

Université de Montréal

Étude du rôle potentiel de l'Endopeptidase Neutre dans la maladie  
d'Alzheimer et Caractérisation de NL1, une nouvelle métallopeptidase à zinc  
chez la souris

par

Mélanie Carpentier-Primi

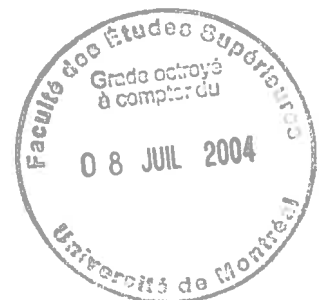
Département de Biochimie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en Biochimie

Janvier, 2004

© Mélanie Carpentier-Primi, 2004.



w

4

U58

2004

v.054



**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**Étude du rôle potentiel de l'Endopeptidase Neutre dans la maladie  
d'Alzheimer et Caractérisation de NL1, une nouvelle métallopeptidase à zinc  
chez la souris**

présentée par:

Mélanie Carpentier-Primi

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Alain Moreau,	président-rapporteur
Luc DesGroseillers,	directeur de recherche
Guy Boileau,	codirecteur
Luis Rokeach,	membre du jury
Hervé LeMoual,	examineur externe

Thèse acceptée le: 26 avril 2004

---

"Après le progrès du savoir, il paraît pour ainsi dire tout à fait normal, qu'il y ait une heureuse conclusion...Mais les années de tâtonnements anxieux dans le noir, l'intensité du désir d'aboutir, les alternances de confiance et d'épuisement, et finalement le débouché en pleine lumière, cela, il faut l'avoir vécu soit même pour le comprendre".

*Albert Einstein*

À mon père, Michel Carpentier.

---

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux patrons, le Dr Luc DesGroseillers et le Dr Guy Boileau pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire. Je voudrais souligner l'intérêt constant qu'ils ont su porter à mon projet et les remercier pour la grande disponibilité et la confiance dont ils ont fait preuve à mon égard.

Je remercie chaleureusement Jean Charron et Lucie Jeannotte avec qui j'ai étroitement collaboré lors de ces deux dernières années. Leur expertise, leur dynamisme et leur grande disponibilité furent une source de motivation et de connaissances inestimables. Je les remercie également pour leur accueil chaleureux. Ils ont su rendre mon séjour parmi eux des plus agréables. Je voudrais également remercier Marcelle Carter et Margot Lemieux du laboratoire de Jean Charron pour leur grande disponibilité et leur amitié.

Je voudrais remercier Mieczyslaw Marcinkiewicz ainsi que Jawija Marcinkiewicz avec qui j'ai eu la chance de collaborer.

Un gros merci à tous les membres des laboratoires de Guy Boileau et Luc DesGroseillers pour leur gentillesse, leur bon conseil et leur bonne humeur. Je tiens également à souligner l'aide inestimable que m'ont portée Line Lespérance, Pierre Melançon, Claire Vézina, Louise Cournoyer et Mireille Fyfe.

Je remercie Jeffrey Rainy et Nancy Harnois pour leur amitié et leur support. Merci pour les bonnes bouffes, le bon vin et les bonnes discussions! Les nombreuses soirées passées en votre compagnie ont été d'une valeur inestimable. Merci Nancy d'avoir été ma L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X-tech des derniers mois. Sans toi, je ne serais pas venue à bout de L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X (sans toi, je n'aurais jamais eu l'idée de m'embarquer dans ce périple mais bon ...). Farce à part Nancy; merci pour tes encouragements et ta disponibilité. Je t'en dois une!

Merci à ma grande amie Nadia Bonvouloir. Merci Nadia pour ta motivation et ton aide lors des longues heures d'études pénibles, pour tes conseils et tes encouragements. Merci pour ta gaieté et ta bonne humeur.

Je remercie du fond du coeur Marc-André Ouellette pour son amour, son soutien quotidien, ses encouragements, sa patience, sa générosité et bien plus encore.

Je tiens à remercier mes parents sans l'aide et le soutien de qui je n'aurais pu compléter

de si longues études. Je leur suis profondément reconnaissante de m'avoir encouragé à me dépasser et de m'avoir légué curiosité et persévérance. Cette thèse est le fruit de leur soutien et de leurs encouragements.

Je dédis cet ouvrage à mon père qui représente à mes yeux le meilleur modèle de courage, de force et de persévérance qu'une fille peut désirer. Merci papa pour tes enseignements.

Finalement, merci au CRSNG et au FCAR pour leur soutien financier et merci aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

---

## Résumé

Au cours des dernières années, une famille particulière de métallopeptidases à zinc, appartenant à la famille des gluzincines, n'a cessé de grandir. Les membres de cette famille présentent d'importantes similarités avec l'Endopeptidase Neutre (EPN) qui en constitue le prototype. Par leurs actions sur les peptides bioactifs, les membres de la famille de l'Endopeptidase Neutre sont impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques. Soulignons par exemple le rôle des enzymes de conversion des endothélines et de l'EPN dans le contrôle de la pression artérielle, de l'EPN dans la perception de la douleur ou de PHEX dans le métabolisme du phosphate. Au cours des dernières années, nous avons tenté de mieux caractériser deux de ces membres soit: l'Endopeptidase Neutre et la peptidase NL1, récemment identifiée dans notre laboratoire.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'étude du rôle potentiel de l'Endopeptidase Neutre dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer. Cette maladie neurodégénératrice est caractérisée par l'accumulation, dans le cerveau et la vasculature cérébrale, de plaques neurotoxiques, composées principalement de peptide amyloïde- $\beta$ . L'accumulation de ce peptide sous forme de plaques constituerait la principale cause de la maladie. Cette accumulation a lieu non seulement chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer mais également dans les petites artères et les leptoméninges de plus de la moitié des personnes âgées de plus de 70 ans, causant ainsi une angiopathie cérébrale de type amyloïde (CAA). Ces hémorragies spontannées et souvent fatales constituent l'une des principales causes d'accident vasculaire cérébral non traumatique.

Une importante étude parue en 2000 suggérait pour la première fois que l'enzyme principalement responsable de la dégradation du peptide amyloïde- $\beta_{1-42}$  dans le cerveau soit l'EPN ou une enzyme dont l'activité est très apparentée. Ainsi, en dégradant le peptide amyloïde- $\beta$ , l'Endopeptidase Neutre participerait à l'élimination du peptide et aurait un rôle neuroprotecteur.

L'accumulation du peptide dans le cerveau des sujets atteints de la maladie d'Alzheimer suggère qu'il existe un déséquilibre entre la synthèse et l'élimination du peptide. Par conséquent, une diminution de l'expression de l'EPN dans le cerveau pourrait contribuer



au déclenchement de la maladie. Afin de confirmer cette hypothèse, nous nous sommes proposé d'étudier les niveaux d'expression de l'EPN dans les cerveaux sains et malades à différents stades de progression de la maladie. La corrélation inverse observée entre l'accumulation de peptide A $\beta$  et les niveaux d'EPN dans le tissu et la vasculature cérébrale suggère que la diminution de l'expression de l'EPN pourrait être reliée à l'accumulation anormale du peptide A $\beta$  observée chez l'humain lors du vieillissement.

Dans un deuxième temps, le projet de recherche visait à mieux caractériser, du point de vue moléculaire et fonctionnel la nouvelle peptidase NL1. L'approche expérimentale qui fut utilisée est la suivante :

1. Étude de l'expression de NL1 au niveau cellulaire et tissulaire
2. Identification de nouveaux substrats pour NL1 et comparaison de son activité enzymatique avec celle de l'Endopeptidase Neutre.
3. Génération et analyse phénotypique de souris déficientes en NL1 (souris knock out).

Nos travaux ont permis de démontrer que NL1 est principalement exprimée dans les testicules mais également au niveau ventral et postérieur du cerveau ainsi que dans l'hypophyse. De plus, nous avons montré que NL1 est la première enzyme de la famille à être sécrétée dans le milieu extracellulaire, où elle est active. Par mutagénèse dirigée ainsi que par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques, nous avons démontré l'importance d'un site dibasique pour la sécrétion de la protéine. L'analyse de l'activité enzymatique de NL1 a permis d'identifier de nouveaux substrats peptidiques pour l'enzyme en plus de souligner son homologie avec l'EPN. Finalement nous savons maintenant que les souris déficientes en NL1 sont viables mais présentent une fertilité réduite. Ainsi, nous avons déterminé que NL1 joue un rôle actif dans les processus reliés à la reproduction.

Mots clés: NL1, Neprilysin-2, Endopeptidase Neutre, peptides, Alzheimer, peptidases, fertilité, ablation génique.

---

## Abstract

An emerging family of metallopeptidases presenting important similarity with Neutral Endopeptidase (Neprilysin) has recently been shown to be involved in the maturation and inactivation of various bioactive peptides. Therefore, this family now represents important therapeutic targets. Members of the Neprilysin family have attracted much attention because of their possible implication in several diseases such as hypertension, Alzheimer's disease and bone diseases. Over the last few years we tried to further characterize two of these members: Neprilysin and the recently identified NL1.

We first studied the potential role of Neprilysin in Alzheimer's disease. This important neurodegenerative disease is characterized by the deposition and accumulation of toxic amyloid  $\beta$  peptide ( $A\beta$ ) in brain tissues forming senile plaques and causing neuronal cell death.  $A\beta$  also forms deposit in the walls of small arteries of leptomeninges and cortex causing cerebral amyloid angiopathy (CAA).  $A\beta$ -induced CAA not only occurs in AD brains but also to various degrees in approximately half of all individuals over 70-year-old. CAA leads to spontaneous and often fatal cerebral haemorrhage and represents one of the major causes of non-traumatic haemorrhage stroke.

The steady-state level of  $A\beta$  peptide in the brain and/or vasculature is determined by the balance between catabolic and anabolic activities. Recent studies reported convincing evidence that the catabolism of the  $A\beta$  peptide plays important role in the establishment and/or progression of AD. These studies strongly suggested that Neprilysin is the peptidase that participates in the degradation and clearance of toxic  $A\beta$ . Therefore a down regulation of Neprilysin expression in brain could contribute to  $A\beta$  peptide deposition and to the onset of the disease.

To demonstrate the involvement of Neprilysin down regulation in AD we localized the enzyme in various brain sections of AD and control cases by RT-PCR and immunocytochemistry. We examined normal and diseased human brain regions with  $A\beta$  deposition including hippocampus, temporal lobe cortex and leptomeninges and provided convincing evidence for down-regulation of Neprilysin expression in these areas of AD brains, consistent with its putative involvement in both AD and CAA.

The second aim of the research project was to further characterize molecularly and functionally the zinc metallopeptidase NL1 which had been recently identified in the laboratory. The experimental strategy employed consisted to:

1. Study the NL1 mRNA expression pattern at tissular and cellular level
2. Identify new peptide substrates for NL1 and compare its activity with Neprilysin. (protein purification, and enzymatic characterization)
3. Generate homozygous NL1<sup>-/-</sup> mice by gene targeting technology.

We demonstrated that NL1 is strongly expressed in mature testis, more precisely in the round and elongated spermatids of seminiferous tubules at all spermiogenesis maturational stages. We also showed that NL1 is moderately expressed in several tissues including brain and pituitary. Moreover, we have established that NL1 is the first member of the family to be processed in the Golgi and secreted in the extracellular space where it degrades several bioactive peptides. Using specific inhibitors and site directed mutagenesis we have identified paired basic residues important for the processing and the secretion of NL1. Finally, using homologous recombination we've disrupted NL1's gene locus. The *NL1*<sup>-/-</sup> mice were shown to be viable and healthy but present reduced fertility. Therefore, we've determined that NL1 plays an important role in processes related to reproduction.

Key words: Neprilysin, Neprilysin-2, NL1, peptidases, Alzheimer, fertility, Knock out, peptides.

---

# Table des matières

Remerciements	iv
Résumé	vi
Abstract	viii
Liste des tableaux	xiv
Liste des figures	xv
Liste des notations et des symboles	xvii
<b>1 Introduction</b>	<b>1</b>
1.1 Communication cellulaire et système peptidergique . . . . .	1
1.1.1 Production et maturation des peptides . . . . .	2
1.1.2 Dégradation des peptides . . . . .	3
1.2 Les métallopeptidases à zinc . . . . .	4
1.2.1 Les gluzincines . . . . .	6
1.2.2 Mécanisme d'action des gluzincines . . . . .	6
1.3 La famille de l'Endopeptidase Neutre . . . . .	8
1.4 L'Endopeptidase Neutre . . . . .	9
1.4.1 Caractéristiques structurales . . . . .	11
1.4.2 Localisation chromosomique et structure du gène . . . . .	14
1.4.3 Régulation de l'expression du gène de l'EPN . . . . .	14
1.4.4 Activité enzymatique/spécificité de clivage . . . . .	16
1.4.5 Les résidus clés du site actif de l'EPN . . . . .	17
1.4.6 Substrats . . . . .	19
1.4.7 Modulation du signal nociceptif . . . . .	23
1.4.8 Rôle de l'EPN dans la maladie d'Alzheimer . . . . .	24
1.4.9 Régulation de l'équilibre hydro-sodé et de la pression artérielle . . . . .	28
1.4.10 Régulation de la réaction inflammatoire . . . . .	29
1.4.11 Digestion des peptides du bol alimentaire et régulation du transit gastro-intestinal. . . . .	31
1.4.12 Différenciation et prolifération cellulaire . . . . .	32
1.4.13 Forme sécrétée de l'EPN dans les fluides physiologiques . . . . .	33
1.4.14 Autres fonctions . . . . .	34
1.5 ECE . . . . .	36
1.5.1 ECE-1 . . . . .	37
1.5.2 ECE-2 . . . . .	40
1.6 PHEX . . . . .	42

1.7	KELL . . . . .	45
1.8	ECEL1/XCE/DINE . . . . .	48
1.9	Projet de Recherche . . . . .	50
<b>Préambule au chapitre 2</b>		<b>53</b>
<b>2</b>	<b>Declining Expression of Neprilysin in Alzheimer's Disease Vasculature: Possible Involvement in Cerebral Amyloid Angiopathy</b>	<b>55</b>
2.1	Abstract . . . . .	55
2.2	Introduction . . . . .	56
2.3	Materials and Methods . . . . .	57
2.4	Results . . . . .	59
2.4.1	Detection of Neprilysin transcripts . . . . .	59
2.4.2	Anti-Neprilysin antibody specificity . . . . .	60
2.4.3	Neprilysin expression in hippocampus . . . . .	61
2.4.4	Neprilysin in blood vessels of cortex and leptomeninges . . . . .	62
2.5	Discussion . . . . .	67
2.6	Aknowlegments . . . . .	69
<b>Préambule au chapitre 3</b>		<b>70</b>
<b>3</b>	<b>Molecular cloning and biochemical characterization of a new mouse testis soluble-zinc-metallopeptidase of the neprilysin family</b>	<b>71</b>
3.1	Abstract . . . . .	71
3.2	Introduction . . . . .	72
3.3	Materials and Methods . . . . .	74
3.4	Results . . . . .	78
3.4.1	NL1 expression in HEK 293 cells . . . . .	83
3.4.2	Processing of NL1 by a subtilisin-like convertase . . . . .	84
3.4.3	NL1 enzymatic activity . . . . .	87
3.4.4	Tissue and cellular distribution of NL1 mRNA . . . . .	90
3.5	Discussion . . . . .	93
3.6	Acknowledgments . . . . .	97
<b>Préambule au chapitre 4</b>		<b>98</b>
<b>4</b>	<b>The Neuropeptide-degrading enzyme NL1 is expressed in specific neurons of mouse brain.</b>	<b>99</b>
4.1	Abstract . . . . .	99
4.2	Introduction . . . . .	100
4.3	Materials and Methods . . . . .	102
4.4	Results . . . . .	103
4.4.1	<i>In situ</i> hybridization . . . . .	103
4.4.2	Peptides degradation . . . . .	106
4.5	Discussion . . . . .	113
4.6	Acknowledgments . . . . .	115

<b>Préambule au chapitre 5</b>	<b>116</b>
<b>5 Reduced fertility in male mice deficient in the zinc metallopeptidase NL1</b>	<b>117</b>
5.1 Abstract . . . . .	117
5.2 Introduction . . . . .	118
5.3 Materials and methods . . . . .	120
5.4 Results . . . . .	123
5.4.1 Generation of a <i>Nl1</i> mutant allele in ES cells . . . . .	123
5.4.2 Generation of Nl1 mutant mice and Mendelian distribution of off-springs . . . . .	128
5.4.3 <i>Nl1</i> <sup>-/-</sup> male mice show reduced fertility . . . . .	129
5.4.4 Testis development and spermatozoa parameters are normal . . . . .	130
5.4.5 <i>Nl1</i> mutation reduces both sperm fertilizing capacity and early embryonic development . . . . .	132
5.5 Discussion . . . . .	137
5.5.1 NL1 modulates two different processes related to fertility . . . . .	138
5.5.2 NL1 is downstream of the protein convertase PC4 . . . . .	139
5.5.3 Putative functional compensation by other peptidases . . . . .	140
5.6 Acknowledgments . . . . .	141
<b>Préambule au chapitre 6</b>	<b>142</b>
<b>6 M684. Neprilysin-2</b>	<b>143</b>
6.1 Databanks . . . . .	143
6.2 Name and History . . . . .	143
6.3 Activity and Specificity . . . . .	144
6.4 Structural chemistry . . . . .	145
6.5 Preparation . . . . .	147
6.6 Biological aspects . . . . .	147
6.7 Distinguishing features . . . . .	148
6.8 Related peptidase . . . . .	149
6.9 Further reading . . . . .	149
<b>7 Discussion</b>	<b>150</b>
7.1 Importance de l'EPN dans la maladie d'Alzheimer . . . . .	150
7.1.1 Autres candidats dans la dégradation des peptides amyloïdes . . . . .	153
7.1.2 L'EPN dans les astrocytes activés . . . . .	156
7.2 NL1: un nouveau membre de la famille de l'Endopeptidase Neutre . . . . .	160
7.2.1 MMEL2: homologue humain de NL1? . . . . .	164
7.2.2 Fonctions physiologiques de NL1 . . . . .	165
7.2.3 Rôle(s) de NL1 dans la reproduction . . . . .	166
7.2.4 Autres rôles potentiels de NL1 . . . . .	171
7.2.5 Conclusions et Projets futurs. . . . .	172
7.3 Conclusions générales . . . . .	176

---

<b>Bibliographie</b>	<b>177</b>
<b>A Contributions des différents auteurs</b>	<b>219</b>
A.1 Chapitre 2: Declining Expression of Neprilysin in Alzheimer's Disease Vasculature: Possible Involvement in Cerebral Amyloid Angiopathy . . . . .	219
A.2 Chapitre 3: Molecular cloning and biochemical characterization of a new mouse testis soluble-zinc-metallopeptidase of the neprilysin family . . . . .	220
A.3 Chapitre 4: The Neuropeptide-degrading enzyme NL1 is expressed in specific neurons of mouse brain. . . . .	221
A.4 Chapitre 5: Reduced fertility in male mice deficient in the zinc metallopeptidase NL1 . . . . .	222
A.5 Chapitre 6: M684. Neprilysin-2 . . . . .	223

---

## Liste des tableaux

1.1	Substrats peptidiques de l'Endopeptidase Neutre . . . . .	20
1.2	Comparaison des séquences en acides aminés des membres de la famille de l'Endopeptidase Neutre . . . . .	37
1.3	Substrats peptidiques d'ECE-1 . . . . .	39
1.4	Substrats peptidiques d'ECE2 . . . . .	41
1.5	Substrats peptidiques de PHEX . . . . .	44
3.1	Comparison of NL1 with other members of the Neprilysin family. . . . .	83
3.2	Comparison of NL1 and soluble Neprilysin enzymatic parameters with D-Ala <sup>2</sup> -Leu <sup>5</sup> -enkephalin. . . . .	87
4.1	Comparison of the distribution of <i>Nl1</i> mouse mRNA with NEP rat mRNA in adult nervous system . . . . .	108
4.2	Comparison of enzymatic efficiency of soluble NL1 toward peptides substrates	111
5.1	Oligonucleotide sequences used for PCR amplification of genomic DNA . . . . .	124
5.2	Exon-intron boundaries of the murine <i>Nl1</i> gene . . . . .	125
5.3	NL1 genotypes of the F2 progeny from F1 heterozygote intercrosses. . . . .	128
5.4	Reduced fertility of male <i>Nl1</i> <sup>-/-</sup> mice. . . . .	129
5.5	Comparison of sperm motility parameters from wild type and <i>Nl1</i> <sup>-/-</sup> mice	133
5.6	Fertilizing capacity of <i>Nl1</i> <sup>-/-</sup> males and early embryo development . . . . .	133



---

## Liste des figures

1.1	Classification des métallopeptidases à zinc . . . . .	5
1.2	Mécanisme d'action de la thermolysine . . . . .	8
1.3	Les métallopeptidases de la famille de l'Endopeptidase Neutre . . . . .	10
1.4	Structure tridimensionnelle de l'EPN . . . . .	13
1.5	Nomenclature du site actif des peptidases . . . . .	17
1.6	Modélisation du site actif de l'Endopeptidase Neutre . . . . .	18
2.1	Expression of human Neprilysin mRNA transcripts in cerebral cortex. . . . .	60
2.2	Specificity of the 18B5 anti-Neprilysin monoclonal antibody . . . . .	61
2.3	Decreased Neprilysin immunoreactivity levels in AD hippocampus. . . . .	62
2.4	Presence of Neprilysin in reactive astrocytes in AD. . . . .	63
2.5	Decreased Neprilysin immunostaining in smooth muscle cells of blood vessels. . . . .	65
2.6	Neprilysin immunostaining on cryostat sections in cerebral vasculature . . . . .	66
3.1	Partial amino acid sequence alignment of human Neprilysin, ECE-1 and PHEX . . . . .	79
3.2	Nucleotide and deduced amino acid sequences of NL1 cDNA cloned from mouse testis. . . . .	81
3.3	Amino acid sequence comparison of NL1 and Neprilysin. . . . .	82
3.4	Immunoblot analysis of NL1-transfected HEK 293 cells. . . . .	84
3.5	Analysis of NL1 processing in HEK 293 cells. . . . .	86
3.6	NL1 enzymatic activity. . . . .	88
3.7	HPLC analysis of degradation products of Leu5-enkephalin. . . . .	89
3.8	Tissue distribution of mouse NL1 mRNA by Northern blot and RT-PCR analysis. . . . .	91
3.9	NL1 mRNA distribution in adult mouse testis observed by in situ hybridization. . . . .	92
4.1	Distribution of NL1 mRNA in the brain. . . . .	104
4.2	Distribution of NL1 mRNA in the brain. . . . .	109
4.3	Heterogeneity of NL1 mRNA distribution in brain regions (A-R in rostro-caudal direction) and trigeminal ganglion (T) at cellular levels. . . . .	110
4.4	Distribution of NL1 mRNA in the pituitary gland. . . . .	111
4.5	<i>in vitro</i> hydrolysis of peptides known to be expressed in the same brain regions as NL1. . . . .	112
5.1	Disruption of the <i>Nl1</i> gene. . . . .	127
5.2	Histological analysis of testis from <i>Nl1</i> <sup>-/-</sup> and <i>Nl1</i> <sup>+/+</sup> mice. . . . .	131
5.3	Embryos recovery at 3.5 days of gestation. . . . .	134
5.4	<i>In vivo</i> fertilization analysis. . . . .	136

---

7.1	Biogénèse et métabolisme du peptide A $\beta$ . . . . .	152
7.2	Rôle de l'Endopeptidase Neutre et d'autres métallopeptidases dans le cata- bolisme du peptide A $\beta$ . . . . .	155
7.3	Représentation schématique de NL1 . . . . .	161
7.4	La fertilisation de l'oeuf . . . . .	167

---

## Liste des notations et des symboles

A $\beta$	Amyloide- $\beta$
ACE	Angiotensin Converting enzyme/enzyme de conversion de l'angiotensine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN <sub>c</sub>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ANP	Atrial natriuretic peptide/peptide natriurétique auriculaire
AMP	Adenosine monophosphate
ARN	Acide ribonucléique
ARN <sub>m</sub>	ARN messenger
CALLA	Common acute lymphoblastic leukemia antigen
CD10	cluster differentiation 10
CHO	Chinese hamster ovaries
ECE	Endothelin converting enzyme/Enzyme de conversion de l'endothéline
ECEL1	Endothelin-converting enzyme like 1
EPN	Endopeptidase neutre
EST	Expressed sequence tag
ET	Endothéline
GMC-SF	Granulocyte Macrophage colony stimulating factor
HPLC	High performance liquid chromatography
kDa	kiloDalton
Leu-enképhaline	Leucine-enképhaline
LPS	Lipopolysaccharides
NEP	Neutral endopeptidase
NL1	Nep-like 1
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase chain reaction
PHEX	Phosphate regulating gene with homologies with endopeptidases on the X chromosome
Pi	Phosphate inorganique
PPi	Pyrophosphate
PTH	Parathormone
PTHrP	PTH-related peptide
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis
SNC	Système nerveux central
SP	Substance P

---

TLN	Thermolysine
TNF	Facteur de croissance tumorale/tumor necrosis factor
UTR	Untranslated region
XLH	X-linked hypophosphatemia
3'UTR	Région 3'non traduite/ 3' untranslated region
5'UTR	Région 5'non traduite/ 5' untranslated region

# 1

---

## Introduction

### 1.1 Communication cellulaire et système peptidergique

Les cellules eukaryotes communiquent entre elles grâce à des mécanismes sophistiqués de propagation de l'information. Cette signalisation intercellulaire permet à chaque cellule de déterminer sa position et sa fonction spécialisée dans le but d'en faire bénéficier l'organisme tout entier. Les cellules peuvent communiquer entre elles par deux mécanismes distincts. La première façon consiste en l'interaction directe entre deux cellules. Cette communication cellulaire par interaction directe peut s'effectuer soit par une interaction entre une protéine de la surface d'une première cellule et un récepteur membranaire de la cellule cible, soit par le biais de jonctions trouées (*GAP junction*). Les jonctions trouées constituent des canaux qui permettent le passage directe de petites molécules signalisatrices, telles que l'AMP cyclique et le calcium, entre les cytoplasmes des deux cellules. Le second mécanisme de signalisation implique la sécrétion d'un messager dans le milieu extracellulaire qui pourra diffuser et interagir avec un récepteur spécifique de la cellule cible. L'avantage de ce système est que le messager peut agir non seulement sur les cellules avoisinantes (signalisation de type paracrine) mais également sur des cellules situées à une très grande distance (signalisation de type endocrine).

Des centaines de molécules différentes sont utilisées par les cellules pour communiquer entre elles. Parmi celles-ci on retrouve des protéines, des petits peptides, des acides aminés, des nucléotides, des dérivés d'acides gras, des stéroïdes, des rétinoïdes, et même des gaz. La plupart des ces messagers sont sécrétés par la cellule par exocytose. Toutefois, certains messagers peuvent également être relargués par diffusion à travers la membrane cellulaire. Les messagers hydrophiles (ex: neuropeptides, hormones peptidiques) interagissent avec

leur récepteur situé à la surface de la cellule cible car ils ne peuvent traverser la membrane plasmique. Quant aux messagers hydrophobes (ex: stéroïdes), ils voyagent dans le milieu extracellulaire grâce à des protéines de transport et interagissent généralement avec des récepteurs situés à l'intérieur de la cellule afin de provoquer une réponse physiologique spécifique.

Les peptides sont des molécules messagères hydrophiles constituées de 100 acides aminés ou moins, impliquées dans une variété de phénomènes physiologiques. L'utilisation de peptides comme molécule signalisatrice implique généralement trois étapes (revue par Snyder (1985)): d'abord, la production, la sécrétion et la maturation du peptide par des cellules spécialisées, puis, l'interaction du peptide actif avec son récepteur spécifique à la surface des cellules cibles et finalement, sa dégradation extracellulaire ou sa recapture afin de terminer son action. La première et la dernière étape nécessitent l'action de peptidases auxquelles notre groupe s'intéresse depuis plusieurs années. Les prochaines sections permettront d'aborder quelques aspects généraux des mécanismes de régulation des messagers peptidiques.

### 1.1.1 Production et maturation des peptides

La première étape de la signalisation cellulaire peptidergique consiste en la production et la sécrétion d'un messenger peptidique par une cellule spécialisée. Plusieurs peptides bioactifs ne sont pas directement synthétisés sous forme active mais requièrent une ou plusieurs étapes supplémentaires de maturation intra ou extracellulaire (revue par : Seidah et al. (1998), Khan & James (1998), et Mizuno & Matsuo (1994)) Cette maturation peut prendre plusieurs formes comme l'acétylation, l'amidation et la protéolyse. Les messagers peptidiques sont souvent initialement synthétisés sous forme de molécules précurseurs de haut poids moléculaire à partir desquels ils sont ultérieurement maturés pour devenir biologiquement actifs. Ces précurseurs peptidiques peuvent contenir soit un seul peptide, soit plusieurs copies du même peptide et/ou soit plusieurs peptides différents. La maturation protéolytique des précurseurs peptidiques est assurée par différentes endo- et exoprotéases. Plusieurs précurseurs comme la pro-opiomélanocortine et la proinsuline sont activés à l'intérieur de l'appareil trans-Golgien ou dans les granules de sécrétion des cellules par des protéases de la famille de la subtilisine aussi appelées pro-hormones convertases (PC). Ces

prohormones convertases clivent les précurseurs peptidiques au niveau de sites spécifiques composés essentiellement des résidus basiques lysine et arginine. Ces résidus se retrouvent soit sous forme de singleton, soit de doublet (Lys-Arg, Arg-Arg, Lys-Lys ou Arg-Lys). De plus, la nature des acides aminés entourant le site potentiel de coupure ainsi que la structure secondaire adoptée par la région peptidique constituent d'importants facteurs régulant la maturation des peptides. Certains peptides tels que les endothélines et l'angiotensine I, sont plutôt relâchés dans le milieu extracellulaire sous une forme inactive. Ces derniers doivent alors subir une étape supplémentaire de maturation par d'autres enzymes protéolytiques telles que les métallopeptidases à zinc membranaires afin de devenir biologiquement actifs (revue par Turner & Tanzawa (1997)). Une fois activés, les messagers peptidiques peuvent interagir avec leurs récepteurs spécifiques au niveau des cellules cibles afin de déclencher une réponse physiologique.

### 1.1.2 Dégradation des peptides

L'intensité et la durée d'une réponse physiologique sont régulées, en partie, par la concentration du messenger peptidique à proximité des cellules cibles. Trois mécanismes permettent de contrôler la concentration des peptides au niveau de leur récepteur et donc de moduler le signal physiologique enclenché:

1. La désensibilisation du récepteur vis-à-vis de son ligand peptidique (l'endocytose du récepteur ou son découplage de sa protéine G hétérotrimérique)
2. La recapture du peptide par la cellule signalisatrice (par un neurone présynaptique)
3. La dégradation du peptide par des protéases de la surface cellulaire.

Pour la majorité des peptides, leur dégradation et/ou la désensibilisation de leur récepteur constituent les principaux mécanismes de modulation du signal peptidergique. La recapture semble être un phénomène très rare puisque ce mécanisme de régulation de la signalisation par des messagers peptidiques ne fut rapporté que dans le cas du peptide natriurétique auriculaire (ANP) (Maack et al. 1987, Fuller et al. 1988, Chabrier et al. 1990). La régulation de l'activité biologique des peptides constitue donc un phénomène essentiel dans lequel un groupe d'enzymes nommées métallopeptidases à zinc joue un rôle clé (Turner & Tanzawa 1997). Toutes ces enzymes catalysent l'hydrolyse d'un lien peptidique. L'Endopeptidase Neutre (EPN) qui sera discutée à la section 1.4 de cet ouvrage constitue un des exemples les mieux caractérisés de ce type d'enzyme.

## 1.2 Les métallopeptidases à zinc

Les métallopeptidases à zinc participent à la régulation de la communication cellulaire peptidergique de 2 façons soit:

1. En activant un précurseur peptidique inactif.
2. En inactivant un peptide actif.

L'activation d'un précurseur peptidique inactif va permettre l'interaction du peptide avec son récepteur situé à la surface de la cellule cible. Ceci va favoriser la transmission du signal à l'intérieur de la cellule et le déclenchement d'une réponse physiologique. À l'inverse, l'hydrolyse d'un peptide actif va empêcher son interaction avec le récepteur et donc bloquer la transmission du signal à l'intérieur de la cellule cible. Ainsi, par leur action sur les peptides bioactifs, les métallopeptidases à zinc sont en mesure de moduler l'intensité et la durée d'une réponse physiologique. Ces enzymes, qui sont essentielles au maintien de l'homéostasie sont d'ailleurs responsables de la modulation de plusieurs processus d'ordre physiologiques et pathophysiologiques. Elles participent entre autres au développement embryonnaire, à la reproduction, à la formation des os et à la modulation de plusieurs signaux neuronaux. De plus, les métallopeptidases à zinc ont également été impliquées dans plusieurs maladies ou infections telles que le tétanos, le botulisme, l'infection par le VIH (virus d'immunodéficience humaine), l'arthrite, certains types de cancer, l'hypertension, le rachitisme, la maladie d'Alzheimer et le diabète.

Les métallopeptidases à zinc constituent une classe d'enzymes très diversifiées caractérisée par la présence d'un (parfois deux) atome(s) de zinc au niveau de leur site actif. Cet ion métallique constitue un élément essentiel du mécanisme d'action de ces enzymes. Les métallopeptidases à zinc possèdent dans leur séquence un motif appelé signature du zinc. Ce motif consiste en une séquence consensus composée des acides aminés liant le zinc et d'un acide glutamique essentiel à la catalyse. De plus, la comparaison des séquences de plusieurs métallopeptidases à zinc a permis de regrouper ces enzymes en différentes familles selon la nature et l'organisation des résidus présents dans le motif signature (Figure 1.1).



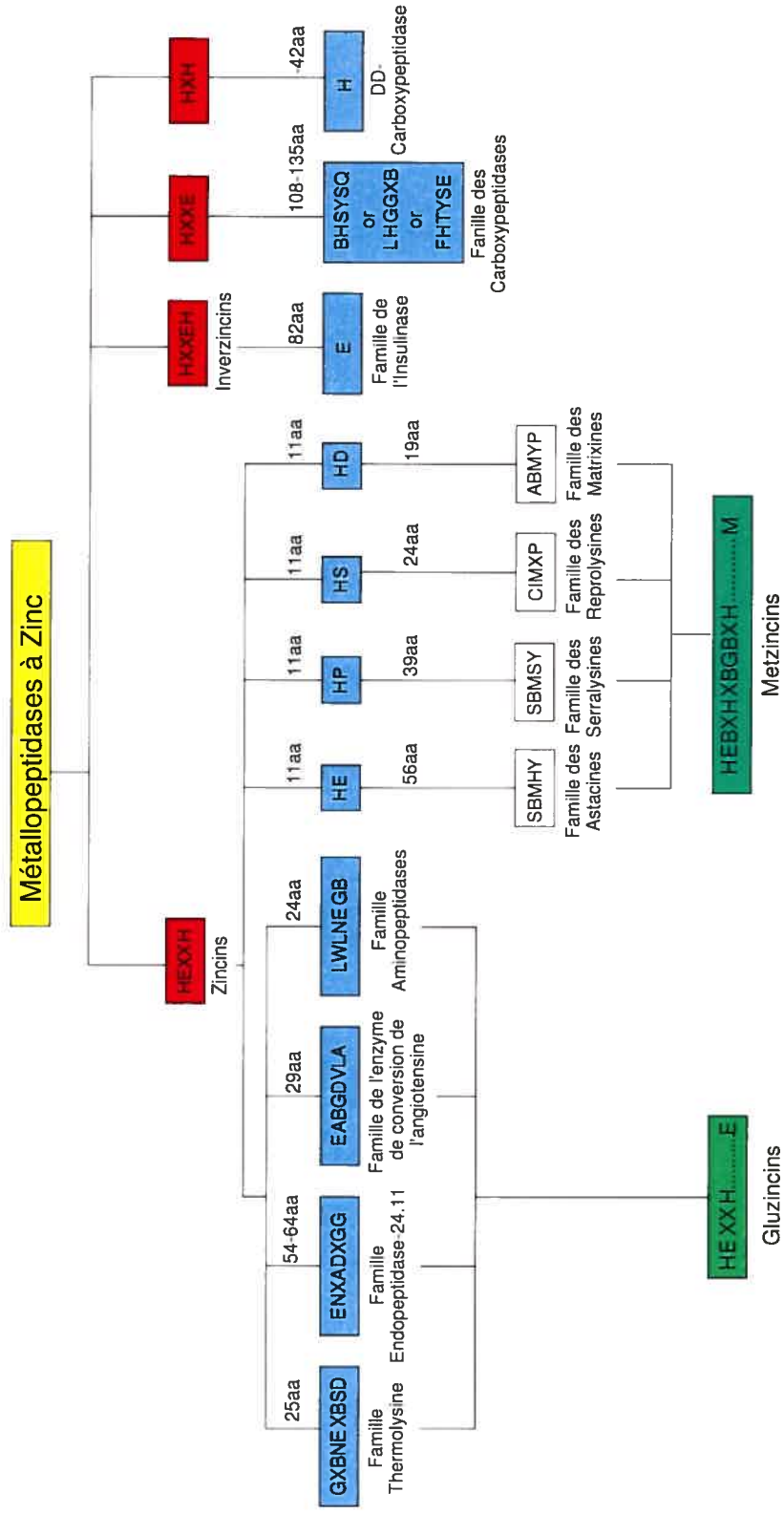


Figure 1.1 – Classification des métallopeptidases à zinc

Quatre superfamilles, caractérisées par quatre motifs signatures ont été identifiées soit: les zincines, les inverzincines, les carboxypeptidases et les DD-carboxypeptidases. Les zincines sont caractérisées par la présence de la séquence consensus **HEXXH** au niveau de leur site actif. Les deux histidines constituent les ligands du zinc alors que l'acide glutamique est impliqué dans la catalyse enzymatique. Les inverzincines présentent quant à elles la séquence **HXXEH** et les carboxypeptidases le motif **HXXE**. Finalement, les DD-carboxypeptidases contiennent le motif signature du zinc **HXH** (Figure 1.1). Dans cet ouvrage, il sera uniquement question des métallopeptidases de la classe des zincines, plus particulièrement de la sous-classe des gluzincines. Ainsi, les sections suivantes présentent un survol des caractéristiques structurales et enzymatiques de cette classe de peptidases.

### 1.2.1 Les gluzincines

À l'intérieur de la superfamille des zincines on retrouve les gluzincines qui utilisent, en plus de deux histidines, un acide glutamique comme troisième ligand du zinc. Cet acide glutamique est situé 24 à 64 résidus en aval du motif de type zincine. Leur motif signature devient alors **HEXXH..... E**. Ce sous-groupe rassemble les familles de la thermolysine, de l'Endopeptidase Neutre (EPN), de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) et des aminopeptidases. Ces quatre familles se distinguent par la nature des résidus entourant l'acide glutamique qui participe à la liaison au zinc.

### 1.2.2 Mécanisme d'action des gluzincines

Le mécanisme d'action des métallopeptidases à zinc est semblable pour l'ensemble de celles-ci. La thermolysine (TLN) est une enzyme bactérienne de *Bacillus thermoproteolyticus* appartenant à la famille des gluzincines. Sa petite taille et sa nature soluble en ont fait un modèle de choix pour l'étude des métallopeptidases à zinc. Elle fut la première protéase contenant un motif **HEXXH** à être cristallisée et son site actif fut largement étudié. Ce sont les études de Matthews (1988) qui ont permis d'élucider le mécanisme d'action de la thermolysine qui constitue, encore aujourd'hui, l'archétype de la famille des gluzincines.

Chez les métallopeptidases à zinc de type hydrolase, telles que la thermolysine et l'Endopeptidase Neutre, l'ion métallique effectue une liaison de coordination avec une molécule d'eau et trois acides aminés de l'enzyme. Les résidus le plus fréquemment retrouvés en tant

que ligands du zinc sont: histidine >> acide glutamique > acide aspartique. De plus, la molécule d'eau, ainsi retenue dans le site actif, est directement responsable du clivage du lien peptidique.

L'hydrolyse du lien peptidique débute par la formation d'une liaison de coordination entre l'atome de zinc du site actif et l'oxygène du lien peptidique à cliver. Le zinc passe ainsi d'un état de tétracoordination à un état de pentacoordination. Ceci favorise la polarisation d'une molécule d'eau, associée à l'acide glutamique retrouvé dans le motif **HEXXH** du site actif de l'enzyme. La molécule d'eau sert alors de nucléophile puissant capable d'attaquer le carbone du lien peptidique à cliver. Il s'ensuit la protonation de l'atome d'azote de ce lien provoquant la scission du lien peptidique et la formation de deux sous produits (figure 1.2).

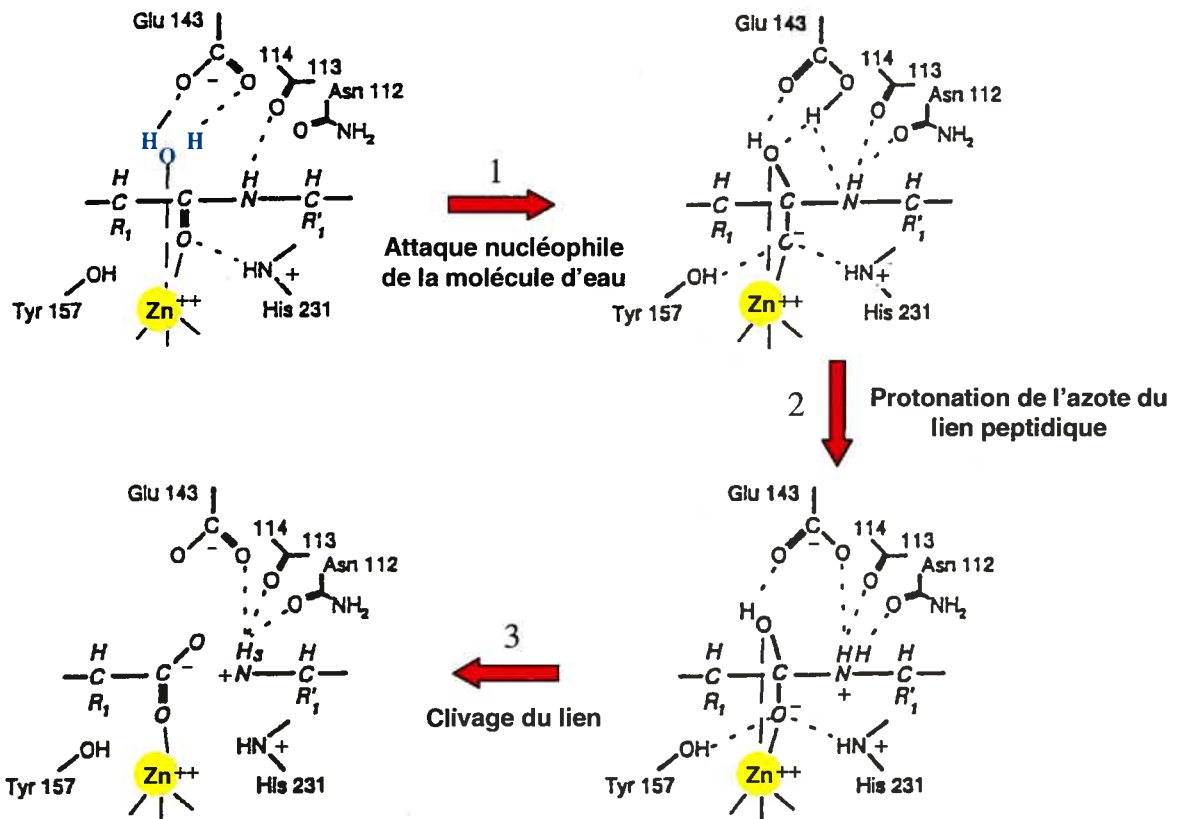


Figure 1.2 – Mécanisme d'action de la thermolysine. L'hydrolyse du lien peptidique par la thermolysine débute par la formation d'une liaison de coordination entre l'atome de zinc du site actif et l'oxygène du lien peptidique à cliver. Le zinc passe ainsi d'un état de tétracoordination à un état de pentacoordination. Ceci favorise la polarisation d'une molécule d'eau, associée à l'acide glutamique retrouvé dans le motif **HEXXH** du site actif de l'enzyme. La molécule d'eau sert alors de nucléophile puissant capable d'attaquer le carbone du lien peptidique à cliver. Il s'ensuit la protonation de l'atome d'azote de ce lien provoquant la scission du lien peptidique et la formation de deux sous produits.

### 1.3 La famille de l'Endopeptidase Neutre

Au cours des dernières années, une famille particulière de métallopeptidases à zinc, appartenant à la famille des gluzincines, n'a cessé de grandir. Les membres de cette famille présentent d'importantes similarités avec l'Endopeptidase Neutre qui en constitue le prototype. Jusqu'à maintenant, la famille de l'EPN comprend 7 membres soit: l'EPN,

*PHEX* (phosphate regulating gene with homologies to endopeptidase on the X chromosome), le complexe antigénique Kell des érythrocytes, *ECE-1* (enzyme de conversion de l'endothéline-1), *ECE-2*, *ECEL1* (enzyme de conversion de l'endothéline-like 1) et la protéine sécrétée *NL1* (Neprilysin-like 1) (Figure 1.3). Parmi les caractéristiques communes de ces enzymes on retrouve, en plus du motif des gluzincines, la séquence ENXADXGG où l'acide glutamique constitue le troisième ligand du zinc. L'acide aspartique, présent dans ce motif est quant à lui impliqué dans l'activité catalytique ainsi que dans la stabilisation de l'état de transition. Cette séquence consensus se situe 64 acides aminés en aval du motif de liaison au zinc **HEXXH**. Les peptidases constituant cette famille sont des glycoprotéines transmembranaires de type II. Elles possèdent une courte queue cytoplasmique à l'extrémité N-terminale, un domaine transmembranaire et un large domaine extracellulaire à l'extrémité C-terminale, qui contient le site actif. L'alignement des séquences de ces enzymes montre que outre le motif consensus **HEXXH....E**, ces glycoprotéines présentent d'importantes similitudes au niveau de leur domaine extracellulaire. Par exemple, dix résidus cystéines situés dans le domaine extracellulaire sont conservés suggérant un repliement tridimensionnel semblable impliquant des ponts disulfures (Tam et al. 1985). De plus, la plupart des acides aminés importants pour la catalyse chez l'EPN tels que l'asparagine 542, l'asparagine 650 et l'histidine 711 sont aussi conservés chez les autres peptidases. Ces observations suggèrent que ces enzymes possèdent, en plus de leur structure, un mécanisme enzymatique similaire, tout en conservant leur spécificité de substrat. Finalement, l'importante similarité entre les membres de la famille de l'EPN suggère une origine commune pour ces enzymes.

## 1.4 L'Endopeptidase Neutre

L' Endopeptidase Neutre a d'abord été isolée par Kerr et Kenny en 1974 à partir de la membranes de bordure en brosse de rein de lapin. Initialement caractérisée comme une métallopeptidase à zinc semblable à l'enzyme bactérienne thermolysine, l'EPN a été isolée en tant que glycoprotéine de 90-100 kDa constituant 4-5 % de la masse protéique de la bordure en brosse de tubules contournés proximaux de reins de lapin. Quatre ans plus tard, elle fut redécouverte une deuxième fois comme l'enképhalinase responsable de la dégradation spécifique des enképhalines dans le cerveau. Finalement, l'EPN fut découverte

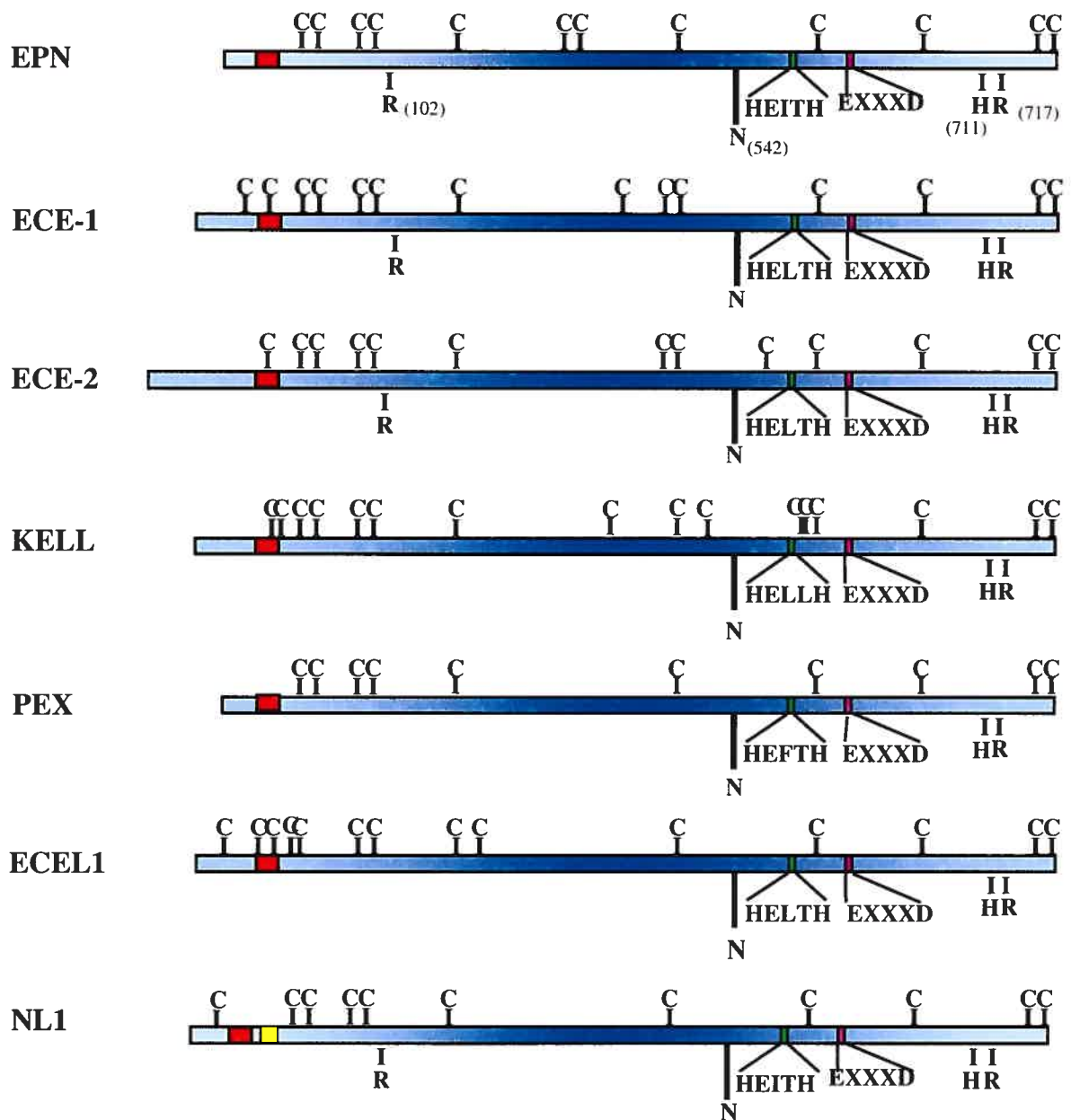


Figure 1.3 – Représentation schématisques des métallopeptidases de la famille de l'Endopeptidase Neutre. Les lettres C représentent les résidus cystéines. Le domaine transmembranaire est représenté en rouge. Le motif signature de liaison au zinc est en vert et le motif consensus EXXXD en rose. Les acides aminés importants pour la catalyse ou la liaison au substrat qui sont conservés avec l'EPN sont également indiqués.

une troisième fois lors du clonage de l'ADNc de CALLA (Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen/CD10) un antigène de surface des lymphocytes B immatures, marqueur du développement de la leucémie lymphoblastique aiguë de type B. En raison de cette triple découverte et de ses multiples rôles physiologiques, plusieurs noms tels que Enképhalinase, Endopeptidase Neutre (EPN ou NEP), CALLA, CD10 (cluster differentiating 10), MME (membrane metallo-endopeptidase) et Néprilysine ont été attribués à cette enzyme.

### 1.4.1 Caractéristiques structurales

La structure primaire complète de l'EPN a été déduite à partir de l'ADNc de lapin, de rat, de souris et d'humain (Devault et al. 1987, Malfroy et al. 1987, Chen et al. 1992, Letarte et al. 1988, Malfroy et al. 1988). La comparaison des séquences de l'EPN entre les différentes espèces de mammifères a révélé une identité de séquence supérieure à 90% au niveau des acides aminés, indiquant un taux de conservation très élevé à travers ces espèces. L'EPN est une glycoprotéine transmembranaire de type II constituée de 749 acides aminés. L'ectodomaine contient plusieurs résidus asparagines faisant partie d'une séquence consensus pour la N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr où X représente n'importe quel acide aminé sauf une proline). L'enzyme de lapin contient 5 de ces sites alors que l'EPN de rat, de souris et d'humain en contient 6. Selon le tissu ou l'espèce d'origine, la masse moléculaire apparente de l'EPN varie de 87 à 110 kDa (Roques et al. 1993). Ces variations provenant du niveau de glycosylation de l'enzyme n'ont cependant pas d'effet sur son activité enzymatique (Landry et al. 1993, Fulcher et al. 1983). En revanche, la présence globale de ces sucres, assure un bon repliement de la protéine, un transport adéquat jusqu'à la membrane plasmique et une activité enzymatique optimale (Lafrance et al. 1994). L'influence de la glycosylation de l'EPN sur son transport à la membrane plasmique résulte d'un effet cumulatif de l'ensemble des sucres plutôt que de la participation d'un ou quelques sites particuliers. Par contre, l'activité enzymatique maximale de la protéine dépend de la glycosylation de deux sites spécifiques soit les Asn en position 145 et 629.

À la surface cellulaire, l'EPN adopte une structure globulaire très compacte (Kenny et al. 1983). Chez certaines espèces telles que le rat et le porc, l'enzyme existe sous forme d'homodimères à la surface cellulaire (Kenny et al. 1983, Varandani & Shroyer 1977). Ces dimères sont composés de deux sous-unités de 89-95 kDa interagissant de façon non co-

valente. Toutefois, de récentes études de cristallographie ont démontré que l'ectodomaine de l'EPN humaine, complexée au phosphoramidon, se présente sous forme de monomère en solution (Oefner et al. 2000). Chez l'homme, une forme tétramérique de l'EPN a déjà été isolée mais aucune fonction n'a encore été attribuée à cette structure oligomérique de l'enzyme (Ishida et al. 1983). L'analyse de la structure cristallographique de l'ectodomaine de l'EPN, résolue avec une précision de 2,1 Å, révèle que l'enzyme est composée de 2 domaines en hélices alpha (figure 1.4). Ces deux domaines peuvent être considérés comme deux lobes connectés par 4 segments polypeptidiques. Avec les 4 régions charnières, les deux domaines forment une cavité centrale, presque sphérique, qui contient le site actif de l'enzyme. Le domaine 1 est constitué de 321 acides aminés. Il est formé de trois segments polypeptidiques non consécutifs. Il contient les résidus importants pour la coordination de l'atome de zinc et pour la catalyse. Le domaine 1 ressemble structurellement à d'autres métallopeptidases à zinc telles que la TLN, la métallo-élastase microbienne et la protéase neutre de *Bacillus Cereus*. Le deuxième domaine, plus petit, est formé de 2 polypeptides non consécutifs composés de 286 acides aminés. Ce domaine montre une faible similarité avec la glycosyl hydrolase et ne contient aucun résidu impliqué dans la liaison au phosphoramidon ou dans la catalyse.



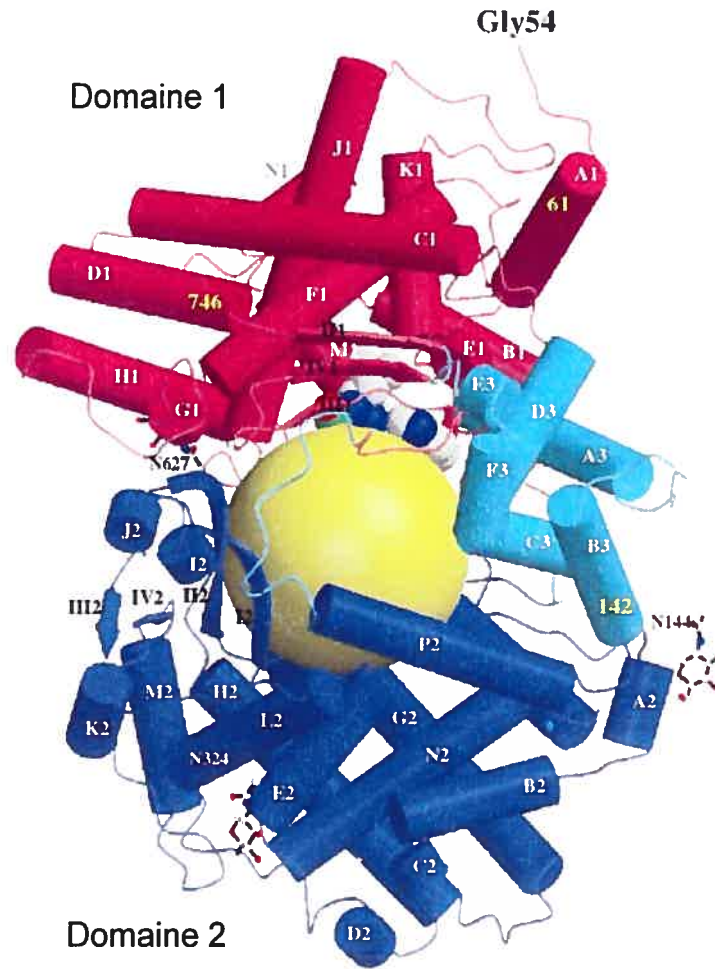


Figure 1.4 – Structure tridimensionnelle de l'EPN. Le domaine 1 est représenté en rouge et le domaine 2 en bleu. La sphère jaune représente l'espace occupé par le phosphoramidon. Figure adaptée de Oefner et al. (2000)

### 1.4.2 Localisation chromosomique et structure du gène

Le gène de l'EPN fut localisé par hybridation *in situ* dans la région 3q21-27 du chromosome 3 humain à proximité de deux autres protéines transmembranaires de type II: le récepteur de la transferrine et la sucrase isomaltase (Barker et al. 1989, Tran-Paterson et al. 1989). Le gène de l'EPN est composé de 25 petits exons répartis sur plus de 80 kb. La taille des exons codants varie entre 36 pb et 162 pb tandis que celle des introns se situe entre 106 pb et 13,5 kb. L'exon 4 contient le site d'initiation de la traduction, la région amino-terminale cytosolique et le domaine transmembranaire. Les exons 5 à 24 contiennent la majeure partie de l'ectodomaine incluant le site actif et l'exon 25, les 32 derniers acides aminés ainsi que la totalité de la région 3' non traduite (3'UTR). Cette région du gène contient 5 sites potentiels de polyadénylation qui pourraient permettre de réguler la stabilité des transcrits. Le motif signature du zinc, HEITH, est codé par l'exon 20. Quant aux exons 1 à 3, ils contiennent la partie 5' non traduite (5'UTR) et sont en partie responsables de la diversité des ARNm observés.

### 1.4.3 Régulation de l'expression du gène de l'EPN

La présence de l'EPN a été démontrée dans plusieurs tissus et types cellulaires où elle est impliquée dans l'inactivation de peptides biologiquement actifs. Son expression est régulée durant le développement et de façon tissu spécifique (Sunday et al. 1992, Turner & Tanzawa 1997). Chez l'humain et les rongeurs, plusieurs transcrits qui diffèrent uniquement dans leur région non codante ont été décrits. La complexité de la région 5'UTR et la présence de 5 sites potentiels de polyadénylation expliquent la diversité des transcrits de l'EPN, observés dans différents tissus et types cellulaires. En effet, plusieurs espèces de transcrits de taille variant entre 2,7 et 5,7 kb peuvent être observés par buvardage Northern, les espèces majeures migrant à 3,7 et 5,7 kb (D'Adamio et al. 1989, Li et al. 1995, Haouas et al. 1995). Quatre principaux transcrits ont été détectés chez l'humain (type 1, 2a, 2b et 3). La caractérisation de la structure du gène révéla que ces transcrits sont produits suite à l'épissage alternatif différentiel de 3 exons non codants.

L'analyse de la séquence de la région régulatrice du gène de l'EPN révéla la présence de trois promoteurs alternatifs permettant de générer les 4 types de transcrits décrits précédemment. La première région régulatrice appelée promoteur de type 1 est localisée en

amont de l'exon 1 et est à l'origine des transcrits de type 1 produits par épissage alternatif de l'exon 1 à l'exon 4. Le transcrit de type 1 est abondant dans le cerveau, la moelle épinière ainsi que dans les cellules de thymus foetal et de leucémies lymphoblastiques (Li et al. 1995).

La deuxième séquence régulatrice nommée promoteur de type 2 est localisée en amont de l'exon 2 et permet de générer les transcrits de type 2a et 2b. Ces deux transcrits sont issus de l'épissage alternatif d'une partie ou de la totalité de l'exon 2 avec l'exon 4. Chez le rat, les transcrits de type 2 sont très abondants dans les tissus périphériques particulièrement au niveau du rein (Li et al. 1995).

Finalement, la troisième séquence régulatrice, appelée promoteur de type 3, permet de générer les transcrits de type 3 par épissage alternatif de l'exon 3 à l'exon 4. Ce promoteur est localisé entre les exons 2 et 3 et possède, contrairement aux deux autres séquences promotrices, une séquence de type boîte TATA située 33 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. Les transcrits de type 3 sont beaucoup moins abondants et se retrouvent notamment dans les oligodendrocytes du corpus callosum.

L'expression de l'EPN est contrôlée par des mécanismes complexes faisant appel à de nombreux médiateurs et ce, dans plusieurs types cellulaires. Par exemple, le peptide formyl-Met-Leu-Phe (fMLF), le facteur de nécrose tumoral (TNF), l'ionophore de calcium A23187, la substance P, le GMC-SF et le LPS (lipopolysaccharides) augmentent l'expression de l'EPN dans les neutrophiles (Shipp et al. 1991, Fagny et al. 1995, Connelly et al. 1993). Les esters de phorbol réduisent l'expression de l'EPN dans les neutrophiles alors qu'ils augmentent son expression dans les cellules endothéliales (Erdos et al. 1989, Werb & Clark 1989, Graf et al. 1995, Graf et al. 1995, Graf et al. 1998). L'expression de l'EPN est également augmentée suite à un traitement aux androgènes, à la progestérone et aux glucocorticoïdes dans certains types cellulaires (Thinakaran 1999, Casey et al. 1991, Borson & Gruenert 1991, der V. van et al. 1998). Cette augmentation a lieu grâce à la présence d'au moins 2 éléments de réponse aux androgènes (un de type ARE et un de type ARR) présents dans la région 3'UTR des transcrits (Shen et al. 2000). Enfin, le traitement aux ultraviolets semble avoir un effet répresseur sur l'expression de l'EPN dans les mélanocytes humains (Aberdam et al. 2000).

#### 1.4.4 Activité enzymatique/spécificité de clivage

L'EPN est capable d'hydrolyser un grand nombre de peptides bioactifs dont la taille ne dépasse généralement pas 3,5 kDa, soit environ 40 acides aminés. La spécificité de l'enzyme a d'abord été étudiée en utilisant la chaîne  $\beta$  de l'insuline (Kerr & Kenny 1974*b*, Kerr & Kenny 1974*a*). Son nom d'Endopeptidase Neutre provient d'ailleurs de sa capacité à hydrolyser ce peptide à pH neutre.

L'EPN hydrolyse généralement la liaison peptidique située du côté amino-terminal d'un résidu hydrophobe. Les propriétés catalytiques de l'EPN ressemblent à celles d'un groupe d'enzymes bactériennes parmi lesquelles la thermolysine est la mieux caractérisée. La cristallographie de la thermolysine a permis d'élucider la structure et la composition de son site actif (Colman et al. 1972, Holmes & Matthews 1982). Bien que l'identité de séquence entre l'EPN et la thermolysine soit modeste plusieurs évidences suggèrent d'importantes similitudes au niveau du site actif des deux enzymes. D'ailleurs, plusieurs des acides aminés impliqués dans la catalyse et dans la liaison de l'atome de zinc chez la TLN sont retrouvés dans deux segments protéiques qui ont été conservés chez l'EPN. De plus, la TLN et l'EPN acceptent spécifiquement des résidus hydrophobes au niveau du sous site  $S'_1$  de leur site actif (Figure 1.5). Par ailleurs le sous site  $S'_2$  de la TLN et de l'EPN montre peu de spécificité et peut accommoder n'importe quel acide aminé à l'exception de la proline. Ce résidu, lorsque présent en position  $P'_2$  du substrat, diminue la force d'interaction du peptide avec l'enzyme. La thermolysine et l'EPN sont également inhibées par le même type d'inhibiteurs tels que le phosphoramidon et le thiorphan et ce, avec la même dépendance stéréochimique. Cependant, la TLN et l'EPN n'hydrolysent pas des substrats de même taille. En effet, la TLN peut cliver des substrats beaucoup plus gros que l'EPN. Cette sélectivité est possiblement due à la présence du domaine 2 (figure 1.4) chez l'EPN qui restreint l'accès au site actif de l'enzyme en fonctionnant comme tamis moléculaire. Ainsi, en raison de son importante similarité avec L'EPN, la thermolysine a historiquement servi de modèle pour l'étude du site actif de l'EPN. Plusieurs études de mutagenèse dirigée, basées sur la structure du site actif de la thermolysine, ont par la suite permis d'établir un modèle du site actif de l'EPN (Crine et al. 1997) (Figure 1.6B). Récemment, la cristallisation de l'ectodomaine de l'EPN complexée au phosphoramidon a confirmé la plupart de ces avancées (Oefner et al. 2000) (figure 1.4).

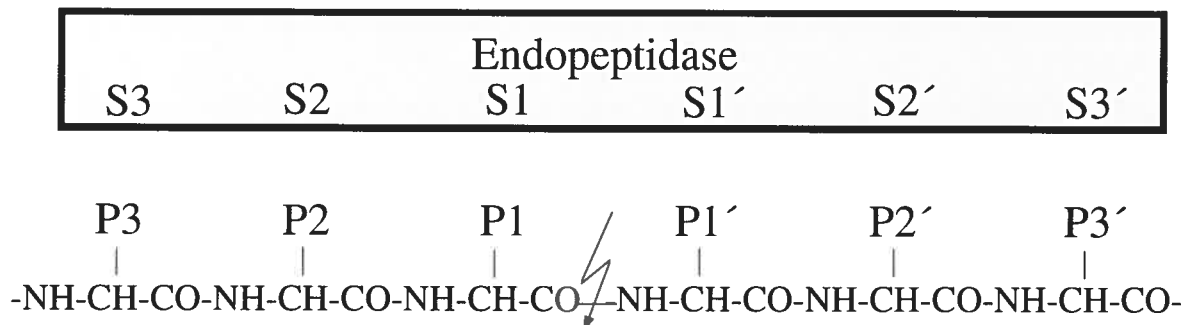


Figure 1.5 – **Nomenclature du site actif des peptidases.** Nomenclature des acides aminés (P) autour du lien peptidique clivé ainsi que des sous-sites (S) du site actif de la peptidase qui peuvent interagir avec les chaînes latérales du substrat peptidique (Schechter & Berger 1967).

#### 1.4.5 Les résidus clés du site actif de l'EPN

Tel que mentionné précédemment, l'atome de zinc, présent dans le site actif de l'EPN constitue un élément essentiel à l'activité enzymatique de la protéine. Étant donné que l'EPN appartient à la famille des gluzincines, les trois acides aminés qui coordonnent l'atome de zinc se retrouvent dans le motif consensus **HEXXH.....E**. Les études de Devault et al. (1988) et LeMoual et al. (1991) ont permis d'identifier spécifiquement chez l'EPN les histidines (**H**) en positions 583 et 587 et l'acide glutamique (**E**) en position 646 comme ligands du zinc (figure 1.6).

La catalyse est réalisée grâce à trois résidus importants, l'acide glutamique 584, l'acide aspartique 650 et l'histidine 711. Il a d'abord été démontré que l'acide glutamique 584, présent dans le motif **HEXXH** est directement impliqué dans l'hydrolyse du substrat (Devault et al. 1988). D'ailleurs, on le qualifie souvent d'acide glutamique catalytique. Cet acide glutamique favorise la polarisation de la molécule d'eau qui sert de nucléophile lors de l'hydrolyse du lien peptidique (voir section 1.2.2). Les premières évidences concernant l'implication d'un résidu histidine dans la catalyse proviennent de l'inactivation de l'EPN par le DEPC. Les travaux de R. C. Bateman et al. (1990) et Dion et al. (1993) ont ensuite permis de démontrer le rôle de l'histidine 711 dans la stabilisation de l'intermédiaire tétrahédrique de l'état de transition. Ce résidu interagit avec l'oxanion ainsi qu'avec plusieurs acides aminés pour former un réseau complexe de ponts hydrogènes stabilisateurs. Finalement, l'acide aspartique 650 serait indirectement impliqué dans la catalyse via son

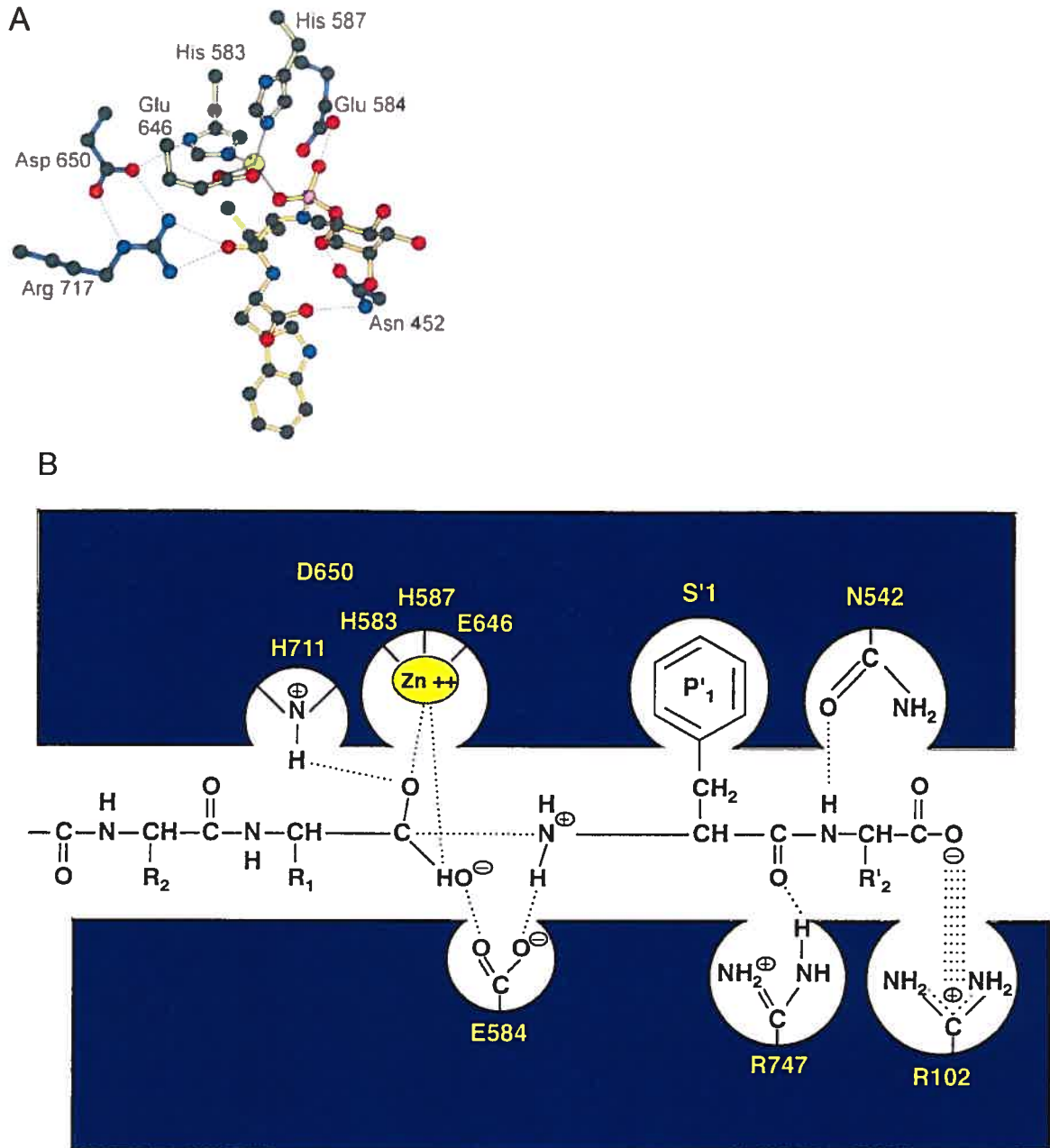


Figure 1.6 – Modélisation du site actif de l'Endopeptidase Neutre. (A) Structure tridimensionnelle du site actif de l'EPN déduite des études cristallographiques (Oefner et al. 2000). L'atome de zinc est représenté par une sphère verte. Les trois ligands du zinc sont également présentés en vert. Les chaînes latérales des acides aminés impliqués dans la liaison au substrat ou dans la catalyse sont représentées en bleu. La molécule de phosphoramidon est représentée en jaune. (B) Modèle bidimensionnel du site actif de l'EPN. Les lignes brisées représentent les liaisons de coordination ainsi que les ponts hydrogènes. Adaptée de Crine et al. (1997).

interaction avec l'histidine 583 qui coordonne l'atome de zinc (LeMoual et al. 1994). Cette triade catalytique permettrait le positionnement précis de l'ion métallique dans le site actif. Récemment, il a été proposé que l'acide aspartique 590 formerait une deuxième triade impliquant cette fois le second ligand du zinc, soit l'histidine 587 (Oefner et al. 2000). Il est à noter que l'acide aspartique 590 est conservé chez tous les membres de la famille de l'Endopeptidase Neutre. Ainsi, les résidus 590 et 587 pourraient contribuer au maintien de la structure du site actif de l'EPN.

L'utilisation de réactifs chimiques permettant d'inhiber l'activité de l'EPN a d'abord révélé la présence d'arginine(s) au niveau du site actif. Par la suite, des études de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier l'arginine 102 comme résidu impliqué dans la liaison au substrat (R. C. Bateman et al. 1989, Beaumont et al. 1991). Il fut proposé que cet acide aminé interagisse avec le groupe carboxyl libre du résidu  $P'_2$  de certains peptides comme les enképhalines. Selon cette hypothèse, l'arginine 102 serait responsable de l'activité dipeptidyl-carboxypeptidase occasionnelle de l'EPN (Llorens et al. 1980, Malfroy & Schwartz 1982b, Beaumont et al. 1991, Jackson & Hersh 1986, Pozsgay et al. 1986). Par contre l'analyse cristallographique du site actif de l'enzyme montre que l'arginine 102 n'est pas impliquée dans l'interaction avec le phosphoramidon (Oefner et al. 2000). De plus, l'enzyme de conversion de l'endothéline, ECE-1, présente une activité dipeptidyl-carboxypeptidase mais ne contient pas de résidu arginine équivalent (Johnson et al. 1999). Ces derniers résultats contradictoires remettent en question l'implication réelle de l'arginine 102 dans la liaison au substrat. Une deuxième arginine en position 717 est proposée comme résidu impliqué dans cette liaison (Marie-Claire et al. 1997). La chaîne latérale de cette arginine participe à la formation d'un pont salin avec l'acide aspartique 650 et joue un rôle dans la liaison au phosphoramidon et dans l'hydrolyse du lien peptidique. Finalement l'asparagine 542 fut identifiée comme acide aminé interagissant avec le résidu en position  $P'_2$  du substrat. Cette interaction est possible grâce à la formation de 2 ponts hydrogènes (Dion et al. 1995).

### 1.4.6 Substrats

L'Endopeptidase Neutre est capable d'hydrolyser plus de 50 substrats peptidiques *in vivo* et *in vitro*. Son rôle physiologique est essentiellement d'inactiver de petits peptides bioactifs tels que les enképhalines, la substance P, la bradykinine et le peptide natriurétique

auriculaire (ANP). Elle permet également de contrôler la concentration de certains neuropeptides ou hormones peptidiques au niveau de leurs cellules cibles en agissant comme barrière enzymatique. De plus, en hydrolysant certains peptides, elle favorise leur réabsorption au niveau du rein et de l'intestin. La fonction physiologique de l'EPN dans un tissu donné dépend de sa localisation cellulaire, de la disponibilité de ses substrats et de la présence de récepteurs peptidiques spécifiques. Une liste des peptides hydrolysés par l'EPN avec leurs sites de coupure est présentée dans le Tableau 1.1.

Tableau 1.1 – Substrats peptidiques de l'Endopeptidase Neutre

Substrats	Sites de clivage et séquence	Km( $\mu$ M)	Références
Leu-enképhaline	YGG†FL	86;73	(Matsas et al. 1984, Ghaddar et al. 2000)
Met-enképhaline	YGG†FM	62;17	(Matsas et al. 1984, Hersh 1984)
D-Ala <sub>2</sub> -leu-enképhaline	YdAG†FL	88	(Matsas et al. 1984)
Dynorphine <sub>1-9</sub>	YGG†F†LRRIR	219	(Matsas et al. 1984)
Dynorphine <sub>1-13</sub>	YGG†FLRR†IRPK†LK	n.d.	(Hersh 1984)
$\gamma$ -Endorphine	YGG†FMTSEKSQTP†LVTL	42;4	(Matsas et al. 1984, Hersh 1984)
$\alpha$ -néo-endorphine	YGG†FLRKYPK	$K_i \geq 500$	(Hersh 1984)
$\beta$ -néo-endorphine	YGG†FLRKYP	$K_i \geq 500$	(Hersh 1984)
MCH	DFDMLRC†MLGR†VYRP-C†WQV	12	(Checler et al. 1992)
LHRH (luliberin)	pEH†WS†YG†LRPGMNH <sub>2</sub>	755	(Matsas et al. 1984)
Bradykinine	RPPG†FSP†FR	92	(Matsas et al. 1984)
Substance P	RPKPQQ†F†FG†LMNH <sub>2</sub>	32; 37,8	(Matsas et al. 1983, Matsas et al. 1984)
Physalaemine	EADPNK†F†YG†LMNH <sub>2</sub>	105	(Matsas et al. 1984)
DimeC7	EQ(MeF)(MeG)†LMNH <sub>2</sub>	2567	(Matsas et al. 1984)
Angiotensine I	DR†VY†IHP†FHL	n.d.	(Stephenson & Kenny 1987)
Angiotensine II	DRVY†IHPF	n.d.	(Stephenson & Kenny 1987)
Neurotensin	pELYENKPRRP†Y†IL	78	(Matsas et al. 1984, Skidgel et al. 1984)
CCK-8	DYMG†WMD†FNH <sub>2</sub>	67,4	(Matsas et al. 1984, Kenny et al. 1985)

† identifie les sites de coupures



Tableau 1.1 – Substrats peptidiques de l'Endopeptidase Neutre (suite)

Substrats	Sites de clivage et séquence	Km(μM)	Références
CCK-8 (SO <sub>3</sub> H)	DY(SO <sub>3</sub> H)MG†W†MD†FNH <sub>2</sub>	296	(Matsas et al. 1984, Kenny et al. 1985, Durieux et al. 1985)
Neurokinine A	HKTDS†FVG†LMNH <sub>2</sub>	113	(Hooper et al. 1985)
Endothéline-1	CSCSS†LMDKECVYFCH†LD†IIW	2,3	(Vijayaraghavan et al. 1990)
Big endothéline-1	CSCSSLMDKECVYFCHLDII- WV†NTPEHVVPYGLGSPRS	n.d.	(Abassi et al. 1993)
α-MSH	AcS†YS†ME†HFR†WGKP†VCONH <sub>2</sub>	n.d.	(Deschodt-Lanckman et al. 1990)
α-hANP	SLRRSSC†FGGRMDRIG- AQSGLCNSFRY	26;34;121	(Kenny et al. 1993)
pBNP <sub>32</sub>	SPKTMRDSCGCFGR- R†LDRIGS†LSGLGCNVLRRY	111;151	(Kenny et al. 1993, Norman et al. 1991)
hCNP-22	GLSKGCFGLKLDRIGSMG- LGC-amide	2,5;13	(Kenny et al. 1993)
hBNP <sub>32</sub>	SP†KM†VQSGCFGRKM- DR†IGSLSGLCNVLRRY	K <sub>i</sub> = 172;151	(Kenny et al. 1993, Norman et al. 1991)
Urodilatine	APRLSLRRSSCFGGRMDRIG- AQSGLCNSFRY	31;62	(Kenny et al. 1993)
Aβ <sub>1-40/42</sub>	DAE†FRHDSG†YEVHHQKLV- F†FAEDVGSNKGA†IIG†LMV- G†GVV	2,8(1-42)	(Howell et al. 1995, Takaki et al. 2000, Shirovani et al. 2001)
OGP	ALKRQ†GRT†LYGFGG	n.d.	(Ruchon et al. 2000)
PTHrP <sub>1-34</sub>	AVSEHQLLHDKGKSIQDLRR- RFF†LHH†L†IAEIHTA	n.d.	(Ruchon et al. 2000)
Osteostatin	TRSAQLDSGVTGSGLEGDHL- SDTSTTS†LELDSR	n.d.	(Ruchon et al. 2000)
Calcitonine	CGNLSTCMLGTYTQDFNK†FH- TFPQTAIGVGAP	.n.d.	(Howell et al. 1993)
α-CGRP	SCNTATC†VTHR†L- AG†LLSRSGG†VVK- DN†FVPTN†VGSE†AFNH <sub>2</sub>	105	(Katayama et al. 1991, Davies et al. 1992)
β-Endorphine	YGGFMTSEKSQTPLVTLFK- NAIKNAYKKGE	K <sub>i</sub> ≥ 500	(Hersh 1984)

† identifie les sites de coupures

Tableau 1.1 – Substrats peptidiques de l'Endopeptidase Neutre (suite)

Substrats	Sites de clivage et séquence	Km( $\mu$ M)	Références
$\beta$ -Lipotropine <sub>61-69</sub>	YGGFMTSEK	$K_i = 19$	(Hersh 1984)
NPY	YPSKPDNPGEDAPAEDMA- RYYSALRHINLITRQRYNH <sub>2</sub>	n.d.	(Baraniuk et al. 1990, Fujiwara et al. 1993)
PYY	YPIKPEAPGEDASPEEL- N†RYYASLRHYLNLVTRQRY- NH <sub>2</sub>	n.d.	(Medeiros & Turner 1994)
VIP	HSDAVFTDNYTRLRKQMAV- KKY†LNS†ILNNH <sub>2</sub>	15	(Gourlet et al. 1997)
PACAP(1-27)	HSDGIFTDSYSRYRKQMAV- KKY†LAA†VLNH <sub>2</sub>	100-200	(Gourlet et al. 1997)
Gastrin	pEGPW†LEEEEA†YG†WM- D†FNH <sub>2</sub>	33;57	(Deschodt-Lanckman et al. 1988, Pauwels et al. 1989)
Gastrin-releasing-peptide(GRP10)	GNHWAVGHLMN <sub>2</sub>	n.d.	(Bunnett et al. 1988, Bunnett et al. 1988)
Oxytocine	CYIQNCP†LGG <sub>2</sub>	n.d.	(Almenoff et al. 1981, Johnson et al. 1984, Ottelecz et al. 1991)
Proadrenomedullin (PAMP)	AR†LDVASE†FRKK†WN- K†W†A†LSRCONH <sub>2</sub>	6,1	(Nagatomo et al. 1996)
GLP-1 <sub>(7-36)</sub>	HAEGTFTSD†VSS†Y†LEGQA- AKE†F†IAW†LVKGR-NH <sub>2</sub>	n.d.	(Hupe-Sodmann et al. 1995)
Glucagon	HSQGTFTSDYSKYLDSRRA- QDFVQWLMNT	n.d.	(Hupe-Sodmann et al. 1995)
Secretin	HSDGTFTSELSRLREGARL- QRLQGLV	n.d.	(Hupe-Sodmann et al. 1995)

† identifie les sites de coupures

La première fonction physiologique attribuée à l'EPN fut celle de neuropeptidase. Dans le système nerveux central (SNC), l'EPN régule la demi-vie de certains neuropeptides comme la substance P et les enképhalines et module ainsi la transmission du signal nociceptif. De plus, de récentes évidences suggèrent qu'une diminution de l'expression de l'EPN dans certaines régions du cerveau favorisait le développement de la maladie d'Alzheimer (revue par: Carson & Turner (2002)). L'importance physiologique de l'EPN a également été démontrée dans d'autres systèmes tels que dans la différenciation et la pro-

lification cellulaire, l'inflammation et le transit gastrointestinal. Finalement, avec l'enzyme de conversion de l'angiotensine, l'EPN joue un rôle déterminant dans la régulation de la pression artérielle et dans le maintien de l'équilibre eau-électrolyte. L'implication de l'EPN dans chacune de ces fonctions sera décrite dans les sections qui suivent.

### 1.4.7 Modulation du signal nociceptif

L'EPN et son transcrite se retrouvent dans plusieurs régions du système nerveux central de mammifères. Elle est particulièrement abondante dans le plexus choroïde du quatrième ventricule, le noyau caudé, la substance noire, le putamen, le noyau accumbens, le tubercule olfactif, la couche glomérulaire du bulbe olfactif, le gyrus dentelé et la substance gélatineuse de l'épine dorsale (Waksman et al. 1984, Waksman et al. 1986, Gaudoux et al. 1993, Matsas et al. 1986, Pollard et al. 1989, Back & Gorenstein 1989*a*, Back & Gorenstein 1989*b*, Back & Gorenstein 1990, Back & Gorenstein 1994). Au niveau cellulaire, l'EPN est principalement localisée dans les neurones mais on la retrouve également associée à la membrane plasmique des oligodendrocytes, des astrocytes et des cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique (Kioussi & Matsas 1991, Kioussi et al. 1992, Marcel et al. 1990, Matsas et al. 1986, Waksman et al. 1986). Dans les neurones, l'EPN est principalement localisée dans les membranes synaptiques et axonales mais on a également pu la détecter dans les dendrites et le périakaryon (Barnes et al. 1988).

Les premières études pharmacologiques ont suggéré que l'EPN est impliquée dans l'inactivation des enképhalines. Les enképhalines sont des neuropeptides qui, lorsqu'ils se lient à leurs récepteurs  $\mu$  et  $\delta$ , procurent un effet antinociceptif ressemblant à celui de la morphine. Ainsi, leur dégradation par l'EPN et l'aminopeptidase N permettrait la modulation de la durée et de l'intensité de l'effet antidouleur. Plusieurs études ont démontré que l'EPN est concentrée dans les structures du système nerveux impliquées dans la perception de la douleur et dans l'analgésie (Waksman et al. 1987, Waksman et al. 1986). En effet, sa distribution dans le cerveau est étroitement liée au patron d'expression des enképhalines et de leurs récepteurs. De plus, l'inhibition spécifique de l'EPN par le thiorphan provoque un effet analgésique modéré chez la souris et bloque complètement la formation d'un métabolite spécifique des enképhalines endogènes (Roques et al. 1980). Toutefois, une récente étude démontre que l'élimination génétique de l'EPN, contrairement à son

inhibition pharmacologique, induit l'hyperalgésie plutôt qu'une analgésie provoquée par les enképhalines (Fischer et al. 2002). Cette hyperalgésie impliquerait la bradykinine, un autre bon substrat de l'EPN. De plus, les niveaux d'enképhalines chez les souris déficientes en EPN (EPN  $-/-$ ) ne semblent pas augmentés. Dans certains tissus tels que l'hypothalamus et la moëlle épinière la concentration d'enképhalines est même diminuée (Fischer et al. 2002, Siems et al. 2000). Une première étude suggérait par contre que l'absence d'EPN provoquait un effet antinociceptif modeste chez la souris (Saria et al. 1997). Selon les auteurs, la différence observée entre les deux études serait due à la méthode expérimentale. Clairement, d'autres études sont nécessaires afin d'expliquer ces résultats plutôt surprenants.

Les enképhalines ne sont pas les seuls neuropeptides modulant la nociception. La substance P, abondante dans la substance noire est aussi impliquée dans le contrôle de la perception de la douleur (Oblin et al. 1989). Des études immunohistochimiques ont permis de colocaliser la substance P et l'EPN dans certaines synapses de la substance noire (Barnes et al. 1993a, Barnes et al. 1993b). Par ailleurs, Mauborgne et al. (1987) ont observé que l'inhibition de l'EPN pouvait protéger partiellement la dégradation de la substance P endogène contenue dans des coupes histologiques de cerveau de rat (Mauborgne et al. 1987). De plus, la constante de spécificité ( $k_{cat}/K_M$ ) de l'EPN pour ce peptide est 4.5 fois plus grande que pour les enképhalines, ce qui en fait un des meilleurs substrats de l'enzyme *in vitro* (Matsas et al. 1983, Matsas et al. 1984). Cependant, puisque la substance P est souvent retrouvée en association avec d'autres neuropeptides, il est possible qu'elle ne constitue pas l'unique substrat de l'EPN dans ces synapses. Bien qu'aucune étude *in vivo* n'ait démontré clairement l'implication de l'EPN dans la modulation de la concentration de ce peptide dans le système nerveux central, son importance est maintenant incontestée dans d'autres phénomènes tels que l'inflammation.

#### 1.4.8 Rôle de l'EPN dans la maladie d'Alzheimer

Le peptide amyloïde beta ( $A\beta$ ) est un peptide produit constitutivement et métabolisé dans les conditions normales mais dont la fonction physiologique demeure encore mal caractérisée. Son accumulation sous forme de plaques séniles au niveau du cerveau constitue un facteur important dans la longue cascade menant à la maladie d'Alzheimer (revue par

Octave (1995), Price & Sisodia (1998), Janus et al. (2000), Steiner et al. (1999), Hartmann (1999), et Gandy & Petanceska (2001)). Le peptide A $\beta$  peut également s'accumuler au niveau des parois des petites artères des leptoméniges et du cortex cérébral causant ainsi une angiopathie cérébrale de type amyloïde (CAA) (Nostrand 2000, Nostrand et al. 2002, Yamada 2000, Yamada et al. 1988, Burgermeister et al. 2000). Ce type d'angiopathie ne se retrouve pas uniquement chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer mais également chez plus de la moitié des personnes âgées de plus de soixante-dix ans (Yamada et al. 1987). L'accumulation du peptide A $\beta$  constitue donc un facteur important non seulement dans la maladie d'Alzheimer mais également dans le processus naturel de vieillissement chez l'homme. La quantité de peptides A $\beta$  présent dans le cerveau dépend de l'équilibre entre sa synthèse et sa dégradation. L'accumulation du peptide peut donc provenir soit d'une augmentation de sa synthèse, soit d'une diminution de sa dégradation.

Depuis plusieurs années, les recherches effectuées sur la maladie d'Alzheimer se concentraient surtout sur les mécanismes de formation du peptide A $\beta$  et sur sa polymérisation en fibrille. Ainsi il a été démontré que la synthèse, la traduction et/ou la maturation excessive ou anormale de l'APP (protéine précurseure amyloïde) mènent à l'accumulation de peptide A $\beta$  et à la maladie d'Alzheimer (Thinakaran 1999, Octave 1995, Yankner 1996, Janus et al. 2000). Récemment, plusieurs études ont démontré l'importance des peptidases/protéases dans le mécanisme de dégradation et d'élimination du peptide A $\beta$ . En effet, plusieurs protéases ont été proposées comme enzymes de dégradation du peptide amyloïde- $\beta$ . Parmi celles-ci on retrouve l'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE), l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), la thimet oligopeptidase, l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) et l'EPN. De plus en plus d'études suggèrent que l'EPN constitue un candidat de choix en tant qu'enzyme de dégradation du peptide A $\beta$ . En effet, une importante étude par Iwata et al. (2000) suggère pour la première fois que l'enzyme principalement responsable de la dégradation du peptide amyloïde- $\beta_{1-42}$  soit l'EPN ou une enzyme dont l'activité est très apparentée. L'administration chronique de thiorphan et de phosphoramidon au niveau de l'hippocampe de rat cause l'accumulation de peptide A $\beta_{1-42}$  endogène. De plus, il existe treize sites potentiels de clivage par l'EPN dans le peptide A $\beta$  et l'enzyme purifiée est capable d'hydrolyser au moins cinq de ces sites avec un  $k_m$  de 2,5  $\mu$ M (Howell et al. 1995, Takaki et al. 2000). Cette haute affinité pour le peptide A $\beta_{1-42}$  reflète peut-être le fait que le peptide contient une séquence ressemblant aux tachykinines (Yankner

et al. 1990, Howell et al. 1995) qui sont parmi les meilleurs substrats de l'EPN *in vitro* et *in vivo* (Matsas et al. 1984). Finalement, parmi les enzymes de la famille sensibles au phosphoramidon et au thiorphan l'EPN est de loin la plus efficace à dégrader le peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Shirovani et al. 2001).

Suite à ces travaux, plusieurs études *in vivo* sont venues appuyer les premières évidences suggérant le rôle neuroprotecteur de l'EPN dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer. Par exemple, Iwata et al. (2001) ont démontré que les niveaux de peptide A $\beta$ <sub>1-40</sub> et A $\beta$ <sub>1-42</sub> endogènes et exogènes sont augmentés chez les souris déficientes en EPN comparative-ment aux souris de type sauvage et ce, dans les régions normalement plus susceptibles à l'accumulation du peptide. Une réduction substantielle de la dégradation du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> exogène radiomarké a également été observée chez les souris *EPN*<sup>-/-</sup>. Par contre, le catabolisme du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> n'est pas complètement éliminé chez ces souris, ce qui suggère l'implication de d'autres peptidases dans la dégradation du peptide. Par ailleurs, la surexpression de l'EPN dans les neurones *in vivo* et *in vitro* réduit de façon importante l'accumulation de peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> ainsi que les lésions cérébrales apparentées chez la souris (Hama et al. 2001, Mohajeri et al. 2002, Marr et al. 2003, Fukami et al. 2002).

Le niveau d'expression de l'EPN dans le cerveau de rongeurs et d'humains fut également abondamment étudié. Chez la souris, l'expression de l'EPN semble diminuer avec le temps. En effet, une diminution importante des niveaux d'expression de l'EPN au niveau de l'hippocampe et de certaines régions du gyrus dentelé fut rapportée (Iwata et al. 2002, Apelt et al. 2003). Des études immunologiques démontrent une diminution de plus de 80% de la densité du marquage histologique dans ces deux régions chez les souris âgées de 132 semaines comparativement aux souris âgées de 10 semaines (Iwata et al. 2002). Ces régions correspondent aux zones cérébrales où la pathologie s'installe dans les modèles animaux de la maladie d'Alzheimer et où on peut observer une perte des synapses fonctionnelles chez l'humain. Par ailleurs, des niveaux réduits du transcrit de l'EPN ont été détectés chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer comparativement aux sujets non atteints (Yasojima et al. 2001, Yasojima et al. 2001, Reilly 2001, Carpentier et al. 2002, chapitre 2). Une diminution d'environ 50% de l'ARNm de l'EPN fut observée dans les régions profondément atteintes par la maladie tandis qu'aucune variation de l'expression ne fut détectée dans les régions qui accumulent peu ou pas de peptide A $\beta$ . Les régions qui expriment davantage du transcrit de l'EPN semblent d'ailleurs moins susceptibles à

la formation de plaques que celles qui en expriment moins (Yasojima et al. 2001, Yasojima et al. 2001, Akiyama et al. 2001). Finalement, nos études immunohistochimiques ont démontré que l'expression de l'EPN est diminuée de façon importante dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe soulignant encore une fois l'importance de l'EPN dans le catabolisme du peptide A $\beta$  (Carpentier et al. 2002, chapitre 2). Nous avons démontré que l'EPN est abondamment exprimée au niveau de la vasculature cérébrale et que son expression est réduite chez les sujets atteints de la maladie d'Alzheimer. La corrélation inverse observée entre l'accumulation de peptide A $\beta$  et les niveaux d'EPN suggère un rôle important pour l'EPN dans l'angiopathie cérébrale de type amyloïde (CAA)(chapitre 2). Toutes ces observations suggèrent que la diminution de l'expression de l'EPN pourrait être reliée à la maladie d'Alzheimer et à l'accumulation normale de peptide A $\beta$  observée chez l'humain lors du vieillissement.

Finalement, deux récentes études génétiques suggèrent que des polymorphismes associés au gène de l'EPN pourraient augmenter le risque d'être atteint de la maladie d'Alzheimer ou encore de souffrir de CAA. En effet, un polymorphisme biallélique situé dans la région 3'UTR du gène de l'EPN fut identifié dans un échantillon représentatif de la population de Catalogne (Clarimon et al. 2003). Le premier polymorphisme identifié correspond à une substitution C/T située 159 nucléotides en aval du codon de terminaison de la traduction. Cette substitution augmenterait les risques d'être atteint de la maladie d'Alzheimer de 2,74 fois ( $p < 0,05$ ) chez les sujets de moins de 75 ans. Le deuxième polymorphisme identifié correspond à une variation dans le nombre de répétitions GT retrouvées dans la région promotrice située en amont de l'exon 1 du gène de l'EPN (Yamada et al. 2003). Une corrélation entre le nombre de répétitions et la sévérité du CAA fut observée ( $p < 0,024$ ). En effet, les sujets présentant moins de 40 répétitions GT démontraient une angiopathie beaucoup plus sévère que les patients présentant plus de 40 répétitions. Ce polymorphisme n'est toutefois pas associé avec une augmentation de la probabilité de développer la maladie d'Alzheimer (Yamada et al. 2003, Oda et al. 2002, Lilius et al. 2003). Ces résultats suggèrent donc une association entre un polymorphisme de l'EPN et le risque de développer une angiopathie cérébrale de type amyloïde. Des études ultérieures impliquant un plus grand nombre d'échantillons de la population et des sujets d'origine ethnique différente seront nécessaires afin de confirmer l'importance des polymorphismes de l'EPN dans le développement de la maladie d'Alzheimer et de l'angiopathie cérébrale de type amyloïde.

### 1.4.9 Régulation de l'équilibre hydro-sodé et de la pression artérielle

C'est dans le rein que l'on retrouve la plus grande concentration d'EPN. En effet, l'enzyme constitue 4 à 5 % de la masse protéique des cellules épithéliales de rein (Kerr & Kenny 1974b, Kerr & Kenny 1974a). L'EPN est ancrée dans la bordure en brosse des tubules proximaux droits et contournés où elle participe au maintien de l'équilibre hydro-sodé. L'EPN agit sur la pression artérielle et sur l'équilibre eau-électrolyte en dégradant plusieurs peptides vasoactifs tels que l'ANP, les kinines (comme la bradykinine), la substance P, l'endothéline-1 (l'ET-1) et l'angiotensine II (AngII) (Wilkins et al. 1993, Vlahovic & Stefanovic 1998, Corti et al. 2001, Wilkins 1993, Sonnenberg et al. 1988). L'hydrolyse de ces peptides ne s'effectue pas uniquement au niveau du rein, l'enzyme présente dans les vaisseaux sanguins, les poumons et le cerveau participe également à la dégradation de ces peptides (Gros et al. 1990, Llorens-Cortes et al. 1992, Bourne & Kenny 1990, Soleilhac et al. 1992).

L'ANP est synthétisé au niveau des oreillettes du coeur et les kinines sont produites par le tubule distal du rein. Ces peptides ont la capacité de diminuer la pression artérielle en favorisant la diurèse et la natriurèse (Carretero & Scicli 1991, Erdos 1990). Quant à la substance P, elle est relâchée par les neurones sensoriels au niveau des vaisseaux sanguins causant leur vasodilatation et entraînant un effet hypotenseur. Ainsi, la modification des concentrations circulantes de ces peptides dans le plasma, les tissus et l'urine par l'EPN constitue un moyen de contrôler la pression artérielle. Le rôle de l'EPN dans l'hydrolyse de ces peptides bioactifs a été démontré *in vivo* par l'administration d'inhibiteurs de l'EPN. Ce traitement résulte en une augmentation des niveaux plasmatiques et urinaires d'ANP associée à une augmentation de la diurèse et une diminution de la pression sanguine (Lecomte et al. 1990). De plus, l'inhibition de l'EPN rénale par le phosphoramidon double l'excrétion urinaire des kinines intactes. Une récente étude a démontré que les inhibiteurs de l'EPN potentialisent aussi la signalisation des kinines en permettant la resensibilisation des récepteurs B2 des kinines au ligand (Deddish et al. 2002). Cette resensibilisation est dépendante de la présence de l'EPN à la membrane puisqu'une forme soluble de l'EPN est incapable de resensibiliser le récepteur.

L'Endothéline est produit par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et consti-



tue un vasoconstricteur puissant (revue par: Schiffrin & Touyz (1998), Schiffrin (2001a) Schiffrin (2001b). Au niveau du rein, l'ET est sécrété par les cellules médullaires du tube collecteur où il diminue localement le flot sanguin ralentissant ainsi la filtration glomérulaire (Kohan 1991). Ceci réduit le volume urinaire et contribue à l'augmentation de la pression artérielle. L'angiotensine II agit également comme vasoconstricteur. Sa présence favorise la rétention de sels et d'eau ce qui induit une augmentation de la pression sanguine. Ainsi, en hydrolysant ces peptides, l'EPN agirait ici en tant qu'hypotenseur. Par conséquent, l'enzyme serait impliquée dans deux mécanismes opposés de régulation de la pression sanguine. Toutefois, l'EPN semble contribuer de façon plus importante au catabolisme des peptides hypotensifs puisque son inhibition sélective chez l'humain semble conduire à une faible baisse de la pression artérielle chez les patients normotensifs et hypertensifs essentiels (revue par: Roques (1998)). De plus, les souris déficientes en EPN ont une pression sanguine moyenne réduite de 20% par rapport aux souris de type sauvage (Lu et al. 1997). En revanche, cet effet hypotensif ne semble pas résulter d'une diminution de la dégradation de l'ANP, des kinines ou de la SP. La concentration plasmatique d'ANP chez ces souris reste inchangée et l'administration d'antagonistes des récepteurs de la SP et des kinines n'a aucun effet sur la différence de pression observée. Encore une fois, le phénotype observé suite à l'élimination génétique de l'EPN vient souligner la complexité du système.

#### 1.4.10 Régulation de la réaction inflammatoire

Plusieurs études ont permis de mettre en évidence le rôle de l'EPN dans la réaction inflammatoire. L'EPN intervient dans le contrôle de l'inflammation neurogénique de plusieurs tissus tels que les voies respiratoires et l'intestin de même que dans la modulation du choc septique (Koehne et al. 1998, Nadel 1992, Nadel 1990, Nadel 1991, Kirkwood et al. 2001).

Lorsque les neurones sensoriels de certains tissus sont stimulés par des voies chimiques ou électriques, ils relâchent des tachykinines dont la substance P (Borson 1991, Nadel 1992). Ce neuropeptide, lorsqu'il interagit avec son récepteur, déclenche alors une réaction inflammatoire. En dégradant les tachykinines, l'EPN permet de moduler l'intensité et la durée de l'inflammation neurogénique.

Au niveau des voies respiratoires, l'EPN est exprimée dans plusieurs types cellulaires comme les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les glandes, les vaisseaux sanguins et les neurones (Borson et al. 1989). Elle est colocalisée soit avec des neurones sensoriels contenant des tachykinines soit avec leurs récepteurs. L'inflammation neurogénique est une caractéristique commune à plusieurs maladies respiratoires chroniques telles que l'asthme, la bronchite chronique et la fibrose kystique. De plus, certains produits chimiques, la fumée de cigarette et certaines infections virales peuvent diminuer l'activité de l'EPN dans les voies respiratoires et ainsi provoquer la toux, des sécrétions anormales, une augmentation de la perméabilité vasculaire et la bronchoconstriction (Borson et al. 1989). Il a été observé que les voies respiratoires supérieures de furets et de rats ayant des infections virales communes (ex. l'influenza, le coronavirus) présentent une inflammation neurogénique exagérée et montrent une diminution de l'activité de l'EPN par rapport aux sujets normaux.

Parallèlement, plusieurs travaux ont démontré que l'inhibition pharmacologique de l'EPN permet de potentialiser les effets de la substance P (revue par Nadel (1992)). Ainsi, de plus grandes concentrations de substance P peuvent atteindre leur récepteur causant ainsi une réaction inflammatoire accrue. Au contraire, l'activité de l'EPN peut être augmentée soit par la prise exogène de l'enzyme soit par une augmentation de son expression. En effet, l'inhalation d'EPN recombinante permet de prévenir la toux induite par la substance P exogène (Kohrogi et al. 1989). Enfin, plusieurs études ont démontré que l'effet anti-inflammatoire des glucocorticoïdes dans les maladies des voies respiratoires est partiellement due à une augmentation de l'expression de l'EPN (Borson & Gruenert 1991).

L'EPN est également impliquée dans la régulation de l'inflammation du système respiratoire causée par une infection bactérienne. Dans ce cas, l'EPN agit non pas sur la substance P mais sur un peptide bactérien. Les bactéries libèrent plusieurs peptides tels que le N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLF) qui se lient à des récepteurs situés à la surface des neutrophiles. La liaison du fMLF aux récepteurs mène à la libération de molécules chimioattractives qui provoquent une réaction inflammatoire. L'EPN située à la surface des neutrophiles dégrade le fMLF ce qui permet de moduler la chémotaxie et par conséquent la durée et l'intensité de l'inflammation (Connelly et al. 1985, Painter et al. 1988). De plus, il a été démontré que l'inhibition de l'EPN des neutrophiles potentialise l'effet du fMLF (Shipp et al. 1991, Shipp et al. 1990, Painter & Aiken 1995).

Récemment, l'EPN fut impliquée dans la régulation de l'inflammation neurogénique de l'intestin. En plus des neurones, l'EPN est exprimée dans plusieurs types cellulaires de l'intestin comme les entérocytes, les myocytes et les cellules endothéliales. La Toxine A (TxA) de *Clostridium difficile* induit une inflammation neurogénique aiguë accompagnée de diarrhée au niveau de l'intestin. L'injection intestinale de TxA chez les souris déficientes en EPN réduit la concentration limite de TxA nécessaire à l'observation de l'inflammation et augmente l'intensité de la réaction inflammatoire par plus de deux fois (Kirkwood et al. 2001). Cette exacerbation de l'inflammation est prévenue par l'administration préalable d'EPN recombinante. Parallèlement à ceci, l'inhibition de l'EPN des souris de type sauvage par le phosphoramidon augmente l'intensité de la réaction inflammatoire induite par la TxA. Ici encore, c'est en métabolisant la substance P que l'EPN module l'intensité de la réaction.

Finalement, la participation de l'EPN dans la modulation du choc septique a également été démontrée. Le choc aux endotoxines chez la souris peut être provoqué par l'injection de molécules comme le LPS de *Salmonella enteritidis*. Les souris déficientes en EPN sont dix fois plus sensibles au LPS et cent fois plus susceptibles de mourir d'un choc septique que les souris de type sauvage (Lu et al. 1996, Lu et al. 1995). Ainsi, il semblerait que l'EPN joue un rôle protecteur contre le choc aux endotoxines en diminuant la réaction inflammatoire. Cependant, le mécanisme d'action spécifique de l'EPN dans la modulation de la réaction au choc septique demeure encore inconnu.

#### 1.4.11 Digestion des peptides du bol alimentaire et régulation du transit gastro-intestinal.

Selon le type cellulaire où elle est exprimée, l'EPN intestinale peut soit participer à la digestion de peptides du bol alimentaire soit réguler le transit gastro-intestinal. L'enzyme exprimée dans la bordure en brosse des cellules épithéliales de l'intestin hydrolyse les peptides ingérés favorisant ainsi leur absorption au niveau du tractus gastro-intestinal. D'autre part, l'EPN exprimée dans les cellules musculaires lisses et les neurones régule le transit gastro-intestinal en modulant la concentration de certains neuropeptides tels que la substance P et les enképhalines (Nau et al. 1985, Marcais-Collado et al. 1987). En hydrolysant la substance P au niveau de son site effecteur, l'enzyme du muscle lisse

et des neurones pourrait réguler le péristaltisme intestinal (Matsas et al. 1983, Bunnett et al. 1985, Bunnett et al. 1988, Bunnett et al. 1988). Contrairement à la substance P, les enképhalines ont la propriété de réduire le mouvement gastro-intestinal en agissant sur le transport des fluides et des ions à travers la membrane de la muqueuse intestinale (Schang et al. 1986, Coupar 1987). L'inhibition de l'EPN dans cet organe potentialise l'effet des enképhalines et de la substance P sur la contraction des muscles lisses. L'augmentation de l'activité de ces neuropeptides est le résultat de l'augmentation de leur concentration à proximité de leur récepteur (Djokic et al. 1989, Menozzi et al. 1991). L'action de l'EPN myentérique et entérique de la sous muqueuse sur les enképhalines serait dominante puisque des inhibiteurs sélectifs de l'EPN tels que le thiorphan présentent un intérêt pharmacologique pour leur effet antidiarrhéique.

#### 1.4.12 Différenciation et prolifération cellulaire

Le diagnostic des leucémies humaines a été facilité par l'utilisation d'anticorps monoclonaux reconnaissant un antigène spécifique à la surface des cellules cancéreuses. Cet antigène nommé CALLA (**C**ommon **A**cute **L**ymphoblastic **L**eukemia **A**ntigen) est présent à la surface des cellules malignes dans 80% des cas de leucémie lymphoblastique aiguë de type pré-B (Greaves 1975, Greaves et al. 1983). Le clonage et la caractérisation de l'ADNc de CALLA en 1988 a démontré que ce marqueur lymphoblastique était identique à l'EPN (Letarte et al. 1988, Shipp et al. 1988). L'expression de l'EPN n'est pas restreinte aux lymphoblastes malins. On la retrouve également à la surface des lymphocytes normaux et en plus faible quantité sur les cellules B et T matures (Beaumont et al. 1989, Mari et al. 1992, Mari et al. 1994, Guerin et al. 1997). L'EPN serait impliquée dans la maturation et la différenciation des lymphocytes en modulant la concentration d'un signal peptidique qui reste encore à être identifié (revue par LeBien (1989)).

Par ailleurs, l'EPN peut moduler la prolifération et la migration de certains types cellulaires tels que les cellules épithéliales du sein (Burns et al. 1999), des poumons (Yamazaki et al. 2001, Ganju et al. 1994) et de la prostate (Cohen et al. 1996). L'enzyme régulerait la migration et la prolifération cellulaire en inactivant certains peptides comme les BLPs (bombesin-like peptides) et l'ET-1 (Sunday et al. 1992, King et al. 1993, Shipp et al. 1991). Les carcinomes pulmonaires expriment très peu ou pas d'EPN à leur surface. Ainsi, les

carcinomes pulmonaires à petites cellules se développent uniquement chez les fumeurs présentant une diminution de l'expression de l'EPN et une augmentation de la concentration des BLPs dans leur fluide bronchoalvéolaire (Shipp & Look 1993). De plus, la croissance *in vitro* de cellules épithéliales pulmonaires fœtales est inhibée par l'ajout d'EPN recombinante dans le milieu de culture. À l'inverse, l'inhibition de l'enzyme stimule la prolifération de ces cellules. Ces études ont révélé un lien direct entre la diminution de l'expression de l'EPN, l'augmentation des BLPs et le développement de cancers pulmonaires.

La perte de l'EPN constitue également un événement précoce et fréquent dans le développement de cancers de la prostate hormono-sensibles chez l'humain (Freedland et al. 2003, Papandreou et al. 1998). De plus, les lignées cellulaires issues de cancers de la prostate qui expriment l'EPN n'ont pas la capacité de migrer (cellules dites bénignes) alors que les lignées cellulaires qui n'expriment pas l'EPN montrent une migration cellulaire dépendante de la présence de bombésine. Toutefois, l'action protectrice de l'EPN ne semble pas uniquement due à sa capacité d'hydrolyser la bombésine. En effet, une étude récente a démontré que l'expression d'une forme inactive de l'EPN est capable d'inhiber partiellement la migration cellulaire (Sumitomo et al. 2000, Shen et al. 2002). Ces résultats suggèrent que l'EPN pourrait agir à un autre niveau qui serait indépendant de la dégradation de substrats peptidiques. Des études de coimmunoprécipitation ont montré que l'EPN s'associe avec la Lyn kinase phosphorylée pour ensuite former un complexe avec la PI-3 kinase (Sumitomo et al. 2000, Ganju et al. 1996). La formation de ce complexe inhiberait de façon compétitive l'association de la PI-3 kinase avec FAK (focal adhesion kinase) aux points de contacts focaux, nécessaire à la migration cellulaire. Ainsi, l'EPN semble pouvoir inhiber la migration des cellules épithéliales prostatiques de deux façons soit en dégradant des substrats peptides, soit en interagissant avec des protéines de la voie de signalisation. On peut maintenant penser que la fonction de l'EPN est beaucoup plus complexe et que l'enzyme pourrait interagir avec d'autres protéines dans d'autres types cellulaires. Le rôle physiologique de l'EPN ne se limiterait donc pas à l'hydrolyse de substrats peptidiques.

#### 1.4.13 Forme sécrétée de l'EPN dans les fluides physiologiques

Bien que l'EPN ait été caractérisée comme une protéine transmembranaire de type II dans la plupart des tissus, une forme soluble de la protéine fut identifiée pour la pre-

mière fois en 1984 dans le sérum humain (Almenoff et al. 1984). Depuis, d'autres liquides physiologiques tels que l'urine (Marco et al. 1998, Aviv et al. 1995, Nortier et al. 1997), le sang (Deschodt-Lanckman et al. 1989, Gros et al. 1990, Johnson et al. 1985, Nortier et al. 1995), le liquide amniotique, le liquide synovial (Appelboom et al. 1991, Matucci-Cerinic et al. 1993), le liquide cébrospinal (Spillantini et al. 1990) et les sécrétions nasales (Ohkubo et al. 1994, Ohkubo et al. 1993) semblent contenir une forme soluble de la protéine. Cette forme soluble de l'EPN est toutefois présente en très faible quantité ce qui a souvent empêché sa détection immunologique et sa purification. Sa concentration dans les liquides physiologiques serait augmentée suite à différents stress ou conditions pathologiques tels que l'arthrite rhumatoïde, différentes maladies respiratoires, l'insuffisance rénale et la sarcoïdose (Matucci-Cerinic et al. 1993, Johnson et al. 1985, Deschodt-Lanckman et al. 1989). L'origine et la fonction physiologique réelle de cette forme soluble d'EPN restent encore inconnues mais il fut suggéré que l'EPN pourrait participer à la régulation de l'inflammation dans plusieurs de ces conditions. Jusqu'à ce jour, aucune évidence ne permet de déterminer si la sécrétion de la forme soluble de l'EPN dans ces fluides constitue un phénomène physiologique régulé. Il fut suggéré que l'enzyme soluble proviendrait plutôt de la dégradation naturelle des cellules. Ainsi, dans certaines conditions pathologiques où davantage de cellules sont endommagées, une plus grande quantité d'EPN serait libérée de la membrane. La purification de la forme soluble de l'EPN et le séquençage de son extrémité amino-terminale permettront certainement de mettre en lumière l'origine de la protéine dans ces liquides physiologiques.

#### 1.4.14 Autres fonctions

De par sa capacité à hydrolyser une variété de peptides *in vitro*, il fut proposé que l'EPN possède plusieurs autres fonctions physiologiques. L'enzyme pourrait notamment être impliquée dans la régulation du métabolisme osseux, dans la reproduction et dans la régulation de certains comportements tels que l'appétit et la consommation d'alcool.

Dans le tissu osseux, des études d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ* ont démontré que l'EPN est associée aux précurseurs ostéoblastiques, aux préostéoblastes, aux ostéoblastes et aux ostéocytes (Howell et al. 1995, Ruchon et al. 2000). De plus, on retrouve davantage d'EPN dans les os de nouveau-nés comparativement aux os de souris

adultes (Ruchon et al. 2000). L'accumulation d'un inhibiteur tritié de l'EPN fut également observée dans les plaques de croissance osseuse (Dutriez et al. 1992). Ces résultats suggèrent une relation entre l'enzyme et la croissance du tissu osseux. De plus, Ruchon et al. (2000) ont récemment démontré que l'EPN est capable d'hydrolyser *in vitro* de nombreux peptides impliqués dans le métabolisme osseux tels que l'ostéostatine, l' $\alpha$ -CGRP, l'OGP, le PTHrP<sub>(1-34)</sub> et la calcitonine. Toutefois, les souris déficientes en EPN ne semblent pas démontrer de problèmes particuliers au niveau de l'os (Geneviève Hélie communication personnelle). Des évidences supplémentaires sont nécessaires afin de clairement impliquer l'EPN dans la physiologie de l'os et le maintien de l'homéostasie du calcium.

L'EPN se retrouve également dans les organes reproducteurs mâle et femelle. Elle fut identifiée plus précisément dans les cellules granulosa des follicules d'ovaires de lapin, dans les cellules de la corona radiata ainsi que dans les cellules endothéliales de la vasculature ovarienne (Zappulla & DesGroseillers 2001, Howell et al. 1991). Un bon nombre de peptides colocalisent avec l'EPN dans ces régions et sont des substrats physiologiques de l'EPN dans d'autres tissus. Par exemple, les niveaux de bradykinine varient au cours de l'ovulation et il fut démontré que ce peptide est impliqué dans le processus de rupture du follicule. Ainsi, l'EPN pourrait jouer un rôle dans le processus d'ovulation en régulant les niveaux de bradykinines critiques pour ce processus. D'autres études ont démontré la présence de l'EPN dans les cellules de l'endomètre et du myomètre utérin (Casey et al. 1991, Imai et al. 1992, Ottlecz et al. 1991, Riley et al. 1995). Chez les femmes, l'expression de l'EPN et de son transcrite, dans les cellules endométriales, varie en fonction de la phase du cycle menstruel (Casey et al. 1991). Dans l'utérus de rat et de mouton, l'activité de l'EPN dans le myomètre est présente en quantité croissante pendant la grossesse et pourrait possiblement inhiber les contractions du muscle lisse pendant cette période en inactivant certains peptides tels que l'ET-1 et l'oxytocine (Riley et al. 1995, Ottlecz et al. 1991). Il fut également suggéré qu'une diminution de l'activité de l'EPN durant la période précédant les menstruations causerait une augmentation d'endothélines qui serait alors responsable de la constriction des artérioles dans l'endomètre utérin (Head et al. 1993, Salamonsen et al. 1992). Finalement, l'EPN fut également identifiée au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales de la prostate ainsi que dans les prostasomes (Renneberg et al. 2001, Fernandez et al. 2002). L'EPN ainsi présente dans la semence, dans les ovaires et dans l'utérus pourrait contrôler l'action de certains peptides afin de participer de façon

directe ou indirecte au processus de reproduction.

Finalement, une étude récente par Frette et al. (1998) suggère que la consommation chronique d'alcool serait associée à une variation des niveaux d'activité EPN dans le sérum humain. De plus, il semblerait que les souris déficientes en EPN consomment non seulement davantage de nourriture ( $\sim 30\%$  de plus) mais également plus d'alcool ( $\sim 40\%$  de plus) comparativement aux souris de type sauvage (Siems et al. 2000). Cette augmentation de la consommation d'alcool ne serait pas associée à une consommation accrue de fluide ni à une variation de la dégradation des enképhalines. Des études futures seront nécessaires afin d'identifier le/les peptides impliqué(s) dans ces comportements et de confirmer le rôle de l'EPN dans la régulation de la consommation d'alcool et de nourriture.

## 1.5 ECE

Les endothélines sont de petits peptides impliqués dans une variété de fonctions physiologiques (revue par: Goraca (2002), Schiffrin & Touyz (1998), Schiffrin (2001a), Iglarz & Schiffrin (2003)). En plus de leurs activités autocrines et paracrines, ces hormones peptidiques possèdent une activité vasoconstrictrice très puissante et sont donc impliquées dans diverses maladies cardiovasculaires telles que l'hypertension et l'insuffisance cardiaque. Trois types d'endothélines, encodés par trois gènes distincts, ont été caractérisés: ET-1, ET-2 et ET-3 (Inoue et al. 1989). Les endothélines sont d'abord synthétisés sous forme de précurseurs peptidiques inactifs qui sont ultérieurement maturés en peptides actifs de 21 acides aminés. L'étape finale de la biosynthèse des endothélines est la conversion du précurseur de 38-41 aa (la Big ET) en hormone active par une enzyme de conversion des endothélines (ECE).

La sous famille des enzymes de conversion des endothélines est responsable de la maturation des Big ETs au niveau d'un lien Trp-Val/Ile permettant de libérer un peptide actif. Deux membres, ECE-1 (Xu et al. 1994) et ECE-2 (Emoto & Yanagisawa 1995) ont été clonés jusqu'à maintenant. Chacune de ces protéines possède une distribution tissulaire, une localisation cellulaire et une activité enzymatique différente. Une troisième activité, appelée ECE-3, fut purifiée à partir de microsomes d'iris bovin mais la nature de son ADNc n'a pas encore été rapportée (Hasegawa et al. 1998).



Tableau 1.2 – Comparaison des séquences en acides aminés des membres de la famille de l'Endopeptidase Neutre.

	EPN	ECE-1	ECE-2	PHEX	KELL	ECEL1
EPN	—	39,1%	33,3%	34,9%	23,1%	30,9%
ECE-1	—	—	60,2%	37,9%	30,4%	37,1%
ECE-2	—	—	—	33,6%	29,5%	36,5%
PHEX	—	—	—	—	24,4%	31,8%
KELL	—	—	—	—	—	23,3%
ECEL1	—	—	—	—	—	—

Note: Les séquences humaines ont été utilisée pour la comparaison à l'exception de ECE-2 (bovin)

### 1.5.1 ECE-1

ECE-1 fut d'abord purifiée d'une préparation de microsomes de poumons de rats (Takahashi et al. 1993). Un an plus tard, le clonage de l'ADNc bovin d'ECE-1 révéla la ressemblance d'ECE-1 avec l'EPN (Xu et al. 1994). ECE-1 partage environ 39% d'identité avec l'EPN au niveau de sa séquence en acides aminés. La majeure partie de cette identité se retrouve au niveau du site actif. ECE-1 contient 10 sites potentiels pour la N-glycosylation et 14 cystéines dont 10 sont conservées avec l'EPN. La taille de ECE-1 glycosylée est estimée à 130 kDa en conditions réductrices mais à 300 kDa en conditions non réductrices suggérant que ECE-1 est composée de 2 sous-unités reliées par un pont disulfure. Des études par mutagénèse dirigée ont démontré que la cystéine en position 412 d'ECE-1 est responsable de la dimérisation de l'enzyme (Schmidt et al. 1994, Shimada et al. 1996). Bien que la dimérisation ne soit pas essentielle, il semblerait que la structure dimérique contribue à l'efficacité enzymatique de la protéine (Figure 1.2).

L'analyse de l'ARNm d'ECE-1 a révélé l'existence de 4 isoformes nommées ECE-1a/ $\beta$ , 1b, 1c/ $\alpha$  et 1d (Turner et al. 1998, Valdenaire et al. 1999). Ces isoformes diffèrent uniquement dans leur portion N-terminale cytoplasmique et sont synthétisées grâce à l'utilisation de promoteurs alternatifs (Valdenaire et al. 1995, Valdenaire et al. 1999, Orzechowski et al. 1999). L'activité enzymatique des quatre isoformes vis-à-vis de la maturation des Big endothélines est similaire mais leur distribution cellulaire et tissulaire diffèrent (Brown

et al. 2000, Schweizer et al. 1997, Muller et al. 2000, Muller et al. 2003, Turner et al. 1998). Dans les cellules AtT20, il semblerait que ECE-1a et 1c soient principalement exprimées à la surface cellulaire tandis que ECE-1b est majoritairement détecté au niveau des endosomes tardifs et des corps vésiculaires (Muller et al. 2003). Un motif di-leucine de rétention a été caractérisé chez ECE-1b (Cailler et al. 1999). Finalement, ECE-1d est présente à la fois au niveau des endosomes et au niveau de la membrane plasmique (Muller et al. 2003). Il faut toutefois souligner que la localisation subcellulaire de certaines isoformes semble dépendre du type cellulaire (revue par Turner et al. (1998)). Le rôle de la localisation différentielle des 4 isoformes d'ECE-1 demeure encore inconnu mais une étude récente suggère que la localisation intracellulaire de ECE-1b permettrait de réguler la localisation et l'activité des autres isoformes (Muller et al. 2003). Cette étude révèle que l'hétérodimérisation entre ECE-1a et ECE-1b redirige ECE-1a de la membrane plasmique vers un compartiment intracellulaire et permet ainsi de diminuer l'activité extracellulaire d'ECE-1a.

Une combinaison d'études de buvardage Northern, d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie a révélé une distribution relativement large d'ECE-1. ECE-1 a notamment pu être détectée dans les poumons, le placenta, les ovaires, le testicule, les cellules endothéliales de plusieurs tissus, le rein, le foie, le coeur et les intestins (revue par Turner & Tanzawa (1997)). On retrouve également ECE-1 dans certaines cellules endocrines comme les cellules chromaffines de la glande surrénale et les îlots  $\beta$  du pancréas. Dans ces cellules, ECE-1 pourrait participer à la régulation de la sécrétion hormonale. L'ARNm ainsi que la protéine ont pu aussi être détectés dans certaines lignées cellulaires d'origine neuronale ainsi que dans certaines régions du cerveau (Barnes & Turner 1997, Turner & Tanzawa 1997).

Pendant plusieurs années, on croyait que l'action d'ECE-1 était restreinte aux précurseurs des endothélines. De récentes études ont démontré que ECE-1 est capable d'hydrolyser une variété de peptides *in vitro* (voir Tableau 1.3) (Johnson et al. 1999). Certains peptides tels que la bradykinine, sont même aussi efficacement hydrolysés que la Big ET-1. Ces études suggèrent donc que ECE-1 pourrait être impliquée dans le métabolisme de peptides bioactifs distincts des endothélines. Tout comme l'EPN, ECE-1 hydrolyse préférentiellement les liens peptidiques contenant un résidu hydrophobe en position  $P'_1$  et possède une activité dipeptidyl-carboxypeptidase sur certains substrats (Johnson et al. 2002). Un modèle de la structure tridimensionnelle d'ECE-1 basé sur la structure cristallographique de l'EPN suggère que les deux enzymes sont très similaires à l'exception de la poche du

Tableau 1.3 – Substrats peptidiques d'ECE-1

Substrats	Sites de clivage/séquence	Km( $\mu$ M)	Références
Big endothéline-1	CSCSSLMDKECVYFCHLDI-IWV†NTPEHVVPYGLGSPRS	2 <sup>1</sup>	(Shimada et al. 1994)
Big endothéline-2	CSCSSWLDKECVYFCHLDI-IW†VNTPEQTAPVGLGNPP	n.d.	(Shimada et al. 1994)
Big endothéline-3	CTCFYKDKCEVYYCHLD-IIW†INTPEQTVPYGSNYRG-SFR	1	(Shimada et al. 1994)
Angiotensine I	DRV†Y†IHP†FHL	2500	(Johnson et al. 1999)
Bradykinine	RPPGFSP†FR	340	(Johnson et al. 1999, Hoang & Turner 1997)
Neurotensine	pEL†YENKPRRP†YIL	78	(Johnson et al. 1999)
Substance P	RPKPQQ†F†FG†LMNH <sub>2</sub>	90	(Johnson et al. 1999)
Chaîne- $\beta$ oxydée de l'insuline	FVNQHLCGSH†L†V-E†A†L†Y†LVCGERGFFY-T†PKA	n.d.	(Johnson et al. 1999)
Calcitonine	CGNLSTCMLGTYTQDFNKF-HTFPQTAIGVGAP	n.d.	(Johnson et al. 1999)
ANP	SLRRSCFGGRMDRIGAQS-GLGCNSFRY	> 500	(Johnson et al. 1999)
A- $\beta$ <sub>(1-42)</sub>	DAEFRHDSGYEVHHQ-K†L†VF†FAEDVGSNKGAI-IGLMVGGVV	$K_{cat}/K_m \geq$ ET-1	(Eckman et al. 2001)

† identifie les sites de coupures

<sup>1</sup> Efficacité de clivage 4 : 2 : 1 pour BigET-1:BigET-2:BigET-3

site actif d'ECE-1 qui serait plus profonde (Bur et al. 2001). Toutefois, la caractérisation de l'activité enzymatique d'ECE-1 *in vitro* suggère que l'enzyme pourrait agir sur une plus petite gamme de substrats. En effet, plusieurs peptides pouvant être hydrolysés par l'EPN ne sont pas hydrolysés par ECE-1. De plus, contrairement à l'EPN, ECE-1 possède très peu d'activité vis-à-vis des substrats de moins de 6 acides aminés tels que les enképhalines (Johnson et al. 1999).

Jusqu'à présent les précurseurs des endothélines constituent les seuls substrats pour lesquels l'action d'ECE-1 a été démontrée comme physiologiquement importante. D'ailleurs, les souris homozygotes négatives pour ECE-1 meurent *in utero* et présentent les mêmes phénotypes que les souris déficientes en endothélines ou leurs récepteurs (Yanagisawa et al. 1998, Yanagisawa et al. 1998, Kurihara et al. 1994, Kurihara et al. 1995, Clouthier et al. 1998, Hosoda et al. 1994). Les souris présentent des malformations craniofaciales et cardiaques (Yanagisawa et al. 1998). On remarque également chez les souris *ECE-1*<sup>-/-</sup> une absence de neurones entériques de l'intestin distal et des mélanocytes de l'épiderme comme dans le cas des souris déficientes en ET-3 (Hosoda et al. 1994).

De récentes études ont démontré qu'ECE-1 est capable d'hydrolyser le peptide amyloïde- $\beta_{1-42}$  (Eckman et al. 2001). La surexpression d'ECE-1 dans les cellules CHO permet de réduire la concentration extracellulaire de peptide A $\beta$  de 90% et ceci peut être contré par l'ajout de phosphoramidon. De plus, les cerveaux de souris *ECE-1*<sup>+/-</sup> accumulent davantage de peptide A $\beta_{1-42}$  comparativement aux souris de type sauvage (Eckman et al. 2003). Ces résultats suggèrent un rôle potentiel pour ECE-1 dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer.

### 1.5.2 ECE-2

L'ADNc d'ECE-2 fut cloné en 1995 par le groupe d'Emoto & Yanagisawa (1995) à partir de glandes surrénales bovines. La séquence en acides aminés d'ECE-2 est identique à celle d'ECE-1 à 59% et à celle de l'EPN à 33% (Tableau 1.2). Des 14 cystéines présentes chez ECE-1, 12 sont retrouvées chez ECE-2. En particulier la cystéine 412, responsable de la formation de dimères chez ECE-1, est conservée chez ECE-2. Ainsi, ECE-2 pourrait également former des dimères covalents. Finalement, ECE-2 constitue une protéine hautement glycosylée de 130 kDa, contenant 10 sites potentiels de N-glycosylation dont

Tableau 1.4 – Substrats peptidiques d'ECE-2

Substrats	Sites de clivage/séquence	Km( $\mu$ M)	Références
Big endothéline-1	CSCSSLMDKECVYFCHLDI-IW†VNTPEHVVPYGLGSPRS	n.d.	(Mzhavia et al. 2003)
Bradykinine	RPPGFSP†FR	n.d.	(Mzhavia et al. 2003)
Neurotensine	pELYENKPRRP†Y†IL	n.d.	(Mzhavia et al. 2003)
Angiotensine I	DRVYIHP†FHL	n.d.	(Mzhavia et al. 2003)
Substance P	RPKPQQFFG†LMNH <sub>2</sub>	n.d.	(Mzhavia et al. 2003)
BAM-18P	YGGFMRRVGRPE†WWMDYQ	n.d.	(Mzhavia et al. 2003)
Dynorphine B	YGGFLRRQ†FK†VVT	n.d.	(Mzhavia et al. 2003)
Little Pen-Len	AVDQDLGPEVPPENV-LGA†LL†R†VKRLENSSPQAPA	n.d.	(Mzhavia et al. 2003)

† identifie les sites de coupures

la localisation n'est pas totalement conservée avec ECE-1 (Emoto & Yanagisawa 1995).

ECE-2 est exprimée dans divers tissus incluant l'utérus, les ovaires, les testicules, le coeur, les poumons, les reins, l'hypophyse et les glandes surrénales. Par buvardage Northern, il a été démontré que, de façon générale, l'ARNm d'ECE-2 est beaucoup moins abondant que celui d'ECE-1, à l'exception des tissus neuronaux (Emoto & Yanagisawa 1995, Ikeda et al. 1999). Par exemple, dans les cellules endothéliales, la quantité d'ARNm d'ECE-2 est estimée à 1 à 2 % de la quantité d'ARNm d'ECE-1. Tout comme ECE-1, 4 isoformes d'ECE-2 ont été identifiées (ECE-2a-1, ECE-2a-2, ECE-2b-1, ECE-2b2) (Lorenzo et al. 2001, Ikeda et al. 1999). Ces isoformes diffèrent dans leur queue N-terminale et possèdent une distribution tissulaire différente. Le rôle de chacune de ces isoformes reste à être identifié.

Tout comme ECE-1 et l'EPN, ECE-2 hydrolyse les liens peptidiques en N-terminal d'acides aminés hydrophobes. En plus des Big endothélines, ECE-2 est capable de métaboliser plusieurs substrats *in vitro* incluant la neurotensine, la dynorphine, la bradykinine et le peptide Bam 18 (Mzhavia et al. 2003). Toutefois, l'importance physiologique d'ECE-2 sur le métabolisme de ces substrats reste à être démontrée (Tableau 1.4).

Bien qu'ECE-1 et ECE-2 soient très similaires, des différences importantes existent. Premièrement, contrairement à ECE-1, ECE-2 démontre une activité enzymatique opti-

male à pH 5.5 et possède une activité négligeable à pH neutre. De plus, l'enzyme est localisée uniquement à l'intérieur de la cellule, possiblement dans le réseau trans-Golgien, où elle participerait à l'étape finale de la maturation des endothélines. Une autre caractéristique qui distingue les deux enzymes est leur sensibilité aux inhibiteurs. En effet, ECE-1 est 250 fois moins sensible au phosphoramidon qu'ECE-2 qui se rapproche davantage de l'EPN sur cet aspect (Emoto & Yanagisawa 1995). Contrairement aux souris déficientes en ECE-1, les souris homozygotes négatives pour ECE-2 sont viables, fertiles et montrent une longévité comparable aux souris de type sauvage. Cependant, l'inactivation combinée de ECE-1 et ECE-2 a révélé un rôle pour ECE-2 dans le développement du coeur chez la souris (Yanagisawa et al. 2000).

## 1.6 PHEX

PHEX (Phosphate regulating gene with homology to endopeptidase on the X chromosome) a d'abord été identifiée en 1995 suite à des études de clonage positionnel sur l'ADN de patients souffrant de rachitisme familial hypophosphatémique lié au chromosome X (XLH) (HYP-Consortium 1995). Cette maladie, à caractère dominant, est la forme la plus commune de rachitisme familial avec une incidence de 1 cas pour 20 000 naissances. La XLH est caractérisée par une diminution de la réabsorption du phosphate au niveau du rein et par un dérèglement du métabolisme de la vitamine D. Parmi les manifestations cliniques les plus évidentes de la maladie on retrouve une petite stature, du rachitisme, des difformités au niveau des membres inférieures et des abcès au niveau des dents. Jusqu'à maintenant, plus de 157 mutations ont été identifiées chez les patients atteints de XLH et toutes sont de type inactivatrices (revue par: Tenenhouse (1999), Drezner (2000), Nelson et al. (1997), Nelson et al. (1997), de Beur & Levine (2002)).

Suite à son identification chez les familles atteintes de XLH, l'ADNc de Phex de souris et d'humains fut cloné en 1996 et 1997-98 respectivement (Du et al. 1996, Lipman et al. 1998). PHEX est composée de 749 acides aminés dont 36% sont identiques à ceux de l'ECE-1 et 34% à ceux de l'EPN (Tableau 1.2). Parmi les acides aminés conservés avec l'EPN on retrouve, en plus des motifs **HEXXH** et **ENXADXGG**, l'acide glutamique 581, l'asparagine 645 et l'histidine 710 (correspondant à Glu 584, Asn 650 et His 711 chez l'EPN). L'acide glutamique 584 et l'asparagine 650 sont essentiels à la catalyse chez l'EPN tandis que

l'histidine 711 participe à la stabilisation de l'état de transition. PHEX possède également 9 sites potentiels de N-glycosylation. De plus, des études de marquage suivies de chasse et de digestion à l'aide de glycosydases ont démontré que PHEX est glycosylée et que la forme mature de la protéine, présente à la membrane plasmique, possède une masse moléculaire apparente de 100-105 kDa (Sabbagh et al. 2001, Boileau et al. 2001). Finalement, comme la plupart des membres de la famille, PHEX possède 10 cystéines conservées dans son domaine extracellulaire. On croit que ces cystéines seraient responsables du maintien de la structure tridimensionnelle de la protéine comme c'est le cas pour l'EPN (Oefner et al. 2000).

PHEX est exprimée de façon prédominante au niveau des os et des dents. Des études immunohistochimiques ont démontré que ce sont les ostéoblastes et les ostéocytes qui expriment PHEX au niveau de l'os tandis que les odontoblastes expriment la protéine au niveau des dents (Ruchon et al. 2000, Thompson et al. 2002). De plus, des études chez la souris indiquent que la protéine n'est pas exprimée dans les cellules moins différenciées de la lignée ostéoblastique (préostéoblastes et précurseurs) et que son expression dans les os diminue avec l'âge (Ruchon et al. 1998). Ceci suggère une corrélation entre l'expression de PHEX et la croissance osseuse et/ou la minéralisation. D'ailleurs, chez la souris adulte, PHEX est fortement exprimée au niveau des incisives en croissance et peu exprimée au niveau des molaires matures. Par RT-PCR, plusieurs groupes ont rapporté la présence de l'ARNm de PHEX dans d'autres tissus tels que le cerveau, le coeur, les testicules, l'ovaire d'adulte, les glandes parathyroïdiennes, le poumon foetal et adulte, les tissus tumoraux associés à l'ostéomalacie hypophosphatémique oncogénique (OHO) (Meyer & R. A. Meyer 2000, Meyer et al. 2000).

Bien que quelques études aient rapporté l'identification de substrats pouvant être clivés par PHEX *in vitro*, ce n'est que récemment que l'activité enzymatique de la protéine fut mieux caractérisée. À l'aide d'une banque combinatoire de peptides synthétiques fluorogéniques et d'une forme recombinante sécrétée et purifiée de PHEX, Campos et al. (2003) ont pu mieux caractériser la spécificité de clivage de PHEX. Cette étude révèle que PHEX possède une spécificité stricte pour les résidus acides (glutamate, aspartate) au niveau du site P<sub>1</sub>' avec une préférence marquée pour un résidu aspartate. La position P<sub>2</sub>' présente une spécificité modérée pour les acides aminés avec des chaînes latérales aromatiques (ex. Phe, Tyr) et polaire (Ser, Thr). Par contre, les substrats possédant un résidu proline, glycine

Tableau 1.5 – Substrats peptidiques de PHEX

Substrat	Sites de clivage/séquence	Km( $\mu$ M)	Références
PTHrP <sub>107-139</sub>	TRSAWL†DSGVTGSGLEGDHL- S†DTSTTSLEL†DSR	n.d.	(Boileau et al. 2001)
PTH <sub>1-34/38</sub>	AVSEIQFMHNLGKHLSSMERV- EWLRKKLQ†DVHNFVALG	n.d.	(Lipman et al. 1998)
Leu-enképhaline	YGGFL	n.d.	(Guo et al. 2001)
FGF-23	Genebank no:AY336491.1	n.d.	(Bowe et al. 2001)
ZAAL-pNA	—	n.d.	(Shirotnani et al. 2001)

† identifie les sites de coupures

ou leucine à cette position résistent à l'hydrolyse par PHEX. Quant au site S<sub>1</sub> de PHEX, il peut accepter un large éventail d'acides aminés, à l'exception de l'histidine, de l'isoleucine et de la valine. La comparaison du sous-site S'<sub>1</sub> de l'EPN avec celui de PHEX a révélé que contrairement à l'EPN, la poche S'<sub>1</sub> de PHEX contient une arginine positivement chargée qui pourrait former un lien ionique avec la chaîne latérale du résidu aspartate du substrat. Ceci expliquerait pourquoi PHEX clive en position N-terminale de résidus acides contrairement aux autres membres de la famille, qui eux, préfèrent les acides aminés hydrophobes. Finalement, tout comme l'EPN, PHEX préfère les substrats avec un résidu non amidé en position C-terminale.

Mis à part les peptides synthétiques, quelques peptides ont été rapportés comme substrats potentiels de PHEX (voir Tableau 1.5).

Parmi ceux-ci, on retrouve le PTHrP<sub>107-139</sub> qui, *in vitro*, est clivé à trois positions, toutes situées en N-terminale d'un résidu aspartate (Boileau et al. 2001). La PTH<sub>1-34/38</sub>, la leu-enképhaline, la protéine FGF-23 et le substrat synthétique de l'EPN ZAAL-pNA furent aussi rapportés comme substrats de PHEX *in vitro* (Lipman et al. 1998, Guo et al. 2001, Bowe et al. 2001, Shirotnani et al. 2001). Cependant, à l'exception de FGF-23, ces résultats n'ont pu être confirmés par d'autres groupes (Lipman et al. 1998, Boileau et al. 2001). Une des raisons pouvant expliquer ceci est l'utilisation, dans ces études, de préparations membranaires pouvant contenir des activités peptidasiques contaminantes et non de la protéine purifiée. Finalement, certains peptides comme la substance P, la caséine, STC-1, PTHrP<sub>1-34</sub>, PTH<sub>1-84</sub>, PTH<sub>1-34</sub>, la bradykinine, la calcitonine, l'OGP, l'endothéline-



1, la Big endothéline-1,  $\alpha$ -CGRP et l' $\alpha$ -endorphine ne semblent pas clivés par PHEX. L'ostéocalcine quant à elle n'est pas clivée par PHEX mais agirait plutôt comme inhibiteur de l'enzyme tout comme le phosphate ( $P_i$ ) et le pyrophosphate ( $PP_i$ ) (Boileau et al. 2001). Par ailleurs, l'inhibition par l'ostéocalcine est abolie en présence de calcium. Des variations dans les concentrations de  $Ca^{2+}$ , du  $P_i$ , du  $PP_i$  et de l'ostéocalcine (tous présents dans l'os) pourraient permettre de contrôler la minéralisation osseuse.

Le mécanisme par lequel la perte de PHEX cause l'hypophosphatémie liée au chromosome X demeure encore incompris. Certaines études sur le modèle animal de la maladie (les souris hyp) ont démontré que le défaut primaire de minéralisation osseuse ainsi que le problème de réabsorption du phosphate sont dépendants d'un facteur circulant. PHEX serait impliquée d'une façon directe ou indirecte dans la maturation ou le clivage de ce facteur appelé jusqu'ici "Phosphatonine". C'est la "Phosphatonine" qui serait impliquée dans le contrôle de la minéralisation osseuse et dans la réabsorption du phosphate au niveau du rein. Récemment, il a été suggéré que FGF-23 pourrait constituer un facteur de régulation de la réabsorption rénale du phosphate. Des mutations dans le gène de FGF-23 ont été identifiées chez les patients atteints de rachitisme héréditaire autosomal avec hypercalciurie (ADHR)(HYP-Consortium 2000). Ces patients présentent des manifestations cliniques similaires à ceux atteints de XLH. Cependant, la régulation de l'activité de FGF-23 par PHEX *in vivo* reste à être démontrée. L'identification de nouveaux substrats de PHEX et la découverte de la "Phosphatonine" permettront certainement de mieux comprendre le mécanisme d'action de PHEX et par le fait même le rachitisme familial hypophosphatémique lié au chromosome X.

Bien que l'importance de PHEX dans la régulation du processus de minéralisation, du métabolisme de la vitamine D et dans la réabsorption du phosphate au niveau du rein soit bien établie, le mécanisme d'action de l'enzyme reste à être caractérisé.

## 1.7 KELL

La protéine Kell fait partie d'un système de groupes sanguins complexe contenant plus de 20 antigènes différents. En présence d'incompatibilité de l'antigène, Kell peut causer des réactions hémolytiques très sévères lors de transfusions sanguines et peut également causer l'érythroblastose chez le nouveau né. Des substitutions de bases engendrant des change-

ments ponctuels d'acides aminés au niveau de la protéine constituent la base moléculaire des différents épitopes de groupes sanguins associés à Kell (Lee 1997, Lee et al. 2001, Lee et al. 2003).

L'ADNc de Kell fut isolé pour la première fois en 1991 à partir d'une banque de moelle osseuse humaine (Lee et al. 1991). Par la suite, Kell fut également isolée chez la souris et le rat (Lee et al. 2000). Kell est une protéine de 731 acides aminés dont 25% sont identiques à ceux de l'EPN et 30,4 % sont identiques à ceux de l'ECE-1 (Tableau 1.2). La protéine possède 6 sites potentiels de N-glycosylation et 16 cystéines dont 15 se retrouvent dans le domaine extracellulaire. De ces 15 cystéines, 10 sont conservées avec l'EPN. Sa queue N-terminale intracellulaire de 47 acides aminés est ancrée au cytosquelette. Kell diffère des autres membres de la famille par le fait qu'elle forme des hétérodimères avec une protéine à dix passages transmembranaires, la protéine XK. Des études de mutagenèse dirigée ont démontré que la cystéine 72 de Kell forme un pont disulfure avec la cystéine 347 de XK (Russo et al. 1998). Le rôle physiologique de cette association demeure encore inconnu à ce jour.

Les premières analyses d'expression de l'ARNm de Kell par buvardage Northern ont démontré que l'expression de l'antigène Kell était restreinte aux tissus érythroïdes, soit: la moelle osseuse et le foie foetal (Lee et al. 1993). Des études immunologiques et de cytométrie de flux sur des échantillons de moelle osseuse, indiquent que la protéine Kell est présente au stade le plus précoce de la différenciation des cellules érythroïdes. Des analyses plus exhaustives par buvardage par points (dot blot) ont révélé la présence de l'ARNm de Kell dans plusieurs autres tissus incluant le cerveau, le coeur, la moelle épinière, le foie, le rein, les intestins, l'estomac, le muscle squelettique, le pancréas, le thymus, la glande thyroïde, la vessie, la prostate, le testicule, l'utérus, la glande mammaire, les ovaires et plusieurs autres (Russo et al. 2000). L'analyse quantitative des résultats de buvardage par points a permis de déterminer que l'ARNm de Kell est exprimé de façon prédominante non seulement dans le foie foetal et dans la moelle osseuse mais également dans le testicule. Finalement, des études d'immunoprécipitation ont démontré que Kell est associée à la protéine XK dans au moins deux tissus, soit le muscle squelettique et les cellules rouges sanguines (Jung et al. 2001). On ne sait toutefois pas si c'est systématiquement le cas dans tous les tissus.

Bien que Kell possède le motif signature du zinc ainsi que deux des acides aminés

importants pour la catalyse chez l'EPN (équivalent à Glu<sup>646</sup> et His<sup>711</sup> de l'EPN), ce ne fut qu'en 1999 qu'une activité enzymatique lui fut attribuée. Lee et al. (1999) ont démontré que Kell clive spécifiquement la Big endothéline 3 (Big ET-3) au niveau du lien Trp21-Ile22 produisant ainsi l'endothéline-3. L'activité de Kell est optimale à un pH de 6,0 à 6,5 et n'est que partiellement inhibée par le phosphoramidon. Kell peut également couper la Big ET-1 et 2 pour générer l'ET-1 et l'ET-2 mais avec une efficacité réduite. De plus, la formation d'un hétérodimère avec XK ne semble pas essentielle à l'activité enzymatique de Kell puisque la protéine Kell recombinante est capable d'hydrolyser la big ET-3 *in vitro*. Il faut cependant noter que l'importance physiologique du clivage des précurseurs des endothélines par Kell *in vivo* reste à être démontré. Kell ne semble pas indispensable puisque certains individus n'exprimant pas la protéine ne démontrent pas de phénotype marqué. Les mutations causant une déficience en protéine Kell ont été caractérisées. Certaines introduisent un codon stop prématuré alors que d'autres affectent le transport à la membrane ou la biosynthèse de la protéine (Lee et al. 2001). Par contre, les individus déficients en protéine XK souffrent du syndrome de Mcleod caractérisé entre autres par une morphologie atypique des érythrocytes, par une dystrophie musculaire tardive et par des problèmes d'ordre neurologique (Danek et al. 2001). Par conséquent, ces fonctions associées à la protéine XK semblent distinctes des fonctions dépendantes de son association avec Kell.

Récemment, un modèle de la structure tridimensionnelle de Kell, basé sur la structure cristalline de l'EPN fut proposé (Lee et al. 2003). Selon l'alignement des séquences de Kell avec l'EPN, les deux enzymes adopteraient une structure tertiaire similaire. Kell adopterait une structure globulaire composée de 2 domaines en hélices- $\alpha$ . Le domaine situé près de la membrane plasmique contient les extrémités amino- et carboxy-terminales ainsi que le site actif de l'enzyme. De plus, les acides aminés qui sont substitués pour générer les différents épitopes de groupe sanguin sont regroupés dans le domaine qui ne contient pas les motifs nécessaires à l'activité catalytique. Selon ce modèle, ces acides aminés seraient situés à la surface du domaine globulaire et seraient donc exposés à l'environnement. Des études de mutagenèse dirigée sur les acides aminés composant le site actif révèlent que Kell et l'EPN utilisent les mêmes acides aminés pour la coordination de l'atome de zinc et pour l'hydrolyse du substrat. Toutefois, Kell semble utiliser des acides aminés différents pour la liaison au substrat. De plus, la substitution de certains résidus du site actif de Kell et de

l'EPN n'affecte pas l'activité des deux enzymes de la même façon. Par conséquent, Kell serait plus flexible et permissive quant à la composition des acides aminés admis au niveau de son site actif (Lee et al. 2003). L'analyse de la structure cristalline de Kell permettra certainement de confirmer ce modèle et d'expliquer les différences de spécificité observées entre les deux sites actifs.

## 1.8 ECEL1/XCE/DINE

ECEL1 fut récemment identifiée sur la base de sa grande similarité avec ECE-1. Sa séquence nucléotidique complète fut identifiée par criblage d'une banque d'ADNc de cerveau humain à partir de courtes séquences similaires à ECE-1 (ESTs) (Valdenaire et al. 1999). L'ADNc de ECEL1 est composé de 2859 nucléotides dont le contenu en GC est très élevé. En effet, on compte plus de 60% de GC dans la séquence nucléotidique complète et 82% dans les 700 premiers nucléotides. ECEL1 constitue une protéine transmembranaire de 775 acides aminés contenant trois sites potentiels pour la N-glycosylation et 11 cystéines du côté luminal de la protéine. De ces 11 cystéines, 9 sont conservées avec les autres membres de la famille. La séquence en acides aminés de ECEL-1 est identique à 42% à celle de ECE-1 et à 37% à celle de l'EPN (Tableau 1.2). ECEL1 ne possède pas d'équivalent du résidu cystéine responsable de la dimérisation d'ECE-1 ce qui suggère que la protéine ne formerait pas de dimères. D'ailleurs, des études de SDS-PAGE en conditions non réductrices suivies d'un immunobuvardage ne permettent pas de détecter d'homodimères de ECEL1 (Valdenaire & Schweizer 2000).

Tout comme l'isoforme ECE-1b de l'enzyme de conversion de l'endothéline, ECEL1 est localisée à l'intérieur de la cellule. L'expression de ECEL1 dans plusieurs lignées cellulaires de mammifères (CHO, MDCK, Hela et HEK) a démontré la localisation préférentielle de la protéine au niveau du réticulum endoplasmique (Valdenaire & Schweizer 2000, Valdenaire et al. 1999). Des études de biotinylation de surface et d'immunodétection indiquent que moins de 10% de la protéine est acheminée à la membrane plasmique de cellules HEK transfectées (Benoit et al. 2004). La distribution cellulaire de la protéine endogène exprimée dans le cerveau et l'hypophyse de souris démontre le même patron de localisation. De plus, des études de marquage suivies de chasse indiquent que la protéine ECEL1 localisée dans le réticulum endoplasmique est stable. Ceci suggère que ECEL1 pourrait jouer un rôle à

la fois au niveau du réticulum endoplasmique ainsi qu'à la surface cellulaire, comme les autres membres de la famille de l'EPN.

Plusieurs analyses par buvardage Northern, buvardage par points ainsi que par hybridation *in situ* ont permis de déterminer l'expression tissulaire de l'ARNm de ECEL1. Chez l'humain et le rat, les niveaux d'expression les plus élevés ont été détectés dans le système nerveux central, la moelle épinière, les ganglions sympathiques et les cellules utérines subépithéliales (Kiryu-Seo et al. 2000, Valdenaire et al. 1995, Valdenaire et al. 1999). Dans le système nerveux central ECEL1 est exprimée spécifiquement au niveau de certains neurones. L'ARNm d'ECEL1 a pu être détecté dans des régions bien précises du système nerveux dont le noyau caudé, le noyau subthalamique, le tronc cérébral, le putamen, le thalamus et l'amygdala. Au niveau périphérique, l'expression de l'ARNm de ECEL1 est beaucoup plus faible. Certains tissus tels que le foie, le coeur, la vessie, le colon, la glande mammaire, la prostate, le thymus et les poumons n'expriment pas le transcrite. En plus du système nerveux, ECEL1 est fortement exprimée dans les ovaires, l'hypophyse, le muscle squelettique et la glande surrénale. De façon générale, le patron d'expression du transcrite de ECEL1 suggère une fonction de modulateur neuroendocrinien pour la protéine.

Peu de choses sont connues sur l'activité enzymatique de ECEL1. Les acides aminés importants pour l'activité enzymatique identifiés chez l'EPN sont conservés chez ECEL1 ce qui suggère que la protéine est une véritable métallopeptidase. Jusqu'à ce jour, aucun substrat physiologique n'a pu être identifié. Des préparations membranaires de cellules surexprimant ECEL1 sont incapables d'hydrolyser la Big ET-1, l'ET-1, la galanine, la bradykinine, la calcitonine, la met- et la leu-enképhaline ainsi que l'OGP, la PTHrP<sub>1-34</sub>, la PTH<sub>1-84</sub> et l' $\alpha$ -CGRP. Par contre, Kiryu-Seo et al. (2000) ont démontré que l'orthologue de ECEL1 chez le rat est capable d'hydrolyser, *in vitro*, un tripeptide fluorogénique synthétique, le Z-Gly-Gly-Leu-pNA. Ce peptide constitue également un substrat de l'EPN. De plus, l'hydrolyse du tripeptide synthétique peut être inhibée par des inhibiteurs de métallopeptidases comme le phosphoramidon, le thiorphan, l'EDTA, et le 1,10-orthophénantroline. Toutefois, ces résultats n'ont pu être confirmés dans notre laboratoire.

Les premières évidences concernant l'importance physiologique de ECEL1 viennent de l'analyse des souris déficientes pour le gène. En effet, l'absence d'ECEL1 entraîne la mort néonatale chez les souris homozygotes négatives pour ECEL1, soulignant ainsi la fonction

essentielle et non redondante de la protéine (Schweizer et al. 1999). Ces souris meurent d'anoxie, 10 à 30 minutes après la naissance, suite à une déficience du système respiratoire. L'anoxie postnatale serait due, non pas à une déficience en protéines de surfactant ou à une obstruction des voies respiratoires mais plutôt à un problème au niveau du contrôle central de la respiration. Il faut souligner que l'ARNm de ECEL1 est fortement exprimé dans des régions essentielles au contrôle et à la transmission de la respiration autonome spontanée soit la medulla et la moelle épinière. De plus, il semblerait qu'une autre fonction d'ECEL1 soit de protéger la cellule contre différents stress. En effet, chez le rat, les niveaux d'ARNm d'ECEL1 (DINE) sont augmentés suite à une variété de lésions dans le système nerveux central incluant des lésions mécaniques, ischémiques et chimiques mais non osmotiques ou psychologiques (Kiryu-Seo et al. 2000, Kato et al. 2002). De plus, l'expression de ECEL1 augmente la survie des cellules COS dans un modèle d'apoptose induite par la céramide C2. L'activité protéolytique d'ECEL1 permettrait de réguler l'expression de certaines enzymes anti-oxydantes dont la Mn-superoxyde dismutase, la Zn/Cu-superoxyde dismutase et la glutathione peroxidase. Bien que l'expression d'ECEL1 ne permette pas de rattraper les cellules déjà endommagées, elle pourrait contribuer à réduire l'impact du stress oxydatif induit par une blessure nerveuse et ainsi prévenir la mort neuronale. Finalement, des études de RT-PCR en temps réel suggèrent l'implication de ECEL1 dans la régulation de la croissance et de la différenciation des neuroblastomes puisque les niveaux d'ARNm d'ECEL1 sont faibles dans les cellules cancéreuses comparativement aux tumeurs bénignes (Kawamoto et al. 2000). Une meilleure caractérisation de l'activité enzymatique, la localisation précise de la protéine et l'identification de nouveaux substrats permettront certainement de mieux comprendre les fonctions physiologiques d'ECEL1.

## 1.9 **Projet de Recherche**

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative qui atteint plus de 5% des personnes de plus de 65 ans et 20% des personnes de plus de 80 ans. Sa forte prévalence ainsi que la charge sociale et économique qu'elle fait peser sur la société en font l'un des problèmes de santé publique les plus étudiés. L'accumulation dans le cerveau de plaques composées principalement de peptide amyloïde- $\beta$  serait la principale cause de la maladie. Récemment, Iwata et al. (2000) ont étudié le catabolisme du peptide amyloïde- $\beta_{1-42}$

en suivant la dégradation du peptide marqué, suite à son injection au niveau de l'hippocampe de rat. Les auteurs ont démontré que l'enzyme responsable de la dégradation du peptide était immunologiquement et pharmacologiquement identique à l'EPN. Cette étude démontre également qu'une administration prolongée d'un inhibiteur spécifique à l'EPN (thiorphan) cause l'accumulation de plaques dans le cerveau des rats. De plus, une étude antérieure avait déjà démontré que l'EPN est capable de dégrader le peptide amyloïde- $\beta_{1-42}$  (Howell et al. 1995).

Suite à ces résultats, nous nous sommes proposé d'étudier les niveaux d'expression de l'EPN dans les cerveaux sains et malades à différents stades de progression de la maladie. L'objectif général de cette étude était de déterminer si l'EPN est présente aux endroits où le peptide amyloïde- $\beta$  est produit et si son expression varie en fonction de la gravité des lésions. De plus, nous avons voulu déterminer si l'expression et la localisation de l'EPN variait chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer par rapport aux sujets sains. Nous avons évalué les niveaux d'expression des transcrits et de la protéine dans trois régions du cerveau soit l'hippocampe, le cortex et les méninges. Les niveaux de transcrits ont été évalués par RT-PCR et la localisation cellulaire de la protéine a été effectuée par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps monoclonal disponible dans le laboratoire. Les résultats de cette étude ont été publiés dans le *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* en octobre 2002 et sont présentés dans le deuxième chapitre de cet ouvrage (Carpentier et al. 2002).

Les enzymes de la famille de l'Endopeptidase Neutre sont impliquées dans d'importantes fonctions physiologiques et plusieurs inhibiteurs et agents pharmaceutiques ont été conçus afin d'agir spécifiquement sur ces enzymes. La présence de nouveaux membres de la famille de l'EPN encore non caractérisés viendrait compromettre la spécificité de ces agents pharmaceutiques. Il est donc essentiel de tenter d'identifier et de caractériser tous les constituants de cette famille. Les découvertes successives de KELL, ECE-1, PHEX et ECE-2 nous ont poussé à croire en l'existence potentielle de nouveaux membres dont les fonctions biologiques seraient tout aussi importantes.

Lors de mon arrivée dans le laboratoire du Dr Luc DesGroseillers et du Dr Guy Boileau, une stratégie utilisant le RT-PCR avait été utilisée pour identifier de nouvelles enzymes de la famille de l'EPN. Un nouveau membre de la famille, nommé NL1 pour *NEP-Like 1*, venait tout juste d'être identifié chez la souris. NL1 constitue le membre de la famille

possédant le plus d'identité avec l'EPN (55%) au niveau de la séquence en acide aminés. Les premières études dans le laboratoire suggéraient que NL1 est enzymatiquement similaire à l'EPN. Toutefois, contrairement aux autres membres de la famille, il avait été observé que NL1 pouvait être sécrétée dans le milieu de culture.

L'objectif général de cette partie de mon projet de recherche était de mieux caractériser ce nouveau membre de la famille et de tenter d'identifier ses rôles fonctionnels. Pour ce faire, nous avons:

1. Effectuer l'analyse de l'expression de NL1 au niveau cellulaire et tissulaire
2. Mieux caractériser l'activité enzymatique de la protéine
3. Générer des souris déficientes en NL1

L'expression de NL1 fut d'abord caractérisée suite à son expression hétérologue dans des cellules de mammifères. NL1 étant le premier membre de la famille à être sécrété dans le milieu extracellulaire, le mécanisme de maturation de la protéine fut caractérisé. Nous avons par la suite étudié l'expression tissulaire de son transcrite chez la souris par RT-PCR, buvardage Northern et hybridation *in situ*. La protéine fut ensuite produite dans des cellules de mammifères, purifiée et mise en présence de différents substrats peptidiques potentiels choisis en fonction de leurs sites d'expression. L'identification de nouveaux substrats pour NL1 nous a ainsi permis de mieux caractériser son activité enzymatique. Les résultats de ces études sont présentés dans les chapitres 3 et 4 de cette thèse (Ghaddar et al. 2000, Carpentier et al. 2003).

Finalement, la caractérisation de l'organisation du gène fut effectuée comme première étape visant à générer des souris déficientes en NL1. Ainsi, un vecteur de ciblage permettant d'inactiver le gène par recombinaison homologue a pu être construit et introduit dans des cellules embryonnaires souches (cellules ES). Suite à l'identification de clones positifs pour la recombinaison homologue, des souris déficientes en NL1 ont été générées et caractérisées. L'ensemble des résultats de cette étude est finalement présenté dans le chapitre 5 de cet ouvrage et soumis à la revue *Molecular and Cellular Biology*.

Finalement, le chapitre 6 de cette thèse constitue une revue de la littérature complète sur NL1 depuis son identification jusqu'à ce jour (Carpentier et al. 2003).



# 2

---

## Préambule

Le peptide amyloïde beta ( $A\beta$ ) est un peptide constamment produit et métabolisé dans les conditions normales mais dont la fonction physiologique demeure encore mal caractérisée. Son accumulation sous forme de plaques séniles au niveau du cerveau constitue un facteur important dans la longue cascade menant à la maladie d'Alzheimer. Le peptide  $A\beta$  peut également s'accumuler au niveau des parois des petites artères des leptoméninges et du cortex cérébral causant ainsi une angiopathie cérébrale de type amyloïde (CAA). Ce type d'angiopathie ne se retrouve pas uniquement chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer mais également chez plus de la moitié des personnes âgées de plus de soixante-dix ans. L'accumulation du peptide  $A\beta$  constitue donc un facteur important non seulement dans la maladie d'Alzheimer mais également dans le processus naturel de vieillissement chez l'homme.

Récemment, plusieurs études ont démontré l'importance des peptidases/protéases dans le mécanisme de dégradation et d'élimination du peptide  $A\beta$ . De plus en plus d'études suggèrent que l'EPN constitue un candidat de choix en tant qu'enzyme de dégradation du peptide  $A\beta$ . En effet, d'importants travaux par Iwata et al. (2000) suggèrent pour la première fois que l'enzyme principalement responsable de la dégradation du peptide amyloïde- $\beta_{1-42}$  soit l'EPN ou une enzyme dont l'activité est très apparentée.

Suite à ces résultats, nous nous sommes proposé d'étudier les niveaux d'expression de l'EPN dans les cerveaux sains et malades à différents stades de progression de la maladie. L'objectif général de cette étude était de déterminer si l'EPN est présente aux endroits où le peptide amyloïde- $\beta$  est produit et si son expression varie en fonction de la gravité des lésions.

Les résultats de cette étude, publiée en 2002, sont présentés sous forme d'article, dans

le chapitre suivant.

# 2

---

## Declining Expression of Neprilysin in Alzheimer's Disease Vasculature: Possible Involvement in Cerebral Amyloid Angiopathy

Mélanie Carpentier<sup>a</sup>, Yves Robitaille<sup>b</sup>, Luc DesGroseillers<sup>a</sup>, Guy Boileau<sup>a</sup>, Mieczyslaw Marcinkiewicz<sup>a,c\*</sup>

<sup>a</sup> Département de biochimie, Faculté de médecine, Université de Montréal

<sup>b</sup> Institut Universitaire de Gériatrie de Montréal, Université de Montréal

<sup>c</sup> Laboratoire de Neuroendocrinologie, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Département de médecine, Université de Montréal

\*Corresponding author: Département de Biochimie, Université de Montréal, Casier postal 6128 succ. Centre-Ville, Montréal (Quebec) Canada, H3C 3J7, Tel: 514 987 5572; Fax: 514 343-7018; *E-mail*: Marcinm@contact.net

**Key Words:** A $\beta$  metabolism; Astrocytes; Cerebral amyloid angiopathy; Neprilysin; Hippocampal neurons; Smooth muscle cells.

Published in the *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 61, No. 10, October 2002, pp. 849-856

### 2.1 Abstract

Molecular, genetics and pharmacological studies have shown that Neprilysin (also called NEP) catabolizes amyloid- $\beta$  peptides (A $\beta$ ) in healthy conditions. However, in Alzheimer's disease (AD) A $\beta$  accumulates forming senile plaques in brain parenchyma and amyloid deposition around blood vessels. In this study, we tested at cellular level the relationship between Neprilysin and A $\beta$  in human healthy and AD brain. Our results provided evidence for declining levels of Neprilysin in AD brains as compared to healthy controls in parallel with increasing deposition of A $\beta$ . In hippocampus of AD individuals, we observed a significant down-regulation of Neprilysin expression in pyramidal neurons, consistent with the possibility that Neprilysin controls the level of A $\beta$  accumulation and plaque formation in this area. In the cortex and leptomeninges, Neprilysin was expressed in the smooth muscle

cells of blood vessels. In sections from AD patients, we observed a clear inverse relationship between Neprilysin and A $\beta$  peptide levels in the vasculature, implicating Neprilysin in cerebral amyloid angiopathy.

## 2.2 Introduction

Toxic amyloid  $\beta$ peptide (A $\beta$ ) processed from a large amyloid  $\beta$ protein precursor ( $\beta$ APP) accumulates in brain tissues of Alzheimer's disease (AD) patients forming senile plaques and causing neuronal cell death (Checler 1995, Dickson 1997, Selkoe 1998). A $\beta$  also forms deposit in the walls of small arteries of leptomeninges and cortex causing cerebral amyloid angiopathy (CAA) (see Calhoun et al. (1999) for review). In CAA, A $\beta$  deposits are always associated with smooth muscle cells (SMC) and pericytes around cortical capillaries (reviewed in Prior et al. (2000)). Although the mechanism of A $\beta$  accumulation is still unclear, it was proposed that Apolipoprotein E and heparan sulfate proteoglycan-mediated internalization and therefore clearance of A $\beta$  peptide by SMCs protects the vascular system against critical A $\beta$  concentrations (Prior et al. 2000). A $\beta$ -induced CAA not only occurs in AD brains but also to various degrees in approximately half of all individuals over 70-year-old (Yamada et al. 1987, Itoh et al. 1993). CAA leads to spontaneous and often fatal cerebral haemorrhage and represents one of the major causes of non-traumatic haemorrhage stroke.

The steady-state level of A $\beta$  peptide in the brain and/or vasculature is determined by the balance between catabolic and anabolic activities. To what extent each of these influences A $\beta$  deposition remains unknown (Iwata et al. 2000). From numerous studies of familial and "non-familial" AD, it is now well established that excessive synthesis, translation and/or processing of neuronal  $\beta$ APP leads to high concentrations of A $\beta$  peptide and to the AD phenotype. Therefore, most attention has been focused on A $\beta$  anabolism. This is only recently that studies reported convincing evidence that the catabolism of the A $\beta$  peptide also plays important role in the establishment and/or progression of AD. These studies strongly suggested that Neprilysin (NEP, neutral endopeptidase-24.11, MME1, CALLA) (Devault et al. 1987, Crine et al. 1997) is the peptidase that participates in the degradation and clearance of toxic A $\beta$  (Iwata et al. 2000, Iwata et al. 2001). This conclusion was reinforced by the observation that the areas most susceptible to senile plaque

development such as hippocampus and temporal gyrus are also regions where Neprilysin is expressed at the lowest levels (Yasojima et al. 2001). Neprilysin expression is even lower in hippocampus and midtemporal gyrus of AD cases than in controls (Yasojima et al. 2001). Although Neprilysin transcripts have been detected in cortex and hippocampus, its cellular localization in these major structures has not yet been reported.

Therefore, detection of Neprilysin at the cellular level is critical for understanding its involvement in AD etiology. To demonstrate its involvement in AD we localized the enzyme in various brain sections of AD and control cases using a highly specific anti-Neprilysin monoclonal antibody developed in our laboratory. With this antibody we examined normal and diseased human brain regions with A $\beta$  deposition including hippocampus, temporal lobe cortex and leptomeninges and provided convincing evidence for down-regulation of Neprilysin expression in these areas of AD brains, consistent with its putative involvement in both AD and CAA.

## 2.3 Materials and Methods

### Human brain tissue

We examined human brain tissues obtained from the Brain Bank (Douglas Hospital Research Centre, Verdun, Qc). For RT-PCR analysis in cortex and hippocampus, frozen samples from 4 control (age range, 58-88 yr), 2 presenile (ages 57 and 66 yr) and 2 AD cases (ages 86 and 87 yr) were studied. For meninges RT-PCR analysis was performed on 6 controls of both sexes (age range, 76-87 yr) and 7 Alzheimer cases (age range, 82-92 yr). The last cases have been characterized for the presence of thioflavin S-stained blood vessels. Meninges contained a mix of positively-stained and unstained blood vessels with variable size of A $\beta$  deposits. For immunocytochemistry (ICC) we used a collection of paraffin-embedded tissues that included temporal lobe cortex, hippocampus and leptomeninges from 12 healthy (age range, 61-92 yr) and 12 AD individuals (age range, 65-95 yr). Autopsy was performed within a postmortem delay of 16 hours. Diagnostic criteria for AD cases included clinical and neuropathological data based on presence of senile plaques, neurofibrillary tangles and vascular deposit as provided by the Brain Bank. Considered as presenile were cases, which in addition to clinical and neuropathological criteria, displayed

the presence of a significant number of preamyloid primitive plaques and immature diffuse amyloid plaques (Marcinkiewicz & Seidah 2000). With exception of sporadic plaques all the controls were devoid of A $\beta$  deposition.

### **RT-PCR analysis**

Neprilysin transcripts were extracted from frozen samples with TRIZOL (GIBCO BRL, Burlington ON) and amplified using one-step RT-PCR kit from Qiagen (Mississauga, Canada; Cat.# 210212) as previously described (Ghaddar et al. 2000). First, different amounts of total RNA (0.1 to 1  $\mu$ g) and different numbers of PCR cycles (20 to 40) were tested to determine optimal conditions that kept amplification within non-saturable conditions. Accordingly, we amplified Neprilysin transcripts with 0.5  $\mu$ g of total RNA for 32 cycles and  $\beta$ -actin used as an internal control with 0.5  $\mu$ g of total RNA for 22 cycles (94°C for 45s, 54°C for 45s and 72°C for 1min). To prevent amplification of genome-generated PCR products, primers were designed on either side of introns. Neprilysin (5'<sub>1992</sub>-cagtgcacgtgtgtatcagtatgg-3' and 5'<sub>2359</sub>-tcatgtatgaattcttgccggcag-3': GenBank accession number Y00811) and  $\beta$ -actin (5'<sub>906</sub>-tcatgaagtgtgacgtggacatc-3' and 5'<sub>1187</sub>-agaagcatttgcggtggacgatg-3': GenBank accession number BC004251) primers amplified PCR-products of 367 and 282 bp, respectively. Controls contained no RNA template. Gels with ethidium bromide-stained PCR-products were analyzed with the Quantity one software (BioRad Laboratories, Hercules, CA). Expressed in arbitrary units, the density of Neprilysin products was normalized against the density of  $\beta$ -actin PCR-products amplified from the same sample.

### **Antibody specificity**

Specificity of monoclonal anti-Neprilysin antibody (prepared in this laboratory) was tested against all other members of the Neprilysin family. HEK T (NL1, MMEL2), LLC PK (PHEX, ECEL1) and MDCK (ECE-1) cells were transfected with mammalian expression vectors containing the appropriate cDNA and stable cells were selected with G418 (GIBCO BRL, Burlington ON). Culture medium (NL1) or total cell extracts (MMEL2, ECEL1, PHEX, ECE-1) were used as source of recombinant proteins. Semi-purified rabbit brush border membrane proteins (1  $\mu$ g) were prepared and used to detect Neprilysin. Total cell

extracts (100  $\mu$ g) and culture medium (40  $\mu$ g) were loaded on a 7.5% acrylamide gel and the proteins revealed by Western blotting. Blots were probed with the anti-Nepriylsin monoclonal antibody 18B5, diluted 1/12 000.

## Immunocytochemistry

ICC was performed with anti-Nepriylsin 18B5 monoclonal antibody, anti-CD10 Ab-2 (CALLA, Nepriylsin) mouse monoclonal antibody (cat# MS-728, NeoMarkers, Lab Vision, Fremont, CA) anti-Amyloid- $\beta_{8-17}$  (cat# NCL-Amyloid- $\beta$ , Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK) (Marcinkiewicz & Seidah 2000), anti- $\alpha$ -smooth muscle actin (cat# NCL-SMA, NovoCastra, Newcastle upon Tyne, UK), anti-gial acidic fibrillary protein (GFAP, cat# NCL-GFAP, NovoCastra, Newcastle upon Tyne, UK) and anti-apolipoproteinE (APOE, a generous gift of Dr. Y Marcel, University of Ottawa Heart Institute, Ottawa, ON). Comparative ICC was performed using either cryostat sections (anti-CD10) or serial paraffin sections (all other antibodies). Brain tissues were fixed in 4% formaldehyde (Fisher Scientific, Montréal, QC), 0.1% picric acid (cryostat sections)(Fisher Scientific, Montréal, QC) or 10% neutralized formaldehyde (paraffin-embedded tissue). Immunocytochemical reaction was performed using the biotin-streptavidin method according to the manufacturer's instruction (Histostain-DS, Zymed laboratories inc., South San Francisco, CA; cat# 95-999). Primary antibodies were diluted 1/10 (anti-CD10) or 1/50-1/100 (all other antibodies) in blocking solution (Histostain-DS), incubated for 48 hours at 4°C and revealed using either alkaline phosphatase or horseradish peroxidase methods as previously described in detail (Marcinkiewicz et al. 1999). Controls obtained by omission of primary antibodies were negative, emphasizing specificity of ICC.

## 2.4 Results

### 2.4.1 Detection of Nepriylsin transcripts

As a first step in establishing a correlation between Nepriylsin expression and A $\beta$  deposition, we compared Nepriylsin RNA expression in specific brain regions of control and AD cases. We first established the best RT-PCR conditions that kept amplification under the saturation point (data not shown). We chose 0.5  $\mu$ g of total RNA for reverse tran-

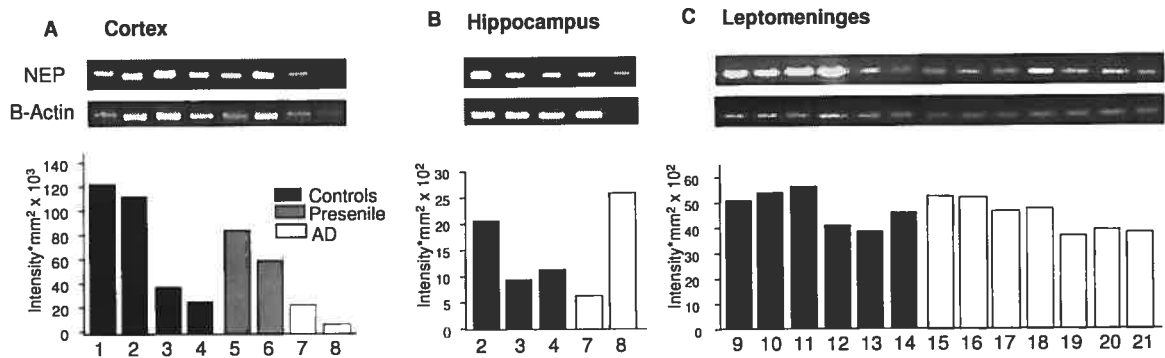


Figure 2.1: Expression of human Neprilysin mRNA transcripts in cerebral cortex (A), hippocampus (B) and leptomeninges (C). Control, presenile and AD samples were analyzed for Neprilysin and  $\beta$ -actin mRNA levels. Neprilysin and  $\beta$ -actin RT-PCR products were resolved by agarose gel electrophoresis, quantified and normalized. Results are means of 3 independent measurements for each case.

scription and 32 and 22 cycles for PCR-amplification of Neprilysin and actin transcripts, respectively. Neprilysin expression was normalized against actin expression. Using these conditions, RNA was successfully amplified from temporal lobe cortex, hippocampus and leptomeninges of control, presenile and/or AD case (Figure 2.1). Comparison of samples within each group first revealed great variation between individuals, making comparison between groups more difficult. Nevertheless, assessment of normal and AD cortex indicated that the relative expression of Neprilysin is lower in AD than in controls (Figure 2.1). In cortex, the mean values of healthy ( $76 \pm 43$  SD) and diseased ( $43 \pm 29$  SD) cases were, however, not statistically different ( $p > 0.05$  according to t Student's test), probably due to the observed Neprilysin-level variation between individuals and the low sample number. In leptomeninges, no change in Neprilysin expression was observed between normal (mean value  $48 \times 10^2 \pm 7.5$ ) and AD ( $44.5 \times 10^2 \pm 6.7$ ) cases. Similarly, in hippocampus, no difference was observed between normal (mean value  $13.83 \times 10^3$ ) and AD (mean value  $15.88 \times 10^3$ ) cases.

#### 2.4.2 Anti-Neprilysin antibody specificity

We next examined Neprilysin expression, by ICC, a more appropriate method to decrypt specific changes in protein expression at cellular resolution. As a first step, we characterized the 18B5 monoclonal anti-Neprilysin antibody for its specificity toward other



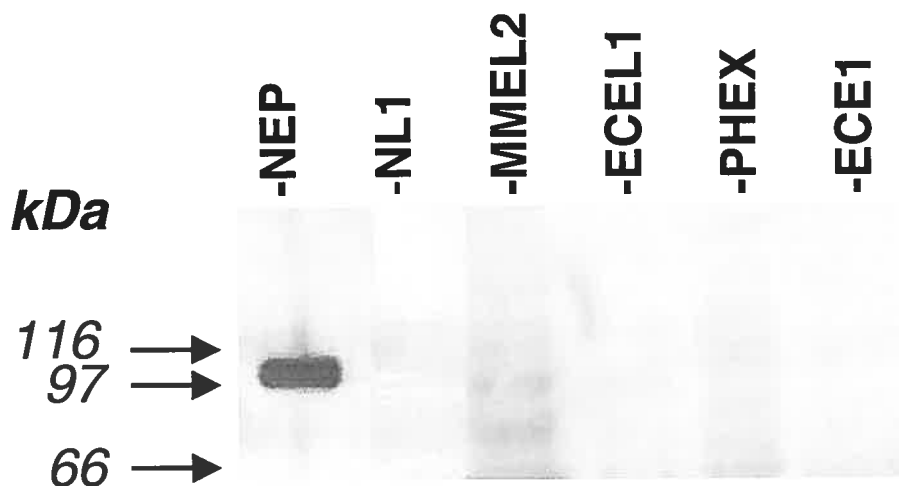


Figure 2.2: **Specificity of the 18B5 anti-Nepriylisin monoclonal antibody.** Total cell extracts and/or culture medium from transfected cells were analyzed by SDS-PAGE. The blot was probed with 18B5 antibody diluted 1/12 000. Lane 1: semi-purified Nepriylisin (100 kDa) from rabbit kidney brush border membrane, lane 2: culture medium from HEK T cells stably transfected with NL1 (125 kDa), lane 3: total cell extract from HEK T cells stably transfected with MMEL2 (80 kDa), lane 4 and 5: total cell extract from LLC PK cells stably transfected with ECEL1 (98 kDa) or PHEX (105 kDa), lane 6: total cell extract from MDCK cells stably transfected with ECE-1 (130 kDa). Equivalent amounts of proteins were loaded on a 7.5% acrylamide gel.

members of the Nepriylisin family. This was particularly essential since MMEL2, a newly discovered metallopeptidase which was cloned from human brain cDNA in our laboratory (Bonvouloir et al. 2001) shares 54% amino acid sequence identity with human Nepriylisin. Mammalian cells were stably transfected with cDNA coding for members of the Nepriylisin family and total cell extracts were prepared to detect these membrane bound peptidases. For the secreted NL1 peptidase, the culture medium were collected and concentrated. Immunoblot analysis showed that the anti-Nepriylisin antibody strongly recognizes Nepriylisin as a single 100 kDa band (Figure 2.2). This antibody did not cross-react with either NL1 (SEP, NEPII), MMEL2, ECEL1 (XCE, DINE), PHEX or ECE-1 demonstrating its high specificity.

### 2.4.3 Nepriylisin expression in hippocampus

Sections from 12 controls and 12 AD cases were stained with 18B5 to detect Nepriylisin protein at the cellular level. In hippocampus of normal individuals, Nepriylisin immunore-

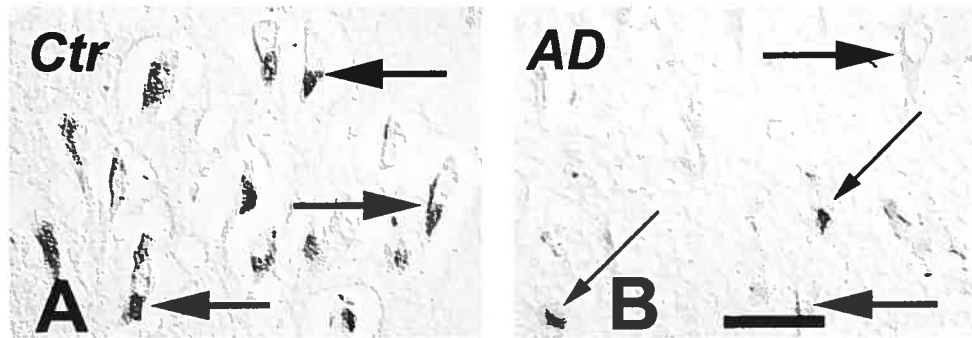


Figure 2.3: **Decreased Neprilysin immunoreactivity levels in AD hippocampus.** Sections of hippocampus from normal (A) and AD cases (B) were stained with anti-Neprilysin monoclonal antibody 18B5. Downregulation of Neprilysin expression in AD hippocampal pyramidal neurons (large arrows) is shown. Also noted is the presence of Neprilysin in presumptive astrocytes (thin arrows). Scale bar = 15  $\mu$ m.

activity was observed in pyramidal neurons (large arrows in Figure 2.3A). In contrast, within corresponding regions of hippocampus collected from AD cases in which senile plaques were detected, Neprilysin immunostaining in pyramidal neurons was dramatically decreased (Figure 2.3B). Interestingly, glial cells in proximity to senile plaque regions expressed Neprilysin (thin arrows in Figure 2.3B). In normal cases, these cells were unstained. Based on GFAP ICC performed on adjacent sections of AD cases (Figure 2.4A and B), these cells were identified as astrocytes. Neprilysin immunoreactivity was detected within approximately 4% of all GFAP-positive astrocytes found in the studied region (Figure 2.4A and B). Neprilysin-positive cells also stained with anti-APOE antibodies (Figure 2.4C and D), emphasizing that they represent a subpopulation of reactive astrocytes. These results strengthen the hypothesis that Neprilysin contributes to the clearance of A $\beta$  in hippocampus of normal individuals and prevents plaque formation and cell death. Consequently, they support the notion that Neprilysin down-regulation in this brain area constitutes a risk factor for developing AD.

#### 2.4.4 Neprilysin in blood vessels of cortex and leptomeninges

In the temporal lobe cortical tissue and leptomeninges of both control and AD cases, neuronal and glial cells were negative for Neprilysin expression as visualized by ICC (data not shown). This result confirms the scarcity of Neprilysin in these brain regions. However, Neprilysin immunostaining was largely distributed in the cerebral vasculature of

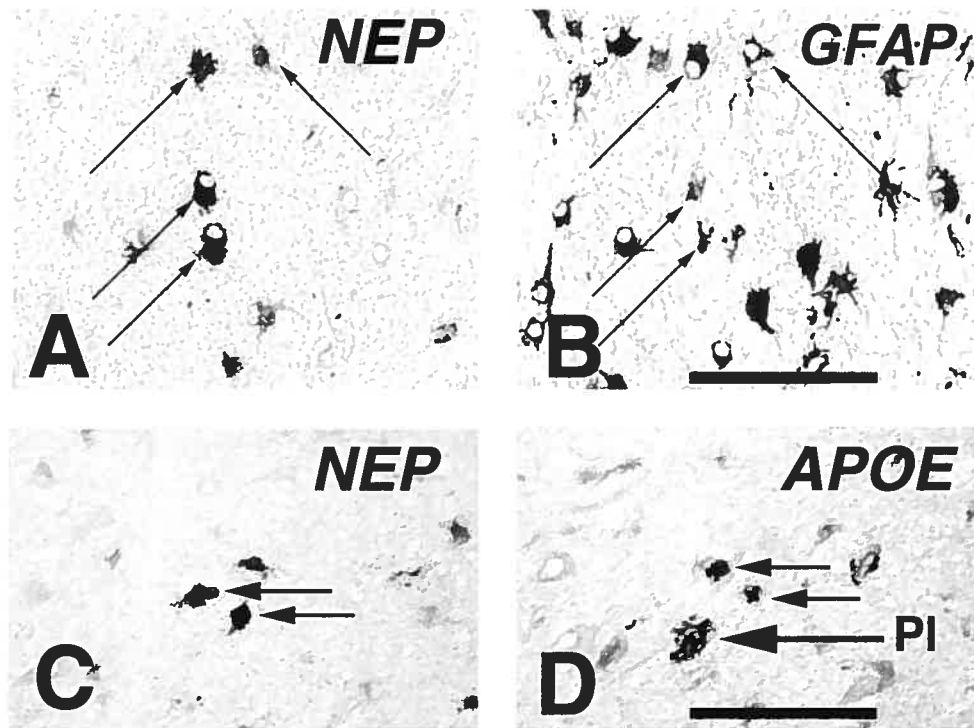


Figure 2.4: **Presence of Neprilysin in reactive astrocytes in AD.** Co-localization (thin arrows) of Neprilysin (A) and GFAP (B) on adjacent sections from a hippocampal region with senile plaques. Reactive astrocytes immunostained with Neprilysin and APOE antibodies are evident in molecular region of the hippocampus (thin arrows in C and D). Note the presence of APOE in senile plaque (large arrow, PI). Scale bar = 20  $\mu$ m.

control subjects. Intense Neprilysin immunostaining was concentrated within the tunica media whose nature was confirmed by ICC on adjacent sections using anti- $\alpha$ -SMA antibodies (Figure 2.5A and B). Intense vascular staining was evident in most of control cases with no A $\beta$  positive deposit (Figure 2.5C). Sporadic A $\beta$  staining could be observed in the leptomeninges of 1 of 6 control cases studied and in parenchyma of 2 of 12 control cases. In contrast, in diseased vessels A $\beta$  deposition was evident in most blood vessels in leptomeninges (5/7 cases) and parenchyma (7/12 cases). ICC on AD cases provided evidence for a significant decrease of Neprilysin immunoreaction. The data has been confirmed using two different monoclonal antibodies: a 18B5 antibody recognizing Neprilysin on paraffin sections (Figure 2.5) and CALLA antibody working on cryostat sections (Figure 2.6). The last one confirmed a presence of negatively- and positively-stained blood vessels in AD cases. In the vasculature, local perturbation of Neprilysin expression was evident even in what appears to represent initial stages of plaque formation (Figure 2.5D to I). In diseased vessels where A $\beta$  deposition was evident but where the tunica media is not yet destroyed and stained normally for  $\alpha$ -SMA, Neprilysin expression was already dramatically decreased (Figure 2.5D to F). These results demonstrate that the down-regulation of Neprilysin in SMCs is not due to the destruction of the tunica media and that it is probably physiologically relevant. Later, when sclerotic vessels had formed and the tunica media had collapsed due to high A $\beta$  deposit, Neprilysin immunoreaction was absent (Figure 2.5G to I). Similar staining in the vasculature, although less intense, was also observed using the commercially available anti-CD10 antibody (Figure 2.6), confirming again specificity of the immunostaining. Altogether, our results demonstrate that despite only an apparent slight decrease in Neprilysin expression in whole brain regions, there are profound changes in Neprilysin protein distribution at the cellular level that correlates with the apparition of A $\beta$  deposit. Our results also suggest that Neprilysin is an active player in the control of A $\beta$  accumulation in the vasculature and in the development of CAA.

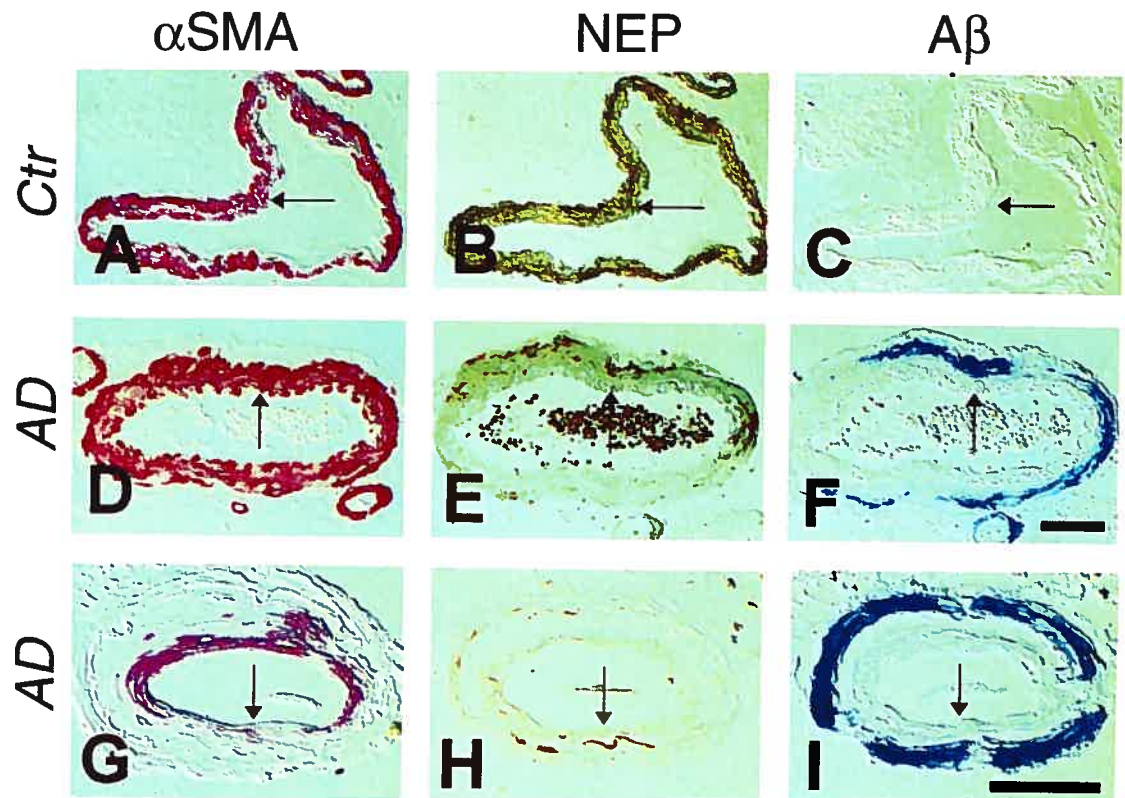


Figure 2.5: **Decreased Neprilysin immunostaining in smooth muscle cells of blood vessels.** Neprilysin immunostaining (NEP) (B,E,H) in blood vessels is shown in comparison to that of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)(A,D,G) and of  $A\beta$  (C,F,I) in healthy (A-C) and disease condition (D-I). Scale bar = 50  $\mu$ m.

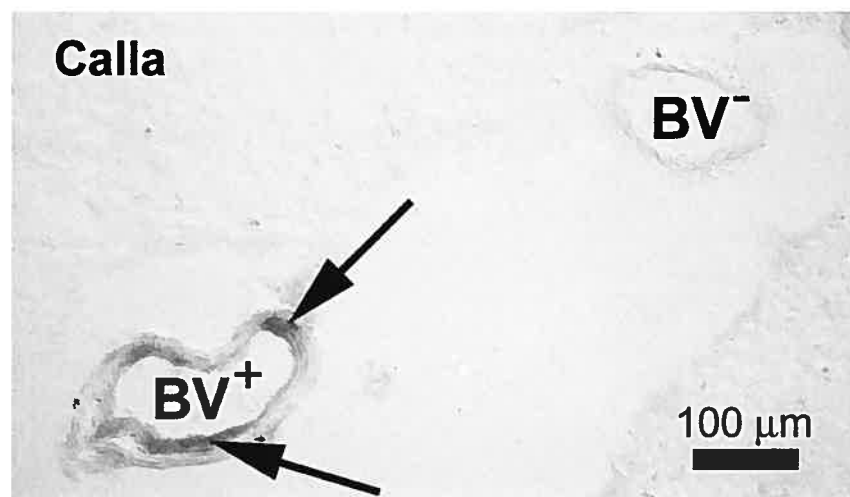


Figure 2.6: Neprilysin immunostaining on cryostat sections in cerebral vasculature (arrows) using commercially available antibody CALLA (anti-CD10). Stained (BV+) and unstained (BV-) blood vessels could be seen in AD brain. Scale bar=100  $\mu$ m.

## 2.5 Discussion

One of the unresolved issues in Alzheimer's disease studies involves the mechanism of A $\beta$  deposition. Two opposing but complementary mechanisms have been documented, i.e. increase of A $\beta$  synthesis and decrease of its clearance. It is thought that an imbalance between these two mechanisms may be the cause of A $\beta$  deposit. On one hand, it was demonstrated that overexpression of  $\beta$ APP gene and/or increase of its processing to form A $\beta$  contribute to AD. Indeed, some of the mutations that segregate with disease phenotypes in autosomal dominant forms of familial AD were found in the  $\beta$ APP gene and shown to enhance production or aggregability of A $\beta$ . Other mutations in the *presenilin* gene, a protein implicated in the cleavage of  $\beta$ APP at the gamma cut site, are consistent with this mechanism (see for review Annaert & Strooper (1999)). On the other hand, at least two lines of evidence suggest that defect in the clearance of A $\beta$  is related to AD and/or CAA. First, it was established that a risk factor for AD and CAA is the E4 genotype of apolipoprotein E (ApoE4) (Nicoll et al. 1997, Mazur-Kolecka et al. 1999, Poirier 2000). ApoE is part of a lipoprotein pathway involved in the internalization of A $\beta$  and its degradation by lysosomes. ApoE4 was reported to be less efficient in this pathway than other alleles. Second, it is documented that an A $\beta$  degrading enzyme that presents the characteristics attributable to Neprilysin plays role(s) in the control of A $\beta$  levels in brain.

Studies demonstrated that Neprilysin is able to catabolize A $\beta$ 1-40 *in vitro* (Howell et al. 1995) and A $\beta$ 1-42 *in vivo* (Iwata et al. 2000). Neprilysin-specific inhibitors and *Neprilysin* gene-disruption in mice abolished this function. In *Neprilysin* gene-disrupted mice, endogenous A $\beta$ 1-40 and A $\beta$ 1-42 levels increased in a dose-dependant manner as compared to normal and heterozygous mice (Iwata et al. 2001). This paper presents a first attempt to understand the relevance of Neprilysin to AD and its interrelationships with A $\beta$  in human brain at cellular level.

Our RT-PCR results demonstrated that Neprilysin is expressed within all studied cerebral regions including hippocampus, cortex and meninges in both control and AD cases. Although obtained from a limited collection of frozen tissues, they contributed to confirm and extend previously reported data that were also obtained from a low sample number (Yasojima et al. 2001). RT-PCR results suggested that the overall Neprilysin expression slightly decreases in AD brains but the levels of down-regulation are rather weak and vary

according to the brain regions. However, the ICC analysis revealed specific differences in Neprilysin expression that were not possible to detect by RT-PCR. Phenotypical changes in Neprilysin expression were detected in pyramidal hippocampal neurons, consistent with the high susceptibility of this region to A $\beta$  deposition. Its down-regulation in AD patients may lead to A $\beta$  accumulation and neuronal cell death. Interestingly, Neprilysin expression was up-regulated in a subpopulation of reactive astrocytes in AD brains, emphasizing on the necessity to analyze defects at the cellular level. In this tissue no difference was observed by RT-PCR at organ level probably due to the inverse regulation of Neprilysin expression in the two cell types. The significance of Neprilysin expression in reactive astrocytes remains unknown. Nevertheless, this compensatory expression of Neprilysin in astrocytes does not seem to be sufficient to counteract the decrease of Neprilysin expression in pyramidal neurons and maintain efficient degradation of A $\beta$ . This may be due to an overall decrease of Neprilysin level in this region or to an inappropriate relocalization of Neprilysin in these two different cell types. Altogether, our results demonstrated important modification in Neprilysin expression in hippocampus with decrease in pyramidal neurons and increase in reactive astrocytes, suggesting an inverse response of the *Neprilysin* gene to A $\beta$  deposition and/or AD progression.

A similar discrepancy between the results of RT-PCR and ICC was observed in leptomeninges. The putative absence of down-regulation of Neprilysin expression at the mRNA level in leptomeninges is probably due to the relatively small proportion of vessels showing mature A $\beta$  plaques as compared to healthy vessels. However, these diseased vessels are easily analyzed by ICC. For the first time, we clearly demonstrated that Neprilysin and A $\beta$  peptide display overlapping distribution patterns and opposite expression levels. As Neprilysin expression decreased, more A $\beta$  deposition was visible even in sections where the tunica media is not yet destroyed, demonstrating that down-regulation of Neprilysin expression in this tissue occurs early in the development of amyloid deposition and is not a consequence of cell death. These results suggested that Neprilysin is involved in the regulation of A $\beta$  deposition around blood vessels and, therefore, that defects in Neprilysin expression may contribute to the onset of CAA. Finally, our results established that, in contrast to results obtained in neuronal cells in rodents (Gaudoux et al. 1993), vascular smooth muscle cells are the main cell type expressing Neprilysin in human brain. Neprilysin expression was not detectable at the protein level in neurons or glial cells of normal



or AD brains, as observed before (Akiyama et al. 2001).

Altogether, our results demonstrate an inverse relationship between Neprilysin and A $\beta$  deposit and suggest that maintained expression of Neprilysin in human brain has an anti-amyloidogenic effect and protects against AD and other pathogenesis such as cerebral amyloid angiopathy. It will be important to determine whether modulation of Neprilysin expression and/or of its enzymatic activity may regulate A $\beta$  deposition in vivo. New therapeutic approaches targeted toward Neprilysin activity may prove useful to halt the progression of plaque formation in AD and CAA patients.

## 2.6 **Aknowlegments**

We wish to thank Mrs J. Marcinkiewicz for immunocytochemistry and Mrs D. Cécylre from the Brain Bank, Douglas Hospital, Verdun, Quebec, for providing brain tissue. We also thank Dr Y. Marcel from the university of Ottawa Heart institute for providing monoclonal antibodies to ApoE.

# 3

---

## Préambule

L'EPN est maintenant le prototype d'une famille grandissante d'enzymes incluant les enzymes de conversions de l'endothéline (ECE-1 et ECE-2), KELL, PHEX et XCE/ECEL1. Bien que ces protéines soient moins bien caractérisées que l'EPN, elles ont déjà été impliquées dans une variété de phénomènes physiologiques incluant la régulation de la pression artérielle et du tonus vasculaire (ECE) ainsi que le métabolisme du phosphate (PHEX). L'identification relativement récente et successives de KELL, ECE-1, PHEX, ECE-2 et XCE/ECEL1 nous a poussé à croire en l'existence potentielle de nouveaux membres dont les fonctions biologiques seraient tout aussi importantes. L'identification de tous les membres de la famille de l'EPN est d'autant plus nécessaire que ces enzymes constituent des cibles thérapeutiques de choix. Il est donc essentiel de tenter d'identifier et de caractériser tous les constituants de cette famille afin de faciliter la conception d'inhibiteurs ou d'agents pharmacologiques spécifiques.

Le prochain chapitre, présenté sous forme d'article, rapportent l'identification et la caractérisation primaire de NL1, un nouveau membre de la famille de l'EPN. Les résultats présentés dans ce chapitre ont été publiés en 2000 dans la revue *Biochemical Journal* (Ghaddar et al. 2000).

# 3

---

## Molecular cloning and biochemical characterization of a new mouse testis soluble-zinc-metallopeptidase of the neprilysin family

Galia Ghaddar<sup>a</sup>, Andréa Frota Ruchon<sup>b,1</sup>, Mélanie Carpentier<sup>a,1</sup>, Mieczyslaw Marcinkiewicz<sup>c</sup>, Nabil G. Seidah<sup>d</sup>, Philippe Crine<sup>a</sup>, Luc DesGroseillers<sup>a</sup> and Guy Boileau<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Département de biochimie, Faculté de médecine, Université de Montréal

<sup>b</sup> Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Ceara, Fortaleza, Brasil

<sup>c</sup> Laboratoire de Neuroendocrinologie, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Département de médecine, Université de Montréal

<sup>d</sup> Laboratoire de Biochimie Neuroendocrinologique, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Département de médecine, Université de Montréal

\*Corresponding author: Tel: 514-343-6328; fax: 514-343-2210; *E-mail address*: guy.boileau@umontreal.ca

<sup>1</sup>These two authors have contributed equally to the work

**Key Words:** metallopeptidases, Neprilysin, NL1, testis, germ cells.

**Abbreviations used:** NEP, Neprilysin; ECE, endothelin converting enzyme; PHEX, Phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome; XCE, X-converting enzyme; RT-PCR, reverse transcription/polymerase chain reaction; NL, NEP-like; endoH, endoglycosidase H; PNGaseF, Peptide: N-glycosidase F; ISH, in situ hybridization; RER, rough endoplasmic reticulum.

Published in the *Biochemical Journal*, vol. 347, 2000, pp. 419-429

### 3.1 Abstract

Because of their roles in controlling the activity of several bio-active peptides, members of the Neprilysin (NEP) family of zinc metallopeptidases have been identified as putative targets for the design of therapeutic agents. Presently, six members have been reported, these are: Neprilysin, Endothelin-converting enzymes ECE-1 and ECE-2, the KELL blood group protein, PHEX (phosphate regulating gene with homologies to endopeptidase on

the X chromosome) and X-converting enzyme (XCE). In order to identify new members of this important family of peptidases, we designed a reverse transcriptase-PCR strategy based on conserved amino acid sequences of Neprilysin, ECE-1 and PHEX. We now report the cloning from mouse testis of a novel Neprilysin-like peptidase that we called NL1. NL1 is a glycoprotein that, among the members of the family, shows the strongest sequence identity with Neprilysin. However, in contrast to Neprilysin and other members of the family which are type II integral membrane proteins, NL1 was secreted when expressed in cultured mammalian cells, likely due to cleavage by a subtilisin-like convertase at a furin-like site located 22 amino acid residues in carboxy-terminus of the transmembrane domain. The recombinant enzyme exhibited Neprilysin-like peptidase activity and was efficiently inhibited by phosphoramidon and thiorphan, two inhibitors of Neprilysin. Northern blot analysis and in situ hybridization showed that NL1 mRNA was found predominantly in testis, specifically in round and elongated spermatids. This distribution of NL1 mRNA suggests that it could be involved in sperm formation or other processes related to fertility.

### 3.2 Introduction

Peptides are used by cells from yeast to mammals to elicit physiological responses. The use of peptides as messengers usually involves the following steps: 1) production and release of the peptide by a specific cell, 2) interaction of the peptide with a receptor on the surface of the target cell, and 3) degradation of the peptide to terminate its action. The first and last steps of this scheme require the participation of proteases/peptidases. There is increasing evidence that membrane-associated zinc-metallopeptidases play important roles in both of these steps. Although activation of inactive prohormone precursors into bioactive peptides is generally performed by proteases of the subtilisin family located either in the Trans Golgi Network or in secretory granules of the cell (for a review see Seidah & Chretien (1994)), a few peptides require a final processing step after secretion. This step involves the action of membrane-associated zinc metallopeptidases. Two enzymes are particularly well characterized: Angiotensin Converting Enzyme (ACE) which cleaves inactive angiotensin I into angiotensin II (for a review see: Corvol & Williams (1997)) and Endothelin Converting Enzyme (ECE) which cleaves isoforms of big endothelin into endothelins (for a review see: Turner (1997)). In addition to their role in peptide activation, cell surface zinc-

metallopeptidases have also been implicated in the termination of the peptidergic signal by degrading the active peptides into inactive fragments. One of the best known of these peptidases is probably Neprilysin (Neutral endopeptidase-24.11, NEP) which has been implicated in the physiological degradation of several bioactive peptides (for reviews see: Kenny (1993) and Koehne et al. (1998)). In the brain, Neprilysin controls the half-life of the enkephalins and substance P, two neuropeptides involved in pain control (reviewed in: Roques et al. (1993), Roques et al. (1980)). In the kidney, the enzyme is believed to participate in the regulation of blood pressure by locally controlling the activity of the atrial natriuretic peptide (ANP), bradykinin and endothelin-1 (ET-1) (Ura et al. 1987, Pham et al. 1992, Yamaguchi et al. 1992, Roques et al. 1993). Neprilysin has been shown to be present in many other tissues although its role is not always well understood.

Interestingly, Neprilysin and the ECEs show significant structural similarities and appear to belong to a family of peptidases that includes PHEX (formerly PEX), a peptidase involved in the regulation of phosphate homeostasis (reviewed in: Tenenhouse (1999)), the KELL blood group protein (Marsh 1992) and XCE, a newly discovered enzyme present in the nervous system (Valdenaire et al. 1999). ACE, despite being a cell-surface Zn-metallopeptidase with some similarities to Neprilysin, is not strictly speaking a member of the same family (Hooper 1994). Because of their important role as regulators of bioactive peptide activity, these enzymes (more specifically Neprilysin and the ECEs) have been identified as putative targets for therapeutic intervention, similar to the way inhibition of ACE is used to control blood pressure. However, the recent discovery of PHEX and XCE, and the possibility that yet other unknown members still exist, raise the problem of the specificity of the therapeutic agents to be developed.

To search for other members of the Neprilysin family, we designed an reverse transcriptase (RT)-PCR strategy based on conserved regions of Neprilysin, ECE-1 and PHEX. In the present paper, we report the molecular cloning, tissue distribution, expression and partial biochemical characterization of a new NEP-like peptidase that we called NL1.

## 3.3 Materials and Methods

### DNA manipulations

All DNA manipulations, phage library screening, and plasmid preparations were performed according to standard protocols (Ausubel et al. 1988, Sambrook et al. 1989). Site-directed mutagenesis was performed using a PCR-based strategy as described previously (LeMoual et al. 1994).

### mRNA purification and RT-PCR protocol for identification of new members of the Neprilysin family

mRNAs were prepared from mouse testis using Quick Prep Micro mRNA purification kit (Pharmacia Biotech). First strand cDNA was synthesized from 1 µg of mRNA using the First-Strand cDNA synthesis kit (Pharmacia Biotech).

Two degenerate sense primers, oligonucleotide 3817 (5'-TGGATGG-AT/CGA/CIGG/AIACIA/CA-3') and oligonucleotide 3719 (5'-A/GTIGTITTT/C-CCIGCIGGIA/GT/AIC/TTG/CCA-3') corresponding to amino acid residues 459-465 and 552-560 of Neprilysin sequence respectively, and one antisense primer, oligonucleotide 3720 (5'-AIICCICCIA/TC/TA/GTCIGCIG/AC/TA/GTTT/CTC-3') corresponding to amino acid residues 646-654 (see Figure 1), were synthesized. PCR was performed with 5 µl of cDNA template and 1 µl of Taq DNA polymerase in a final volume of 100 µl, containing 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µM of each oligonucleotide 3817 and 3720, 200 µM of each dNTP and 5% v/v DMSO. Cycling profiles included an initial denaturation step of 5 min at 94°C, 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 40°C and 1.5 min at 72°C, and a final extension step at 72°C for 10 min. One half of the amplified DNA was separated on a 2% (w/v) agarose gel and fragments ranging in size between 500-700 bp were purified and resuspended in a final volume of 50 µl. A second round of PCR was done with primers 3719 and 3720, using as template either 10 µl of the first PCR reaction or 5 µl of the purified fragments, and the new PCR products were ligated in pCR2.1 vector (Invitrogen). Several identical clones corresponded to a potential new member of the Neprilysin family. We called this member NL1 for NEP-like 1.

## Cloning of full-length NL1 cDNA

The cloned NL1 PCR fragment was used as probe to screen a mouse testis  $\lambda$  Uni-ZAP<sup>TM</sup>XR cDNA library (Stratagene). Twelve out of a hundred positive phages were plaque purified and subcloned into pBS SK vector (Stratagene). As the longest clone analyzed presented an incomplete ORF (pBS-NL1A), 5'RACE with primers located in vector (5'-TAGTGGATCCCCCGGGCTGCAG-3', sense primer) and NL1 (5'-ACCAA-ACCTTTCCTGTAGCTCC-3', antisense primer, nt 1303 to 1324 of NL1; Figure 2) was subsequently performed on the DNA of the remaining semi-purified positive clones. Amplification was performed with 1  $\mu$ l of Vent polymerase in a final volume of 100  $\mu$ l containing 50 ng of DNA, 4 mM of MgSO<sub>4</sub>, 1  $\mu$ M of each oligonucleotide, 200  $\mu$ M of each dNTP and 10% DMSO. Cycling parameters included an initial denaturation step of 1 min at 94°C, 25 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 60°C and 1 min at 72°C, and an incubation of 10 min at 72°C. A PCR fragment of the expected length was subcloned into pCR2.1 vector (clone pCR-NL1A), but sequencing revealed no initiator ATG codon. A nested 5'RACE was then performed on mouse testis cDNA using the Marathon Ready cDNA kit (Clontech) with sense oligonucleotides AP1 and AP2 (from the kit) and NL1 antisense oligonucleotides 5'-CC-TGAGGGCTCGTTTTACAACCGTCCT-3' (nt 503-529 of NL1; see Figure 2) and 5'-CTCATCCCAGGAGAAGTGTAGCAGGCT-3' (nt 475-502 of NL1; see Figure 2) as recommended by the supplier. The resulting fragment was cloned into pCR2.1 vector (pCR-NL1B). Since only ten bp were missing for the initiator ATG codon, we reconstructed the 5' end of the cDNA by PCR-amplifying clone pCR-NL1A with sense primer 5'-CCACCATGGTGGAGAGAGCAGGCTGGTGTGCGGAAGAAG-3' (nt 332-364 of NL1; see Figure 2; the 10 missing nucleotides are underlined) and antisense primer 5'-ACCAAACCTTTCCTGTAGCTCC-3' (nt 1303-1324 of NL1; Figure 2) using Vent polymerase as described above. The DNA fragment was then inserted into pCR2.1 (clone pCR-NL1C). The entire open reading frame was reconstituted following digestion of pBS-NL1A and pCR-NL1C with *Eco*RI and *Pfl*MI. The 5' end of NL1 cDNA was excised from pCR-NL1C and ligated into pBS-NL1A at the corresponding sites, resulting in plasmid pBS-NL1B.

For expression studies, a *Bam*HI/*Apa*I fragment generated out of pBS-NL1B, corresponding to the full length cDNA of NL1, was inserted into pCDNA3/RSV (Jockers

et al. 1996) vector.

## Production of polyclonal antibodies

A plasmid for the production in *Escherichia coli* of a glutathione S-transferase (GST)-fusion protein with NL1 was constructed using pGEX-4T-3 expression vector (Pharmacia Biotechnologies). A 255 bp fragment from NL1 was amplified by PCR with Vent polymerase using sense primer 5'-GCTACGGGATCCGTGGCCACTATGCTTAGGAA-3' (nt 1139-1158; see Figure 2) and antisense primer 5'-CGATTGCTCGAGTGGGAACAGC-TCGACTTCCA-3' (nt 1377-1396; see Figure 2). Both pGEX-4T-3 and the PCR product were digested with *Bam*HI and *Xho*I and ligated. The recombinant protein was produced and purified according to the supplier's instructions. Five weeks old female balb/c mice were immunized at monthly intervals for 3 months with 20 µg of the recombinant NL1 fragment in Freund's adjuvant and antisera were subsequently collected.

## Cell culture and transfection

Human Embryonic Kidney (HEK 293) cells were maintained in Dubelco's Modified Eagle's medium containing 10% (v/v) fetal bovine serum, and supplemented with 60 µg/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.25 µg/ml fungizone. Transfections of cells with appropriate plasmids were performed by the calcium/phosphate-DNA co-precipitation method (Chen & Okayama 1987). To establish permanent cell lines, G418 (geneticin) selection was initiated 48 h after the transfections at 400 µg/ml for 12 days and gradually decreased at 100 µg/ml.

LLC-PK1 cells transfected with pRcCMV-sNEP (where snep stands for soluble Nepri-lysin) were maintained as described previously (Lanctot et al. 1995).

## Immunoblot analysis

For immunoblot analysis, cells were incubated for 16 h in synthetic Dubelco's modified Eagle's medium containing 2mM sodium butyrate. Cellular proteins were solubilized as described previously (Dion et al. 1995). Secreted proteins recovered in culture media were concentrated approx. 10 fold by ultrafiltration. Immunoblot analysis were performed



using the NEN Renaissance kit with the polyclonal antibody specific to NL1 or the  $\alpha$ -antitrypsin inhibitor antibody (Calbiochem; LaJolla, CA) followed by the appropriate horseradish peroxidase-conjugated IgG (Vector Laboratories).

For the glycosylation studies, proteins were incubated with endoglycosidase H (endoH) or peptide:N-glycosidase F (PNGaseF) as suggested by the distributor (New England Biolab).

### **Enzymatic activity assays**

NL1 activity was monitored and compared with soluble Neprilysin activity using (Tyrosyl-[3,5- $^3$ H])(D-Ala<sup>2</sup>)-Leu<sup>5</sup>-enkephalin (50 Ci/mmol) (Research Products International Inc.), as already described (Dion et al. 1995, Devault et al. 1988).  $K_m$  values were determined by the isotope-dilution method. The inhibitory effects of phosphoramidon and thiorphan were also assessed as described previously (Dion et al. 1995).

### **HPLC analysis of the hydrolysis of Leu-enkephalin**

Leu<sup>5</sup>-enkephalin (5  $\mu$ g) was incubated at 37°C for 1 hour in 50mM MES, pH 6.5, with concentrated culture medium of HEK 293 cells expressing NL1 (approx. 300  $\mu$ g of total proteins) or LLC-PK1 cells expressing soluble Neprilysin (approx. 30  $\mu$ g of total proteins), in the absence or presence of 0.1 mM phosphoramidon. Hydrolysis products were separated by reversed-phase HPLC as described previously (Bawab et al. 1993). Tyr-Gly-Gly and Phe-Leu were both identified by elution profiles of synthetic marker peptides.

### **Northern blot analysis**

A mouse multiple tissue poly(A)<sup>+</sup> mRNA blot (Clontech) was hybridized with a [ $^{32}$ P] dCTP random primer labelled probe in ExpressHyb solution (Clontech). The blot was washed according to the manufacturer's recommendations and exposed to Fuji RX film for 7 days at -80°C with intensifying screens.

### RT-PCR screening of mouse tissues

First strand cDNA synthesis was performed with 1 µg of total RNA from mouse tissues and oligo(dT) as primer, using Gene Amp RNA PCR Core Kit (Perkin Elmer). For the PCR reactions, primers 5'-TGGCGAGAGTGTGTCAGCTATGTC-3' and 5'-CTTCCA-AAATGTAGTCAGGGTAGCCAATC-3' were used with Taq polymerase. One tenth of the PCR products were visualized on a 4% agarose gel.

### *In situ* hybridization

To construct a plasmid for the synthesis of cRNA probes for ISH, pCR-NL1A was used as template to amplify a 452 bp fragment by PCR with sense primer 5'-GGAGCCATAG-TGACTCTGGGTGTC-3' (nt 416-439; see Figure 2) and antisense primer 5'-GACGCT-CAGCAGGGGCTCAGAGTC-3' (nt 842-865; see Figure 2). The amplification product was inserted into pCRII vector (Invitrogen). Synthesis of riboprobes and protocols for ISH were as described previously (Ruchon et al. 1998).

## 3.4 Results

### Cloning and sequence analysis of mouse NL1 cDNA

In order to isolate cDNAs for new members of the Neprilysin family, we developed an RT-PCR strategy based on fact that Neprilysin, ECE-1 and PHEX share regions of significant sequence identity (Figure 3.1).

```

          450                                542
hNEP      ...FIQTLD.DLTWMDAETKKRAEEKALAI.....NAFYSSGRNQ
hECE-1    ...FEESLS.TLKWMDEETRKSAKEKADAI.....NAYYSPTKNE
hPHEX     ...FIDMLEKENEWMDAGTKRKAKEKARAV.....NAFYASTNQ
consensus  F   L       WMD T   A EKA A           NA YS   N
                    ───────────────────────────▶
                    3817

          636
hNEP      IVFPAGILQPPFFSAQQ.S.....QHLNGINTLGENIADNGGLGQAY...
hECE-1    IVFPAGILQAPFYTRSS.P.....EPVNGRHTLGENIADNGGLKAAY...
hPHEX     IRFPAGELQKPPFFWGTEYP.....LNVKGKRTLGENIADNGGLREAF...
cons.     I FPAG LQ PF                               G TLGENIADNGGL A
          ───────────────────────────▶                ◀──────────────────────────
          3719                                         3720

```

Figure 3.1: **Partial amino acid sequence alignment of human Neprilysin, ECE-1 and PHEX.** Numbers above the sequences identify residues in Neprilysin sequence. Regions corresponding to degenerate oligonucleotides used for the nested PCR are underlined. Arrows below the sequences represent the degenerate oligonucleotides and the numbers correspond to the nomenclature used in the text.

Following RT-PCR on testis mRNAs with nested primers, a DNA fragment of approx. 300 bp was amplified. This DNA fragment was cloned and the plasmids from 24 independent colonies were sequenced: 3 clones had no insert, 4 clones had DNA fragments not related to the Neprilysin family, 7 clones had sequences corresponding to mouse Neprilysin and 3 clones had sequences corresponding to mouse PHEX, showing that our approach efficiently allowed the identification of members of the family. Moreover, 7 identical clones had a new cDNA presenting sequence similarities to members of the Neprilysin family. The full-length cDNA was subsequently obtained by screening a mouse testis  $\lambda$  cDNA library followed by 5'RACE, as described in the *Materials and Methods* section. The nucleotide and deduced amino acid sequences shown in Figure 3.2 confirm that we cloned a novel NEP-like protein, referred to thereafter as NL1. NL1 cDNA spans 2925 nt, including a 5'-untranslated region of 331 nt, an open reading frame of 2295 nt from nt 332-2626, and a 3'-untranslated region of 299 nt. The sequence surrounding the proposed initiator ATG conforms to the Kozak consensus (Kozak 1986). The deduced amino acid sequence of NL1 reveals a putative type II transmembrane protein of 765 amino acid residues encompassing a short N-terminal cytoplasmic tail, a unique putative transmembrane domain, and a large C-terminal extracellular domain. The ectodomain contains nine potential N-glycosylation sites (Asn-X-Ser/Thr) and ten cysteine residues corresponding to those conserved among all the members of the family, which are presumably involved in proper folding and in maintenance of the protein in an active conformation. All amino acid residues known to be part of the active site of Neprilysin are present in NL1 (see Figure 3.3). The predicted protein sequence presents greater similarities to Neprilysin than to any other member of the family (Table 3.1).

Although NL1 shares numerous features with proteins of the Neprilysin family, a notable aspect distinguishes it from the others : the first conserved cysteine residue of the ectodomain is more distant (34 amino acid residues) from the predicted transmembrane domain in NL1 than it is in Neprilysin (9 residues) or any other members of the family. Moreover, we noticed a putative furin cleavage site (-Arg<sup>58</sup>-Thr-Val-Val-Lys-Arg<sup>63</sup>-) between the end of the transmembrane domain and the first cysteine (Figure 3.3). This observation suggests that NL1 could exist as a secreted rather than a membrane-bound protein.



```

1
NL1  MVERAGWCRKKS PGFVEYGLMVL LLLLLLGAIVTLGVFY SIGQLPLLTSL LHFSWDERTVVKRALRDS SLKSDI
NEP  MGRSESQMDITDINAPKPKKKQRWTPLEISLSVLVLLXTIIAVTMIALYATYDDGI

75
NL1  CTTSPCVIAAARIENMDQSRNPCENFYQYACGGWLRHHV I PETNSRYSVFDILRDELEVILKGVLEDSTSQHR
NEP  CKSSDCIKSAARLIQNMDASVEPCTDFFKYACGGWLRNVI PETSSRYSNFDILRDELEVILKDVLPQPKTEDI

149
NL1  PAVEKAKTLYRSCMNQSVIEKRDSEPLLSVLKMGVGPVAMDKNWNETMGLKWELERQLAVLNSQFNRRVLIDLF
NEP  VAVQKAKTLYRSCINESAIDSRGGQPL LKLLPDIYGWPVASDNWDQTYGTSWTAEKSI AQLNSKYGKVKLINFF

223
NL1  IWDDQNSSRHVIYIDQPTLGMPSREYFQEDNNHKVRKAYLEFMTSVATMLRKDQNL SKESAMVREEMA EVLE
NEP  VGTDDKNSTQHI IHFDQPRGLPSRGYECTGIYKEACTAYVDFMISVARLIRQE QSLPIDENQLSLEMNKVME

297
NL1  LETHLANATVPQEK RHDVTALYHRMDLMELQERFGL ---KGFNWTLFIQNLSSVEVELFPDEEVVYGI PYL
NEP  LEKEIANATTKPEDRNDPMLLYNKMTLAKLQNNFSLEVNKGSF SWSNFTNEIMSTVNINI QNEEEVVVYAPEYL

367
NL1  ENLEDIIDSYSARTMQNYLVWRLVLDRI GSLSRFKEARVDYRKALYGT TVEEVWRREC SVYVNSNMESAVGSL
NEP  TKLKPILTKYSPRDLQNLMSWRFIMDLVSSLSRNYKESRN AFRKALYGT TSETATWRRCANYVNGNMENAVGRL

441
NL1  YIKRAFSKDSKSTVRELIEKIRSVFVDNLDELNWMDEESK KKAQEKAMNIREQIGYPDYILEDNNKHLDEEYSS
NEP  YVEAAFAGESKHVVEDLIAQIREVFIQTLDDL TWMDAETKKKAEKALAIKERIGYPDDIISNENK-LNNEYLE

515
NL1  LTFYEDLYFENGLQNLKNN AQRSLKKLREKVDQNLWIIGA AVVNAFYSPNRNQIVFPAGILQPPFFSKDQPQSL
NEP  LNYREDEYFENIQNLKFSQSKQLKKLREKVDKDEWISGA AVVNAFYSSGRNQIVFPAGILQPPFFSAQQSNSL

589
NL1  NFGGIGMVGHEITHGFDDNGRNF DKNGNMLDWSNFSARHFQQQSQCMIYQYGNFSWELADNQN VNGFSTLGE
NEP  NYGGIGMVGHEITHGFDDNGRNF NKGDLVDWWTQQSANNFKDQSQCMVYQYGNFSWDLAGGQHLNGINTLGE

663
NL1  NIADNGGVRQAYKAYLRWLADGGKDQRLPGLNLT YAQLFFINYAQVWCGSYRPEFAVQS IKTVDVHSP LKYRVLG
NEP  NIADNGGIGQAYRAYQNYVKNGEEKLLPGLDLN HKQLFFLNFAQVWCGTYRPEYAVNSIKTVDVHSPGNFR IIG

737
NL1  SLQNLPGFSEAFHCPRGSPMHPMKRCRIW
NEP  TLQNSAEFADAFHCRKNSYMNPERKCRVW

765

```

Figure 3.3: Amino acid sequence comparison of NL1 and Neprilysin. Single dots stand for similarity and double dots for identity. Residues known to be important for enzyme activity, including the three zinc ligands (His 583, His 587, and Glu 646 in Neprilysin), the catalytic Glu residue (Glu 584 in Neprilysin), the transition state stabilizing His residue (His 711 in Neprilysin), the residues involved in substrate binding (Arg 102, Arg 717 and Asn 542 in Neprilysin) and the Asp residue implicated in structure maintenance of the active site (Asp 650 in Neprilysin) are indicated with asteriks (\*).

Table 3.1: **Comparison of NL1 with other members of the Neprilysin family.** Region covering amino acids 70 to 765 of NL1 was compared with corresponding sequences of other members of the Neprilysin family.

<b>Protein</b>	<b>Identity (%)</b>	<b>Similarity (%)</b>
Mouse Neprilysin	55	74
Rat Neprilysin	54	73
Human Neprilysin	55	74
Rat ECE-1	39	60
Human ECE-1	39	60
Bovine ECE-2	38	57
Mouse PHEX	39	58
Human PHEX	39	58
Human KELL blood group protein	26	46
Human XCE/ECEL1	36	56

### 3.4.1 NL1 expression in HEK 293 cells

HEK 293 cells were transfected with pCDNA3/RSV expression vector containing NL1 cDNA, and a permanent cell line was established as described under *Materials and Method* section (HEK/NL1 cells). Immunoblotting with a polyclonal antibody showed that after 16h of culture, most NL1 was present in the culture medium with small amounts of the enzyme in the cell extract (Figure 3.4). Secreted and cell-associated NL1 had apparent molecular masses of approx. 125 and 110 kDa, respectively. To characterize the glycosylation state of NL1, we next submitted the recombinant protein to deglycosylation by PNGase F and Endo H). PNGase F removes high mannose as well as most complex N-linked oligosaccharides added in the Golgi complex. In contrast, endo H removes N-linked oligosaccharide side chains of the high mannose type found on proteins in the RER but which have not yet transited through the Golgi complex; thus, resistance to endo H can be used as an indication that the protein has traveled through the Golgi complex. PNGase F treatment showed that the cell-associated and secreted NL1 were N-glycosylated as their electrophoretic mobility increased following digestion (Figure 3.4). However, the se-

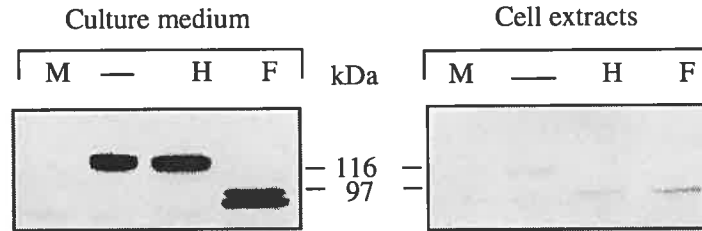


Figure 3.4: **Immunoblot analysis of NL1-transfected HEK 293 cells.** Proteins from culture medium and from cell extracts (corresponding to 1/50 of a 150 mm dish) were separated by SDS-PAGE (8% gels), transferred to nitrocellulose membranes and revealed with a NL1-specific polyclonal antibody. (M): mock-transfected cells; (-): NL1-transfected cells; (H): Endo H-treated NL1-transfected cells; (F): PNGase F-treated NL1-transfected cells. Molecular weight markers positions are shown in the center.

creted NL1 migrated as a doublet after PNGase F treatment, with one band co-migrating with cell-associated form and the second having a slower rate of migration. Since untreated and endo H-digested secreted NL1 are seen as single bands by SDS-PAGE, our observation suggests that a proportion of secreted NL1 undergoes further post-RER postranslational modification that renders some of the N-linked oligosaccharides resistant to PNGase F digestion.

In contrast with secreted NL1, NL1 from cell extract was sensitive to endo H treatment. This result shows differences in the glycosylation state of the two species and suggests that the cell-associated form observed in transfected cells is an intracellular species that has not travelled through the Golgi complex.

### 3.4.2 Processing of NL1 by a subtilisin-like convertase

To determine whether a member of the mammalian subtilisine-like convertase family is responsible for NL1 presence in the culture medium of transfected cells, we transiently co-transfected HEK 293 cells with a constant amount of plasmid pCDNA3/RSV/NL1 and increasing amounts of plasmid pCDNA3/CMV/PDX (Benjannet et al. 1997). This latter vector promotes the expression of the  $\alpha$ 1-antitrypsin Portland variant,  $\alpha$ 1-PDX, a known inhibitor of subtilisin-like convertases (Anderson et al. 1993). Immunoblot analysis of the culture media of cells expressing both NL1 and  $\alpha$ 1-PDX indicated that NL1 secretion was strongly inhibited by the presence of  $\alpha$ 1-PDX (Figure 3.5); a relationship was observed between the amount of  $\alpha$ 1-PDX and the level of inhibition of NL1 secretion.



To confirm that proteolysis by the subtilisin-like convertase occurred at the putative furin cleavage site identified in NL1 ectodomain (-Arg<sup>58</sup>-Thr-Val-Val-Lys-Arg<sup>63</sup>-), the amino acid residues Asn<sup>62</sup>-Gly<sup>63</sup> were substituted for Lys<sup>62</sup>-Arg<sup>63</sup> by site-directed mutagenesis in vector pCDNA3/RSV/NL1 and the mutated vector used to establish HEK 293 cells expressing the mutant protein (HEK/NL1mut cells). Immunoblot analysis of the culture media of HEK/NL1mut cells showed that the mutation totally abolished secretion of NL1 (Figure 3.5B). Furthermore, an additional form of NL1 with a molecular mass of 127 kDa was detected in the extract of these cells (Figure 3.5B). This new species was resistant to endo H digestion (Figure 3.5B) and was found associated with membranes when HEK/NL1mut cells were fractionated according to Chidiac et al. (1996) (results not shown).

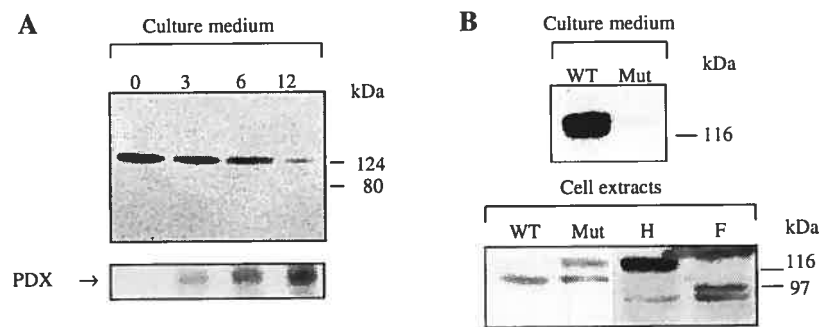


Figure 3.5: **Analysis of NL1 processing in HEK 293 cells.** (A) Proteins from culture medium of HEK 293 cells co-expressing NL1 and  $\alpha$ 1-PDX were separated as in legend to Figure 4 and revealed with either NL1 antibodies (upper panel) or  $\alpha$ 1-antitrypsin inhibitor antibodies (lower panel). The amount in  $\mu$ g of plasmid pCDNA3.1/CMV/PDX used in the transfections is indicated above each lane. (B) Proteins from the culture media or extracts of cells expressing either wild-type NL1 (WT) or NL1 mutated in the furin cleavage site (Mut) (corresponding to 1/20 of a 150 mm dish) were analyzed as in Figure 4. (H): Mut proteins treated with endo H; (F): Mut proteins treated with PNGase F. Lanes H and F were exposed 3 times longer. Molecular weight markers positions are shown on the right (B and C).

Table 3.2: Comparison of NL1 and soluble Neprilysin enzymatic parameters with D-Ala<sup>2</sup>-Leu<sup>5</sup>-enkephalin. Each value is the average of the results of three (\*) or four (◇) independent experiments. See Materials and Methods (section 3.3) for details.

Enzyme	$K_m^*$ ( $\mu$ )	$IC_{50}^\diamond$ Phosphoramidon (nM)	$IC_{50}^*$ Thiorphan (nM)
NL1	$18 \pm 10$	$0.9 \pm 0.3$	$47 \pm 0.12$
sNEP	$73 \pm 18$	$0.5 \pm 0.1$	$8 \pm 2$

### 3.4.3 NL1 enzymatic activity

Culture media from HEK 293 and HEK/NL1 cells were tested for enzymatic activity using Tyrosyl-[3,5-<sup>3</sup>H]-D-Ala<sup>2</sup>-Leu<sup>5</sup>-enkephalin, (a known Neprilysin substrate) as substrate. Activity was detected in the culture medium of HEK/NL1 cells but not in that of HEK 293 cells. The activity increased linearly with the amount of NL1 (Figure 3.6A) and with the incubation period (Figure 3.6B), indicating that degradation of the substrate was due to NL1 enzymatic activity.

We then characterized enzymatic parameters of NL1 using the same substrate and compared them to those of an engineered soluble form of Neprilysin (Lemay et al. 1989). NL1 affinity for D-Ala<sup>2</sup>-Leu<sup>5</sup>-enkephalin was slightly higher than that of soluble Neprilysin as shown by their  $K_m$  values of 18  $\mu$ M and 73  $\mu$ M, respectively (Table 3.2). Inhibition assays showed that phosphoramidon had similar effects on NL1 and soluble-Neprilysin activity, with  $IC_{50}$  values of 0.9 nM and 0.5 nM respectively, and that thiorphan, a specific inhibitor of Neprilysin, inhibited NL1 with an  $IC_{50}$  of 47 nM, as compared with an  $IC_{50}$  of 8 nM for Neprilysin (Table 3.2).

Very low levels of phosphoramidon-sensitive activity was detected in extracts of HEK/NL1 cells (data not shown) consistent with the small amounts of NL1 observed by immunoblotting.

To determine whether NL1 had cleavage-site specificity similar to Neprilysin, we incubated Leu<sup>5</sup>-enkephalin in the presence of NL1 recovered from the medium of HEK/NL1 cells (Figure 3.7B) or in the presence of soluble Neprilysin (Figure 3.7C), and analyzed the degradation products by reverse-phase HPLC. Peaks co-migrating with standard Tyr-Gly-

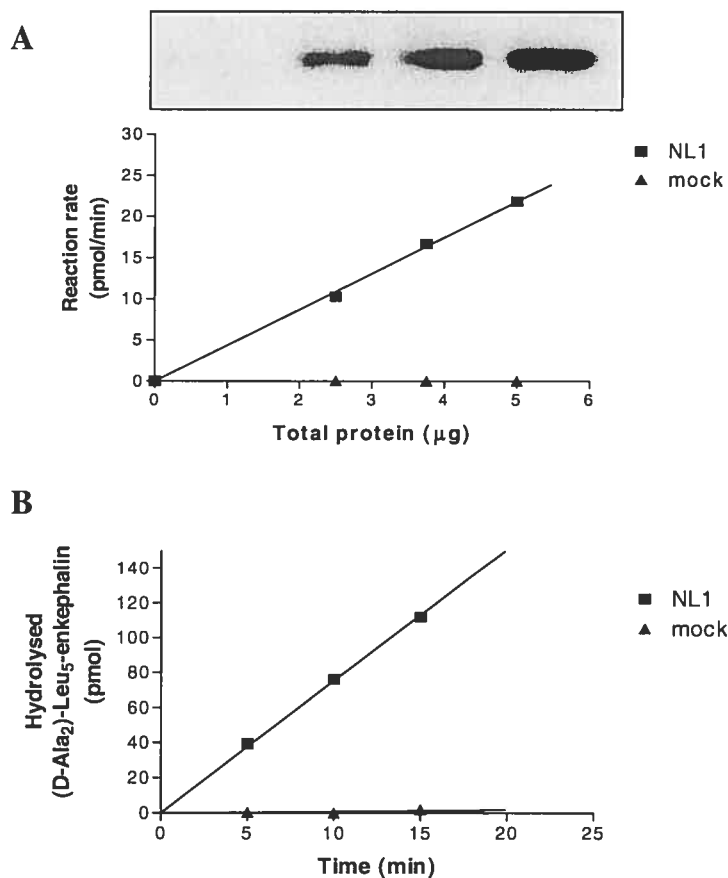


Figure 3.6: NL1 enzymatic activity as a function of (A) the amount of protein and (B) time. (A) Increasing volumes of culture media from HEK 293 or HEK/NL1 cells were tested for peptidase activity using  $[3,5\text{-}^3\text{H}]$ tyrosyl-D-Ala<sup>2</sup>-Leu<sup>5</sup>-enkephalin as substrate. The amounts of NL1 detected by immunoblotting in the aliquots used to measure activity is shown in the panel above the graph. (B) Aliquots of culture media from HEK 293 or HEK/NL1 cells containing 2.5 μg of total protein were incubated for the indicated periods of time with the same substrate as in (A).

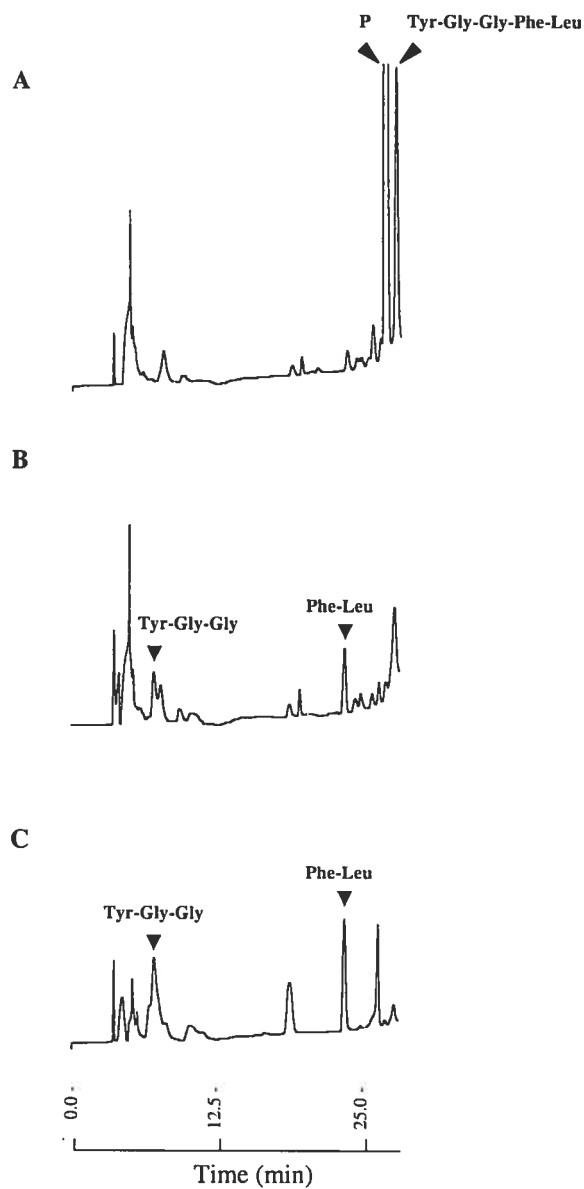


Figure 3.7: **HPLC analysis of degradation products of Leu<sup>5</sup>-enkephalin.** Leu<sup>5</sup>-enkephalin was incubated with concentrated culture media from HEK/NL1 cells in presence (A) or absence (B) of phosphoramidon (P), or with concentrated media from soluble Neprilysin-transfected LLC-PK<sub>1</sub> cells (C) and hydrolysis products were resolved by HPLC. Tyr-Gly-Gly and Phe-Leu were both identified with HPLC profiles of synthetic marker peptides.

Gly-Gly and Phe-Leu peptides were observed in both reverse-phase HPLC profiles, indicating that both enzymes cleaved the substrate at the Gly<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> peptide bond. This enkephalin-degrading activity was completely inhibited by phosphoramidon (1  $\mu$ M, Figure 3.7A).

#### 3.4.4 Tissue and cellular distribution of NL1 mRNA

Tissue distribution of NL1 mRNA was determined by Northern blot analysis with a specific probe corresponding to the 5' end of the coding region of NL1 cDNA. A single transcript of 3.4 kb was detected exclusively in testis among all the mouse tissues tested (Figure 3.8A). Mouse tissues were also screened by RT-PCR. Using this more sensitive technique, expression of NL1 was observed in several other tissues including heart, brain, spleen, lungs and kidney (Figure 3.8B). Consistent with the Northern blot results, RT-PCR analysis, although not strictly quantitative, detected more NL1 mRNA in testis than in other tissues.

To gain more insight into NL1 mRNA distribution, we examined by *in situ* hybridization cryostat sagittal sections from a 4-day newborn mouse, as well as sections from a 16-day old animal (p16) and adult tissues (heart, brain, spleen, lungs, liver, kidney and testis). The presence of NL1 mRNA was detected only in adult testis (Figure 3.9). Only the germinal cells in the luminal face of the seminiferous tubules were labelled (Figure 3.9A and B). These cells were identified as round and elongated spermatids in all spermiogenesis maturational stages (Figure 3.9B1, 3.9B2, 3.9B3 and 3.9B4). Neither spermatozoa (Figure 3.9B and 3.9B5) nor spermatocytes, spermatogonies or Sertoli cells were labelled (Figure 3.9B). Interstitial cells were also negative. Controls were performed with sense riboprobes, which produced only nonspecific background (data not shown). The 4-day old mouse sagittal sections and all other tissues tested were negative.

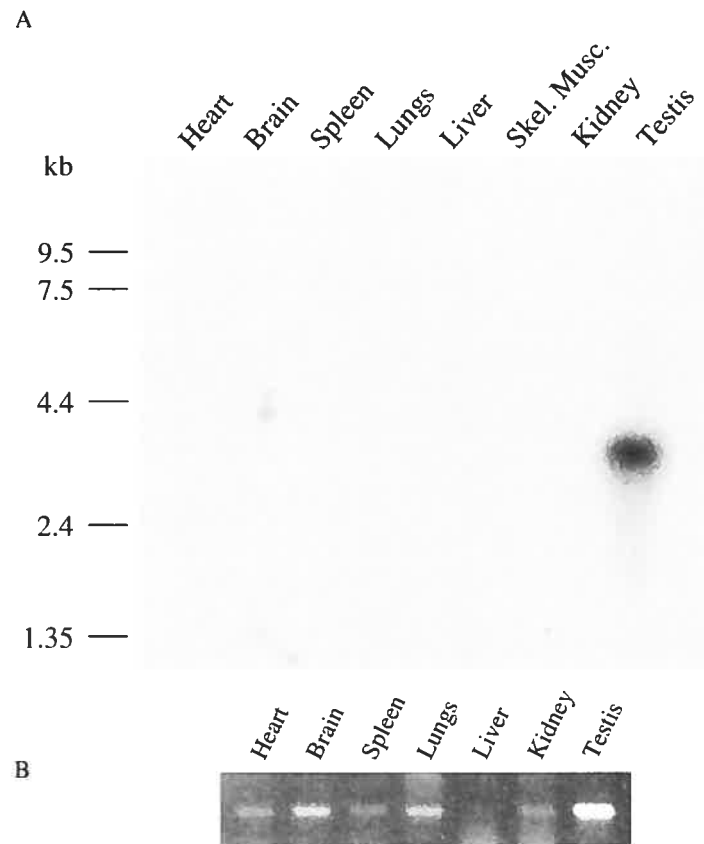


Figure 3.8: **Tissue distribution of mouse NL1 mRNA by Northern blot and RT-PCR analysis.** (A) The membrane purchased from Clontech containing 2  $\mu\text{g}$  of poly(A)<sup>+</sup> mRNA of various tissues was hybridized with a 1 kb specific cDNA probe corresponding to the 5' coding region of NL1. The blot was exposed for autoradiography for 7 days. (B) Total RNA (1  $\mu\text{g}$ ) was used for the RT-PCR reactions. Amplified DNA fragments were resolved on a 4% agarose gel.

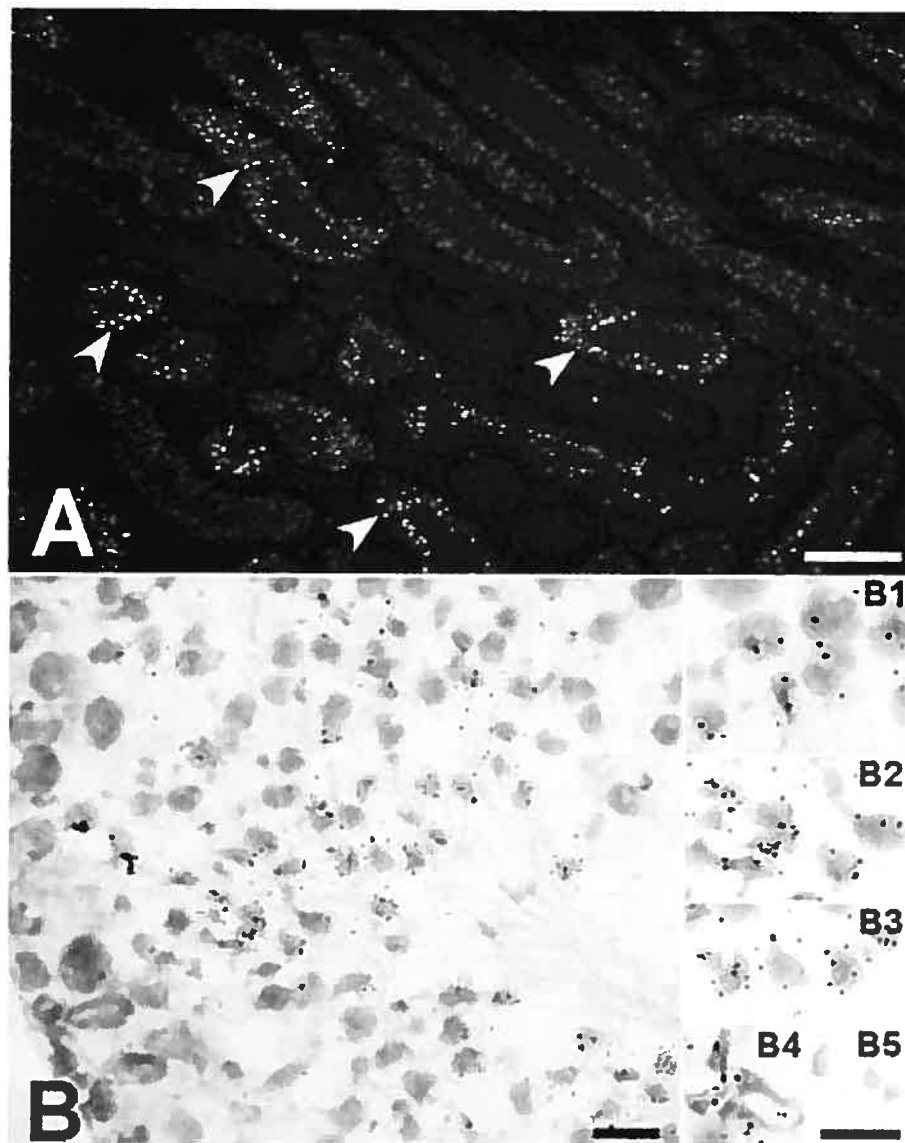


Figure 3.9: NL1 mRNA distribution in adult mouse testis observed by *in situ* hybridization. Silver labelling is seen as white spots on dark field (A) or as dark labelling on bright field (B). A, Low power emulsion autoradiography showing tubular distribution of NL1 mRNA. Some tubules present more evident labelling (arrows) indicating a stage specific tubular distribution. No labelling is seen in the interstitium. B, Sites of NL1 mRNA expression at cellular level showing labelling in inner germinal cells identified as round and elongated spermatids (Higher magnification in B1, B2, B3 and B4). Note that large cells corresponding to spermatogonies, spermatocytes and Sertoli cells are unlabelled (B), as well as spermatozoa (B and B5). Scale bar = 150  $\mu$ m (A), 15  $\mu$ m (B) and 10  $\mu$ m B1, B2, B3, B4 and B5, (scale bar in B5).



## 3.5 Discussion

The great interest in members of the Neprilysin family as putative therapeutic targets, and the recent discovery of new members of this important family of peptidases led us to investigate whether additional members of the family remained to be identified. Using a PCR-based strategy, we cloned, from mouse testis, a partial cDNA encoding a new Neprilysin-like enzyme that we called NL1. Analysis of the amino acid sequence encoded by the full-length NL1 cDNA revealed that this member of the family resembles Neprilysin the most: 55% identity and 74% similarity. Recently, the primary structure of a new zinc metallopeptidase from total mouse embryo was reported (Ikeda et al. 1999). This enzyme, called soluble secreted endopeptidase (SEP), is found as either a soluble or a cell-associated form due to alternative splicing. NL1 shows only 3 amino acid differences with the soluble form of SEP indicating that secreted SEP and NL1 are the same enzyme. Our cloning strategy did not allow characterization of the cell-associated form of NL1 which is a minor specie in mouse testis (Ikeda et al. 1999).

The amino acid sequence of NL1 predicts a topology of a type II integral membrane glycoprotein that is similar to the other members of the family. Treatment of the recombinant protein with PNGase F showed that NL1 possesses N-linked carbohydrate side chains. However, it is not possible to determine precisely whether all nine putative N-glycosylation sites are used, but the 30 kDa decrease in molecular mass upon PNGase F treatment suggests that most are glycosylated. It has already been shown that all asparagine residues in a Asn-X-Ser/Thr consensus are glycosylated in rabbit Neprilysin expressed in COS-1 cells and that sugar moieties increase the stability and enzymatic activity of the protein and facilitate its intracellular transport (Lafrance et al. 1994). Three of Neprilysin glycosylated Asn residues (Asn<sup>145</sup>, Asn<sup>285</sup> and Asn<sup>628</sup>) are conserved in NL1 (Asn<sup>163</sup>, Asn<sup>303</sup> and Asn<sup>643</sup>). Amongst these residues, Asn<sup>145</sup> and Asn<sup>628</sup> have been reported to influence Neprilysin enzymatic activity (Lafrance et al. 1994). In the same work, it has also been shown that the effect of sugar addition on folding and intracellular transport of Neprilysin is an accumulative effect of all glycosylation sites rather than a contribution of any particular one. Glycosylation of NL1 may share similarities with that of Neprilysin since we found their primary structures and enzymatic activities to be very similar.

Surprisingly, expression of the cDNA by transfection of HEK 293 cells showed that most

of the enzyme was secreted in the culture medium. The small amount of NL1 associated with the cells was endo H-sensitive, suggesting that the cell-associated enzyme is a species that has not yet left the RER. The presence of a furin cleavage site in NL1 sequence between the predicted transmembrane domain and the first conserved cysteine residue of the ectodomain led us to believe that a member of the mammalian subtilisin-like family of convertases was responsible for the presence of NL1 in the culture medium. These enzymes are involved in processing a variety of precursor proteins such as growth factors and hormones, receptors, plasma proteins, matrix metalloproteinases, metalloproteases-desintegrins and viral envelope glycoproteins (for a review see: Nakayama (1997)). Site-directed mutagenesis of the furin cleavage site (-Arg<sup>58</sup>-Thr-Val-Val-Lys-Arg<sup>63</sup>-) and expression of  $\alpha$ 1-PDX, a potent inhibitor of mammalian subtilisin-like convertases (Anderson et al. 1993), confirmed that a member of this family of endoproteases was involved in NL1 secretion presumably by cleaving in carboxy-terminus of Arg<sup>63</sup>. There are only a few examples of proteins which are processed from a membrane-bound precursor to a secreted form following cleavage by subtilisin-like convertases; these include meprin and collagen XVII (Milhiet et al. 1995, Schacke et al. 1998). Three members of the subtilisin-like family of convertases, namely furin, PC4 and PC7, are known to be expressed in germ cells (Nakayama et al. 1992, Torii et al. 1993, Seidah et al. 1992, Seidah et al. 1996). Whether one of these convertases generates secreted NL1 from its membrane form is under current investigation. In any case, NL1 is the only known member of the Neprilysin family that is secreted. This unique feature suggests that NL1 plays its physiological role in a context different from that of the membrane-bound peptidases, thereby diversifying the role of the peptidases of the Neprilysin family. It is of interest that circulating forms of Neprilysin in blood and urine have been described, but they have generally been related to pathological or stressful conditions (Almenoff et al. 1984, Deschodt-Lanckman et al. 1989, Johnson et al. 1985, Soleilhac et al. 1996, Aviv et al. 1995).

We have observed in cells expressing NL1 mutated at the furin cleavage site the appearance of a species resistant to digestion by endo H. This mutated protein was associated with cellular membranes. Taken together, these results indicate that NL1 is first synthesized and inserted in the RER membrane as a type II transmembrane protein. During intracellular transport, NL1 is converted to a soluble form by the action of a member of the mammalian subtilisin-like convertases. The identity of the cellular compartment

where this process occurs is not known. However, mammalian subtilisin-like convertases are usually active in post-Golgi compartments of the secretory pathway suggesting that processing of NL1 from the membrane bound form to the soluble form is a post-Golgi event.

Despite almost total abrogation of NL1 secretion, we observed only a slight accumulation of endo H-resistant NL1 in cells either co-expressing  $\alpha$ 1-PDX and NL1 (result not shown) or expressing mutated NL1. This observation suggests that unprocessed NL1 is rapidly degraded. A similar behavior was reported for the Notch1 receptor expressed in the furin-deficient cell line LoVo (Logeat et al. 1998). The mechanism(s) by which these unprocessed proteins are degraded is still unknown. It is interesting to point out that the spliceoform of SEP that has lost a 23 amino acid peptide, including the furin cleavage site, generates a cell-associated endo H-sensitive molecule (Ikeda et al. 1999).

The most important observation regarding the NL1 primary structure is the conservation of residues which in Neprilysin are essential for catalysis and binding of substrates or inhibitors. This finding suggests that NL1 could effectively act as an endopeptidase with a catalytic mechanism similar to that of Neprilysin. This hypothesis was supported by the demonstration that [3,5- $^3$ H]tyrosyl-D-Ala<sup>2</sup>-Leu<sup>5</sup>-enkephalin, a peptide substrate often used to monitor Neprilysin activity, was also an excellent NL1 substrate. The affinity of NL1 for [3,5- $^3$ H]tyrosyl-D-Ala<sup>2</sup>-Leu<sup>5</sup>-enkephalin was even higher than that of Neprilysin, as reflected by a  $K_m$  value 4- to 5-fold lower. Furthermore, two well known Neprilysin inhibitors, phosphoramidon and thiorphan, also abolished NL1 activity. Phosphoramidon, which inhibits Neprilysin as well as ECE-1 activity, albeit to a lesser extent (Turner & Murphy 1996), had very similar effects on NL1 and Neprilysin, with an IC<sub>50</sub> value for NL1 varying not more than two-fold from the value determined for Neprilysin. Thiorphan, considered to be a more specific inhibitor of Neprilysin, also inhibited NL1 activity, with an IC<sub>50</sub> six-fold greater than that for Neprilysin. These results suggest that the active sites of NL1 and Neprilysin are similar. This hypothesis is supported by the observation that secreted SEP degraded a set of peptides known to be Neprilysin substrates, including substance P, bradykinin and atrial natriuretic peptide (Ikeda et al. 1999). Taken together, these results illustrate the importance of identifying and characterizing other member of the family for the design of highly specific inhibitors.

In agreement with the enzymatic parameters demonstrating that NL1 and Neprilysin

have similar catalytic sites, we have observed that both enzymes cleaved Leu<sup>5</sup>-enkephalin at the same peptide bond. This result suggests that NL1 hydrolyzes peptide bonds on the amino side of hydrophobic amino acid residues as does Nephilysin (Turner et al. 1985). However, several other peptides will have to be tested to confirm this specificity and to determine whether NL1 has dipeptidyl carboxypeptidase activity as was shown for Nephilysin (Malfroy & Schwartz 1982a, R. C. Bateman et al. 1989, Beaumont et al. 1991) and more recently for ECE-1 (Johnson et al. 1999).

RT-PCR experiments with specific primers for the soluble and cell-associated forms of SEP showed a wide tissue distribution of the enzyme with the soluble form of SEP being predominant in testis and the cell-associated form in other tissues (Ikeda et al. 1999). Our RT-PCR results confirmed the wide tissue distribution of NL1. However, Northern blotting and *in situ* hybridization experiments indicated that expression of NL1 is predominant in germ cells of mature testis. Interestingly, proenkephalin mRNA has been shown to be expressed in germ cells and somatic cells of the testis (Torii et al. 1993, Seidah et al. 1992, Kew et al. 1989, Mehta et al. 1994, Kilpatrick et al. 1987, Kilpatrick & Millette 1986). Specific functions for testicular enkephalin peptides have not yet been defined, but it is believed that they could act as intratesticular paracrine/autocrine factors. In addition to their putative role as mediators of testicular cell communication, it has also been demonstrated that proenkephalin products synthesized by spermatogenic cells during spermatogenesis are stored in the acrosome of human, hamster, rat and sheep spermatozoa and are released from sperm following acrosomal reaction (Kew et al. 1990). It has thus been proposed that proenkephalin products may act as sperm acrosomal factors during the fertilization process as well as intratesticular regulators secreted by spermatogenic cells. Since Leu<sup>5</sup>-enkephalin was found to be a good substrate for NL1, opioid peptides originating from proenkephalin could serve as physiological substrate for this new enzyme. In this way, NL1 would serve to regulate the activity of these bioactive peptides.

Testis is the only tissue where the soluble form of SEP is predominant (Ikeda et al. 1999), suggesting a testis-specific alternative splicing. Expression of testis-specific molecular species of peptidases or prohormones, arising through diverse mechanisms, has been documented in the past (Howard et al. 1990, Jeannotte et al. 1987). However, the physiological significance of these testis-specific species is not always clear. In the case of NL1 or SEP, it might allow local constitutive secretion by germinal cells of an otherwise

cell-associated enzyme, to regulate spermatogenesis much like several other proteolytic enzymes of the seminiferous tubules (Monsees et al. 1998). Alternatively, it might allow accumulation in acrosome with proenkephalin peptides and release upon acrosomal reaction. More exhaustive studies concerning NL1 localization and physiological substrate identification will be needed to understand its role in the testis and possibly in the fertilization process.

### **3.6 Acknowledgments**

This work was supported by grants from Fonds pour Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) and Medical Research Council of Canada (MRC) to P.C., L.D. and G.B., and from MRC to M.M. A.F.R. is supported by the Canadian International Development Agency (CIDA) and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil. M.C. is supported by a studentship from National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC). We are grateful to Dr. Harriet S. Tenenhouse for reading the manuscript.

# 4

---

## Préambule

Suite à l'identification et à la caractérisation primaire de NL1, nous avons voulu mieux définir l'expression de cette enzyme au niveau tissulaire et cellulaire. Pour ce faire, nous avons entrepris des études d'hybridation *in situ* chez la souris. Une fois les sites d'expression de NL1 mieux caractérisés, nous avons identifié une série de substrats peptidiques localisés dans les mêmes régions que l'enzyme et avons testé l'activité de la protéine purifiée sur ces peptides. Nos études ont permis d'approfondir nos connaissances sur cette nouvelle peptidase et nous ont rapproché de notre but ultime qui est l'identification des fonctions physiologiques de NL1.

Le prochain chapitre, présenté sous forme d'article, rapporte les résultats obtenus lors de ces études. Ces résultats furent publiés en 2003 dans la revue *Peptides*.

# 4

---

## The Neuropeptide-degrading enzyme NL1 is expressed in specific neurons of mouse brain.

Mélanie Carpentier<sup>a</sup>, Mieczyslaw Marcinkiewicz<sup>b</sup>, Guy Boileau<sup>a</sup>, Luc DesGroseillers<sup>a,c\*</sup>

<sup>a</sup> Département de biochimie, Faculté de médecine, Université de Montréal

<sup>b</sup> Laboratoire de Neuroendocrinologie, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Département de médecine, Université de Montréal

<sup>c</sup> Centre de Recherche en Sciences Neurologiques, Université de Montréal.

\*Corresponding author: Département de Biochimie, Université de Montréal, Casier postal 6128 succ. Centre-Ville, Montréal (Quebec) Canada, H3C 3J7, Tel: 514-343-5802; fax: 514-343-2210; *E-mail address*: luc.desgroseillers@umontreal.ca

**Key Words:** *in situ* hybridization, Neprilysin, pituitary gland, bradykinin, substance P.

Published in *Peptides*, vol. 24, 2003, pp. 1083-1091

### 4.1 Abstract

Metallo-endopeptidases of the M13 family were shown to play critical roles in normal physiological processes such as pain control, hypertension and phosphate metabolism, and in pathological states such as Alzheimer's disease. Recently, NL1, a novel member of the family, has been identified and shown to be expressed in several tissues both as a membrane-bound and a secreted protein. As a further step to understand the physiological role(s) of NL1 in mouse, we mapped NL1 mRNA expression pattern in embryos and in young animals at postnatal days p1 and p3, and in adult nervous tissue, using *in situ* hybridization at the cellular level. No expression could be detected in embryos and young animals. In contrast, NL1 expression was evident in adult brain, pituitary gland and spinal cord. In the central nervous system, NL1 mRNA was predominantly found in the ventro-posterior regions, which are mostly associated with vegetative functions. At the cellular level, NL1 mRNA was non-uniformly

distributed within subpopulations of neurons. In the spinal cord, specific signal was observed in the gray matter. Then, in order to identify putative relevant substrates for NL1, we studied its enzymatic activity towards peptides known to be co-expressed in the NL1 positive domains. Our study showed that NL1 degrades several of these peptides *in vitro*, the most readily degraded peptides being Bradykinin and Substance P. These results suggest that NL1 is likely to play a critical role in the central nervous system.

## 4.2 Introduction

Bioactive peptides interact with specific receptors on target cells to produce cellular responses, and it is now well known that enzymatic activation or degradation is a key mechanism for regulating the levels of these compounds *in vivo*. Membrane-bound zinc metallopeptidases of the M13 family have been shown to exert critical roles in the metabolism of biologically active peptides (Crine et al. 1997, Drezner 2000, Tenenhouse 1999, Turner et al. 2000, Turner 1997). In mammals, this family of peptidases comprises the following members: Neprilysin (Neutral endopeptidase-24.11, NEP, CALLA) (Crine et al. 1997), the Endothelin-Converting Enzymes 1 and 2 (ECE-1 and ECE-2) (reviewed in Turner (1997)), PHEX (formerly PEX; a Phosphate regulating gene with homologies to Endopeptidases on the X chromosome) (reviewed in Tenenhouse (1999)), the Kell blood group protein (reviewed in Marsh (1992)), SEP/NL1/NEP2 (called NL1 in the present paper) (Ghaddar et al. 2000, Ikeda et al. 1999, Ouimet et al. 2000, Rose et al. 2002) and finally ECEL1/DINE/XCE (Endothelin-Converting Enzyme-Like 1/Damage-Induced Neuronal Endopeptidase) (Kiryu-Seo et al. 2000, Valdenaire et al. 1999, Valdenaire & Schweizer 2000). Members of this family have recently attracted much attention because of their possible implication in several diseases such as hypertension, Alzheimer's disease and bone diseases (Carpentier et al. 2002, Carson & Turner 2002, Iwata et al. 2000, Tenenhouse 1999, Turner 1997). Therefore they have been identified as important therapeutic targets.

NL1 glycoprotein shares greater sequence similarities with Neprilysin than with any other members of the family (55% amino acid sequence identity in mouse). Accordingly, all amino acid residues known to be part of the active site of Neprilysin are present in



NL1. These include, catalytic and substrate binding residues as well as amino acids known to stabilize the transition state of the catalytic reaction, suggesting that the two proteins share a similar catalytic mechanism (Ghaddar et al. 2000). In line with this hypothesis, NL1 was shown to digest peptides that are known substrates for Neprilysin and to be inhibited by Neprilysin inhibitors (Ghaddar et al. 2000, Rose et al. 2002). However, in contrast to Neprilysin, NL1 exists as two forms generated by alternative splicing: in addition to the transmembrane form common to other members of the M13 family, NL1 is also found as a secreted protein (Ikeda et al. 1999). This latter species is generated by inclusion of an additional exon at the C-terminal end of the transmembrane domain containing a putative prohormone convertase recognition site responsible for the secretion of NL1 in the extracellular space (Ghaddar et al. 2000). This feature makes NL1 unique among the M13 family of zinc metallopeptidases since all other members are type II integral membrane proteins.

Although not ubiquitous, NL1 expression has been detected in many tissues. Initial determination of NL1 tissue distribution in mice by Northern blot revealed expression only in testis (Ghaddar et al. 2000). However, RT-PCR analyses showed that the enzyme was expressed in many other tissues, including brain, heart, lung, liver and kidney (Ikeda et al. 1999). Interestingly, these RT-PCR experiments also indicated that testis expressed mainly the soluble form of NL1, whereas all other tissues tested expressed mostly the membrane-bound form of the enzyme. In testis, NL1 mRNA was found in the round and elongated spermatids suggesting that it could be involved in sperm formation and/or specific processes related to fertility (Ghaddar et al. 2000). Similar Northern blot experiments with rat tissues showed NL1 expression not only in testis, but also in brain and pituitary (Ouimet et al. 2000). *In situ* hybridization on rat brain tissue revealed that NL1 mRNA is present in several brain regions, including cerebral cortex, hippocampus, hypothalamus and pituitary. Finally, as observed in mice, weak expression of NL1 mRNA was detected in many other rat tissues using RT-PCR experiments (Ouimet et al. 2000). However, there is presently no report of NL1 expression at the cellular level in brain.

In order to better understand the physiological role(s) of NL1 in mouse, we have undertaken an *in situ* hybridization study of NL1 mRNA expression pattern both at the anatomical and the cellular level, followed by an enzymatic characterization of NL1 activity toward potential peptide substrates known to be expressed in the NL1 positive

domains. Our results showed that NL1 mRNA is expressed in subpopulations of neurons in ventro-posterior regions of the brain, pituitary gland and spinal cord. Our demonstration that NL1 efficiently degrades several peptides known to be expressed in these regions may contribute to identify putative relevant peptide substrates of NL1.

## 4.3 Materials and Methods

### cRNA probe and *in situ* hybridization

PCR amplification using the primer pair  $_{281}5'$ -CGAGGAACCCCTGTAAACTTCTAC-3' (sense) and  $_{2171}5'$ -GTCTTGATGGACTGGACGGCGAAC-3' (antisense) (numbering according to the sequence published in (Ghaddar et al. 2000) ) was used to clone an NL1 1890 bp fragment into the pGemT-easy vector (Promega, Madison, WI). Radiolabelled antisense and sense NL1 riboprobes were prepared by *in vitro* synthesis in the presence of [ $^{35}$ S]-UTP and of [ $^{35}$ S]-CTP (1250 Ci/mmol; Amersham, Arlington Heights, IL) as described elsewhere (Ghaddar et al. 2000). The specific activity of the NL1 probes was 323 Ci/mmol. The cRNA probes were applied on 10  $\mu$ m cryostat sections of whole mouse embryos at embryonic day E12, E13, E14, E15, E17, and postnatal day p1 and p3, or of brain, pituitary gland and trigeminal ganglion fixed in 4% formaldehyde. *In situ* hybridization procedure was carried out overnight at 4°C as previously described (Ruchon et al. 1998). For autoradiography, the sections were dipped in photographic emulsion (NTB-2, Kodak), exposed for 14 days at 4°C before development in D19 solution (Kodak) and stained with hematoxylin and eosin.

### Peptide hydrolysis and high performance liquid chromatography analysis

Orexin B, NPY, substance P, leu-enkephalin, ACTH, bradykinin and  $\alpha$ -MSH were all purchased from Peninsula Laboratories (San Carlos, CA). For the determination of peptides half-life, each peptide (110  $\mu$ M) was incubated with 225 ng of purified NL1 in 100  $\mu$ l of 50 mM MES ([2-(*N*-Morpholino)ethansulfonic acid]) pH 6.5 at 37°C for various periods of time. Hydrolysis was stopped at different times by the addition of EDTA to a final

concentration of 5 mM. For time 0, 5mM of EDTA was added at the same time as the substrate. Peptide hydrolysis was detected by reverse phase HPLC (RP-HPLC). RP-HPLC was performed on a C18  $\mu$ Bondapak analytical column (Waters, Mississauga, ON) with U.V. detector set at 220 nm. Peptides were resolved with a linear gradient in 20 min at the flow rate of 1ml/min (mobile phase A=0.1% trifluoroacetic acid (TCA) and mobile phase B= 80% acetonitrile [CH<sub>3</sub>CN], 0.1% TCA). The area under the peptide peak at different time points was compared to that observed at time 0 to calculate the % of remaining peptide. The amount of peptides at time 0 was considered to represent 100% of the peptides. Each enzymatic reaction was kept in the linear range of detection of the HPLC apparatus. All enzymatic digestions of peptides were done in triplicates (n=3).

### NL1 purification

Secreted NL1 was produced by transfection of HEK 293 cells as described previously (Ghaddar et al. 2000) and purified using three FPLC steps. First the culture medium was loaded on a source 15Q column (Amersham, Arlington Heights, IL) and the positive fractions identified by western blotting. Then, NL1 positive fractions were pooled and further purified on a Phenyl Superose HR 5/5 column (Amersham, Arlington Heights, IL) and finally on a HiTrap blue column (Amersham, Arlington Heights, IL). Purity of the final product was more than 95% as assayed by SDS-PAGE on a 7.5% gel and silver staining. The detailed procedure of NL1 purification will be published elsewhere (Carpentier, M., Boileau, G., and DesGroseillers, L. in preparation).

## 4.4 Results

### 4.4.1 *In situ* hybridization

To gain more insight into tissue and cellular expression of NL1 mRNA, *in situ* hybridization was first performed on cryostat sections of whole mouse embryos at embryonic day E12, E13, E14, E15, E17 and postnatal day p1 and p3. The probe used for *in situ* hybridization recognize both the secreted and transmembrane forms of NL1, therefore the hybridization signal obtained throughout this study does not discriminate between the two isoforms. All tissues were either negative or gave non-specific signals as compared to the sense

probe (data not shown). These results suggest that NL1 is not required for embryonic development. However, we do not exclude the possibility of a very weak expression that could not be detected by *in situ* hybridization or that NL1 is required before embryonic day 12.

We then studied NL1 expression in the nervous system of adult mice. Previous studies had demonstrated low levels of mRNA in mice brain extracts using an RT-PCR assay, but the precise localization of NL1 within brain subdomains was not addressed (Ghaddar et al. 2000, Ikeda et al. 1999). Cryostat sections of brain were fixed and hybridized with the NL1 sense and antisense probes. In the central nervous system (CNS), NL1 was mostly detected in the ventro-posterior regions of the brain, with little if any hybridization in the antero-dorsal regions as seen in the rostro-caudal sections of the brain (Figure 4.1). In

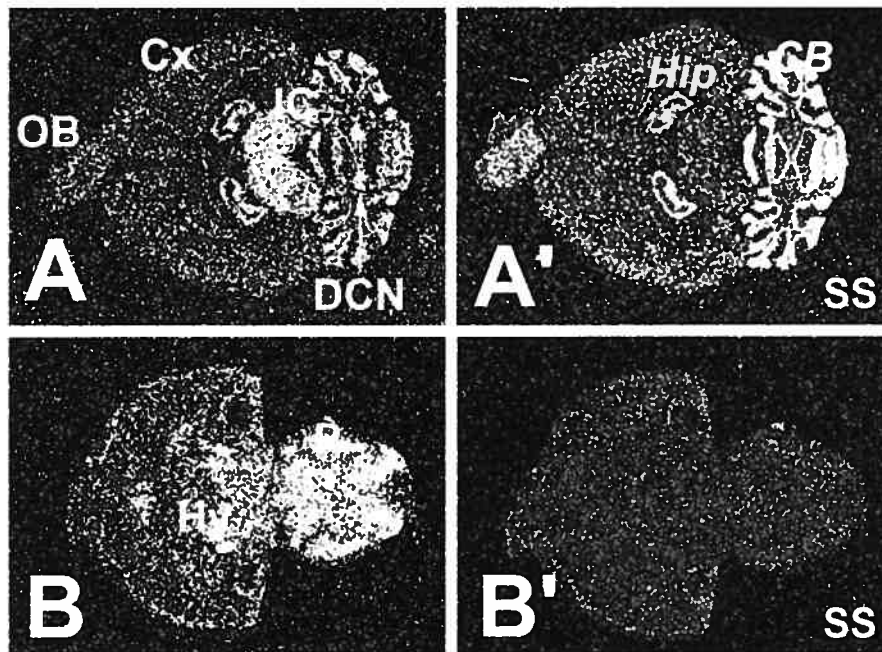


Figure 4.1: **Distribution of NL1 mRNA in the brain.** *In situ* hybridization patterns of NL1 mRNA in mouse brain horizontal sections using [<sup>35</sup>S]-labelled antisense (A and B) and sense (ss, A' and B') cRNA probes. Abbreviations: CB - cerebellum; Cx - cerebral cortex, Hip - hippocampus, Hy hypothalamus, P - pons, OB - olfactory bulb, IC - inferior colliculi, DCN - deep cerebellar nucleus). Controls with sense riboprobes were negative in most regions except the hippocampus (Hip) and cerebellum (CB). Exposure time is 3 days. Magnification x 5.

the ventro-posterior regions. hypothalamus, deep cerebellar nuclei, inferior colliculi and pons were clearly labelled. Controls performed with the sense cRNA probe were negative

in these structures (Figure 4.1), emphasizing the specificity of hybridization. Non-specific hybridization signals were observed in the hippocampus and part of cerebellum, more precisely in the granule cells. The results of *in situ* hybridization in adult mouse brain are summarized in Table 4.1.

In order to more precisely define the regions in which NL1 is expressed, we analyzed coronal sections of the brain (Figure 4.2). The most anterior region of NL1 mRNA expression has been found in the diagonal band of Broca (Figure 4.2A). NL1 mRNA was widely observed throughout the hypothalamic centers such as lateral hypothalamus and subthalamic regions (Figure 4.2B), but there was little if any expression in the thalamus. One exception was the lateral habenular nucleus. Most mesencephalic structures including superior (Figure 4.2C) and inferior colliculi (Figure 4.2D) contained NL1 mRNA. Pontine structures with raphe nuclei and pontine nuclei (Figure 4.2E) were strongly labelled. Positive signals were also found in the spinal cord where the gray matter was labelled (Figure 4.2F). Controls performed with the sense cRNA probe were negative in all these structures (Figure 4.2G and H).

At the cellular level, NL1 mRNA was visible in specific neuronal cell populations. Figure 4.3 shows a selection of several CNS structures displaying various levels of NL1 mRNA hybridization at cellular resolution. Positive NL1 mRNA labelling has been found in specific sets of neuronal cells (arrows) of regions such as the diagonal band of Broca (Figure 4.3B), some cells associated with the islands of Calleja (Figure 4.3C) and olfactory cortex cells (Figure 4.3D). The lateral hypothalamus (Figure 4.3G) and subthalamic nucleus (Figure 4.3H) contained numerous NL1-labelled neurons. Positive neurons were present within lateral habenular nucleus (Figure 4.3I), interstitial magnocellular nucleus of the posterior commissurae (Figure 4.3L), superior colliculi (Figure 4.3M), deep gray layer of superior colliculi (Figure 4.3N), red nucleus in mesencephalon (Figure 4.3O), oculomotor nucleus (Figure 4.3P), pontine nuclei (Figure 4.3Q), deep cerebellar nuclei (Figure 4.3R), and gray matter of the spinal cord (Figure 4.3S). In the peripheral nervous system, exemplified by trigeminal ganglion, few positively-labelled sensory neurons surrounded by unlabelled satellite cells were found (Figure 4.3T). In contrast, most brain cells were negative in the olfactory lobe (Figure 4.3A), cerebral cortex (Figure 4.3E), hippocampal CA3 region and dentate gyrus (Figure 4.3F), ependyma and central gray (Figure 4.3J) and choroid plexus (Figure 4.3K). There was no labelling in white matter oligodendrocytes or

in endothelial cells around blood vessels. Gray matter cells with small nuclei, most likely astrocytes, freely-distributed or in association with neuronal cells, were unlabelled.

In the pituitary gland most labelling was found in the intermediate lobe melanotrophs (Figure 4.4). Much less was observed in the anterior lobe endocrine cells, where about 30% of adenohypophyseal cells expressed weak NL1 labelling (Figure 4.4). No signal was detected with the sense probe used as control (data not shown).

#### 4.4.2 Peptides degradation

Our results indicate that NL1 is expressed in neuronal cells of several specific brain regions and therefore may play multiple physiological roles associated with those centers. It is believed, since NL1 active site is located outside the cells, that it participates in the degradation of several peptides and contributes to turn off the physiological signal that they carry. Therefore, based on our *in situ* hybridization results, we tested whether purified NL1 degrades peptides known to be expressed in the same regions as NL1 mRNA. These peptides are likely to be relevant substrates *in vivo*. NL1-mediated degradation of NPY, Orexins, substance P, bradykinin and POMC derivatives was compared to that of leu-enkephalin (Figure 4.5), a peptide already shown to be a good substrate for NL1 (Ghaddar et al. 2000). As shown in figure 4.5A, NPY and orexin B are degraded by NL1 at a slightly lower rate than leu-enkephalin. orexin B being nevertheless more rapidly degraded than NPY (see also Table 4.1). We then tested the degradation of POMC-derived peptides, which are expressed in hypothalamus and pituitary. Our results show that  $\alpha$ -MSH is degraded with the same efficiency as leu-enkephalin (Figure 4.5B). In contrast ACTH is very poorly degraded by NL1, with approximately 90% of the peptide still undigested even after an incubation of 60 minutes (Figure 4.5B). Similarly,  $\beta$ -endorphin is a poor NL1 substrate (data not shown). Finally, substance P and bradykinin are more efficiently degraded than leu-enkephalin (Figure 4.5C). The half-life of bradykinin and substance P are approximately 3 times shorter than that of leu-enkephalin (Table 4.2). To compare the degradation of these substrates between them, we normalized the half-life of each peptide with the half life of leu-enkephalin. This was necessary because different preparations of the NL1 enzyme were used in these studies and each purified preparation gave limited amounts of the NL1 peptidase that did not allow us to calculate the half-life

of several peptides in a single experiment. As shown in Table 4.2, the order of potency is: substance P > bradykinin > leu-enkephalin,  $\alpha$ -MSH > orexinB > NPY >>> ACTH and  $\beta$ -endorphin (data not shown).

Table 4.1: Comparison of the distribution of *Nl1* mouse mRNA with NEP rat mRNA in adult nervous system

Regions	NEP*	NL1
<b>Cortex</b>		
Glomerular layer of olfactory bulb	+	-
Olfactory cortex	-	+
Diagonal band of broca	-	+
<b>Hippocampus</b>		
Dentate gyrus	+	..**
Ammon's horn	+	..**
<b>Basal ganglia</b>		
Accumbens nucleus	+	-
Caudate putamen	+	-
Olfactory tubercle	+	-
<b>Thalamus</b>		
habenular nucleus	+	+
Subthalamic nucleus	-	+
<b>Hypothalamus</b>		
Arcuate nucleus	+	-
Mammillary nuclei	+	-
lateral hypothalamus	-	+
<b>Mesencephalon</b>		
Inferior colliculus	+	+
Superior colliculus	+	+
oculomotor nucleus	-	+
Anterior pretectal nucleus	+	-
Red nucleus	+	+
Medial terminal nucleus of accessory tract	+	+
Interpeduncular nucleus	+	-
<b>Metencephalon</b>		
Pontine nuclei	+	+
Raphe nuclei	-	+
trigeminal ganglion	-	+
Vestibular nucleus	+	-
<b>Cerebellum</b>		
Deep cerebellar nucleus	-	+
Purkinje cells	+	-
Molecular layer	+	-
<b>Choroid plexus (fourth ventricle)</b>	+	-
<b>Pituitary</b>		
Anterior lobe	n.d.	+
Intermediate lobe	n.d.	+
Posterior lobe	n.d.	-
<b>Spinal cord</b>		
Gray matter of the spinal cord	n.d.	+

\* according to Gaudoux et al. (1993)

\*\* Hybridization signal has been observed with both sense and reverse riboprobes

n.d. not done



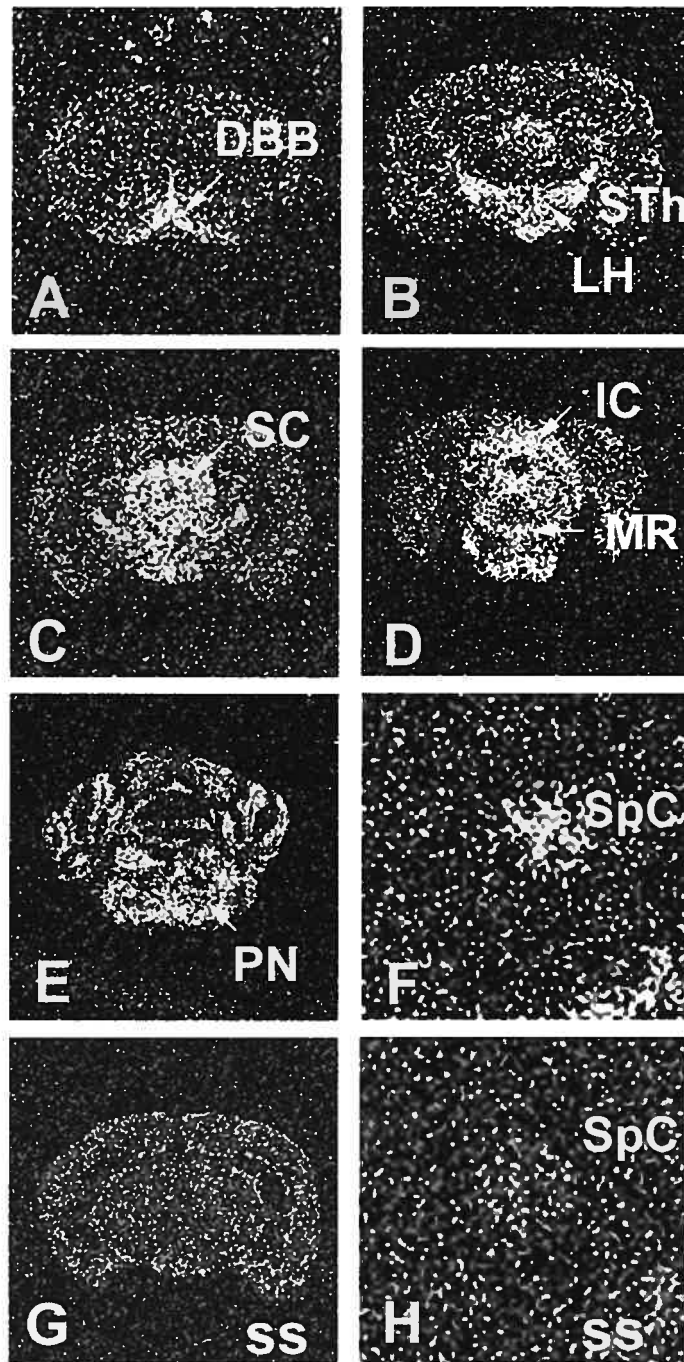


Figure 4.2: **Distribution of NL1 mRNA in the brain.** *in situ* hybridization patterns of NL1 mRNA in mouse brain coronal sections using [<sup>35</sup>S]-labelled antisense (A to F) and sense (ss, G and H) cRNA probes. Most hybridization signal is distributed in ventro-posterior regions of the brain and much less in dorsal regions. Cortical regions are not labelled. Abbreviations: DBB - Diagonal band of Broca, LH - lateral hypothalamus, STh - subthalamic nuclei, SC - superior culliculi, IC - inferior culliculi, MR - median raphe nucleus, PN - pontine regions, SpC - spinal cord). Magnification x 5.

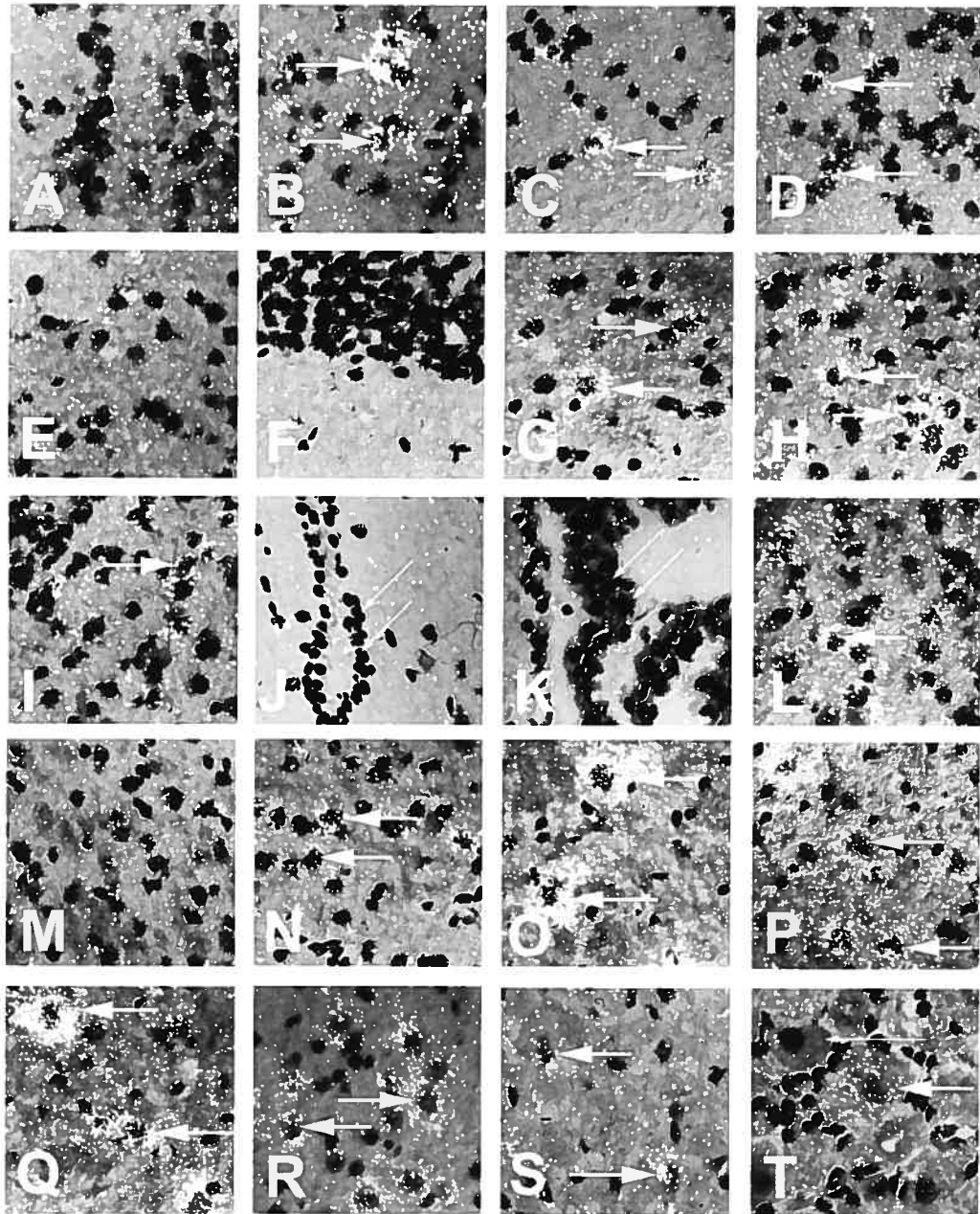


Figure 4.3: **Heterogeneity of NL1 mRNA distribution in brain regions (A-R in rostro-caudal direction) and trigeminal ganglion (T) at cellular levels.** NL1 mRNA is present in specific sets of neuronal cells (arrows) such as: diagonal band of Broca (B); some cells associated with the islands of Calleja (C) and olfactory cortex (D). The lateral hypothalamus (G) and subthalamic nucleus (H) contain numerous NL1-labelled neurons. Positively-labelled neurons are present within lateral habenular nucleus (I), interstitial magnocellular nucleus of the posterior commissurae (L), superior colliculi (M), deep gray layer of superior colliculi (N), red nucleus in mesencephalon (O), oculomotor nucleus (P) pontine nuclei (Q), deep cerebellar nuclei (R), and gray matter of the spinal cord (S). Only few positive sensory neurons were labelled in the peripheral nervous system trigeminal ganglion (T). Other brain cells are negative: the olfactory lobe (A), cerebral cortex (E), hippocampal CA3 region and dentate gyrus (F), ependyma and central gray (J) and choroid plexus (K). Magnification x 180.

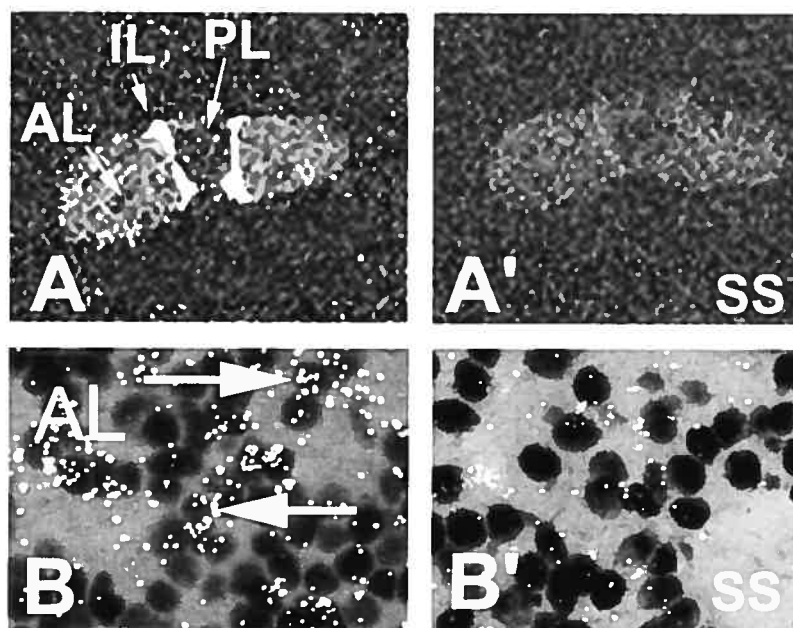


Figure 4.4: **Distribution of NL1 mRNA in the pituitary gland.** using antisense (A and B) and control sense (ss, A' and B') cRNA probes at both anatomical (A and A') and cellular (B and B') level. Abbreviations: AL - anterior lobe; IL - intermediate lobe and PL - posterior lobe. Magnification x 30 (A and A') and x 150 (B and B').

Table 4.2: **Comparison of enzymatic efficiency of soluble NL1 toward peptides substrates<sup>a</sup>**

Peptide	Half-life (peptide/Leu-enkephalin)
Leu-Enk	1
NPY	1.85
Orexin B	1.44
Substance P	0.28
Bradykinin	0.29
$\alpha$ -MHS	1.05
ACTH	>>4

<sup>a</sup> Half-life of peptides was extrapolated using linear regression curve in the linear range of peptide degradation by 225 ng of purified NL1. All experiments were normalized for enkephalin degradation.

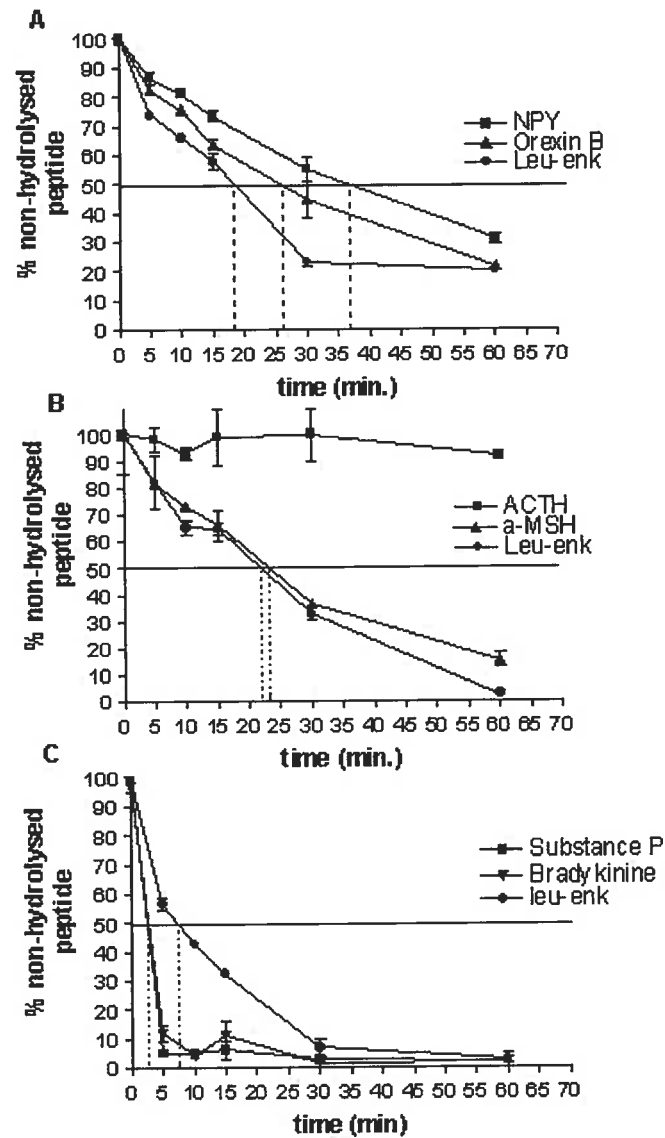


Figure 4.5: *in vitro* hydrolysis of peptides known to be expressed in the same brain regions as NL1. Bradykinin, substance P, NPY, orexin B, ACTH,  $\alpha$ -MSH and leu-enkephalin (110  $\mu$ M each) were incubated in the presence of 225 ng of purified NL1 over a period of 90 minutes. Aliquots were taken at regular times and run on HPLC columns. Percentage of degradation was calculated by measuring the area under the peak corresponding to the undigested peptide. Half-life of each peptide was calculated and normalized to that of leu-enkephalin in the same experiment and presented in Table 4.1.

## 4.5 Discussion

In this paper, we documented the distribution of NL1 mRNA during mouse development and in the adult CNS using *in situ* hybridization. Screening whole embryos and newborn mice from embryonic day 12 to postnatal day 3 revealed that NL1 is poorly if not at all expressed during development. This is in contrast to what has been observed for other members of the M13 family. Neprilysin mRNA was reported to be expressed at embryonic day 10 in the lining of the gut and at E12 in several structures such as the heart, notochord, nasal process and neuroepithelium (Spencer-Dene et al. 1994). Similarly, PHEX is expressed early in life in growing bones and teeth and its expression declines at one month post natal (Ruchon et al. 1998). In addition, early expression of other members of the M13 family can be inferred from embryonic defects that were reported in knockout mice. ECE-1 knockout mice die *in utero* and show severe craniofacial, enteric and cardiac malformation (Renolleau et al. 2001). ECE-2 was reported to play a role in cardiac development (Yanagisawa et al. 2000). Finally, ECEL1 knockout mice die at birth of respiratory failure (Schweizer et al. 1999). All these results suggest that NL1 is not likely to play a major role during mouse development and early postnatal life.

In the adult central nervous system, NL1 was mostly observed in the ventro-posterior regions of the brain. These regions are generally associated with vegetative functions. NL1 mRNA was also found in the spinal cord, a region known to relay general sensory and motor stimuli and to regulate nociception. Based on its tissue distribution and its putative substrates, NL1 could be involved in several physiological pathways controlling pain, energy balance, endocrine functions and reproduction. NL1 could also be implicated in some aspects of the regulation of the hypothalamus-pituitary-gonadal axis since it is well expressed in those key regions. Its expression in these tissues may be necessary to coordinate its function in the brain and those in testis, the major site of NL1 expression in adults (Ghaddar et al. 2000).

Although globally similar, the NL1 expression pattern in mouse shows some divergence with that reported in rat. NL1 expression in mouse brain is more restricted than in rat brain. For example, NL1 mRNA has not been detected in the mouse cerebral cortex, trapezoid body and zona incerta, regions that are positive in rat (Ouimet et al. 2000). Other differences were observed in the intermediate lobe of pituitary and deep cerebellar

nuclei where NL1 is expressed in mouse but not in rat. Finally, NL1 was shown to be expressed in rat hippocampus. Unfortunately, non-specific hybridization in this tissue prevents any conclusion as to whether NL1 is present in mouse hippocampus or not. These variations could reflect slight evolutionary differences in the functions of this peptidase *in vivo*.

NL1 is closely related to Neprilysin. Mouse NL1 shares 55% amino acid sequence identity with mouse Neprilysin and not surprisingly, both enzymes degrade overlapping sets of peptides and respond to the same inhibitors. As a consequence, localization studies using pharmacological or activity-based assays must be taken with caution, since these assays are not likely to discriminate between the two activities. For example, injection of thiorphan in rat brain caused analgesia resulting from enhanced extracellular enkephalin concentration *in vivo* (Roques et al. 1980). This effect was believed to be due to the pharmacological inhibition of Neprilysin activity by thiorphan. However, Neprilysin deficient mice did not respond with decreased pain perception in the hot plate, tail-withdrawal and writhing tests (Fischer et al. 2002), suggesting that Neprilysin may not be involved in this function and/or that other enzyme(s) closely related to Neprilysin may also be involved in the analgesic effect of thiorphan.

Neprilysin mRNA distribution in rat brain and mouse NL1 mRNA distribution in mouse brain overlap in several brain regions while they are complementary in many others (Table 4.1). For example, Neprilysin and NL1 are coexpressed in most subregions of the mesencephalon whereas they are differentially expressed in the hypothalamus. Other brain regions such as the choroid plexus of the fourth ventricle, the basal ganglia and Purkinje cells in the cerebellum strongly expressed Neprilysin (Gaudoux et al. 1993). All these regions are devoid of NL1 mRNA. In addition, whereas NL1 expression is restricted to neurons, Neprilysin mRNA expression was reported in both neuronal and glial cells including oligodendrocytes, astrocytes and ependymal cells (). The distinct distribution of NL1 and Neprilysin in the CNS, despite their similar although not identical enzymatic activities argue in favor of complementary rather than similar physiological roles *in vivo*. Finally, the restricted expression of NL1 in the ventro-posterior region of the brain, the so called "primitive" brain, suggests that NL1 may be the ancestor of members of the M13 family, before duplication and specialization of other members to fulfill additional functions as the organisms evolved.

At the cellular level, NL1 is heterogeneously expressed in specific sets of neurons. This expression pattern is characteristic of peptidergic pathways. Peptidergic pathways are believed to be at least partly regulated by peptidases. Co-localization of peptides and peptidases is a major prerequisite for peptide degradation. Therefore, based on NL1 expression in brain, we have identified potentially relevant peptide substrates. substance P, bradykinin, leu-enkephalin,  $\alpha$ -MSH, orexins and NPY are readily degraded by NL1, suggesting that these peptides are potential physiological NL1 substrates. In contrast, ACTH and  $\beta$ -endorphin are unlikely physiological substrates since they are not degraded by NL1. These results also show that NL1 has wide substrate specificity, indicating that colocalization of peptides with the peptidase is more relevant for cleavage than the peptide amino acid sequence. These characteristics were also reported for Neprilysin.

*In vivo* evidence for the participation of NL1 in the biological inactivation of any of the so far identified substrates awaits further studies. It will be important to study the distribution of the NL1 protein to correlate the presence of NL1 mRNA in diverse brain structures with the distribution of the protein. Development of potent and highly specific NL1 inhibitors and the generation of NL1 knockout mice will allow us to further define the role of NL1 in animal physiology and to understand the relative contribution of NL1 and Neprilysin to the regulation of peptide functions.

## 4.6 Acknowledgments

We thank Mrs J. Marcinkiewicz for help with *in situ* hybridization. This work was supported by grant # NRF13052 from the Canadian Institutes for Health Research of Canada (CIHR). MC was supported by a studentship from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

# 5

---

## Préambule

Une des multiples façons d'identifier le rôle physiologique d'une protéine est de générer des souris déficientes en celle-ci. Par la technique de recombinaison homologue (*gene targeting*), nous avons entrepris de générer des souris déficientes en NL1. Afin de fabriquer un vecteur de ciblage adéquat, l'organisation du gène codant pour l'enzyme a d'abord été caractérisée. Un vecteur de ciblage a ensuite été introduit dans des cellules embryonnaires souches (ES) afin de générer une mutation dans le gène codant pour NL1. Finalement, les cellules ES mutantes ont été injectées dans des blastocytes murins pour produire des souris portant la mutation. L'analyse des souris déficientes en NL1 révéla que l'enzyme est impliquée dans les processus liés à la reproduction.

Le prochain chapitre, présenté sous forme d'article, rapporte la production et l'analyse des souris déficientes en NL1. Ce manuscrit est soumis à la revue *Molecular and Cellular Biology* (MCB).



# 5

---

## Reduced fertility in male mice deficient in the zinc metallopeptidase NL1

Mélanie Carpentier<sup>a</sup>, Christine Guillemette<sup>b</sup>, Janice L. Bailey<sup>b</sup>, Guy Boileau<sup>a</sup>, Lucie Jeannotte<sup>c</sup>, Luc DesGroseillers<sup>a,d\*</sup>, and Jean Charron<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Département de biochimie, Faculté de médecine, Université de Montréal

<sup>b</sup> Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction, Département de Sciences Animales, Université Laval

<sup>c</sup> Centre de Recherche en Cancérologie de l'Université Laval, L'Hôtel-Dieu de Québec, CHUQ

<sup>d</sup> Centre de Recherche en Sciences Neurologiques, Université de Montréal.

\*Corresponding author: Département de Biochimie, Université de Montréal, Casier postal 6128 succ. Centre-Ville, Montréal (Quebec) Canada, H3C 3J7, Tel: 514-343-5802; fax: 514-343-2210; *E-mail address*: luc.desgroseillers@umontreal.ca

**Key Words:** Neutral endopeptidase, gene targeting, sperm function, hypofertility

Submitted to *Molecular and Cellular Biology*, 2003

### 5.1 Abstract

Members of the M13 family of zinc metallo-endopeptidases have been shown to play critical roles in the metabolism of various neuropeptides and peptide hormones, and they have been identified as important therapeutic targets. Recently a mouse NL1 protein, a novel member of the family, has been identified and shown to be expressed mainly in the testis as a secreted protein. To define its physiological role(s), we used a gene targeting strategy to disrupt the endogenous murine *Nl1* gene by homologous recombination and generated *Nl1* mutant mice. The *Nl1*<sup>-/-</sup> mice are viable and develop normally, suggesting that zygotic expression of NL1 is not required for development. However, *Nl1*<sup>-/-</sup> males produce smaller litters than their wild type siblings indicating specific male fertility problems. Reduced fertility may be explained by two impaired processes: (i) decreased egg fertilization, and (ii) perturbed early development of fertilized eggs. These two phenotypes do not

result from gross anatomical modifications of the testis or from impaired spermatogenesis. Basic sperm parameters are also normal. Thus, our findings suggest that one of the roles of NL1 in mouse is related to sperm function and that NL1 modulates the processes of fertilization and early embryonic development *in vivo*.

## 5.2 Introduction

A wide variety of biologically active peptide hormones, neuropeptides and regulatory peptides are proteolytically activated or inactivated by members of zinc metalloproteases (Turner et al. 1985, Turner & Tanzawa 1997). The M13 family of zinc metalloproteases attracts much interest because all members are involved in the metabolism of several regulatory peptides of the mammalian nervous, cardiovascular, inflammatory and immune systems as well as in mineralization process (10,59,60,62). For these reasons, several members of this family of peptidases have been selected as targets for therapeutic intervention by inhibitors or pharmacological agents.

NL1 (also named SEP or NEP2) is the newest member of the M13 family of zinc metalloproteases (Ghaddar et al. 2000, Ikeda et al. 1999, Ouimet et al. 2000) that also includes Nephilysin (Neutral endopeptidase-24.11, NEP, CALLA) (reviewed in (Crine et al. 1997)), the Endothelin-Converting Enzymes 1 and 2 (ECE-1 and ECE-2) (reviewed in Turner (1997)), PHEX (formerly PEX; a Phosphate regulating gene with homologies to Endopeptidases on the X chromosome) (reviewed in Tenenhouse (1999)), the Kell blood group protein (reviewed in Marsh (1992)), and ECEL1/DINE (Endothelin-Converting Enzyme-Like 1/Damage-Induced Neuronal Endopeptidase) (Kiryu-Seo et al. 2000, Valdenaire et al. 1999, Valdenaire & Schweizer 2000). *Nl1* cDNA was simultaneously cloned by RT-PCR technology using degenerate oligonucleotide primers based on conserved sequence similarity between members of the family and mRNA isolated from mouse and rat testis or from *Ece-1*<sup>-/-</sup> embryos (Ghaddar et al. 2000, Ikeda et al. 1999, Ouimet et al. 2000). Finally, a clone coding for a putative human homologue has been obtained from a central nervous system (CNS) cDNA library (Bonvouloir et al. 2001).

As observed for other members of the M13 family of peptidases, the *Nl1* cDNA encodes a type II transmembrane glycoprotein encompassing a short N-terminal cytoplasmic tail, a single transmembrane domain and a large C-terminal extracellular region that contains

the zinc binding motif HEXXH. However, in contrast to the other members, NL1 can be expressed as both a membrane-bound and a soluble protein (Ikeda et al. 1999). Differential splicing introduces an additional exon that causes the insertion of a furin-like cleavage site at the C-terminal end of the transmembrane domain and the release of the protein into the extracellular space. Data from RT-PCR experiments suggest that the secreted form of NL1 is mainly found in testis whereas the membrane-bound form is expressed in the remaining expressing sites (Ikeda et al. 1999).

NL1 degrades a broad variety of small peptides. Oligopeptides shorter than 3 kDa and containing neutral bulky aliphatic or aromatic amino acid residues are preferred substrates. These characteristics are close to those described for Neprilysin. In fact, all peptide substrates identified so far for NL1 are also metabolized by Neprilysin (Carpentier et al. 2003, Ghaddar et al. 2000, Ikeda et al. 1999, Rose et al. 2002). Furthermore for many peptides, both enzymes cleave at the same amide bond. As expected, prototypical transition state inhibitors of Neprilysin such as phosphoramidon and thiorphan, or dual Neprilysin /ACE inhibitors such as omapatrilat also inhibit NL1 enzymatic activity (Rose et al. 2002, Ghaddar et al. 2000). NL1 is more closely related to Neprilysin with 55% amino acid identity than to any other members of the family.

Northern blot analyses using total RNA isolated from a variety of mouse tissues reveal strong expression of the *Nl1* gene in testis, while other tissues are negative (Ghaddar et al. 2000). By in situ hybridization, *Nl1* mRNA is detected in round and elongated spermatids in seminiferous tubules of mature testis at all spermiogenesis maturational stages, suggesting that the predominant role of NL1 in mouse may be related to sperm functions (Ghaddar et al. 2000). Nevertheless, using the more sensitive RT-PCR technology, a weak expression of *Nl1* mRNA is also detected in several other tissues such as heart, spleen, lungs, liver, kidney, intestine and brain (Ghaddar et al. 2000, Ikeda et al. 1999). In situ hybridization experiments on mouse sections also reveal the presence of *Nl1* mRNA in neurons of the ventroposterior regions of the brain as well as in the anterior and intermediate lobes of the pituitary gland (Facchinetti et al. 2003).

Although the NL1 enzymatic activity and tissular expression has been extensively studied, no physiological function has yet been identified for this protein. To gain more insights into its role(s) in mammals, we disrupted the *Nl1* gene by homologous recombination and produced a NL1 deficient mice. Here, we report the reduced fertility of *Nl1*<sup>-/-</sup> mutant

mouse males.

## 5.3 Materials and methods

### Gene targeting

The genomic organization of the *Nl1* gene was characterized by PCR amplification as done previously (Brizard et al. 2000). Briefly, several pairs of overlapping primers (Table I) spanning the entire *Nl1* cDNA sequence were used to amplify mouse 129/SvEv genomic DNA. Resulting PCR products were cloned and the intron-exon junctions sequenced using the Sanger dideoxynucleotide chain termination method (Sanger et al. 1992). To construct the targeting vector, two genomic fragments were PCR-amplified. The 5.6 kb 5'-end fragment and the 4.1 kb 3'-end fragment were amplified using the primer pairs: sense 5'-AGTGACATCTGTGCGACCACCACCCCAAGCTG-3' (underlined: *SalI* restriction site)/antisense 5'-ATGCGTCTCCAGTTCAGCACCTC-3', and sense 5'-CCAGGAGAAAAGGCTCGAGATGATGTCACTGC-3'/antisense 5'-CCAAAATGTAGTCTCGAGAGGGTAGCCAATC-3' (underlined: *XhoI* restriction site), respectively. The 5'-end fragment was digested with *SalI* and *HindIII* (which removes a 729 bp fragment at the 3' end of the amplification product) whereas the 3'-end fragment was digested with *XhoI*. The genomic fragments were cloned each side of the neomycin selection cassette in the PGKneo vector. A counterselection herpes simplex virus (HSV)-thymidine kinase (TK) cassette was inserted at the 3'-end of homology of the targeting vector (Belanger et al. 2003, Ma et al. 2003).

WW6 embryonic stem (ES) cells were electroporated with 25 µg of *SalI*-linearized targeting vector DNA as previously described and plated on neo<sup>r</sup> feeder layers (Belanger et al. 2003). After 24 h, selection for G418 (400 µg/ml; Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) and ganciclovir (2 µM; Syntex, Palo Alto, CA) was applied. ES cell clones recovered from drug selection were screened by Southern analysis. Positive clones were injected into MF1 blastocysts and transferred into pseudopregnant foster mothers to generate chimeras that were tested for germline transmission as previously described (Belanger et al. 2003, Charron et al. 1992, Giroux et al. 1999, Ma et al. 2003).

## Genotyping of ES cells and mice

Genomic DNA was isolated from ES cells or mouse tail biopsies. Extracts were treated with proteinase K, followed by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation (Hogan 1986). Purified DNA was digested with restriction enzymes as indicated in Fig. 1, fractionated by electrophoresis through 0.8% agarose gels, blotted onto a Hybond-NX membrane (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Québec, Canada), and hybridized by following procedures recommended by the supplier for either the 5' *Nl1* probe (the first 733 bp of the *Nl1* cDNA sequence - nucleotides 332 to 1064 from Genebank accession number AF176569) or the 3' *Nl1* probe (the last 1000 bp of the *Nl1* cDNA - nucleotide 1925 to 2925 from Genebank accession number AF176569).

## Northern blot analysis

Total RNA from testes was isolated using the RNeasy column kit (Qiagen, Chatsworth, CA). Equal amounts (12.5 µg) of total RNA isolated from *Nl1*<sup>+/+</sup>, *Nl1*<sup>+/-</sup> and *Nl1*<sup>-/-</sup> specimens were electrophoresed on a 1.5% formaldehyde agarose gel, transferred onto Hybond N+ blotting membrane, and hybridized with the [<sup>32</sup>P]-labelled 3' cDNA probe described above. The 645 bp β-actin fragment corresponding to nucleotides 333 to 978 of the coding sequence (Genebank accession number NM<sub>0</sub>07393) was used as quantitative control. Samples from 3 *Nl1*<sup>+/+</sup>, 4 *Nl1*<sup>+/-</sup> and 4 *Nl1*<sup>-/-</sup> adult mice aged between 3 to 6 months were analyzed.

## Histology

Testis were fixed in 4% paraformaldehyde for 16 hours at 4°C and embedded in paraffin wax as previously described (Jaffe et al. 1990). Specimens were sectioned at 5 µm and stained with hematoxylin and eosin for general histological examination. Sections from 4 wild type and 5 *Nl1*<sup>-/-</sup> males aged from 3 to 7 months were analyzed.

## Sperm motility analysis

Spermatozoa were collected from the caudal epididymides of 6 wild type and 6 *Nl1*<sup>-/-</sup> males in HMB fertilization medium (Visconti et al. 1995), and incubated for 30 minutes

in 5% CO<sub>2</sub>, 90% O<sub>2</sub>/air. Motility parameters were measured using the Hamilton-Thorne IVOS computer assisted digital analyzer (version 7.4G; Beverly, MA, USA). The following parameters were measured: (i) average path velocity (VAP, mm/s, velocity along the average path of the spermatozoon), (ii) straight line velocity (VSL, mm/s, calculated from the straight line distance between the start and the end of the observed track), (iii) curvilinear velocity (VCL, mm/s, the total distance divided by time), (iv) lateral head displacement (ALH, mm, the deviation of the head from the mean head trajectory), (v) beat cross frequency (BCF, Hz, beats per second, the number of times the spermatozoon head crosses the head trajectory per seconds), (vi) linearity (LIN, calculated as VSL/ VCL\*100), and (vii) straightness (STR, calculated as VSL/VAP\*100). The settings for the Ceros analyzer were: 30 frames captured for analysis at 60 Hz (frame rate 0.5), minimum cell size was 4 pixels, progressive cells were defined with VAP>50μ/s and STR>50%, slow cells were defined by a VAP cutoff of 10μm/s.

### Blastocyst analysis

F1 *Nl1*<sup>+/-</sup> females (aged from 2 to 5 months) were mated with wild type or mutant males (aged from 2 to 5 months). Three days following the detection of a copulatory plug, females were sacrificed and embryos were recovered in PBS from uterine horns. Embryos were counted and photographed for microscopic analysis. A total of 5 wild type and 5 *Nl1*<sup>-/-</sup> males were mated with 9 and 11 females, respectively.

### *In vivo* fertilization analysis

32 C57Bl/6XCBA F1 females aged between 24 to 28 days were superovulated by intraperitoneal injection of 5 U of PMS (Intervet, Whitby, Ontario, Canada) at 1:00 pm followed by 10 U of hCG (Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, Ontario, Canada) 46 hours later. The evening after the second injection, superovulated females were housed with single *Nl1*<sup>+/+</sup> or *Nl1*<sup>-/-</sup> males. The next morning, males were removed and mating was confirmed by detection of copulatory plug. 0.75 day post coitum (pc), females were killed and embryos were collected from the ampulla of oviduct in M2 medium (Hogan 1986), and digested with 300 μg/ml hyaluronidase (embryo-tested, Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, Ontario, Canada). Embryos were first washed twice in M2 medium, then twice in M16 medium

before incubation in M16 medium at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 4 days. Embryo development was followed daily by microscopic inspection. Litters from the mating of eighteen females with 5 different wild type males and from 14 females with 5 different *Nl1*<sup>-/-</sup> mutant males were recovered. Males from both genotypes were age-matched.

## 5.4 Results

### 5.4.1 Generation of a *Nl1* mutant allele in ES cells

As a first step toward the generation of the targeting vector for *Nl1* genetic ablation, the structure of the murine *Nl1* gene was defined. Based on the high conservation of the genomic organization of the members of the Neprilysin family, genomic DNA was PCR-amplified using several primer pairs derived from the *Nl1* cDNA sequence. Resulting PCR products were sequenced and the intron-exon junctions were determined (Table II). The mouse *Nl1* gene is divided into 24 small exons distributed over at least 27 kb of genomic DNA (Figure 5.1A). The size of exons varied from 60 to 391 bp whereas the size of introns ranged from 75 bp to over 8 kb. The ATG initiation start site was located in the second exon, the protein convertase cleavage site in the third exon whereas the HEITH motif, signature of zinc-metallopeptidases, was found in exon 19. The third exon was alternatively spliced in the membrane-bound form of NL1 (Raharjo et al. 2001). The positions of the intron-exon junctions were mostly conserved between the *Nl1* and *Neprilysin* genes (D'Adamio et al. 1989).

To construct the targeting vector designed to ablate the mouse *Nl1* gene in ES cells by homologous recombination, two noncontiguous DNA fragments from the *Nl1* gene were PCR-amplified and cloned each side of the PGKneo cassette. A cDNA cassette coding for the viral thymidine kinase was included at the 3' end of the targeting vector for negative selection against random integration of the vector. The *Nl1* 5'- end (4.9 kb) and 3'- end (4.1 kb) fragments encompass regions that include exons 4 to 9 and exons 11 to 16, respectively. An intervening region of 823 bp was omitted between the 5' and 3' fragments. Therefore, integration of the vector into the *Nl1* gene locus by homologous recombination deletes exon 10 and part of exon 11 modifying the open reading frame of the gene. The vector was electroporated into ES cells and dual positive and negative

Table 5.1: Oligonucleotide sequences used for PCR amplification of genomic DNA\*

Sense primers	Reverse primers
5'-CAGCACCGTACCTCACACCC-3'	5'-CTGGTCTCTGCTCTCAATGCTG-3'
5'-TCTTAACTAGCCTGCTACACTTCTCC-3'	5'-TGCTATCACACAGCTTGGGGTG-3'
5'-TGCACCACCCCAAGCTGTGTGATAGC-3'	5'-TGGGATCACGTGGTGCCTCAGCC-3'
5'-TCGAGGAACCCCTGTGAAAATTCTACC-3'	5'-TCGATGAGGACCCGCCTGTTGAACTG-3'
5'-AGTTCACCAGGCGGGTCCTCATCG-3'	5'-AGATGCGACTCCAGTTCAGCACCTCC-3'
5'-ACTATGCTTAGGAAAGACCAGAACC-3'	5'-TCATCTGGCAACAGCTCGACTTCC-3'
5'-TTGTCTTCTGTGGAAGTCGAGCTGTTCC-3'	5'-TTGACATAGCTGACACACTCTCGCC-3'
5'-TGGCGAGAGTGTGTCAGCTATGTCAAC-3'	5'-TCTTCCAAAATGTAGTCAGGGTAGC-3'
5'-TGGCTACCCTGACTACATTTTGAAG-3'	5'-AGGCTCCTCTGGGCATTGTTCTTG-3'
5'-ACTTCAGAACCCTCAAGAACAATGC-3'	5'-TAGCCCCCAAAATTCAAGGAC-3'
5'-ATTCTCCAGCCGCCCTTCTTCAGC-3'	5'-ACCTCCGTTGTCCGCAATGTTCTCC-3'
5'-AGAACATTGCCGACAACGGAGG-3'	5'-TCCGTCTTGATGGACTGGACGG-3'
5'-AGTTCGCCGTCCAGTCCATCAAGACG-3'	5'-ACCTGCACATCTCTGCCAGCTAC-3'

\*Each line correspond to a primer pair

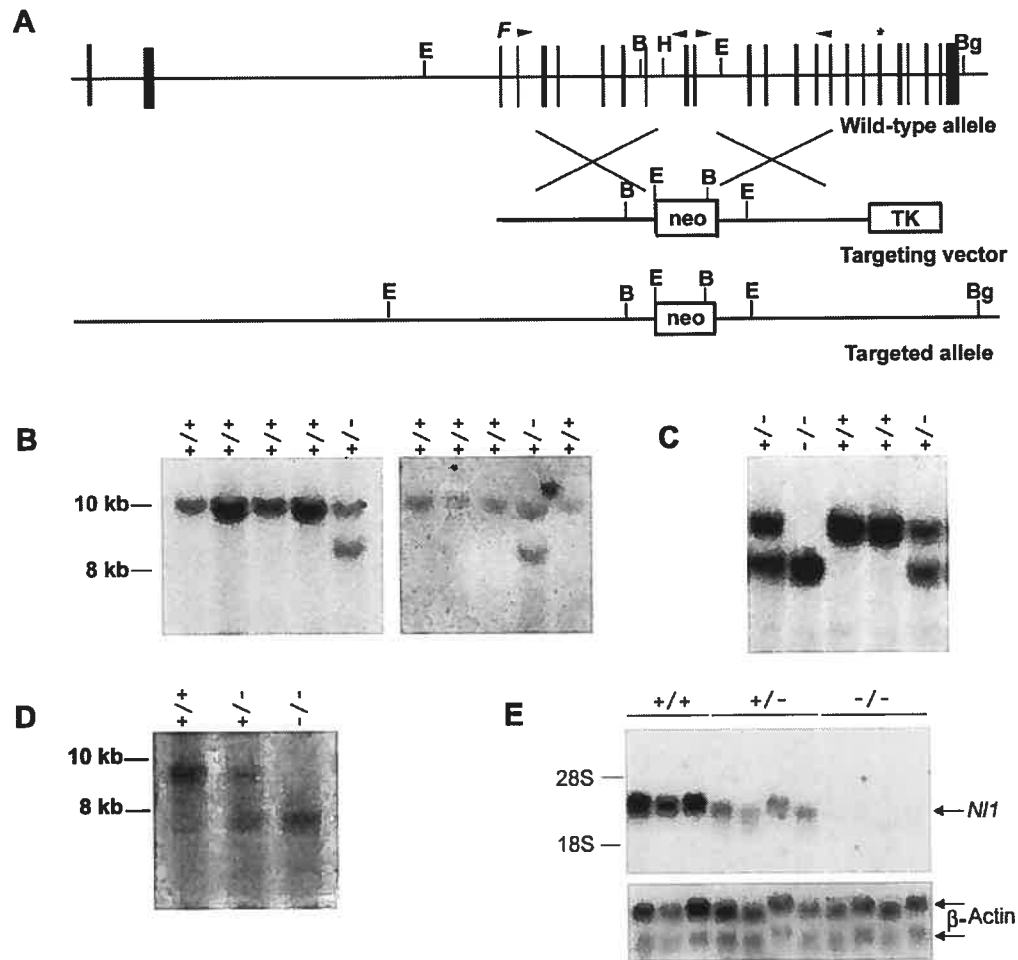


Table 5.2: Exon-intron boundaries of the murine *Nl1* gene

Exon Number	Intron 3'-acceptor site	5' end	Exon Size (kb)	3'end	Intron 5'-donor site	Intron Size (kb)
1	undetermined	Undetermined	-(>0,141)-	GCACCAG	gtaggatt...	1.7
2	...ccctctacacag	GGTCCCC	-(0.315)-	AGCATAG	gtgagcaagga...	>8
3*	...tttctcccag	GGAAGCA	-(0.069)-	AAACGAG	gtagccttacc...	0.55
4	...ctgttctccag	CCCTCAG	-(0.060)-	ATAGCAG	gtgagcttctcc...	0.84
5	...ccttaatacaag	CTGCCAG	-(0.161)-	CTCAAAG	gtgaagagtgg...	0.28
6	...ctgccacag	GGGTGCT	-(0.081)-	AACCAAA	gtgagtagagcc...	1.24
7	...ccccttccag	GTGTGAT	-(0,096)-	ACCATGG	gtgagtatcgg...	0.46
8	...aactcctcag	GCCTCAA	-(0.119)-	TCATCTAC	gtatgcaatgcct...	0.52
9	...gtgtgttccag	ATAGACC	-(0.065)-	CCACAAG	gtaagcaggg...	1.18
10	...ctttggccag	GTACGGA	-(0.075)-	GGCCAAC	gtgaggcgggg...	0.07
11	...ccccacacag	GCCACAG	-(0.090)-	TCTGAAG	gtgagaccaggca...	1.66
12	...accctctacag	GGGTTTA	-(0.137)-	CAGCACG	gtgagcccaggg...	0.28
13	...gctacctctag	GACCATG	-(0.094)-	CCGCAAG	gtgagcgcac...	0.81
14	...aacacaccag	GCGCTGT	-(0.129)-	GAGCACG	gtgcgtatcctga...	0.51
15	...gcattccccag	GTCAGAG	-(0.099)-	GGAAAAG	gtgggcaagcc...	0.36
16	...ctccactcag	GCCATGA	-(0.084)-	CTCCAGT	gtgcgtacctcc...	0.39
17	...cttctcatag	TTGACTT	-(0.104)-	AGAATCT	gtgagtaggatgg...	0.30
18	...atttaccacag	CTGGATC	-(0.059)-	CAGATCG	gtaaggtccacc...	0.34
19	...gtgggggacag	TCTTTCC	-(0.120)-	GATAATG	gtaaagcagca...	0.48
20	...tcttgacacag	GTGAACG	-(0.134)-	CCAGAAT	gtgagcatgtc...	0.11
21	...tctttttatgacag	GTGAACG	-(0.066)-	ATACAAG	gtgggccccta...	0.46
22	...tgctgcagag	GCTTACC	-(0.096)-	TGCCCAG	gtaatccctag...	0.27
23	...atgcatctccag	GTGTGGT	-(0.077)-	AGTACAG	gcaagtgtgc...	0.09
24	...ggtctacag	GGTGCTG	-(≥0.391)-	Undetermined		
consensus	(y) <sub>12</sub> n c a g	N		AG	g t ...	

\* Exon 3 is differentially spliced to generate the membrane bound and secreted forms of NL1.

selections were applied to obtain clones that were resistant to G418 and insensitive to ganciclovir. Homologous recombination events were detected by Southern blot analysis. Genomic DNA from all recovered clones was digested with *Bgl*II and *Bam*HI restriction enzymes and membranes were hybridized with a probe generated from the *Nl1* cDNA sequence flanking the 3' -end fragment of the targeting vector (Figure 5.1B) Digestion of wild type and *Nl1* mutant alleles generated fragments of 9.6 and 8.1 kb, respectively. A targeting event was detected in 2 out of 480 ES cell clones analyzed.



**Figure 5.1: Disruption of the *Nl1* gene.** (A) Schematic representation of the wild type mouse *Nl1* gene, the targeting vector and the targeted *Nl1* allele. Vertical black boxes represent exons. The position of the *neo* resistance gene (*neo*) and the *HSV-TK* gene (*TK*) are shown. The *neo* cassette is flanked at its 5'- and 3'-ends by 4.9 kb and 4.1 kb of *Nl1* genomic sequence, respectively. *F* indicates the position of the convertase cleavage site, and the asterisk (\*) shows the position of the *NL1* active site. *B*, *Bam*HI; *Bg*, *Bgl*II; *H*, *Hind*III; *E*, *Eco*RI restriction sites. Arrowheads indicate the position of oligonucleotide primers used to PCR-amplify genomic DNA to generate the vector. (B,C) Southern blot analyses of DNA isolated from ES cell clones (B) or mouse tails (C). Genomic DNA was digested with *Bgl*II and *Bam*HI, transferred to nylon membranes and the blots were hybridized with a *Nl1* probe located 3' of the targeting vector sequence (described in Materials and Methods). Fragments from the wild type (+/+; 9.6 kb) and mutated (-/-; 8.1 kb) alleles are detected. (D) Southern blot analysis of genomic DNA digested with *Eco*RI, transferred to nylon membranes and hybridized with a *nl* probe located 5' of the targeting vector sequence (described in Materials and Methods). Fragments from the wild type (+/+; 8.9 kb) and mutated (-/-; 7.3 kb) alleles are visible. (E) Northern blot analysis of total RNA (12.5  $\mu$ g) isolated from testis of 3 wild-type, 4 *Nl1*<sup>+/-</sup> and 4 *Nl1*<sup>-/-</sup> mice. RNA was hybridized with either the 3'-derived *Nl1* or *actin* probes (see materials and methods).

Table 5.3: NL1 genotypes of the F2 progeny from F1 heterozygote intercrosses.

Genotype	No of F2 mice per genotype	Expected mendelian values
+/+	20(20,6%)	25%
+/-	55(56,7%)	50%
-/-	22(22,7%)	25%

#### 5.4.2 Generation of NL1 mutant mice and Mendelian distribution of offsprings

Targeting ES cell clones were injected into mouse MF1 blastocysts and chimeric transmitters were obtained. Chimeric males were bred either with MF1 females or with 129/SvEv females to establish the mutation in an inbred background. All the subsequent phenotypical analyses were done with animals from the outbred background. Heterozygous mice developed normally and showed no obvious abnormalities. To determine the effect of the *Nl1* mutation in homozygous animals, heterozygous intercrosses were performed and offspring were analyzed. Progeny from heterozygous intercrosses were genotyped and *Nl1*<sup>-/-</sup> mice were recovered (Figure 5.1C). Table 5.3 shows that the incidence of *Nl1*<sup>+/+</sup>, *Nl1*<sup>+/-</sup> and *Nl1*<sup>-/-</sup> genotypes corresponds to a Mendelian distribution, as expected for random allele segregation and inheritance.

Mice were further genotyped to test whether integration at the 5'-end of the neo cassette also occurred by homologous recombination (Figure 5.1D). Digestion of genomic DNA by *EcoRI* enzyme and hybridization of the membrane with a 5' probe generated fragments of 8.9 kb for the wild type allele and 7.3 kb for the mutated allele in *Nl1*<sup>+/-</sup> mice but only the 7.3 kb fragment in *Nl1*<sup>-/-</sup> mice. Altogether, these results indicate that the vector was integrated by homologous recombination and exclude any gross rearrangement at either end of the targeting site.

As a mean to monitor NL1 expression in mutant mice, Northern blot analyses were performed with RNA isolated from testis. As expected, no *Nl1* mRNA was detected in *Nl1*<sup>-/-</sup> specimens (Figure 5.1E). The levels of *Nl1* mRNA were reduced by about half in heterozygous mice when compared to *Nl1* expression detected in wild type mice (Figure

Table 5.4: Reduced fertility of male  $Nl1^{-/-}$  mice.

Parents		n	Average litter size
F	M		
+/-	x +/+	18	8.9
+/-	x +/-	20	7.35
+/-	x -/-	21	4.7*
+/+	x +/-	9	7.44
-/-	x +/-	11	7.45
+/+	x +/+	7	10.1

n=number of productive mating.  
 \* $p=0.0004$  for variance between -/- and +/+ males (one way ANOVA)

5.1E). These results clearly demonstrated that no  $Nl1$  expression occurs in  $Nl1^{-/-}$  mice indicating that the mutation generated is a null allele.

### 5.4.3 $Nl1^{-/-}$ male mice show reduced fertility

Mutant  $Nl1^{-/-}$  mice did not exhibit obvious physical or behavioral abnormality. Therefore, since NL1 is predominantly expressed in the round and elongated spermatids, we first tested whether disruption of the  $Nl1$  gene impairs male fertility. Fertility of  $Nl1^{+/+}$ ,  $Nl1^{+/-}$  and  $Nl1^{-/-}$  male and female mice was compared using different combinations of intercrosses (Table 5.4). First, heterozygous  $Nl1^{+/-}$  females were crossed with wild type, heterozygous or homozygous mutant males. Wild type males produced an average of 8.9 pups per litter while  $Nl1^{-/-}$  males generated only 4.7 pups per litter. Intercrosses with  $Nl1^{+/-}$  males produced an intermediate average of 7.4 pups per litter. Litter sizes are statistically different. About 20% of the  $Nl1^{-/-}$  males did not produce any progeny when mated with  $Nl1^{+/-}$  females, even if they were housed together for several months. These male were not included in the calculation of the average litter size in Table IV. If included, the average litter size would have been smaller. These results suggest that the loss of NL1 function results in male hypofertility.

We also tested female fertility. Wild type, heterozygous and homozygous mutant females were bred with heterozygous  $Nl1^{+/-}$  males. The average litter size obtained for matings between  $Nl1^{+/-}$  males and either  $Nl1^{-/-}$  or  $Nl1^{+/+}$  females was 7.4 and 7.5, respectively (Table IV), which was equivalent to the values from heterozygous male and female intercrosses, indicating that fertility is not affected in female mice. The small difference in the litter size between wild type breedings (10.1) and crosses between wild-type males and  $Nl1^{+/-}$  females (8.9) was not statistically significant ( $p=0,9348$ ).

#### 5.4.4 Testis development and spermatozoa parameters are normal

To determine whether the reduced fertility of  $Nl1^{-/-}$  mice resulted from a spermatogenic defect, a microscopic analysis of the seminiferous tubules was conducted. Testis sections from 4 wild type and 5  $Nl1^{-/-}$  males showing various stages of the spermatogenic cycle were stained with hematoxylin and eosin. No major difference was observed and the morphology of the tubules as well as the relative numbers of spermatogonia, spermatocytes and round and elongated spermatids were similar between control and  $Nl1^{-/-}$  mice (Figure 5.2). Histological characteristics of testes from mutant males that were found infertile according to absence of progeny production were also normal. Overall, the testis morphology of  $Nl1^{-/-}$  mice was similar to that of wild type littermates.

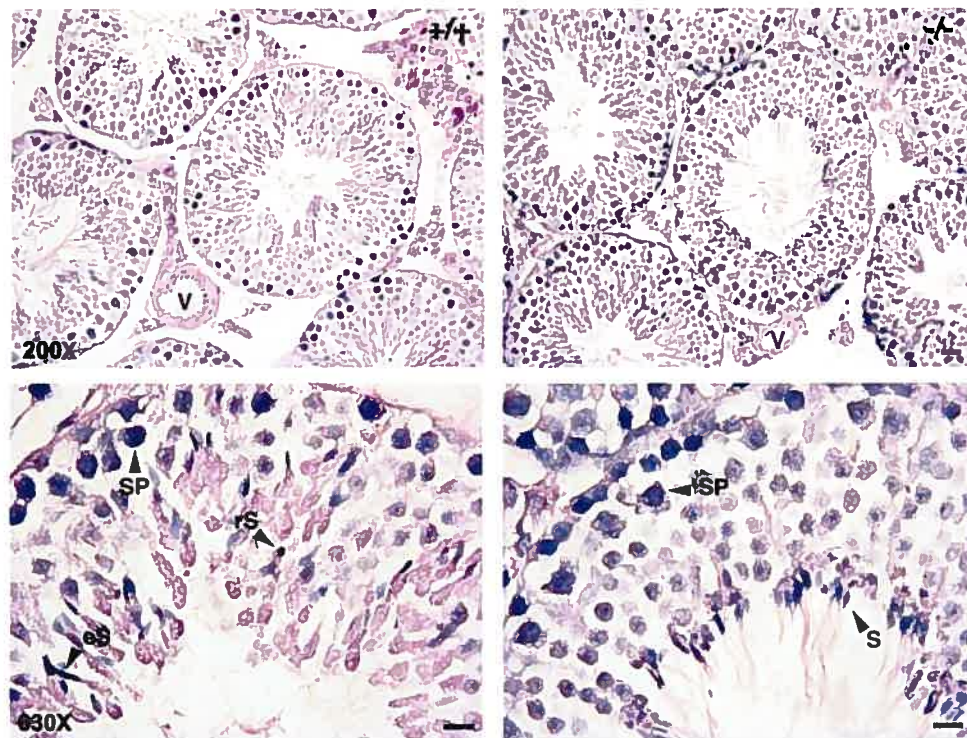


Figure 5.2: **Histological analysis of testis from  $Nl1^{-/-}$  and  $Nl1^{+/+}$  mice.** Hematoxylin and eosin staining of thin sections from control (+/+) and NL1 null mice (-/-). Arrowheads point at some round spermatid (rS), elongated spermatids (eS), pachytene spermatocytes (SP) and spermatozoon (S). V, blood vessel. Bar=10  $\mu$ m

We also compared the motility parameters of spermatozoa collected from wild type and  $Nl1^{-/-}$  males. Although most motility parameters of  $Nl1^{-/-}$  spermatozoa were slightly lower than those of  $Nl1^{+/+}$  spermatozoa, the difference was not statistically significant (Table 5.4).

#### 5.4.5 $Nl1$ mutation reduces both sperm fertilizing capacity and early embryonic development

No morphological anomaly appears responsible for the reduced litter size phenotype observed with  $Nl1^{-/-}$  males. To determine if defects in sperm fertilization ability and/or early embryonic development may underlie the phenotype, outbred F1  $Nl1^{+/-}$  females were mated with either wild type or  $Nl1^{-/-}$  males, and embryos were collected at 3.5 days pc. Microscopic examinations revealed that 74% of the embryos issued from crosses with  $Nl1^{+/+}$  males were in the late morulae or blastocyst stage as compared to 33% of those fertilized by  $Nl1^{-/-}$  males (Table VI, and (Figure 5.3). This significant difference (Chi square test  $p < 0.0001$ ) is very close to that observed in the litter size suggesting that defects due to the absence of NL1 appear early in the course of fertilization/embryogenesis and that early development is perturbed when sperm originates from  $Nl1^{-/-}$  mice.



Table 5.5: Comparison of sperm motility parameters from wild type and  $Nl1^{-/-}$  mice

Parameters	Genotype		$\rho$
	+/+	-/-	
% Motile sperm	87.2 $\pm$ 6.7	73.3 $\pm$ 10.0	0.1184
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	100.1 $\pm$ 4.6	86.8 $\pm$ 7.6	0.1642
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	64.2 $\pm$ 3.6	55.5 $\pm$ 4.3	0.155
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	186.9 $\pm$ 7.2	161.3 $\pm$ 12.9	0.1147
ALH ( $\mu\text{m}$ )	9.8 $\pm$ 0.1	9.42 $\pm$ 0.2	0.0903
BCF (beat/s)	24.3 $\pm$ 0.9	25.1 $\pm$ 1.2	0.6081
STR	58.8 $\pm$ 0.70	60.2 $\pm$ 0.8	0.2368
Linearity	32.67 $\pm$ 0.8	33.0 $\pm$ 0.5	0.7342
Total count	1109 $\pm$ 198	828 $\pm$ 181	-

Seven mice of each genotype were studied. 6 field per mouse were analyzed. The parameters examined are defined in materials and methods. Values represent the mean and SD of determinations on seven mice of each genotypes.

Table 5.6: Fertilizing capacity of  $Nl1^{-/-}$  males and early embryo development

Male	n	Egg harvest	Number of embryos at 3.5 days after mating						
			1	2	3	4	M	B	Dead
+/+	9	88	1(1%)	2(2%)	1(1%)	4(5%)	22(25%)	43(49%)	15(17%)
-/-	11	80	3(4%)	3(4%)	3(5%)	0	14(17%)	13(16%)	44(54%)

n (total number of mated  $Nl1^{+/-}$  females).

Each column represents the number of embryos in each developing stages

(1, 2, 3, 4 cells, M(Morulae) and B(blastocyst)) when collected at 3.5 days post conception. Chi square ( $\chi^2$ ) test:  $p < 0.0001$

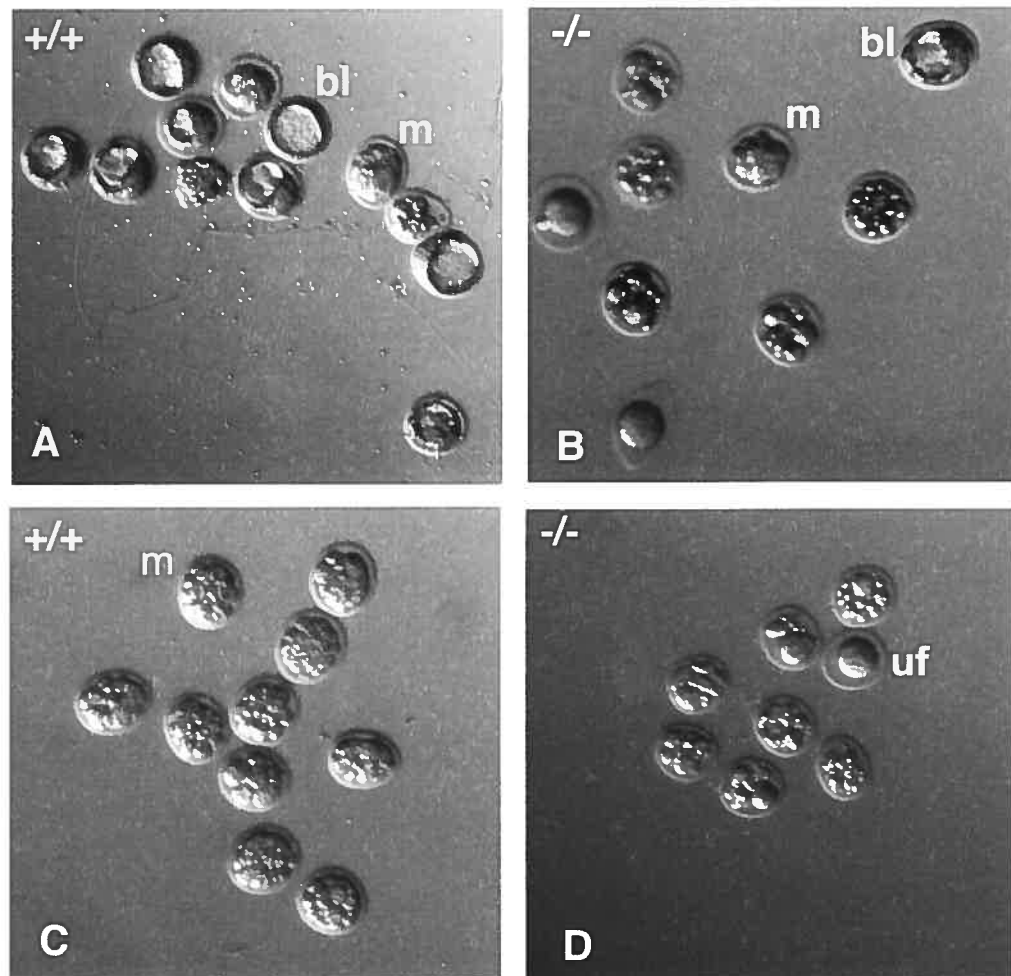


Figure 5.3: **Embryos recovery at 3.5 days of gestation.** Four representative litters from  $Nl1^{+/-}$  females fertilized by  $Nl1^{-/-}$  (A, C) or  $Nl1^{+/+}$  (B, D) males. Some morulae (m), blastocyst (bl) or unfertilized (uf) eggs are indicated. A larger proportion of embryos are well developed when fertilized by  $Nl1^{+/+}$  males as compared to those fertilized by  $Nl1^{-/-}$  males. A total of 5 knockout or wild type males were mated with 11 and 9 females, respectively. Embryos were collected at 3.5 days post conception (see material and methods). Magnification: 50X

To determine whether fertilization was normal and define at which embryonic stage development was impaired, a time course experiment was performed. Superovulated C57Bl/6xCBA F1 virgin females were mated with either wild type or  $Nl1^{-/-}$  males. Embryos were collected around 0.75 day pc and their development was pursued in culture for 4 days. Embryo development was followed by daily microscopic observations. Around 1.0 day pc, 62% of the embryos collected from matings with wild type males were fertilized and had divided. In contrast, only 38% of the embryos obtained from matings with  $Nl1^{-/-}$  males had reached cell division (Figure 5.4). These results indicated that the fertilization rate was reduced by 39% when the sperm originates from  $Nl1^{-/-}$  males. However, two days after fertilization, the  $Nl1^{-/-}$  sperm fertilization ability was only decreased by 15% when compared to wild type sperm suggesting that in addition to fertilization defects, the absence of NL1 causes a delay in cell division (s). At 3.5 and 4.5 days pc, the number of morula and blastocysts generated from fertilization with  $Nl1^{-/-}$  sperm was 30% lower than that obtained from wild type sperm. These results suggest that the  $Nl1$  mutation reduces the ability of fertilized eggs to develop normally. Differences in the distribution of embryos resulting from  $Nl1^{-/-}$  and  $Nl1^{+/+}$  males mated with  $Nl1^{+/-}$  females are statistically significant. We cannot rule out the additional possibility that early processes of pre-implantation development may also be perturbed by the mutation. Altogether, these anomalies explain the reduced litter size observed in matings with  $Nl1^{-/-}$  males since the differences closely reflect the variation detected in the litter size.

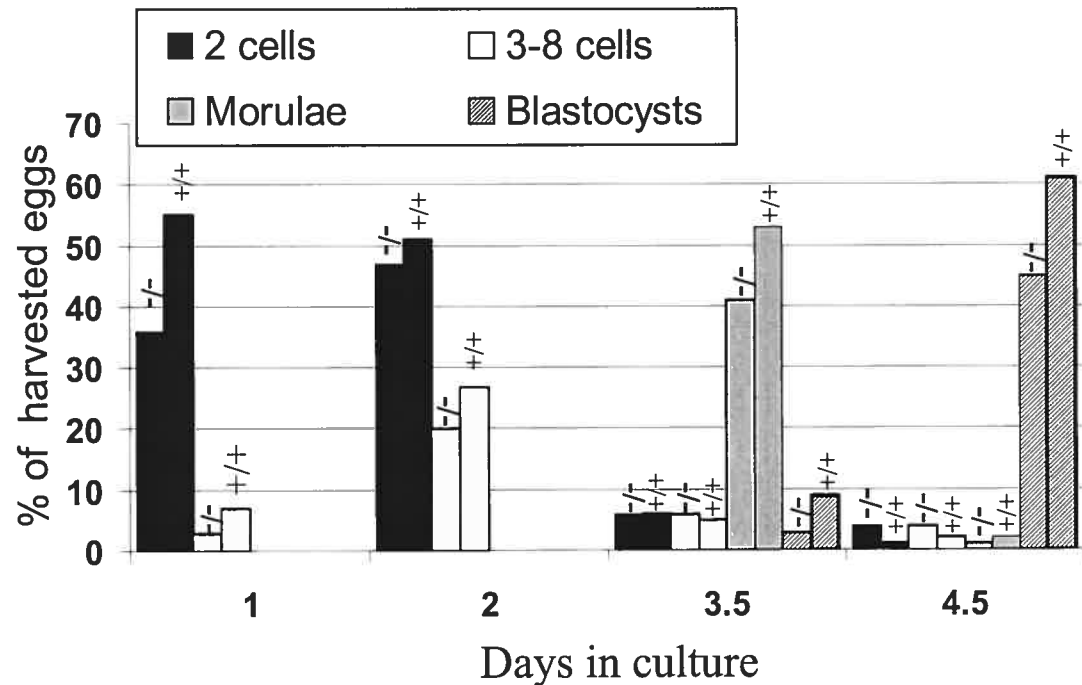


Figure 5.4: *In vivo* fertilization analysis. C57Bl/6xCBA F1 females were superovulated and mated with *Nl1*<sup>+/+</sup> or *Nl1*<sup>-/-</sup> males. Embryos were collected at 0.75 day post conception and cultured *in vitro* for 4 days. Embryo development was followed by daily microscopic analysis. Bars labelled -/- indicate eggs fertilized by *Nl1*<sup>-/-</sup> males while bars with +/+ sign correspond to eggs fertilized by wild type males. Chi square ( $\chi^2$ ) and Jonkheere-Terpstra (JT) analyses revealed that the distribution of developing embryos is statistically different at each day (Day 1:  $\chi^2$   $p < 0.0001$  and JT  $p < 0.0001$ . Day 2:  $\chi^2$   $p < 0.0024$  and JT  $p < 0.0003$ . Day 3.5:  $\chi^2$   $p < 0.0001$  and JT  $p < 0.0001$ . Day 4.5:  $\chi^2$   $p < 0.0001$  and JT  $p < 0.0001$ ).

## 5.5 Discussion

In this study, we have disrupted the *Nl1* gene by homologous recombination and generated *Nl1*<sup>-/-</sup> mice. The mutation prevents the synthesis of both the transmembrane and secreted forms of NL1 protein. Although our anti-NL1 antibodies did not allow us to directly test whether the protein is present or not in the mutant mice, we demonstrated that *Nl1* mRNA is not expressed in testis from *Nl1*<sup>-/-</sup> mice, supporting the notion that the protein is not produced. This result is in concordance with the fact that the designed targeting vector adds a new polyadenylation site after exon 9 interrupting transcription of the *Nl1* gene. Matings of heterozygous mice produce the expected Mendelian ratio of wild type, heterozygous and homozygous mutant mice, and *Nl1*<sup>-/-</sup> mice are viable and anatomically normal. Thus, zygotic expression of NL1 does not seem to be required for mouse development. It is consistent with our recent in situ hybridization studies showing that *Nl1* mRNA is not expressed in mice from embryonic day 12 to 17 (Carpentier et al. 2003) in whole mouse embryos. Targeted disruption of other members of the M13 family has been reported. While ablation of the Neprilysin gene only results in a mild phenotype, disruption of the ECE-1, ECEL1 or Phex genes causes severe developmental defects (Lu et al. 1995, Rowe 1998, Schweizer et al. 1999, Yanagisawa et al. 2000, Yanagisawa et al. 1998).

We showed that NL1 plays a significant role in male fertility while it is not essential for the fertility of females. This result is consistent with the expression of *Nl1* mRNA in mouse tissues, which is strong in germ cells of mature testis but weak in ovaries (Ikeda et al. 1999). The expressivity of the fertility impairment amongst *Nl1*<sup>-/-</sup> males is variable. For instance, 20% of the *Nl1*<sup>-/-</sup> outbred males do not produce offspring. In contrast, about 10% of the *Nl1*<sup>-/-</sup> outbred males give birth to litters of roughly the wild type size. The variable phenotype in *Nl1*<sup>-/-</sup> males is not unprecedented and most probably reflects the segregation of genetic modifiers on the mosaic genetic background as was shown for at least two other mutations in sperm (Nayernia et al. 2002, Pearse et al. 1997). For instance, mice bearing mutations in either sprm-1 transcription factor (Pearse et al. 1997) or the smcp mitochondrial protein (Nayernia et al. 2002) lead to males sterility only when bred on the 129/sv line. Moreover, males deficient in sperm protein SED1 (Ensslin & Shur 2003) show a similar variation in litter size (varying from no pups to litter size

approaching the normal size) in an outbred background. Testing this possibility, however, must await the characterization of *Nl1*<sup>-/-</sup> males fertility phenotype in different inbred genetic backgrounds.

### 5.5.1 NL1 modulates two different processes related to fertility

Our results suggest a role for NL1 in two developmental processes: egg fertilization and early embryo development. First, spermatozoa from *Nl1*<sup>-/-</sup> mice appear less efficient than those produced by *Nl1*<sup>+/+</sup> mice for egg fertilization despite normal sperm motility parameters and no major morphological defect of the testis. The fact that NL1 is mostly expressed as a secreted protein in testis is consistent with a role in a step that occurs outside of the testis. Accordingly, a Neprilysin-like activity has been detected in sperm of several species (Boettger et al. 1993, Diaz-Perez & Meizel 1992, Heder et al. 1994, Siems et al. 2003) although such an activity has not been confirmed by others (Correa et al. 2000, Fernandez et al. 2002). Generation of specific inhibitors and/or antibodies will be required to determine whether this activity is due to the presence of NL1. It is thus possible that the *Nl1* phenotype is linked to defects in sperm maturation, capacitation, the acrosome reaction or sperm-related processes during fertilization.

Several proteases are known to modulate the different steps of sperm maturation that lead to fertilization (Lee & Wei 1994). Some of these are released during the acrosomal reaction and play important roles in the fertilization process itself (Lee & Wei 1994, Snell & White 1996). Consistently, several bioactive peptides are either co-expressed with NL1 in testicular germ cells, packaged in sperm acrosome and/or released during the acrosomal reaction (Ayer-Lelievre et al. 1988, Breyer et al. 1996, Hannibal & Fahrenkrug 1995, Kew et al. 1990). Among them, the enkephalins that have been shown to be stored in the acrosome of human, hamster and sheep spermatozoa and released following acrosomal reaction (Kew et al. 1990), decrease mouse fertility when overexpressed in testis of transgenic mice (O'Hara et al. 1994). These results support the notion that the levels of neuropeptide are critical for proper fertilization processes. Since some of these bioactive peptides are known substrates of NL1 *in vitro*, the *Nl1* phenotype could be partly explained by a lack of their regulation *in vivo*.

Second, a large proportion of eggs do not develop normally when fertilized with mutant

spermatozoa. We must emphasize that defects in embryo development are not likely to be due to the lack of zygotic Nl1 expression since we did not observe selective elimination of *Nl1*<sup>-/-</sup> offspring. The phenotype appears to be associated to the absence of NL1 in sperm. Therefore, through its action on active peptides, it is possible that NL1 may regulate sperm-dependent spatial patterning of the early mouse embryo, a sperm-activated block to polyspermy and/or proteolytic activation of morphogens.

### 5.5.2 NL1 is downstream of the protein convertase PC4

Cleavage and release into the extracellular fluids of the secreted testicular form of NL1 is accomplished by member(s) of the prohormone convertase (PC) family (Ghaddar et al. 2000). In testis, the nature of the PC that cleaves NL1 remains to be defined. However, a good candidate is the prohormone convertase PC4 since it is abundantly and specifically expressed in spermatocytes and round spermatids of rodents (Nakayama et al. 1992). Moreover, PC4 homozygous mutant males show reduced fertility in the absence of any evidence of spermatogenic abnormality (Mbikay et al. 1997), similarly to what we observed in NL1 deficient mice. Interestingly, reduced fertility of *Pc4*<sup>-/-</sup> males is a combination of both reduced efficiency in egg fertilization and abnormal embryo development after fertilization. Therefore, it is possible that some of the phenotypes attributed to *Pc4* gene ablation are directly related to the failure of *Pc4* deficient mice to properly process NL1, the lack of secreted NL1 protein in *Pc4*<sup>-/-</sup> mice causing the phenotypes. Analysis of NL1 maturation in *Pc4*<sup>-/-</sup> mice would help answering this question.

The *Pc4* phenotype is broader than that observed in *Nl1*<sup>-/-</sup> mice suggesting that NL1 acts downstream of PC4. For instance, the hypofertility observed in males is more important in *Pc4* mutants than in *Nl1* mutant mice. Second, *Pc4*<sup>-/-</sup> females are less fertile while the fertility of *Nl1*<sup>-/-</sup> females appears normal. Finally, in intercrosses of heterozygous mutant mice, the recovery of *Pc4*<sup>-/-</sup> mutant animals was reduced conversely to what was observed for the transmission of the Nl1 mutation. These observations indicate that NL1 is not the unique substrate for PC4 and that the absence of maturation of other bioactive polypeptide(s) may be responsible for the additional phenotypes detected in *Pc4* mutants. Alternatively, the differences can be explained by variations in the genetic background in which the two studies have been conducted (C57BL/6J vs outbred).

### 5.5.3 Putative functional compensation by other peptidases

The relatively mild phenotype observed after genetic ablation of the *Nl1* gene suggests that other peptidases may compensate for the loss of NL1. A strong candidate is Neprilysin since NL1 and Neprilysin share overlapping sites of expression, have similar enzymatic properties and degrade the same set of peptides (Li et al. 1995). May be not surprisingly then, mutant mice lacking Neprilysin function are viable and appear developmentally normal except for some minor effects in lymphoid development. Therefore, it is possible that both NL1 and Neprilysin enzymes share redundant functions, and that the expression of one enzyme can compensate for the absence of the other in mutant animals. Production of compound *Nl1* / *Neprilysin* mutants should test this hypothesis.

Although Neprilysin has been shown to be expressed in testis, *Neprilysin*<sup>-/-</sup> mice have no reported fertility problem. Since Neprilysin is membrane-bound, it might compensate for the lack of some of the membrane-bound NL1-related functions in testis of *Nl1*<sup>-/-</sup> mice but it might not rescue the phenotypes associated with the loss of the secreted form of NL1 protein. In other tissues, NL1 and Neprilysin are both believed to be membrane-bound proteins. In the brain, their sites of expression are rather complementary although many regions expressed both enzymes (Carpentier et al. 2003, Facchinetti et al. 2003). It will be interesting to study the effect of NL1 deficiency on brain function. For example, injection of thiorphan in the rat brain regions that controls nociception causes analgesia resulting from enhanced extracellular concentration of enkephalins (Roques et al. 1980). This effect was believed to be due to the pharmacological inhibition of Neprilysin activity. However, *Neprilysin* mutant animals were unexpectedly reported to exhibit hyperalgesia in the hot plate and tail withdrawal tests (Fischer et al. 2002). This suggests that Neprilysin may not be involved in this function and/or that other enzymes closely related to Neprilysin, such as NL1, may rather be involved in the analgesic effect of thiorphan.

Other zinc proteases are known to be involved in processes related to fertility (Correa et al. 2000, Diaz-Perez & Meizel 1992, Diaz-Perez et al. 1988, Li et al. 1995). Any of these peptidases could play a role in the partial rescue of the NL1 phenotype. For example, the testicular form of the angiotensin converting-enzyme (ACE) could be a good candidate since it is specifically expressed in developing spermatids and ACE mutant mice have reduced fertility (Hagaman et al. 1998). Furthermore, NL1 and ACE share overlapping



substrate specificity and hydrolyze several common peptides *in vitro*. Other peptidases of the M13 family of metallopeptidases like Phex, ECE-1, ECE-2 and ECEL1 have also been detected in testis (Ikeda et al. 2002, Korth et al. 1999, Meyer & R. A. Meyer 2000, Valdenaire et al. 1999) but their role in male fertility has not yet been established.

Production of *Nl1* null mice constitutes an important step in the understanding of the physiological importance of NL1 in mammals. NL1 deficiency has proven to impair normal fertilization processes. Further investigation will be necessary to precisely determine the molecular basis of the fertility defect, both at the level of the fertilization processes and of the early steps of embryonic development. Moreover, these basic investigations could be clinically relevant since the human homolog of NL1, MMEL2, has recently been identified (Bonvouloir et al. 2001). Therefore, mutations in this gene may be responsible for part of the fertility problems found in humans. Future studies evaluating the importance of MMEL2 in human reproduction processes will contribute to our understanding of the multiple factors involved in male fertility.

## 5.6 Acknowledgments

We would like to thank Marcelle Carter and Margot Lemieux for their technical support and François Harel for performing the statistical analyses. We would also like to thank François Harel for performing the statistic analysis. This work was supported by grants # MT-13052 (to LDG and GB) and # MOP-42523 (to JC) from the Canadian Institutes for Health Research of Canada (CIHR). MC was supported by studentships from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR), LJ holds a Chercheur National Award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and JC is a Senior Scholar from the FRSQ. The last two authors contribute equally to this study.

# 6

---

## Préambule

La prochain chapitre présente une revue complète de la littérature concernant NL1. Ce chapitre se veut une synthèse des connaissances acquises, par nous et part d'autres, sur cette enzyme, depuis sa découverte jusqu'à ce jour. Présenté sous forme d'article de revue, ce document fut publié en 2003 en tant que chapitre du livre <*Handbook of proteolytic enzymes*>.

# 6

---

## M684. Neprilysin-2

Mélanie Carpentier<sup>a</sup>, Luc DesGroseillers<sup>a</sup>, and Guy Boileau<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Département de Biochimie, Faculté de Médecine, Université de Montréal

\*Corresponding author: Département de Biochimie, Université de Montréal, Casier postal 6128 succ. Centre-Ville, Montréal (Quebec) Canada, H3C 3J7, Tel: 514-343-6328; fax: 514-343-2210; *E-mail address*: guy.boileau@umontreal.ca

Published in the *Handbook of proteolytic enzymes*, 2003.

### 6.1 Databanks

*MEROPS name*: Neprilysin-2

*MEROPS classification*: Clan MA (E), Family M13, peptidase M13.008

*Species distribution*: Mammalia

*Sequence known from* : *Homo Sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*

### 6.2 Name and History

Neprilysin-2 cDNA was first cloned from ECE-1 knock out mice embryos using a degenerate PCR strategy, and termed Soluble Secreted Endopeptidase (SEP), because it can exist in both a membrane-bound and soluble secreted form (Ikeda et al. 1999). A similar approach used by Ghaddar et al. (2000) and Ouimet et al. (2000) has subsequently resulted in the molecular characterization of Neprilysin-2 from mouse testis (Neprilysin-like 1; NL1) and from rat brain (NEPII), respectively.

## 6.3 Activity and Specificity

Experiments using culture medium from human embryonic kidney cells (HEK-293) stably transfected with the soluble secreted form of Neprilysin-2 identified [3,5-<sup>3</sup>H]tyrosyl-D-Ala<sup>2</sup>-Leu<sup>5</sup>-enkephalin as a substrate. [3,5-<sup>3</sup>H]tyrosyl-D-Ala<sup>2</sup>-Leu<sup>5</sup>-enkephalin is a well characterized Neprilysin substrate. The enzymatic parameters were characterized and compared to those of Neprilysin (Ghaddar et al. 2000). Neprilysin-2 affinity for [3,5-<sup>3</sup>H]tyrosyl-D-Ala<sup>2</sup>-Leu<sup>5</sup>-enkephalin was slightly higher than that of Neprilysin with Km values of 18  $\mu$ M and 73  $\mu$ M, respectively. Analysis of degradation products on reverse phase HPLC showed that Neprilysin-2 cleaves the substrate Leu-enkephalin at the Gly<sub>3</sub>†Phe<sub>4</sub> peptide bond as does Neprilysin. Similarly, Rose et al. (2002) who compared in vitro the activity of Neprilysin and Neprilysin-2 with several model peptide substrates, observed that both enzymes have very similar specificities. Furthermore, Ikeda et al. (1999) showed that Neprilysin-2 can produce endothelin-1 (ET-1) by cleaving at the specific Trp<sub>21</sub>†Val<sub>22</sub> peptide bond of Big ET-1. However, since it also cleaves very efficiently ET-1 at multiple sites, the physiological relevance of ET-1 production from Big ET-1 is questionable. Neprilysin-2 is active around neutral pH values with a maximum around 7.4 (Ikeda et al. 1999). Activity decreases sharply at values lower than 6.5 or higher than 8.0.

The enzymatic activity of the membrane-bound Neprilysin-2 has also been characterized (Rose et al. 2002). These studies showed that both the soluble and membrane-bound isoforms have comparable specificities in terms of model substrates, pH optima and inhibitory pattern. In addition, Ikeda et al. (1999) reported that Chinese hamster ovary (CHO) cells transiently cotransfected with the membrane-bound form of Neprilysin-2 and preprobigET-1 cDNA accumulated more ET-1 in their culture medium than CHO cells transfected with prepro ET-1 cDNA alone.

As a metallopeptidase, Neprilysin-2 is fully inhibited by chelating agents such as EDTA and 1,10-orthophenanthroline. Neprilysin and Neprilysin-2 showed the same sensitivity to inhibition by phosphoramidon with IC<sub>50</sub> values of 0.5 nM and 0.9 nM, respectively. Thiorphan, a specific inhibitor of Neprilysin with an IC<sub>50</sub> of 8 nM, inhibited Neprilysin-2 with an IC<sub>50</sub> of 47 nM. The enzyme is also partially sensitive to the ECE specific inhibitor FR901533 but not to the angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril (Ikeda et al. 1999, Ghaddar et al. 2000).

All Neprilysin-2 substrates found to date are also hydrolysed by Neprilysin *in vitro* and all identified Neprilysin-2 inhibitors are Neprilysin inhibitors. This strongly suggests that both enzymes use very similar enzymatic mechanisms. Detailed structural studies and enzymological characterization of the enzymes will be needed to make the distinction between their activities and will contribute valuable information for the rational design of Neprilysin or Neprilysin-2 specific inhibitors. Finally, both Neprilysin-2 and Neprilysin showed similar sensitivity to the angiotensin converting enzyme and Neprilysin dual inhibitors fasidotrilat and omapatrilat (Rose et al. 2002).

## 6.4 Structural chemistry

Neprilysin-2 primary structure has been deduced from cDNA sequences cloned in mouse and rat (Ghaddar et al. 2000, Ikeda et al. 1999, Ouimet et al. 2000). Three cDNAs were characterized that code for 742, 765 and 779 amino acid proteins, respectively. The 765 amino acid-long polypeptide will generate the soluble secreted form of Neprilysin-2 (see below), whereas the 742 residue-long protein corresponds to the membrane-bound form of the enzyme. The 779 amino acid protein corresponds to a membrane-bound isoform with an insertion of 37 amino acids at position 334 (Shirotni et al. 2001). Neprilysin-2 shares greater similarities with Neprilysin than with any other member of the family (55% amino acid sequence identity in mouse). The hydropathy profile of the deduced sequences predicts type-II integral membrane proteins with a 17-residue N-terminal cytoplasmic tail, a 21-residue putative transmembrane helix, and a large (727 and 704 amino acid residues in the two forms, respectively) C-terminal extracellular domain, which contains the active site. The two forms of Neprilysin-2 are generated by alternative splicing (Ikeda et al. 1999, Ouimet et al. 2000, Raharjo et al. 2001). Indeed, an additional exon encoding a 23 amino acid domain and containing a furin cleavage site (Arg<sup>58</sup>-Thr-Val-Val-Lys-Arg<sup>63</sup>) (throughout the text, amino acid residue numbering corresponds to the soluble secreted form of Neprilysin-2 and starts with the initiator methionine) is inserted just downstream the transmembrane domain in the transcript encoding the 765 amino acid-long protein. Recognition and cleavage of the furin site by still unidentified member(s) of the furin family are likely to generate the soluble secreted form of Neprilysin-2. These conclusions were based on studies in transfected cells in which the  $\alpha_1$ -anti-trypsin Portland variant ( $\alpha_1$ -

PDX), a known inhibitor of furin, prevents cleavage and release of the protein. Similarly, mutant Neprilysin-2 in which Lys<sup>62</sup> and Arg<sup>63</sup> were changed to asparagine and glycine, respectively, is not secreted from the cells (Ghaddar et al. 2000).

The position of the cleavage site was later challenged by Raharjo et al. (2001) who proposed a novel cleavage sequence. However, sequencing of the N-terminal amino acid residues of the protein secreted by transfected HEK-293 cells showed a unique sequence starting at Ala<sup>64</sup>, immediately downstream the furin cleavage site. This result definitely establishes that the soluble secreted form of Neprilysin-2 is produced by cleavage after Arg<sup>63</sup>. It thus appears that both forms of Neprilysin-2 are initially synthesized as type-II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. While the 742 amino acid polypeptide remains membrane-associated, the 765 amino acid protein is subsequently transformed into the soluble secreted form by cleavage of the Arg<sup>63</sup>†Ala<sup>64</sup> peptide bond.

The extracellular domain contains the two highly conserved consensus sequences of zinc binding motif: H<sup>600</sup>-E-X-X-H<sup>604</sup>, and G<sup>661</sup>-E-N-I-A-D<sup>666</sup> that are shared by all the members of the M13 family. By comparison with Neprilysin, these residues are postulated to form the zinc-binding site with H<sup>600</sup>, H<sup>604</sup> and E<sup>662</sup> being the zinc ligands. All amino acid residues known to be part of the active site of Neprilysin are present in Neprilysin-2. These include substrate binding and catalytic residues as well as amino acids known to stabilize the transition state of the catalytic reaction, suggesting that the two proteins share a very similar enzymatic mechanism. Like other members of the M13 family (with the exception of Endothelin-converting enzyme-like peptidase 1), Neprilysin-2 contains 10 conserved cysteine residues in its extracellular domain. These conserved cysteine residues are presumably involved in proper folding and in maintaining the protein in an active conformation, and probably reflect the conformational closeness of these proteins (Oefner et al. 2000).

Nine putative N-glycosylation sites (Asn-X-Ser/Thr) are found in the ectodomain of mouse Neprilysin-2 (8 sites in rat). Consistent with the presence of these sites, digestion with peptide:N-glycosidase F, which removes all N-linked oligosaccharide side chains from proteins, reduces Neprilysin-2 apparent Mr from 125,000-120,000 to 97,000 when analyzed by SDS-PAGE (Ghaddar et al. 2000, Ikeda et al. 1999). It has been shown that all asparagine residues in an Asn-X-Ser/Thr consensus are glycosylated in rabbit Neprilysin and that these sugar moieties increase the stability and enzymatic activity of the protein

as well as its intracellular transport. Three of Neprilysin glycosylated asparagine residues (Asn<sup>145</sup>, Asn<sup>285</sup> and Asn<sup>628</sup>) are conserved in Neprilysin-2 (Asn<sup>163</sup>, Asn<sup>303</sup> and Asn<sup>643</sup>). Among these residues, Asn<sup>145</sup> and Asn<sup>628</sup> have been reported to influence Neprilysin enzymatic activity (Lafrance et al. 1994).

## 6.5 Preparation

Neprilysin-2 is abundantly expressed in testis (Ghaddar et al. 2000), but no isolation procedure has been published to prepare it from animal tissues. So far, the enzyme has been produced by recombinant DNA technology and expression in cultured animal cells. A partial purification procedure from AtT20 and CHO transfected cells has been reported (Rose et al. 2002).

## 6.6 Biological aspects

Immunocytochemistry experiments and peptide:Nglycosidase F digestions, which allows to distinguish the core-glycosylated endoplasmic reticulum-localized forms of a protein from its mature cell-surface species, showed that the membrane-bound form of Neprilysin-2 was located inside the cells (Ikeda et al. 1999). The enzyme is presumably located in the early secretory pathway including endoplasmic reticulum and a portion of the Golgi apparatus. Other members of the M13 family of zinc metallopeptidase such as ECE-1b (Schweizer et al. 1997), ECE-2 (Emoto & Yanagisawa 1995) and Endothelin-converting enzyme-like peptidase 1 (Valdenaire & Schweizer 2000) have been localized intracellularly. The physiological function of the endoplasmic reticulum-localized Neprilysin-2 is still unclear. More recently, (Rose et al. 2002) suggested that membrane-bound Neprilysin-2 could be at the cell surface in the endocrine AtT20 cell line.

Neprilysin-2 mRNA expression pattern has been studied extensively. Northern blot analysis using total RNA from a variety of mouse tissues revealed a high, specific expression of a unique 3.4 kb Neprilysin-2 transcript in testis (Ghaddar et al. 2000). Neprilysin-2 mRNA has also been detected by RT-PCR in a variety of tissues including brain, heart, lung, liver, kidney, adrenal gland, intestine, spleen and testis (Ghaddar et al. 2000, Ikeda et al. 1999). Using specific RT-PCR primers for the soluble secreted or membrane-bound

form of Neprilysin-2, it was shown that both isoforms are present in all the tissues tested. Interestingly, testis is the only tissue where the soluble secreted form of Neprilysin-2 is predominant, the membrane-bound form being predominant in the other tissues (Ikeda et al. 1999). *In situ* hybridization (ISH) experiments on mouse cryostat sagittal sections showed that only germinal cells in the luminal face of seminiferous tubules in adult testis are labelled for Neprilysin-2 transcripts (Ghaddar et al. 2000, Carpentier et al. 2003). These cells were identified as round and elongated spermatids in all spermiogenesis maturational stages. Neither spermatozoa nor spermatocytes, spermatogonies or sertoli cells were labelled.

In rat, Neprilysin-2 transcripts have been detected by RT-PCR in all the tissues tested, which include testis, brain, spinal cord, pituitary, cortex, hippocampus, mid brain, hypothalamus striatum and brain stem. *In situ* hybridization in brain revealed that the mRNA coding for this protease is widely and heterogeneously distributed in the central nervous system, the most abundant regions being the brain stem, the hypothalamus and pituitary (Ouimet et al. 2000, Facchinetti et al. 2003).

Since testis is the only tissue where the soluble secreted form of Neprilysin-2 is predominant and since its expression pattern is high and restricted to germinal cells in this tissue, one could postulate a role for Neprilysin-2 in reproduction processes. The protein could be constitutively secreted to regulate spermiogenesis much like several other proteolytic enzymes of the seminiferous tubules. Alternatively Neprilysin-2 could accumulate in the acrosome with proenkephalin peptides and then be released upon acrosomal reaction. In brain, one could postulate a role for Neprilysin-2 in neuropeptide degradation much like NEP. Further studies, including the generation and analysis of mice containing a targeted disruption of the Neprilysin-2 gene (which is well underway in our laboratory) will be needed to determine the physiological functions of this enzyme.

## 6.7 Distinguishing features

Two rabbit polyclonal antiserum against mouse Neprilysin-2 have been described, but are not commercially available. One was raised against a synthetic peptide corresponding to the C-terminal 16 amino acids of Neprilysin-2 (Ikeda et al. 1999) and the other one against the region encompassing amino acids 270 to 355 of the protein (Ghaddar et al. 2000).



## 6.8 Related peptidase

MMEL2, was recently cloned from a  $\lambda$ gt10 human fetal brain library using mouse Neprilysin-2 cDNA as a probe (Bonvouloir et al. 2001). Hydropathy profile of the predicted amino acid sequence of MMEL2 predicts a putative type II transmembrane glycoprotein of 770 amino acids with 7 potential N-glycosylation sites. As Neprilysin-2, MMEL2 contains a putative recognition site for convertases ( $R^{60}$ -T-F-V-K- $R^{65}$ ) downstream of the transmembrane domain, suggesting that it could be expressed as a soluble secreted protein. However, a proline residue is present in  $P'_2$  of the consensus sequence and may compromise this cleavage. Northern blot and RT-PCR analysis revealed that MMEL2 is almost exclusively expressed in testis but small amounts of mRNA could be found in brain, heart and kidney after hybridization of the RT-PCR products with a radioactive probe. An additional isoform was observed by RT-PCR in testis, brain and kidney and likely corresponds to the membrane-bound form of the protein. The ratio of the two isoforms was similar among tissues as opposed to that of Neprilysin-2.

Is MMEL2 the human ortholog of Neprilysin-2? MMEL2 amino acid sequence is 77% identical to that of Neprilysin-2. This is relatively low since mouse Neprilysin-2 is 91% identical to its rat ortholog. Indeed, orthologs of other members of the M13 family of metallopeptidases characterized in different species always share more than 90% identity in their amino acid sequence. However, both enzymes are positioned on corresponding regions of the human and mouse chromosomes (1p36 for MMEL2 and distal end of chromosome 4 for Neprilysin-2) (our own unpublished data) and no sequence closer to Neprilysin-2 has been found so far in the human genome EST database.

## 6.9 Further reading

The papers by Ikeda et al. (1999), Ghaddar et al. (2000), Ouimet et al. (2000), Rose et al. (2002) present all the relevant data on the structure, expression and biochemistry of Neprilysin-2.

# 7

---

## Discussion

### 7.1 Importance de l'EPN dans la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénératrice conduisant progressivement à la perte de la mémoire (amnésie) et des fonctions cognitives (aphasie, apraxie, agnosie). Deux processus dégénératifs caractérisent cette maladie: l'amyloïdogénèse qui correspond à la formation de peptide A $\beta$  sous forme de dépôts extracellulaires et la dégénérescence neurofibrillaire (DNF) qui résulte de l'agrégation intraneuronale de filaments de protéines tau pathologiques. De nombreuses études biochimiques et génétiques indiquent qu'une perturbation de l'équilibre entre la synthèse et l'élimination des peptides A $\beta$  constitue l'événement déclencheur de la MA. L'accumulation de ces peptides sous forme de plaques est toxique pour les neurones et les vaisseaux sanguins où ils se déposent. Cette accumulation conduit à une réponse inflammatoire provoquant l'endommagement des neurites ainsi que l'hyperphosphorylation et l'agrégation de protéines tau intracellulaires. Ce phénomène conduit ultimement à la mort des neurones. De plus, l'accumulation de peptides A $\beta$  au niveau des vaisseaux sanguins endommage la barrière hématoencéphalique et peut causer des hémorragies cérébrales sévères.

Les peptides A $\beta$  sont dérivés du clivage séquentiel de la protéine précurseur amyloïde APP. Cette protéine transmembranaire, très répandue dans l'organisme, joue plusieurs rôles en particulier dans les cellules du système nerveux central. L'APP peut agir comme molécule d'interaction cellule-cellule, comme récepteur de surface ou encore comme facteur de croissance (formation du cytosquelette, régulation du calcium intracellulaire, formation des synapses, modulation des cholinestérases...). Deux voies de maturation de l'APP existent (figure 7.1). La première voie, dite non-amyloïdogénique, implique le clivage de

l'APP par une  $\alpha$ -sécrétase et conduit à la sécrétion de la portion N-terminale extracellulaire de la protéine. Le clivage aux sites  $\alpha$  prévient la formation du peptide A $\beta$  d'où son nom de voie non-amyloïdogénique ou voie physiologique. La deuxième, voie dite amyloïdogénique, implique le clivage aux sites  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétase pour former le peptide A $\beta$  retrouvé dans les plaques séniles. Bien que la  $\beta$ -sécrétase ait été identifiée de façon non équivoque comme étant l'aspartyl protéase BACE, l'identité des  $\alpha$ - et  $\gamma$ -sécrétases demeure incertaine. Un ou plusieurs membre(s) des métalloprotéases de la famille ADAMS seraient impliqués dans la coupure au site  $\alpha$  tandis que les présénilines seraient impliquées de façon directe ou indirecte dans la maturation aux sites  $\gamma$ . La coupure au niveau des sites  $\gamma$  permet de générer soit le peptide A $\beta_{(1-40)}$ , soit le peptide A $\beta_{(1-42)}$  qui constitue la forme la plus toxique du peptide. Les peptides A $\beta$  peuvent être dégradés par des métallopeptidases telles que l'Endopeptidase Neutre ou encore être métabolisés via leur endocytose dépendante de l'apolipoprotéine E (APOE). Des mutations dans l'APP et les présénilines favorisant la voie amyloïdogénique ont été identifiées chez des cas familiaux de la maladie d'Alzheimer. Quant aux cas sporadiques, plusieurs gènes dont l'allèle  $\epsilon 4$  de l'APOE, impliquée dans l'endocytose du peptide A $\beta$  conduirait à une prédisposition à la maladie (figure 7.1)(revue par: Racchi & Govoni (2003), Gandy & Petanceska (2001), Evin & Weidemann (2002)).

Depuis plusieurs années, une proportion considérable des activités de recherche sur la maladie d'Alzheimer était vouée à l'identification des mécanismes cellulaires qui soutiennent la formation du peptide A $\beta$  et à l'identification des sécrétases responsables de la maturation de l'APP. Par contre, relativement peu d'efforts étaient destinés à la compréhension de l'élimination et de la dégradation du peptide. De récentes études indiquent qu'un déséquilibre autant du côté de la synthèse que du catabolisme du peptide pourrait contribuer au développement de la MA. Une importante étude montrant que l'immunisation de rongeurs avec le peptide A $\beta$  pouvait mener à l'élimination des plaques à ouvert la voie à l'étude du métabolisme du peptide A $\beta$  comme stratégie thérapeutique viable. La majorité des études jusqu'à maintenant réalisées convergent vers l'implication de métallopeptidases dans la dégradation des peptides A $\beta$ . C'est suite aux études de Iwata et al. (2000) montrant l'implication potentielle de l'EPN dans la dégradation du peptide A $\beta$  *in vivo* que nous avons entrepris d'évaluer les niveaux d'expression de l'EPN dans les cerveaux atteints de la MA. Cette étude nous a permis d'observer une diminution impor-

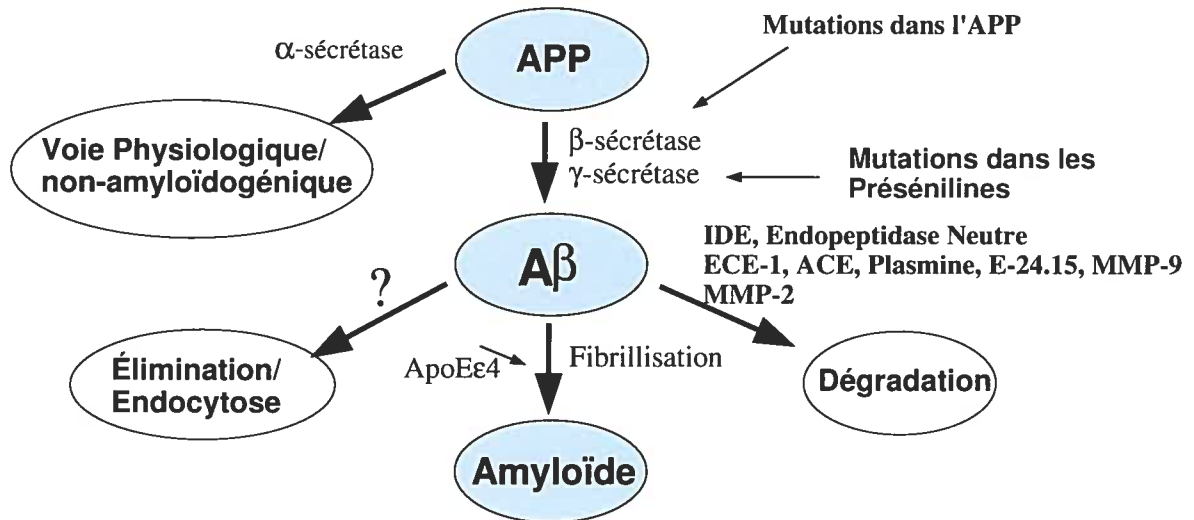


Figure 7.1 – **Biogenèse et métabolisme du peptide Aβ.** Le peptide Aβ est un fragment protéolytique dérivé de la protéine précurseur APP suite à deux clivages séquentiels par les β- et γ-sécrétases. La maladie d'Alzheimer d'origine familiale (héréditaire) est causée par des mutations dans les gènes de l'APP et/ou des présénilines et affecte le clivage de l'APP causant ainsi une augmentation de la synthèse du peptide Aβ, plus particulièrement l' Aβ<sub>(1-42)</sub> qui constitue l'espèce la plus neurotoxique. Le peptide Aβ s'agrège de façon dose dépendante pour former des protofibrilles cytotoxiques qui s'accumulent sous forme de plaques amyloïdes. Le peptide Aβ soluble peut être dégradé par l'IDE, l'Endopeptidase Neutre, l'ACE, l'E-24.15, l'ECE-1, la MMP-9, la MMP-2 et la Plasmin. De plus, l'élimination du peptide Aβ par des mécanismes de phagocytose et d'endocytose impliquant l'apolipoprotéine E, l'α-macroglobuline et le récepteur de lipoprotéine de faible densité (LRP) fut également proposé. Figure adaptée de Evin & Weidemann (2002)

tante des niveaux d'expression de l'EPN dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe ainsi que dans la vasculature de cerveaux atteints de la MA (Carpentier et al. 2002). Nos résultats sont d'ailleurs appuyés par plusieurs autres études effectuées chez les rongeurs (Iwata et al. 2000, Iwata et al. 2002, Zhang & Snell 1993) et chez l'humain (Yasojima et al. 2001, Akiyama et al. 2001). Toutefois, nous n'avons pu observer la diminution de l'expression de l'EPN dans les neurones du cortex rapportée par Yasojima et al. (2001) dans nos échantillons. Cette différence pourrait provenir de différences au niveau des régions corticales étudiées ou encore de la sensibilité de la méthode utilisée. D'ailleurs, la quantification de l'EPN et de son transcrit dans différentes régions du cerveau suggère une régulation régionale de son expression. En effet, de façon générale les régions moins susceptibles à l'accumulation de peptides A $\beta$  expriment davantage d'EPN et les régions plus touchées expriment moins d'enzyme (Yasojima et al. 2001, Yasojima et al. 2001, Fukami et al. 2002, Akiyama et al. 2001). Les études effectuées chez les souris déficientes en EPN et la récente découverte d'un lien génétique possible entre 2 polymorphismes du gène de l'EPN et la maladie d'Alzheimer ainsi que la CAA viennent encore une fois supporter le rôle protecteur de l'EPN dans le système nerveux (Yamada et al. 2003, Clarimon et al. 2003, Iwata et al. 2001).

### 7.1.1 Autres candidats dans la dégradation des peptides amyloïdes

Malgré l'importante quantité de résultats impliquant l'EPN comme enzyme majeure de dégradation des peptides A $\beta$  *in vivo* et *in vitro*, certaines évidences favorisant d'autres voies ont également été présentées. En effet, plusieurs autres études effectuées chez l'humain et les rongeurs suggèrent qu'au moins 7 autres métallopeptidases agiraient comme enzyme de dégradation du peptide A $\beta$  (figure 7.2)(revue par: Carson & Turner (2002), Evin & Weidemann (2002)). Le criblage d'une lignée cellulaire microgliale (BV-2) pour des protéases capables de dégrader le peptide A $\beta$  a mené à l'identification de l'IDE (insulin degrading enzyme) comme principale candidate (Qiu et al. 1998). De plus, des fractions membranaires et des cultures primaires de neurones de souris déficientes en IDE montrent une diminution de 50% de la dégradation du peptide A $\beta$  comparativement aux souris de type sauvage (Farris et al. 2003). Finalement, l'importance de l'IDE dans l'étiologie de la

maladie d'Alzheimer fut récemment validée par la découverte d'un lien génétique entre le locus du gène de l'IDE sur le chromosome 10 et la MA (Bertram et al. 2000, Ertekin-Taner et al. 2000).

Une autre métallopeptidase à zinc impliquée dans le métabolisme des peptides A $\beta$  est l'E-24.15 cytosolique. Du milieu conditionné de cellules de neuroblastomes (SKNMC) transfectées avec l'ARN antisens de l'E-24.15 montre des niveaux de peptides A $\beta$  significativement plus élevés que les contrôles. De plus, le prétraitement du milieu conditionné avec des inhibiteurs de protéases à sérine réduit le catabolisme des peptides A $\beta$  (Yamin et al. 1999). Il semblerait donc que l'E-24.15 participerait à l'élimination du peptide amyloïde en activant une sérine protéase capable de dégrader ce dernier.

L'enzyme de conversion de l'endothéline semble également constituer un acteur important dans le métabolisme du peptide amyloïde. Il a récemment été démontré que l'ECE-1 hydrolyse l'A $\beta_{(1-40)}$  et A $\beta_{(1-42)}$  *in vitro* au niveau de sites distincts de ceux ciblés par l'EPN (Eckman et al. 2001). Certaines lignées de neuroblastomes ou de neurogliomes traitées au phosphoramidon (mais non au thiorphan) sécrètent davantage de peptides A $\beta$  ce qui est en accord avec l'implication de ECE-1 dans la dégradation intracellulaire de ces peptides. Une étude de Eckman et al. (2003) a démontré que les souris déficientes en ECE-1 et ECE-2 accumulent davantage de peptides amyloïdes dans leurs cerveaux comparativement aux souris de type sauvage, impliquant une fois de plus ces enzymes dans l'élimination des peptides A $\beta$ .

L'ACE figure également depuis peu dans la liste d'enzymes participant à la dégradation du peptide A $\beta_{(1-40)}$ . Hu et al. (2001) ont proposé que l'ACE pouvait inhiber l'agrégation du peptide A $\beta$  et que cet effet résulte de l'hydrolyse du peptide A $\beta_{(1-40)}$  au niveau du lien Asp<sup>7</sup>-Ser<sup>8</sup>. Cette observation est toutefois surprenante compte tenue de la spécificité connue de la protéine (Turner & Hooper 2002). Des études supplémentaires seront nécessaires afin de confirmer ces observations puisque Iwata et al. (2000) n'ont observé aucun effet des inhibiteurs de l'ACE sur le métabolisme du peptide A $\beta$  *in vivo*.

La protéase à sérine plasmine est également capable de dégrader les peptides A $\beta_{(1-40)}$  et A $\beta_{(1-42)}$  *in vitro*, prévenant ainsi leur agrégation. De plus, il semblerait que la plasmine présente au niveau des membranes cliverait l'APP préférentiellement au site  $\alpha$  tandis que la protéine sécrétée dégraderait les fragments d'APP y compris les peptides amyloïdes. Ledesma et al. (2000) ont aussi rapporté une diminution de l'expression de la plasmine

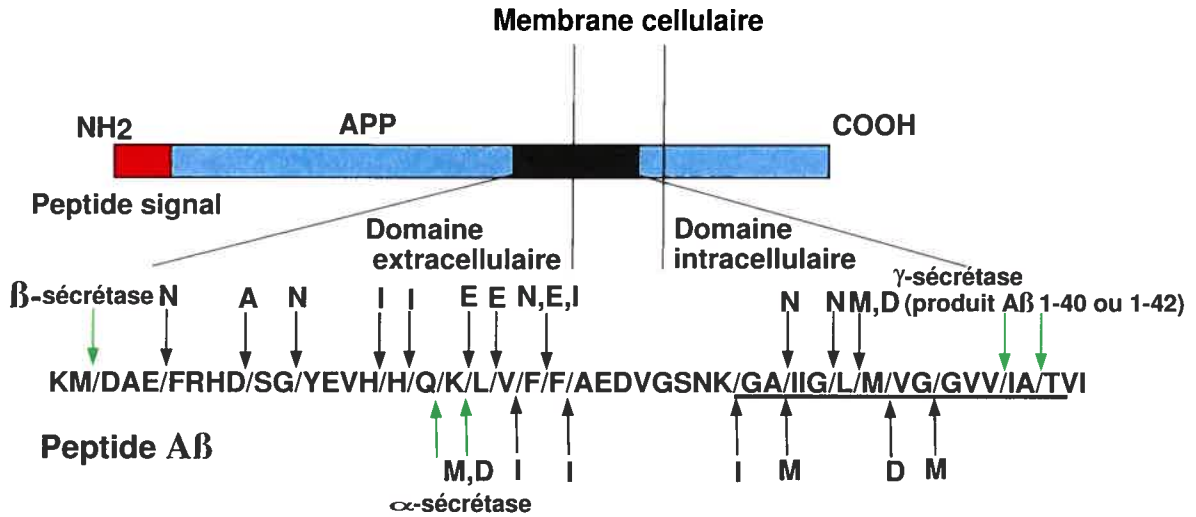


Figure 7.2 – Rôle de l'Endopeptidase Neutre et d'autres métallopeptidases dans le catabolisme du peptide A $\beta$ . Le peptide A $\beta$  est en partie contenu dans le domaine transmembranaire et dans le domaine extracellulaire (boîte noire) de l'APP. La relâche du peptide A $\beta$  a lieu suite à la double maturation de la protéine. Le premier événement de clivage de l'APP s'effectue en N-terminal du peptide A $\beta$  par une aspartyl protéase nommée  $\beta$ -sécrétase (BACE). Ceci génère la relâche d'un fragment soluble (sAPP $\beta$ ) tandis que le fragment carboxy-terminal (C99) demeure associé à la membrane. Une  $\gamma$ -sécrétase clive ensuite le fragment C99 en carboxy-terminal au niveau du domaine transmembranaire de l'APP afin de relâcher le peptide A $\beta$ . Les flèches présentées au-dessus et sous la séquence du peptide A $\beta$  et le symbole / entre les résidus indiquent les principaux sites de clivages identifiés pour les métallopeptidases suivantes: A, ACE; N, Endopeptidase Neutre; E, ECE-1; M, MMP-9; D, MMP-2 et I, IDE. La séquence du peptide A $\beta$  est représentée par le code de lettres des acides aminés. La région soulignée représente la portion du peptide contenue dans le domaine transmembranaire de l'APP. Les flèches vertes indiquent les sites de maturation de l'APP par les sécrétases. Figure traduite et adaptée de Carson & Turner (2002).

dans des échantillons de cerveaux atteints de la MA. L'ensemble de ces résultats suggèrent que la plasmine pourrait être un autre régulateur important des niveaux de peptides amyloïdes dans le cerveau. Finalement, les métallopeptidases de la matrice MMP-2 (Roher et al. 1994) et MMP-9 (Backstrom et al. 1996) furent également proposées comme enzymes impliquées dans le catabolisme du peptide amyloïde.

Comment tous ces résultats peuvent-ils être intégrés et expliqués? Le catabolisme des peptides amyloïdes constitue fort probablement un événement continu qui a lieu à la fois dans les compartiments intra et extracellulaires. Ainsi, plusieurs enzymes sont susceptibles d'y participer. La vitesse de dégradation du peptide semble également varier d'une région

à l'autre du cerveau. Par conséquent, cette activité pourrait dépendre non pas de la présence d'une seule enzyme dans une région donnée mais de l'activité complémentaire de plusieurs d'entre elles. Les résultats *in vivo* obtenus chez les rongeurs, incluant ceux des souris *EPN* *-/-*, sont convaincants mais doivent toutefois être interprétés avec prudence. Par exemple, les résultats obtenus par Iwata et al. (2000) proviennent du métabolisme du peptide  $A\beta$  uniquement au niveau de l'hippocampe où l'EPN est exprimée. Par contre, on retrouve peu d'EPN dans les régions corticales où le peptide  $A\beta$  s'accumule également pour former des dépôts. Dans ces régions, l'IDE ou d'autres métallopeptidases pourraient constituer les principaux acteurs dans l'élimination du peptide  $A\beta$ . Quel que soit le mécanisme d'élimination des peptides amyloïdes il est clair que ces voies enzymatiques sont surchargées dans la MA. Il reste maintenant à savoir si l'augmentation de l'expression de l'une ou plusieurs de ces métallopeptidases pourrait permettre de rétablir l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des peptides. Le développement d'inhibiteurs plus sélectifs pour ces différentes enzymes facilitera certainement l'évaluation de l'importance relative de ces différentes voies de dégradation.

### 7.1.2 L'EPN dans les astrocytes activés

Plusieurs études ont démontré que l'activation des cellules microgliales et la présence d'astrocytes activés en périphérie de plaques séniles constituent des événements précoces dans la maladie d'Alzheimer. L'accumulation de peptides amyloïdes induit une réaction inflammatoire ainsi que l'activation des cellules gliales, qui constituent les principaux acteurs dans l'immunité du SNC. Le nombre d'astrocytes exprimant la protéine GFAP à proximité des plaques séniles augmente au cours de la maladie et la présence de fibrille de peptide  $A\beta$  dans le cerveau humain semble stimuler cette augmentation (Vehmas et al. 2003, Wegiel et al. 2000). L'activation des astrocytes semble particulièrement importante non seulement autour des dépôts dans le parenchyme mais également au niveau de la vasculature cérébrale.

Les astrocytes participent normalement au maintien de l'homéostasie du système nerveux central en régulant le pH et la concentration extracellulaire d'ions, en métabolisant des neurotransmetteurs et en contribuant à l'intégrité structurale et fonctionnelle de la barrière hémato-encéphalique (Dong & Benveniste 2001). Lors d'une blessure, d'un stress



ou en situation neurodégénératrice, les astrocytes et les microglies deviennent les cellules immunitaires effectrices du SNC. Les astrocytes vont alors participer à la reconnaissance de synapses en dégénérescence, de neurones endommagés et de protéines modifiées ou agrégées (Wyss-Coray & Mucke 2002). Les astrocytes ainsi activés expriment la protéine GFAP, migrent en réponse à des signaux chimiotactiques et produisent une variété de cytokines et de chémokines afin de prendre part, localement, à la réponse immune et inflammatoire.

Dans la plupart des cas, ces réponses sont bénéfiques et visent à restaurer le milieu extracellulaire, à détoxifier et à procurer un transport trophique. Toutefois, ce ne sont pas toutes les réponses gliales qui sont bénéfiques. L'astrocyte activé peut, par exemple, sécréter des molécules qui inhibent la croissance des neurites. L'oedème glial (Sudley) pourrait contribuer à l'augmentation de la pression intracrânienne et pourrait être associé à la relâche excessive de substances nocives pour les neurones lors d'une réaction inflammatoire soutenue.

L'activation des cellules gliales fut longtemps considérée comme un phénomène contribuant à la neurodégénérescence. Toutefois, certains auteurs suggèrent maintenant que les astrocytes jouent un rôle protecteur dans la maladie d'Alzheimer en protégeant les neurones des effets toxiques des plaques séniles extracellulaires. Une récente étude de Wyss-Coray et al. (2003) a démontré pour la première fois que des astrocytes de souris adultes en culture migrent en réponse à une chémokine (la protéine MCP-1) présente au niveau des lésions de la MA. De plus, l'interaction des astrocytes avec le peptide A $\beta$  provoque l'arrêt de leur migration au niveau des plaques séniles. Les auteurs démontrent également que les astrocytes sont capables de lier et de dégrader le peptide A $\beta_{(1-42)}$  *in vitro* et *in situ*. Ainsi, il semblerait que les astrocytes participent de façon active au catabolisme des peptides A $\beta$  endogènes et exogènes. Cette étude démontre également que les astrocytes sont capables d'éliminer des dépôts de peptides présents sur des coupes de cerveaux de souris surexprimant l'APP humain. En effet, l'incubation de coupes d'hippocampe de souris avec des astrocytes en culture permet de diminuer de 40% l'aire totale de la section occupée par le peptide A $\beta$  comparativement aux coupes non traitées. Ces résultats montrent pour la première fois l'importance des astrocytes dans l'élimination des peptides A $\beta$ .

L'analyse de l'expression de l'EPN au niveau de l'hippocampe par immunohistochimie a révélé un changement dramatique non seulement au niveau de l'expression mais également au niveau de la localisation cellulaire de la protéine. En effet, chez les sujets

atteints de la maladie d'Alzheimer, nous avons pu observer une baisse importante de l'expression de l'EPN dans les neurones pyramidaux tandis qu'une induction de l'expression de l'enzyme a pu être observée dans les astrocytes activés à proximité des plaques séniles (Carpentier et al. 2002). Une récente étude par Apelt et al. (2003), réalisée chez la souris, rapporte également une induction de l'expression de l'EPN dans des astrocytes GFAP-positifs localisés à proximité des plaques amyloïdes au niveau du néocortex et de l'hippocampe. Ces résultats suggèrent donc que l'expression de l'EPN serait régulée à la hausse dans les astrocytes activés en situation pathologique. Ainsi l'EPN pourrait être en partie responsable de l'activité de dégradation observée chez les astrocytes activés au niveau des plaques séniles de souris transgéniques. Cependant, il est probable que cette fonction soit insuffisante ou partiellement inactivée dans la maladie d'Alzheimer puisque les astrocytes y sont incapables de réduire efficacement l'accumulation du peptide dans le cerveau. Des traitements permettant d'augmenter la dégradation du peptide A $\beta$  par les astrocytes pourraient contribuer à réduire la neurodégénérescence associée à la maladie.

L'élément déclencheur responsable de l'expression de l'EPN au niveau des astrocytes activés dans la maladie d'Alzheimer demeure inconnu. Très peu d'études se sont attardées à la régulation de l'expression de l'EPN dans le système nerveux et nous avons été les premiers à rapporter l'expression de l'EPN dans les astrocytes activés. Une étude immunohistologique chez le porc a également démontré la réorganisation cellulaire de l'EPN dans les cellules de Schwann suite au sectionnement d'un nerf périphérique suggérant que l'expression de l'EPN puisse être modulée suite à des blessures (Kenny & Bourne 1991). De plus, l'injection intracrânienne de peptide A $\beta$  synthétique dans les souris transgéniques Tg2576 surexprimant une forme mutante d'APP humaine, augmente les niveaux d'expression de l'EPN et mène même à une diminution de l'accumulation de peptides dans le cerveau des souris (Mohajeri et al. 2002). L'activation des astrocytes résulte en la variation de l'expression de centaines de molécules incluant des cytokines, des chémokines, des facteurs de croissance, des protéines du cytosquelette, des récepteurs et des protéases. Parmi ces molécules, au moins trois (le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et le TGF- $\beta$ ) sont capables de stimuler l'expression de l'EPN et de son transcrite dans certains tissus périphériques. De plus, Wyss-Coray et al. (2001) ont démontré qu'une augmentation modeste de TGF- $\beta$ 1 dans les astrocytes murins exprimant l'APP humaine résulte en une réduction significative du nombre de plaques amyloïdes dans l'hippocampe et le néocortex. Ainsi l'expression de

l'EPN dans les astrocytes pourrait être stimulée par ces cytokines inflammatoires. Finalement, il est intéressant de noter que le gène de l'EPN contient deux éléments de réponse aux androgènes ce qui concorde avec l'observation selon laquelle la MA est plus fréquente chez les femmes que chez les hommes.

L'activation des astrocytes constitue un mécanisme de défense commun à plusieurs situations pathologiques et à plusieurs types de blessures cérébrales. Par exemple, on retrouve des astrocytes activés chez les sujets atteints de la maladie de Parkinson, de sclérose en plaques, lors d'infections virales ou bactériennes et lors de traumatismes crâniens. Il serait intéressant de déterminer si l'expression de l'EPN dans les astrocytes activés à proximité des plaques séniles constitue un phénomène spécifique à la maladie d'Alzheimer ou si cette expression fait suite à un traumatisme plus général. La question est maintenant de savoir si l'expression de l'EPN est également induite dans les astrocytes activés présents au niveau de d'autres types de lésions. Il a été démontré que certains neuropeptides ou leurs récepteurs sont exprimés dans les astrocytes (Kostyk et al. 1989, Mason et al. 2002, Mileusnic et al. 1999) et que les astrocytes migrent en réponse à certaines chémokines. En plus de son rôle potentiel de dégradation du peptide A $\beta$  dans les astrocytes activés, l'EPN pourrait permettre de moduler la communication cellulaire ainsi que la réaction inflammatoire en dégradant certains neuropeptides ou chémokines. D'ailleurs le rôle de l'EPN dans la régulation de la réaction inflammatoire et dans la dégradation de chémokines dans certains tissus périphériques est bien établi (Turner et al. 2000, Koehne et al. 1998). L'analyse future de la régulation de l'expression de l'EPN dans les astrocytes et l'identification de son/ses substrat(s) permettront certainement de jeter un oeil nouveau sur le rôle de l'enzyme dans ces cellules.

Mis à part les cas familiaux de la maladie d'Alzheimer, le principal facteur de risque de développer la maladie demeure encore le vieillissement. Ainsi, l'augmentation de l'espérance de vie et le vieillissement de la population ne cessent de faire augmenter la prévalence de la MA. Entre 1900 et 2050 on estime que la proportion de personnes âgées de plus de 65 ans sera passée de 1% à 25% (Olshansky et al. 1993). Il reste maintenant à savoir si l'augmentation de l'expression de l'EPN et/ou d'une autre métallopeptidase pourrait permettre de rétablir l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des peptides A $\beta$  afin de prévenir le déclenchement de la maladie. Le développement d'inhibiteurs plus sélectifs pour les différentes métallopeptidases impliquées dans la dégradation des peptides A $\beta$  facilitera

certainement l'évaluation de l'importance relative de ces différentes voies de dégradation. Une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires de la MA est essentielle afin de permettre le développement d'une approche thérapeutique spécifique et efficace.

## 7.2 NL1: un nouveau membre de la famille de l'Endopeptidase Neutre

La famille de l'EPN est composée de sept membres impliqués dans une variété de processus physiologiques allant de la régulation de la perception de la douleur au contrôle de la minéralisation osseuse (Turner & Tanzawa 1997, Turner et al. 2001, Turner et al. 2000). Lors de mon arrivée dans le laboratoire, un nouveau membre de la famille de l'EPN, NL1, venait tout juste d'être cloné. L'ADNc de NL1 est composé de 2925 nucléotides incluant des régions 5'UTR et 3'UTR de 331 et 399 nucléotides respectivement. L'analyse de la séquence prédit une topologie transmembranaire de type 2 caractéristique des autres membres de la famille de l'EPN. Elle est composée de 765 acides aminés où 17 acides aminés composent le domaine N-terminal cytoplasmique, 24 acides aminés le domaine transmembranaire et 728 acides aminés le domaine extracellulaire. Le domaine extracellulaire contient également 10 cystéines (conservées à travers les membres de la famille), neuf sites potentiels de N-glycosylation et des équivalents de tous les résidus importants pour la catalyse identifiés chez l'EPN (Figure 7.3). D'ailleurs, NL1 constitue la protéine connue la plus similaire à l'EPN partageant 55% d'identité et 70% de similarité avec elle.

L'analyse de l'expression de NL1 dans les cellules HEK-293 révéla, contre toute attente, que la protéine peut être sécrétée dans le milieu de culture. Le clonage de NL1 par un autre groupe (Ikeda et al. 1999) a permis de déterminer que NL1 peut en fait exister sous deux formes, soit la forme membranaire et la forme sécrétée (qui avait été clonée dans notre laboratoire). Ces deux formes de l'enzyme peuvent être générées grâce à l'épissage alternatif de l'exon contenant le signal de sécrétion. Cette caractéristique unique à NL1 en fait un membre à part et nous a poussé à caractériser son signal ainsi que son mécanisme de sécrétion.

L'analyse détaillée de la séquence de NL1 révéla la présence d'un site potentiel de clivage par les membres de la famille des prohormones convertases. Selon notre hypothèse,

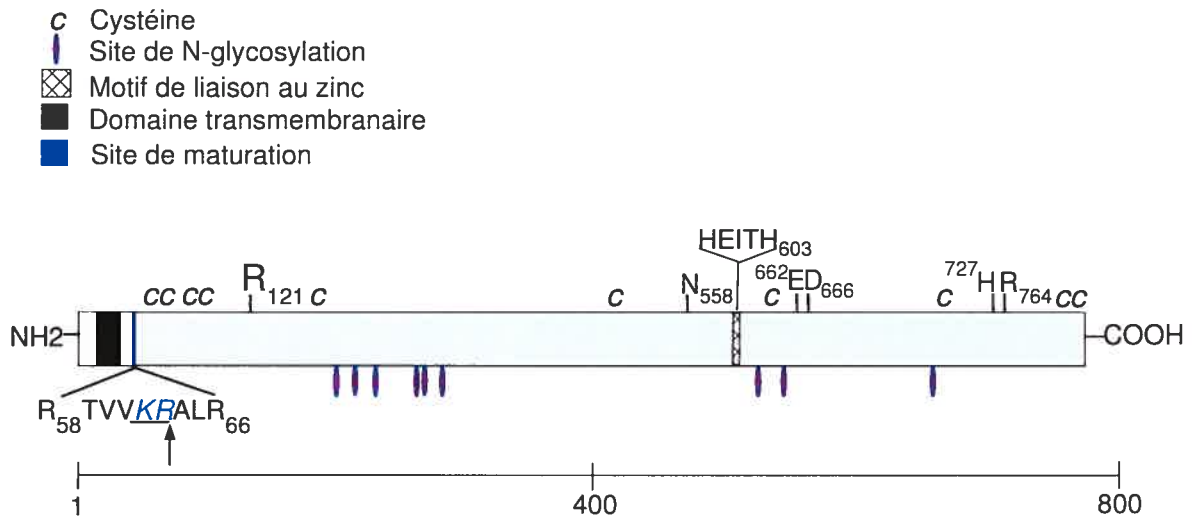


Figure 7.3 – **Représentation schématique de NL1.** Les acides aminés importants pour 1) la coordination de l'atome de zinc: His<sup>599</sup>, His<sup>603</sup>, Glu<sup>662</sup> (His<sup>583</sup>, His<sup>587</sup>, Glu<sup>646</sup> chez l'EPN) 2) la catalyse: GLU<sup>600</sup> (GLU<sup>584</sup> chez l'EPN) 3) la liaison au substrat: Arg<sup>121</sup>, Arg<sup>764</sup>, Asn<sup>558</sup> (Arg<sup>102</sup>, Arg<sup>717</sup>, Asn<sup>542</sup> chez l'EPN) 4) la stabilisation de l'état de transition: His<sup>727</sup>, Asp<sup>666</sup> (His<sup>711</sup>, Asp<sup>650</sup> chez l'EPN) sont indiqués. L'emplacement des résidus cystéines, des sites potentiels pour la N-glycosylation ainsi que le site de clivage par une prohormone convertase sont également montrés. Il est à noter que le site de clivage est absent dans la forme transmembranaire de la protéine.

l'utilisation de ce site, situé tout juste en C-terminal du domaine transmembranaire, permettrait à NL1 d'être sécrété dans le milieu de culture. Afin de confirmer notre hypothèse nous avons généré un mutant de NL1 dont le site consensus de clivage a été aboli. Lors de son expression dans les cellules de mammifères la protéine mutée n'a pu être détectée dans le milieu de culture. Nous avons plutôt observé son accumulation dans les extraits cellulaires ce qui suggère que le site potentiel de clivage identifié serait bien responsable de la maturation et de la sécrétion de NL1. Malgré le fait que la présence de la mutation abolie plus de 95% de la sécrétion de NL1, une petite quantité de protéine a parfois pu être détectée dans le milieu de culture. L'utilisation d'un site de clivage alternatif pourrait être à l'origine de la faible présence de NL1 dans le milieu de culture. En effet, un résidu arginine situé 3 acides aminés en aval du site muté pourrait peut-être être utilisé. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique des prohormones convertase ( $\alpha$ 1-PDX) a permis de confirmer l'importance d'un membre de cette famille dans la maturation et le clivage de NL1. Contrairement à ce que nous avons pu observer, les travaux de Raharjo et al. (2001) rapportent l'utilisation d'un nouveau mécanisme de sécrétion impliquant le motif WDERTVV comme site minimal de clivage de NL1. Cette divergence pourrait soit provenir des lignées cellulaires ou de l'approche utilisée pour caractériser le site de maturation. Toutefois, l'expression de notre mutant de NL1 dans les cellules CHO (cellules utilisées par Raharjo et al, 2001) suggère également l'utilisation du site RTVVKR lors de la sécrétion de la protéine. De plus, le séquençage de l'extrémité N-terminale de la protéine de type sauvage produite dans les cellules HEK et CHO confirme le clivage endogène de NL1 en C-terminal des résidus Lys<sup>62</sup>-Arg<sup>63</sup> (résultats non présentés).

L'identité de la prohormone convertase responsable de la maturation et du clivage de NL1 demeure inconnue. Selon le tissu où NL1 est exprimé, un ou plusieurs membre(s) de la famille des prohormones convertases pourraient participer à sa maturation. Dans le testicule, où la forme sécrétée de NL1 est la plus abondante (Ikeda et al. 1999), on retrouve les convertases furine, PC4, PC5 et PC7 (Seidah et al. 1994, Torii et al. 1993, Seidah et al. 1996). L'analyse des souris déficientes en NL1 suggère que PC4 soit un bon candidat pour la maturation de NL1 dans le testicule. En effet, tout comme les souris *NL1*<sup>-/-</sup>, les mâles déficients en PC4 sont infertiles. De plus, l'infertilité observée chez les souris *Pc4*<sup>-/-</sup> provient à la fois d'une faible capacité à fertiliser les oeufs et d'un problème développemental survenant après l'événement de fertilisation (Mbikay et al.

1997) (voir chapitre 2). L'analyse de l'expression de NL1 chez les souris déficientes en PC4 permettrait de confirmer l'importance de cette prohormone convertase dans la maturation et la sécrétion de NL1 dans le testicule.

Bien que le testicule constitue le site majeur d'expression de la forme soluble de NL1, on la retrouve également dans d'autres tissus tels que l'hypophyse et le système nerveux central. Dans ces tissus, NL1 pourrait être maturée par d'autres membres de la famille des prohormones convertases. La maturation de précurseurs peptidiques ou protéiques par plusieurs prohormones convertases n'est pas chose rare. Par exemple, le précurseur des enképhaline, la proenképhaline, peut être maturé par la PC1, la PC2 et la furine (Breslin et al. 1993). Le précurseur peptidique PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) est exprimé dans plusieurs tissus dont le cerveau et le testicule. Au niveau du testicule PACAP est maturé par PC4 tandis que dans les cellules neuroendocriniennes PACAP peut être maturé par PC1 et PC2 (Li et al. 2000). Ainsi, plusieurs prohormones convertases sont susceptibles de participer à la maturation de NL1 dans différents tissus.

NL1 est le seul membre de la famille de l'EPN dont l'existence sous forme sécrétée a clairement pu être établie. En effet, bien que plusieurs études rapportent la présence d'une forme soluble de l'EPN dans certains fluides corporels (sang, urine, liquide céphalo-rachidien, liquide amniotique, liquide synovial) il semblerait qu'elle dériverait de la forme membranaire localisée à la membrane plasmique plutôt que de la sécrétion d'une forme soluble proprement dite. On croit que l'EPN soluble proviendrait en fait d'une fragmentation des membranes ou de la dégradation de la protéine membranaire. Ces phénomènes se produisent chez les individus sains lors du renouvellement des cellules des tissus et prennent une plus grande importance chez les personnes souffrant de certaines pathologies telles que l'insuffisance rénale, l'ARDS (adult respiratory distress syndrome) et la sarcoïdose. L'EPN soluble a d'ailleurs été détectée dans les fluides de sujets atteints de ces différentes maladies. L'EPN détectée dans le sang et le liquide synovial pourrait provenir des neutrophiles et des leucocytes qui l'expriment. Par ailleurs, on ne peut exclure que l'EPN soluble, détectée dans certains fluides biologiques, corresponde en fait à une enzyme similaire telle que NL1. En effet, plusieurs de ces études se basaient uniquement sur des essais enzymatiques tels que des tests d'inhibition avec le phosphoramidon et le thiorphan afin de vérifier la présence d'EPN soluble. NL1 étant également inhibée par ces agents pharmacologiques, ces seules expériences sont clairement insuffisantes pour discriminer entre l'EPN

soluble et une autre enzyme lui ressemblant de façon considérable. Néanmoins, la présence d'une réelle forme soluble de l'EPN ne peut être écartée. La purification de l'enzyme des liquides biologiques et son séquençage permettront d'en savoir plus sur cette forme soluble de l'EPN.

### 7.2.1 MMEL2: homologue humain de NL1?

Par homologie de séquence à NL1, MMEL2 fut cloné à partir d'une banque de cerveau humain. MMEL2 est une protéine de 770 acides aminés présentant toutes les caractéristiques structurales de la famille de l'EPN. MMEL2 est hautement identique à NL1 avec 77,5% d'identité au niveau de la séquence protéique. Bien que ce pourcentage d'identité entre les deux espèces semble élevé, il n'est pas suffisant pour conclure qu'il s'agit de la même protéine. En effet, chez les membres de la famille de l'EPN, une même protéine, présente chez deux espèces différentes, montre généralement plus de 90% d'identité avec la séquence protéique de l'autre espèce. Par contre, pour d'autres familles d'enzymes telles que la famille de l'aldolase, ou des astacines, un pourcentage aussi élevé aurait cependant permis de conclure qu'il s'agit effectivement de la même protéine, présente chez deux espèces différentes.

La localisation cellulaire de MMEL2 et NL1 sème également le doute quant à l'identité de ces deux protéines. En effet, contrairement à NL1 qui peut être produite sous forme soluble, MMEL2 est détectée à l'intérieur des cellules transfectées, plus précisément au niveau du réticulum endoplasmique. Pourtant, MMEL2 possède également un site potentiel de clivage par les prohormones convertases situé immédiatement en aval du domaine transmembranaire. Toutefois, les acides aminés qui composent le site potentiel de clivage ainsi que ceux qui l'entourent ne sont pas conservés à 100%. Une possibilité serait que le site de clivage de MMEL2 soit potentiellement moins idéal comparativement à celui de NL1. L'analyse de la séquence des substrats clivés par la furine a permis de constater que le site P1' est souvent occupé par une sérine et que la position P2' doit contenir un acide aminé hydrophobe aliphatique. Ainsi, la présence d'une proline, un acide aminé cyclique et rigide, en position P2' du site de clivage de MMEL2 pourrait influencer la capacité de l'enzyme à être clivée. Il faut cependant noter que certaines protéines précurseurs présentant une proline en position P2' telles que la pronociceptine, la prorénine et la POMC



sont efficacement maturées par les prohormones convertases *in vivo*. Il serait donc possible que la lignée cellulaire HEK-293, dans laquelle MMEL2 fut exprimée, ne contienne simplement pas la prohormone convertase qui serait spécifique à la maturation et à la sécrétion de MMEL2 *in vivo*. D'ailleurs, les études de Rose et al. (2002) semblent indiquer que l'expression de NL1 est régulée de façon spécifique dans les cellules endocriniennes AtT20. L'expression de MMEL2 dans d'autres types cellulaires tels que les cellules de testicules humaines Hs 1.Tes permettra peut-être de détecter la forme mature soluble de la protéine.

Les résultats les plus convaincants permettant d'identifier MMEL2 en tant qu'homologue humain de NL1 viennent de la localisation du gène et de l'expression tissulaire des deux protéines. En effet, NL1 et MMEL2 montrent une distribution tissulaire similaire. De plus, MMEL2 est localisée au niveau du locus chromosomique 1p36 (Bonvouloir et al. 2001) le paragène de la partie distale du chromosome 4 murin où nous avons localisé le gène de *NL1* (Mélanie Carpentier, résultats non présentés). Cette équivalence de localisation chromosomique suggère qu'il s'agit du même gène. Cependant on ne peut écarter l'hypothèse d'une duplication d'un de ces gènes menant à la localisation très rapprochée des gènes de *NL1* et *MMEL2*. C'est le cas par exemple de ECE-1 qui est localisée, tout comme MMEL2, au niveau du locus 1p36. La comparaison des génomes murins et humains nous permettra de déterminer si MMEL2 est l'homologue humain de NL1. En effet, l'absence de nouveaux membres de l'EPN dans ces génomes constituera une preuve supplémentaire quant à l'identité des deux protéines. Il est à noter qu'aucun autre membre de la famille de l'EPN n'a été identifié suite au séquençage du génome humain. Toutefois, la possibilité de l'élimination de certaines peptidases au cours de l'évolution ne peut cependant pas être écartée.

### 7.2.2 Fonctions physiologiques de NL1

Les études de buvardage Northern, d'hybridation *in situ* et de RT-PCR ont permis d'identifier le transcrite de *NL1* dans plusieurs tissus. Cependant, son abondante expression dans les cellules germinales des testicules et sa présence spécifique au niveau des spermatides ronds et allongés suggèrent un rôle pour NL1 dans les processus liés à la reproduction. L'analyse des souris déficientes en NL1 a d'ailleurs permis de confirmer cette hypothèse (Carpentier et al. 2003) (voir chapitre 6). Les sections qui suivent complètent

la discussion retrouvée dans les chapitres 4, 5 et 6 de cette thèse concernant les fonctions physiologiques potentielles de NL1.

### 7.2.3 Rôle(s) de NL1 dans la reproduction

La première étape du développement d'un nouvel individu débute suite à la rencontre entre un gamète mâle et un gamète femelle. Cette étape, essentielle dans la création d'un nouvel organisme, est appelée la fécondation. Chez les mammifères, la fécondation se produit lorsqu'un spermatozoïde fusionne avec l'ovocyte pour former le zygote, qui constitue la première cellule du nouvel individu. La rencontre entre l'ovocyte et le spermatozoïde est un phénomène complexe, nécessitant la réalisation de plusieurs étapes coordonnées de façon extrêmement précises. Les principales étapes menant à la fécondation de l'ovocyte sont:

1. Transport, capacitation et attraction des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle
2. Traversée de la matrice externe (cumulus et corona radiata) qui entoure l'ovocyte
3. Reconnaissance de la zone pellucide par les spermatozoïdes (fait intervenir la glycoprotéine ZP3)
4. Liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide
5. Réaction acrosomale (libération d'enzymes hydrolytiques dans le voisinage immédiat de l'ovocyte)
6. Traversée de la zone pellucide
7. Fusion membranaire entre les gamètes
8. Activation de l'oeuf.

Pour qu'il y ait fécondation, les gamètes doivent d'abord être produits puis transportés à l'intérieur des tractus reproducteurs mâles et femelle. Ce voyage les mène jusqu'au site de leur rencontre au niveau de l'ampoule de l'oviduct chez la femelle. Lors de leur sinueux passage dans les tractus reproducteurs mâle et femelle les spermatozoïdes sont activés grâce à une série de modifications. Ces modifications qui augmentent la capacité des spermatozoïdes à féconder sont connues sous le terme général de capacitation. Afin de pouvoir féconder l'oeuf, le spermatozoïde doit d'abord traverser le cumulus, la corona radiata et la zone pellucide. Cette pénétration va provoquer des modifications profondes au niveau de l'ovocyte et du spermatozoïde. C'est la mobilité du spermatozoïde, aidée par l'équipement enzymatique de son acrosome qui va lui permettre d'effectuer cette pénétration. L'acrosome, une vésicule de sécrétion d'origine Golgienne, contient un équipement

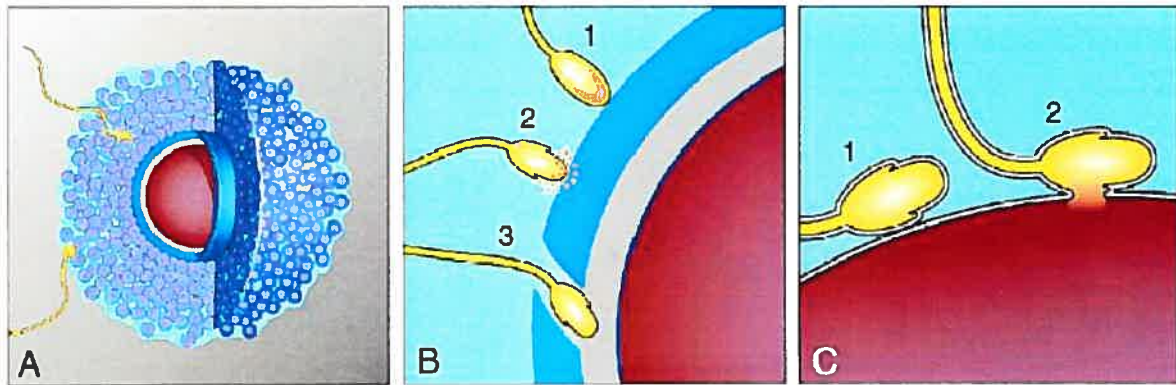


Figure 7.4 – **La fertilisation de l'oeuf.**(A) Pénétration du spermatozoïde à travers des cellules du cumulus (mauve). (B) L'oeuf est représenté sans les cellules du cumulus. 1) Le spermatozoïde commence par se lier à la zone pellucide (en bleu). Par la suite, le spermatozoïde (2) relâche le contenu de son acrosome par un processus d'exocytose spécifique appelé réaction acrosomale. Ceci permet au spermatozoïde de traverser la zone pellucide et d'entrer dans l'espace périvitellin (en gris)(3). (C) Une fois dans l'espace périvitellin, à l'aide de la région équatoriale de sa tête, le spermatozoïde se lie à la membrane plasmique de l'oeuf (1) et fusionne avec elle (2). L'activation de l'oeuf suite à la fusion des membranes marque la fin du processus de fertilisation.

enzymatique spécifique. Certaines enzymes (dont des protéases) sont libres dans la cavité de l'acrosome et vont pouvoir sortir du spermatozoïde en traversant la membrane externe de l'acrosome. D'autres, sont liées à la membrane interne de l'acrosome et seront libérées uniquement après la réaction acrosomale. Une fois lié à la zone pellucide, le spermatozoïde subit la réaction acrosomale qui est caractérisée par une exocytose du contenu de l'acrosome. La réaction acrosomale va provoquer la libération d'enzymes dont certaines ont une activité protéasique, permettant la digestion partielle de la zone pellucide et la traversée de celle-ci par le spermatozoïde. En plus de la relâche d'enzymes hydrolytiques, la réaction acrosomale déclenche le remodelage de la surface du spermatozoïde. Une portion de la membrane plasmique originale est entre autre remplacée par la membrane acrosomale interne nouvellement exposée. La réaction acrosomale permet entre autre aux gamètes mâles de pénétrer dans l'espace périvitellin et d'entrer en contact avec la membrane plasmique de l'ovocyte. Ce contact permet la fusion membranaire des deux gamètes ainsi que la libération du contenu du spermatozoïde dans l'ovocyte (Figure 7.4).

De nombreuses métallopeptidases participent activement à plusieurs étapes du processus de reproduction allant de la spermatogénèse à la régulation de la fusion des membranes

entre le spermatozoïde et l'oocyte. Par exemple, des peptidases à zinc membranaires ou sécrétées sont impliquées dans le remodelage des tubules séminifères lors de la spermatogénèse en modulant l'activité de peptides bioactifs. Les métalloprotéases de la matrice (MMPs) et les métalloprotéases à zinc de la famille ADAMs, présentes au niveau des spermatozoïdes, participent également au processus de fertilisation. Ainsi, NL1 pourrait, tout comme ces enzymes, participer à une ou plusieurs étapes du processus menant à la fécondation et à la formation du zygote.

Par exemple, NL1, en étant sécrétée localement par les spermatides dont la machinerie de sécrétion est encore intacte pourrait participer à la régulation de la spermatogénèse. NL1 pourrait également être acheminée au niveau de l'acrosome des spermatozoïdes pour y être emmagasinée. D'ailleurs la formation de l'acrosome a lieu dans les spermatides en voie de maturation, cellules dans lesquelles le transcrit de NL1 peut être détecté. En régulant l'activité de certains peptides, NL1 pourrait participer à l'une ou l'autre des étapes menant à la fécondation comme la pénétration du spermatozoïde à travers la zone pellucide ou encore la fusion entre les membranes plasmiques de l'ovocyte et du spermatozoïde.

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), une métallopeptidase de la famille des gluzincines partageant plusieurs caractéristiques avec les enzymes de la famille de l'EPN, joue un rôle important dans la fertilité masculine. L'ACE partage même certains substrats peptidiques avec l'EPN et NL1 dont la bradykinine. Des composés permettant d'inhiber du même coup l'EPN et l'ACE ont d'ailleurs été développés. L'isoforme de l'ACE, spécifique aux cellules germinales, est retrouvée uniquement dans les spermatides et les spermatozoïdes matures. L'inactivation du gène de l'ACE spécifique aux testicules provoque une réduction marquée de la fertilité des mâles homozygotes pour la mutation (Hagaman et al. 1998). Certains aspects du phénotype observé chez les souris déficientes en ACE ressemblent au phénotype des souris *Nl1*<sup>-/-</sup> que nous avons observé. En effet, tout comme chez les souris *Nl1*<sup>-/-</sup>, il semblerait que la spermatogénèse chez les souris *ACE*<sup>-/-</sup> se déroule normalement. De plus, les spermatozoïdes de souris déficientes en ACE ne peuvent être distingués des spermatozoïdes de souris de type sauvage sur le plan de la viabilité, de la motilité, de la capacitation et de l'induction de la réaction acrosomale. Cependant, malgré la présence de paramètres fonctionnels normaux, très peu de spermatozoïdes déficients en ACE atteignent l'ampoule ainsi que les régions distales de l'oviduct. Ces spermatozoïdes montrent entre autre, un problème de transport dans le

tractus reproducteur femelle. Durant leur transit dans le tractus reproducteur femelle, les spermatozoïdes peuvent lier l'épithélium de l'utérus et de l'oviduct. La liaison à l'épithélium oviductal agit comme réservoir de spermatozoïdes jusqu'à ce que l'ovulation ait lieu. L'absence de l'ACE pourrait faire en sorte que les spermatozoïdes se détachent plus difficilement de l'épithélium. Ainsi, moins de spermatozoïdes seraient en mesure d'atteindre l'oeuf afin de le fertiliser. Par ailleurs, en plus du problème de transport dans l'oviduct, les spermatozoïdes provenant de souris  $ACE^{-/-}$  semblent plus difficilement capable de lier la zone pellucide ce qui réduirait de surcroît le nombre de spermatozoïdes capables de féconder l'ovocyte. Finalement, l'angiotensine ne semble pas être le substrat sur lequel agit l'ACE germinale puisque les souris déficientes en angiotensine ne présentent aucun problème de fertilité.

Lors de l'analyse du phénotype des souris déficientes en *NL1*, nous avons pu observer une diminution du nombre d'oeufs fertilisés par les spermatozoïdes de souris  $NL1^{-/-}$  comparativement au nombre de ceux fécondés par les spermatozoïdes de souris de type sauvage. L'origine de cette diminution n'a toutefois pas été identifiée. Tout comme chez les souris déficientes en ACE, les paramètres fonctionnels des spermatozoïdes des souris  $NL1^{-/-}$  semblent, à première vue, normaux. En plus d'une activité de type ACE, une activité de type EPN pouvant être inhibée par le phosphoramidon, fut également détectée dans les spermatozoïdes de plusieurs espèces de mammifères (Siems et al. 2003, Diaz-Perez & Meizel 1992). Une des possibilités serait que les spermatozoïdes  $NL1^{-/-}$  soient également plus difficilement transportés dans l'oviduct. Des études futures permettront de déterminer si un mauvais transport des spermatozoïdes dans l'oviduct ou encore si un problème de liaison à la zone pellucide est à l'origine de la plus faible quantité d'oeufs fertilisés par les mâles déficients en *NL1*.

Tel que mentionné précédemment, des activités de type métalloprotéases furent impliquées dans différentes étapes menant à la fertilization. Diaz-Perez & Meizel (1992) ont étudié, à l'aide d'un système hétérologue (spermatozoïdes humains et oeufs de hamster dépourvus de zone pellucide), l'implication d'une activité métalloendoprotéase précoce dans la fusion des gamètes. Dans cette étude, la fusion des gamètes était inhibée uniquement si des inhibiteurs de métalloprotéases tels que le phosphoramidon, étaient présents durant la réaction acrosomale (Diaz-Perez et al. 1988). La présence d'inhibiteurs durant l'étape de liaison entre gamètes avait peu ou pas d'effets sur la fusion entre les membranes du

spermatozoïde et de l'oeuf. Ainsi, cette/ces métalloprotéase(s) serai(en)t positionnée(s) de façon à pouvoir agir sur la surface des spermatozoïdes humains lors de la réaction acrosomale. Il fut proposé que cette métalloprotéase soit localisée au niveau de l'acrosome de façon à modifier la surface des spermatozoïdes humains dans le but de moduler leur habileté à fusionner avec l'ovocyte. De plus, la présence de phosphoramidon durant la réaction acrosomale ne semble pas avoir d'effets sur le déclenchement de celle-ci ou sur la motilité apparente des spermatozoïdes. Les auteurs ont plutôt observé une diminution d'environ 50% du nombre de spermatozoïdes pouvant fusionner avec l'oeuf. L'activité métalloendoprotéase observée était en partie relâchée durant la réaction acrosomale induite par l'ionomycine. D'ailleurs, l'incubation de milieu conditionné de réaction acrosomale contenant l'activité métalloendoprotéase avec des spermatozoïdes préalablement traités au phosphoramidon permet de renverser l'effet de l'inhibiteur sur la fusion des gamètes.

La présence d'une activité métalloendoprotéase chez les spermatozoïdes de mammifères pouvant être inhibée par le phosphoramidon suggère l'implication d'un ou plusieurs membre(s) de la famille de l'EPN dans cette activité. Cependant, le caractère soluble de l'activité identifiée par Diaz-Perez & Meizel (1992) suggère que NL1 puisse constituer l'enzyme responsable de l'activité métalloendoprotéase impliquée dans la fusion des gamètes. De plus, il est peu probable que l'enzyme responsable de cette activité soit l'EPN puisqu'aucune étude de localisation n'a permis de détecter l'enzyme ou son transcrite dans les cellules germinales telles que les spermatozoïdes. L'implication de NL1 dans la fusion des gamètes pourrait permettre d'expliquer la baisse de fertilité des mâles déficients en NL1 que nous avons pu observer. Des études similaires à celles effectuées par Diaz-Perez & Meizel (1992) avec des spermatozoïdes de souris *Nl1*<sup>-/-</sup> ou des inhibiteurs plus spécifiques pourraient permettre de valider cette hypothèse.

Bien que les mécanismes physiologiques qui induisent et maintiennent la motilité des spermatozoïdes ait été étudiés abondamment, l'effet de plusieurs facteurs est toujours inconnu. Récemment, l'effet de la bradykinine, un substrat potentiel de NL1, sur la motilité et la vitalité des spermatozoïdes de mammifères fut étudié. Dans cette étude, un effet stimulateur sur la motilité des spermatozoïdes a pu être observé en présence de quantité croissante de bradykinine (Siems et al. 2003). De plus, cet effet est potentialisé par la présence d'inhibiteurs de l'ACE (lisonopril) et/ou de l'EPN (phosphoramidon) chez toutes les espèces étudiées (bovin, mouton, humain et sanglier). Ainsi, les auteurs ont conclu que

conclus que la ACE et l'EPN étaient les deux enzymes principalement responsables de la dégradation de la bradykinine par les spermatozoïdes chez quatre espèces de mammifères. Or, tel que nous l'avons démontré, l'activité de NL1 peut également être inhibée par le phosphoramidon. Il serait donc possible que l'activité de type EPN observée par Siems et al. (2003) puisse être attribuable à la présence de NL1. Toutefois, il s'agirait ici de la forme membranaire plutôt que de la forme sécrétée de l'enzyme. Ainsi, NL1 présente à la surface des spermatozoïdes pourrait participer à la régulation du signal chémotactique de la bradykinine mais également de d'autres peptides (exemple: substance P, angiotensine, endothélines) présents dans le tractus génital femelle.

La présence d'une enzyme possédant les mêmes caractéristiques enzymatiques que NL1 fut rapportée plus d'une fois. Bien que cette activité fut précédemment attribuée à l'EPN, l'identification récente de NL1 suggère que cette activité pourrait être liée à sa présence. Toutefois, certaines études récentes viennent mettre en doute la présence même d'une activité de type EPN dans les spermatozoïdes. En effet, Fernandez et al. (2002), n'ont pas pu détecter d'activité de type EPN dans les spermatozoïdes humains. De plus, Correa et al. (2000) n'ont également pu observer d'inhibition de la fusion des gamètes par le phosphoramidon chez la souris. La nature de ces divergences n'a jusqu'à maintenant pu être expliquée. Ainsi, les études précédemment exposées devront être confirmées par des expériences futures.

#### 7.2.4 Autres rôles potentiels de NL1

Bien que NL1 soit principalement exprimée dans le testicule, son ARNm a également pu être détecté dans plusieurs tissus dont le cerveau, l'hypophyse, les reins, les poumons, les intestins et le coeur. La présence de NL1 au niveau de ces tissus suggère donc qu'elle pourrait y jouer un rôle actif en régulant l'activité de certains peptides. Vraisemblablement, dans le système nerveux, NL1 pourrait jouer un rôle similaire à celui de l'EPN en terminant le signal enclenché par la présence de certains neuropeptides tels que les enképhalines, la substance P, la bradykinine, le neuropeptide Y ou les orexines. Dans d'autres tissus, NL1 pourrait contrôler l'activité d'hormones peptidiques et ainsi participer à l'homéostasie du système. Une analyse plus précise de l'expression et de l'activité de NL1 dans ces tissus ainsi que la colocalisation de NL1 avec des substrats peptidiques potentiels ou leurs

récepteurs permettraient d'en savoir davantage sur les rôles potentiels de cette enzyme dans les différents tissus où elle est exprimée.

La localisation du gène du présumé homologue humain de NL1, MMEL2, est associée, chez l'homme, avec de nombreuses maladies génétiques. Ainsi, au locus 1p36 sont associés la neuropathie motrice héréditaire de type 2A, le syndrome de Schwartz-Jampel-Aberfield, certaines formes de dyslexie ainsi que la susceptibilité au développement de neuroblastomes. Le rôle de MMEL2/NL1 dans l'une ou l'autre de ces maladies héréditaires n'a cependant pas encore été démontré. La présence de NL1 dans le système nerveux ainsi que le rôle primordial des métallopeptidases dans le maintien de l'homéostasie laissent croire que des délétions ou des mutations dans le gène de MMEL2/NL1 pourraient entraîner un déséquilibre des fonctions cellulaires. L'investigation du rôle de MMEL2/NL1 dans ces maladies permettra éventuellement d'en savoir plus sur son implication potentielle dans certaines pathologies humaines.

### 7.2.5 Conclusions et Projets futurs.

Bien que nos études aient permis d'identifier un nouveau membre de la famille de l'EPN et de débiter sa caractérisation du point de vue biochimique, enzymatique et fonctionnel, plusieurs facettes de NL1 restent encore à être étudiées. Les sections suivantes proposent différents projets qui pourraient permettre de compléter les études jusqu'à maintenant réalisées.

#### **Localisation de la protéine.**

Les études d'expression et de localisation que nous avons effectuées devraient être complétées par des immunobuvardages de type Western et des études immunohistochimiques. Ces études permettraient de confirmer la présence de la protéine dans les différents tissus où le transcrite de NL1 a pu être détecté. Pour ce faire, un bon anticorps, spécifique à NL1 devra d'abord être produit. En effet, les anticorps polyclonaux de souris ou de lapin actuellement disponibles dans le laboratoire ne permettent pas de détecter de façon spécifique la protéine dans les tissus. Le développement d'un bon anticorps permettrait de non seulement confirmer la présence de la protéine dans les tissus mais également de déterminer avec précision la localisation de la protéine. Par exemple, il serait possible de



déterminer si la protéine est présente dans le testicule et si on la retrouve également au niveau de l'acrosome du spermatozoïde. On pourrait également déterminer si NL1 est relâchée lors de la réaction acrosomale. Les études d'expression du transcrit ne permettent pas de déterminer si la protéine est exprimée dans les spermatozoïdes et les études d'activité sont peu spécifiques. En effet, aucun substrat ou inhibiteur spécifique à NL1 n'a encore été identifié. De plus, ces études ne permettent pas de détecter la présence de NL1 dans le cas où un inhibiteur endogène serait présent dans les préparations. La localisation de la protéine est essentielle à la poursuite des études d'activité enzymatique et des fonctions physiologiques de NL1.

### **Caractérisation enzymatique et identification d'inhibiteurs spécifiques.**

Pour l'instant, l'activité enzymatique de l'EPN et de NL1 ne peut dans aucun cas être distinguée. Les deux enzymes semblent démontrer la même spécificité vis-à-vis des substrats et inhibiteurs. Ceci pose problème puisque leurs patrons d'expression se recourent. Par conséquent, l'activité des deux enzymes est susceptible d'être détectée au même moment dans un tissu donné. Plusieurs études ayant pour but de caractériser le rôle et l'activité de l'EPN dans différents systèmes étaient uniquement basées sur la détection d'une activité enzymatique de type EPN et/ou de son inhibition par des inhibiteurs que l'on croyait à l'époque hautement spécifiques. Ainsi, les résultats obtenus dans certaines de ces études sont maintenant remis en doute. L'identification de substrats et d'inhibiteurs spécifiques à NL1 et à l'EPN permettrait d'évaluer plus facilement la contribution de chacune des enzymes dans un système donné et de faciliter l'identification des fonctions physiologiques non seulement de NL1 mais également de l'EPN.

### **Identification du mécanisme d'action de NL1 dans la reproduction.**

Les résultats que nous avons obtenus lors de l'analyse des souris déficientes en NL1 indiquent que NL1 joue un rôle important dans la reproduction. Nos analyses préliminaires ne nous ont cependant pas permis de localiser le moment et le site d'action de NL1. Ainsi, il serait intéressant de déterminer si le problème se situe au niveau du transport des spermatozoïdes dans l'oviduct, au niveau de la liaison à la zone pellucide, au niveau de la fusion des membranes ou ailleurs. Le développement d'un anticorps et d'inhibiteurs

spécifiques faciliteront ces études.

### Poursuites des analyses sur les souris déficientes en NL1.

L'inactivation d'un gène dans une lignée de souris constitue un outil important pour l'étude de ces fonctions physiologiques. Toutefois, il serait faux de croire que les résultats obtenus suite à cette inactivation sont simples et qu'ils dressent un portrait complet des rôles qu'une protéine peut jouer *in vivo*. Par exemple, des résultats complètement différents peuvent être obtenus selon la lignée de souris dans laquelle la mutation est introduite. Ces résultats variables reflètent généralement le fait que des gènes agissant dans des voies parallèles sont en mesure de compenser pour l'absence d'un gène donné. Ainsi, l'absence de phénotype dans un système particulier ne permet pas de conclure qu'un gène n'est pas important pour ce système mais uniquement qu'il n'est pas essentiel dans ce contexte particulier.

Les analyses que nous avons effectuées chez les souris  $NL1^{-/-}$  nous ont permis d'apprécier l'importance de NL1 dans la reproduction. Cependant, le degré d'infertilité que nous avons pu observer variait de façon importante d'un mâle mutant à l'autre. Le fond génétique mixte dans lequel ces études ont été effectuées pourrait expliquer la variabilité du phénotype observé chez les souris  $NL1^{-/-}$ . Il serait donc intéressant de purifier la lignée de souris NL1 dans plusieurs fonds génétiques différents afin de déterminer dans lequel de ces fonds le phénotype de fertilité est le plus important. D'autres phénotypes pourraient également être identifiés.

Puisque plusieurs protéines sont susceptibles de compenser pour l'absence de NL1, il pourrait être intéressant d'évaluer les niveaux d'expression de certaines peptidases chez les souris déficientes en NL1. Il fut d'ailleurs démontré que les niveaux de ECEL1 sont augmentés au niveau des os de souris déficientes en PHEX, suggérant ainsi que ECEL1 puisse compenser pour l'absence de PHEX dans ce tissu. Pour commencer, les niveaux d'expression des différents membres de la famille, en particulier l'EPN devraient donc être évalués. Par la suite, les niveaux d'expression de d'autres peptidases, partageant des substrats communs avec NL1 telles que l'ACE et l'aminopeptidase N, pourraient également être déterminés. Ces études permettraient de voir, dans quels systèmes l'activité de NL1 est susceptible d'être compensée. De plus, ces études permettraient de déterminer

si les niveaux d'expression de NL1 affectent les niveaux de synthèse de d'autres enzymes possédant des activités similaires.

Puisque les sites d'expression de NL1 et de l'EPN se chevauchent partiellement et que leurs activités peptidasiques sont très similaires, il est fort possible que l'une puisse compenser pour l'absence de l'autre. Une façon plus directe de déterminer ceci serait de générer des souris double mutantes pour NL1 et l'EPN. De telles études permettent souvent de révéler des résultats inattendus. Par exemple, les souris double mutantes pour ECE-1 et ECE-2 présentent un phénotype cardiaque absent des souris déficientes en ECE-1 ou ECE-2. La disponibilité des deux lignées de souris  $Nl1^{-/-}$  et  $EPN^{-/-}$  dans le laboratoire nous a permis d'initier ce projet. L'analyse des phénotypes de ces souris permettra de déterminer dans quels systèmes les deux protéines sont impliquées et dans quels systèmes l'une était en mesure de compenser pour l'absence de l'autre.

Afin de déterminer quels sont les substrats de NL1, des études radioimmunologiques de type RIA (radio-immuno-assay) pourraient être effectuées sur les souris déficientes en NL1. Ces études permettraient de voir si certains des substrats potentiels jusqu'à maintenant identifiés sont moins dégradés en absence de NL1. Ces études combinées à des analyses de colocalisation et à des études d'activité pourraient mener à l'identification des substrats peptidiques de NL1.

Finalement, nos analyses sur les souris déficientes en NL1 se sont limitées au système reproducteur masculin. NL1 étant exprimée dans plusieurs autres tissus il serait intéressant d'aller étudier l'effet de l'absence de NL1 dans ces systèmes. Par exemple, puisque NL1 dégrade la leu-enképhaline *in vitro* et que son transcrite est exprimé dans des régions associées à la nociception, il serait intéressant d'évaluer le rôle de NL1 dans la modulation du signal nociceptif.

Bien que l'ensemble des études que nous avons effectuées ont clairement permis d'avancer les connaissances que nous avons sur NL1, énormément de questions restent encore à être posées. Les outils que nous avons développés, notamment les souris déficientes en NL1, permettront certainement de faciliter la réponse à ces questions.

## 7.3 Conclusions générales

Pendant près de 20 ans, l'EPN fut considérée comme une endopeptidase de mammifère unique exprimée dans une vaste gamme de tissus et possédant une large spécificité de substrats. Elle semblait également agir sur divers systèmes physiologiques en terminant l'action des neuropeptides. Depuis quelques années, la famille de l'EPN s'est diversifiée et est dorénavant impliquée non seulement dans l'inactivation de peptides bioactifs mais également dans leur activation. Les études des dernières années ont permis de déterminer l'importance de la famille de l'EPN dans plusieurs systèmes tels que la régulation du métabolisme osseux, la reproduction, la régulation de la pression artérielle et le contrôle de la respiration. De plus, de récentes avancées semblent souligner le rôle protecteur de la famille de l'EPN dans certaines situations pathologiques telles que la maladie d'Alzheimer.

Du point de vue pharmacologique, l'identification d'un nouveau membre de la famille peut entraîner des conséquences importantes. Plusieurs produits pharmacologiques ont été créés au cours des dernières années dans le but de réguler l'action des peptidases de la famille de l'EPN. Ainsi, des inhibiteurs jugés spécifiques à certains membres de la famille actuellement utilisés en clinique et dans les laboratoires de recherche pourraient également affecter NL1. Ceci remet en question les hypothèses découlant de l'utilisation de ces agents et permet possiblement d'expliquer certains effets secondaires résultant de l'administration de ces produits dits spécifiques. Finalement, l'appréciation récente du rôle de plusieurs membres de la famille de l'EPN dans la protection contre certaines maladies telles que la maladie d'Alzheimer souligne certainement davantage le besoin d'identifier des inhibiteurs hautement spécifiques non seulement du point de vue de l'enzyme cible mais également du point de vue du tissu cible. Une meilleure connaissance des enzymes de la famille de l'EPN et de leurs fonctions permettra un meilleur traitement de plusieurs pathologies humaines.

---

# Bibliographie

- Abassi, Z. A., Golomb, E., Bridenbaugh, R. & Keiser, H. R. (1993), 'Metabolism of endothelin-1 and big endothelin-1 by recombinant neutral endopeptidase ec.3.4.24.11', *Br. J. Pharmacol.* **109**(4), 1024–1028.
- Aberdam, E., Auberger, P., Ortonne, J. P. & Ballotti, R. (2000), 'Neprilysin, a novel target for ultraviolet b regulation of melanogenesis via melanocortins', *J. Invest Dermatol.* **115**(3), 381–387.
- Akiyama, H., Kondo, H., Ikeda, K., Kato, M. & McGeer, P. L. (2001), 'Immunohistochemical localization of neprilysin in the human cerebral cortex: inverse association with vulnerability to amyloid beta-protein (abeta) deposition', *Brain Res.* **902**(2), 277–281.
- Almenoff, J., Teirstein, A. S., Thornton, J. C. & Orlowski, M. (1984), 'Identification of a thermolysin-like metalloendopeptidase in serum: activity in normal subjects and in patients with sarcoidosis', *J Lab Clin Med* **103**(3), 420–31.
- Almenoff, J., Wilk, S. & Orlowski, M. (1981), 'Membrane bound pituitary metalloendopeptidase: apparent identity to enkephalinase', *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **102**(1), 206–214.
- Anderson, E. D., Thomas, L., Hayflick, J. S. & Thomas, G. (1993), 'Inhibition of hiv-1 gp160-dependent membrane fusion by a furin-directed alpha 1-antitrypsin variant', *J. Biol. Chem.* **268**(33), 24887–24891.
- Annaert, W. & Strooper, B. D. (1999), 'Presenilins: molecular switches between proteolysis and signal transduction', *Trends Neurosci.* **22**(10), 439–443.
- Apelt, J., Ach, K. & Schliebs, R. (2003), 'Aging-related down-regulation of neprilysin, a putative beta-amyloid-degrading enzyme, in transgenic tg2576 alzheimer-like mouse brain is accompanied by an astroglial upregulation in the vicinity of beta-amyloid plaques', *Neurosci. Lett.* **339**(3), 183–186.
- Appelboom, T., de Maertelaer, V., de Prez, E., Hauzeur, J. P. & Deschodt-Lanckman, M.

- (1991), 'Enkephalinase: a physiologic neuroimmunomodulator detected in the synovial fluid', *Arthritis Rheum* **34**(8), 1048–51.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D. & Smith, J. A. (1988), *Current protocols in molecular biology*, Wiley Interscience, New-York.
- Aviv, R., Gurbanov, K., Hoffman, A., Blumberg, S. & Winaver, J. (1995), 'Urinary neutral endopeptidase 24.11 activity: modulation by chronic salt loading', *Kidney Int.* **47**(3), 855–860.
- Ayer-Lelievre, C., Olson, L., Ebendal, T., Hallbook, F. & Persson, H. (1988), 'Nerve growth factor mrna and protein in the testis and epididymis of mouse and rat', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**(8), 2628–2632.
- Back, S. A. & Gorenstein, C. (1989a), 'Fluorescent histochemical localization of neutral endopeptidase-24.11 (enkephalinase) in the rat spinal cord', *J Comp Neurol* **280**(3), 436–50.
- Back, S. A. & Gorenstein, C. (1989b), 'Histochemical visualization of neutral endopeptidase-24.11 (enkephalinase) activity in rat brain: cellular localization and codistribution with enkephalins in the globus pallidus', *J. Neurosci.* **9**(12), 4439–4455.
- Back, S. A. & Gorenstein, C. (1990), 'Localization of neutral endopeptidase-24.11 (enkephalinase) to n-methyl-d-aspartate sensitive cell populations in the rat forebrain', *Prog. Clin. Biol. Res.* **328**, 199–202.
- Back, S. A. & Gorenstein, C. (1994), 'Differential response of neutral endopeptidase 24.11 ("enkephalinase"), and cholinergic and opioidergic markers to hypoglossal axotomy', *J. Comp Neurol.* **340**(2), 149–160.
- Backstrom, J. R., Lim, G. P., Cullen, M. J. & Tokes, Z. A. (1996), 'Matrix metalloproteinase-9 (mmp-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40)', *J. Neurosci.* **16**(24), 7910–7919.
- Baraniuk, J. N., Castellino, S., Lundgren, J. D., Goff, J., Mullol, J., Merida, M., Shelhamer, J. H. & Kaliner, M. A. (1990), 'Neuropeptide y (npy) in human nasal mucosa', *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **3**(2), 165–173.
- Barker, P. E., Shipp, M. A., D'Adamio, L., Masteller, E. L. & Reinherz, E. L. (1989), 'The

- common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3 (q21-q27)', *J. Immunol.* **142**(1), 283–287.
- Barnes, K. & Turner, A. J. (1997), 'The endothelin system and endothelin-converting enzyme in the brain: molecular and cellular studies', *Neurochem Res* **22**(8), 1033–40.
- Barnes, K., Turner, A. J. & Kenny, A. J. (1988), 'Electronmicroscopic immunocytochemistry of pig brain shows that endopeptidase-24.11 is localized in neuronal membranes', *Neurosci. Lett.* **94**(1-2), 64–69.
- Barnes, K., Turner, A. J. & Kenny, A. J. (1993a), 'Co-localisation of substance p and endopeptidase-24.11 in pig substantia nigra: an ultrastructural study', *Biochem Soc Trans* **21**(Pt 3)(3), 246S.
- Barnes, K., Turner, A. J. & Kenny, A. J. (1993b), 'An immunoelectron microscopic study of pig substantia nigra shows co-localization of endopeptidase-24.11 with substance p', *Neuroscience* **53**(4), 1073–1082.
- Bawab, W., Aloyz, R. S., Crine, P., Roques, B. P. & DesGroseillers, L. (1993), 'Identification and characterization of a neutral endopeptidase activity in aplysia californica', *Biochem. J.* **296** ( Pt 2), 459–465.
- Beaumont, A., Brouet, J. C. & Roques, B. P. (1989), 'Neutral endopeptidase 24.11 and angiotensin converting enzyme like activity in calla positive and calla negative lymphoid cells', *Biochem Biophys Res Commun* **160**(3), 1323–9.
- Beaumont, A., Moual, H. L., Boileau, G., Crine, P. & Roques, B. P. (1991), 'Evidence that both arginine 102 and arginine 747 are involved in substrate binding to neutral endopeptidase (ec 3.4.24.11)', *J Biol Chem* **266**(1), 214–20.
- Belanger, L. F., Roy, S., Tremblay, M., Brott, B., Steff, A. M., Mourad, W., Hugo, P., Erikson, R. & Charron, J. (2003), 'Mek2 is dispensable for mouse growth and development', *Mol. Cell Biol.* **23**(14), 4778–4787.
- Benjannet, S., Savaria, D., Laslop, A., Munzer, J. S., Chretien, M., Marcinkiewicz, M. & Seidah, N. G. (1997), 'Alpha1-antitrypsin portland inhibits processing of precursors mediated by proprotein convertases primarily within the constitutive secretory pathway', *J. Biol. Chem.* **272**(42), 26210–26218.
- Benoit, A., Vargas, M., DesGroseillers, L. & Boileau, G. (2004), 'Endothelin-converting enzyme-like 1 (ecel1) is present in the plasma membrane but is mostly localized in the

- endoplasmic reticulum where it is specifically retained by its transmembrane domain', *manuscrit en préparation* .
- Bertram, L., Blacker, D., Mullin, K., Keeney, D., Jones, J., Basu, S., Yhu, S., McInnis, M. G., Go, R. C., Vekrellis, K., Selkoe, D. J., Saunders, A. J. & Tanzi, R. E. (2000), 'Evidence for genetic linkage of alzheimer's disease to chromosome 10q', *Science* **290**(5500), 2302–2303.
- Boettger, A., Kertscher, U., Steinmann, C., Baeger, U., Siems, W. E. & Heder, G. (1993), 'Degradation of bradykinin in semen of ram and boar', *Biochem. Pharmacol.* **45**(10), 1983–1988.
- Boileau, G., Tenenhouse, H. S., DesGroseillers, L. & Crine, P. (2001), 'Characterization of phex endopeptidase catalytic activity: identification of parathyroid-hormone-related peptide107-139 as a substrate and osteocalcin, ppi and phosphate as inhibitors', *Biochem J* **355**(Pt 3), 707–13.
- Bonvouloir, N., Lemieux, N., Crine, P., Boileau, G. & DesGroseillers, L. (2001), 'Molecular cloning, tissue distribution, and chromosomal localization of mmel2, a gene coding for a novel human member of the neutral endopeptidase-24.11 family', *DNA Cell Biol.* **20**(8), 493–498.
- Borson, D. B. (1991), 'Roles of neutral endopeptidase in airways', *Am J Physiol* **260**(4 Pt 1), 212–25.
- Borson, D. B., Brokaw, J. J., Sekizawa, K., McDonald, D. M. & Nadel, J. A. (1989), 'Neutral endopeptidase and neurogenic inflammation in rats with respiratory infections', *J Appl Physiol* **66**(6), 2653–8.
- Borson, D. B. & Gruenert, D. C. (1991), 'Glucocorticoids induce neutral endopeptidase in transformed human tracheal epithelial cells', *Am. J. Physiol* **260**(2 Pt 1), L83–L89.
- Bourne, A. & Kenny, A. J. (1990), 'The hydrolysis of brain and atrial natriuretic peptides by porcine choroid plexus is attributable to endopeptidase-24.11', *Biochem. J.* **271**(2), 381–385.
- Bowe, A. E., Finnegan, R., de Beur, S. M. J., Cho, J., Levine, M. A., Kumar, R. & Schiavi, S. C. (2001), 'Fgf-23 inhibits renal tubular phosphate transport and is a phex substrate', *Biochem Biophys Res Commun* **284**(4), 977–81.
- Breslin, M. B., Lindberg, I., Benjannet, S., Mathis, J. P., Lazure, C. & Seidah, N. G.



- (1993), 'Differential processing of proenkephalin by prohormone convertases 1(3) and 2 and furin', *J. Biol. Chem.* **268**(36), 27084–27093.
- Breyer, P. R., Rothrock, J. K., Beaudry, N. & Pescovitz, O. H. (1996), 'A novel peptide from the growth hormone releasing hormone gene stimulates sertoli cell activity', *Endocrinology* **137**(5), 2159–2162.
- Brizard, F., Luo, M. & DesGroseillers, L. (2000), 'Genomic organization of the human and mouse stau genes', *DNA Cell Biol.* **19**(6), 331–339.
- Brown, C. D., Barnes, K. & Turner, A. J. (2000), 'Functional significance of the isoforms of endothelin-converting enzyme-1', *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36**(5 Suppl 1), S26–S27.
- Bunnett, N. W., Debas, H. T., Turner, A. J., Kobayashi, R. & Walsh, J. H. (1988), 'Metabolism of gastrin and cholecystokinin by endopeptidase 24.11 from the pig stomach', *Am J Physiol* **255**(5 Pt 1), 676–84.
- Bunnett, N. W., Orloff, M. S. & Turner, A. J. (1985), 'Catabolism of substance p in the stomach wall of the rat', *Life Sci* **37**(7), 599–606.
- Bunnett, N. W., Turner, A. J., Hryszko, J., Kobayashi, R. & Walsh, J. H. (1988), 'Isolation of endopeptidase-24.11 (ec 3.4.24.11, "enkephalinase") from the pig stomach. hydrolysis of substance p, gastrin-releasing peptide 10, [leu5] enkephalin, and [met5] enkephalin', *Gastroenterology* **95**(4), 952–7.
- Bur, D., Dale, G. E. & Oefner, C. (2001), 'A three-dimensional model of endothelin-converting enzyme (ece) based on the x-ray structure of neutral endopeptidase 24.11 (nep)', *Protein Eng* **14**(5), 337–341.
- Burgermeister, P., Calhoun, M. E., Winkler, D. T. & Jucker, M. (2000), 'Mechanisms of cerebrovascular amyloid deposition. lessons from mouse models', *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **903**, 307–316.
- Burns, D. M., Walker, B., Gray, J. & Nelson, J. (1999), 'Breast cancer cell-associated endopeptidase ec 24.11 modulates proliferative response to bombesin', *Br J Cancer* **79**(2), 214–20.
- Cailler, F., Zappulla, J. P., Boileau, G. & Crine, P. (1999), 'The n-terminal segment of endothelin-converting enzyme (ece)-1b contains a di-leucine motif that can redirect neprilysin to an intracellular compartment in madin-darby canine kidney (mdck) cells', *Biochem J* **341**(Pt 1), 119–26.

- Calhoun, M. E., Burgermeister, P., Phinney, A. L., Stalder, M., Tolnay, M., Wiederhold, K. H., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Sommer, B., Staufenbiel, M. & Jucker, M. (1999), 'Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein results in prominent deposition of cerebrovascular amyloid', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**(24), 14088–14093.
- Campos, M., Couture, C., Hirata, I. Y., Juliano, M. A., Loisel, T. P., Crine, P., Juliano, L., Boileau, G. & Carmona, A. K. (2003), 'Human recombinant endopeptidase pex has a strict s1' specificity for acidic residues and cleaves peptides derived from fibroblast growth factor-23 and matrix extracellular phosphoglycoprotein', *Biochem. J.* **373**(Pt 1), 271–279.
- Carpentier, M., Bailey, J. L., Jeannotte, L., Boileau, G., Charron, J. & DesGroseillers, L. (2003), 'Reduced male fertility in mice deficient in the zinc metallopeptidase n11', *Submitted in MCB*.
- Carpentier, M., DesGroseillers, L. & Boileau, G. (2003), [m684].neprilysin-2, in Elsevier, ed., 'Handbook of proteolytic enzymes', 2nd edition edn, Elsevier.
- Carpentier, M., Marcinkiewicz, M., Boileau, G. & DesGroseillers, L. (2003), 'The neuropeptide-degrading enzyme n11 is expressed in specific neurons of mouse brain', *Peptides* **24**(7), 1083–1091.
- Carpentier, M., Robitaille, Y., DesGroseillers, L., Boileau, G. & Marcinkiewicz, M. (2002), 'Declining expression of neprilysin in alzheimer disease vasculature: possible involvement in cerebral amyloid angiopathy', *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **61**(10), 849–856.
- Carretero, O. A. & Scicli, A. G. (1991), 'Local hormonal factors (intracrine, autocrine, and paracrine) in hypertension', *Hypertension* **18**(3 Suppl), 58–69.
- Carson, J. A. & Turner, A. J. (2002), 'Beta-amyloid catabolism: roles for neprilysin (nep) and other metallopeptidases?', *J. Neurochem.* **81**(1), 1–8.
- Casey, M. L., Smith, J. W., Nagai, K., Hersh, L. B. & MacDonald, P. C. (1991), 'Progesterone-regulated cyclic modulation of membrane metalloendopeptidase (enkephalinase) in human endometrium', *J. Biol. Chem.* **266**(34), 23041–23047.
- Chabrier, P. E., Roubert, P., Lonchamp, M. O., Plas, P. & Braquet, P. (1990), 'Receptor regulation of atrial natriuretic factor', *Blood Vessels* **27**(2-5), 153–161.
- Charron, J., Malynn, B. A., Fisher, P., Stewart, V., Jeannotte, L., Goff, S. P., Robertson,

- E. J. & Alt, F. W. (1992), 'Embryonic lethality in mice homozygous for a targeted disruption of the n-myc gene', *Genes Dev.* **6**(12A), 2248–2257.
- Checler, F. (1995), 'Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in alzheimer's disease', *J. Neurochem.* **65**(4), 1431–1444.
- Checler, F., Dauch, P., Barelli, H., Nahon, J. L. & Vincent, J. P. (1992), 'Hydrolysis of rat melanin-concentrating hormone by endopeptidase 24.11 (neutral endopeptidase)', *Biochem J* **286**(Pt 1), 217–21.
- Chen, C. & Okayama, H. (1987), 'High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid dna', *Mol Cell Biol* **7**(8), 2745–52.
- Chen, C. Y., Salles, G., Seldin, M. F., Kister, A. E., Reinherz, E. L. & Shipp, M. A. (1992), 'Murine common acute lymphoblastic leukemia antigen (cd10 neutral endopeptidase 24.11). molecular characterization, chromosomal localization, and modeling of the active site', *J Immunol* **148**(9), 2817–25.
- Chidiac, P., Nouet, S. & Bouvier, M. (1996), 'Agonist-induced modulation of inverse agonist efficacy at the beta 2-adrenergic receptor', *Mol. Pharmacol.* **50**(3), 662–669.
- Clarimon, J., Munoz, F. J., Boada, M., Tarraga, L., Sunyer, J., Bertranpetit, J. & Comas, D. (2003), 'Possible increased risk for alzheimer's disease associated with neprilysin gene', *J. Neural Transm.* **110**(6), 651–657.
- Clouthier, D. E., Hosoda, K., Richardson, J. A., Williams, S. C., Yanagisawa, H., Kuwaki, T., Kumada, M., Hammer, R. E. & Yanagisawa, M. (1998), 'Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-a receptor-deficient mice', *Development* **125**(5), 813–824.
- Cohen, A. J., Bunn, P. A., Franklin, W., Magill-Solc, C., Hartmann, C., Helfrich, B., Gilman, L., Folkvord, J., Helm, K. & Miller, Y. E. (1996), 'Neutral endopeptidase: variable expression in human lung, inactivation in lung cancer, and modulation of peptide-induced calcium flux', *Cancer Res* **56**(4), 831–9.
- Colman, P. M., Jansonius, J. N. & Matthews, B. W. (1972), 'The structure of thermolysin: an electron density map at 2-3 a resolution', *J. Mol. Biol.* **70**(3), 701–724.
- Connelly, J. C., Chambless, R., Holiday, D., Chittenden, K. & Johnson, A. R. (1993), 'Up-regulation of neutral endopeptidase (calla) in human neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor', *J. Leukoc. Biol.* **53**(6), 685–690.

- Connelly, J. C., Skidgel, R. A., Schulz, W. W., Johnson, A. R. & Erdos, E. G. (1985), 'Neutral endopeptidase 24.11 in human neutrophils: cleavage of chemotactic peptide', *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(24), 8737–41.
- Consortium, T. A. (2000), 'Autosomal dominant hypophosphatemic rickets is associated with mutations in fgf-23', *Nat Genet* **26**, 345–348.
- Correa, L. M., Cho, C., Myles, D. G. & Primakoff, P. (2000), 'A role for a timp-3-sensitive, zn(2+)-dependent metalloprotease in mammalian gamete membrane fusion', *Dev Biol.* **225**(1), 124–134.
- Corti, R., J. C. Burnett, J., Rouleau, J. L., Ruschitzka, F. & Luscher, T. F. (2001), 'Vasopeptidase inhibitors: a new therapeutic concept in cardiovascular disease?', *Circulation* **104**(15), 1856–1862.
- Corvol, P. & Williams, T. A. (1997), Biochemical and molecular aspects of angiotensin i-converting enzyme, in A. J. Kenny & C. M. Bousted, eds, 'Cell surface peptidases in health and disease', BIOS Scientific Publishers Ltd, book chapter 7, pp. 99–117.
- Coupar, I. M. (1987), 'Opioid action of the intestine: the importance of the intestinal mucosa', *Life Sci* **41**(8), 917–25.
- Crine, P., Dion, N. & Boileau, G. (1997), Endopeptidase 24.11, in 'Cell-surface peptidases in health and disease', kenny a.j. and bousted c. edn, M. BIOS scientific publisher Ltd, pp. 79–98.
- D'Adamio, L., Shipp, M. A., Masteller, E. L. & Reinherz, E. L. (1989), 'Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple minixons and separate 5' untranslated regions', *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(18), 7103–7.
- Danek, A., Rubio, J. P., Rampoldi, L., Ho, M., Dobson-Stone, C., Tison, F., Symmans, W. A., Oechsner, M., Kalckreuth, W., Watt, J. M., Corbett, A. J., Hamdalla, H. H., Marshall, A. G., Sutton, I., Dotti, M. T., Malandrini, A., Walker, R. H., Daniels, G. & Monaco, A. P. (2001), 'McLeod neuroacanthocytosis: genotype and phenotype', *Ann. Neurol.* **50**(6), 755–764.
- Davies, D., Medeiros, M. S., Keen, J., Turner, A. J. & Haynes, L. W. (1992), 'Eosinophil chemotactic peptide sequences in rat alpha-cgrp. activation of a novel trophic action by neutral endopeptidase 24.11', *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **657**, 405–411.

- de Beur, S. M. J. & Levine, M. A. (2002), 'Molecular pathogenesis of hypophosphatemic rickets', *J. Clin. Endocrinol. Metab* **87**(6), 2467–2473.
- Deddish, P. A., Marcic, B. M., Tan, F., Jackman, H. L., Chen, Z. & Erdos, E. G. (2002), 'Neprilysin inhibitors potentiate effects of bradykinin on b2 receptor', *Hypertension* **39**(2 Pt 2), 619–623.
- der V. van, V., Naber, B. A., van der, S. P., Hoogsteden, H. C. & Versnel, M. A. (1998), 'Cytokines and glucocorticoids modulate human bronchial epithelial cell peptidases', *Cytokine* **10**(1), 55–65.
- Deschodt-Lanckman, M., Michaux, F., de Prez, E., Abramowicz, D., Vanherweghem, J. L. & Goldman, M. (1989), 'Increased serum levels of endopeptidase 24.11 ('enkephalinase') in patients with end-stage renal failure', *Life Sci* **45**(2), 133–41.
- Deschodt-Lanckman, M., Pauwels, S., Najdovski, T., Dimaline, R. & Dockray, G. J. (1988), 'In vitro and in vivo degradation of human gastrin by endopeptidase 24.11', *Gastroenterology* **94**(3), 712–721.
- Deschodt-Lanckman, M., Vanneste, Y., Loir, B., Michel, A., Libert, A., Ghanem, G. & Lejeune, F. (1990), 'Degradation of alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-msh) by calla/endopeptidase 24.11 expressed by human melanoma cells in culture', *Int. J. Cancer* **46**(6), 1124–1130.
- Devault, A., Lazure, C., Nault, C., Moual, H. L., Seidah, N. G., Chretien, M., Kahn, P., Powell, J., Mallet, J., Beaumont, A. & et al. (1987), 'Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) deduced from a complementary dna', *Embo J* **6**(5), 1317–22.
- Devault, A., Nault, C., Zollinger, M., Fournie-Zaluski, M. C., Roques, B. P., Crine, P. & Boileau, G. (1988), 'Expression of neutral endopeptidase (enkephalinase) in heterologous cos- 1 cells. characterization of the recombinant enzyme and evidence for a glutamic acid residue at the active site', *J Biol Chem* **263**(8), 4033–40.
- Devault, A., Sales, V., Nault, C., Beaumont, A., Roques, B., Crine, P. & Boileau, G. (1988), 'Exploration of the catalytic site of endopeptidase 24.11 by site-directed mutagenesis. histidine residues 583 and 587 are essential for catalysis', *FEBS Lett* **231**(1), 54–8.
- Diaz-Perez, E. & Meizel, S. (1992), 'Importance of mammalian sperm metalloendopro-

- tease activity during the acrosome reaction to subsequent sperm-egg fusion: inhibitor studies with human sperm and zona-free hamster eggs', *Mol. Reprod. Dev.* **31**(2), 122–130.
- Diaz-Perez, E., Thomas, P. & Meizel, S. (1988), 'Evidence suggesting a role for sperm metalloendoprotease activity in penetration of zona-free hamster eggs by human sperm', *J. Exp. Zool.* **248**(2), 213–221.
- Dickson, D. W. (1997), 'The pathogenesis of senile plaques', *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **56**(4), 321–339.
- Dion, N., Moual, H. L., Crine, P. & Boileau, G. (1993), 'Kinetic evidence that his-711 of neutral endopeptidase 24.11 is involved in stabilization of the transition state', *FEBS Lett* **318**(3), 301–4.
- Dion, N., Moual, H. L., Fournie-Zaluski, M. C., Roques, B. P., Crine, P. & Boileau, G. (1995), 'Evidence that asn542 of neprilysin (ec 3.4.24.11) is involved in binding of the p2' residue of substrates and inhibitors', *Biochem J* **311**(Pt 2), 623–7.
- Djokic, T. D., Sekizawa, K., Borson, D. B. & Nadel, J. A. (1989), 'Neutral endopeptidase inhibitors potentiate substance p-induced contraction in gut smooth muscle', *Am. J. Physiol* **256**(1 Pt 1), G39–G43.
- Dong, Y. & Benveniste, E. N. (2001), 'Immune function of astrocytes', *Glia* **36**(2), 180–190.
- Drezner, M. K. (2000), 'PheX gene and hypophosphatemia', *Kidney Int* **57**(1), 9–18.
- Du, L., Desbarats, M., Viel, J., Glorieux, F. H., Cawthorn, C. & Ecarot, B. (1996), 'cdna cloning of the murine pex gene implicated in x-linked hypophosphatemia and evidence for expression in bone', *Genomics* **36**(1), 22–8.
- Durieux, C., Charpentier, B., Fellion, E., Gacel, G., Pelaprat, D. & Roques, B. P. (1985), 'Multiple cleavage sites of cholecystokinin heptapeptide by "enkephalinase"', *Peptides* **6**(3), 495–501.
- Dutriez, I., Sales, N., Fournie-Zaluski, M. C. & Roques, B. P. (1992), 'Pre- and post-natal ontogeny of neutral endopeptidase 24-11 ('enkephalinase') studied by in vitro autoradiography in the rat', *Experientia* **48**(3), 290–300.
- Eckman, E. A., Reed, D. K. & Eckman, C. B. (2001), 'Degradation of the alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme', *J. Biol. Chem.* **276**(27), 24540–24548.

- Eckman, E. A., Watson, M., Marlow, L., Sambamurti, K. & Eckman, C. B. (2003), 'Alzheimer's disease beta-amyloid peptide is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme', *J. Biol. Chem.* **278**(4), 2081–2084.
- Emoto, N. & Yanagisawa, M. (1995), 'Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum', *J Biol Chem* **270**(25), 15262–8.
- Ensslin, M. A. & Shur, B. D. (2003), 'Identification of mouse sperm sed1, a bimotif egf repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding', *Cell* **114**(4), 405–417.
- Erdos, E. G. (1990), 'Some old and some new ideas on kinin metabolism', *J Cardiovasc Pharmacol* **15**(Suppl 6), 20–4.
- Erdos, E. G., Wagner, B., Harbury, C. B., Painter, R. G., Skidgel, R. A. & Fa, X. G. (1989), 'Down-regulation and inactivation of neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) in human neutrophils', *J. Biol. Chem.* **264**(24), 14519–14523.
- Ertekin-Taner, N., Graff-Radford, N., Younkin, L. H., Eckman, C., Baker, M., Adamson, J., Ronald, J., Blangero, J., Hutton, M. & Younkin, S. G. (2000), 'Linkage of plasma abeta42 to a quantitative locus on chromosome 10 in late-onset alzheimer's disease pedigrees', *Science* **290**(5500), 2303–2304.
- Evin, G. & Weidemann, A. (2002), 'Biogenesis and metabolism of alzheimer's disease abeta amyloid peptides', *Peptides* **23**(7), 1285–1297.
- Facchinetti, P., Rose, C., Schwartz, J. C. & Ouimet, T. (2003), 'Ontogeny, regional and cellular distribution of the novel metalloprotease neprilysin 2 in the rat: a comparison with neprilysin and endothelin-converting enzyme-1', *Neuroscience* **118**(3), 627–639.
- Fagny, C., Marchant, A., de Prez, E., Goldman, M. & Deschodt-Lanckman, M. (1995), 'Lipopolysaccharide induces upregulation of neutral endopeptidase 24.11 on human neutrophils: involvement of the cd14 receptor', *Clin. Sci. (Lond)* **89**(1), 83–89.
- Farris, W., Mansourian, S., Chang, Y., Lindsley, L., Eckman, E. A., Frosch, M. P., Eckman, C. B., Tanzi, R. E., Selkoe, D. J. & Guenette, S. (2003), 'Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**(7), 4162–4167.

- Fernandez, D., Valdivia, A., Irazusta, J., Ochoa, C. & Casis, L. (2002), 'Peptidase activities in human semen', *Peptides* **23**(3), 461–468.
- Fischer, H. S., Zernig, G., Hauser, K. F., Gerard, C., Hersh, L. B. & Saria, A. (2002), 'Neutral endopeptidase knockout induces hyperalgesia in a model of visceral pain, an effect related to bradykinin and nitric oxide', *J. Mol. Neurosci.* **18**(1-2), 129–134.
- Freedland, S. J., Seligson, D. B., Liu, A. Y., Pantuck, A. J., Paik, S. H., Horvath, S., Wieder, J. A., Zisman, A., Nguyen, D., Tso, C. L., Palotie, A. V. & Beldegrun, A. S. (2003), 'Loss of cd10 (neutral endopeptidase) is a frequent and early event in human prostate cancer', *Prostate* **55**(1), 71–80.
- Frette, C., Pezet, S., Nabout, R. A. E., Bertrand, J. P., Pham, Q. T., Kauffmann, F. & Lafuma, C. (1998), 'Relationship of serum neutral endopeptidase e.c.3.4.24.11 activity to alcohol consumption', *Alcohol Clin. Exp. Res.* **22**(7), 1405–1408.
- Fujiwara, H., Kurihara, N., Hirata, K., Ohta, K., Kanazawa, H. & Takeda, T. (1993), 'Effect of neuropeptide y on human bronchus and its modulation of neutral endopeptidase', *J. Allergy Clin. Immunol.* **92**(1 Pt 1), 89–94.
- Fukami, S., Watanabe, K., Iwata, N., Haraoka, J., Lu, B., Gerard, N. P., Gerard, C., Fraser, P., Westaway, D., George-Hyslop, P. & Saido, T. C. (2002), 'Abeta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse brain: synaptic and axonal localization inversely correlating with abeta pathology', *Neurosci. Res.* **43**(1), 39–56.
- Fulcher, I. S., Chaplin, M. F. & Kenny, A. J. (1983), 'Endopeptidase-24.11 purified from pig intestine is differently glycosylated from that in kidney', *Biochem. J.* **215**(2), 317–323.
- Fuller, F., Porter, J. G., Arfsten, A. E., Miller, J., Schilling, J. W., Scarborough, R. M., Lewicki, J. A. & Schenk, D. B. (1988), 'Atrial natriuretic peptide clearance receptor. complete sequence and functional expression of cdna clones', *J. Biol. Chem.* **263**(19), 9395–9401.
- Gandy, S. & Petanceska, S. (2001), 'Regulation of alzheimer beta-amyloid precursor trafficking and metabolism', *Adv. Exp. Med. Biol.* **487**, 85–100.
- Ganju, R. K., Shpektor, R. G., Brenner, D. G. & Shipp, M. A. (1996), 'Cd10/neutral endopeptidase 24.11 is phosphorylated by casein kinase ii and coassociates with other phosphoproteins including the lyn src- related kinase', *Blood* **88**(11), 4159–65.



- Ganju, R. K., Sunday, M., Tsarwhas, D. G., Card, A. & Shipp, M. A. (1994), 'Cd10/nep in non-small cell lung carcinomas. relationship to cellular proliferation', *J Clin Invest* **94**(5), 1784–91.
- Gaudoux, F., Boileau, G. & Crine, P. (1993), 'Localization of neprilysin (ec 3.4.24.11) mrna in rat brain by in situ hybridization', *J Neurosci Res* **34**(4), 426–33.
- Ghaddar, G., Ruchon, A. F., Carpentier, M., Marcinkiewicz, M., Seidah, N. G., Crine, P., DesGroseillers, L. & Boileau, G. (2000), 'Molecular cloning and biochemical characterization of a new mouse testis soluble-zinc-metallopeptidase of the neprilysin family', *Biochem J* **347**(Pt 2), 419–29.
- Giroux, S., Tremblay, M., Bernard, D., Cardin-Girard, J. F., Aubry, S., Larouche, L., Rousseau, S., Huot, J., Landry, J., Jeannotte, L. & Charron, J. (1999), 'Embryonic death of mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta', *Curr. Biol.* **9**(7), 369–372.
- Goraca, A. (2002), 'New views on the role of endothelin (minireview)', *Endocr. Regul.* **36**(4), 161–167.
- Gourlet, P., Vandermeers, A., Robberecht, P. & Deschodt-Lanckman, M. (1997), 'Vasoactive intestinal peptide (vip) and pituitary adenylate cyclase-activating peptide (pacap-27, but not pacap-38) degradation by the neutral endopeptidase ec 3.4.24.11', *Biochem. Pharmacol.* **54**(4), 509–515.
- Graf, K., Koehne, P., Grafe, M., Zhang, M., Auch-Schwelk, W. & Fleck, E. (1995), 'Regulation and differential expression of neutral endopeptidase 24.11 in human endothelial cells', *Hypertension* **26**(2), 230–235.
- Graf, K., Kunkel, K., Zhang, M., Grafe, M., Schultz, K., Schudt, C., Biroc, S., Fleck, E. & Kunkel, G. (1995), 'Activation of adenylate cyclase and phosphodiesterase inhibition enhance neutral endopeptidase activity in human endothelial cells', *Peptides* **16**(7), 1273–1278.
- Graf, K., Schaper, C., Grafe, M., Fleck, E. & Kunkel, G. (1998), 'Glucocorticoids and protein kinase c regulate neutral endopeptidase 24.11 in human vascular smooth muscle cells', *Basic Res. Cardiol.* **93**(1), 11–17.
- Greaves, M. F. (1975), 'Proceedings: Surface antigens of leukaemic cells', *Br J Cancer* **32**(2), 280–1.

- Greaves, M. F., Hariri, G., Newman, R. A., Sutherland, D. R., Ritter, M. A. & Ritz, J. (1983), 'Selective expression of the common acute lymphoblastic leukemia (gp 100) antigen on immature lymphoid cells and their malignant counterparts', *Blood* **61**(4), 628–39.
- Gros, C., Souque, A. & Schwartz, J. C. (1990), 'Degradation of atrial natriuretic factor in mouse blood in vitro and in vivo: role of enkephalinase (ec 3.4.24.11)', *Neuropeptides* **17**(1), 1–5.
- Guerin, S., Mari, B., Fernandez, E., Belhacene, N., Toribio, M. L. & Auburger, P. (1997), 'Cd10 is expressed on human thymic epithelial cell lines and modulates thymopentin-induced cell proliferation', *Faseb J* **11**(12), 1003–11.
- Guo, R., Liu, S., Spurney, R. F. & Quarles, L. D. (2001), 'Analysis of recombinant phex: an endopeptidase in search of a substrate', *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**(4), 837–47.
- Hagaman, J. R., Moyer, J. S., Bachman, E. S., Sibony, M., Magyar, P. L., Welch, J. E., Smithies, O., Krege, J. H. & O'Brien, D. A. (1998), 'Angiotensin-converting enzyme and male fertility', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**(5), 2552–2557.
- Hama, E., Shirotani, K., Masumoto, H., Sekine-Aizawa, Y., Aizawa, H. & Saido, T. C. (2001), 'Clearance of extracellular and cell-associated amyloid beta peptide through viral expression of neprilysin in primary neurons', *J. Biochem. (Tokyo)* **130**(6), 721–726.
- Hannibal, J. & Fahrenkrug, J. (1995), 'Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (pacap) gene by rat spermatogenic cells', *Regul. Pept.* **55**(1), 111–115.
- Haouas, H., Morello, D., Lavenu, A., Billard, M., Jasmin, C. & Boucheix, C. (1995), 'Characterization of the 5' region of the cd10/neutral endopeptidase 24.11 gene', *Biochem Biophys Res Commun* **207**(3), 933–42.
- Hartmann, T. (1999), 'Intracellular biology of alzheimer's disease amyloid beta peptide', *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **249**(6), 291–8.
- Hasegawa, H., Hiki, K., Sawamura, T., Aoyama, T., Okamoto, Y., Miwa, S., Shimohama, S., Kimura, J. & Masaki, T. (1998), 'Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3', *FEBS Lett* **428**(3), 304–8.
- Head, J. R., MacDonald, P. C. & Casey, M. L. (1993), 'Cellular localization of membrane

- metalloendopeptidase (enkephalinase) in human endometrium during the ovarian cycle', *J Clin Endocrinol Metab* **76**(3), 769–76.
- Heder, G., Bottger, A., Siems, W. E., Rottmann, M. & Kertscher, U. (1994), 'The enzymatic degradation of bradykinin in semen of various species', *Andrologia* **26**(5), 295–301.
- Hersh, L. B. (1984), 'Reaction of opioid peptides with neutral endopeptidase ("enkephalinase")', *J. Neurochem.* **43**(2), 487–493.
- Hoang, M. V. & Turner, A. J. (1997), 'Novel activity of endothelin-converting enzyme: hydrolysis of bradykinin', *Biochem J* **327**(Pt 1), 23–6.
- Hogan, B. (1986), *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor.
- Holmes, M. A. & Matthews, B. W. (1982), 'Structure of thermolysin refined at 1.6 Å resolution', *J. Mol. Biol.* **160**(4), 623–639.
- Hooper, N. M. (1994), 'Families of zinc metalloproteases', *FEBS Lett* **354**(1), 1–6.
- Hooper, N. M., Kenny, A. J. & Turner, A. J. (1985), 'The metabolism of neuropeptides. neurokinin a (substance k) is a substrate for endopeptidase-24.11 but not for peptidyl dipeptidase a (angiotensin-converting enzyme)', *Biochem. J.* **231**(2), 357–361.
- Hosoda, K., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Baynash, A. G., Cheung, J. C., Giaid, A. & Yanagisawa, M. (1994), 'Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-b receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice', *Cell* **79**(7), 1267–1276.
- Howard, T. E., Shai, S. Y., Langford, K. G., Martin, B. M. & Bernstein, K. E. (1990), 'Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ace) is initiated within the 12th intron of the somatic ace gene', *Mol. Cell Biol.* **10**(8), 4294–4302.
- Howell, S., Caswell, A. M., Kenny, A. J. & Turner, A. J. (1993), 'Membrane peptidases on human osteoblast-like cells in culture: hydrolysis of calcitonin and hormonal regulation of endopeptidase-24.11', *Biochem. J.* **290** ( Pt 1), 159–164.
- Howell, S., Murray, H., Scott, C. S., Turner, A. J. & Kenny, A. J. (1991), 'A highly sensitive e.l.i.s.a. for endopeptidase-24.11, the common acute-lymphoblastic-leukaemia antigen (calla, cd-10), applicable to material of porcine and human origin', *Biochem. J.* **278** ( Pt 2), 417–421.
- Howell, S., Nalbantoglu, J. & Crine, P. (1995), 'Neutral endopeptidase can hydrolyze beta-

- amyloid(1-40) but shows no effect on beta-amyloid precursor protein metabolism', *Peptides* **16**(4), 647–52.
- Hu, J., Igarashi, A., Kamata, M. & Nakagawa, H. (2001), 'Angiotensin-converting enzyme degrades alzheimer amyloid beta-peptide (a beta ); retards a beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity', *J. Biol. Chem.* **276**(51), 47863–47868.
- Hupe-Sodmann, K., McGregor, G. P., Bridenbaugh, R., Goke, R., Goke, B., Thole, H., Zimmermann, B. & Voigt, K. (1995), 'Characterisation of the processing by human neutral endopeptidase 24.11 of glp-1(7-36) amide and comparison of the substrate specificity of the enzyme for other glucagon-like peptides', *Regul. Pept.* **58**(3), 149–156.
- HYP-Consortium, T. (1995), 'A gene (pex) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with x-linked hypophosphatemic rickets.', *Nat Genet* **11**(2), 130–6.
- Iglarz, M. & Schiffrin, E. L. (2003), 'Role of endothelin-1 in hypertension', *Curr. Hypertens. Rep.* **5**(2), 144–148.
- Ikeda, K., Emoto, N., Raharjo, S. B., Nurhantari, Y., Saiki, K., Yokoyama, M. & Matsuo, M. (1999), 'Molecular identification and characterization of novel membrane-bound metalloprotease, the soluble secreted form of which hydrolyzes a variety of vasoactive peptides', *J Biol Chem* **274**(45), 32469–77.
- Ikeda, S., Emoto, N., Alimsardjono, H., Yokoyama, M. & Matsuo, M. (2002), 'Molecular isolation and characterization of novel four subisoforms of ece-2', *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**(1), 421–426.
- Imai, K., Kanzaki, H., Fujiwara, H., Kariya, M., Okamoto, N., Takakura, K., Maeda, M. & Mori, T. (1992), 'Expression of aminopeptidase n and neutral endopeptidase on the endometrial stromal cells in endometriosis and adenomyosis', *Hum. Reprod.* **7**(9), 1326–1328.
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K. & Masaki, T. (1989), 'The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**(8), 2863–2867.
- Ishida, M., Ogawa, M., Kosaki, G., Mega, T. & Ikenaka, T. (1983), 'Purification and cha-

- racterization of the neutral endopeptidase from human kidney', *J Biochem (Tokyo)* **94**(1), 17–24.
- Itoh, Y., Yamada, M., Hayakawa, M., Otomo, E. & Miyatake, T. (1993), 'Cerebral amyloid angiopathy: a significant cause of cerebellar as well as lobar cerebral hemorrhage in the elderly', *J. Neurol. Sci.* **116**(2), 135–141.
- Iwata, N., Takaki, Y., Fukami, S., Tsubuki, S. & Saido, T. C. (2002), 'Region-specific reduction of a beta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging', *J. Neurosci. Res.* **70**(3), 493–500.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Shirotani, K., Lu, B., Gerard, N. P., Gerard, C., Hama, E., Lee, H. J. & Saido, T. C. (2001), 'Metabolic regulation of brain abeta by neprilysin', *Science* **292**(5521), 1550–1552.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H. J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y. & Saido, T. C. (2000), 'Identification of the major abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition', *Nat Med* **6**(2), 143–50.
- Jackson, D. G. & Hersh, L. B. (1986), 'Reaction of neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) with arginine reagents', *J Biol Chem* **261**(19), 8649–54.
- Jaffe, L., Jeannotte, L., Bikoff, E. K. & Robertson, E. J. (1990), 'Analysis of beta 2-microglobulin gene expression in the developing mouse embryo and placenta', *J. Immunol.* **145**(10), 3474–3482.
- Janus, C., Chishti, M. A. & Westaway, D. (2000), 'Transgenic mouse models of alzheimer's disease', *Biochim Biophys Acta* **1502**(1), 63–75.
- Jeannotte, L., Burbach, J. P. & Drouin, J. (1987), 'Unusual proopiomelanocortin ribonucleic acids in extrapituitary tissues: intronless transcripts in testes and long poly(a) tails in hypothalamus', *Mol. Endocrinol.* **1**(10), 749–757.
- Jockers, R., Silva, A. D., Strosberg, A. D., Bouvier, M. & Marullo, S. (1996), 'New molecular and structural determinants involved in beta 2-adrenergic receptor desensitization and sequestration. delineation using chimeric beta 3/beta 2-adrenergic receptors', *J. Biol. Chem.* **271**(16), 9355–9362.
- Johnson, A. R., Coalson, J. J., Ashton, J., Larumbide, M. & Erdos, E. G. (1985), 'Neutral endopeptidase in serum samples from patients with adult respiratory distress

- syndrome. comparison with angiotensin-converting enzyme', *Am. Rev. Respir. Dis.* **132**(6), 1262–1267.
- Johnson, A. R., Skidgel, R. A., Gafford, J. T. & Erdos, E. G. (1984), 'Enzymes in placental microvilli: angiotensin i converting enzyme, angiotensinase a, carboxypeptidase, and neutral endopeptidase ("enkephalinase")', *Peptides* **5**(4), 789–796.
- Johnson, G. D., Stevenson, T. & Ahn, K. (1999), 'Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1. a comparison with neprilysin', *J Biol Chem* **274**(7), 4053–8.
- Johnson, G. D., Swenson, H. R., Ramage, R. & Ahn, K. (2002), 'Mapping the active site of endothelin-converting enzyme-1 through subsite specificity and mutagenesis studies: a comparison with neprilysin', *Arch. Biochem. Biophys.* **398**(2), 240–248.
- Jung, H. H., Russo, D., Redman, C. & Brandner, S. (2001), 'Kell and xk immunohistochemistry in mcLeod myopathy', *Muscle Nerve* **24**(10), 1346–1351.
- Katayama, M., Nadel, J. A., Bunnett, N. W., Maria, G. U. D., Haxhiu, M. & Borson, D. B. (1991), 'Catabolism of calcitonin gene-related peptide and substance p by neutral endopeptidase', *Peptides* **12**(3), 563–567.
- Kato, R., Kiryu-Seo, S. & Kiyama, H. (2002), 'Damage-induced neuronal endopeptidase (dipeptidyl aminopeptidase) expression is regulated by leukemia inhibitory factor and deprivation of nerve growth factor in rat sensory ganglia after nerve injury', *J. Neurosci.* **22**(21), 9410–9418.
- Kawamoto, T., Shishikura, T., Ohira, M., Takayasu, H., Morohashi, A., Takada, N., Takahashi, M., Suzuki, Y., Sugano, S., Hori, T. & Nakagawara, A. (2000), 'Association between favorable neuroblastoma and high expression of the novel metalloproteinase gene, nbla3145/xce, cloned by differential screening of the full-length-enriched oligo-capping neuroblastoma cDNA libraries', *Med Pediatr Oncol* **35**(6), 628–31.
- Kenny, A. J. & Bourne, A. (1991), 'Cellular reorganisation of membrane peptidases in wallerian degeneration of pig peripheral nerve', *J. Neurocytol.* **20**(11), 875–885.
- Kenny, A. J., Bourne, A. & Ingram, J. (1993), 'Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, c-type natriuretic peptide and some c-receptor ligands by endopeptidase-24.11', *Biochem. J.* **291** ( Pt 1), 83–88.
- Kenny, A. J., Bowes, M. A., Gee, N. S. & Matsas, R. (1985), 'Endopeptidase-24.11:

- a cell-surface enzyme for metabolizing regulatory peptides', *Biochem. Soc. Trans.* **13**(2), 293–295.
- Kenny, A. J., Fulcher, I. S., McGill, K. A. & Kershaw, D. (1983), 'Proteins of the kidney microvillar membrane. reconstitution of endopeptidase in liposomes shows that it is a short-stalked protein', *Biochem J* **211**(3), 755–62.
- Kenny, J. (1993), 'Endopeptidase-24.11: putative substrates and possible roles', *Biochem. Soc. Trans.* **21 ( Pt 3)**(3), 663–668.
- Kerr, M. A. & Kenny, A. J. (1974a), 'The molecular weight and properties of a neutral metallo-endopeptidase from rabbit kidney brush border', *Biochem J* **137**(3), 489–95.
- Kerr, M. A. & Kenny, A. J. (1974b), 'The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border', *Biochem J* **137**(3), 477–88.
- Kew, D., Jin, D. F., Kim, F., Laddis, T. & Kilpatrick, D. L. (1989), 'Translational status of proenkephalin mrna in the rat reproductive system', *Mol. Endocrinol.* **3**(8), 1191–1196.
- Kew, D., Muffly, K. E. & Kilpatrick, D. L. (1990), 'Proenkephalin products are stored in the sperm acrosome and may function in fertilization', *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(23), 9143–7.
- Khan, A. R. & James, M. N. (1998), 'Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes', *Protein Sci* **7**(4), 815–36.
- Kilpatrick, D. L., Borland, K. & Jin, D. F. (1987), 'Differential expression of opioid peptide genes by testicular germ cells and somatic cells', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**(16), 5695–5699.
- Kilpatrick, D. L. & Millette, C. F. (1986), 'Expression of proenkephalin messenger rna by mouse spermatogenic cells', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**(14), 5015–5018.
- King, K. A., Hua, J., Torday, J. S., Drazen, J. M., Graham, S. A., Shipp, M. A. & Sunday, M. E. (1993), 'Cd10/neutral endopeptidase 24.11 regulates fetal lung growth and maturation in utero by potentiating endogenous bombesin-like peptides', *J Clin Invest* **91**(5), 1969–73.
- Kioussi, C., Crine, P. & Matsas, R. (1992), 'Endopeptidase-24.11 is suppressed in myelin-forming but not in non-myelin-forming schwann cells during development of the rat sciatic nerve', *Neuroscience* **50**(1), 69–83.

- Kioussi, C. & Matsas, R. (1991), 'Endopeptidase-24.11, a cell-surface peptidase of central nervous system neurons, is expressed by schwann cells in the pig peripheral nervous system', *J. Neurochem.* **57**(2), 431–440.
- Kirkwood, K. S., Bunnett, N. W., Maa, J., Castagliolo, I., Liu, B., Gerard, N., Zacks, J., Pothoulakis, C. & Grady, E. F. (2001), 'Deletion of neutral endopeptidase exacerbates intestinal inflammation induced by clostridium difficile toxin a', *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* **281**(2), G544–G551.
- Kiryu-Seo, S., Sasaki, M., Yokohama, H., Nakagomi, S., Hirayama, T., Aoki, S., Wada, K. & Kiyama, H. (2000), 'Damage-induced neuronal endopeptidase (dine) is a unique metallopeptidase expressed in response to neuronal damage and activates superoxide scavengers', *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(8), 4345–50.
- Koehne, P., Schaper, C., Graf, K. & Kunkel, G. (1998), 'Neutral endopeptidase 24.11: its physiologic and possibly pathophysiologic role in inflammation with special effect on respiratory inflammation', *Allergy* **53**(11), 1023–1042.
- Kohan, D. E. (1991), 'Endothelin synthesis by rabbit renal tubule cells', *Am J Physiol* **261**(2 Pt 2), 221–6.
- Kohrogi, H., Nadel, J. A., Malfroy, B., Gorman, C., Bridenbaugh, R., Patton, J. S. & Borson, D. B. (1989), 'Recombinant human enkephalinase (neutral endopeptidase) prevents cough induced by tachykinins in awake guinea pigs', *J. Clin. Invest* **84**(3), 781–786.
- Korth, P., Bohle, R. M., Corvol, P. & Pinet, F. (1999), 'Cellular distribution of endothelin-converting enzyme-1 in human tissues', *J Histochem Cytochem* **47**(4), 447–62.
- Kostyk, S. K., Kowall, N. W. & Hauser, S. L. (1989), 'Substance p immunoreactive astrocytes are present in multiple sclerosis plaques', *Brain Res.* **504**(2), 284–288.
- Kozak, M. (1986), 'Point mutations define a sequence flanking the aug initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes', *Cell* **44**(2), 283–92.
- Kurihara, Y., Kurihara, H., Oda, H., Maemura, K., Nagai, R., Ishikawa, T. & Yazaki, Y. (1995), 'Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1', *J. Clin. Invest* **96**(1), 293–300.
- Kurihara, Y., Kurihara, H., Suzuki, H., Kodama, T., Maemura, K., Nagai, R., Oda, H., Kuwaki, T., Cao, W. H., Kamada, N. & et al. (1994), 'Elevated blood pressure and



- craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1', *Nature* **368**(6473), 703–10.
- Lafrance, M. H., Vezina, C., Wang, Q., Boileau, G., Crine, P. & Lemay, G. (1994), 'Role of glycosylation in transport and enzymic activity of neutral endopeptidase-24.11', *Biochem J* **302**(Pt 2), 451–4.
- Lanctot, C., Fournier, H., Howell, S., Boileau, G. & Crine, P. (1995), 'Direct targeting of neutral endopeptidase (ec 3.4.24.11) to the apical cell surface of transfected llc-pk1 cells and unpolarized secretion of its soluble form', *Biochem J* **305**(Pt 1), 165–71.
- Landry, C., Santagata, P., Bawab, W., Fournie-Zaluski, M. C., Roques, B. P., Vinay, P. & Crine, P. (1993), 'Characterization of neutral endopeptidase 24.11 in dog glomeruli', *Biochem J* **291**(Pt 3), 773–9.
- LeBien, T. W. (1989), 'Growing human b-cell precursors in vitro: the continuing challenge', *Immunol Today* **10**(9), 296–8.
- Lecomte, J. M., Baumer, P., Lim, C., Duchier, J., Cournot, A., Dussaule, J. C., Ardaillou, R., Gros, C., Chaignon, B., Souque, A. & . (1990), 'Stereoselective protection of exogenous and endogenous atrial natriuretic factor by enkephalinase inhibitors in mice and humans', *Eur. J. Pharmacol.* **179**(1-2), 65–73.
- Ledesma, M. D., Silva, J. S. D., Crassaerts, K., Delacourte, A., Strooper, B. D. & Dotti, C. G. (2000), 'Brain plasmin enhances app alpha-cleavage and abeta degradation and is reduced in alzheimer's disease brains', *EMBO Rep.* **1**(6), 530–535.
- Lee, S. (1997), 'Molecular basis of kell blood group phenotypes', *Vox Sang.* **73**(1), 1–11.
- Lee, S., Debnath, A. K. & Redman, C. M. (2003), 'Active amino acids of the kell blood group protein and model of the ectodomain based on the structure of neutral endopeptidase 24.11', *Blood* .
- Lee, S. L. & Wei, Y. H. (1994), 'The involvement of extracellular proteinases and proteinase inhibitors in mammalian fertilization', *Biotechnol. Appl. Biochem.* **19** ( Pt 1), 31–40.
- Lee, S., Lin, M., Mele, A., Cao, Y., Farmar, J., Russo, D. & Redman, C. (1999), 'Proteolytic processing of big endothelin-3 by the kell blood group protein', *Blood* **94**(4), 1440–50.
- Lee, S., Russo, D. C., Pu, J., Ho, M. & Redman, C. M. (2000), 'The mouse kell blood group gene (kel): cDNA sequence, genomic organization, expression, and enzymatic function', *Immunogenetics* **52**(1-2), 53–62.

- Lee, S., Russo, D. C., Reid, M. E. & Redman, C. M. (2003), 'Mutations that diminish expression of kell surface protein and lead to the kmod rbc phenotype', *Transfusion* **43**(8), 1121–1125.
- Lee, S., Russo, D. C., Reiner, A. P., Lee, J. H., Sy, M. Y., Telen, M. J., Judd, W. J., Simon, P., Rodrigues, M. J., Chabert, T., Poole, J., Jovanovic-Srzentic, S., Levene, C., Yahalom, V. & Redman, C. M. (2001), 'Molecular defects underlying the kell null phenotype', *J. Biol. Chem.* **276**(29), 27281–27289.
- Lee, S., Zambas, E. D., Marsh, W. L. & Redman, C. M. (1991), 'Molecular cloning and primary structure of kell blood group protein', *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(14), 6353–7.
- Lee, S., Zambas, E. D., Marsh, W. L. & Redman, C. M. (1993), 'The human kell blood group gene maps to chromosome 7q33 and its expression is restricted to erythroid cells', *Blood* **81**(10), 2804–2809.
- Lemay, G., Waksman, G., Roques, B. P., Crine, P. & Boileau, G. (1989), 'Fusion of a cleavable signal peptide to the ectodomain of neutral endopeptidase (ec 3.4.24.11) results in the secretion of an active enzyme in cos-1 cells', *J Biol Chem* **264**(26), 15620–3.
- Letarte, M., Vera, S., Tran, R., Addis, J. B., Onizuka, R. J., Quackenbush, E. J., Jongeneel, C. V. & McInnes, R. R. (1988), 'Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase', *J Exp Med* **168**(4), 1247–53.
- Li, C., Booze, R. M. & Hersh, L. B. (1995), 'Tissue-specific expression of rat neutral endopeptidase (neprilysin) mRNAs', *J. Biol. Chem.* **270**(11), 5723–5728.
- Li, M., Mbikay, M. & Arimura, A. (2000), 'Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide precursor is processed solely by prohormone convertase 4 in the gonads', *Endocrinology* **141**(10), 3723–3730.
- Lilius, L., Forsell, C., Axelman, K., Winblad, B., Graff, C. & Tjernberg, L. (2003), 'No association between polymorphisms in the neprilysin promoter region and Swedish Alzheimer's disease patients', *Neurosci. Lett.* **337**(2), 111–113.
- Lipman, M. L., Panda, D., Bennett, H. P., Henderson, J. E., Shane, E., Shen, Y., Goltzman, D. & Karaplis, A. C. (1998), 'Cloning of human pex cDNA. expression, subcellular localization, and endopeptidase activity', *J Biol Chem* **273**(22), 13729–37.
- Llorens, C., Gacel, G., Swerts, J. P., Perdrisot, R., Fournie-Zaluski, M. C., Schwartz, J. C. & Roques, B. P. (1980), 'Rational design of enkephalinase inhibitors: substrate

- specificity of enkephalinase studied from inhibitory potency of various dipeptides', *Biochem Biophys Res Commun* **96**(4), 1710–6.
- Llorens-Cortes, C., Huang, H., Vicart, P., Gasc, J. M., Paulin, D. & Corvol, P. (1992), 'Identification and characterization of neutral endopeptidase in endothelial cells from venous or arterial origins', *J. Biol. Chem.* **267**(20), 14012–14018.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G. & Israel, A. (1998), 'The notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase', *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(14), 8108–12.
- Lorenzo, M. N., Khan, R. Y., Wang, Y., Tai, S. C., Chan, G. C., Cheung, A. H. & Marsden, P. A. (2001), 'Human endothelin converting enzyme-2 (ece2): characterization of mrna species and chromosomal localization', *Biochim. Biophys. Acta* **1522**(1), 46–52.
- Lu, B., Figini, M., Emanuelli, C., Geppetti, P., Grady, E. F., Gerard, N. P., Ansell, J., Payan, D. G., Gerard, C. & Bunnett, N. (1997), 'The control of microvascular permeability and blood pressure by neutral endopeptidase', *Nat. Med.* **3**(8), 904–907.
- Lu, B., Gerard, N. P., Kolakowski, L. F., Bozza, M., Zurakowski, D., Finco, O., Carroll, M. C. & Gerard, C. (1995), 'Neutral endopeptidase modulation of septic shock', *J Exp Med* **181**(6), 2271–5.
- Lu, B., Gerard, N. P., Kolakowski, L. F., Finco, O., Carroll, M. C. & Gerard, C. (1996), 'Neutral endopeptidase modulates septic shock', *Ann N Y Acad Sci* **780**, 156–63.
- Ma, S., Charron, J. & Erikson, R. L. (2003), 'Role of plk2 (snk) in mouse development and cell proliferation', *Mol. Cell Biol.* **23**(19), 6936–6943.
- Maack, T., Suzuki, M., Almeida, F. A., Nussenzveig, D., Scarborough, R. M., McEnroe, G. A. & Lewicki, J. A. (1987), 'Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor', *Science* **238**(4827), 675–678.
- Malfroy, B., Kuang, W. J., Seeburg, P. H., Mason, A. J. & Schofield, P. R. (1988), 'Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase)', *FEBS Lett* **229**(1), 206–10.
- Malfroy, B., Schofield, P. R., Kuang, W. J., Seeburg, P. H., Mason, A. J. & Henzel, W. J. (1987), 'Molecular cloning and amino acid sequence of rat enkephalinase', *Biochem Biophys Res Commun* **144**(1), 59–66.
- Malfroy, B. & Schwartz, J. C. (1982a), 'Properties of "enkephalinase" from rat kidney:

- comparison of dipeptidyl- carboxypeptidase and endopeptidase activities', *Biochem Biophys Res Commun* **106**(2), 276–85.
- Malfroy, B. & Schwartz, J. C. (1982b), 'Purification and substrate specificity of rat kidney "enkephalinase"', *Life Sci* **31**(16-17), 1745–8.
- Marcas-Collado, H., Uchida, G., Costentin, J., Schwartz, J. C. & Lecomte, J. M. (1987), 'Naloxone-reversible antidiarrheal effects of enkephalinase inhibitors', *Eur J Pharmacol* **144**(2), 125–32.
- Marcel, D., Pollard, H., Verroust, P., Schwartz, J. C. & Beaudet, A. (1990), 'Electron microscopic localization of immunoreactive enkephalinase (ec 3.4.24.11) in the neostriatum of the rat', *J. Neurosci.* **10**(8), 2804–2817.
- Marcinkiewicz, M., Marcinkiewicz, J., Chen, A., Leclaire, F., Chretien, M. & Richardson, P. (1999), 'Nerve growth factor and proprotein convertases furin and pc7 in transected sciatic nerves and in nerve segments cultured in conditioned media: their presence in schwann cells, macrophages, and smooth muscle cells', *J. Comp Neurol.* **403**(4), 471–485.
- Marcinkiewicz, M. & Seidah, N. G. (2000), 'Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase bace and alpha-secretase adam10 in mouse and human brain', *J. Neurochem.* **75**(5), 2133–2143.
- Marco, G. S. D., Quinto, B. M., Juliano, M., Carmona, A. K., Stella, R. C., Plavnik, F. L. & Casarini, D. E. (1998), 'Purification and characterization of a neutral endopeptidase-like enzyme from human urine', *J Hypertens* **16**(12 Pt 2), 1971–8.
- Mari, B., Breittmayer, J. P., Guerin, S., Belhacene, N., Peyron, J. F., Deckert, M., Rossi, B. & Auberger, P. (1994), 'High levels of functional endopeptidase 24.11 (cd10) activity on human thymocytes: preferential expression on immature subsets', *Immunology* **82**(3), 433–8.
- Mari, B., Checler, F., Ponzio, G., Peyron, J. F., Manie, S., Farahifar, D., Rossi, B. & Auberger, P. (1992), 'Jurkat t cells express a functional neutral endopeptidase activity (calla) involved in t cell activation', *Embo J* **11**(11), 3875–85.
- Marie-Claire, C., Ruffet, E., Antonczak, S., Beaumont, A., O'Donohue, M., Roques, B. P. & Fournie-Zaluski, M. C. (1997), 'Evidence by site-directed mutagenesis that arginine 203 of thermolysin and arginine 717 of neprilysin (neutral endopeptidase) play

- equivalent critical roles in substrate hydrolysis and inhibitor binding', *Biochemistry* **36**(45), 13938–45.
- Marr, R. A., Rockenstein, E., Mukherjee, A., Kindy, M. S., Hersh, L. B., Gage, F. H., Verma, I. M. & Masliah, E. (2003), 'Nepriylsin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice', *J. Neurosci.* **23**(6), 1992–1996.
- Marsh, W. L. (1992), 'Molecular biology of blood groups: cloning the kell gene', *Transfusion* **32**(2), 98–101.
- Mason, S., Smart, D., Marshall, I. C., McKnight, A., Skepper, J. N. & McNulty, S. (2002), 'Identification and characterisation of functional bombesin receptors in human astrocytes', *Eur. J. Pharmacol.* **438**(1-2), 25–34.
- Matsas, R., Fulcher, I. S., Kenny, A. J. & Turner, A. J. (1983), 'Substance p and [leu]enkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli', *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(10), 3111–5.
- Matsas, R., Kenny, A. J. & Turner, A. J. (1984), 'The metabolism of neuropeptides. the hydrolysis of peptides, including enkephalins, tachykinins and their analogues, by endopeptidase-24.11', *Biochem J* **223**(2), 433–40.
- Matsas, R., Kenny, A. J. & Turner, A. J. (1986), 'An immunohistochemical study of endopeptidase-24.11 ("enkephalinase") in the pig nervous system', *Neuroscience* **18**(4), 991–1012.
- Matthews, B. W. (1988), 'structural basis of the action of thermolysin and related zinc metellopeptidases', *Acc. Chem. Res.* **21**, 333–340.
- Matucci-Cerinic, M., Lombardi, A., Leoncini, G., Pignone, A., Sacerdoti, L., Spillantini, M. G. & Partsch, G. (1993), 'Neutral endopeptidase (3.4.24.11) in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. a marker of disease activity or a regulator of pain and inflammation?', *Rheumatol Int* **13**(1), 1–4.
- Mauborgne, A., Bourgoin, S., Benoliel, J. J., Hirsch, M., Berthier, J. L., Hamon, M. & Cesselin, F. (1987), 'Enkephalinase is involved in the degradation of endogenous substance p released from slices of rat substantia nigra', *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **243**(2), 674–680.
- Mazur-Kolecka, B., Frackowiak, J., Krzeslowska, J., Ramakrishna, N., Haske, T., Emmer-

- ling, M. R., Zhang, W., Kim, K. S. & Wisniewski, H. M. (1999), 'Apolipoprotein e alters metabolism of abeta in cells engaged in beta-amyloidosis', *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **58**(3), 288–295.
- Mbikay, M., Tadros, H., Ishida, N., Lerner, C. P., Lamirande, E. D., Chen, A., El-Alfy, M., Clermont, Y., Seidah, N. G., Chretien, M., Gagnon, C. & Simpson, E. M. (1997), 'Impaired fertility in mice deficient for the testicular germ-cell protease pc4', *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(13), 6842–6.
- Medeiros, M. D. & Turner, A. J. (1994), 'Processing and metabolism of peptide-yy: pivotal roles of dipeptidylpeptidase-iv, aminopeptidase-p, and endopeptidase-24.11', *Endocrinology* **134**(5), 2088–2094.
- Mehta, N. D., Don, J., Zinn, S. A., Millette, C., Wolgemuth, D. J. & Kilpatrick, D. L. (1994), 'Proenkephalin gene expression in testicular interstitial cells is down-regulated coincident with the appearance of pachytene spermatocytes', *Endocrinology* **135**(4), 1543–1550.
- Menzio, D., Gu, Z. F., Maton, P. N. & Bunnett, N. W. (1991), 'Inhibition of peptidases potentiates enkephalin-stimulated contraction of gastric muscle cells', *Am. J. Physiol* **261**(3 Pt 1), G476–G484.
- Meyer, M. H. & R. A. Meyer, J. (2000), 'Mrna expression of pex in mice and rats: the effect of low phosphate diet', *Endocrine*. **13**(1), 81–87.
- Meyer, R. A. J., Young, C. G., Meyer, M. H., Garges, P. L. & Price, D. K. (2000), 'Effect of age on the expression of pex (pex) in the mouse', *Calcif. Tissue Int.* **66**(4), 282–287.
- Mileusnic, D., Lee, J. M., Magnuson, D. J., Hejna, M. J., Krause, J. E., Lorens, J. B. & Lorens, S. A. (1999), 'Neurokinin-3 receptor distribution in rat and human brain: an immunohistochemical study', *Neuroscience* **89**(4), 1269–1290.
- Milhiet, P. E., Chevallier, S., Corbeil, D., Seidah, N. G., Crine, P. & Boileau, G. (1995), 'Proteolytic processing of the alpha-subunit of rat endopeptidase-24.18 by furin', *Biochem J* **309**(Pt 2), 683–8.
- Mizuno, K. & Matsuo, H. (1994), Processing of peptide hormone precursors, in H. Imura, ed., 'The Pituitary Gland', 2nd edition edn, Raven Press, Ltd, book chapter 7, pp. 153–178.
- Mohajeri, M. H., Wollmer, M. A. & Nitsch, R. M. (2002), 'Abeta 42-induced increase in

- nepriylsin is associated with prevention of amyloid plaque formation in vivo', *J. Biol. Chem.* **277**(38), 35460–35465.
- Monsees, T. K., Gornig, M., Schill, W. B. & Miska, W. (1998), 'Possible involvement of proteases in the regulation of spermatogenesis', *Andrologia* **30**(4-5), 185–191.
- LeMoual, H., Devault, A., Roques, B. P., Crine, P. & Boileau, G. (1991), 'Identification of glutamic acid 646 as a zinc-coordinating residue in endopeptidase-24.11', *J Biol Chem* **266**(24), 15670–4.
- LeMoual, H., Dion, N., Roques, B. P., Crine, P. & Boileau, G. (1994), 'Asp650 is crucial for catalytic activity of neutral endopeptidase 24-11', *Eur J Biochem* **221**(1), 475–80.
- Muller, L., Barret, A., Etienne, E., Meidan, R., Valdenaire, O., Corvol, P. & Tougard, C. (2003), 'Heterodimerization of endothelin-converting enzyme-1 isoforms regulates the subcellular distribution of this metalloprotease', *J. Biol. Chem.* **278**(1), 545–555.
- Muller, L., Valdenaire, O., Barret, A., Korth, P., Pinet, F., Corvol, P. & Tougard, C. (2000), 'Expression of the endothelin-converting enzyme-1 isoforms in endothelial cells', *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36**(5 Suppl 1), S15–S18.
- Mzhavia, N., Pan, H., Che, F. Y., Fricker, L. D. & Devi, L. A. (2003), 'Characterization of endothelin-converting enzyme-2. implication for a role in the nonclassical processing of regulatory peptides', *J. Biol. Chem.* **278**(17), 14704–14711.
- Nadel, J. A. (1990), 'Decreased neutral endopeptidases: possible role in inflammatory diseases of airways', *Lung* **168**(Suppl), 123–7.
- Nadel, J. A. (1991), 'Neutral endopeptidase modulates neurogenic inflammation', *Eur Respir J* **4**(6), 745–54.
- Nadel, J. A. (1992), 'Regulation of neurogenic inflammation by neutral endopeptidase', *Am Rev Respir Dis* **145**(2 Pt 2), 48–52.
- Nagatomo, Y., Kitamura, K., Kangawa, K., Fujimoto, Y. & Eto, T. (1996), 'Proadrenomedullin n-terminal 20 peptide is rapidly cleaved by neutral endopeptidase', *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**(3), 539–543.
- Nakayama, K. (1997), 'Furin: a mammalian subtilisin/kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins', *Biochem J* **327**(Pt 3), 625–35.
- Nakayama, K., Kim, W. S., Torii, S., Hosaka, M., Nakagawa, T., Ikemizu, J., Baba, T. & Murakami, K. (1992), 'Identification of the fourth member of the mammalian endo-

- protease family homologous to the yeast kex2 protease. its testis-specific expression', *J Biol Chem* **267**(9), 5897–900.
- Nau, R., Schafer, G. & Conlon, J. M. (1985), 'Proteolytic inactivation of substance p in the epithelial layer of the intestine', *Biochem Pharmacol* **34**(22), 4019–23.
- Nayernia, K., Adham, I. M., Burkhardt-Gottges, E., Neesen, J., Rieche, M., Wolf, S., Sanken, U., Kleene, K. & Engel, W. (2002), 'Asthenozoospermia in mice with targeted deletion of the sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein (smcp) gene', *Mol. Cell Biol.* **22**(9), 3046–3052.
- Nelson, A. E., Mason, R. S. & Robinson, B. G. (1997), 'The pex gene: not a simple answer for x-linked hypophosphataemic rickets and oncogenic osteomalacia', *Mol Cell Endocrinol* **132**(1-2), 1–5.
- Nelson, A. E., Robinson, B. G. & Mason, R. S. (1997), 'Oncogenic osteomalacia: is there a new phosphate regulating hormone?', *Clin Endocrinol (Oxf)* **47**(6), 635–42.
- Nicoll, J. A., Burnett, C., Love, S., Graham, D. I., Dewar, D., Ironside, J. W., Stewart, J. & Vinters, H. V. (1997), 'High frequency of apolipoprotein e epsilon 2 allele in hemorrhage due to cerebral amyloid angiopathy', *Ann. Neurol.* **41**(6), 716–721.
- Norman, J. A., Little, D., Bolgar, M. & Donato, G. D. (1991), 'Degradation of brain natriuretic peptide by neutral endopeptidase: species specific sites of proteolysis determined by mass spectrometry', *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**(1), 22–30.
- Nortier, J., Bernard, A., Roels, H., Deschodt-Lanckman, M., Gueuning, C. & Lauwerys, R. (1997), 'Urinary neutral endopeptidase in workers exposed to cadmium: interaction with cigarette smoking', *Occup. Environ. Med.* **54**(6), 432–436.
- Nortier, J., Pauwels, S., de Prez, E. & Deschodt-Lanckman, M. (1995), 'Human neutrophil and plasma endopeptidase 24.11: quantification and respective roles in atrial natriuretic peptide hydrolysis', *Eur J Clin Invest* **25**(3), 206–12.
- Nostrand, W. E. V. (2000), 'Cellular and transgenic animal models of cerebrovascular amyloidosis', *Mol. Med. Today* **6**(9), 373–374.
- Nostrand, W. E. V., Melchor, J. P., Romanov, G., Zeigler, K. & Davis, J. (2002), 'Pathogenic effects of cerebral amyloid angiopathy mutations in the amyloid beta-protein precursor', *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **977**, 258–265.
- Oblin, A., Danse, M. J. & Zivkovic, B. (1989), 'Metalloendopeptidase (ec 3.4.24.11) but



- not angiotensin converting enzyme is involved in the inactivation of substance p by synaptic membranes of the rat substantia nigra', *Life Sci* **44**(20), 1467–74.
- Octave, J. N. (1995), 'The amyloid peptide precursor in alzheimer's disease', *Acta Neurol Belg* **95**(4), 197–209.
- Oda, M., Morino, H., Maruyama, H., Terasawa, H., Izumi, Y., Torii, T., Sasaki, K., Nakamura, S. & Kawakami, H. (2002), 'Dinucleotide repeat polymorphisms in the neprilysin gene are not associated with sporadic alzheimer's disease', *Neurosci. Lett.* **320**(1-2), 105–107.
- Oefner, C., D'Arcy, A., Hennig, M., Winkler, F. K. & Dale, G. E. (2000), 'Structure of human neutral endopeptidase (neprilysin) complexed with phosphoramidon', *J Mol Biol* **296**(2), 341–9.
- O'Hara, B. F., Donovan, D. M., Lindberg, I., Brannock, M. T., Ricker, D. D., Moffatt, C. A., Klaunberg, B. A., Schindler, C., Chang, T. S., Nelson, R. J. & . (1994), 'Proenkephalin transgenic mice: a short promoter confers high testis expression and reduced fertility', *Mol. Reprod. Dev.* **38**(3), 275–284.
- Ohkubo, K., Baraniuk, J. N., Hohman, R. J., Kaulbach, H. C., Hausfeld, J. N., Merida, M. & Kaliner, M. A. (1993), 'Human nasal mucosal neutral endopeptidase (nep): location, quantitation, and secretion', *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **9**(5), 557–567.
- Ohkubo, K., Okuda, M. & Kaliner, M. A. (1994), 'Immunological localization of neuropeptide-degrading enzymes in the nasal mucosa', *Rhinology* **32**(3), 130–133.
- Olshansky, S. J., Carnes, B. A. & Cassel, C. K. (1993), 'The aging of the human species', *Sci. Am.* **268**(4), 46–52.
- Orzechowski, H. D., Richter, C. M., Funke-Kaiser, H., Lemmer, J., Theis, S. & Paul, M. (1999), 'Cloning and functional characterization of the bovine endothelin-converting enzyme-1a promoter', *Biochim. Biophys. Acta* **1446**(3), 352–358.
- Ottlecz, A., Walker, S., Conrad, M. & Starcher, B. (1991), 'Neutral metalloendopeptidase associated with the smooth muscle cells of pregnant rat uterus', *J. Cell Biochem.* **45**(4), 401–411.
- Ouimet, T., Facchinetti, P., Rose, C., Bonhomme, M. C., Gros, C. & Schwartz, J. C. (2000), 'Neprilysin ii: A putative novel metalloprotease and its isoforms in cns and testis', *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**(3), 565–570.

- Painter, R. G. & Aiken, M. L. (1995), 'Regulation of n-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine receptor recycling by surface membrane neutral endopeptidase-mediated degradation of ligand', *J. Leukoc. Biol.* **58**(4), 468–476.
- Painter, R. G., Dukes, R., Sullivan, J., Carter, R., Erdos, E. G. & Johnson, A. R. (1988), 'Function of neutral endopeptidase on the cell membrane of human neutrophils', *J Biol Chem* **263**(19), 9456–61.
- Papandreou, C. N., Usmani, B., Geng, Y., Bogenrieder, T., Freeman, R., Wilk, S., Finstad, C. L., Reuter, V. E., Powell, C. T., Scheinberg, D., Magill, C., Scher, H. I., Albino, A. P. & Nanus, D. M. (1998), 'Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression', *Nat Med* **4**(1), 50–7.
- Pauwels, S., Najdovski, T., Dimaline, R., Lee, C. M. & Deschodt-Lanckman, M. (1989), 'Degradation of human gastrin and cck by endopeptidase 24.11: differential behaviour of the sulphated and unsulphated peptides', *Biochim. Biophys. Acta* **996**(1-2), 82–88.
- Pearse, R. V., Drolet, D. W., Kalla, K. A., Hooshmand, F., J. R. Bermingham, J. & Rosenfeld, M. G. (1997), 'Reduced fertility in mice deficient for the pou protein sperm-1', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**(14), 7555–7560.
- Pham, I., el Amrani, A. I., Fournie-Zaluski, M. C., Corvol, P., Roques, B. & Michel, J. B. (1992), 'Effects of the selective neutral endopeptidase inhibitor, retrothiorphan, on renal function and blood pressure in conscious normotensive wistar and hypertensive doca-salt rats', *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **20**(6), 847–857.
- Poirier, J. (2000), 'Apolipoprotein e and alzheimer's disease. a role in amyloid catabolism', *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **924**, 81–90.
- Pollard, H., Bouthenet, M. L., Moreau, J., Souil, E., Verroust, P., Ronco, P. & Schwartz, J. C. (1989), 'Detailed immunoradiographic mapping of enkephalinase (ec 3.4.24.11) in rat central nervous system: comparison with enkephalins and substance p', *Neuroscience* **30**(2), 339–76.
- Pozsgay, M., Michaud, C., Liebman, M. & Orlowski, M. (1986), 'Substrate and inhibitor studies of thermolysin-like neutral metalloendopeptidase from kidney membrane fractions. comparison with bacterial thermolysin', *Biochemistry* **25**(6), 1292–9.

- Price, D. L. & Sisodia, S. S. (1998), 'Mutant genes in familial alzheimer's disease and transgenic models', *Annu Rev Neurosci* **21**, 479–505.
- Prior, R., Wihl, G. & Urmoneit, B. (2000), 'Apolipoprotein e, smooth muscle cells and the pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy: the potential role of impaired cerebrovascular a beta clearance', *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **903**, 180–186.
- Qiu, W. Q., Walsh, D. M., Ye, Z., Vekrellis, K., Zhang, J., Podlisny, M. B., Rosner, M. R., Safavi, A., Hersh, L. B. & Selkoe, D. J. (1998), 'Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation', *J. Biol. Chem.* **273**(49), 32730–32738.
- R. C. Bateman, J., Jackson, D., Slaughter, C. A., Unnithan, S., Chai, Y. G., Moomaw, C. & Hersh, L. B. (1989), 'Identification of the active-site arginine in rat neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) as arginine 102 and analysis of a glutamine 102 mutant', *J Biol Chem* **264**(11), 6151–7.
- R. C. Bateman, J., Kim, Y. A., Slaughter, C. & Hersh, L. B. (1990), 'N-bromoacetyl-d-leucylglycine. an affinity label for neutral endopeptidase 24.11', *J Biol Chem* **265**(15), 8365–8.
- Racchi, M. & Govoni, S. (2003), 'The pharmacology of amyloid precursor protein processing', *Exp. Gerontol.* **38**(1-2), 145–157.
- Raharjo, S. B., Emoto, N., Ikeda, K., Sato, R., Yokoyama, M. & Matsuo, M. (2001), 'Alternative splicing regulates the endoplasmic reticulum localization or secretion of soluble secreted endopeptidase', *J. Biol. Chem.* **276**(27), 25612–25620.
- Reilly, C. E. (2001), 'Nepriylsin content is reduced in alzheimer brain areas', *J. Neurol.* **248**(2), 159–160.
- Renneberg, H., Albrecht, M., Kurek, R., Krause, E., Lottspeich, F., Aumuller, G. & Wilhelm, B. (2001), 'Identification and characterization of neutral endopeptidase (ec 3. 4. 24. 11) from human prostasomes—localization in prostatic tissue and cell lines', *Prostate* **46**(3), 173–183.
- Renolleau, S., Dauger, S., Vardon, G., Levacher, B., Simonneau, M., Yanagisawa, M., Gaultier, C. & Gallego, J. (2001), 'Impaired ventilatory responses to hypoxia in mice deficient in endothelin-converting-enzyme-1', *Pediatr. Res.* **49**(5), 705–712.
- Riley, S. C., Wong, E., Findlay, J. K. & Salamonsen, L. A. (1995), 'Localization of neutral

- endopeptidase in the ovine uterus and conceptus during the oestrous cycle and early pregnancy', *Reprod. Fertil. Dev.* **7**(1), 27–33.
- Roher, A. E., Kasunic, T. C., Woods, A. S., Cotter, R. J., Ball, M. J. & Fridman, R. (1994), 'Proteolysis of a beta peptide from alzheimer disease brain by gelatinase a', *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**(3), 1755–1761.
- Roques, B. P. (1998), 'Cell surface metallopeptidases involved in blood pressure regulation: structure, inhibition and clinical perspectives', *Pathol. Biol. (Paris)* **46**(3), 191–200.
- Roques, B. P., Fournie-Zaluski, M. C., Soroca, E., Lecomte, J. M., Malfroy, B., Llorens, C. & Schwartz, J. C. (1980), 'The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice', *Nature* **288**(5788), 286–288.
- Roques, B. P., Noble, F., Dauge, V., Fournie-Zaluski, M. C. & Beaumont, A. (1993), 'Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology', *Pharmacol Rev* **45**(1), 87–146.
- Rose, C., Voisin, S., Gros, C., Schwartz, J. C. & Ouimet, T. (2002), 'Cell-specific activity of neprilysin 2 isoforms and enzymic specificity compared with neprilysin', *Biochem. J.* **363**(Pt 3), 697–705.
- Rowe, P. S. (1998), 'The role of the phex gene (pex) in families with x-linked hypophosphataemic rickets', *Curr Opin Nephrol Hypertens* **7**(4), 367–76.
- Ruchon, A. F., Marcinkiewicz, M., Ellefsen, K., Basak, A., Aubin, J., Crine, P. & Boileau, G. (2000), 'Cellular localization of neprilysin in mouse bone tissue and putative role in hydrolysis of osteogenic peptides', *J Bone Miner Res* **15**(7), 1266–74.
- Ruchon, A. F., Marcinkiewicz, M., Siegfried, G., Tenenhouse, H. S., DesGroseillers, L., Crine, P. & Boileau, G. (1998), 'Pex mrna is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts', *J Histochem Cytochem* **46**(4), 459–68.
- Ruchon, A. F., Tenenhouse, H. S., Marcinkiewicz, M., Siegfried, G., Aubin, J. E., DesGroseillers, L., Crine, P. & Boileau, G. (2000), 'Developmental expression and tissue distribution of phex protein: effect of the hyp mutation and relationship to bone markers', *J Bone Miner Res* **15**(8), 1440–50.
- Russell, F. D. & Davenport, A. P. (1999), 'Evidence for intracellular endothelin-converting enzyme-2 expression in cultured human vascular endothelial cells', *Circ Res* **84**(8), 891–6.

- Russo, D., Redman, C. & Lee, S. (1998), 'Association of xk and kell blood group proteins', *J Biol Chem* **273**(22), 13950–6.
- Russo, D., Wu, X., Redman, C. M. & Lee, S. (2000), 'Expression of kell blood group protein in nonerythroid tissues', *Blood* **96**(1), 340–6.
- Sabbagh, Y., Boileau, G., DesGroseillers, L. & Tenenhouse, H. S. (2001), 'Disease-causing missense mutations in the phex gene interfere with membrane targeting of the recombinant protein', *Hum. Mol. Genet.* **10**(15), 1539–1546.
- Salamonsen, L. A., Butt, A. R., Macpherson, A. M., Rogers, P. A. & Findlay, J. K. (1992), 'Immunolocalization of the vasoconstrictor endothelin in human endometrium during the menstrual cycle and in umbilical cord at birth', *Am. J. Obstet. Gynecol.* **167**(1), 163–167.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977), 'Dna sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977', *Biotechnology* **24**, 104–108.
- Saria, A., Hauser, K. F., Traurig, H. H., Turbek, C. S., Hersh, L. & Gerard, C. (1997), 'Opioid-related changes in nociceptive threshold and in tissue levels of enkephalins after target disruption of the gene for neutral endopeptidase (ec 3.4.24.11) in mice', *Neurosci. Lett.* **234**(1), 27–30.
- Schacke, H., Schumann, H., Hammami-Hauasli, N., Raghunath, M. & Bruckner-Tuderman, L. (1998), 'Two forms of collagen xvii in keratinocytes. a full-length transmembrane protein and a soluble ectodomain', *J. Biol. Chem.* **273**(40), 25937–25943.
- Schang, J. C., Hemond, M., Hebert, M. & Pilote, M. (1986), 'How does morphine work on colonic motility? an electromyographic study in the human left and sigmoid colon', *Life Sci* **38**(8), 671–6.
- Schechter, I. & Berger, A. (1967), 'On the size of the active site in proteases. i. papain', *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**(2), 157–162.
- Schiffrin, E. L. (2001a), 'A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension', *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **38 Suppl 2**, S3–S6.
- Schiffrin, E. L. (2001b), 'Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease', *Am. J. Hypertens.* **14**(6 Pt 2), 83S–89S.

- Schiffrin, E. L. & Touyz, R. M. (1998), 'Vascular biology of endothelin', *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **32 Suppl 3**, S2-13.
- Schmidt, M., Kroger, B., Jacob, E., Seulberger, H., Subkowski, T., Otter, R., Meyer, T., Schmalzing, G. & Hillen, H. (1994), 'Molecular characterization of human and bovine endothelin converting enzyme (ece-1)', *FEBS Lett* **356**(2-3), 238-43.
- Schweizer, A., Valdenaire, O., Koster, A., Lang, Y., Schmitt, G., Lenz, B., Bluethmann, H. & Rohrer, J. (1999), 'Neonatal lethality in mice deficient in xce, a novel member of the endothelin-converting enzyme and neutral endopeptidase family', *J Biol Chem* **274**(29), 20450-6.
- Schweizer, A., Valdenaire, O., Nelbock, P., Deuschle, U., Edwards, J. B. D. M., Stumpf, J. G. & Loffler, B. M. (1997), 'Human endothelin-converting enzyme (ece-1): three isoforms with distinct subcellular localizations', *Biochem J* **328**(Pt 3), 871-7.
- Seidah, N. G. & Chretien, M. (1994), 'Pro-protein convertases of subtilisin/kexin family', *Methods Enzymol* **244**, 175-88.
- Seidah, N. G., Chretien, M. & Day, R. (1994), 'The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions', *Biochimie* **76**(3-4), 197-209.
- Seidah, N. G., Day, R., Hamelin, J., Gaspar, A., Collard, M. W. & Chretien, M. (1992), 'Testicular expression of pc4 in the rat: molecular diversity of a novel germ cell-specific kex2/subtilisin-like proprotein convertase', *Mol Endocrinol* **6**(10), 1559-70.
- Seidah, N. G., Day, R., Marcinkiewicz, M. & Chretien, M. (1998), 'Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bio-active peptides and proteins', *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **839**, 9-24.
- Seidah, N. G., Hamelin, J., Mamarbachi, M., Dong, W., Tardos, H., Mbikay, M., Chretien, M. & Day, R. (1996), 'cdna structure, tissue distribution, and chromosomal localization of rat pc7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases', *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(8), 3388-93.
- Selkoe, D. J. (1998), 'The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in alzheimer's disease', *Trends Cell Biol.* **8**(11), 447-453.
- Shen, R., Milowsky, M. I., Ozaki, N., Navarro, D., Sumitomo, M., Xu, Y. & Nanus, D. M.

- (2002), 'Detection of the p110 beta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase complexed with neutral endopeptidase', *Anticancer Res.* **22**(5), 2533–2538.
- Shen, R., Sumitomo, M., Dai, J., Hardy, D. O., Navarro, D., Usmani, B., Papandreou, C. N., Hersh, L. B., Shipp, M. A., Freedman, L. P. & Nanus, D. M. (2000), 'Identification and characterization of two androgen response regions in the human neutral endopeptidase gene', *Mol. Cell Endocrinol.* **170**(1-2), 131–142.
- Shimada, K., Takahashi, M. & Tanzawa, K. (1994), 'Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells', *J Biol Chem* **269**(28), 18275–8.
- Shimada, K., Takahashi, M., Turner, A. J. & Tanzawa, K. (1996), 'Rat endothelin-converting enzyme-1 forms a dimer through cys412 with a similar catalytic mechanism and a distinct substrate binding mechanism compared with neutral endopeptidase-24.11', *Biochem J* **315**(Pt 3), 863–7.
- Shipp, M. A. & Look, A. T. (1993), 'Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key!', *Blood* **82**(4), 1052–70.
- Shipp, M. A., Richardson, N. E., Sayre, P. H., Brown, N. R., Masteller, E. L., Clayton, L. K., Ritz, J. & Reinherz, E. L. (1988), 'Molecular cloning of the common acute lymphoblastic leukemia antigen (calla) identifies a type ii integral membrane protein', *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(13), 4819–23.
- Shipp, M. A., Stefano, G. B., D'Adamio, L., Switzer, S. N., Howard, F. D., Sinisterra, J., Scharrer, B. & Reinherz, E. L. (1990), 'Downregulation of enkephalin-mediated inflammatory responses by cd10/neutral endopeptidase 24.11', *Nature* **347**(6291), 394–396.
- Shipp, M. A., Stefano, G. B., Switzer, S. N., Griffin, J. D. & Reinherz, E. L. (1991), 'Cd10 (calla)/neutral endopeptidase 24.11 modulates inflammatory peptide-induced changes in neutrophil morphology, migration, and adhesion proteins and is itself regulated by neutrophil activation', *Blood* **78**(7), 1834–41.
- Shipp, M. A., Tarr, G. E., Chen, C. Y., Switzer, S. N., Hersh, L. B., Stein, H., Sunday, M. E. & Reinherz, E. L. (1991), 'Cd10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung', *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(23), 10662–6.

- Shirotani, K., Tsubuki, S., Iwata, N., Takaki, Y., Harigaya, W., Maruyama, K., Kiryu-  
Seo, S., Kiyama, H., Iwata, H., Tomita, T., Iwatsubo, T. & Saido, T. C. (2001),  
'Nepriylisin degrades both amyloid beta peptides 1-40 and 1-42 most rapidly and  
efficiently among thiorphan- and phosphoramidon-sensitive endopeptidases', *J. Biol.*  
*Chem.* **276**(24), 21895–21901.
- Siems, W. E., Maul, B., Wiesner, B., Becker, M., Walther, T., Rothe, L. & Winkler, A.  
(2003), 'Effects of kinins on mammalian spermatozoa and the impact of peptidolytic  
enzymes', *Andrologia* **35**(1), 44–54.
- Siems, W., Maul, B., Krause, W., Gerard, C., Hauser, K. F., Hersh, L. B., Fischer, H. S.,  
Zernig, G. & Saria, A. (2000), 'Neutral endopeptidase and alcohol consumption, expe-  
riments in neutral endopeptidase-deficient mice', *Eur. J. Pharmacol.* **397**(2-3), 327–  
334.
- Skidgel, R. A., Engelbrecht, S., Johnson, A. R. & Erdos, E. G. (1984), 'Hydrolysis of sub-  
stance p and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase', *Peptides*  
**5**(4), 769–776.
- Snell, W. J. & White, J. M. (1996), 'The molecules of mammalian fertilization', *Cell*  
**85**(5), 629–637.
- Snyder, S. H. (1985), 'The molecular basis of communication between cells', *Sci Am*  
**253**(4), 132–41.
- Soleilhac, J. M., Lafuma, C., Porcher, J. M., Auburtin, G. & Roques, B. P. (1996), 'Cha-  
racterization of a soluble form of neutral endopeptidase-24.11 (ec 3.4.24.11) in human  
serum: enhancement of its activity in serum of underground miners exposed to coal  
dust particles', *Eur. J. Clin. Invest* **26**(11), 1011–1017.
- Soleilhac, J. M., Lucas, E., Beaumont, A., Turcaud, S., Michel, J. B., Ficheux, D., Fournie-  
Zaluski, M. C. & Roques, B. P. (1992), 'A 94-kda protein, identified as neutral  
endopeptidase-24.11, can inactivate atrial natriuretic peptide in the vascular endo-  
thelium', *Mol. Pharmacol.* **41**(4), 609–614.
- Sonnenberg, J. L., Sakane, Y., Jeng, A. Y., Koehn, J. A., Ansell, J. A., Wennogle, L. P. &  
Ghai, R. D. (1988), 'Identification of protease 3.4.24.11 as the major atrial natriuretic  
factor degrading enzyme in the rat kidney', *Peptides* **9**(1), 173–80.
- Spencer-Dene, B., Thorogood, P., Nair, S., Kenny, A. J., Harris, M. & Hender-



- son, B. (1994), 'Distribution of, and a putative role for, the cell-surface neutral metallo-endopeptidases during mammalian craniofacial development', *Development* **120**(11), 3213–3226.
- Spillantini, M. G., Sicuteri, F., Salmon, S. & Malfroy, B. (1990), 'Characterization of endopeptidase 3.4.24.11 ("enkephalinase") activity in human plasma and cerebrospinal fluid', *Biochem Pharmacol* **39**(8), 1353–6.
- Steiner, H., Capell, A., Leimer, U. & Haass, C. (1999), 'Genes and mechanisms involved in beta-amyloid generation and alzheimer's disease', *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **249**(6), 266–270.
- Stephenson, S. L. & Kenny, A. J. (1987), 'The hydrolysis of alpha-human atrial natriuretic peptide by pig kidney microvillar membranes is initiated by endopeptidase-24.11', *Biochem. J.* **243**(1), 183–187.
- Sumitomo, M., Shen, R., Walburg, M., Dai, J., Geng, Y., Navarro, D., Boileau, G., Pappandreou, C. N., Giancotti, F. G., Knudsen, B. & Nanus, D. M. (2000), 'Neutral endopeptidase inhibits prostate cancer cell migration by blocking focal adhesion kinase signaling', *J. Clin. Invest* **106**(11), 1399–1407.
- Sunday, M. E., Hua, J., Torday, J. S., Reyes, B. & Shipp, M. A. (1992), 'Cd10/neutral endopeptidase 24.11 in developing human fetal lung. patterns of expression and modulation of peptide-mediated proliferation', *J Clin Invest* **90**(6), 2517–25.
- Takahashi, M., Matsushita, Y., Iijima, Y. & Tanzawa, K. (1993), 'Purification and characterization of endothelin-converting enzyme from rat lung', *J Biol Chem* **268**(28), 21394–8.
- Takaki, Y., Iwata, N., Tsubuki, S., Taniguchi, S., Toyoshima, S., Lu, B., Gerard, N. P., Gerard, C., Lee, H. J., Shirotani, K. & Saido, T. C. (2000), 'Biochemical identification of the neutral endopeptidase family member responsible for the catabolism of amyloid beta peptide in the brain', *J. Biochem. (Tokyo)* **128**(6), 897–902.
- Tam, L. T., Engelbrecht, S., Talent, J. M., Gracy, R. W. & Erdos, E. G. (1985), 'The importance of disulfide bridges in human endopeptidase (enkephalinase) after proteolytic cleavage', *Biochem Biophys Res Commun* **133**(3), 1187–92.
- Tenenhouse, H. S. (1999), 'X-linked hypophosphataemia: a homologous disorder in humans and mice', *Nephrol Dial Transplant* **14**(2), 333–41.

- Thinakaran, G. (1999), 'The role of presenilins in alzheimer's disease', *J Clin Invest* **104**(10), 1321–7.
- Thompson, D. L., Sabbagh, Y., Tenenhouse, H. S., Roche, P. C., Drezner, M. K., Salisbury, J. L., Grande, J. P., Poeschla, E. M. & Kumar, R. (2002), 'Ontogeny of phex/phex protein expression in mouse embryo and subcellular localization in osteoblasts', *J. Bone Miner. Res.* **17**(2), 311–320.
- Torii, S., Yamagishi, T., Murakami, K. & Nakayama, K. (1993), 'Localization of kex2-like processing endoproteases, furin and pc4, within mouse testis by in situ hybridization', *FEBS Lett* **316**(1), 12–6.
- Tran-Paterson, R., Willard, H. F. & Letarte, M. (1989), 'The common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase- 3.4.24.11) gene is located on human chromosome 3', *Cancer Genet Cytogenet* **42**(1), 129–34.
- Turner, A. J. (1997), Endothelin converting enzymes, *in* 'cell-surface peptidases in health and disease', kenny a.j. and bousted c.m. edn, BIOS Scientific Publishers Ltd, pp. 137–153.
- Turner, A. J., Barnes, K., Schweizer, A. & Valdenaire, O. (1998), 'Isoforms of endothelin-converting enzyme: why and where?', *Trends Pharmacol Sci* **19**(12), 483–6.
- Turner, A. J., Brown, C. D., Carson, J. A. & Barnes, K. (2000), 'The neprilysin family in health and disease', *Adv Exp Med Biol* **477**, 229–40.
- Turner, A. J. & Hooper, N. M. (2002), 'The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology', *Trends Pharmacol. Sci.* **23**(4), 177–183.
- Turner, A. J., Isaac, R. E. & Coates, D. (2001), 'The neprilysin (nep) family of zinc metalloendopeptidases: Genomics and function', *Bioessays* **23**(3), 261–9.
- Turner, A. J., Matsas, R. & Kenny, A. J. (1985), 'Are there neuropeptide-specific peptidases?', *Biochem Pharmacol* **34**(9), 1347–56.
- Turner, A. J. & Murphy, L. J. (1996), 'Molecular pharmacology of endothelin converting enzymes', *Biochem. Pharmacol.* **51**(2), 91–102.
- Turner, A. J. & Tanzawa, K. (1997), 'Mammalian membrane metallopeptidases: Nep, ece, kell, and pex', *Faseb J* **11**(5), 355–64.
- Ura, N., Carretero, O. A. & Erdos, E. G. (1987), 'Role of renal endopeptidase 24.11 in kinin metabolism in vitro and in vivo', *Kidney Int.* **32**(4), 507–513.

- Valdenaire, O., Lepailleur-Enouf, D., Egidy, G., Thouard, A., Barret, A., Vranckx, R., Tougard, C. & Michel, J. B. (1999), 'A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ece-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization', *Eur. J. Biochem.* **264**(2), 341–349.
- Valdenaire, O., Richards, J. G., Faull, R. L. & Schweizer, A. (1999), 'Xce, a new member of the endothelin-converting enzyme and neutral endopeptidase family, is preferentially expressed in the CNS', *Brain Res Mol Brain Res* **64**(2), 211–21.
- Valdenaire, O., Rohrbacher, E. & Mattei, M. G. (1995), 'Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ece-1)', *J Biol Chem* **270**(50), 29794–8.
- Valdenaire, O. & Schweizer, A. (2000), 'Endothelin-converting enzyme-like 1 (ecel1; 'xce'): a putative metallopeptidase crucially involved in the nervous control of respiration', *Biochem Soc Trans* **28**(4), 426–30.
- Varandani, P. T. & Shroyer, L. A. (1977), 'A rat kidney neutral peptidase that degrades b chain of insulin, glucagon, and acth: purification by affinity chromatography and some properties', *Arch. Biochem. Biophys.* **181**(1), 82–93.
- Vehmas, A. K., Kawas, C. H., Stewart, W. F. & Troncoso, J. C. (2003), 'Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease', *Neurobiol. Aging* **24**(2), 321–331.
- Vijayaraghavan, J., Scicli, A. G., Carretero, O. A., Slaughter, C., Moomaw, C. & Hersh, L. B. (1990), 'The hydrolysis of endothelins by neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase)', *J. Biol. Chem.* **265**(24), 14150–14155.
- Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P. & Kopf, G. S. (1995), 'Capacitation of mouse spermatozoa. i. correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation', *Development* **121**(4), 1129–1137.
- Vlahovic, P. & Stefanovic, V. (1998), 'Kidney ectopeptidases. structure, functions and clinical significance', *Pathol. Biol. (Paris)* **46**(10), 779–786.
- Waksman, G., Hamel, E., Bouboutou, R., Besselievre, R., Fournie-Zaluski, M. C. & Roques, B. P. (1984), '[regional distribution of enkephalinase in the rat brain by autoradiography]', *C R Acad Sci III* **299**(14), 613–5.
- Waksman, G., Hamel, E., Delay-Goyet, P. & Roques, B. P. (1986), 'Neuronal localization

- of the neutral endopeptidase 'enkephalinase' in rat brain revealed by lesions and autoradiography', *Embo J* **5**(12), 3163–6.
- Waksman, G., Hamel, E., Delay-Goyet, P. & Roques, B. P. (1987), 'Neutral endopeptidase-24.11, mu and delta opioid receptors after selective brain lesions: an autoradiographic study', *Brain Res.* **436**(2), 205–216.
- Wegiel, J., Wang, K. C., Tarnawski, M. & Lach, B. (2000), 'Microglia cells are the driving force in fibrillar plaque formation, whereas astrocytes are a leading factor in plaque degradation', *Acta Neuropathol. (Berl)* **100**(4), 356–364.
- Werb, Z. & Clark, E. J. (1989), 'Phorbol diesters regulate expression of the membrane neutral metalloendopeptidase (ec 3.4.24.11) in rabbit synovial fibroblasts and mammary epithelial cells', *J. Biol. Chem.* **264**(16), 9111–9113.
- Wilkins, M. R. (1993), 'Clinical potential of endopeptidase-24.11 inhibitors in cardiovascular disease', *Biochem. Soc. Trans.* **21** ( Pt 3)(3), 673–678.
- Wilkins, M. R., Unwin, R. J. & Kenny, A. J. (1993), 'Endopeptidase-24.11 and its inhibitors: potential therapeutic agents for edematous disorders and hypertension', *Kidney Int* **43**(2), 273–85.
- Wyss-Coray, T., Lin, C., Yan, F., Yu, G. Q., Rohde, M., McConlogue, L., Masliah, E. & Mucke, L. (2001), 'Tgf-beta1 promotes microglial amyloid-beta clearance and reduces plaque burden in transgenic mice', *Nat Med.* **7**(5), 612–618.
- Wyss-Coray, T., Loike, J. D., Brionne, T. C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., Silverstein, S. C. & Husemann, J. (2003), 'Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ', *Nat Med.* **9**(4), 453–457.
- Wyss-Coray, T. & Mucke, L. (2002), 'Inflammation in neurodegenerative disease—a double-edged sword', *Neuron* **35**(3), 419–432.
- Xu, D., Emoto, N., Giaid, A., Slaughter, C., Kaw, S., deWit, D. & Yanagisawa, M. (1994), 'Ece-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1', *Cell* **78**(3), 473–85.
- Yamada, M. (2000), 'Cerebral amyloid angiopathy: an overview', *Neuropathology.* **20**(1), 8–22.
- Yamada, M., Sodeyama, N., Itoh, Y., Takahashi, A., Otomo, E., Matsushita, M. & Mi-

- zusawa, H. (2003), 'Association of neprilysin polymorphism with cerebral amyloid angiopathy', *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **74**(6), 749–751.
- Yamada, M., Tsukagoshi, H., Otomo, E. & Hayakawa, M. (1987), 'Cerebral amyloid angiopathy in the aged', *J. Neurol.* **234**(6), 371–376.
- Yamada, M., Tsukagoshi, H., Otomo, E. & Hayakawa, M. (1988), 'Systemic amyloid deposition in old age and dementia of alzheimer type: the relationship of brain amyloid to other amyloid', *Acta Neuropathol. (Berl)* **77**(2), 136–141.
- Yamaguchi, T., Fukase, M., Arao, M., Sugimoto, T. & Chihara, K. (1992), 'Endothelin 1 hydrolysis by rat kidney membranes', *FEBS Lett.* **309**(3), 303–306.
- Yamazaki, T., Honda, M., Yamamoto, Y., Hazato, T. & Ono, H. (2001), 'Effects of spiorphin and tynorphin on synaptic transmission in rat hippocampal slices', *Eur J Pharmacol* **413**(2-3), 173–178.
- Yamin, R., Malgeri, E. G., Sloane, J. A., McGraw, W. T. & Abraham, C. R. (1999), 'Metalloendopeptidase ec 3.4.24.15 is necessary for alzheimer's amyloid-beta peptide degradation', *J. Biol. Chem.* **274**(26), 18777–18784.
- Yanagisawa, H., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Emoto, N., Williams, S. C., Takeda, S., Clouthier, D. E. & Yanagisawa, M. (2000), 'Disruption of ece-1 and ece-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development', *J. Clin. Invest* **105**(10), 1373–1382.
- Yanagisawa, H., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Williams, S. C., Clouthier, D. E. & Yanagisawa, M. (1998), 'Role of endothelin-1/endothelin-a receptor-mediated signaling pathway in the aortic arch patterning in mice', *J Clin Invest* **102**(1), 22–33.
- Yanagisawa, H., Yanagisawa, M., Kapur, R. P., Richardson, J. A., Williams, S. C., Clouthier, D. E., de Wit, D., Emoto, N. & Hammer, R. E. (1998), 'Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene', *Development* **125**(5), 825–36.
- Yankner, B. A. (1996), 'Mechanisms of neuronal degeneration in alzheimer's disease', *Neuron* **16**(5), 921–932.
- Yankner, B. A., Duffy, L. K. & Kirschner, D. A. (1990), 'Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides', *Science* **250**(4978), 279–282.

- Yasojima, K., Akiyama, H., McGeer, E. G. & McGeer, P. L. (2001), 'Reduced neprilysin in high plaque areas of alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide', *Neurosci. Lett.* **297**(2), 97–100.
- Yasojima, K., McGeer, E. G. & McGeer, P. L. (2001), 'Relationship between beta amyloid peptide generating molecules and neprilysin in alzheimer disease and normal brain', *Brain Res.* **919**(1), 115–121.
- Zappulla, J. P. & DesGroseillers, L. (2001), 'Neutral endopeptidase is expressed on the follicular granulosa cells of rabbit ovaries', *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.* **129**(4), 863–870.
- Zhang, Y. & Snell, W. J. (1993), 'Differential regulation of adenylcyclases in vegetative and gametic flagella of chlamydomonas', *J. Biol. Chem.* **268**(3), 1786–1791.

# A

---

## Contributions des différents auteurs

### A.1 Chapitre 2: Declining Expression of Neprilysin in Alzheimer's Disease Vasculature: Possible Involvement in Cerebral Amyloid Angiopathy

**Mélanie Carpentier:**

- Analyse de l'expression de l'Endopeptidase Neutre dans le cortex, les leptoméniges et l'hippocampe (Figures 1, 3, 4, 5).
- Analyse de la spécificité de l'anticorps 18B5 (Figure 2).
- Écriture du manuscrit.

**Yves Robitaille:**

Pathologiste, prélèvement des tissus.

**Luc DesGroseillers:**

Écriture du manuscrit, expertise technique.

**Guy Boileau:**

Écriture du Manuscrit, expertise technique.

**Mieczyslaw Marcinkiewicz:**

- Écriture du Manuscrit, expertise technique.
- Immunohistochimie (Figure 6).

## A.2 Chapitre 3: Molecular cloning and biochemical characterization of a new mouse testis soluble-zinc-metalloproteinase of the neprilysin family

- Galia Ghaddar:**
- Clonage de NL1 (Figures 1 et 2).
  - Analyse de l'activité enzymatique (Figures 6 et 7 et Table 2).
  - Buvardage Northern (Figure 8).
  - Écriture du Manuscrit.
- Andréa Frota-Ruchon:**
- Identification du premier clone partiel de NL1 (Figure 1).
  - hybridation *in situ* (Figure 9).
- Mélanie Carpentier:**
- Établissement de lignées cellulaires stables dans les cellules HEK 293.
  - Analyse de l'expression cellulaire et du processus de maturation de NL1 (expression dans les cellules HEK 293, mutagenèse dirigée, tests avec inhibiteur de convertase: Figure 4 et 5).
  - Analyse de l'expression tissulaire de NL1 par RT-PCR (Figure 8).
- Mieczyslaw Marcinkiewicz:** Expertise en hybridation *in situ*.
- Nabil Seidah:** A fourni l'inhibiteur de convertase  $\alpha 1$ -PDX.
- Philippe Crine:** Révision du Manuscrit, expertise technique.
- Luc DesGroseillers:** Révision et écriture du Manuscrit, expertise technique.
- Guy Boileau:** Révision et écriture du manuscrit, expertise technique.



## A.3 Chapitre 4: The Neuropeptide-degrading enzyme NL1 is expressed in specific neurons of mouse brain.

- Mélanie Carpentier:** A effectué tout le travail présenté dans cet article.
- Hybridation *in situ* (Figures 1, 2, 3, 4, et la Table 1).
  - Production, purification de NL1 et identification de nouveaux substrats (Figure 5 et Table 2).
  - Écriture du manuscrit.
- Mieczyslaw Marcinkiewicz:** Révision du manuscrit, expertise technique.
- Guy Boileau:** Révision du manuscrit, expertise technique.
- Luc DesGroseillers:** Écriture du manuscrit et expertise technique.

## A.4 Chapitre 5: Reduced fertility in male mice deficient in the zinc metallopeptidase NL1

- Mélanie Carpentier:** –A effectué tout le travail présenté dans cet article (Figures 1, 2, 3, 4, et Tables I, II, III, IV, V et VI).  
– Écriture du manuscrit.
- Christine Guillemette:** Effectué l'analyse des paramètres fonctionnels des spermatozoïdes avec Mélanie Carpentier (Table V).
- Janice Bailey:** Expertise technique (fertilité) et révision du manuscrit.
- Guy Boileau:** Expertise technique et révision du manuscrit.
- Lucie Jeannotte:** Expertise technique (*Knock out*) et révision du manuscrit.
- Luc DesGroseillers:** Expertise technique et écriture du manuscrit.
- Jean Charron:** Expertise technique (*Knock out*) et révision du manuscrit. A également effectué l'injection de cellules ES dans les blastocytes et l'implantation des embryons dans les mères porteuses.

## A.5 Chapitre 6: M684. Neprilysin-2

**Mélanie Carpentier:** Écriture du manuscrit

**Luc DesGroseillers:** Révision du manuscrit

**Guy Boileau:** Écriture du manuscrit.

