

2m11.3178.10

Université de Montréal

**Inhibition cellulaire de la proprotéine convertase 1 et  
activité des proprotéines convertases dans le réticulum endoplasmique**

par

**Alexandre Salvas**

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences  
en biochimie

Mai 2004



© Alexandre Salvas, 2004

W

4

U58

2004

V. 098

**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

Ce mémoire intitulé:

**Inhibition cellulaire de la proprotéine convertase 1 et  
activité des proprotéines convertases dans le réticulum endoplasmique**

Présenté par:

Alexandre Salvas

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président-rapporteur: Dr. Guy Boileau

Directeur de recherche: Dr. Nabil G. Seidah

Membre du jury: Dr. Luis Rokeach

## Sommaire

Le but de ce projet de maîtrise était d'inhiber spécifiquement PC1 (une protéase à sérine impliquée dans la maturation des prohormones polypeptidiques) dans les granules sécrétoires (là où est concentrée la majorité de l'activité de cette enzyme). Nous avons élaboré notre stratégie d'inhibition autour de la serpine PDX. Il s'agit d'un substrat suicide spécifique aux PCs et sécrété constitutivement. Puisqu'il inhibe la majorité des PCs, il fut nécessaire de le modifier pour le rendre spécifique qu'à PC1. Cela fut fait en mutant les résidus en P1' et P2' du site inhibiteur **RIPR** de SI<sup>384</sup> à LE. Par ailleurs nous avons ajouté au PDX le domaine C-terminal de PC1 (CT). Il a été prouvé que l'ajout de ce dernier à une protéine de la voie constitutive pouvait la rediriger vers la voie régulée. L'inhibiteur ainsi créé, le PDX-CT LE, inhibe efficacement PC1 et PC2 dans les cellules endocriniennes AtT20. En outre il n'inhibe pas ou peu d'autres PCs telles que la furine, PC5-A et PC7. Ainsi il faudra faire d'autres mutations dans le PDX-CT LE afin de prévenir l'inhibition de PC2. Par ailleurs notre inhibiteur n'est pas ciblé aux granules; il est sécrété constitutivement. Nous pourrions toutefois régler ce problème simplement en trouvant un autre motif de ciblage au PDX que le CT.

Ajoutons que nos résultats nous ont amenés sur une voie inattendue: la remise en question du mécanisme d'activation des PCs. En effet il est généralement reconnu que les convertases sont inactives *en trans* dans le RE et qu'elles s'autoactivent en clivant leur prosegment au site secondaire dans le RTG. Néanmoins nous avons découvert une activité des PCs dans le RE et nous pouvons attribuer celle-ci aux PCs néo-synthétisées, c'est-à-dire celles encore complexées à leur prosegment par des liens non-covalents. Nous proposons que le pH régule l'activité des convertases du type furine en agissant sur les substrats plutôt que sur les enzymes elles-mêmes.

Mots clés: furine, PC, PC1, réticulum endoplasmique, granules sécrétoires, PDX, prosegment, sécrétion régulée, C-terminus de PC1, activation des PCs

## Abstract

The aim of this project was to make a specific PC1 inhibitor (PC1 is a serine protease that matures prohormones) targeted to secretory granules (where we find most of PC1 activity). In order to do this, we mutated the PDX serpin, which is a suicide substrate that inhibits only the PCs and that is secreted by the constitutive pathway. As it inhibits most of the PCs, it was necessary to make it specific to PC1. So we mutated the PDX P1' and P2' residues of the inhibitory site from SI<sup>384</sup> to LE. Also we added PC1 C-terminus (CT) to the PDX. It was shown that CT can act as a secretory granules targeting signal for a protein sorted into the constitutive pathway. The inhibitor, PDX-CT LE, inhibits PC1 and PC2 in the AtT20 endocrine cells. Moreover it does not inhibit furin, PC5-A and PC7. So we will make others mutations in PDX-CT LE to prevent PC2 inhibition. However the PDX-CT LE is not targeted to the regulated pathway. We propose to fuse PDX to a granule targeting signal other than CT.

Nevertheless, our results showed something totally new: the activity of neo-synthesized PCs in the endoplasmic reticulum (ER). The theory predicts that neo-synthesized PCs are not active *in trans* in the ER since the inhibitory interaction with their prosegment. They become active in the *trans*-Golgi network (TGN) when they autocleave their prosegment at the secondary site. Nevertheless we found that PCs interacting with their prosegment by non-covalent links in the ER are active *in trans*. We hypothesize that pH regulates convertase activity by acting on the substrates rather than on the enzymes.

Key words: furin, PC, PC1, endoplasmic reticulum, secretory granules, PDX, prosegment, regulated secretion, PC1 C-terminus, PCs activation

## Table des matières

Sommaire	<i>i</i>
Abstract	<i>ii</i>
Table des matières	<i>iii</i>
Liste des figures	<i>v</i>
Liste des tableaux	<i>vi</i>
Liste des abréviations	<i>vii</i>
Remerciements	<i>x</i>
Chapitre I: Introduction	<i>1</i>
1.1 Les hormones polypeptidiques	<i>1</i>
1.2 La voie sécrétoire cellulaire	<i>2</i>
1.3 Les proprotéines convertases	<i>9</i>
1.4 Définition du projet de recherche	<i>17</i>
Chapitre II: Matériel et méthodes	<i>19</i>
2.1 Construction d'ADN plasmidique et mutagenèse dirigée	<i>19</i>
2.2 Culture cellulaire et obtention de clones AtT20 et de pools de cellules FD11	<i>20</i>
2.3 Marquage métabolique de cellules avec acides aminés radioactifs, séquençage de protéines par dégradation de Edman et immunobuvardage	<i>21</i>
Chapitre III: Résultats	<i>24</i>
3.1 Inhibition de PC1 dans les granules sécrétoires: stratégie basée sur le prosegment de l'enzyme	<i>24</i>
3.2 Inhibition de PC1 dans les granules sécrétoires: stratégie basée sur le PDX	<i>27</i>
3.3 Activité des PCs dans le RE	<i>32</i>
Chapitre IV: Discussion	<i>35</i>
4.1 Inhibition de PC1 dans les granules sécrétoires: stratégie basée sur le prosegment de l'enzyme	<i>35</i>

4.2 Inhibition de PC1 dans les granules sécrétoires: stratégie basée sur le  
PDX 36

4.3 Activité des PCs dans le RE: les implications théoriques pour le  
modèle d'activation des PCs 41

Chapitre V: Conclusion 48

Bibliographie 49

## Liste des figures

Figure 1: Les cinq classes de récepteurs des hormones polypeptidiques 2-A

Figure 2: La voie sécrétoire cellulaire 2-B

Figure 3: Endoprotéolyse des prohormones polypeptidiques 6-A

Figure 4: Site de clivage reconnu par les PCs 9-A

Figure 5: Localisation des PCs dans la voie sécrétoire cellulaire 9-B

Figure 6: Représentation schématique des PCs 9-C

Figure 7: Maturation protéolytique de PC1 dans la voie sécrétoire cellulaire 9-D

Figure 8: Complexe covalent stable entre l' $\alpha$ 1-antitrypsine et l'élastase 14-A

Figure 9: Clivage de proCT et pro\*CT dans les cellules AtT20 et HK293 24-A

Figure 10: Maturation précoce du proCT 26-A

Figure 11: Stabilité du PDX, PDX-CT, PDX-CT LE, proCT et pro\*CT dans les cellules AtT20 28-A

Figure 12: Expression de PDX, PDX-CT et PDX-CT LE dans les clones AtT20 28-B

Figure 13: Ciblage intracellulaire du PDX, PDX-CT et PDX-CT LE dans les cellules AtT20 29-A

Figure 14: Inhibition de la maturation de la POMC dans la voie constitutive des clones AtT20 exprimant stablement PDX, PDX-CT ou PDX-CT LE 30-A

Figure 15: Inhibition de la maturation du proPDGF-A dans les cellules FD11 32-A

Figure 16: Maturation par les PCs du proCT dans le RE des cellules FD11 33-A

Figure 17: Maturation par la furine du proCT néo-synthétisé dans le RE des cellules FD11 33-B

Figure 18: Maturation par la furine R75A du proCT dans le RE des cellules FD11 34-A

Figure 19: Perspectives futures pour l'inhibition de PC1 35-A

Figure 20: Trafic intracellulaire de la furine de type sauvage et de la furine R75A 43-A



## Liste des tableaux

Tableau I. Amorces employées pour les RCP 20

## Liste des abréviations

Ac: anticorps

ACTH: adrenocorticotropin hormone

ADNc: ADN complémentaire

$\alpha$ 1-AT:  $\alpha$ 1-antitrypsine

BDNF: brain-derived neurotrophic factor

BFA: brefeldine A

[Ca<sup>2+</sup>]: concentration en ion calcium

CART: cocaine and amphetamine regulated transcript

CgB: chromogranine B

COPI: coat protein complex I

COPII: coat protein complex II

CPD: carboxypeptidase D

CPE: carboxypeptidase E

CRH: corticotrophin-releasing hormone

CT: domaine C-terminal

Ctl: contrôle

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

DTT: dithiothreitol

EDEM: ER degradation-enhancing 1,2-mannosidase-like protein

EGFP: enhanced green fluorescent protein

$\beta$ -END:  $\beta$ -endorphine

Endo: endocytose

ER: endoplasmic reticulum

ERAD: endoplasmic reticulum-associated degradation

F12: F12 Ham's medium

FACS: fluorescence activated cell sorting

FBS: fetal bovine serum

GC: récepteur guanylyl cyclase membranaire

GFP: green fluorescent protein  
GHRH: growth hormone-releasing hormone  
GLP1: glucagon-like peptide 1  
GMPc: guanosine monophosphate cyclique  
GnRH: gonadotropin-releasing hormone  
GPCR: G protein coupled receptor  
GS: granule sécrétoire  
GTM: gentamycine  
GTP: guanosine triphosphate  
HK293: human embryonic kidney 293 cells  
HRP: horseradish peroxidase  
ISG: immature secretory granule  
 $\beta$ -LPH:  $\beta$ -lipotropin hormone  
 $\gamma$ -LPH:  $\gamma$ -lipotropin hormone  
MSG: mature secretory granule  
NGF: nerve growth factor  
NP-40: nonidet P-40  
P: domaine P  
PACE4: paired basic amino acid cleaving enzyme 4  
PBS: phosphate buffered saline solution  
PC: proprotéine convertase  
PC1: proprotein convertase 1  
PC2: proprotéine convertase 2  
PC4: proprotéine convertase 4  
PC5: proprotéine convertase 5 (isoformes A et B confondues)  
PC5-A: proprotéine convertase 5 isoforme A  
PC5-A/B: proprotéine convertase 5 isoformes A et B  
PC5-B: proprotéine convertase 5 isoforme B  
PC7: proprotéine convertase 7  
PDGF-A: platelet-derived growth factor A

PDX:  $\alpha$ 1-antitrypsine Portland  
POMC: proopiomélanocortine  
Pro: prosegment  
PRS: particule de reconnaissance du signal  
PS: peptide signal  
RCG: réseau *cis*-Golgien  
RCP: réaction en chaîne de la polymérase  
RE: réticulum endoplasmique  
RIPA: radio immunoprecipitation assay buffer  
RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium  
RT: room temperature  
RTG: réseau *trans*-Golgien  
RTK: récepteur tyrosine kinase  
SDS: sodium dodécyl sulfate  
SDS-PAGE: SDS polyacrylamide gel electrophoresis  
STAT: signal transducer and activator of transcription  
TGF- $\beta$ : transforming growth factor  $\beta$   
TGN: *trans*-Golgi network  
VEGF-C: vascular endothelial growth factor C  
VIP: vasointestinal peptide

## **Remerciements**

Je remercie le Dr. Nabil G. Seidah pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour le support intellectuel qu'il m'a apporté tout au long de ma maîtrise. Également, j'en profite pour remercier le Dr. Annik Prat pour les bons conseils qu'elle m'a donnés durant ces trois années de travail. Pour finir, je suis reconnaissant du support technique que m'ont apporté Suzanne Benjannet, Andrew Chen, Louise Wickham, Josée Hamelin et Marie-Claude Asselin.

## Chapitre I: Introduction

### 1.1 Les hormones polypeptidiques

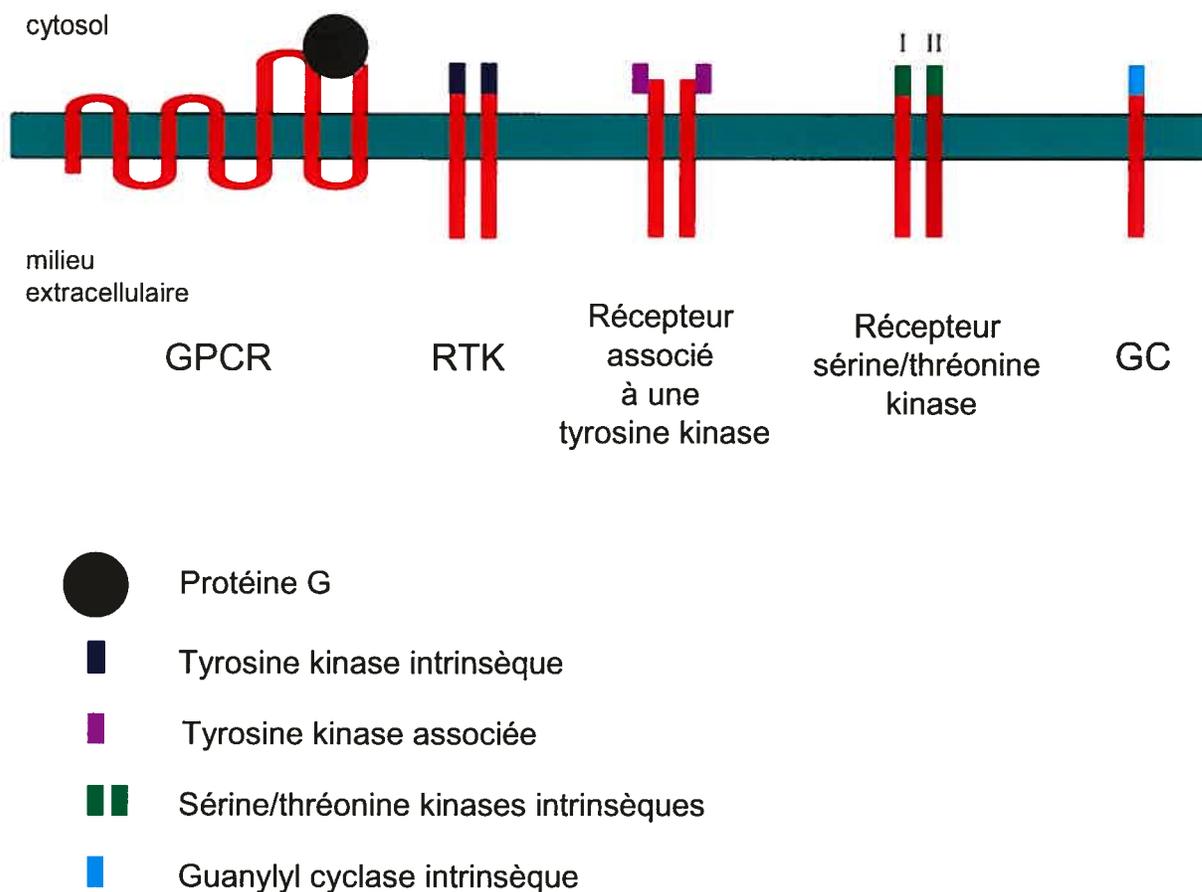
Les hormones ont été définies à l'origine comme étant des substances chimiques physiologiquement actives, sécrétées par une glande endocrine et voyageant jusqu'à leur site d'action par le système sanguin. Les glandes endocrines sont pour leur part des glandes qui sécrètent leurs produits (hormones) directement dans le fluide extracellulaire. Par la suite les hormones peuvent entrer dans le sang en passant par la paroi des vaisseaux capillaires. Cependant cette définition est trop restrictive, car elle n'inclut pas les hormones qui ne sont pas fabriquées par les glandes endocrines classiques (les neurones de l'hypothalamus par exemple synthétisent l'oxytocine) et celles qui agissent de manière paracrine (c'est le cas de bien des facteurs de croissance). On distingue généralement deux types d'hormones: les liposolubles et les hydrosolubles. Les premières parviennent à traverser la membrane plasmique en raison de leur hydrophobicité et leurs récepteurs sont intracellulaires. Elles exercent le plus souvent leurs actions au niveau génomique. Les hormones hydrosolubles quant à elles ont une structure polypeptidique ou sont des dérivés d'acides aminés et ne peuvent traverser les membranes lipidiques; leurs récepteurs sont donc localisés à la surface des cellules et sont transmembranaires. De plus leurs actions sont surtout non-génomiques. Comme ces hormones ne peuvent traverser la membrane des cellules cibles, elles ne peuvent agir directement à l'intérieur de celles-ci. La liaison à leurs récepteurs provoquent donc la génération de seconds messagers dans le cytosol qui transduisent le signal initié par l'hormone [1]. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux hormones polypeptidiques au cours de ce travail.

Les récepteurs des hormones polypeptidiques sont répartis en cinq grandes classes: les récepteurs couplés à une protéine G (GPCRs), les récepteurs tyrosine kinase (RTKs), les récepteurs associés à une tyrosine kinase, les récepteurs

sérine/thréonine kinase et les récepteurs guanylyl cyclase membranaires (GCs) (Figure 1, p.2-A). Les GPCRs sont des protéines à sept domaines transmembranaires interagissant intracellulairement avec un complexe trimérique, la protéine G. Lorsque le récepteur se lie à son agoniste, la protéine G est activée et stimule (ou inhibe) à son tour plusieurs effecteurs dont la phospholipase C $\beta$  et l'adénylyl cyclase. L'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et la vasopressine reconnaissent des récepteurs de cette classe. Les RTKs, les récepteurs associés à une tyrosine kinase et les récepteurs sérine/thréonine kinase ne sont constitués quant à eux que d'un seul domaine transmembranaire. Dans le cas des RTKs et des récepteurs sérine/thréonine kinase, la portion cytosolique de la protéine a une activité kinase intrinsèque, tandis que chez les récepteurs associés à une tyrosine kinase cette région de la protéine est plutôt associée non-covalentement à une kinase. Néanmoins les mécanismes d'activation des trois classes de récepteurs se ressemblent: le ligand se lie à son récepteur ce qui provoque sa dimérisation et son activation, puis le récepteur activé phosphoryle ses effecteurs comme la phospholipase C $\gamma$  ou les facteurs de transcription STAT et Smad. Le PDGF-A, l'hormone de croissance et le TGF- $\beta$  sont des exemples d'agonistes liant respectivement un RTK, un récepteur associé à une tyrosine kinase et un récepteur sérine/thréonine kinase. Pour ce qui est des GCs, ils ne sont composés que d'un seul domaine transmembranaire et leur portion cytosolique a une activité guanylyl cyclase intrinsèque. La liaison d'un ligand comme les peptides natriurétiques engendre l'activation du récepteur qui convertit alors le GTP en GMPc. Ce dernier stimule l'activité de la protéine kinase G [1].

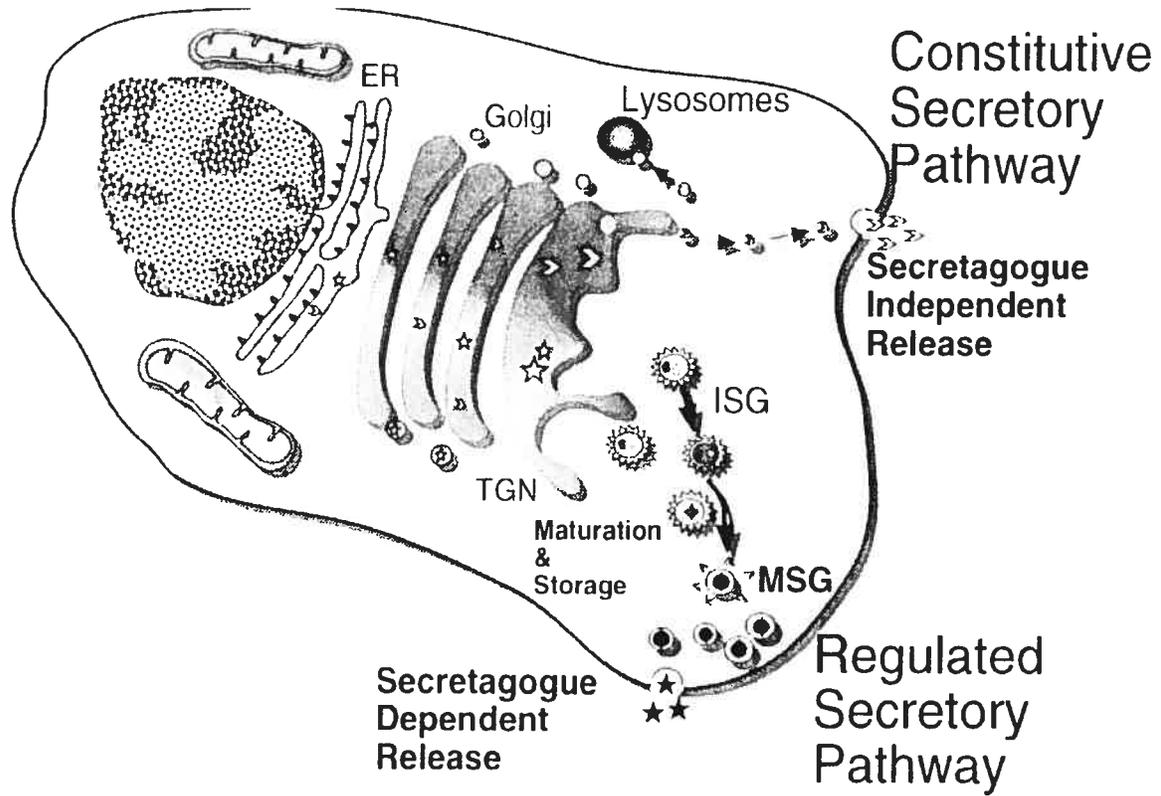
### *1.2 La voie sécrétoire cellulaire*

Les hormones polypeptidiques sont fabriquées à l'intérieur des cellules et sécrétées dans le fluide extracellulaire comme toutes les hormones d'ailleurs. Leur synthèse et leur sécrétion se font donc dans et par la voie sécrétoire cellulaire. Cette voie débute avec le réticulum endoplasmique (RE). Il s'agit d'un compartiment



**Figure 1:** Les cinq classes de récepteurs des hormones polypeptidiques

Contrairement aux RTKs ou aux récepteurs associés à une tyrosine kinase, les récepteurs sérine/thréonine kinase forment des hétérodimères lorsqu'ils sont activés par leur ligand. En effet, la liaison du ligand au récepteur de type II provoque la dimérisation de ce dernier avec le récepteur de type I. Chacun possède sa propre activité sérine/thréonine kinase intrinsèque.



**Figure 2:** La voie sécrétoire cellulaire

Cette figure est tirée de la référence 56. ISG: immature secretory granule,  
MSG: mature secretory granule.

intracellulaire séparé du cytosol par un réseau de membranes (Figure 2, p.2-B). C'est le lieu de synthèse des protéines sécrétées, des protéines transmembranaires et des lipides de la plupart des organelles. Le pH dans la lumière du RE est de 7.4 et la concentration en ion calcium ( $[Ca^{2+}]$ ) s'élève à 1 mM comparativement à 7.2 et 0.1  $\mu$ M pour le cytosol [2]. Comme toutes les protéines sécrétées, les hormones polypeptidiques possèdent à l'extrémité N-terminale une séquence hydrophobe appelée peptide signal (PS). Celui-ci dirige le polypeptide en cours de synthèse par le ribosome (la chaîne naissante) du cytosol vers la surface du RE. Cela est rendu possible grâce une interaction entre le PS de la chaîne naissante et une protéine dénommée particule de reconnaissance du signal (PRS). En effet, en s'associant à son récepteur à la surface du RE, PRS y entraîne par la même occasion le ribosome et la chaîne naissante. Une fois localisé à la surface du RE, le ribosome entre en contact avec le complexe Sec61. Il s'agit d'un complexe protéique faisant office de canal pour le passage des polypeptides à l'intérieur du RE. L'interaction avec le ribosome permet donc son ouverture et ainsi la chaîne naissante est co-translationnellement transloquée vers l'intérieur du RE. Le PS n'est pas conservé; une peptidase du RE le clive du reste du polypeptide durant la synthèse [74]. C'est aussi pendant ce processus que la protéine est glycosylée sur certaines de ses asparagines, que des ponts disulfures se forment entre ses cystéines et qu'elle débute son repliement. Tant et aussi longtemps qu'elle ne se sera pas repliée correctement des chaperones telles que BiP, la calnexine ou la calréticuline la retiendront dans le RE. BiP est une chaperone appartenant à la famille des protéines de choc thermique 70. Elle interagit avec des groupes d'acides aminés hydrophobes exposés à la surface des protéines en voie de repliement. En masquant ces groupes d'acides aminés hydrophobes, BiP prévient l'agrégation des protéines dans le RE et de ce fait favorise leur repliement. La calnexine et la calréticuline pour leur part reconnaissent plutôt les oligosaccharides monoglucosylés à la surface des protéines en voie de repliement. Tout comme BiP, la calnexine et la calréticuline favorisent le repliement correct des protéines de la voie sécrétoire en empêchant leur agrégation dans le RE. La formation des ponts disulfures entre les cystéines est quant à elle catalysée par des oxidoréductases

comme l'isomérase des ponts disulfures [75]. En outre la protéine peut également subir dans le RE l'hydroxylation de prolines et de lysines, l'ancrage aux membranes lipidiques par l'ajout d'un groupe glycosylphosphatidylinositol à l'extrémité C-terminale et l'oligomérisation [2].

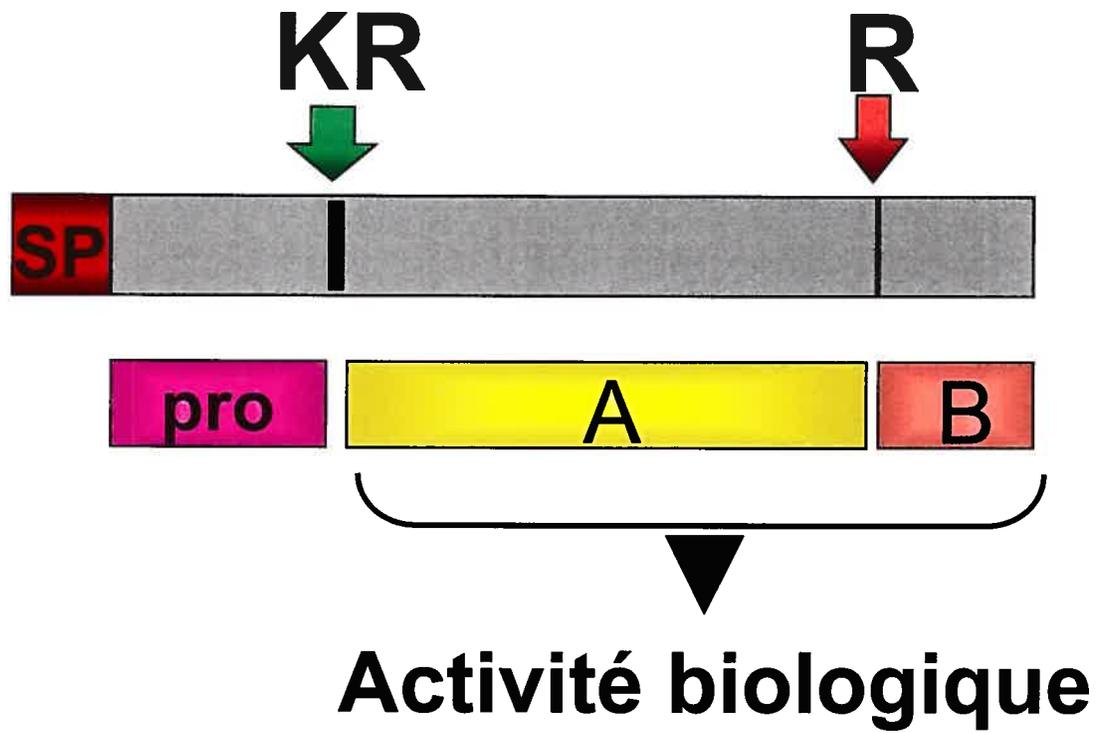
Il arrive cependant que des protéines ne parviennent pas se replier correctement dans le RE. Dans ce cas elles sont rétrogradées vers le cytosol, où elles seront dégradées par le protéasome au cours d'un processus dénommé endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD). Effectivement un séjour prolongé dans le RE les expose à l'action de la mannosidase I, qui retire un résidu mannose de leur(s) chaîne(s) d'oligosaccharides comme son nom l'indique. Ce clivage permet à la protéine EDEM de reconnaître les dites protéines et de les cibler vers le complexe Sec61. De cette manière les protéines mal repliées sont rétrotransloquées vers le cytosol pour y être polyubiquitinées, puis dégradées par le protéasome [75, 76].

Du RE les hormones polypeptidiques migrent vers l'appareil de Golgi (Figure 2, p.2-B). Les protéines voyagent ainsi du RE vers le Golgi et vice-versa dans des vésicules formées à partir de l'invagination de la membrane du compartiment expéditeur. Le Golgi est un autre compartiment intracellulaire, isolé du cytosol par des membranes tout comme le RE, qui se trouve à être le lieu de maturation et de triage des protéines en provenance du RE. Il est constitué de plusieurs *cisternae* s'empilant les unes sur les autres. La *cisterna* d'entrée (faisant face au RE) est nommée réseau *cis*-Golgien (RCG) et celle de sortie (faisant face à la membrane cellulaire), réseau *trans*-Golgien (RTG). Le pH du Golgi est plus acide que celui du RE (6.2 vs 7.4) et la  $[Ca^{2+}]$ , plus élevée (3 mM vs 1 mM) [2]. Les vésicules voyageant du RE vers le Golgi sont enrobées d'un complexe protéique nommé COPII. Celui-ci permet de courber la membrane du RE à partir de laquelle la vésicule se forme. De plus, il séquestre dans la vésicule en formation des récepteurs qui y concentrent spécifiquement des protéines devant quitter le RE. Le transport en sens inverse s'effectue de manière semblable, sauf que les vésicules concernées sont plutôt

enrobées d'un complexe protéique nommé COPI. À l'instar de COPII, COPI permet l'incorporation à l'intérieur des vésicules transitant du Golgi vers le RE de récepteurs qui y concentrent spécifiquement des protéines devant retourner au RE. Dans bien des cas il s'agit de protéines résidentes du RE comme BiP. Celle-ci (comme plusieurs autres) est dotée à son extrémité C-terminale d'un motif KDEL, qui assure l'interaction avec son récepteur dans les vésicules de retour au RE [77, 78]. Par ailleurs, les protéines mal repliées sont aussi retournées au RE. L'immunoglobuline E, à titre d'exemple, contient dans sa portion cytosolique un motif dilysine qui s'expose et s'associe conséquemment au complexe COPI lorsque la protéine n'adopte pas la conformation correcte. Ainsi une mauvaise conformation engendrera le retour de l'immunoglobuline E au RE [79].

Si les mécanismes du transport des protéines entre le RE et le Golgi sont bien connus, le transport s'effectuant à l'intérieur du Golgi porte beaucoup plus à controverse. En effet, il existe deux modèles pour expliquer le transport intragolgien. Le premier consiste à imaginer des vésicules enrobées de COPI se formant à partir du RCG et déversant leur contenu dans le compartiment golgien suivant, puis le même processus se répétant jusqu'au RTG. Le second modèle quant à lui propose que les vésicules originant du RE se fusionnent pour constituer le RCG. Ce dernier évoluerait vers la membrane plasmique au cours d'un processus où le RCG se transformerait en le compartiment golgien suivant et ainsi de suite jusqu'au RTG. Ce processus de maturation des *cisternae* s'achèverait avec la formation du RTG, qui se disloquerait en plusieurs vésicules destinées à la sécrétion (constitutive ou régulée). Chaque *cisterna* pourrait acquérir une composition chimique propre en produisant des vésicules enrobées de COPI destinées à la *cisterna* précédente dans le processus de maturation. Ce modèle a l'avantage d'expliquer comment des structures aussi imposantes que les agrégats de collagène (impossibles à incorporer dans des vésicules) parviennent à être sécrétées [80].

Les protéines transitant par le Golgi y subissent plusieurs modifications post-traductionnelles. Par exemple, les chaînes d'oligosaccharides liés covalentement aux asparagines durant la synthèse dans le RE y perdent plusieurs résidus mannose et y gagnent d'autres types de saccharides comme le *N*-acétylglucosamine, le galactose, le fucose et l'acide sialique. De plus certaines sérines et thréonines se voient ajouter des oligosaccharides au cours du séjour dans le Golgi. D'autres modifications comme la sulfatation de tyrosines ou d'acides sialiques, la phosphorylation, l'amidation, l'acétylation et la formation de pyroglutamines se produisent également dans le Golgi [2]. Il est à noter qu'il arrive que des protéines mal repliées échappent au contrôle de qualité dans le RE et se rendent jusqu'au RTG. Dans ce cas elles sont ciblées vers le lysosome pour y être dégradées et de cette façon le Golgi joue un rôle dans le contrôle de qualité des protéines [76]. Dans un autre ordre d'idée, c'est dans le Golgi que plusieurs hormones polypeptidiques voient leur prosegment retiré du reste de la protéine par endoprotéolyse (Figure 3, p.6-A). On ajoute le préfixe pro- au précurseur d'une protéine active (hormone ou autre). Le clivage a lieu directement en C-terminal d'un résidu basique (lysine ou arginine) et est catalysé par une famille de protéases à sérine, les proprotéines convertases (PCs), dont il sera question plus loin [3]. On reconnaît deux types de prosegment: le type I (qu'on retrouve chez le proNGF et le précurseur du facteur de von Willebrand notamment) catalyse le repliement correct de la protéine et le type II (qu'on retrouve chez la prosomatostatine par exemple) assume d'autres fonctions comme le ciblage intracellulaire. Les prosegments de type I jouent leur rôle en diminuant l'énergie d'activation nécessaire au processus de repliement [4]. En outre, l'endoprotéolyse sert aussi à générer des peptides actifs, c'est-à-dire manifestant une activité biologique. Par exemple, chez le proglucagon, la maturation protéolytique peut aboutir au glucagon ou au GLP1, selon le type cellulaire dans lequel elle a lieu. C'est seulement les produits issus du clivage qui ont une activité biologique; le proglucagon est inactif [3]. Une fois clivées les hormones polypeptidiques doivent encore subir une autre modification: l'exoprotéolyse des résidus basiques à l'extrémité C-terminale. Celle-ci est catalysée notamment par la carboxypeptidase D (CPD), une métalloprotéase à zinc résidant dans le RTG [5].



**Figure 3:** Endoprotéolyse des prohormones polypeptidiques  
Pro: prosegment, A: hormone A, B: hormone B

À partir du RTG la voie sécrétoire se divise en deux: la voie constitutive et la voie régulée (Figure 2, p.2-B). La voie constitutive est présente chez toutes les cellules. Des vésicules se forment à partir du RTG, se rendent directement à la membrane plasmique et déversent leur contenu dans le milieu extracellulaire. Les protéines ainsi sécrétées n'ont pas de motif de ciblage particulier les dirigeant vers cette voie; il s'agit de la voie par défaut. Dans certaines cellules, dont des cellules endocriniennes, une deuxième voie sécrétoire se superpose à la voie constitutive: la voie régulée. Des structures beaucoup plus imposantes que les vésicules de la voie constitutive sont fabriquées à partir du RTG; il s'agit des granules sécrétoires immatures. Ces derniers évoluent pour devenir des granules matures au cours d'un processus où le pH au sein de ces organelles finira par descendre à 5.5 et la  $[Ca^{2+}]$ , par atteindre 10 mM. Les protéines contenues dans les granules ne sont sécrétées que lorsqu'un stimulus précis excite la cellule. La présence d'un sécrétagogue (stimulus chimique) dans le milieu extracellulaire ou un potentiel d'action (stimulus électrique) dans un neurone provoque en effet une augmentation de la  $[Ca^{2+}]$  dans le cytosol des cellules concernées, ce qui amène les granules à déverser leur contenu dans le milieu. La sécrétion par cette voie est donc régulée par la présence d'un stimulus contrairement à la voie constitutive qui s'effectue spontanément. De plus les protéines des granules doivent avoir un motif ou une structure particulière les dirigeant vers ces organelles; privées de ce motif de ciblage elles sont sécrétées constitutivement. La voie régulée n'est donc pas une voie par défaut [2].

Le motif de ciblage aux granules peut agir de trois manières différentes: en provoquant l'agrégation de la protéine concernée à pH acide et  $[Ca^{2+}]$  élevée, en lui faisant interagir avec les radeaux lipidiques du RTG ou en lui faisant interagir avec une protéine associée à ceux-ci. Un modèle de ciblage des protéines vers la sécrétion régulée qui inclut ces trois mécanismes fut développé au fil des années. Il stipule que plusieurs protéines ciblées aux granules se mettent à agréger les unes aux autres à pH acide et  $[Ca^{2+}]$  élevée, des conditions qu'on retrouve dans le RTG. Ces agrégats

déforment les membranes du RTG à proximité, ce qui y attire les radeaux lipidiques et par le fait même les protéines y résidant (par interaction directe avec les lipides ou indirecte via des protéines associées aux dits lipides). Ces radeaux lipidiques sont en fait des microdomaines enrichis en sphingolipides et en cholestérol qui ont la possibilité de se déplacer au sein des membranes lipidiques. Ils interagissent spécifiquement avec certaines protéines, qui sont elles-mêmes associées spécifiquement à d'autres protéines. Par contre les protéines de la voie constitutive sont exclues de ces agrégats formés dans le RTG. Ainsi ces derniers réunissent et maintiennent ensemble les protéines de la voie régulée et les séparent de celles de la voie constitutive. C'est cette ségrégation qui est à la base du ciblage de certaines protéines vers la voie régulée. En effet les granules immatures ne se constituent qu'autour des agrégats formés dans le RTG; les protéines de la voie constitutive n'entrent donc pas dans les granules immatures. C'est ce qu'on appelle le ciblage par entrée. Il est à noter qu'il existe un autre modèle pour expliquer le ciblage des protéines. Contrairement à ce que nous avons écrit plus haut, le processus de ségrégation (agrégation) peut également se produire dans les granules immatures. Dans ce cas, les protéines sécrétées constitutivement sont incorporées dans les granules immatures avec les protéines de la voie régulée; selon ce modèle les granules immatures se forment n'importe où à partir du RTG. Par la suite les protéines de la voie constitutive (celles qui ne sont pas associées aux agrégats formés dans les granules immatures) sont éliminées pendant la maturation de l'organelle. Le granule en voie de maturation sécréterait des vésicules contenant les protéines de la voie constitutive et ne conserverait que les protéines de la voie régulée, c'est-à-dire celles qui font partie des agrégats. C'est ce qu'on appelle le ciblage par rétention. Le ciblage par entrée ne se distingue donc du ciblage par rétention que par le lieu où se déroule la ségrégation (RTG vs granule immature); le processus physique à la base de la ségrégation serait le même [6-9].

Pour revenir aux hormones polypeptidiques, plusieurs d'entre elles sont sécrétées par la voie régulée et les prohormones qui transitent par cette voie peuvent

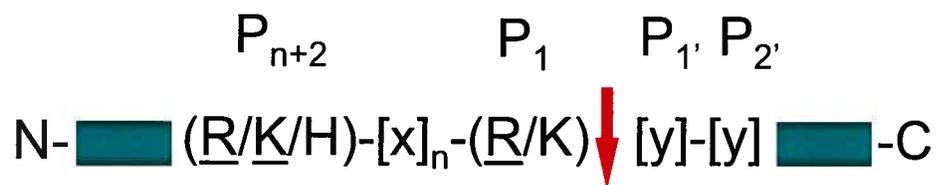
subir leur maturation endoprotéolytique dans les granules sécrétoires. Certaines PCs y sont d'ailleurs plus actives que dans le RTG [3]. Les hormones polypeptidiques concernées voient alors leurs résidus basiques à l'extrémité C-terminale éliminés par l'action de la carboxypeptidase E (CPE). Cette dernière est une métalloprotéase à zinc, apparentée à la CPD, qui réside dans les granules plutôt que dans le RTG [5].

### 1.3 Les proprotéines convertases

Nous avons déjà mentionné que les prohormones polypeptidiques sont maturées par une famille de protéase à sérine, les PCs. Ce sont des endoprotéases apparentées aux subtilases bactériennes et dépendantes du calcium. Elles comptent sept membres: la furine, PC1, PC2, PC4, PACE4, PC5 et PC7. Notons que PC5 a deux isoformes (A et B). Ces enzymes reconnaissent spécifiquement les résidus basiques et clivent en C-terminal de ceux-ci (Figure 4, p.9-A). Outre les prohormones polypeptidiques, les PCs maturent des proenzymes (prorénine), des prorécepteurs (prointégrine  $\alpha$ 4) et même des proprotéines pathogéniques (précurseur de la toxine de la diphteria) [3]. Toutes ces protéines transitent par la voie sécrétoire cellulaire, où on trouve les PCs (Figure 5, p.9-B). Ces dernières sont exprimées à tous les niveaux dans cette voie: la furine, PC4, PACE4, PC5-A et PC7 dans le RTG; la furine et PC7 à la surface cellulaire; PC1 et PC2 dans les granules; PC5-B dans les compartiments pré-RTG du Golgi [10].

Les PCs sont organisées en quatre domaines fonctionnels: le prosegment, le domaine catalytique, le domaine P et le domaine C-terminal (Figure 6, p.9-C) [11].

- *Le prosegment:* On reconnaît généralement les fonctions de chaperone intramoléculaire et d'inhibiteur compétitif à ce domaine de 80-90 acides aminés [11]. Le prosegment des PCs est en effet un prosegment de type I, c'est-à-dire qu'il catalyse le repliement correct de l'enzyme en diminuant l'énergie d'activation nécessaire au processus [4]. De plus il aurait comme rôle d'inhiber

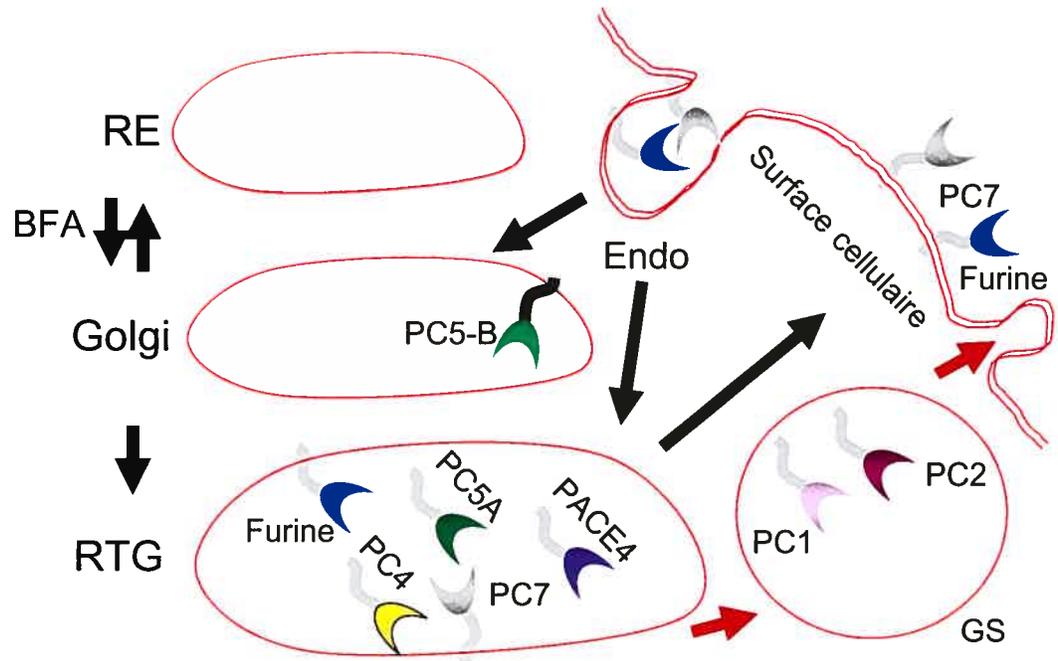


$n = 0, 2, 4$  ou  $6$

$x =$  tous les aa sauf Cys

$y =$  tous les aa

**Figure 4:** Site de clivage reconnu par les PCs



**Figure 5:** Localisation des PCs dans la voie sécrétoire cellulaire  
 GS: granule sécrétoire, Endo: endocytose

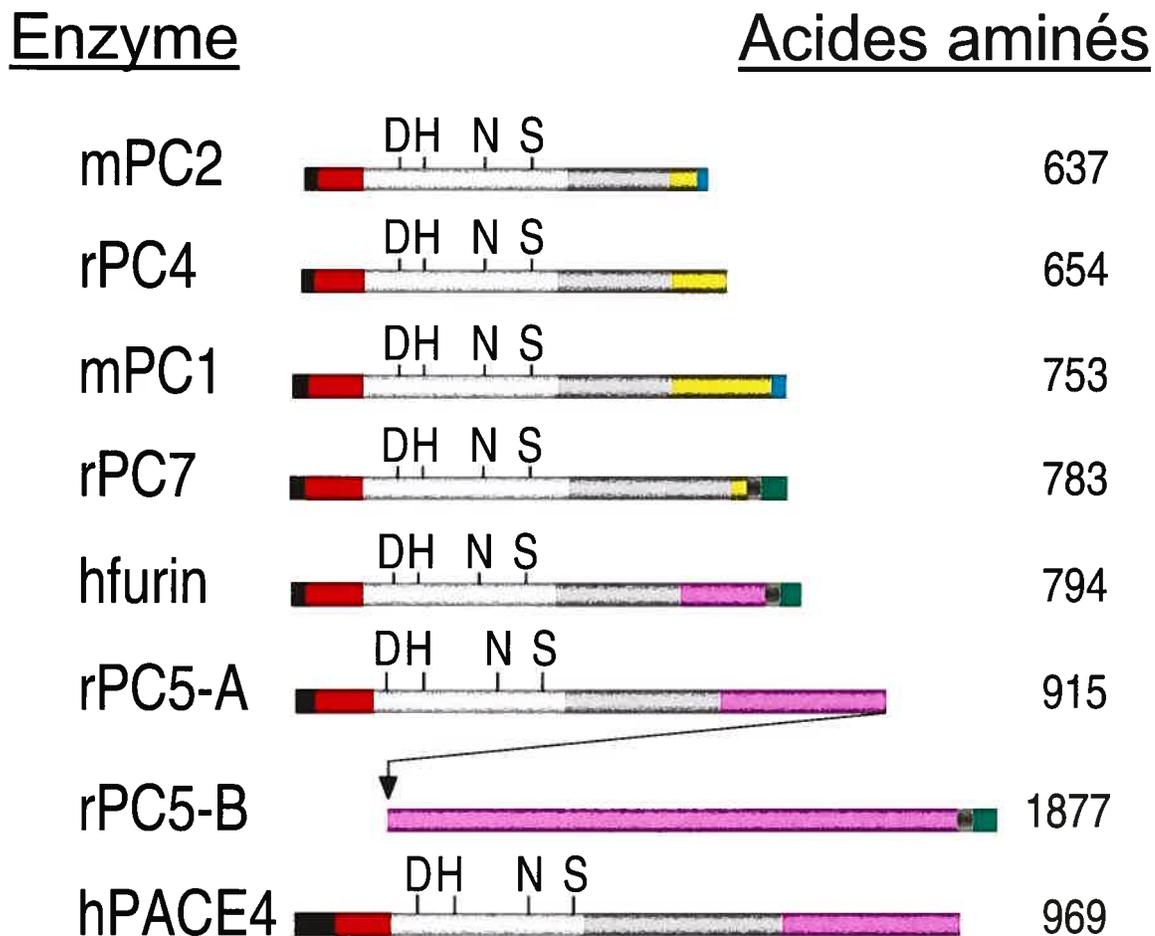
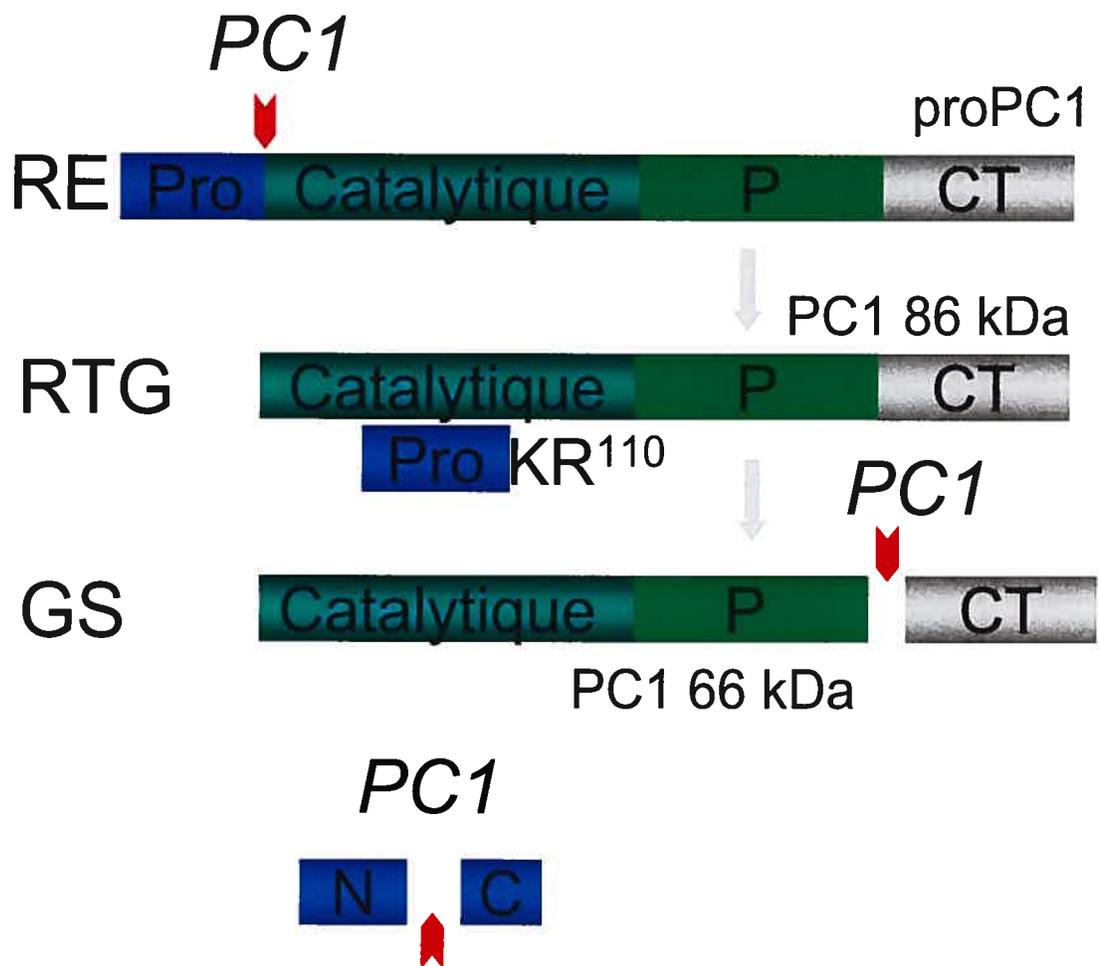


Figure 6: Représentation schématique des PCs

- |                       |                             |
|-----------------------|-----------------------------|
| ■ Peptide signal      | ■ Domaine riche en cystéine |
| ■ Prosegment          | ■ Hélice amphipatique       |
| ▨ Domaine catalytique | ■ Hélice transmembranaire   |
| ▨ Domaine P           | ■ Domaine cytoplasmique     |
| ■ Région indéterminée |                             |



**Figure 7:** Maturation protéolytique de PC1 dans la voie sécrétoire cellulaire  
 Bien que sur cette figure le clivage du prosegment au site secondaire se produise dans le granule, cette coupure peut aussi avoir lieu dans le RTG.

sa PC jusqu'à ce qu'elle atteigne son site intracellulaire de résidence [12]. Afin de bien comprendre ce second rôle, il serait bon de résumer brièvement le modèle d'activation des PCs élaboré par G. Thomas à l'Institut Vollum en Orégon (Figure 7, p.9-D) [12]. Ce modèle prévoit que les PCs (à l'exception de PC2) autoclivent leur prosegment au site primaire dès les 10 premières minutes suivant leur synthèse dans le RE. Malgré tout, le prosegment clivé continue d'interagir avec le domaine catalytique de la convertase par des liens non-covalents, en particulier des interactions hydrophobes [13]. Les résidus basiques de l'extrémité C-terminale du prosegment demeurent dans le site actif après la coupure et de cette façon bloquent son accès aux substrats *en trans*. Il en résulte que l'enzyme ne peut pas activer des proprotéines *en trans* dans le RE (et en fait tant et aussi longtemps qu'elle ne se sera pas débarrassée de son prosegment). Le complexe enzyme/prosegment ainsi formé est le seul apte à quitter le RE. Ayant atteint le RTG, où le pH est plus acide que dans le RE, la convertase termine alors son processus d'autoactivation. Notons que chez PC1 l'autoactivation peut aussi s'achever dans le granule sécrétoire. L'environnement plus acide du RTG (ou des granules) fait en sorte que des histidines du prosegment jusqu'ici neutres acquièrent une charge positive. Cela déstabilise les interactions hydrophobes qui tiennent ensemble la PC et son prosegment et de cette manière le site secondaire peut glisser à l'intérieur du site actif pour y déloger les résidus basiques (et inhibiteurs) du site primaire [13]. La convertase peut alors autocliver son prosegment au site secondaire, ce qui provoque sa dissociation. L'enzyme est désormais active *en trans*. Nous voyons donc que le prosegment serait un inhibiteur compétitif des PCs. Dans cet ordre d'idée Boudreault et al. ont montré que le prosegment de PC1 inhibait de cette façon la furine et PC1 *in vitro* [14]. PC2 cependant fait exception quant à ce modèle d'autoactivation. En effet le prosegment de PC2 est autoclivé au site primaire beaucoup plus tardivement dans la voie sécrétoire, dans le granule immature en fait. De plus PC2 a besoin d'une autre protéine pour être active, 7B2. Il s'agit d'une granine de 186 acides aminés qui assiste PC2 dans son repliement en molécule active. Sans 7B2, PC2 peut

autocliver son prosegment et s'en débarrasser, mais l'enzyme qui en résulte est inactive. Ainsi 7B2 permet l'autoclivage productif du prosegment, c'est-à-dire celui qui produit de l'enzyme active. Aucune autre protéine de ce type ne fut identifiée pour les autres PCs [15].

- *Le domaine catalytique*: Il contient la triade catalytique typique des protéases à sérine, soit un acide aspartique, une histidine et une sérine. En plus toutes les PCs sauf PC2 ont une asparagine au creux de leur cavité oxyanionique. Cette cavité est un environnement au sein du domaine catalytique qui stabilise la charge négative de l'oxygène du groupe carbonyle du lien peptidique à couper qui se développe au cours de la protéolyse. La chaîne latérale de l'asparagine stabilise la charge négative de l'oxygène en établissant un pont hydrogène avec celle-ci. Chez PC2, c'est plutôt un acide aspartique qu'on retrouve au creux de la cavité oxyanionique [11]. Scougall et al. ont rapporté que c'était cette différence qui expliquait l'autoclivage tardif du prosegment au site primaire et le pH optimal de la convertase (5.0) [16]. À plusieurs endroits dans le domaine catalytique des PCs on retrouve des résidus chargés négativement (Glu et Asp). Ces derniers sont localisés au creux des différents sites (les sites S) accueillant les résidus basiques des substrats. Une liaison électrostatique assure donc l'interaction entre l'enzyme et ses substrats. Il est à noter que toutes les PCs préfèrent une arginine en P1 plutôt qu'une lysine, quoique PC2 tolère beaucoup mieux une lysine en P1 que les autres PCs, car il se peut que l'acide aspartique de la cavité oxyanionique de PC2 (dans sa forme déprotonée) participe aussi à l'interaction avec le résidu en P1 [11].
- *Le domaine P*: C'est un domaine d'environ 150 acides aminés capable de se replier indépendamment du reste de la protéine. Il forme un baril à huit brins  $\beta$  interagissant avec le domaine catalytique par des interactions hydrophobes. Il a été proposé que ces interactions stabilisaient le domaine catalytique, puisque celui-ci est instable en raison de la répulsion électrostatique entre les résidus acides des sites S. D'ailleurs, quand les PCs sont exprimées sans leur domaine P, elles restent prises dans le RE [17, 18]. À cette fonction dans le repliement de

l'enzyme, ajoutons que le domaine P est aussi responsable de la sensibilité des convertases au pH et à la  $[Ca^{2+}]$ . Lorsqu'on change le domaine P de PC1 contre celui de la furine, PC1 adopte le pH et la  $[Ca^{2+}]$  optimaux de la furine [19].

- *Le domaine C-terminal (CT)*: De tous les domaines des PCs, il offre le plus de variabilité d'une PC à l'autre (Figure 6, p.9-C). Chez la furine, PACE4 et PC5-B, le CT comprend notamment une région riche en cystéine. En plus chez la furine et PC5-B, cette région est suivie d'une hélice transmembranaire et d'un domaine cytosolique. Le CT de PC7 est organisé de la même façon que celui de la furine et PC5-B, mais sans la région riche en cystéine. Quant au CT de PC1 et PC2, il est constitué d'une hélice  $\alpha$  amphipatique [3]. Dans bien des cas le CT est responsable de la localisation cellulaire de sa PC. Il a été montré par exemple que le domaine riche en cystéine de PACE4 faisait en sorte que la protéine est associée à la matrice extracellulaire [20]. De plus, l'hélice transmembranaire de la furine, PC5-B et PC7 ancre ces enzymes aux membranes du Golgi, du RTG ou de la surface cellulaire, tandis que le domaine cytosolique de la furine et PC5-B est responsable de la localisation fine de ces deux dernières PCs [3]. Divers motifs ont été identifiés dans cette région de la furine et il a été rapporté qu'ils permettaient à l'enzyme d'être localisée dans le RTG, les endosomes et à la surface cellulaire [12]. Quant au domaine cytosolique de PC5-B, des motifs semblables ont été découverts, mais ils permettent plutôt à la convertase d'être localisée dans des compartiments pré-RTG du Golgi [21]. L'hélice amphipatique de PC1 et PC2 pour sa part cible ces deux convertases vers les granules sécrétoires. Dans les deux cas, elle permet l'interaction de la convertase avec les membranes du RTG, ce qui dirige ensuite celle-ci vers les granules [22-24]. Une fois parvenue dans la voie régulée, PC1 autoclave son CT (Figure 7, p.9-D). L'enzyme qui en résulte (PC1 66 kDa) est quatre fois plus active *in vitro* que la forme complète (PC1 86 kDa) et son pH optimal passe de 6.0 à 5.5 [25]. Également la spécificité enzymatique de PC1 change quelque peu suite à cette autocoupe. Par exemple PC1 66 kDa est capable de maturer *in vitro* la proAVP en AVP, ce qu'est incapable de faire PC1 86 kDa [26]. PC1 66 kDa est cependant

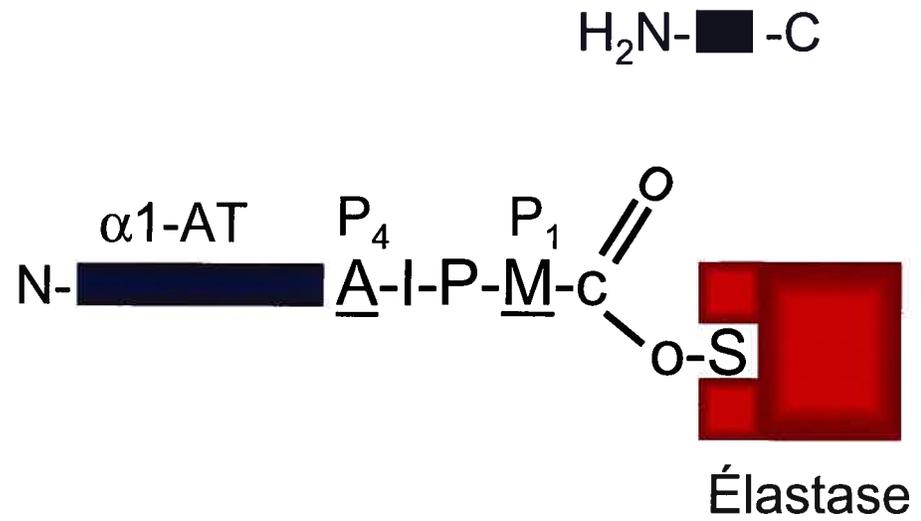
moins stable que la forme complète [25]. Pour ce qui est de PC2, elle conserve son CT [27]. En dépit de ce que nous avons écrit plus haut, le CT des PCs n'est pas qu'impliqué dans leur localisation cellulaire. Le domaine riche en cystéine de PACE4 a aussi pour fonction de ralentir la maturation du prosegment de l'enzyme, ce qui fait en sorte qu'elle est retenue plus longtemps dans le RE [28]. Par ailleurs la région riche en cystéine de la furine influence la conformation globale de la protéine, ce qui modifie sa susceptibilité au shedding [29]. Le CT de PC7 n'est pas en reste lui non plus, car le domaine cytosolique de cette enzyme est palmitoylé, ce qui prolonge la demi-vie de PC7 mais paradoxalement ne semble pas influencer sa localisation cellulaire [30, 31].

Afin d'étudier le rôle des PCs, les chercheurs ont développé au fil du temps plusieurs inhibiteurs ciblant spécifiquement cette famille de protéases. Plusieurs d'entre eux sont en fait des molécules ne traversant pas la membrane plasmique et cela les empêche d'inhiber intracellulairement les PCs. Par contre d'autres inhibiteurs spécifiques sont des protéines pouvant être exprimées par transfection, ce qui en fait des outils idéaux pour étudier le rôle des PCs au sein de diverses lignées cellulaires.

- *7B2*: En plus de son rôle dans le repliement de PC2, 7B2 est un inhibiteur de l'ordre du nanomolaire absolument spécifique à PC2. La fonction inhibitrice est contenue dans la portion C-terminale de la protéine et deux motifs essentiels à l'inhibition furent découverts. Un doublet KK pénètre dans le site actif de PC2 et bloque son accès aux substrats; 7B2 est donc un inhibiteur compétitif. Aussi un motif VNPYLQG se lie à un exosite dans le domaine catalytique de PC2, ce qui renforce l'association de l'inhibiteur à l'enzyme [27]. Il peut sembler étrange que 7B2 soit à la fois un activateur de PC2 et un inhibiteur. En fait la convertase finit par cliver la granine au site KK inhibiteur, ce qui a pour effet de détacher 7B2 et de permettre à l'enzyme d'être pleinement active [32].
- *SAAS*: Il s'agit d'une autre granine, mais SAAS est plutôt un inhibiteur de PC1. D'une spécificité absolue à cette PC, elle est un inhibiteur compétitif de l'ordre du

nanomolaire et sa fonction inhibitrice réside dans son C-terminal [27]. De plus elle est dirigée vers la sécrétion régulée [33]. Bien que ces caractéristiques rappellent étrangement le cas de 7B2, SAAS n'est pas un activateur de PC1; d'aucune façon elle ne l'assiste dans son repliement [34]. En outre le motif inhibiteur de SAAS fut identifié, il s'agit de la séquence LLRVKR. Ce peptide inhibe efficacement *in vitro* plusieurs PCs dont la furine et PC5-A [35]. Cela suggère qu'il existe au moins un autre motif dans SAAS qui se lierait à un exosite de PC1 pour assurer la spécificité d'inhibition. Quoique SAAS semble être l'inhibiteur cellulaire parfait de PC1, elle comporte un inconvénient majeur: le manque de stabilité. PC1 finit par cliver SAAS au site LLRVKR inhibiteur, ce qui cause l'inactivation de l'inhibiteur. Ainsi SAAS ne fait que retarder l'activation de PC1; elle ne diminue pas l'activité totale de l'enzyme [34].

- *Les prosegments*: Comme nous l'avons vu précédemment, le modèle d'activation des PCs prévoit que les prosegments sont des inhibiteurs de leur convertase. Une approche d'inhibition par surexpression de divers prosegments donna de bons résultats *ex vivo* contre la furine et PC5-A [36]. Par ailleurs *in vitro* les prosegments se comportent comme des inhibiteurs compétitifs de l'ordre du nanomolaire et l'inhibition dépend de la présence du site primaire [37]. Il est intéressant de noter que des peptides dérivés du site primaire des PCs sont en fait des inhibiteurs moins potents que les prosegments complets. Cela suggère l'existence d'un ou plusieurs motif(s) dans les prosegments liant un ou des exosite(s) dans le domaine catalytique des convertases et stabilisant l'interaction enzyme/inhibiteur [38].
- *PDX*: C'est une serpine dérivée de l' $\alpha$ 1-antitrypsine. Celle-ci est un inhibiteur spécifique à l'élastase et comme toutes les serpines elle agit en tant que substrat suicide [12]. La boucle réactive de l' $\alpha$ 1-antitrypsine commence par s'insérer dans le site actif de l'élastase comme le ferait n'importe quel substrat. La boucle réactive est une structure de 17 acides aminés, exposée au solvant et flexible, qui contient le site de reconnaissance pour l'élastase, c'est-à-dire la séquence AIPM. La sérine active de la protéase attaque donc le carbone du groupe carbonyle du



**Figure 8:** Complexe covalent stable entre l'α1-antitrypsine et l'élastase  
 α1-AT: α1-antitrypsine

résidu en P1 (Met) et forme ainsi l'intermédiaire acyl-enzyme, ce qui permet la libération de la région en C-terminal du site de reconnaissance (Figure 8, p.14-A). Si l' $\alpha$ 1-antitrypsine avait été un substrat comme les autres plutôt qu'un inhibiteur, la réaction se serait poursuivie et une molécule d'eau aurait attaqué à son tour le carbone du groupe carbonyle, ce qui aurait abouti à la dissociation du reste de la serpine et à la régénération de l'enzyme. Toutefois, l' $\alpha$ 1-antitrypsine étant un substrat suicide, sitôt l'intermédiaire acyl-enzyme formé le résidu en P1 se retire vers l'intérieur de la serpine entraînant avec lui la sérine active. Cela a pour résultat de déformer le site actif de la protéase et de causer son inactivation permanente [39]. Il existe une mutation naturelle de l' $\alpha$ 1-antitrypsine dans le site de reconnaissance qui change la méthionine en P1 en arginine. Étonnement la spécificité de la serpine change aussi; elle devient un inhibiteur de la thrombine (causant ainsi de graves problèmes à la coagulation sanguine). De cette manière en mutant le site de reconnaissance il est possible de modifier la spécificité de l' $\alpha$ 1-antitrypsine, d'où l'idée de muter la séquence AIPM en RIPR pour obtenir un substrat suicide contre la furine (et les autres PCs) [12]. Cette stratégie d'inhibition de la furine fut un succès. L'inhibiteur ainsi créé, le PDX, inhibe dans l'ordre du nanomolaire la furine, PC1 et PC5. PC2 aussi est inhibée mais seulement dans l'ordre du micromolaire [40]. Quant à PACE4 et PC7, elles ne sont pas affectées *in vitro* par le PDX [40], bien que certains laboratoires ont rapporté l'inhibition des deux convertases par la serpine *ex vivo* [42, 73]. Spécifions que la thrombine n'est pas inhibée par le PDX, ce qui met en évidence la spécificité de la serpine mutante contre les PCs [40]. Également le complexe acyl-enzyme a été observé *in vitro* et *ex vivo* avec la furine, montrant de cette manière que la mutation n'a pas affecté le mécanisme d'inhibition de la serpine [41]. Bien que PC1 et PC2 soient la cible du PDX *in vitro*, ce dernier quand il est exprimé dans des cellules à sécrétion régulée ne pénètre pas dans les granules, ce qui prévient l'inhibition des deux convertases dans cette organelle (mais pas dans la voie constitutive) [42].

Plusieurs hormones polypeptidiques comme l'insuline, l'ACTH et le glucagon sont sécrétées de manière régulée et leur précurseur est mûri protéolytiquement dans les granules sécrétoires [11]. Considérant la localisation cellulaire de PC1 et PC2 [10] et leur pH optimal nettement plus bas que les autres PCs [25, 27], ces deux enzymes sont appelées à mûrir les prohormones polypeptidiques transitant par la voie régulée. Dans cet ordre d'idée, PC1 et PC2 sont exprimées dans des tissus sécrétant de manière régulée des hormones polypeptidiques comme le pancréas, l'hypothalamus ou l'hypophyse [3]. L'étude de l'ablation génique de PC1 et PC2 dans l'être humain et la souris est à ce sujet très éclairante. Il existe dans le monde deux patientes déficientes en PC1. L'un des allèles de la première patiente produit PC1 tronqué dans le domaine catalytique, tandis que l'autre allèle introduit une mutation ponctuelle dans le domaine P. Ces deux mutants sont retenus dans le RE et sont inactifs. Quant à la deuxième patiente, un des allèles produit aussi une troncature de l'enzyme dans le domaine catalytique, alors que l'autre allèle élimine une alanine dans le domaine catalytique. Il en résulte encore la rétention de PC1 dans le RE et son inactivation. Ces patientes ont beaucoup de proinsuline et de proopiomélanocortine (POMC) dans le sang et elles souffrent d'obésité, d'hypogonadisme hypogonadotrope et de divers problèmes relatifs au fonctionnement du petit intestin. La présence de proinsuline et de POMC dans le sang suggère bien entendu que PC1 mûrit ces précurseurs, tandis que l'obésité, l'hypogonadisme hypogonadotrope et les problèmes du petit intestin suggèrent que PC1 mûrit respectivement des précurseurs de neuropeptides impliqués dans la régulation hypothalamique de l'appétit et du métabolisme, le proGnRH et le proglucagon [3, 43]. Le GnRH stimule les fonctions gonadiques et le GLP1 (produit de l'endoprotéolyse du proglucagon) interfère dans le fonctionnement du petit intestin [1]. L'ablation génique de PC1 dans la souris vient confirmer ces données. Comme chez l'être humain ces souris ont de la difficulté à mûrir la proinsuline et la POMC. De plus, elles ne produisent pas de GHRH (d'où des problèmes de croissance), de GLP1 (d'où des problèmes intestinaux) et des peptides CART [44, 45]. Quant à l'ablation génique de PC2 dans la souris, elle engendre une augmentation de la

POMC, du proglucagon et de la proinsuline dans le sang. Ces souris souffrent d'ailleurs d'hypoglycémie à cause d'un manque de glucagon [3]. Ajoutons qu'elles fabriquent beaucoup moins de somatostatine 14 [46], de polypeptide pancréatique [47], de polypeptide amyloïde [47], de neuropeptide EI [47], de cholécystokinine [47], de peptides opioïdes [47], d'enképhalines [46], de dynorphines [47], de neuropeptide Y [46], de VIP [46], de galanine [46], de CRH [46], d'orphanine FQ [48], de peptides CART [45] et de gastrine 17 [49] que les souris de type sauvage. Il se dégage de toutes ces études d'ablation génique que PC1 et PC2 mûrissent de nombreux précurseurs qui génèrent toute une panoplie d'hormones polypeptidiques sécrétées de manière régulée.

#### *1.4 Définition du projet de recherche*

PC1 est la seule PC pour laquelle une ablation génique fut observée chez l'être humain. Cela nous donne une occasion unique d'étudier le rôle de cette PC dans le système endocrinien de l'organisme humain. Par ailleurs, l'ablation génique réalisée chez la souris vient compléter ces données quant à la maturation des prohormones polypeptidiques. Cependant l'ablation génique demeure un outil d'une portée limitée, car elle ne permet pas d'étudier ce qui se passe en détail dans chaque type cellulaire. Grâce à l'ablation génique nous pouvons bien constater la fonction d'une protéine dans le contexte de l'organisme en entier, mais pas dans le contexte d'un type cellulaire précis. En effet, il est très difficile d'isoler un seul type de cellules à partir d'un organisme; notre échantillon sera toujours contaminé par d'autres types cellulaires. Cette limite peut être transcendée par l'utilisation de lignées cellulaires immortalisées. Bien qu'elles soient différentes des cellules primaires desquelles elles sont dérivées, elles ont l'avantage d'être pures. Cela fait en sorte qu'il est possible d'étudier le rôle d'une protéine, PC1 par exemple, au sein d'une lignée cellulaire bien précise. D'où l'intérêt de développer un inhibiteur cellulaire spécifique à PC1. Ainsi, il sera possible de vérifier les effets de l'inhibition spécifique de cette convertase sur

la maturation de diverses prohormones polypeptidiques dans des lignées cellulaires endocriniennes et de les comparer avec les effets observés chez les souris et les êtres humains déficients en PC1.

Notre projet de recherche s'articule donc autour de trois points précis:

- 1) Développer un inhibiteur cellulaire de PC1
- 2) Qui soit spécifique à cette enzyme (qui n'inhibe pas les autres PCs)
- 3) Qui soit ciblé aux granules sécrétoires (où est concentrée la majorité de l'activité de PC1 dans les cellules à sécrétion régulée).

## Chapitre II: Matériel et méthodes

### 2.1 Construction d'ADN plasmidique et mutagenèse dirigée

L'ADNc du proCT fut construit en amplifiant par RCP (réaction en chaîne de la polymérase) l'ADNc du prosegment de mPC1 (résidus 1-110) avec les amorces 742 et 743 et en amplifiant l'ADNc du CT de mPC1 (résidus 618-753) avec les amorces 744 et 741, puis en les fusionnant par RCP avec les amorces 741 et 742. L'ADNc du proCT fut par la suite cloné *XhoI/AgeI* dans le vecteur pIRES2-EGFP (*Clontech*) modifié pour ajouter en 3' l'épitope V5 (GKPIPPLLGLDST) lorsqu'on clone *AgeI* (pIRv5) [50]. L'ADNc du pro\*CT fut obtenu en mutant par RCP avec les amorces 6771 et 6772 l'arginine 110 du proCT en alanine et fut cloné *XhoI/AgeI* dans le vecteur pIRv5.

L'ADNc du PDX-CT fut conçu en amplifiant par RCP avec les amorces 11506 et 751 la partie 3' de l'ADNc du PDX et en amplifiant l'ADNc du CT de mPC1 avec les amorces 750 et 741, puis en fusionnant les deux produits de RCP avec les amorces 11506 et 741. Cet ADNc fut ensuite cloné *EcoRV/AgeI* dans le vecteur pIRv5 PDX [50]. L'ADNc du PDX-CT LE fut obtenu en mutant par RCP avec les amorces 754 et 755 les résidus SI<sup>384</sup> en LE et fut cloné *EcoRV/AgeI* dans le vecteur pIRv5 PDX.

L'ADNc de la furine R75A fut fabriqué en clonant *SacII* l'ADNc du prosegment de la hFurine R75A dans le vecteur pIRES2-EGFP hFurine [50]. Quant aux ADNc de mPC5-A/B, hPACE4, rPC7, hFurine, hPDGF-A et du PDX, ils ont été décrits ailleurs [50].

**Tableau I.** Amorces employées pour les RCP (les bases en italique représentent les bases mutées et celles soulignées appartiennent aux sites de restriction)

Nom de l'amorce	Orientation	Site de restriction	Séquence	Espèce
741	antisens	<i>AgeI</i>	ACC <u>GGT</u> ATT CTC CTC ATT TAG GAT GTC C	souris
742	sens	<i>XhoI</i>	CTC GAG ATG GAG CAA AGA GGT TGG	souris
743	antisens		CTT TTC CAC TCC ACG TTT ACT TCT CTC TTT TTC ATA	souris
744	sens		AAG TAA ACG TGG AGT GGA AAA GAT GGT GAA TG	souris
750	sens		CCA CCC AAA AAG GAG TGG AAA AGA TGG TGA ATG	humain -souris
751	antisens		CTT TTC CAC TCC TTT TTG GGT GGG ATT CAC CAC	humain -souris
754	sens		CAT ACC CAG ACT TGA ACC TCC CGA G	humain
755	antisens		CTC GGG AGG <i>TTC</i> AAG TCT GGG TAT G	humain
6771	antisens		CCA CTC CAG CTT TAC TTC TCT C	souris
6772	sens		GAG AGA AGT AAA <i>GCT</i> GGA GTG G	souris
11506	sens	<i>EcoRV</i>	CTC ACC CAC <u>GAT ATC</u> ATC ACC	humain

## 2.2 Culture cellulaire et obtention de clones AtT20 et de pools de cellules FD11

Les cellules AtT20 (Dr. Regis Kelly, University of California) furent cultivées dans Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (*GibcoBRL*) + 10% fetal bovine serum (FBS) (*Wisent*) + 28 µg/ml gentamycine (GTM) (*Wisent*) et les cellules HK293 (Dr. Jean Davignon, Institut de recherches cliniques de Montréal), dans DMEM + 10% FBS inactivé à la chaleur + 28 µg/ml GTM. Les cellules FD11 (Dr. Alnawaz Rehemtulla, University of Michigan) pour leur part furent cultivées dans DMEM:F12 Ham's medium (F12) (*GibcoBRL*) (1:1) + 5% FBS + 28 µg/ml GTM. Les clones AtT20 et les pools de cellules FD11 eurent en plus 300 µg/ml G418 (*Canadian Life Technologies*) dans leur milieu respectif. Toutes les cellules furent incubées à 37°C en présence de 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules AtT20 et FD11 furent transfectées dans un pétri 3.5 cm avec la Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*) selon le protocole du fabricant et les cellules HK293, avec l'Effectene (*Qiagen*) d'après les recommandations de la compagnie.

Les clones AtT20 furent obtenus en sélectionnant à l'aide de 400 µg/ml G418 pendant deux semaines un pool de cellules AtT20 transfectées avec le vecteur pIRv5 ou l'ADNc du PDX, PDX-CT ou PDX-CT LE. Au terme de ces deux semaines, les cellules positives pour l'EGFP furent sélectionnées par fluorescence activated cell sorting (FACS) avec un appareil MoFlo (*Cytomation*). Les cellules positives furent déposées dans une plaque de 96 puits à raison d'une par puits et les différents clones furent amplifiés pendant deux semaines, puis testés pour l'expression des inhibiteurs par immunobuvardage avec l'anticorps  $\alpha$ V5-HRP (1/2000) (*Invitrogen*). Les pools de cellules FD11 exprimant stablement hFurine, mPC5-A, rPC7, hPACE4 ou le vecteur pIRES2-EGFP furent obtenus de la même manière que les clones AtT20, à l'exception que les cellules furent collectées en pool plutôt qu'en clone.

### *2.3 Marquage métabolique de cellules avec acides aminés radioactifs, séquençage de protéines par dégradation de Edman et immunobuvardage*

À vingt-quatre heures post-transfection, les cellules AtT20, FD11 ou HK293 furent incubées une heure dans RPMI 1640 (sans Met/Cys) (*GibcoBRL*) + 0.5% FBS dialysé (*GibcoBRL*) + 28 µg/ml GTM, puis pulsées dans RPMI 1640 (sans Met/Cys) + 0.5% FBS dialysé + 28 µg/ml GTM + 200 µCi Met/Cys [ $S^{35}$ ] (*NEN Life Science*) pour une période variable. Les cellules AtT20 et HK293 furent chasées dans DMEM + 0.5% FBS dialysé + GTM. Où cela est pertinent, la brefeldine A (BFA) (*Calbiochem*) fut ajoutée au milieu à une concentration de 2.5 µg/ml durant la pré-incubation sans Met/Cys et le pulse, alors que la forskoline (*Sigma-Aldrich*) fut ajoutée à une concentration de 10 µM pendant la chase seulement. Les cellules furent lysées dans RIPA 1x (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate) + Complete 1x (*Roche*) à 4°C pendant 30 minutes et le lysat fut débarrassé des débris cellulaires par une centrifugation de 13000 x g 20 minutes. Les protéines des lysats furent subséquemment immunoprécipitées à 4°C dans RIPA 0.5x + PBS 0.5x (1.4 mM KCl, 0.75 mM  $KH_2PO_4$ , 68.5 mM NaCl, 4.0

mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 mM HEPES) + Met 10 mM + Complete 1x. Quant aux milieux, ils furent en premier lieu centrifugés 13000 x g deux minutes; puis leurs protéines, immunoprécipitées à 4°C dans RIPA 0.5x + Met 10 mM + Complete 1x. Les anticorps  $\alpha\text{V5}$  (1/500) (*Invitrogen*) ou  $\alpha\text{POMC}$  (1/200) [42] furent incubés avec les lysats ou les milieux durant 24 heures, puis les billes Agarose A/G (30  $\mu\text{l}$ ) (*Santa Cruz*) furent ajoutées et incubées pendant 16 heures supplémentaires. Les billes furent lavées quatre fois au RIPA 1x, puis une fois au PBS 1x. L'immunoprécipitat fut détaché des billes par une incubation de cinq minutes à 100°C dans Laemli 2x (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 200 mM DTT, 4% SDS, 12 % glycérol). Les protéines de l'immunoprécipitat furent séparées par SDS-PAGE. Ces gels furent par la suite traités 45 minutes dans une solution 40% méthanol/10% acide acétique/50%  $\text{H}_2\text{O}$ , puis 45 minutes dans la solution Amplify (*Amersham*). Ils furent finalement séchés deux heures à 80°C dans un appareil *Biorad* modèle 583. Nous utilisâmes des films X-OMAT (*Kodak*) ou Biomax (*Kodak*) pour les expositions (-80°C).

Les cellules HK293 (un pétri 15 cm) exprimant transitoirement proCT ou pro\*CT en vue du séquençage furent marquées métaboliquement avec 1.5 mCi Val [ $\text{H}^3$ ] (*Amersham*) pendant quatre heures selon le protocole décrit au paragraphe précédent. Où cela est pertinent, la BFA fut ajoutée au milieu à une concentration de 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  durant la pré-incubation sans Val et le pulse. Ensuite, les cellules furent lysées; les protéines des lysats, immunoprécipitées avec l'anticorps  $\alpha\text{V5}$  et les protéines de l'immunoprécipitat, séparées par SDS-PAGE selon le protocole décrit au paragraphe précédent. Les protéines dans le gel furent enfin séquencées par dégradation de Edman d'après le protocole de Benjannet et al. [51].

En ce qui concerne les expériences sans radioactivité, nous avons procédé à peu près de la même manière. À vingt-quatre heures post-transfection, nous changeâmes le milieu des cellules FD11 contre DMEM:F12 (1:1) + 28  $\mu\text{g}/\text{ml}$  GTM et nous fîmes une incubation de six heures. Où cela est pertinent, la BFA fut ajoutée au milieu à une concentration de 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  durant une pré-incubation d'une heure suivie

d'une incubation de cinq heures. Ensuite les cellules furent lysées dans RIPA 1x + Complete 1x tel que décrit précédemment. Les milieux pour leur part furent centrifugés 13000 x g deux minutes. Les protéines des lysats (1/3 pétri 3.5 cm) et des milieux (1/30 du total recouvrant un pétri 3.5 cm) furent séparées par SDS-PAGE et transférées sur membrane de nitrocellulose (*Amersham*). Par la suite elles furent détectées par immunobuvardage avec divers anticorps:  $\alpha$ V5-HRP (1/2000) (*Invitrogen*), rabbit  $\alpha$ POMC (1/1000) [42], rabbit  $\alpha$ actine (1/1000) (*Sigma-Aldrich*),  $\alpha$ GFP-HRP (1/1000) (*Santa Cruz*), goat  $\alpha$ PDX (1/2000) (*ICN*), rabbit  $\alpha$ CT mPC1 (1/2000) [51], rabbit  $\alpha$ PC7 (1/2000) [52] et mouse ( $\alpha$ furine) MON148 (1/1000) (*Alexis*). Les membranes furent d'abord bloquées avec TBST (10 mM Tris-HCl pH 8, 0.15 M NaCl, 0.1% Tween-20) + 5% lait 30 minutes à température pièce (RT), puis le premier anticorps fut incubé avec les membranes pendant 16 heures à 4°C dans une solution de même composition. S'en est suivi trois lavages de 10 minutes avec TBST, puis l'incubation avec le deuxième anticorps ( $\alpha$ rabbit-HRP (1/10000) (*Sigma-Aldrich*),  $\alpha$ mouse-HRP (1/10000) (*Amersham*) ou  $\alpha$ goat-HRP (1/8000) (*Santa Cruz*)) une heure à RT dans TBST + 5% lait et encore trois lavages de 10 minutes avec TBST. Évidemment pour les immunobuvardages avec  $\alpha$ V5-HRP et  $\alpha$ GFP-HRP il n'y eut pas d'anticorps secondaire.  $\alpha$ V5-HRP,  $\alpha$ GFP-HRP et les anticorps secondaires furent détectés grâce à la trousse ECL+ (*Amersham*) et les bandes furent visualisées par exposition des membranes aux films X-OMAT ou Biomax.

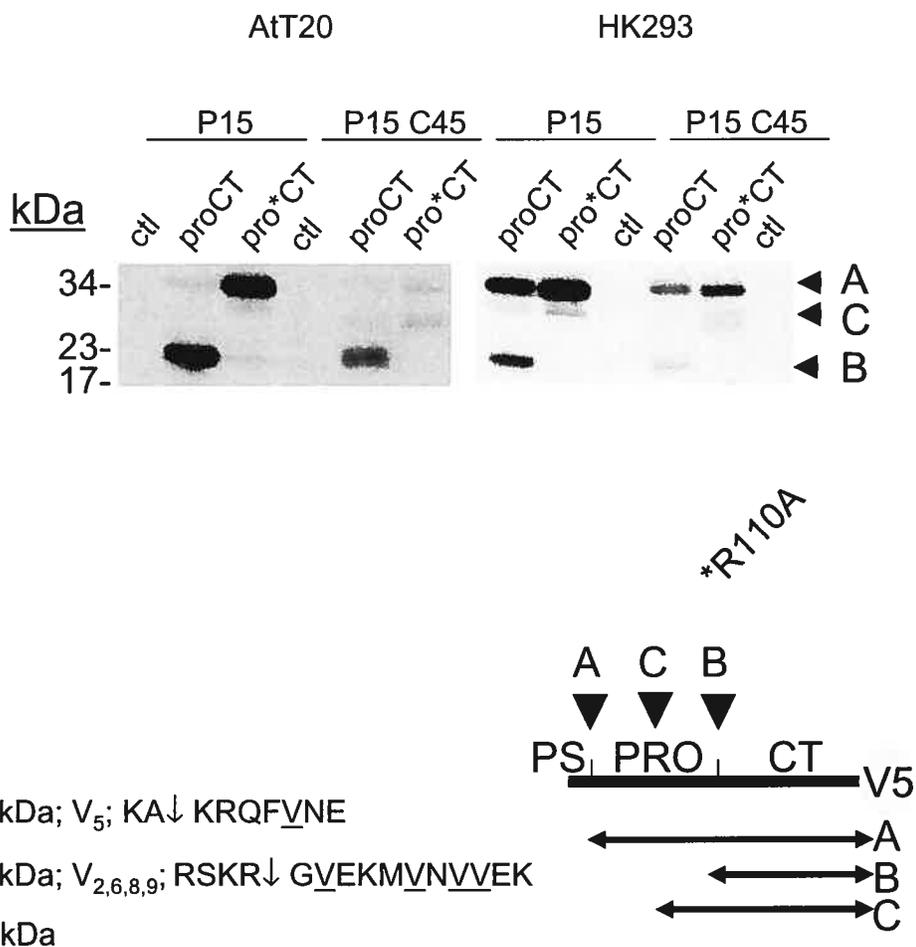
Les cellules AtT20 furent traitées de la même manière que les FD11, sauf que l'incubation post-transfection eut lieu trois heures dans DMEM + 10% FBS + 28  $\mu$ g/ml GTM  $\pm$  10  $\mu$ M forskoline. Par après les cellules furent lysées comme décrit au paragraphe précédent et les protéines des milieux, immunoprécipitées avec l'anticorps  $\alpha$ V5 (1/500) dans RIPA 1x + Complete 1x tel que décrit précédemment.

### Chapitre III: Résultats

#### 3.1 Inhibition de PC1 dans les granules sécrétoires: stratégie basée sur le prosegment de l'enzyme

Afin d'inhiber PC1 dans les granules sécrétoires des cellules neuro-endocriniennes, nous avons d'abord employé une stratégie basée sur le prosegment de l'enzyme. En effet les PCs (dont PC1) sont inhibées *en trans* par leur prosegment (section 1.3). Cependant celui-ci *a priori* ne possède pas de motif le ciblant vers les granules. Le défi technique consista donc à lui en ajouter un de sorte que désormais il y serait dirigé. Un tel motif existe: il s'agit du CT de PC1 (section 1.3). Notre première stratégie d'inhibition de PC1 consista alors à fusionner le CT de PC1 en C-terminal du prosegment de l'enzyme (Figure 9 en bas à droite, p.24-A). Par ailleurs, nous avons ajouté à l'extrémité C-terminale de la construction un épitope V5 pour des fins de détection immunologique et à l'extrémité N-terminale, le peptide signal de PC1 afin que la construction entre dans la voie sécrétoire cellulaire. Nous avons donné le nom *proCT* à cette construction. Également nous avons généré une autre construction, nommée *pro\*CT*, dans laquelle l'arginine 110 du *proCT* fut mutée en alanine. Ayant perdu son arginine (résidu basique) à la position P1 du site primaire du prosegment, cette construction ne devrait plus inhiber PC1. Il s'agit donc d'un contrôle négatif.

Dans un premier temps, nous avons exprimé *proCT* et *pro\*CT* transitoirement dans les cellules AtT20 afin de vérifier le niveau d'expression et la stabilité des deux protéines dans cette lignée cellulaire. Ces dernières, étant dérivées de cellules pituitaires corticotrophes, expriment endogènement la POMC, PC1 et PC2. De plus nous y trouvons des granules sécrétoires [53]. Les cellules AtT20 représentent donc un modèle cellulaire idéal pour étudier l'inhibition de PC1. Comme nous pouvons le voir à la Figure 9 en haut (p.24-A), au cours du pulse de 15 minutes *proCT* produit deux formes: les formes A (33 kDa) et B (21 kDa). Après les 45 minutes de chase, la



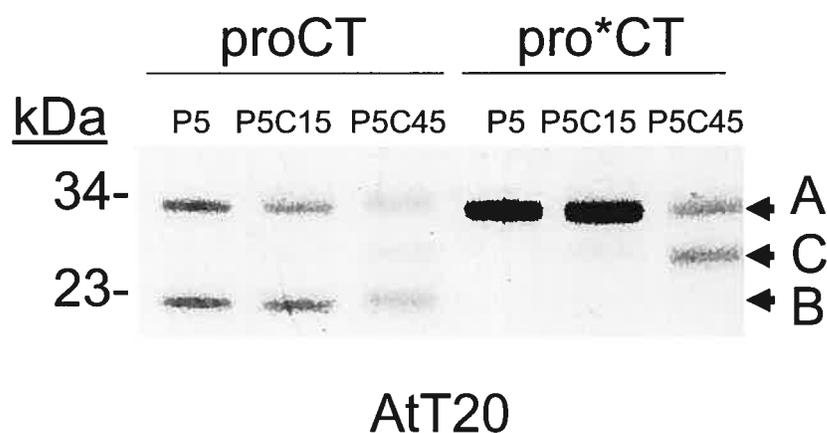
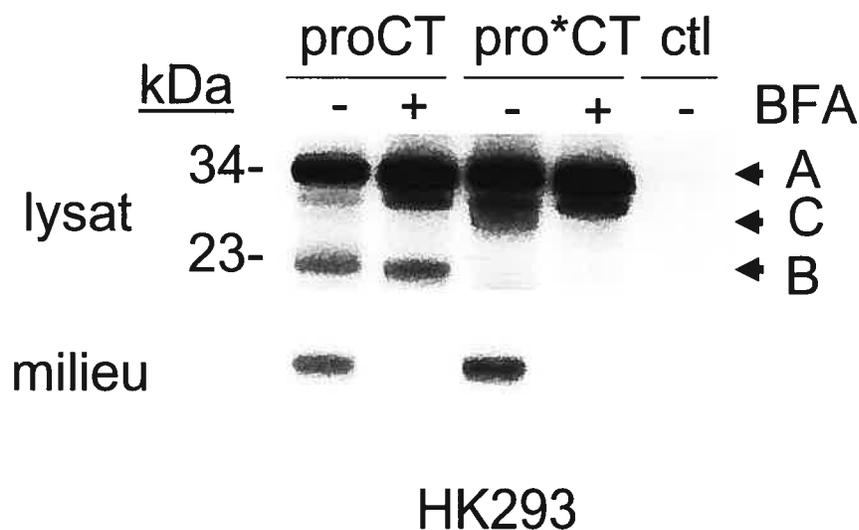
**Figure 9:** Clivage de proCT et pro\*CT dans les cellules AtT20 et HK293

*En haut:* Les cellules AtT20 ou HK293 exprimant transitoirement proCT ou pro\*CT furent pulsées 15 minutes avec Met/Cys [ $S^{35}$ ], puis chasées 45 minutes. Les protéines des lysats furent immunoprécipitées avec l'anticorps  $\alpha V5$  et les protéines des immunoprécipitats furent séparées dans un gel SDS-PAGE tricine 14%. Ctl: contrôle (vecteur vide). *En bas à gauche:* Les cellules HK293 exprimant transitoirement proCT ou pro\*CT furent pulsées quatre heures avec Val [ $H^3$ ], puis les protéines des lysats furent immunoprécipitées avec l'anticorps  $\alpha V5$ . Les protéines des immunoprécipitats furent séparées dans un gel SDS-PAGE tricine 14% et séquencées par dégradation de Edman. *En bas à droite:* Représentation schématique des différentes formes de proCT et pro\*CT.

forme A de proCT a complètement disparu et nous avons vu la forme C (26 kDa) apparaître. Quant à pro\*CT il ne génère que les formes A et C. Le séquençage des différentes bandes fut nécessaire pour identifier la nature de chacune d'entre elles. Puisque les cellules AtT20 sont difficiles à transfecter, elles expriment peu (au total) de protéines recombinantes. Nous avons donc dû choisir un autre lignée cellulaire, plus facile à transfecter, pour produire suffisamment de protéines à des fins de séquençage. Notre choix s'est arrêté sur les HK293. Comme on peut le constater à la Figure 9 en haut (p.24-A), proCT et pro\*CT produisent les mêmes formes dans les cellules HK293 et AtT20. Nous avons donc produit et marqué à la Val [ $H^3$ ] les deux protéines dans la lignée HK293 et séquencé les différentes bandes par dégradation de Edman. La forme A de proCT et pro\*CT ne possède qu'une seule valine en position 5 (Figure 9 en bas à gauche, p.24-A). Quant à la forme B, nous avons trouvé des valines en position 2, 6, 8 et 9. Nous concluons alors que la forme A correspond à la protéine entière débarrassée du peptide signal (prosegment + CT) et la forme B, au CT seul (proCT clivé au site primaire du prosegment). Nous n'avons cependant pas pu séquencer la forme C, car la cellule n'en produisait pas suffisamment. Ne considérant que la masse moléculaire de celle-ci (26 kDa), nous pouvons supposer qu'elle correspond au proCT ou pro\*CT clivé au site secondaire du prosegment. Le fait que la forme C soit produite à partir du proCT *et* du pro\*CT (les deux protéines ont le site secondaire du prosegment intact) et qu'elle augmente lorsqu'on coexprime la furine ou d'autres PCs (ce site est reconnu par les PCs-Figure 16, p.33-A) atteste cette supposition. Résumons ainsi le profil de maturation du proCT et du pro\*CT: très tôt dans la voie sécrétoire, dans les 15 premières minutes suivant la synthèse, proCT est clivé au site primaire du prosegment; pour sa part pro\*CT (et proCT dans une moindre mesure) est clivé plus tardivement (jusqu'à une heure après la synthèse) au site secondaire du prosegment.

Le clivage générant la forme B constitue potentiellement une nuisance, car il détache l'inhibiteur (le prosegment) du motif le ciblant vers les granules (le CT). Si cette coupure survient dans le granule (ce qui serait surprenant considérant la

précocité de ce clivage), elle ne représente plus un problème puisque le prosegment aura déjà atteint sa destination avant de perdre son motif de ciblage. Toutefois, si la coupure se produit dans un compartiment pré-granule (ce qui est probablement le cas), l'inhibiteur perdra la chance d'atteindre la destination désirée. D'où la nécessité d'identifier la localisation intracellulaire du clivage produisant la forme B du proCT. Pour ce faire nous avons traité les cellules HK293 à la brefeldine A (BFA). Cet agent chimique bloque le transport des protéines de la voie sécrétoire dans le RE [54]; ainsi si proCT est maturé dans un compartiment post-RE, la BFA préviendra cette maturation. Tel qu'on peut le remarquer à la Figure 10 en haut (p.26-A), le traitement à la BFA n'empêcha pas l'apparition de la forme B. Ainsi nous en déduisons que celle-ci est formée dans le RE. Notons par ailleurs que la forme C disparaît en présence de BFA, ce qui confirme que cette dernière est générée plus tardivement dans la voie sécrétoire (dans le RTG par exemple). Néanmoins, la BFA a aussi pour effet de provoquer la fusion de l'appareil de Golgi (mais pas du RTG) avec le RE (Figure 5, p.9-B) [54]. De cette manière si une protéase réside physiologiquement sous sa forme active dans le Golgi (et non dans le RE), la BFA la ramènera vers le RE, où elle pourra désormais agir. En d'autres mots, la production de la forme B dans le RE en présence de BFA n'est peut-être qu'un artefact. Afin d'écarter cette possibilité, nous avons fait un pulse court (cinq minutes) dans les cellules AtT20 (Figure 10 en bas, p.26-A). Il faut en effet compter 10 à 20 minutes après sa synthèse pour qu'une protéine de la voie sécrétoire quitte le RE et se rende dans le Golgi [47]. De cette façon, si proCT est clivé dans le RE par une protéase qui y est localisée sous sa forme active dans des conditions physiologiques, nous devrions observer la forme B au cours du pulse de cinq minutes. De fait la forme B fit son apparition dans les cinq premières minutes suivant la synthèse, ce qui confirme les résultats obtenus avec la BFA. Quant à la forme C, nous ne l'avons observée qu'après la chase de 45 minutes, ce qui confirme également les résultats précédents. À titre de contrôle ultime, nous avons séquencé par dégradation de Edman la forme B produite dans les cellules HK293 traitées à la BFA. En effet rien ne nous garantissait que le clivage du proCT se produisait au même site lorsque la construction était retenue dans le RE.



**Figure 10: Maturation précoce du proCT**

*En haut:* Les cellules HK293 exprimant transitoirement proCT ou pro\*CT furent pulsées une heure avec Met/Cys [ $S^{35}$ ] et traitées simultanément à la BFA (2.5  $\mu\text{g/ml}$ ). Les protéines des lysats et des milieux furent immunoprécipitées avec l'anticorps  $\alpha\text{V5}$  et les protéines des immunoprécipitats furent séparées dans un gel SDS-PAGE tricine 14%.

*En bas:* Les cellules AtT20 exprimant transitoirement proCT ou pro\*CT furent pulsées cinq minutes avec Met/Cys [ $S^{35}$ ], puis chasées 0, 15 ou 45 minutes. Les protéines des lysats furent immunoprécipitées avec l'anticorps  $\alpha\text{V5}$  et les protéines des immunoprécipitats furent séparées dans un gel SDS-PAGE tricine 14%.

Nous avons obtenu des valines en position 2, 6, 8 et 9. Ainsi le clivage générant la forme B se produit au même site en absence ou en présence de BFA.

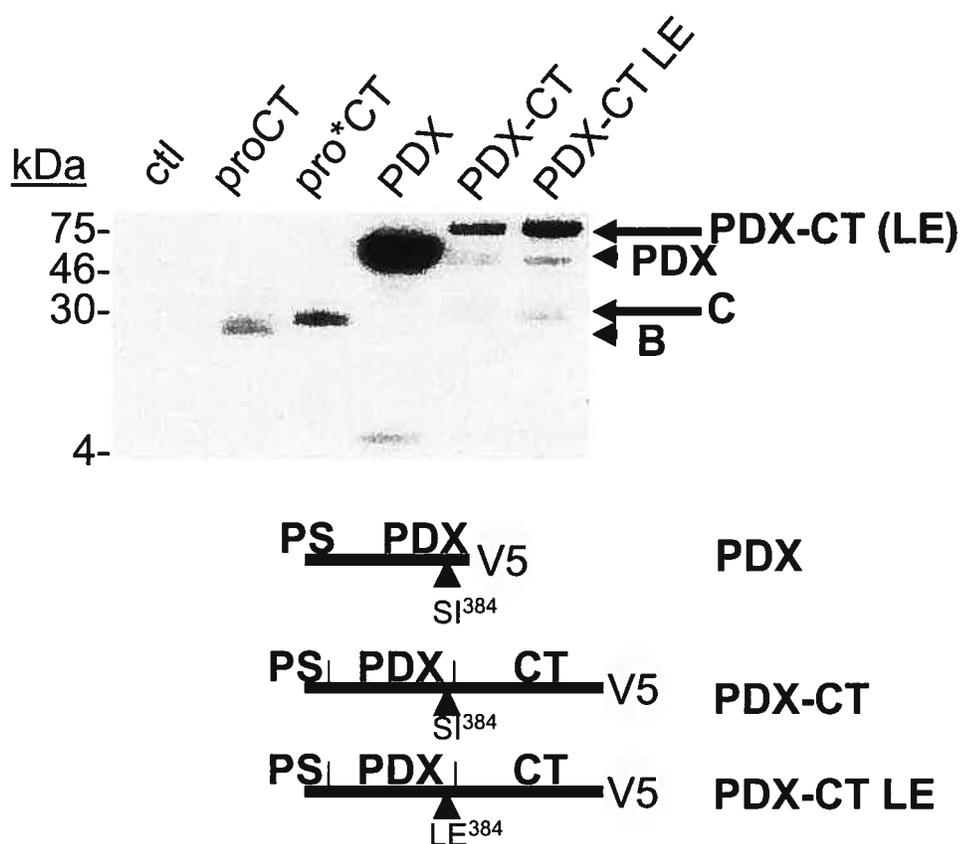
Il se dégage de nos résultats que le proCT n'est pas un inhibiteur stable, c'est-à-dire qu'il est dégradé dans la voie sécrétoire aussi précocement que dans le RE. Cela a pour conséquence que le prosegment perd beaucoup trop tôt son motif de ciblage et qu'il ne peut atteindre sa destination finale, le granule sécrétoire. Malgré tout, cette construction nous a permis de mettre en évidence une activité des PCs (plus particulièrement de la furine) dans le RE comme nous le verrons plus loin. En ce qui concerne l'inhibition cellulaire de PC1, il a fallu néanmoins développer une autre approche.

### 3.2 Inhibition de PC1 dans les granules sécrétoires: stratégie basée sur le PDX

Le PDX est une protéine inhibitrice des PCs bien connue (section 1.3). Cependant, elle est non-spécifique en ce sens qu'elle inhibe à des degrés variables la furine, PC1, PC2 et PC5-A/B. Il fut donc nécessaire de muter le PDX dans la boucle réactive afin de le rendre spécifique à PC1. De plus le PDX est une protéine de la voie constitutive; il n'est pas dirigé vers les granules de sécrétion. Il fut donc nécessaire d'ajouter au PDX un motif de ciblage. Nous avons d'abord généré le PDX-CT (Figure 11 en bas, p.28-A). Ce dernier est constitué du PDX fusionné en C-terminal avec le CT de PC1. Comme dans le cas du proCT, le CT de PC1 devrait cibler PDX vers les granules. De plus, nous avons ajouté un épitope V5 à la fin de la construction à des fins de détection immunologique. Cependant, nous ne nous attendions pas à ce que PDX-CT soit plus spécifique vis-à-vis PC1 que ne l'est PDX. Pour ce faire nous avons muté les résidus P1' et P2' du site de reconnaissance du PDX-CT de SI<sup>384</sup> à LE. En effet, il a été montré au cours d'études *in vitro* que le fait d'ajouter ces deux résidus à cette position augmentait la spécificité d'inhibition contre PC1 d'un peptide inhibiteur dérivé du SAAS: la furine était 150 fois moins inhibée et

PC5-A, 300 fois moins suite à l'ajout des résidus LE en position P1' et P2' respectivement, alors que l'inhibition de PC1 restait à peu près inchangée [35]. Ainsi nous avons prévu que PDX-CT LE soit ciblé aux granules *et* spécifique à PC1.

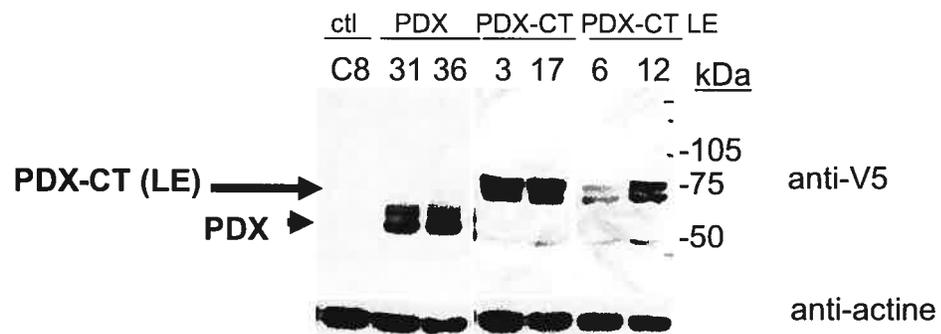
Pour commencer nous avons exprimé transitoirement dans les cellules AtT20 le PDX, PDX-CT et PDX-CT LE et nous avons comparé la stabilité de ceux-ci avec le proCT. Comme nous pouvons le constater à la Figure 11 en haut (p.28-A), après sécrétion (c'est-à-dire après avoir traversé toute la voie sécrétoire) le proCT n'est présent dans le milieu que sous la forme B. Pour ce qui est du PDX-CT et PDX-CT LE, nous avons observé majoritairement une bande de 75 kDa dans le milieu. Cette dernière correspond à la masse moléculaire attendue pour la forme complète des deux protéines. Toutefois nous avons aussi détecté des bandes de 50 et 30 kDa, correspondant sans doute à des produits de dégradation. Comme ces bandes de 50 et 30 kDa sont minoritaires par rapport à celle de 75 kDa, nous pouvons considérer comme stables PDX-CT et PDX-CT LE. Les cellules AtT20 sont difficiles à transfecter; nous l'avons déjà mentionné. Il en résulte que seulement une faible proportion de celles-ci (moins de 50%) expriment effectivement nos inhibiteurs lors d'une transfection transitoire. Ainsi la majorité des cellules ne verront pas leur niveau d'activité de PC1 changer, puisque cette dernière n'y sera pas en contact avec les inhibiteurs. Bien entendu, ce faible niveau de transfection diminuera l'inhibition globale observée. Il était donc impératif d'obtenir des clones des cellules AtT20 exprimant stablement PDX, PDX-CT ou PDX-CT LE. Par sélection au G-418 de pools de cellules transfectées, nous avons obtenu 2 clones pour PDX, PDX-CT et PDX-CT LE. Par contre nous n'en avons obtenu qu'un seul pour le vecteur vide (contrôle). Tel que montré à la Figure 12 (p.28-B), l'expression des différents inhibiteurs est comparable, sauf en ce qui concerne le PDX-CT LE; en effet son expression est nettement inférieure à celle des autres inhibiteurs. D'ailleurs, au cours du processus de sélection nous avons eu beaucoup plus de difficulté à trouver des clones exprimant PDX-CT LE que les autres inhibiteurs. Notons aussi que chacune



**Figure 11:** Stabilité du PDX, PDX-CT, PDX-CT LE, proCT et pro\*CT dans les cellules AtT20

*En haut:* Les cellules AtT20 exprimant transitoirement PDX, PDX-CT, PDX-CT LE, proCT ou pro\*CT furent pulsées 15 minutes avec Met/Cys [ $S^{35}$ ] et chasées deux heures. Les protéines des milieux furent immunoprécipitées avec l'anticorps  $\alpha V5$  et les protéines des immunoprécipitats furent séparées dans un gel SDS-PAGE tricine 8%.

*En bas:* Représentation schématique du PDX, PDX-CT et PDX-CT LE.

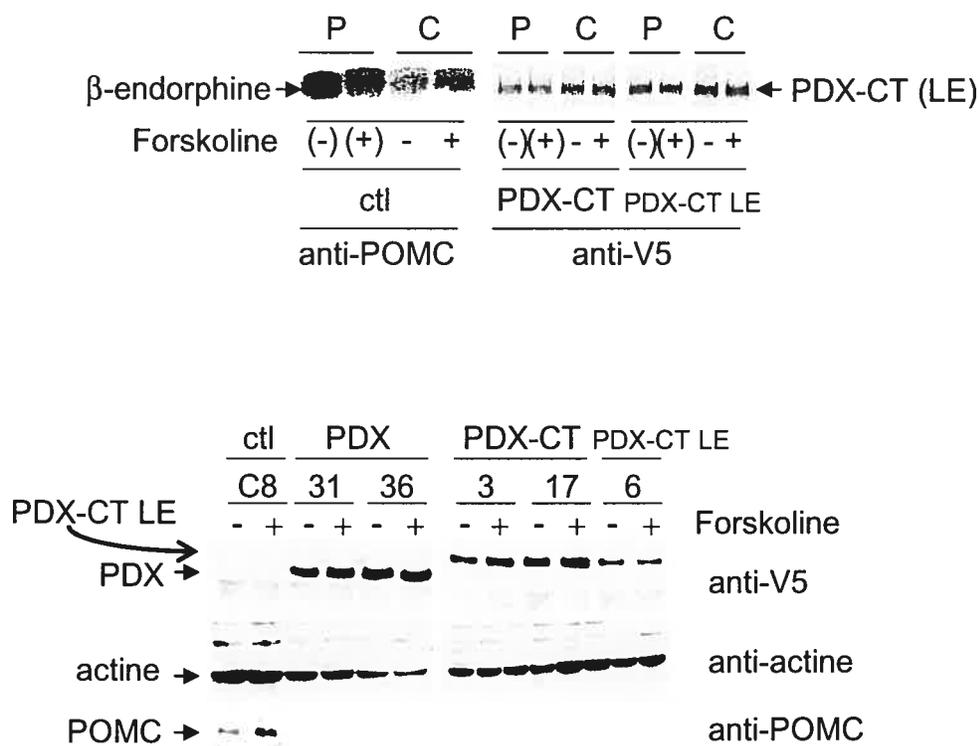


**Figure 12:** Expression de PDX, PDX-CT et PDX-CT LE dans les clones AtT20

30  $\mu$ g de protéines de lysat des différents clones AtT20 exprimant stablement PDX, PDX-CT ou PDX-CT LE furent séparées dans un gel SDS-PAGE glycine 8% et les protéines furent détectées par immunobuvardage avec les anticorps  $\alpha$ V5 ou  $\alpha$ actine.

des protéines exprimées sont présentes sous forme de doublet dans les lysats. Ces doublets reflètent probablement l'état de glycosylation des inhibiteurs [42].

Avant de vérifier l'inhibition de PC1, nous avons étudié le ciblage de PDX-CT et PDX-CT LE au sein des cellules AtT20. Pour ce faire nous avons exprimé transitoirement les deux protéines dans ces cellules et nous les avons marquées à la Met/Cys [ $S^{35}$ ]. Puis, durant la chase, nous avons traité les cellules à la forskoline. Il s'agit d'un agent chimique qui stimule la libération du contenu des granules dans le milieu extracellulaire [55]. De cette façon si une protéine réside dans les granules, sa sécrétion augmentera avec le traitement à la forskoline. Comme on peut le constater à la Figure 13 en haut (p.29-A), ni PDX-CT ni PDX-CT LE ne virent leur sécrétion augmenter suite au traitement à la forskoline. Cependant celle de la  $\beta$ -endorphine (une protéine résidente des granules) s'est accrue au cours de l'expérience, ce qui confirme l'efficacité du traitement. Nous devons mentionner que cette analyse de ciblage par pulse/chase ne nous a permis que d'étudier le trafic intracellulaire du PDX-CT et PDX-CT LE au cours d'une période restreinte de trois heures (le temps que dura le traitement à la forskoline). En effet, ce genre d'expérience ne nous permet pas de visualiser les protéines synthétisées et accumulées dans les cellules *avant* le pulse (elles ne sont pas radioactives). Ainsi, nous n'avons étudié que le ciblage des protéines fabriquées durant le pulse, puis dispersées dans la cellule pendant la chase de trois heures. Généralement deux ou trois heures sont suffisantes pour qu'une protéine puisse se loger au sein des granules sécrétoires matures [47]. Cependant il est possible que le processus soit plus long pour le PDX-CT et PDX-CT LE. Il en résulte que ceux-ci n'auront pas le temps nécessaire au cours de la chase pour aller s'accumuler dans les granules et par conséquent nous ne pourrons pas stimuler leur sécrétion par la forskoline. Afin d'écarter cette possibilité nous avons tenté le même genre d'expérience, mais cette fois-ci nous avons procédé par immunobuvardage avec les clones exprimant stablement les inhibiteurs. Puisque l'immunobuvardage est une technique qui permet de détecter toutes les protéines portant un antigène donné, nous avons pu visualiser toutes les molécules de nos

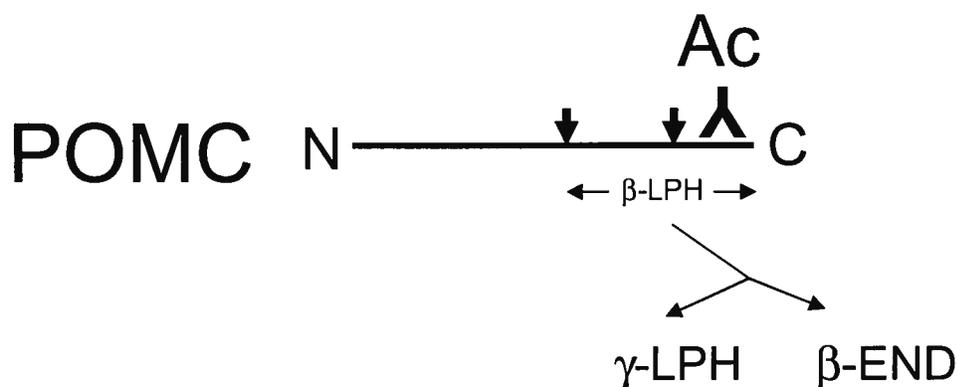
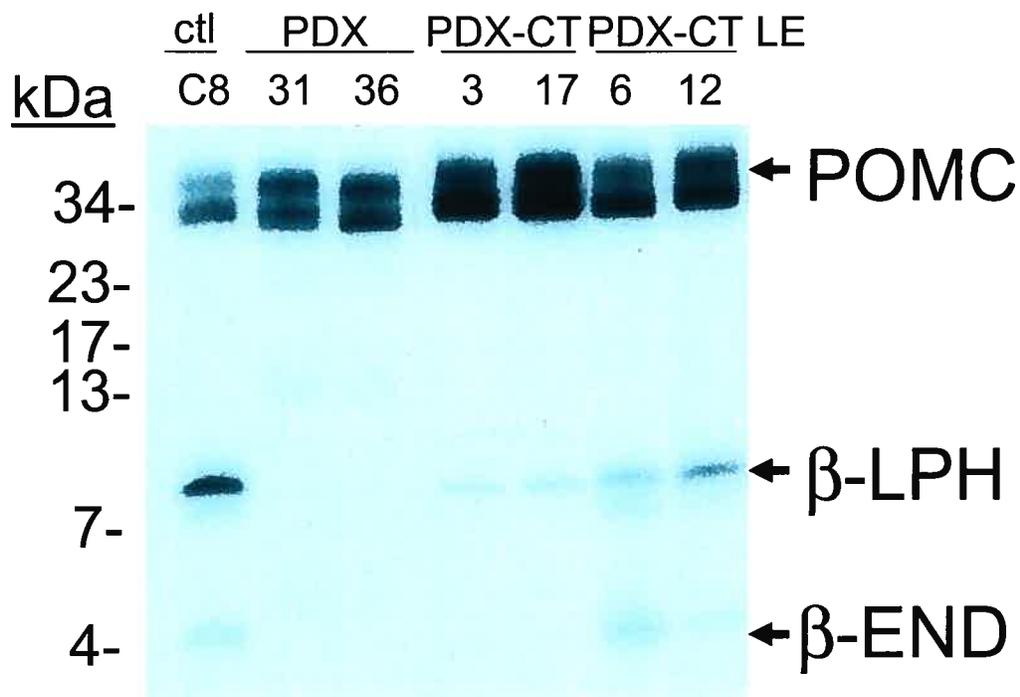


**Figure 13: Ciblage intracellulaire du PDX, PDX-CT et PDX-CT LE dans les cellules AtT20**

*En haut:* Les cellules AtT20 exprimant transitoirement PDX, PDX-CT ou PDX-CT LE furent pulsées une heure avec Met/Cys [ $S^{35}$ ] et chasées trois heures en présence de forskoline (10 $\mu$ M). Les protéines des milieux furent immunoprécipitées avec les anticorps  $\alpha$ V5 ou  $\alpha$ POMC et les protéines des immunoprécipitats furent séparées dans un gel SDS-PAGE tricine 8% ( $\alpha$ V5) ou 14% ( $\alpha$ POMC). *En bas:* Les clones AtT20 exprimant stablement PDX, PDX-CT ou PDX-CT LE furent incubés trois heures en présence de forskoline (10  $\mu$ M). Les protéines des milieux furent immunoprécipitées avec l'anticorps  $\alpha$ V5. Les protéines des lysats, des milieux et des immunoprécipitats furent séparées respectivement dans un gel SDS-PAGE glycine 8%, un gel SDS-PAGE glycine 12% et un gel SDS-PAGE tricine 8%. Les protéines furent détectées par immunobuvardage avec les anticorps  $\alpha$ actine,  $\alpha$ POMC ou  $\alpha$ V5.

inhibiteurs (ce qui inclut celles fabriquées plusieurs heures avant que ne débute le traitement à la forskoline). Néanmoins ni la sécrétion du PDX-CT ni celle du PDX-CT LE n'augmentèrent suite à l'exposition des cellules à la forskoline (Figure 13 en bas, p.29-A). À titre de contrôle positif, nous avons vu clairement l'accroissement de la sécrétion de la POMC (une protéine résidente des granules) en présence du sécrétagogue. Nous devons donc nous rendre à l'évidence: ni PDX-CT ni PDX-CT LE ne sont ciblés aux granules sécrétoires.

L'absence de ciblage de PDX-CT et PDX-CT LE aux granules les écarte en tant qu'outil utile pour l'inhibition cellulaire de PC1. Malgré tout, il serait intéressant de vérifier si la mutation LE du PDX confère à ce dernier une spécificité d'inhibition à l'égard de PC1. S'il s'avère que le PDX-CT LE inhibe spécifiquement PC1, nous pourrions toujours par la suite remplacer le CT de PC1 par un autre motif de ciblage. Nous avons donc étudié la maturation de la POMC dans les clones AtT20. La POMC est un substrat endogène de PC1 et PC2 dans ces cellules (Figure 14 en bas, p.30-A). PC1 clive d'abord le précurseur protéique pour générer l'hormone lipotropine  $\beta$  ( $\beta$ -LPH), puis cette dernière est maturée en  $\beta$ -endorphine par PC2. Notons que dans une moindre mesure PC1 peut produire la  $\beta$ -endorphine et PC2, la  $\beta$ -LPH. Par ailleurs, la  $\beta$ -endorphine peut aussi être directement produite à partir de la POMC (sans passer par la  $\beta$ -LPH comme intermédiaire) [56]. Au cours de notre expérience nous avons employé un anticorps dirigé contre l'extrémité C-terminale de la POMC [42]. Il nous a permis de détecter simultanément la POMC, la  $\beta$ -LPH et la  $\beta$ -endorphine. Il est important de spécifier que nous n'avons analysé que les produits de maturation de la POMC fabriqués dans la voie constitutive. Puisque PDX-CT et PDX-CT LE ne sont pas ciblés aux granules, il n'y a que dans cette voie que les inhibiteurs sont susceptibles de rencontrer PC1 pour bloquer son activité. Tel que montré à la Figure 14 en haut (p.30-A), le PDX a inhibé la formation de la  $\beta$ -LPH et de la  $\beta$ -endorphine. PDX-CT fit de même, mais la production de  $\beta$ -LPH ne fut pas totalement bloquée contrairement aux clones PDX. Pour ce qui est de l'inhibition par le PDX-CT LE, l'analyse est plus complexe. La formation de  $\beta$ -LPH dans les clones PDX-CT LE



**Figure 14:** Inhibition de la maturation de la POMC dans la voie constitutive des clones AtT20 exprimant stablement PDX, PDX-CT ou PDX-CT LE

*En haut:* Les clones AtT20 exprimant stablement PDX, PDX-CT ou PDX-CT LE furent pulsés trois heures avec Met/Cys [ $S^{35}$ ]. Les protéines des milieux furent immunoprécipitées avec l'anticorps  $\alpha$ POMC et les protéines des immunoprécipitats furent séparées dans un gel SDS-PAGE tricine 14%. *En bas:* Représentation schématique de la POMC et de ses produits de maturation.  $\gamma$ -LPH: hormone lipotropine  $\gamma$ ,  $\beta$ -END:  $\beta$ -endorphine Ac: anticorps

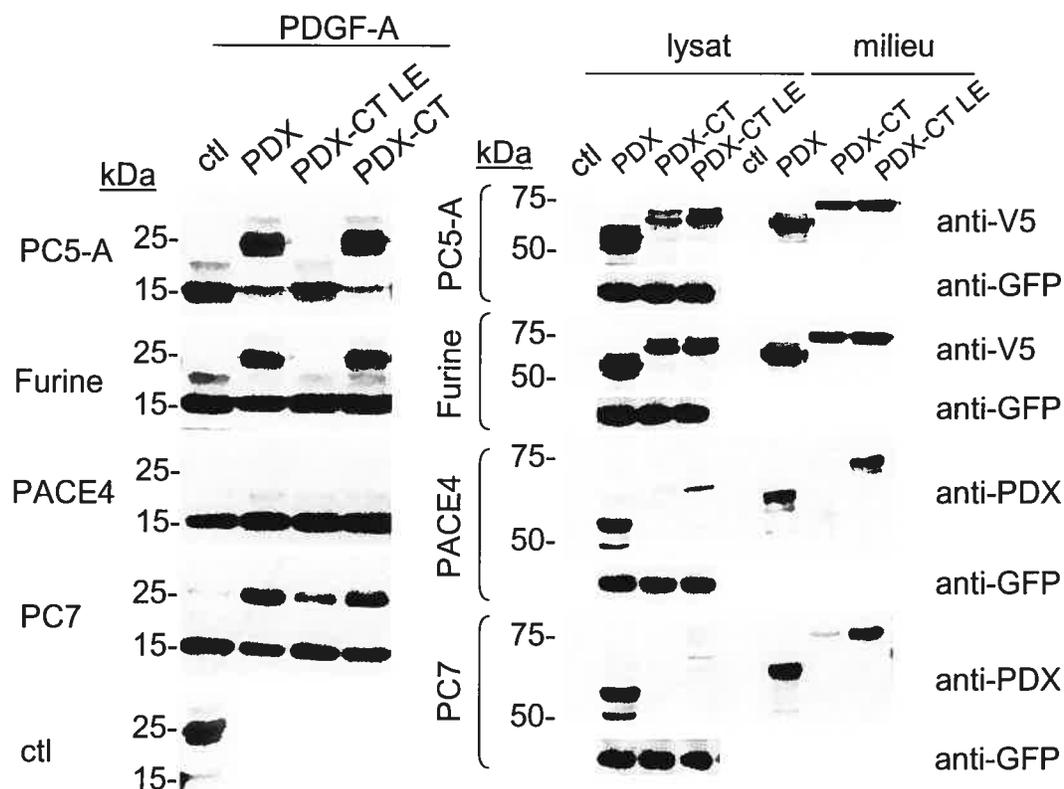
diminua également par rapport au contrôle, mais lorsque la quantité d'inhibiteurs augmentait dans la cellule (clone 12 vs 6) on observa plus de  $\beta$ -LPH dans le milieu. Quant à la  $\beta$ -endorphine son niveau demeura inchangé dans le clone 6 par rapport au contrôle, mais elle a presque totalement disparu dans le clone 12. Nous proposons l'explication suivante pour ce résultat étrange: il n'y avait pas suffisamment de PDX-CT LE dans le clone 6 pour inhiber PC2 (tandis qu'il y en avait assez pour bloquer partiellement l'activité de PC1), mais dans le clone 12 la quantité d'inhibiteurs était suffisante pour inhiber partiellement les deux enzymes. Ainsi dans le clone 6 le niveau de  $\beta$ -endorphine fut semblable au contrôle, car cette hormone fut générée par PC2 directement à partir de la POMC. En ce qui concerne le clone 12, l'inhibition de PC2 eut pour conséquence de réduire la maturation de la  $\beta$ -LPH en  $\beta$ -endorphine par rapport au clone 6, d'où une augmentation de la  $\beta$ -LPH dans ce clone par rapport au clone 6. Résumons en concluant que PDX, PDX-CT et PDX-CT LE inhibent PC1 et PC2 dans la voie constitutive.

Bien que la mutation LE du PDX ne le rende pas plus spécifique à PC1 par rapport à PC2, il serait intéressant de voir si cette mutation affecte l'inhibition d'autres PCs comme la furine, PC5-A, PACE4 ou PC7. Celles-ci étant largement distribuées dans l'organisme, nous sommes assurés de les retrouver dans de nombreuses lignées cellulaires contenant PC1 [3]. Il est donc important que l'inhibiteur conçu contre cette dernière ne les affecte pas. Dans le but de poursuivre notre investigation, nous avons coexprimé transitoirement dans les cellules FD11 le PDGF-A et les différents inhibiteurs. Le PDGF-A est un facteur de croissance dont le précurseur est mûri par les PCs [50]. Les cellules FD11 quant à elles ne possèdent pas de furine active [57], donc le précurseur du PDGF-A ne peut y être clivé, à moins qu'on y exprime stablement une PC par transfection. De cette manière il est possible d'étudier l'inhibition d'une PC particulière au sein des cellules FD11. Comme on peut le constater à la Figure 15 à gauche (p.32-A), le proPDGF-A (25 kDa) ne fut presque pas mûri en PDGF-A (15 kDa) dans les cellules FD11 contrôle. Par contre lorsqu'on y surexprimait stablement la furine, PC5-A, PACE4 ou PC7, la maturation

du précurseur y fut complète ou quasi complète (Figure 15 à gauche, p.32-A). Nous avons remarqué que le PDX-CT LE n'a pas inhibé la furine ou PC5-A, alors que PDX et PDX-CT y sont très bien parvenus (Figure 15 à gauche, p.32-A). Observons que le niveau d'expression de PDX-CT LE se comparait à celui de PDX-CT dans les deux lignées cellulaires (FD11+furine et FD11+PC5-A) (Figure 15 à droite, p.32-A). Quant à PACE4 et PC7, aucun des quatre inhibiteurs ne modifia l'activité de la première, tandis que la deuxième fut beaucoup mieux inhibée par le PDX et PDX-CT que par le mutant LE (Figure 15 à gauche, p.32-A). Notons que le PDX-CT LE était nettement plus exprimé que le PDX-CT dans les cellules FD11+PC7 (Figure 15 à droite, p.32-A). Il se dégage de tout cela que la mutation LE du PDX lui confère une plus grande spécificité vis-à-vis PC1, en ce sens qu'elle réduit presque à zéro l'inhibition de la furine ou PC5-A. Le même effet, tout en étant moins marqué, est observé chez PC7. Quant à PACE4, cette enzyme ne fut pas inhibée de toute façon par le PDX.

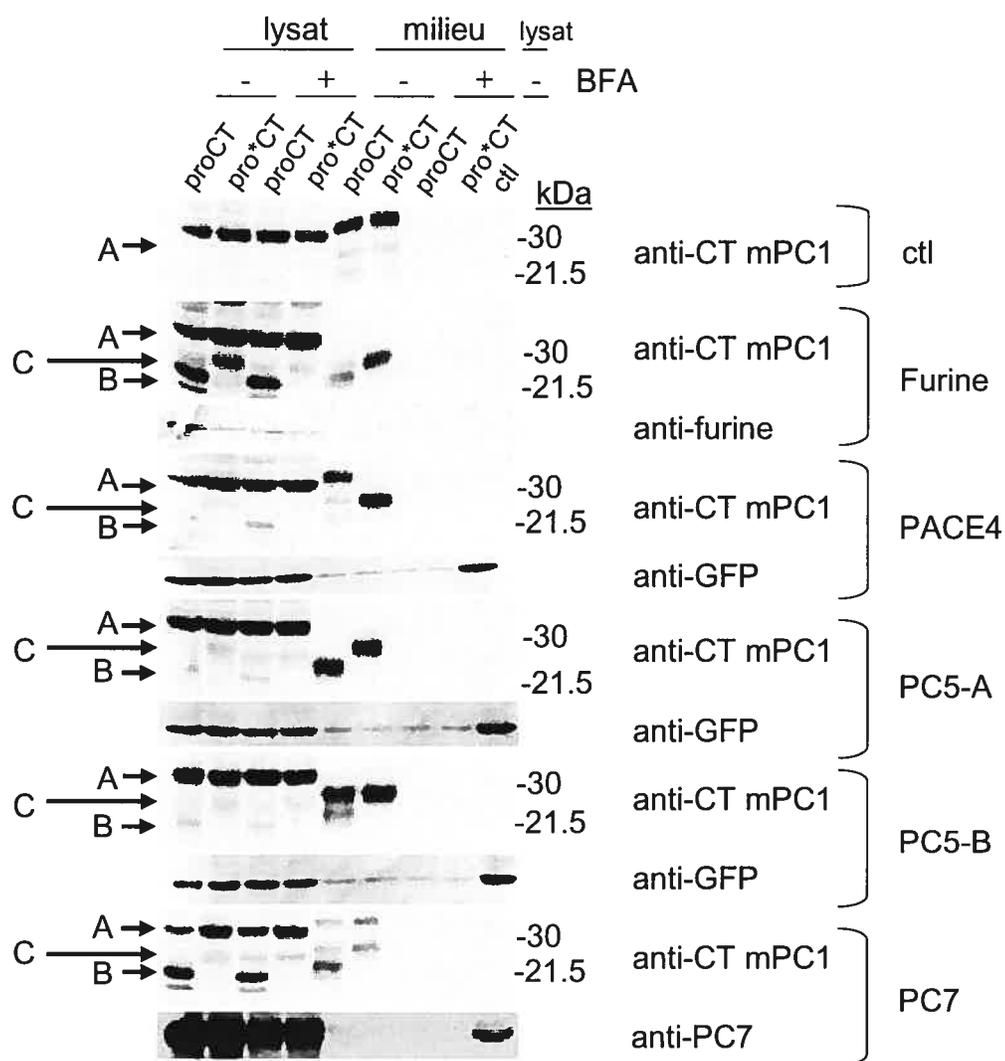
### *3.3 Activité des PCs dans le RE*

L'activité générant la forme B du proCT dans le RE est bien étrange. En effet, l'enzyme responsable de cette coupure reconnaît le même genre de site que les PCs, puisque le clivage se produit directement en C-terminal d'un site dibasique et que le pro\*CT (qui perd ce site) n'est pas maturé. Or, les PCs ne sont pas reconnues pour être actives dans le RE à cause de l'interaction inhibitrice entre leur domaine catalytique et leur prosegment. Le modèle actuel prévoit que les PCs ne s'activent que dans le RTG ou un compartiment postérieur en autoclivant leur prosegment au site secondaire, ce qui libère le domaine catalytique (section 1.3). Néanmoins un cas d'activité dans le RE fut rapporté dans la littérature: la furine peut y cliver un mutant du prorécepteur de l'insuline [58]. Comme la maturation d'un substrat dans le RE par au moins une PC n'est pas sans précédent, il est possible que le proCT aussi soit coupé par une ou plusieurs de ces enzymes dans ce compartiment intracellulaire.



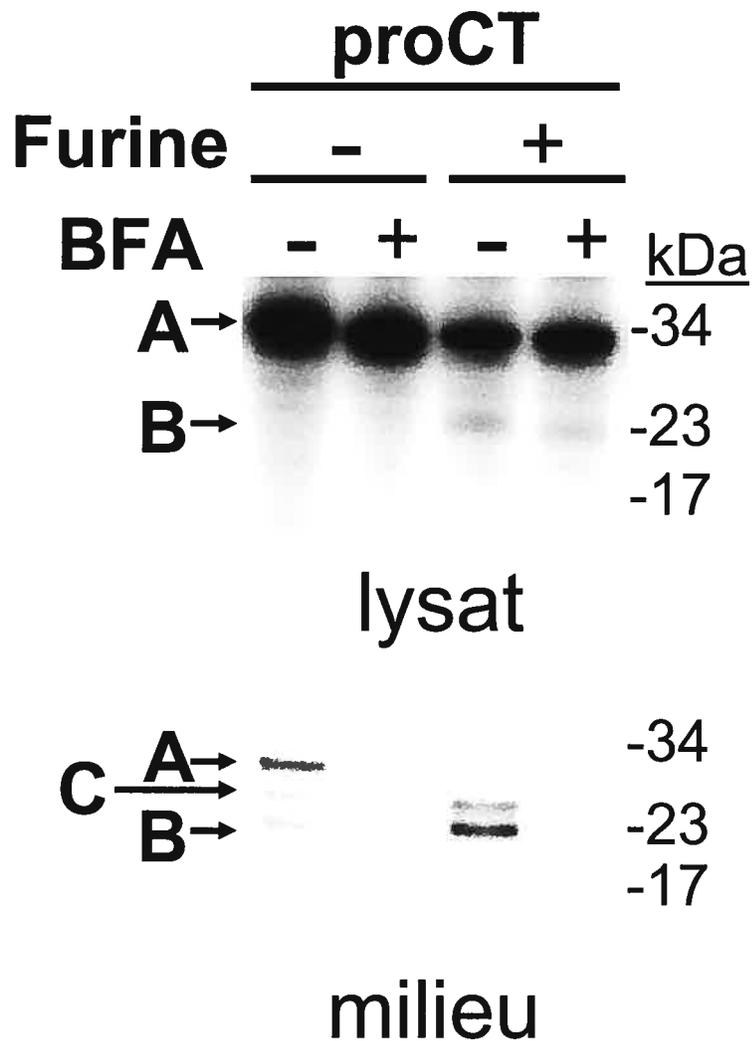
**Figure 15: Inhibition de la maturation du proPDGF-A dans les cellules FD11**  
*À gauche:* Les pools de cellules FD11 exprimant stablement la furine, PC5-A, PC7, PACE4 ou pIRES2-EGFP furent co-transfectées transitoirement avec l'ADNc du proPDGF-A et des différents inhibiteurs (substrat:inhibiteur (1:3)). Les cellules furent incubées six heures sans sérum et les protéines de milieux furent séparées dans un gel SDS-PAGE glycine 12%. Les protéines furent détectées par immunobuvardage avec l'anticorps  $\alpha$ V5 (le PDGF-A porte l'épitope V5). *À droite:* Les protéines des lysats et des milieux de la même expérience furent séparées dans un gel SDS-PAGE glycine 8% et furent détectées par immunobuvardage avec les anticorps  $\alpha$ V5,  $\alpha$ PDX ou  $\alpha$ GFP.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons coexprimé le proCT dans les cellules FD11 avec différentes PCs et nous avons traité les cellules à la BFA. Tel qu'observé à la Figure 16 (p.33-A), si on tient compte des lysats et des milieux, la furine, PC5-A et PC7 furent les PCs les plus aptes à générer la forme B en absence de BFA, bien que PACE4 et PC5-B fussent également capables de faire cette coupure. Quant à la forme C du pro\*CT, si on tient compte encore une fois des lysats et des milieux, elle fut très bien produite par toutes les PCs en absence de BFA, sauf PC7 qui fut la moins efficace. Lorsque nous avons exposé les cellules à la BFA, nous avons constaté que la furine et PC7 étaient toujours en mesure de donner naissance à la forme B, quoique PACE4 et PC5-A/B furent dans une moindre mesure capable de créer cette forme dans ces conditions. La forme C du pro\*CT quant à elle fut très mal produite par toutes les PCs en présence de BFA. Ces résultats fascinants, contrairement à ce qu'enseigne le modèle dominant, montrent que les PCs peuvent être actives dans le RE. Toutefois nos résultats peuvent être l'objet de la critique suivante: les formes B et C observées en présence de BFA dans les lysats n'ont pas nécessairement été produites pendant le traitement à la BFA; il se peut qu'il s'agisse de matériel accumulé dans la cellule avant le dit traitement, car nous avons détecté les différents produits de maturation par immunobuvardage et conséquemment nous n'avons pas pu distinguer le matériel produit *avant* le traitement à la BFA de celui fabriqué *pendant* l'exposition des cellules à l'agent chimique. Ainsi, les PCs auraient clivé le proCT et pro\*CT avant l'arrivée de la BFA et c'est ce matériel que nous eûmes observé. Dans le but d'écarter cette possibilité, nous avons refait la même expérience, mais cette fois-ci nous avons procédé par pulse/chase avec Met/Cys [ $S^{35}$ ]. Puisque cette technique ne permet de visualiser que le matériel néo-synthétisé, tout ce qui a été produit dans la cellule avant le pulse (et le traitement à la BFA qui se déroulait simultanément) est invisible. Comme on peut le voir à la Figure 17 (p.33-B), la furine cliva le proCT néo-synthétisé pour produire la forme B en absence ou en présence de BFA, ce qui confirme nos résultats précédents. De plus la forme C ne fut générée qu'en absence de BFA (comparez les milieux sans BFA vs les lysats avec BFA).



**Figure 16:** Maturation par les PCs du proCT dans le RE des cellules FD11

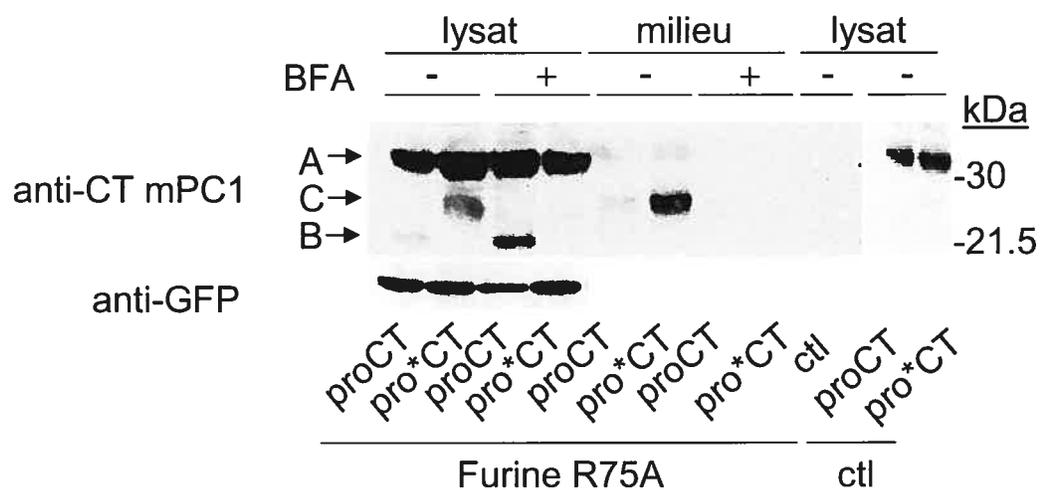
Les cellules FD11 furent co-transfectées transitoirement avec l'ADNc du proCT ou du pro\*CT et avec celui de différentes PCs (substrat:enzyme (1:1)). Les cellules furent pré-incubées une heure avec BFA, puis furent incubées cinq heures avec le même agent chimique. Les protéines des lysats et des milieux furent séparées dans un gel SDS-PAGE glycine 12%. Les protéines furent détectées par immunobuvardage avec les anticorps  $\alpha$ CT mPC1,  $\alpha$ furine,  $\alpha$ PC7 ou  $\alpha$ GFP.



**Figure 17:** Maturation par la furine du proCT néo-synthétisé dans le RE des cellules FD11

Les pools de cellules FD11 exprimant stablement la furine ou pIRES2-EGFP furent transfectées transitoirement avec l'ADNc du proCT. Les cellules furent pulsées quatre heures et les protéines des lysats (*en haut*) et des milieux (*en bas*) furent immunoprécipitées avec l'anticorps  $\alpha$ V5. Les protéines des immunoprécipitats furent séparées dans un gel SDS-PAGE tricine 14%.

Une question cependant reste sans réponse: quelle est l'origine de cette activité des PCs dans le RE? Une explication consiste à imaginer que le proCT déplace le prosegment des PCs néo-synthétisées dans le RE, prend place de cette façon dans la poche catalytique des enzymes et peut ainsi être clivé par les PCs néo-synthétisées. Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, nous avons dû utiliser un autre outil: la furine R75A. Elle correspond à la furine mutée au site secondaire du prosegment. Ce mutant est incapable d'autocliver son prosegment au site secondaire et de cette manière il ne peut s'en débarrasser [60]. Conséquemment, si la furine R75A ne mature pas le proCT, cela signifie qu'il ne peut déplacer le prosegment de la convertase, donc que la furine néo-synthétisée ne peut être active dans le RE. Tel qu'on peut le remarquer à la Figure 18 (p.34-A), la furine R75A coupe le proCT pour produire la forme B en absence ou en présence de BFA, alors que le pro\*CT ne fut maturé en forme C qu'en absence de BFA. Cela suggère que la furine néo-synthétisée est active dès son apparition dans le RE.

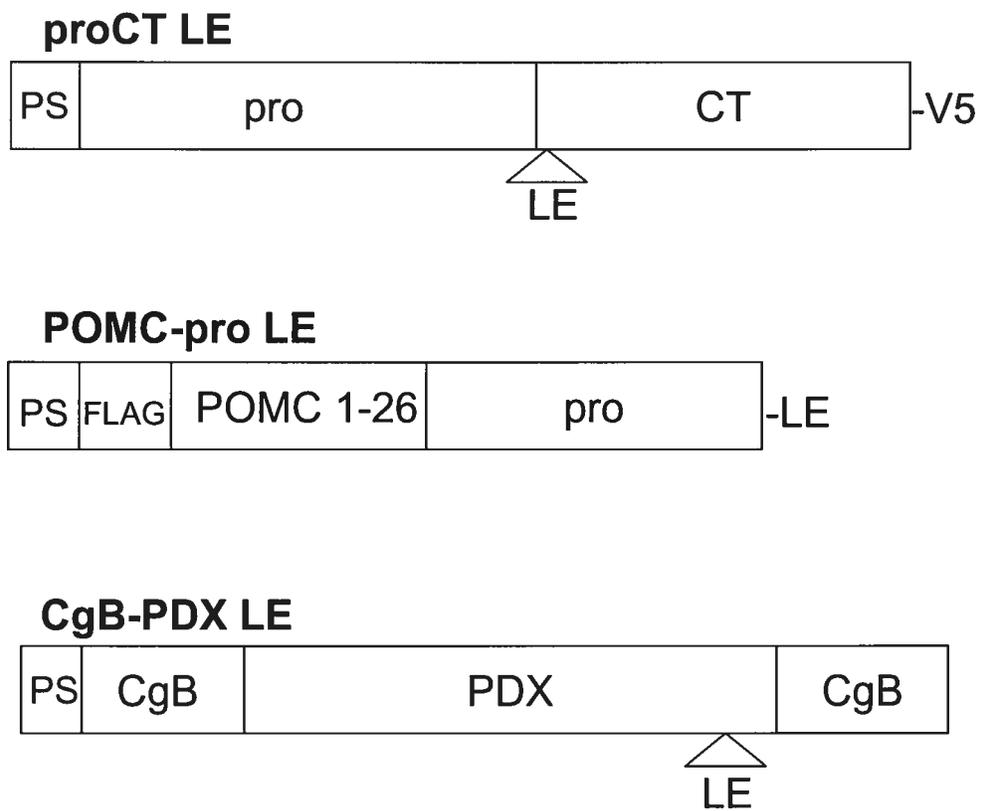


**Figure 18:** Maturation par la furine R75A du proCT dans le RE des cellules FD11  
 Les cellules FD11 furent co-transfectées transitoirement avec l'ADNc du proCT ou du pro\*CT et avec celui de la furine R75A (substrat:enzyme (1:1)). Les cellules furent pré-incubées une heure avec BFA, puis furent incubées cinq heures avec le même agent chimique. Les protéines des lysats et des milieux furent séparées dans un gel SDS-PAGE glycine 12%. Les protéines furent détectées par immunobuvardage avec les anticorps  $\alpha$ CT mPC1 ou  $\alpha$ GFP.

## Chapitre IV: Discussion

### 4.1 Inhibition de PC1 dans les granules sécrétoires: stratégie basée sur le prosegment de l'enzyme

Notre approche basée sur le prosegment n'a pas réussi en raison de l'instabilité de l'inhibiteur. En effet, le proCT est clivé dès le RE au site primaire du prosegment surtout par la furine et PC7. Nous en sommes arrivés à cette conclusion après avoir constaté que la BFA ne bloquait pas le clivage du proCT et que cette coupure se produisait dans les cinq premières minutes suivant la synthèse de la protéine. Ainsi, il apparaît que le proCT ne sera jamais un inhibiteur ciblé aux granules, car il perd beaucoup trop tôt dans la voie sécrétoire son motif de ciblage. Néanmoins, l'approche d'inhiber PC1 par son prosegment demeure valable, car le prosegment en lui-même est stable; il n'est clivé au site secondaire que tardivement dans la voie sécrétoire. D'ailleurs cette stratégie fut déjà employée avec succès pour inhiber *ex vivo* d'autres PCs comme la furine ou PC5-A. Zhong et al. ont réussi à inhiber la maturation du proNGF et du proBDNF dans les cellules COS-1 avec le prosegment de la furine [36], tandis que Nour et al. parvinrent à inhiber le clivage du proVEGF-C dans les cellules FD11 avec le prosegment de PC5-A [37]. Quoique intéressante cette approche comporte toujours un inconvénient majeur: la non-spécificité des inhibiteurs. De fait, Nour et al. remarquèrent que le prosegment de PC5-A inhibent aussi bien la furine que PC5-A [37]. Dans le même ordre d'idée, Boudreault et al. mesurèrent *in vitro* le  $K_i$  du prosegment de PC1 contre la furine et PC1 et obtinrent respectivement 10 nM et 6nM [14]. Une solution intéressante consisterait à muter les résidus en P1' et P2' du site primaire du prosegment dans le proCT de GV à LE (Figure 19, p.35-A). De cette manière, nous pourrions obtenir du même coup un inhibiteur stable (ni la furine, ni PC5-A, ni PC7 ne reconnaissent les résidus LE en P1' et P2' respectivement si on en croit les études que nous avons menées avec le PDX) et spécifique à PC1. Cependant nous n'avons pas pu tester la capacité de PC1 de cliver le proCT dans le RE, car cette protéase n'est pas active dans



**Figure 19:** Perspectives futures pour l'inhibition de PC1  
FLAG: épitope à des fins de détection immunologique

les cellules FD11 [51] et conséquemment nous ne savons pas si le proCT LE pourrait être coupé dans le RE des cellules AtT20 par PC1. Si c'était le cas nous pourrions plutôt placer un motif de ciblage en N-terminal du prosegment.

Une tactique semblable a déjà donné des résultats prometteurs avec la chloramphénicol acétyltransférase. Tam et al. ont fusionné en N-terminal de cette enzyme les 26 résidus de l'extrémité N-terminale de la POMC et ont découvert que cette fusion permettait à la protéine d'être ciblée vers les granules sécrétoires des cellules Neuro2A [61]. Le motif de ciblage réside en fait dans les résidus D<sup>10</sup>L<sup>11</sup>E<sup>14</sup>L<sup>18</sup> et est stabilisé par deux ponts disulfures. Il a été reconnu que les deux résidus chargés négativement du motif interagissaient avec deux résidus chargés positivement de la CPE. Cette dernière est une enzyme des granules sécrétoires clivant les résidus basiques à l'extrémité C-terminale des protéines maturées par les PCs (section 1.2). En plus de ce rôle dans la maturation des proprotéines, la CPE est un récepteur de triage pour la POMC et la proenképhaline notamment. En interagissant avec celle-ci, les deux prohormones sont entraînées vers les granules [62]. La CPE est elle-même dirigée vers la sécrétion régulée grâce à une hélice  $\alpha$  amphipatique localisée en C-terminal de la protéine. Cette hélice permet à la CPE de résider dans les radeaux lipidiques du RTG, ce qui la dirige par la suite vers les granules [63, 64]. Pour revenir à l'inhibition de PC1, le POMC-pro LE (Figure 19, p.35-A) aurait malgré tout l'inconvénient de dépendre de la CPE pour son ciblage vers les granules, ce qui ne constitue toutefois pas un problème dans les cellules AtT20 puisque la CPE y est exprimée [53].

#### *4.2 Inhibition de PC1 dans les granules sécrétoires: stratégie basée sur le PDX*

Nous avons réussi à exprimer stablement dans les cellules AtT20 le PDX, PDX-CT et PDX-CT LE. Contrairement au proCT ces inhibiteurs sont stables en ce sens qu'ils sont présents dans la cellule majoritairement sous la forme complète.

Nous avons tout de même observé des formes (minoritaires) de 30 et 50 kDa pour le PDX-CT et PDX-CT LE et une de 4 kDa pour le PDX. Les formes de 4 et 30 kDa correspondent probablement à la portion C-terminale de l'inhibiteur clivé dans la boucle réactive. Lorsqu'une serpine (PDX ou autre) entre en contact avec une protéase, elle a la possibilité de former un complexe covalent stable avec celle-ci. Dans ce cas il y aura libération de la région en C-terminale du site de reconnaissance (section 1.3). Chez le PDX cette région ne compte que 36 acides aminés, alors que chez le PDX-CT (LE) elle en compte 171 (CT du PDX + CT de PC1). Ce qui donne approximativement une masse moléculaire de 4 et 30 kDa respectivement. Pour ce qui est du PDX-CT et PDX-CT LE, on constate en plus la présence d'un fragment de 50 kDa (qui n'a pas d'équivalent chez le PDX). Notons qu'il y en a plus quand nous surexprimons PC1 dans les cellules AtT20 (résultats non-montrés). Nous expliquons cela par la présence de plusieurs sites dibasiques dans le corps du PDX qui seraient exploités seulement dans le PDX-CT et PDX-CT LE, car le CT de PC1 déstabiliserait assez le corps du PDX pour rendre accessibles ces sites aux PC1. En effet, il a été montré chez la thermopine, une serpine prokaryote, que le fait de retirer cinq acides aminés dans la région en C-terminal de la boucle réactive éliminait sa résistance à des températures élevées [65]. Ainsi il semble que la région en C-terminal de la boucle réactive soit importante pour la stabilisation de la serpine, d'où la déstabilisation relative du PDX-CT et PDX-CT LE par l'ajout du CT de PC1. Dans un même ordre d'idée, nous avons constaté l'expression beaucoup plus faible du PDX-CT LE par rapport aux autres inhibiteurs dans les clones AtT20. Il est peu probable que cela soit attribuable à un quelconque effet cytotoxique du CT de PC1, puisque le PDX-CT est exprimé au même niveau que le PDX. Il apparaît plutôt que la mutation LE déstabilise le PDX-CT LE. Yu et al. ont découvert que la mutation naturelle  $E^{342} \rightarrow K$  de l' $\alpha 1$ -antitrypsine nuisait à ce point au repliement de la serpine que cette dernière formait des agrégats inactifs dans la cellule [66]. Or, cette mutation se trouve dans la boucle réactive de l' $\alpha 1$ -antitrypsine, ce qui met en évidence l'importance de cette région dans la stabilité des serpines. Comme la mutation LE du

PDX se trouve également dans la boucle réactive, il est possible qu'elle affecte le bon repliement du PDX-CT LE et par la même occasion, l'expression de l'inhibiteur.

Bien que l'idée de fusionner le CT de PC1 au PDX pour l'amener aux granules soit séduisante, cette approche s'est soldée par un échec. Ni le PDX-CT ni PDX-CT LE ne furent dirigés vers la sécrétion régulée comme en témoignent nos expériences de stimulation de la sécrétion régulée par la forskoline. Pourtant cette stratégie avait donné des résultats intéressants avec l'immunoglobuline IgG2b [22]. D'ailleurs, Jutras et al. ont démontré que le ciblage de IgG2b vers la voie régulée grâce au CT de PC1 est dépendant de l'interaction de la protéine de fusion avec les membranes du RTG; quand ils mutaient le CT de façon à ce qu'il ne puisse plus remplir sa fonction de ciblage, l'interaction avec les membranes était aussi compromise [22]. Donc, il est possible que le PDX-CT et PDX-CT LE aient de la difficulté à interagir avec les membranes du RTG, d'où leur absence de ciblage aux granules. Malgré cela, l'idée de fusionner à l' $\alpha$ 1-antitrypsine (de laquelle est dérivé le PDX) un quelconque motif pour la diriger vers les granules n'est pas sans précédent. Glombik et al. réussirent à l'amener dans la voie régulée en la fusionnant en N-terminal *et* en C-terminal à un même motif de ciblage de la chromogranine B (CgB) [67]. Il s'agit d'un motif de 31 acides aminés stabilisé par un pont disulfure. Bien que la ressemblance avec le motif de ciblage de la POMC soit frappante, les deux protéines n'utilisent pas le même mécanisme de ciblage. La POMC ne s'associe pas directement aux membranes du RTG; elle le fait par l'intermédiaire de la CPE. La CgB pour sa part interagit directement avec celles-ci. Glombik et al. remarquèrent donc que l'ajout d'un seul motif de la CgB (en N- ou en C-terminal) n'était pas suffisant pour provoquer l'interaction de l' $\alpha$ 1-antitrypsine avec les membranes du RTG et conséquemment pour la diriger vers les granules [67]. Ainsi il semble que l' $\alpha$ 1-antitrypsine (et par extension le PDX) ait de la difficulté à interagir avec les membranes et c'est sans doute ce qui explique que le PDX-CT et PDX-CT LE ne soient pas ciblés aux granules; un seul motif (en l'occurrence le CT de PC1) n'est pas

suffisant. Bien entendu, reprendre la stratégie de Glombik et al. avec le PDX LE constituerait une alternative prometteuse (Figure 19, p.35-A).

Quoique l'ajout du CT de PC1 au PDX ne le cible pas vers les granules, il était intéressant de poursuivre nos recherches afin de vérifier si la mutation LE rendait le PDX plus spécifique vis-à-vis PC1; quitte à lui trouver par la suite un autre motif de ciblage. Nous avons d'abord constaté que le PDX-CT et PDX-CT LE inhibaient PC1 et PC2 dans la voie constitutive des cellules AtT20. En effet nous vîmes une diminution de la maturation de la POMC en  $\beta$ -LPH et en  $\beta$ -endorphine dans les clones concernés. Comme le PDX-CT bloquait presque aussi bien l'activité de PC1 et PC2 que le PDX, il apparaît que l'ajout du CT au PDX ne déstabilise pas grossièrement la protéine au point de compromettre sa fonction inhibitrice. Bien que nous avons mentionné plus haut que le CT générât assez de chaos dans le PDX pour rendre accessibles aux PCs certains sites de clivage autrement dissimulés dans le corps de la serpine chez le PDX, ce chaos ne semble pas suffisant pour détruire la fonction inhibitrice du PDX-CT et PDX-CT LE. Ainsi fusionner un motif de ciblage en C-terminal du PDX (comme dans le cas du CgB-PDX LE) ne crée pas nécessairement assez de désordre dans la protéine pour l'empêcher d'inhiber les PCs. D'où l'intérêt de poursuivre avec cette approche. Pour ce qui est de la spécificité du mutant LE, nous devons admettre que la dite mutation est impuissante à empêcher l'inhibition de PC2. Bien qu'il semble qu'à faible concentration (dans le clone 6) le PDX-CT LE inhibe moins bien PC2 que PC1, cela n'est sûrement pas dû à la mutation LE. Jean et al. ont mesuré *in vitro* le  $K_i$  du PDX contre diverses PCs et ont obtenu 260 et 1000 nM contre PC1 et PC2 respectivement [40]. Donc, il est évident qu'en soi le PDX inhibe mieux PC1 que PC2 et nous ne pouvons pas attribuer cette spécificité relative à la mutation LE. De cette manière, si l'expression du PDX ou PDX-CT avait été plus faible dans les clones AtT20, nous aurions sans doute obtenu le même profile d'inhibition que dans le clone 6 du PDX-CT LE. Cette absence de spécificité du mutant LE contre PC1 par rapport à PC2 est étonnante, car Benjannet et al. ont découvert que la prorénine humaine n'était clivée que par PC1; ni la furine ni

PC2 ne reconnaissent ce substrat. Or, le site de clivage est KR↓LT. Benjannet et al. en avaient alors conclu qu'une leucine en position P1' ne pouvait pas être reconnue par la furine ou PC2 [51]. Nos résultats apportent donc un bémol quant à la généralité de leur conclusion. Néanmoins nous ne sommes pas dépourvus de solution quant à ce problème. En effet il a été montré qu'une lysine en position P5 dans un peptide inhibiteur diminuait beaucoup l'inhibition de PC2, tandis que l'inhibition de PC1 demeurait inchangée [27]. De cette manière nous pourrions muter le résidu en position P5 dans le PDX pour augmenter sa spécificité contre PC1 par rapport à PC2.

Les résultats concernant la spécificité du PDX-CT LE par rapport à la furine, PC5-A et PC7 sont plus encourageants. De fait la mutation LE bloque presque totalement l'inhibition de la furine et de PC5-A et elle réduit sérieusement celle de PC7. Ces résultats sont en partie conformes à ceux de Basak et al. [35]. Ils avaient observé qu'un peptide dérivé du SAAS inhibait à différents degrés PC1, PC5-A et PC7. Lorsqu'ils ajoutèrent au dit peptide les résidus LE en position P1' et P2' respectivement, ils constatèrent une baisse drastique de l'inhibition de la furine et PC5-A, mais pas celle de PC1 et PC7. Nous devons donc conclure que l'effet de la mutation LE sur PC7 varie en fonction du contexte dans lequel elle est faite (PDX vs SAAS). Nos résultats à propos de PC7 nous étonnent à un autre égard: le PDX l'inhibe. Jean et al. n'avaient trouvé aucune inhibition de PC7 par le PDX dans leurs essais *in vitro* [40]. Il faut mentionner que nous avons surexprimé le PDX dans les cellules FD11 et de cette façon il est possible que PC7 fut exposée à une concentration de PDX beaucoup plus grande dans nos expériences *ex vivo* que celles employées par Jean et al. dans leurs essais *in vitro* (10-200 nM). Quant à PACE4, nous avons constaté que ni le PDX ni ses dérivés ne bloquent son activité, ce qui est en conformité avec les résultats de Jean et al. cette fois-ci [40].

Malgré ces résultats positifs quant à la spécificité d'inhibition de PC1, une critique demeure: peut-être qu'en faisant subir la mutation LE au PDX nous détruisons sa fonction inhibitrice et que celle-ci est prise en charge dans le PDX-CT

LE par le CT de PC1 en fait. Jutras et al. ont remarqué que la surexpression du CT de PC1 dans les cellules neuro-endocriniennes GH4 engendrait une baisse d'activité de PC1 [68]. Ainsi il est possible que le CT dans le PDX-CT LE inhibe PC1 et PC2 dans les cellules AtT20, mais pas la furine, PC5-A et PC7 dans les cellules FD11. Par conséquent il nous aurait suffi d'exprimer le CT pour obtenir un inhibiteur spécifique de PC1. Nous pouvons heureusement écarter cette critique en soulignant que nous n'avons jamais trouvé d'inhibition de PC1 par le pro\*CT dans les cellules AtT20 (résultats non-montrés). Puisque le pro\*CT a perdu la fonction inhibitrice du prosegment, il ne lui reste plus que le CT pour inhiber PC1. Si ce dernier remplissait à lui seul la fonction inhibitrice dans le PDX-CT LE, le pro\*CT devrait lui aussi inhiber PC1. Or, ce n'est pas le cas. De toute façon l'idée même que le CT puisse agir comme inhibiteur de PC1 est controversée, puisque Lindberg et al. n'ont jamais réussi à inhiber *in vitro* PC1 avec diverses constructions renfermant le CT [27].

#### *4.3 Activité des PCs dans le RE: les implications théoriques pour le modèle d'activation des PCs*

Bien que la stratégie utilisant le proCT comme inhibiteur de PC1 fut un échec, cette construction nous a permis de faire une découverte fascinante: les PCs néo-synthétisées sont actives *en trans* dès leur apparition dans le RE. En effet, nous avons découvert que le proCT est clivé au site primaire du prosegment aussi précocement que dans le RE, tandis que le pro\*CT (et le proCT dans une moindre mesure) est coupé au site secondaire plus tardivement dans la voie sécrétoire (dans le RTG probablement). De plus, nous avons observé que le clivage précoce du proCT était surtout accompli par la furine et PC7. Nous ne pouvons pas attribuer cette maturation à la surexpression des différentes PCs, car la construction est également clivée dans le RE des cellules AtT20 et HK293 par des convertases exprimées endogènement. En somme, ces résultats s'accordent avec les études de dépendance au pH du clivage de peptides dérivés des sites primaire et secondaire du prosegment de la furine.

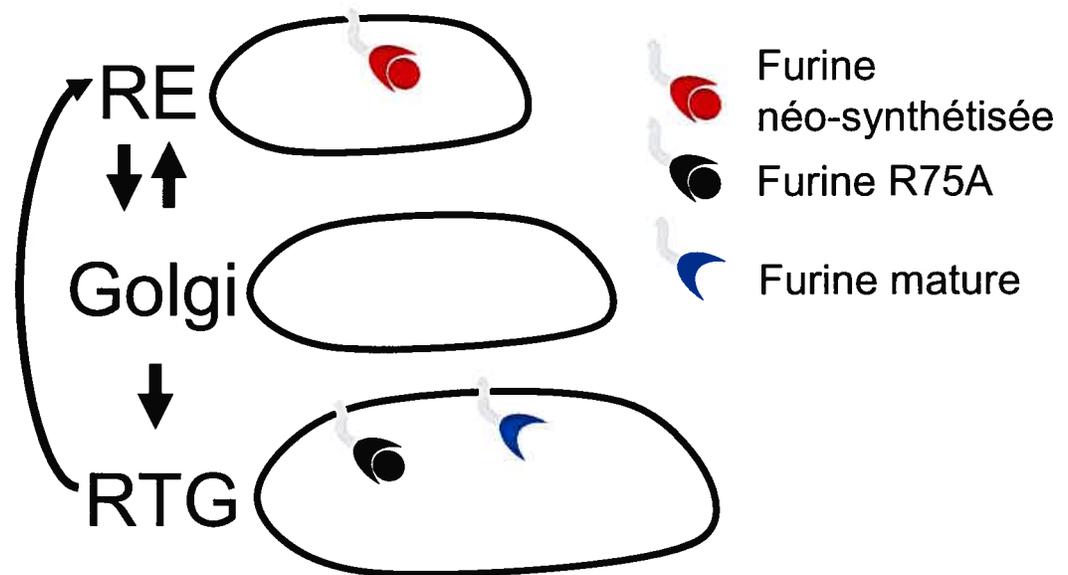
Anderson et al. notèrent qu'un peptide dérivé du site primaire du prosegment de la furine est mieux clivé par cette dernière à pH neutre (comme dans le RE) qu'à pH acide (comme dans le RTG), tandis que c'est l'inverse pour un peptide dérivé du site secondaire [60]. Ainsi, le proCT est clivé aux sites primaire et secondaire dans les mêmes conditions de pH que ces peptides. Remarquons que les sites primaire et secondaire des prosegments de PC1 et de la furine se ressemblent beaucoup [38]. Nous pouvons par ailleurs expliquer que la furine et PC7 soient les convertases les plus aptes à cliver le proCT dans le RE en faisant remarquer que ce sont les deux PCs qui ont le pH optimal le plus large (6.0-8.0) [69]. C'est pourquoi elles sont plus susceptibles de fonctionner efficacement dans l'environnement de pH neutre du RE que les autres PCs (qui ne tolèrent qu'un milieu acide comme le RTG).

Nous sommes arrivés à la conclusion que les PCs néo-synthétisées (du moins la furine) sont actives dans le RE sur la base de l'évidence suivante: la furine R75A clive le proCT au site primaire en présence de BFA dans les cellules FD11. Puisque ce mutant de la furine ne peut pas autocliver son prosegment au site secondaire, il ne peut s'en débarrasser. En outre, Anderson et al. ont montré qu'il restait associé stablement à l'enzyme. On ne peut donc pas argumenter qu'une autre protéase l'élimine *en trans* [60]. C'est pourquoi si la furine néo-synthétisée ne pouvait absolument pas être active (en raison de son interaction inhibitrice avec le prosegment), la furine R75A ne le serait pas plus. Or, cette dernière put couper le proCT dans le RE, ce qui suggère fortement un déplacement du prosegment par notre construction. En extrapolant nous pouvons croire que le proCT puisse en faire autant avec le prosegment de la furine de type sauvage. Une critique demeure pourtant: rien ne nous confirme que la furine R75A n'a pas d'abord transité par le RTG avant d'être rétrogradée vers le RE, où fut déplacé son prosegment. Un tel trafic est possible en effet; Cole et al. ont déjà mis en évidence par exemple la rétrogradation de la protéine virale VSVGtsO45 du RTG vers le RE [59]. Comme la furine subit la maturation finale de ses oligosaccharides dans le Golgi tardif (ajout d'acides sialiques) [60], peut-être que cette modification post-traductionnelle est nécessaire pour l'activité de

la convertase. Il en découle que c'est seulement en transitant par le RTG que la furine R75A pourrait être active dans le RE (Figure 20, p.43-A). Nous pouvons réfuter cette argumentation en analysant les résultats de Bissonnette et al. [70]. Ils mutèrent plusieurs résidus du prosegment de la furine et constatèrent que certains mutants n'étaient pas sécrétés (ils restaient pris dans le RE et par conséquent ils ne pouvaient atteindre le RTG). Cependant ces mutants n'étaient pas inactifs, car ils parvenaient à maturer le précurseur du facteur de von Willebrand. Il apparaît alors que la furine néo-synthétisée (celle qu'on trouve dans le RE associée à son prosegment) est active. Ces résultats viennent donc appuyer notre interprétation à propos de l'activité de la furine R75A.

À notre connaissance il n'a jamais été rapporté que les PCs néo-synthétisées sont actives dans le RE. Bass et al. ont bien trouvé que la furine clive un mutant du pro-récepteur de l'insuline dans ce compartiment, mais ils n'ont pas tenté de déterminer l'origine de cette activité protéolytique (rétrogradation de la furine mature ou activité de la furine néo-synthétisée) [58]. D'autre part, Anderson et al. ont observé que la furine R75A n'est pas active *in vitro*, d'où leur conclusion qu'un des rôles du prosegment est de retarder l'activation de la furine (et des autres PCs par extension) [60]. Nous devons souligner qu'Anderson et al. n'ont pas du tout employé la même méthodologie que nous pour mesurer l'activité de la furine R75A. Ils isolèrent des extraits membranaires de cellules BSC40 exprimant le mutant de la furine et mesurèrent *in vitro* l'activité de ces préparations à l'aide d'un térapeptide fluorogénique. Ainsi, nous pouvons supposer que ce peptide n'était pas un substrat assez imposant pour déplacer le prosegment de la furine R75A contrairement au proCT ou au précurseur du facteur de von Willebrand.

Ces divergences remettent sérieusement en question le modèle d'activation des PCs développé par G. Thomas (section 1.3). De fait G. Thomas a élaboré son modèle uniquement sur la base d'expériences *in vitro*. Pour ce faire il a exprimé la furine R75A ou la furine KDEL dans les cellules BSC40 et en a extrait une activité



**Figure 20:** Trafic intracellulaire de la furine de type sauvage et de la furine R75A

spécifique qu'il a mesurée *in vitro* comme nous l'avons décrit précédemment. La furine KDEL correspond à une forme soluble de la furine (non-membranaire) pourvue en C-terminal d'un motif de rétention au RE (section 1.2). Ayant constaté que ces deux mutants de la furine ne sont actifs *in vitro* qu'après avoir subi une digestion partielle à la trypsine, il en arriva à la conclusion que l'étape clé dans l'activation de la convertase est l'autoclivage de son prosegment au site secondaire. Ainsi la trypsine vint débarrasser les deux furines mutantes de leur prosegment: la furine R75A était incapable de procéder elle-même à son élimination à cause de la disparition du site secondaire et la furine KDEL, à cause de la non-exposition de l'enzyme aux conditions de pH acide du RTG [71]. Or, puisque que nous avons montré que la furine R75A est active *ex vivo*, cela détruit ce modèle selon lequel il est nécessaire que la convertase élimine d'abord son prosegment pour être active. La conséquence ultime de cette négation est que le prosegment n'a pas de rôle à jouer comme régulateur de l'activation des PCs. Bien sûr on nous répondra que la surexpression *ex vivo* du prosegment conduit à l'inhibition de sa convertase, mais notons qu'il s'agissait bien d'expériences au cours desquelles le prosegment était surexprimé [36, 37]. Rien ne nous indique qu'à un niveau d'expression stochiométrique, il inhibe significativement sa PC. Néanmoins cette interprétation provocante du rôle du prosegment se prête à deux critiques. En premier lieu, pour observer l'activité des convertases dans le RE, nous avons dû surexprimer un substrat (tout comme Bissonnette et al.) et rien ne nous assure qu'un substrat exprimé au niveau *endogène* puisse aussi déplacer le prosegment des enzymes. Deuxièmement, la mutation R75A dans le prosegment de la furine ou les autres faites par Bissonnette et al. peuvent affaiblir l'interaction prosegment/convertase et rendre ainsi plus facile le déplacement du prosegment par un quelconque substrat. Malgré tout il est tentant de spéculer que le prosegment n'a de fonction que celle de chaperone intramoléculaire pour sa convertase (du moins dans le RE).

Si le prosegment n'est pas un régulateur de l'activation des PCs, la question est de savoir qu'est-ce qui empêche ces enzymes de cliver la majorité de leurs

substrats dans le RE. Qu'est-ce qui fait en sorte que la majorité des substrats ne peuvent déplacer le prosegment du domaine catalytique dans le RE? Les résultats de Bergeron et al. sont à ce sujet très éclairants [72]. Ils découvrirent qu'un peptide dérivé de la prointégrine  $\alpha 4$  est mieux clivé par la furine à pH acide que neutre, mais lorsqu'ils mutèrent l'histidine (P6) de ce peptide en arginine la maturation se faisait mieux à pH neutre. Ainsi, selon les propriétés d'un substrat, le pH fera en sorte qu'il sera clivé dans un compartiment intracellulaire plutôt qu'un autre. Nous émettons donc l'hypothèse que le pH régule l'activité des PCs en modifiant les propriétés de leurs substrats, ce qui affecte en conséquence leur affinité pour ces enzymes ( $K_m$ ). Le clivage du prosegment au site secondaire dans le RTG ne constituerait donc qu'une maturation d'un substrat par les convertases. Le modèle classique prévoit que le dit  $K_m$  diminue dans le RTG suite à l'autoélimination du prosegment des PCs (c'est un inhibiteur compétitif). Nous croyons plutôt que cette baisse du  $K_m$  dans le RTG est attribuable à la possibilité que le pH agisse sur les substrats en modifiant leurs caractéristiques. Par exemple, le pH acide du RTG pourrait amener les histidines des substrats à acquérir une charge positive, ce qui ferait augmenter l'affinité des substrats concernés pour les convertases. Ou encore le pH acide du RTG pourrait amener les substrats à exposer leur site PC, dissimulé à l'intérieur de la protéine au pH neutre du RE. Si ces substrats au pH neutre du RE avaient la charge électrique ou la conformation appropriées, ils pourraient déplacer le prosegment des convertases dans le RE et ainsi y être coupés. Le pH contrôle alors l'activité des PCs en agissant sur les substrats plutôt que sur les enzymes. La majorité des substrats seraient donc clivés dans le RTG au lieu du RE à cause d'un changement des propriétés des dits substrats provoqué par le pH acide du RTG. Ce changement diminuerait le  $K_m$ . Spécifions que ce nouveau modèle d'activation des PCs s'applique surtout à la furine et PC7. Puisque *in vitro* celles-ci ont un pH optimal assez large (6.0-8.0) [69], cela fait en sorte qu'elles peuvent mieux s'adapter à l'environnement de pH neutre du RE que les autres PCs, comme en témoignent d'ailleurs nos résultats relatifs au clivage du proCT dans le RE des cellules FD11 par diverses convertases.

À la défense de ce nouveau paradigme, nous pouvons revenir sur le cas du prorécepteur muté de l'insuline [58]. Une mutation ponctuelle hors du site de clivage par la furine fait en sorte qu'il est retenu dans le RE. Cependant la furine parvient à le cliver dans ce compartiment intracellulaire, alors qu'elle ne mature le prorécepteur de type sauvage que dans le RTG. Dans la mesure où la furine néo-synthétisée n'est pas active en raison de son interaction inhibitrice avec le prosegment, ce résultat de Bass et al. est totalement mystérieux. Par contre dans la perspective de notre modèle, il est facilement explicable. En effet, la mutation dans le prorécepteur a pu empêcher la protéine de se replier correctement et par conséquent, le site PC normalement caché dans la protéine de type sauvage lorsqu'elle est encore dans le RE a pu être exposé au solvant précocement. Ainsi le prorécepteur muté a pu déplacer le prosegment de la furine, ce qu'est incapable de faire le prorécepteur de type sauvage. Il en résulta le clivage du mutant dans le RE par la furine néo-synthétisée.

Quoique séduisant, notre modèle nous impose d'abord de vérifier si la furine néo-synthétisée pourvue d'un prosegment de type sauvage peut couper des substrats exprimés à un niveau endogène dans le RE. Pour ce faire, nous pourrions examiner si la furine KDEL (dotée d'un prosegment de type sauvage et qui reste dans un état néo-synthétisé à perpétuité) est capable de maturer *ex vivo* des substrats des PCs exprimés endogènement. Dans un deuxième temps, il faudra vérifier si l'incapacité de la furine à cliver certains substrats dans le RE est bien dépendante du pH. En effet si ces substrats ne sont pas plus capables de déplacer le prosegment de la furine dans le RTG que dans le RE, cela signifie que le prosegment a effectivement un rôle à jouer comme frein à l'activation de la convertase. Il s'agira alors tout simplement d'étudier la maturation des substrats non-clivés dans le RE par la furine R75A en présence et en absence de BFA. S'ils peuvent déplacer le prosegment de l'enzyme mutante qu'en absence de BFA (et être coupés), nous pourrions donc en déduire que *tous* les substrats (clivés dans le RE ou ailleurs) peuvent être coupés par la furine encore complexée non-covalentement à son prosegment et que cette capacité qu'ont les substrats à

déplacer le prosegment est de fait dépendante du pH. Notre modèle sera donc confirmé.

## Chapitre V: Conclusion

Les résultats à propos de la mutation LE du PDX sont sans contredit les plus prometteurs. En effet cette mutation rendit le PDX spécifique à PC1 et PC2; ni la furine ni PC5-A ne sont inhibées par le PDX-CT LE et PC7 voit son inhibition sérieusement compromise par cette mutation. Cependant il faudrait rendre le PDX spécifique qu'à PC1. Pour ce faire nous pourrions muter l'acide glutamique en P5 en lysine de manière à briser l'inhibition contre PC2. Malheureusement nous n'avons pas réussi à cibler le PDX vers les granules. Le CT de PC1 ne fut pas un motif approprié dans ce cas, sans doute à cause d'un défaut du PDX à interagir avec les membranes du RTG. Nous pourrions pallier à cette déficience en remplaçant le CT de PC1 par un motif de la CgB. Il a été montré que cette stratégie fonctionne avec l' $\alpha$ 1-antitrypsine, serpine de laquelle est dérivé le PDX.

Par ailleurs nos résultats nous ont amenés sur une voie totalement inattendue: la remise en question du modèle d'activation des PCs développé par G. Thomas. Contrairement à lui nous avons observé que la furine R75A est active. Cette découverte questionne le rôle admis du prosegment en tant que régulateur de l'activation des convertases, car la présence permanente de celui-ci ne gêne pas l'activité de la furine R75A. Notre hypothèse est que le pH régule l'activité des PCs par le biais des substrats: la plupart des substrats sont clivés dans le RTG parce que le pH acide de ce compartiment intracellulaire favorise leur maturation en agissant sur leurs propriétés (électriques, conformationnelles ou autres). De cette manière, l'autoclivage du prosegment au site secondaire n'est plus un événement décisif dans l'activation des PCs; il ne s'agit que d'une maturation de plus opérée par les convertases. Notons néanmoins que ce nouveau modèle s'applique surtout à la furine et PC7 dans la mesure où ces enzymes ont un pH optimal plus large que les autres convertases (6.0-8.0).

## Bibliographie

1. Kacsóh B (2000); *Endocrine physiology*; McGraw-Hill; 22-4, 32-3, 59-71, 208-10, 490-8, 516-9
2. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K et Watson JD (1994); *Molecular biology of the cell*; Garland publishing; 577-610, 626-633
3. Seidah NG et Chrétien M (1999); Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides; *Brain research* **848**, 45-62
4. Shinde U et Inouye M (2000); Intracellular chaperones: polypeptide extension that modulate protein folding; *Cell and developmental biology* **11**, 35-44
5. Lloyd FD (2001); Carboxypeptidases E and D; *The enzymes* **22**, 421-451
6. Blásquez M et Shennan KIJ (2000); Basic mechanisms of secretion: sorting into the regulated secretory pathway; *Biochem. cell. biol.* **78**, 181-91
7. Glombik MM et Gerdes HH (2000); Signal-mediated sorting of neuropeptides and prohormones: secretory granule biogenesis revisited; *Biochimie* **82**, 315-26
8. Dannies PS (1999); Protein hormone storage in secretory granules: mechanisms for concentration and sorting; *Endocrine reviews* **20**, 3-21
9. Tooze SA (1998); Biogenesis of secretory granules in the trans-Golgi network of neuroendocrine and endocrine cells; *Biochimica et biophysica Acta* **1404**, 213-44
10. Seidah NG (2001); Cellular limited proteolysis of precursor proteins and peptides; *The enzymes* **22**, 237-58
11. Rouillé Y, Duguay SJ, Lund K, Furuta M, Gong Q, Lipkind G, Oliva AA, Chan SJ et Steiner DF (1995); Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases; *Frontiers in neuroendocrinology* **16**, 322-61
12. Molloy SS et Thomas G (2001); Furin; *The enzymes* **22**, 199-235
13. Tangrea MA, Bryan PN, Sari N et Orban J (2002); Solution structure of the pro-hormone convertase 1 pro-domain from *Mus musculus*; *J. mol. biol.* **320**, 801-12

14. Boudreault A, Gauthier D et Lazure C (1998); Proprotein convertase PC1/3-related peptides are potent slow tight-binding inhibitors of murine PC1/3 and Hfurin; *J. biol. chem.* **273**, 31574-80
15. Muller L et Lindberg I (2000); The cell biology of the prohormone convertases PC1 and PC2; *Progress in nucleic acid research* **63**, 69-108
16. Scougall K, Taylor NA, Jermany JL, Docherty K et Shenan KI (1998); Differences in the autocatalytic cleavage of pro-PC2 and pro-PC3 can be attributed to sequences within the propeptide and Asp310 of pro-PC2; *Biochemical j.* **334**, 531-7
17. Lipkind GM, Zhou A et Steiner DF (1998); A model for the structure of the P domain in the subtilisin-like prohormone convertases; *PNAS* **95**, 7310-5
18. Ueda K, Lipkind GM, Zhou A, Zhu X, Kuznetsov A, Philipson L, Gardner P, Zhang C et Steiner DF (2003); Mutational analysis of predicted interactions between the catalytic and P domains of prohormone convertase 3 (PC3/PC1); *PNAS* **100**, 5622-7
19. Zhou A, Martin S, Lipkind G, LaMendola J et Steiner DF (1998); Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases; *J. biol. chem.* **273**, 11107-14
20. Tsuji A, Sakurai K, Kiyokage E, Yamazaki T, Koide S, Toida K, Ishimura K et Matsuda (2003); Secretory proprotein convertases PACE4 and PC6A are heparin-binding proteins which are localized in the extracellular matrix; *Biochimica et biophysica acta* **1645**, 95-104
21. Xiang Y, Molloy SS, Thomas L et Thomas G (2000); The PC6B cytoplasmic domain contains two acidic clusters that direct sorting to distinct trans-Golgi network/endosomal compartments; *Molecular biology of the cell* **11**, 1257-73
22. Jutras I, Seidah NG et Reudelhuber TL (2000); A predicted  $\alpha$ -helix mediates targeting of the proprotein convertase PC1 to the regulated secretory pathway; *J. biol. chem.* **275**, 40337-43
23. Creemers JWM, Usac EF, Bright NA, Van de Loo JW, Jansen E, Van de Ven WJM et Hutton JC (1996); Identification of a transferable sorting domain for the

- regulated pathway in the prohormone convertase PC2; *J. biol. chem.* **271**, 25284-91
24. Blásquez M, Thiele C, Huttner WB, Docherty K et Shennan KIJ (2000); Involvement of the membrane lipid bilayer in sorting prohormone convertase 2 into the regulated secretory pathway; *Biochem. j.* **349**, 843-52
25. Zhou Y et Lindberg I (1994); Enzymatic properties of carboxyl-terminally truncated prohormone convertase 1 (PC1/SPC3) and evidence for autocatalytic conversion; *J. biol. chem.* **269**, 18408-13
26. Coates LC et Birch NG (1998); Differential cleavage of provasopressin by the major molecular forms of SPC3; *J. neurochem.* **70**, 1670-8
27. Cameron A, Apletalina EV et Lindberg I (2001); The enzymology of PC1 and PC2; *The enzymes* **22**, 291-332
28. Taniguchi T, Kuroda R, Sakurai K, Nagahama M, Wada I, Tsuji A et Matsuda Y (2002); A critical role for the carboxy terminal region of the proprotein convertase, PACE4, in the regulation of its autocatalytic activation coupled with secretion; *Biochimical and biophysical research communications* **290**, 878-84
29. Denault JB, Bissonnette L, Longpré JM, Charest G, Lavigne P et Leduc R (2002); Ectodomain shedding of furin: kinetics and role of the cysteine-rich region; *FEBS letters* **527**, 309-14
30. van de Loo JWHP, Creemers JWM, Bright NA, Young BD, Roebroek AJM et Van de Ven WJM (1997); Biosynthesis, distinct post-translational modifications, and functional characterization of lymphoma proprotein convertases; *J. biol. chem.* **272**, 27116-23
31. van de Loo JWHP, Teuchert M, Pauli I, Plets E, Van de Ven WJM et Creemers JWM (2000); Dynamic palmitoylation of lymphoma proprotein convertase prolongs its half-life, but is not essential for trans-Golgi network localization; *Biochem J.* **352**, 827-33
32. Zhu X, Rouillé Y, Lamango NS, Steiner DF et Lindberg I (1996); Internal cleavage of the inhibitory 7B2 carboxy-terminal peptide by PC2: a potential mechanism for its inactivation; *PNAS* **93**, 4919-24

33. Fricker LD, McKinzie AA, Sun J, Curran E, Qian Y, Yan L, Patterson SD, Courchesne PL, Richards B, Levin N, Mzhavia N, Devi LA et Douglass J (2000); Identification and characterization of proSAAS, a granin-like neuroendocrine peptide precursor that inhibits prohormone processing; *J. neurosci.* **20**, 639-48
34. Fortenberry Y, Hwang JR, Apletalina EV et Lindberg I (2002); Functional characterization of proSAAS; *J. biol. chem.* **277**, 5175-86
35. Basak A, Koch P, Dupelle M, Fricker LD, Devi LA, Chrétien M. et Seidah NG (2001); Inhibitory specificity and potency of proSAAS-derived peptides toward proprotein convertase 1; *J. biol. chem.* **276**, 32720-8
36. Zhong M, Munzer JS, Basak A, Benjannet S, Mowla SJ, Decroly E, Chrétien M et Seidah NG (1999); The prosegments of furin and PC7 as potent inhibitors of proprotein convertases; *J. biol. chem.* **274**, 33913-20
37. Nour N, Basak A, Chrétien M et Seidah NG (2003); Structure-function analysis of the prosegment of the proprotein convertase PC5A; *J. biol. chem.* **278**, 2886-95
38. Fugère M, Limperis PC, Beaulieu-Audy V, Gagnon F, Lavigne P, Klarskov K, Leduc R et Day R (2002); Inhibitory potency and specificity of subtilase-like proprotein convertase (SPC) prodomains; *J. biol. chem.* **277**, 7648-56
39. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PGW, Irving JA, Lomas DA, Luke CJ, Moyer RW, Pemberton PA, Remod-O'Donnell E, Salvesen GS, Travis J et Whisstock JC (2001); The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins; *J. biol. chem.* **276**, 33293-6
40. Jean F, Stella K, Thomas L, Liu G, Xiang Y, Reason AJ, Thomas G (1998);  $\alpha$ 1-antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent; *PNAS* **95**, 7293-8
41. Dufour EK, Denault JB, Hopkins PCR et Leduc R (1998); Serpin-like properties of  $\alpha$ 1-antitrypsin Portland towards furin convertase; *FEBS letters* **426**, 41-6
42. Benjannet S, Savaria D, Laslop A, Munzer JS, Chrétien M, Marcinkiewicz M et Seidah NG (1997);  $\alpha$ 1-antitrypsin Portland inhibits processing of precursors

- mediated by proprotein convertases primarily within the constitutive secretory pathway; *J. biol. chem.* **272**, 26210-8
43. Jackson RS, Creemers JWM, Farooqi IS, Raffin-Sanson ML, Varro A, Dockray GJ, Holst JJ, Brubaker PL, Corvol P, Polonsky KS, Ostrega D, Becker KL, Bertagna X, Hutton JC, White A, Dattani MT, Hussain K, Middleton SJ, Nicole TM, Milla PJ, Lindley KJ et O’Rahilly S (2003); Small-intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency; *J. clinical investigation* **112**, 1550-60
44. Zhu X, Zhou A, Dey A, Norrbom C, Carroll R, Zhang C, Laurent V, Lindberg I, Ugleholdt R, Holst JJ et Steiner DF (2002); Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and multiple neuroendocrine peptide processing defects; *PNAS* **99**, 10293-8
45. Dey A, Xhu X, Carroll R, Turck CW, Stein J et Steiner DF (2003); Biological processing of the CART precursors by prohormone convertases, PC2 and PC1/3; *J. biol. chem.* **278**, 15007-14
46. Miller R, Toneff T, Vishnuvardhan D, Beinfeld M et Hook VYH (2003); Selective roles for the PC2 processing enzyme in the regulation of peptide neurotransmitter levels in brain and peripheral neuroendocrine tissues of PC2 deficient mice; *Neuropeptides* **37**, 140-8
47. Steiner DF (2001); The prohormones convertases and precursor processing in protein biosynthesis; *The enzymes* **22**, 163-97
48. Allen RG, Peng B, Pellegrino MJ, Miller ED, Grandy DK, Lundblad J, Washburn CL et Pintar JE (2001); Altered processing of proorphanin FQ/Nociceptin and proopiomelanocortin-derived peptides in the brains of mice expressing defective prohormone convertase 2; *J. neurosci.* **15**, 5864-70
49. Rehfeld JF, Lindberg I et Friis-Hansen L (2002); Progastrin processing differs in 7B2 and PC2 knockout animals: a role for 7B2 independent of action on PC2; *FEBS letters* **510**, 89-93
50. Siegfried G, Khatib AM, Benjannet S, Chrétien M et Seidah NG (2003); The proteolytic processing of pro-platelet-derived growth factor-A at RRKR<sup>86</sup> by

- members of the proprotein convertase family is functionally correlated to platelet-derived growth factor-A-induced functions and tumorigenicity; *Cancer research* **63**, 1458-63
51. Benjannet S, Reudelhuber T, Mercure C, Rondeau N, Chrétien M et Seidah NG (1992); Proprotein convertase conversion is determined by a multiplicity of factors including convertase processing, substrate specificity, and intracellular environment; *J. biol. chem.* **267**, 11417-23
52. Munzer JS, Basak A, Zhong M, Mamarbachi A, Hamelin J, Savaria D, Lazure C, Hendy GN, Benjannet S, Chrétien M et Seidah NG (1997); In vitro characterization of the novel proprotein convertase PC7; *J. biol. chem.* **272**, 19672-81
53. Schiller MR (2000); Genes expressed in the mouse pituitary corticotrope AtT-20/D-16v tumor cell line; *Pituitary* **3**, 141-52
54. Klausner RD, Donaldson JG et Lippincott-Schwartz J (1992); Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure; *J. cell biol.* **116**, 1071-80
55. Heisler S et Reisine T (1984); Forskolin stimulates adenylate cyclase activity, cyclic AMP accumulation, and adrenocorticotropin secretion from mouse anterior pituitary tumor cells; *J. neurochem.* **42**, 1659-66
56. Hook VYH (1998); *Proteolytic and cellular mechanisms in prohormone and proprotein processing*; Landes company; 29-48
57. Gordon VM, Rehmtulla A et Leppla SH (1997); A role for PACE4 in the proteolytic activation of anthrax toxin protective antigen; *Infect immu.* **65**, 3370-5
58. Bass J, Turck C, Rouard M et Steiner DF (2000); Furin-mediated processing in the early secretory pathway: sequential cleavage and degradation of misfolded insulin receptors; *PNAS* **97**, 11905-9
59. Cole NB, Ellenberg J, Song J, DiEuliis D et Lippincott-Scharwtz J (1998); Retrograde transport of Golgi-localized proteins to the ER; *J. cell biol.* **140**, 1-15
60. Anderson ED, Molloy SS, Jean F, Fei H, Shimamura S et Thomas G (2002); The ordered and compartment-specific autoproteolytic removal of the furin

- intramolecular chaperone is required for enzyme activation; *J. biol. chem.* **277**, 12879-90
61. Tam WWH, Andreasson KI et Loh YP (1993); The amino-terminal sequence of proopiomelanocortin directs intracellular targeting to the regulated secretory pathway; *Eur. j. cell biol.* **62**, 294-306
  62. Loh YP, Maldonado A, Zhang C, Tam WH et Cawley N (2002); Mechanism of sorting proopiomelanocortin and proenkephalin to the regulated secretory pathway of neuroendocrine cells; *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **971**, 416-25
  63. Dhanvantari S et Loh YP (2000); Lipid raft association of carboxypeptidase E is necessary for its function as a regulated secretory pathway sorting receptor; *J. biol. chem.* **275**, 29887-93
  64. Zhang CF, Dhanvantari S, Lou H et Loh YP (2003); Sorting of carboxypeptidase E to the regulated secretory pathway requires interaction of its transmembrane domain with lipid rafts; *Biochem. j.* **369**, 453-60
  65. Irving JA, Cabrita LD, Rossjohn J, Pike RN, Bottomley SP et Whisstock JC (2003); The 1.5 Å crystal structure of a prokaryote serpin: controlling conformational change in a heated environment; *Structure* **11**, 387-97
  66. Yu MH, Lee KN et Kim J (1995); The Z type variation of human  $\alpha$ 1-antitrypsin causes a protein folding defect; *Nat. struct. biol.* **2**, 363-7
  67. Glombik MM, Krömer A, Salm T, Huttner WB et Gerdes HH (1999); The disulfide-bonded loop of chromogranin B mediates membrane binding and directs sorting from the *trans*-Golgi network to secretory granules; *EMBO j.* **18**, 1059-70
  68. Jutras I, Seidah NG, Reudelhuber TL et Brechler V (1997); Two activation states of the prohormone convertase PC1 in the secretory pathway; *J. biol. chem.* **272**, 15184-8
  69. Rockwell NC, Krysan DJ, Komiyama T et Fuller RS (2002); Precursor processing by Kex2/Furin proteases; *Chem. rev.* **102**, 4525-48
  70. Bisonnette L, Charest G, Longpré, Lavigne P et Leduc R (2004); Identification of furin pro-region involved in folding and activation; *Biochem. j.* **379**, 757-63

71. Anderson ED, VanSlyke JK, Thulin CD, Jean F et Thomas G (1997); Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage; *EMBO j.* **16**, 1508-18
72. Bergeron E, Basak A, Decroly E et Seidah NG (2003); Processing of  $\alpha 4$  integrin by the proprotein convertases: His at position P6 regulates cleavage; *Biochem. j.* **373**, 475-84
73. Tsuji A, Hashimoto E, Ikoma T, Tanigucchi T, Mori K, Nagahama M et Matsuda Y (1999); Inactivation of proprotein convertase, PACE4, by alpha1-antitrypsin Portland (alpha1-PDX), a blocker of proteolytic activation of bone morphogenetic protein during embryogenesis: evidence that PACE4 is able to form an SDS-stable acyl intermediate with alpha1-PDX; *J. biochem.* **126**, 591-603
74. Kales K-U et Hartmann E (1998); Protein translocation into the endoplasmic reticulum (ER); *Eur. j. biochem.* **254**, 1-5
75. Ellgaard L et Helenius A (2003); Quality control in the endoplasmic reticulum; *Nature reviews* **4**, 181-91
76. Trombetta ES et Parodi AJ (2003); Quality control and protein folding in the secretory pathway; *Ann. rev. cell dev. biol.* **19**, 649-76
77. Barlowe C (2002); COPII-dependent transport from the endoplasmic reticulum; *Curr. op. cell biol.* **14**, 417-22
78. Duben R (2003); ER-to-Golgi transport: COPI and COPII function; *Mol. mem. biol.* **20**, 197-207
79. Ellgaard L, Molinari M et Helenius A (1999); Setting the standards: quality control in the secretory pathway; *Science* **286**, 1882-8
80. Storrie B et Nilsson T (2002); The Golgi apparatus: balancing new with old; *Traffic* **3**, 521-9

