

Université de Montréal

**Étude de l'*Endothelin-converting enzyme-like 1* (ECE1), un nouveau membre de
la famille de l'endopeptidase neutre-24.11 (EPN)**

par

Alexandre Benoit

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

en Biochimie

Décembre, 2004

© Alexandre Benoit, 2004



W
4
U58
2005
v. 179

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
Étude de l'*Endothelin-converting enzyme-like 1* (ECE1),
un nouveau membre de la famille de l'endopeptidase neutre-24.11 (EPN)

présentée par :
Alexandre Benoit
Département de Biochimie
Faculté de Médecine

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Sylvie Mader	présidente du jury
Dr. Guy Boileau	directeur de recherche
Dr. Muriel Aubry	membre du jury
Dr. Joanne Paquin	examineur externe
Dr. Rémy Sauvé	représentant du doyen

Thèse acceptée le :
20 septembre 2005

SOMMAIRE

Les endopeptidases de la famille M13 sont d'importants régulateurs de l'activité peptidergique. Elles ont aussi été identifiées comme étant, via certains inhibiteurs, des cibles putatives pour certaines interventions thérapeutiques. Sept membres de cette famille ont été caractérisés jusqu'à présent : EPN (néprilysine ; aussi connue sous les noms endopeptidase neutre-24.11 et CALLA), ECE-1 et ECE-2 (enzymes de conversion de l'endothéline 1 et 2), PHEX (*phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome* ; autrefois PEX), le complexe antigénique Kell des érythrocytes, SEP/NL1/NEP2 (appelée NEP2 dans le présent travail) et, finalement, ECEL1/DINE (*ECE-like 1/Damage-induced neuronal endopeptidase*)

Les profils d'hydropaticité des séquences déduites des ADNc des membres de la famille M13 prédisent une topologie protéique membranaire de type II avec de courts domaines cytosoliques N-terminaux, suivies par un segment transmembranaire ainsi qu'un large domaine extracellulaire ou ectodomaine d'approximativement 700 acides aminés englobant le site actif des enzymes.

ECEL1 est l'un des nouveaux membres de la famille M13. Elle a été identifiée par clonage d'homologie et fut subséquemment clonée suite à l'observation d'une induction de son expression transcriptionnelle en réponse aux dommages neuronaux. Il a été rapporté que ECEL1 était exprimé spécifiquement dans le système nerveux. Des expériences d'inactivation du gène chez la souris suggère un rôle critique de l'enzyme dans la régulation nerveuse du système respiratoire. Plus récemment, de hauts niveaux d'expression de

ECEL1 furent associés à des tumeurs neuroblastomes présentant un diagnostic favorable de régression spontanée.

ECEL1 est une glycoprotéine de 775 résidus et son ectodomaine englobe les motifs H₆₁₂EXXH (où 'X' peut être n'importe quel acide aminé) et G₆₇₁ENIAD, qui sont des caractéristiques des métallopeptidases à zinc de la famille M13. Plusieurs autres résidus jugés importants pour l'activité enzymatique de l'EPN sont aussi présents chez ECEL1. ECEL1 affiche une identité de 48% avec l'EPN dans les 500 derniers acides aminés, où la vaste majorité des résidus du site actif sont retrouvés.

La localisation cellulaire de ECEL1 est toujours mal définie et son (ses) substrat(s) physiologique(s) inconnu(s). Dans la présente étude, nous avons examiné la biosynthèse ainsi que la distribution sous-cellulaire de ECEL1 dans des cellules HEK-293 (*human embryonic kidney-293*) exprimant cette protéine. Nous démontrons qu'une petite proportion de ECEL1 est transportée à la surface cellulaire et que la vaste majorité des protéines sont présentes dans les RE, où elles sont stables. Une distribution similaire a été observée pour ECEL1 endogène d'hypophyse de souris. De plus, nous identifions les domaines transmembranaire et cytosolique comme étant nécessaires pour la localisation de ECEL1 au RE. Ensuite, nous avons construit une protéine chimérique qui a conduit à la sécrétion de l'ectodomaine de ECEL1 et a facilité sa purification. Utilisant cet ectodomaine purifié, nous avons effectué des essais enzymatiques à l'aide d'un tripeptide synthétique ainsi que plusieurs peptides biologiques reconnues comme étant des substrats de certains des autres membres de la famille M13. Cependant, ECEL1 reste à ce jour une enzyme orpheline. Finalement, nous avons démontré que le gène ECEL1 peut être régulé par certaines conditions physiologiques.

La caractérisation de ECEL1 a progressé lors des cinq dernières années. Bien que plus de questions que de réponses demeurent, le présent ouvrage se veut le rapport de notre contribution aux connaissances actuelles sur cette nouvelle peptidase de la famille M13.

Mots clés :

Métallopeptidases à zinc, biosynthèse, localisation sous-cellulaire, réticulum endoplasmique (ER), *endothelin-converting enzyme-like 1* (ECEL1), expression hétérologue, anticorps monoclonal, activité enzymatique, régulation génique.

ABSTRACT

Endopeptidases of the M13 family are important regulators of neuropeptide and peptide hormone activity. They have also been identified as putative targets for therapeutic intervention using inhibitors. Seven members of this family have been characterized so far: NEP (neprilysin; also known as neutral endopeptidase-24.11 and CALLA), ECE-1 and ECE-2 (endothelin-converting enzymes 1 and 2), PHEX (phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome; formerly known as PEX), the Kell blood group protein, SEP/NL1/NEP2 (designated NEP2 in the present work) and, finally, ECEL1/DINE (ECE-Like 1/damage-induced neuronal endopeptidase).

The hydropathy profiles of sequences deduced from the cDNAs of the M13 family members predict integral-membrane proteins of type II topology, with short N-terminal cytosolic domains, followed by a transmembrane segment and a large extracellular domain or ectodomain of approximately 700 amino acid residues containing the active site of the enzymes.

ECEL1 is one of the newest members of the M13 family. It was first identified by homology cloning, and was subsequently cloned as a transcript whose expression was induced in response to nerve injury. It has been reported to be expressed specifically in the nervous system. Gene disruption experiments in the mouse suggest a critical role of the enzyme in the nervous regulation of the respiratory system. More recently, high levels of ECEL1 expression were associated with neuroblastoma tumors presenting a favourable prognosis of spontaneous regression.

ECEL1 is a 775-amino-acid residue glycoprotein, and its ectodomain harbours the

H₆₁₂EXXH (where 'X' denotes any amino acid) and G₆₇₁ENIAD motifs, which are hallmarks of the Zn²⁺-metallopeptidases of the M13 family. Several other amino acid residues that have been shown in NEP to be important for enzymic activity are also present in ECEL1. Overall, ECEL1 has 48% identity with NEP in the last 500 amino acid residues, where most of the active site residues are located.

Little is known about ECEL1 cellular localization and its physiological substrate(s) still not characterized. In the present study, we have examined the biosynthesis and subcellular distribution of ECEL1 in transfected HEK-293 (human embryonic kidney-293) cells expressing this enzyme. We show that a small fraction of ECEL1 is transported to the cell surface, but that most of the protein is present in the ER, where it is stable. A similar distribution was found for endogenous ECEL1 from mouse pituitary gland. Also, we show that both the transmembrane and cytoplasmic domains are necessary for ER localization of ECEL1. Next, we constructed a chimaeric protein that lead to the secretion of the ectodomain of ECEL1, facilitating its purification. Using this purified ectodomain, we performed an analysis of the enzymatic activity, using a synthetic tripeptide and many biological peptides known to be substrates of some of the other member of the M13 family. Still, ECEL1 remained an orphan enzyme. Finally, we demonstrate that ECEL1 may be under regulation by some physiological conditions.

The characterization of ECEL1 has progressed in the last 5 years. Of course, there are still more questions than answers but the present study contributed greatly to our knowledge of this peptidase of the M13 family.

Key words :

Zinc Metallopeptidases, biosynthesis, cellular localization, endoplasmic reticulum (ER), endothelin-converting enzyme-like 1 (ECE1), heterologous expression, monoclonal antibody, enzymatic activity, gene regulation.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	iii
<i>Abstract</i>	vi
Tables des matières	ix
Liste des tableaux	xvii
Liste des figures	xviii
Liste des abréviations	xxii
Remerciements	xxviii
Dédicace	xxx

CHAPITRE I – INTRODUCTION

1.1 <u>Le modèle membranaire de la mosaïque fluide</u>	1
1.2 <u>Les protéines membranaires</u>	2
1.2.1 Biosynthèse et ciblage des protéines transmembranaires vers le réticulum endoplasmique rugueux	3
1.2.2 Typologie des protéines transmembranaires	3
1.2.3 Protéines à ancrage glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)	6
1.3 <u>Modifications co- et post-traductionnelles des protéines empruntant la voie d'exocytose</u>	7
1.3.1 Repliement et contrôle de qualité	7
1.3.2 Glycosylation	8
1.3.3 Autres modifications post-traductionnelles	9
1.4 <u>Les protéines membranaires et les signaux de localisation cellulaire</u>	12
1.4.1 Signaux de rétention au RER	12
1.4.2 Signaux d'export du RER	13

1.4.3	Signaux de localisation dans l'appareil de Golgi	16
1.4.4	Signaux de localisation au réseau <i>trans</i>-Golgi (TGN)	17
1.4.5	Signaux de ciblage vers les lysosomes	18
1.4.6	Signaux de ciblage vers les endosomes	19
1.4.7	Transport à la membranaire plasmique :	
	le cas de cellules polarisées et/ou spécialisées	19
1.4.7.1	Transport vers la membrane apicale	19
1.4.7.2	Transport vers la membrane basolatérale	20
1.4.7.3	Transport via la voie de sécrétion régulée	21
1.5	<u>Les systèmes de communication intercellulaire via l'intégration peptidergique</u>	23
1.5.1	Maturation peptidique par les peptidases	23
1.5.2	Dégradation de molécules peptidiques	24
1.6	<u>Les enzymes aux fonctions variées : les protéases/peptidases</u>	25
1.6.1	Les zincines	27
1.6.2	Mécanismes général d'action des gluzincines	29
1.7	<u>Les métallopeptidases membres de la famille de l'endopeptidase neutre</u>	29
1.7.1	L'endopeptidase neutre	33
1.7.1.1	Structure protéique de l'endopeptidase neutre	35
1.7.1.2	Activité enzymatique et site actif de l'endopeptidase neutre	38
1.7.1.3	Localisation tissulaire	43
1.7.1.4	Fonctions	44
1.7.1.4.1	<i>Régulation de la tension artérielle et de l'équilibre hydro-sodé</i>	44
1.7.1.4.2	<i>Modulation de la perception de la douleur</i>	46
1.7.1.4.3	<i>Modulation de l'inflammation</i>	47
1.7.1.4.4	<i>Digestion et régulation du transit gastro-intestinal</i>	49
1.7.1.4.5	<i>Différenciation et prolifération cellulaires</i>	50
1.7.1.4.6	<i>L'EPN et la maladie d'Alzheimer</i>	51

1.7.2 Les enzymes de conversion de l'endothéline (ECE)	52
1.7.2.1 ECE-1	54
1.7.2.2 ECE-2	57
1.7.2.3 ECE-3	58
1.7.2.4 Caractéristiques enzymatiques des ECE	59
1.7.3 Le complexe antigénique Kell des érythrocytes	60
1.7.4 PHEX	63
1.7.5 NL 1/SEP/NEP2	66
1.7.5.1 Distribution tissulaire	68
1.7.5.2 Caractéristiques enzymatiques	69
1.7.5.3 Phénotypes associés à la délétion du gène SEP/NL1/NEP2	70
1.7.6 L'Endothelin-converting enzyme-like 1 (ECEL1)	72
1.7.6.1 Caractéristiques de la protéine ECEL1	73
1.7.6.2 Régulation de l'expression du gène ECEL1	74
1.7.6.3 Distribution tissulaire	76
1.7.6.4 Caractérisation enzymatique de ECEL1	77
1.7.6.5 Rôles de ECEL1	78
1.7.6.5.1 <i>Implication de ECEL1 dans le</i> <i>contrôle de la respiration autonome</i>	78
1.7.6.5.2 <i>Implication de ECEL1/DINE dans la</i> <i>survie lors de lésions cellulaires</i>	79
1.7.6.5.3 <i>ECEL1 pourrait être impliquée</i> <i>dans la régulation tumorale</i>	80
1.8 <u>Description du projet de recherche</u>	82

CHAPITRE 2 – MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 <u>Clonage de ECEL1 humain et construction de vecteurs d'expression</u>	84
2.2 <u>Production d'anticorps monoclonaux</u>	85
2.2.1 Construction du vecteur plasmidique	85

2.2.2	Production et purification de l'antigène	85
2.2.3	Immunisation	86
2.2.4	Sélection clonale	86
2.3	<u>Constructions plasmidiques</u>	87
2.3.1	Construction de chimères ECEL1/EPN	87
2.3.2	Construction de la chimère NEP2-ECEL1	88
2.3.3	Construction du mutant ECEL1 C95G/C99G/P100C/F105C	89
2.4	<u>Transfections, culture cellulaire et immunobuvardage</u>	90
2.5	<u>Biotinylation des protéines de la surface cellulaire</u>	92
2.6	<u>Fractionnement sous-cellulaire</u>	93
2.7	<u>Microscopie confocale</u>	94
2.8	<u>Étude de marquage et de chasse (<i>Pulse-chase</i>)</u>	95
2.9	<u>Solubilisation de ECEL1 de l'hypophyse de souris</u>	96
2.10	<u>Production et purification de l'ectodomaine de ECEL1</u>	96
2.11	<u>Hydrolyse de peptides et analyse par chromatographie liquide haute-performance</u>	98
2.12	<u>Immunoprécipitation ECEL1/Calnexine</u>	99
2.13	<u>Immunoprécipitation et immunobuvardage de BiP et ECEL1</u>	100
2.14	<u>Test au glycérol</u>	101

2.15 <u>Régulation de l'expression génique de ECEL1</u>	102
2.15.1 <u>Test d'hypoxie</u>	102
2.15.2 <u>Induction de la réponse des protéines non repliées</u> (<i>unfolded protein response</i>)	102
2.15.3 <u>Extraction d'ARNm des cellules GH3</u>	103
2.15.4 <u>Semiquantification de l'ARNm de ECEL1 par RT-PCR</u>	103

CHAPITRE 3 – RÉSULTATS : ÉTUDE DE LOCALISATION DE L'ENDOTHELIN-CONVERTING ENZYME-LIKE 1 (ECEL1)

3.1 <u>Production d'anticorps monoclonaux de souris</u>	106
3.2 <u>L'anticorps monoclonal 7B6 reconnaît spécifiquement ECEL1</u>	109
3.3 <u>Deux protéines ECEL1, différentes dans leur état de glycosylation, sont présentes dans des cellules transfectées</u>	111
3.4 <u>L'espèce de 105 kDa est présente à la membrane plasmique, alors que celle de 95 kDa est localisée dans le RE</u>	115
3.5 <u>L'ECEL1 endogène montre une distribution à la membrane plasmique ainsi qu'au RE, dans les cellules hypophysaires de souris</u>	119
3.6 <u>L'utilisation d'un chaperon chimique semble influencer le ratio de la localisation sous-cellulaire de ECEL1</u>	121
3.7 <u>Les deux premières cystéines de l'ectodomaine de ECEL1 ne montrent pas un alignement conservé avec les autres membres de la famille de l'endopeptidase neutre, et ce positionnement n'est pas responsable de la rétention/localisation au RE</u>	123
3.8 <u>La protéine ECEL1 de 95 kDa est stable dans le RE</u>	124

3.9 <u>ECEL1 s'associe à la calnexine de manière transitoire dans le RE</u>	127
---	-----

3.10 <u>Les domaines transmembranaire et cytoplasmique de ECEL1 sont impliqués dans la rétention/localisation au RE</u>	131
---	-----

CHAPITRE 4 – RÉSULTATS : PURIFICATION DE L'ECTODOMAINE DE ECEL1 ET ÉTUDE DE SON ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

4.1 <u>Production d'une forme sécrétée de l'ectodomaine de ECEL1</u>	133
--	-----

4.2 <u>Purification de l'ectodomaine de ECEL1</u>	136
---	-----

4.3 <u>Essais enzymatiques</u>	139
--------------------------------	-----

4.3.1 Essais enzymatiques avec le peptide synthétique Z-gly-gly-leu-pNa	139
--	-----

4.3.2 Essais enzymatiques avec des substrats d'autres membres de la famille de l'endopeptidase neutre	140
--	-----

CHAPITRE 5 – RÉSULTATS : ÉTUDE DE LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE ECEL1

5.1 <u>ECEL1 est exprimée de façon endogène dans la lignée cellulaire lactosomatotrope GH3</u>	143
--	-----

5.2 <u>L'expression transcriptionnelle de ECEL1 est influencée par des conditions hypoxiques</u>	145
--	-----

5.3 <u>L'expression transcriptionnelle de ECEL1 est influencée par des conditions provoquant une réponse due à une accumulation de protéines non-repliées (<i>unfolded protein response</i>)</u>	149
--	-----

5.4	<u>L'induction de la réponse due à une accumulation de protéines non-repliées (<i>unfolded protein response</i>) provoque une diminution des niveaux protéiques de ECEL1</u>	150
-----	--	-----

CHAPITRE 6 – DISCUSSION

6.1	<u>Localisation sous-cellulaire de ECEL1</u>	156
6.2	<u>L'effet de l'utilisation d'un chaperon chimique sur la localisation de ECEL1</u>	160
6.3	<u>La stabilité de la structure de la protéine ECEL1 n'est pas en cause dans sa rétention au RE</u>	162
6.4	<u>Identification des déterminants responsables de la localisation de ECEL1 au RE</u>	166
6.5	<u>Production d'une forme sécrétée de ECEL1 et purification</u>	170
6.6	<u>Essais enzymatiques avec l'ectodomaine de ECEL1</u>	172
6.7	<u>Identification d'un tissu et d'une lignée cellulaire exprimant ECEL1 de façon endogène</u>	175
6.8	<u>L'expression transcriptionnelle est influencée par l'induction de la réponse aux protéines non repliées (<i>unfolded protein response</i>)</u>	176
6.8.1	Contrôle de la transcription	177
6.8.2	Contrôle de la traduction	179
6.8.3	ECEL1 et le stress cellulaire	180
6.9	<u>L'expression transcriptionnelle de ECEL1 est influencée par des conditions hypoxiques</u>	181

6.10 <u>Perspectives et conclusion</u>	185
6.10.1 Étude du mécanisme de rétention de la protéine ECEL1 au réticulum endoplasmique rugueux	185
6.10.2 Caractérisation enzymatique et identification de substrats biologiques	186
6.10.3 Étude de la régulation transcriptionnelle de ECEL1	187
6.10.4 Conclusion générale	188
 BIBLIOGRAPHIE	 189

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 :

<u>Tableau I</u> :	Modifications des protéines empruntant la voie de sécrétion.	11
<u>Tableau II</u> :	Signaux de localisation de protéines membranaires.	22
<u>Tableau III</u> :	Substrats de l'endopeptidase neutre	39
<u>Tableau IV</u> :	Substrats de ECE-1	57
<u>Tableau V</u> :	Substrats de ECE-2	59
<u>Tableau VI</u> :	Substrats de PHEX	66
<u>Tableau VII</u> :	Substrats de SEP/NL1/NEP2	71

CHAPITRE 4 :

<u>Tableau I</u> :	Conditions et peptides utilisés pour les essais enzymatiques	141
--------------------	--	-----

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 :

Figure 1 :	Classification des protéines intégrales membranaires selon leur mode d'insertion dans la membrane	5
Figure 2 :	Représentation schématique de la maturation des sucres N-liés	10
Figure 3 :	Schéma illustrant l'activation (A) ou la dégradation (B) de peptides via la protéolyse	26
Figure 4 :	Classification des métallopeptidase à zinc	28
Figure 5 :	Mécanisme d'action des gluzincines	30
Figure 6 :	(A) Arbre phylogénétique de métallopeptidases et (B) Identité de séquences des membres de la famille de l'EPN (B)	32
Figure 7 :	Alignement des séquences des membres de la famille de l'EPN	34
Figure 8 :	Structure tridimensionnelle de l'EPN	37
Figure 9 :	Modélisation du site actif de l'EPN	41

CHAPITRE 3 :

Figure 1 :	Évaluation des différents antisérums provenant des souris immunisées avec un fragment de ECEL1 comme antigène	107
------------	---	-----

Figure 2 :	L'antisérum de la souris 2 immunisée avec l'antigène ECEL1 reconnaît spécifiquement la protéine dans des lignées cellulaires transfectées HEK293-ECEL1 et LLC-PK ₁ -ECEL1	108
Figure 3 :	Analyse par immunobuvardage de type Western des meilleurs hybridomes, selon le test ELISA	110
Figure 4 :	Spécificité de l'anticorps monoclonal anti-ECEL1 7B6	112
Figure 5 :	Analyse par immunobuvardage des cellules HEK-293 transfectées et exprimant ECEL1	113
Figure 6 :	Biotinylation de ECEL1 sur la surface cellulaire	116
Figure 7 :	Colocalisation de ECEL1 avec la calnexine	117
Figure 8 :	Fractionnement sous-cellulaire de cellules HEK-293 transfectées avec ECEL1	118
Figure 9 :	Analyse par immunobuvardage de ECEL1 endogène d'hypophyse de souris	120
Figure 10 :	Effet d'un chaperon chimique (glycérol) sur la localisation de la protéine ECEL1	122
Figure 11 :	Représentation schématique de la protéine ECEL1 et alignement des séquences protéiques des membres de la famille de l'endopeptidase neutre (EPN) (région N-terminale des ectodomains); Alignement des deux premières cystéines de l'ectodomaine de ECEL1 d'après les autres membres de la famille	125

Figure 12 :	Analyse par immunobuvardage des cellules HEK-293 transfectées et exprimant ECEL1 C95G/C99G/P100C/F105C	126
Figure 13 :	Biosynthèse des protéines ECEL1, PHEX et PHEX mutante	128
Figure 14 :	ECEL1 s'associe de façon transitoire avec le chaperon calnexine, dans le RE de cellules HEK293-ECEL1	130
Figure 15 :	Représentation schématique de protéines chimériques ECEL1/EPN et analyse d'immunobuvardage des chimères ECEL1/EPN	132

CHAPITRE 4 :

Figure 1 :	Représentation schématique de la protéine chimérique NEP2-ECEL1	134
Figure 2 :	Analyse par immunobuvardage de type Western des cellules LLC-PK ₁ transfectées et exprimant NEP2-ECEL1	135
Figure 3 :	Graphique chromatographique de la purification de l'ectodomaine de ECEL1 par FPLC	137
Figure 4 :	Analyse par immunobuvardage de type Western des fractions récoltées suite à la purification par FPLC	138
Figure 5 :	Analyse par HPLC de l'activité enzymatique de ECEL1 avec la substance P	142

CHAPITRE 5 :

- Figure 1 : Identification d'une lignée cellulaire exprimant ECEL1 de façon endogène 144
- Figure 2 : Effet dose-réponse du CoCl_2 sur les niveaux d'ARNm de ECEL1 dans les cellules GH3 147
- Figure 3 : Effet temporel du CoCl_2 sur les niveaux d'ARNm de ECEL1 dans les cellules GH3 148
- Figure 4 : Effet dose-réponse du DTT sur les niveaux d'ARNm de ECEL1 dans les cellules GH3 151
- Figure 5 : Effet temporel du DTT sur les niveaux d'ARNm de ECEL1 dans les cellules GH3 152
- Figure 6 : Effet de la réponse UPR, induite par le DTT, sur les niveaux protéiques de ECEL1 et BiP(GRP78) dans les cellules GH3 154

CHAPITRE 6 :

- Figure 1 : Modèles proposés pour une localisation spécifique de ECEL1 au réticulum endoplasmique rugueux 169
- Figure 2 : Les composantes fonctionnelles de la réponse au stress du RE (mammifères) 178
- Figure 3 : Séquence partielle de la région 5' du gène ECEL1 184

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

α -CGRP :	<i>Alpha-Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
α 1-PDX :	<i>α1-anti-trypsin Portland variant</i>
α MSH :	Alpha-mélanotropine
μ Ci :	MicroCurie
μ g :	Microgramme
μ l :	Microlitre
μ M :	Micromolaire
% :	Pourcentage
\emptyset :	Phi, (Résidu hydrophobe dans ce travail)
$^{\circ}$ C :	Degré celsius
aa :	Acide aminé
A β :	Amyloïde bêta
Abz :	Acide <i>o</i> -aminobenzoïque
ACTH :	<i>Adrenocorticotropic hormone</i>
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
ANP :	<i>Atrial natriuretic peptide</i>
APN :	Aminopeptidase N
APP:	<i>Amyloid precursor protein</i>
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
BDNF :	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BLP:	<i>Bombesin-like peptide</i>
BNP:	<i>Brain natriuretic peptide</i>
C-terminal :	Extrémité carboxy terminale d'un acide aminé ou d'une chaîne polypeptidique (-COOH)
CALLA:	<i>Common acute leukemia lymphoblastic antigen</i>

CCK:	Cholecystokinine
CFTR :	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CHO:	<i>Chinese hamster ovary cells</i>
CK-II :	Caséine kinase II
CNP :	<i>C-type natriuretic peptide</i>
CNTF :	<i>Ciliary neurotrophic factor</i>
COP :	<i>Coat Proteins</i>
CRH:	<i>Corticotropin-releasing hormone</i>
D ₂ O :	Eau deutérée
DD-PCR :	<i>Differential display PCR</i>
DINE:	<i>Damage-induced neuronal endopeptidase</i>
DMEM :	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
dNM:	1-deoxynojirimycine
Dnp :	2,4-dinitrophényl
DTT :	Dithiothreitol
E18.5 :	Embryon de 18.5 jours
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
ECA:	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ECE:	Enzyme de conversion de l'endothéline
ECEL1 :	<i>Endothelin-converting enzyme-like 1</i>
EDDnp :	N-(2,4-dinitrophényl)éthylènediamine
EDTA:	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGF:	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA :	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Endo H :	Endoglycosidase H
EPN:	Endopeptidase neutre-24.11 ou néprilysine
ER :	<i>Endoplasmic reticulum</i> (ou RER)
ERAD:	<i>Endoplasmic reticulum-associated degradation</i>
ERGIC :	<i>ER-Golgi intermediate compartment</i>
ERSE :	Élément de réponse au stress du RE
EST :	<i>Expressed sequence tag</i>

ET:	Endothéline
EPO :	Érythropoïétine
FAK :	<i>Focal adhesion kinase</i>
FGF-23 :	<i>Fibroblast growth factor-23</i>
g :	Gramme
G418 :	Généticine
GDNF :	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GFP :	<i>Green fluorescent protein</i>
GHRH :	<i>Growth hormone-releasing hormone</i>
GIP :	<i>Gastrin inhibitory peptide</i>
Glc :	Glucose
GlcNAc :	<i>N</i> -acétylglycosamine
GLP :	<i>Glucagon-like peptide</i>
GnRH :	<i>Gonadotropin-releasing hormone</i>
GPI :	Glycosyl-phosphatidylinositol
GPX :	Glutathione peroxidase
GRP :	<i>Gastrin-releasing peptide</i>
GST :	Glutathione S-transférase
h :	Heure
HEK :	<i>Human embryonic kidney</i>
HIF :	<i>Hypoxia-inducible factor</i>
HPLC:	<i>High pressure liquid chromatography</i>
HRP:	<i>Horseradish peroxidase</i>
HRPs:	<i>Hypoxia-regulated proteins</i>
IGF-I :	<i>Insulin-like growth factor I</i>
IL-6 :	Interleukine-6
Kb :	Kilo paires de bases nucléotidiques
kDa :	KiloDalton
Kell :	Antigène de surface des érythrocytes
K _m :	Constante de Michaelis-Menten
LDL :	<i>Low density lipoprotein</i>
Leu-enképhaline :	Leucine-enképhaline

LIF :	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LLC-PK ₁ :	<i>Porcine kidney cells</i>
LH :	<i>Luteinizing Hormone</i>
LHRH :	<i>Luteinizing Hormone-Releasing Hormone</i>
mM :	Millimolaire
M :	Mole
M-dNM :	<i>N-Méthyl-1-deoxynojirimycine</i>
Man :	Mannose
MCH :	<i>Melanin-concentrating hormone</i>
MEP :	Métalloendopeptidase
MES :	<i>2-(N-morpholino)ethansulfonic acid</i>
Min :	Minute
ml :	Millilitre
mm :	Millimètre
N-terminal :	Extrémité amino terminale d'un acide aminé ou d'une chaîne polypeptidique (-NH ₂)
NEP :	<i>Neutral endopeptidase-24.11</i> ou néprilysine
NGF :	<i>Nerve growth factor</i>
NL :	<i>NEP-like</i>
nm :	Nanomètre
NPY :	Neuropeptide Y
NT-3 :	Neurotrophine-3
OGP :	<i>Osteogenic growth peptide</i>
ORP :	<i>Oxygen-regulated protein</i>
PACAP :	<i>Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i>
PAGE :	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAMP :	Proadrénomédulline
pb :	Paire de bases nucléotidiques
PBS :	<i>Phosphate buffer saline</i>
PC :	<i>Prohormone convertase</i>
PCR :	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDI :	<i>Protein disulfide isomerase</i>

PHEX :	<i>Phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome</i>
P _i :	Phosphate inorganique
PI3K:	Phosphatidylinositol-3 kinase
PMSF :	Phénylméthylsulfonylfluoride
PNGaseF :	<i>Peptide: N-Glycosidase F</i>
PP _i :	Pyrophosphate inorganique
PPIase :	peptidylprolyl <i>cis-trans</i> isomérase
PTH :	<i>Parathyroid hormone</i>
PTHrP :	<i>Parathyroid hormone releasing hormone</i>
PYY:	Peptide YY
RER:	Réticulum endoplasmique rugueux (ou RE et ER)
RNase :	Ribonucléase
RP-HPLC :	<i>Reverse phase-HPLC</i>
RT-PCR:	<i>Reverse transcriptase-PCR</i>
SDS :	Sodium dodecyl sulfate
SEP:	<i>Secreted endopeptidase</i>
SEPΔ :	SEPdelta
SNC :	Système nerveux central
SOD :	Superoxyde dismutase
SP :	Substance P
Sw:	Swainsonine
<i>t</i> :	Temps
TCA:	Acide trifluoroactétique
TGF :	<i>Transforming Growth Factor</i>
TGN :	<i>Trans-golgi network</i>
TLN :	Thermolysine
TMAO :	Triméthylamine N-oxyde
TNF :	<i>Tumour Necrosis Factor</i>
TRIS :	<i>Tris(Hydroxymethyl)aminomethane</i>
UPR :	<i>Unfolded protein response</i>
UV :	Ultraviolet

v/v :	Volume/volume
VIP:	<i>Vasoactive intestinal peptide</i>
VSG :	<i>Variant Surface Glycoprotein</i>
VSV-G:	<i>Vesicular stomatitis virus glycoprotein</i>
w/v:	<i>Weight/volume</i>
XCE :	<i>X-converting enzyme</i>
XLH:	<i>X-linked hypophosphaemia</i>

REMERCIEMENTS

Voilà une époque qui s'achève... Avec cette thèse se termine dix années à l'Université de Montréal, dont les sept dernières ont été passées dans le laboratoire du Dr Guy Boileau. Les remerciements représentent peu si je considère les sentiments ressentis envers les personnes qui m'ont appuyé, toléré, apprécié ou tout simplement côtoyé tout au long de ce trajet.

Je voudrais remercier le Dr Guy Boileau pour plusieurs choses. Tout d'abord, de m'avoir donné ma chance... de m'avoir donné beaucoup de chances devrais-je dire... Il m'a soutenu et m'a permis de me connaître davantage comme étudiant, comme chercheur et, surtout, comme personne. Je suis heureux d'avoir pu connaître un scientifique rigoureux doublé d'un sympathique chasseur et buveur de Scotch...

Je tiens également à remercier le Dr Luc DesGroseillers, qui a su apporter une dimension intellectuelle très appréciable à mon travail. De plus, j'aimerais remercier le Dr Miguel Vargas qui m'a aidé dans le développement de mes recherches.

Une aide technique efficace est essentielle pour mener à bien un travail de recherches. Pour cela, je tiens à remercier Line Lespérance, Pierre Melançon et Claire Vézina, assistants de recherches compétents et disponibles, ainsi que Louise Cournoyer et Mireille Fyfe pour l'aide avec ces charmantes cellules qui ne poussent pas toujours quand et, surtout, comme on le voudrait.

Je tiens à remercier plusieurs des anciens qui sont passés dans le laboratoire : Sylvain Huard, Dr Mélanie Carpentier-Primi, Nadia Bonvouloir, Caroline Meilleur, Geneviève Hélie, Dr Guillaume Lesage, Galia Ghaddar. Tel l'effet papillon, chaque petit

geste que vous avez posé a eu d'immenses répercussions positives sur moi.

Mais je tiens surtout à remercier les membres de la présente *gang* Boileau-DesGroseillers, qui ont su créer une ambiance dynamique qui m'a, sans aucun doute, aidé à passer à travers cette période. Je remercie aussi Mathieu St-Louis, Catherine Martel, Mathieu Ferron, Dr Jean-Hugues Fournier et Marjolaine Maher-Laporte pour des raisons que je ne pourrais dévoiler ici, faute d'être poursuivi en justice... Mais surtout je remercie mon ami Luc Furic, qui a été une source inépuisable et, surtout, fiable de *partys*, de soirées à dormir sur son sofa, de soirées à parler de science, d'hypothèses, de manip dans euh.. tout environnement favorisant les débats oratoires scientifiques...

À ma famille, plus particulièrement à mes parents Denise et Claude Benoit, je leur exprime mes plus profonds remerciements pour m'avoir aidé, encouragé et soutenu, sans jamais vraiment savoir ce que je faisais, mais en sachant toujours que leur aide m'aiderait à passer à travers cette «épreuve». Merci à ma sœur Caroline et à mon «beau» beau-frère Hugo pour leur compréhension et leur soutien; leur présence m'est très chère et rien ne peut remplacer la famille.

Finalement, à titre de «*cerise sur le sundae*», j'aimerais exprimer ma plus grande reconnaissance à ma femme, (future Dr) Catherine Bourbeau, sans qui cette thèse n'aurait jamais vu le jour. Elle est la plus «FANTASTIQUE» des femmes, pour avoir réussi à m'endurer, à me consoler, à m'encourager, à me féliciter... et à m'encourager encore, tout en ne cessant jamais d'exprimer son amour et sa passion! Mais au-delà de tout, je la remercie d'avoir participé «activement» à l'expérience la plus précieuse et réussie de ma vie jusqu'à présent : notre petite Joséphine!

*À tous les membres de ma famille,
la plus merveilleuse équipe de recherche sur «la vie».*

CHAPITRE 1 – INTRODUCTION

1.1 Le modèle membranaire de la mosaïque fluide

Nous sommes en 1972, le modèle de la mosaïque fluide, tel que proposé par Singer et Nicholson, vient changer la donne des connaissances sur les structures cellulaires : il propose les bicouches lipidiques comme structure de base des membranes biologiques (Singer et Nicholson, 1972). Les cellules ainsi que leurs organites sont enveloppés de ces membranes. Ces bicouches lipidiques possèdent la caractéristique d'être hydrophiles à leurs deux surfaces, et hydrophobes à l'intérieur. Ces membranes ont comme rôle d'agir comme barrière perméable, établissant des compartiments cellulaires distincts et établissant le contact entre la cellule et son environnement.

Ce modèle permet l'existence de protéines qui traversent et s'attachent aux bicouches; elles deviennent ainsi des protéines intrinsèques aux membranes ou, encore, des protéines qui sont attachées d'une part ou d'autre de ces bicouches, devenant des protéines extrinsèques et périphériques. Un mouvement membranaire continu et fluide permet la diffusion des constituants membranaires et l'existence de phénomènes tels le flip-flop, ou le transport actif qui s'explique par la présence de canaux protéiques intrinsèques à ces membranes.

Cette découverte a créé une révolution dont l'ampleur ne s'est jamais estompée. La présence de composantes protéiques dans la membrane permet d'expliquer le transport de molécules (métabolites, ions ou protéines) à travers des canaux ou encore la transmission de

signaux lors de la liaison d'un agoniste à un récepteur. Ceci permet une interaction entre l'environnement de la cellule et son cytoplasme.

1.2 Les protéines membranaires

Les protéines qui sont insérées dans une bicouche lipidique possèdent, dans leur plus simple expression, trois régions distinctes : une région hydrophobe permettant l'intégration de la protéine à la membrane et deux régions hydrophiles de part et d'autre de cette membrane. Ces protéines amphipatiques forment habituellement un domaine fonctionnel globulaire sur au moins un des côtés de la membrane. Certaines chaînes polypeptidiques comportent plus d'un domaine hydrophobe, ce qui implique qu'elles possèdent plusieurs segments insérés dans la membrane.

La quantité et la nature des protéines sont variables selon le type membranaire aussi bien que selon le type cellulaire ou tissulaire. Citons, à titre d'exemple, la membrane de la bordure en brosse du rein qui contient une quantité importante d'endopeptidase neutre, soit 4-5% de la quantité totale des protéines retrouvées dans cette membrane (Kenny, 1977). La proportion de protéines composant les diverses membranes varie aussi : la membrane de myéline, par exemple, est composée de 25 % (en masse) de protéine, alors qu'une membrane impliquée dans la production d'énergie, telle la membrane interne de la mitochondrie ou du chloroplaste, regorge de protéines qui constituent 75% de la masse membranaire. À titre comparatif, la composition moyenne d'une membrane plasmique est de 50% protéines et 50% lipides.

1.2.1 Biosynthèse et ciblage des protéines transmembranaires vers le réticulum endoplasmique rugueux

La quasi totalité des protéines membranaires sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique rugueux où elles acquièrent, de façon co-translationnelle, leur topologie particulière. De manière générale, le ciblage initial de protéines destinées vers la voie de sécrétion nécessite la présence d'un signal d'initiation de transfert, situé en N-terminal de la protéine (*peptide signal*), et qui consiste en une séquence de 15 à 30 acides aminés (N-terminal chargé, domaine central hydrophobe et domaine polaire en C-terminal englobant un site de clivage). Dans le cas d'une protéine sécrétée, cette séquence polypeptidique sera clivée par une peptidase signal dès que l'extrémité C-terminale de la séquence aura complètement traversé la membrane du réticulum endoplasmique rugueux, ou RER (von Heijne *et coll.*, 1984a). La protéine est alors relâchée dans la lumière du réticulum.

1.2.2 Typologie des protéines transmembranaires

Selon la classification de Singer (1990), on distingue cinq types de protéines transmembranaires (figure 1). Les protéines de type I et II comprennent un seul domaine polypeptidique transmembranaire et diffèrent dans leur orientation par rapport à la membrane. Les protéines de type III comportent plusieurs passages transmembranaires et celles de type IV sont formées de multimères de plusieurs sous-unités qui, après assemblage, formeront un canal transmembranaire. Les protéines insérées dans la membrane par un lipide lié de façon covalente à la chaîne polypeptidique sont dites de type V. Des protéines possédant deux types d'ancrages différents ont récemment été décrites (Hitt *et coll.*, 1994). Elles sont ancrées par un ou plusieurs domaines transmembranaires N-terminaux et par un

ancrage glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) C-terminal et ont été désignées comme étant de type VI (Howell et Crine, 1996) (Figure 1).

Dans le cas des protéines à passage(s) transmembranaire(s), un signal hydrophobe – séquence continue de résidus majoritairement hydrophobes – va servir au ciblage vers la membrane du RER. L'environnement dans lequel se situe cette région hydrophobe va contribuer à déterminer l'orientation de la protéine dans la membrane du réticulum. Comme la synthèse protéique par le ribosome se fait toujours du N-terminal vers le C-terminal, on pourrait s'attendre à ce que toutes les protéines comportant un passage transmembranaire soit de type I, impliquant que l'extrémité N-terminale soit dans la lumière du réticulum endoplasmique et que la queue C-terminale soit cytosolique. Or, la présence de quelques résidus chargés positivement du côté N-terminal du segment hydrophobe permet à cette séquence de s'inverser pour voir l'extrémité N-terminale du côté cytosolique (von Heijne et Gavel, 1988).

Il semble donc que la présence d'acides aminés basiques adjacents au segment hydrophobe influence l'orientation protéique ; ces résidus sont habituellement retrouvés du côté cytosolique, alors que les résidus acides se retrouvent généralement du côté luminal de la membrane du RER (Beltzer *et coll.*, 1991 ; Parks *et coll.*, 1989 ; Parks et Lamb, 1991). Deux règles ont été dictées pour prédire l'orientation d'une protéine ancrée. La première, «*positive-inside rule*», spécifie que la région adjacente au segment hydrophobes – les 15 résidus de part ou d'autre du segment possédant le plus de résidus basiques – sera retenue du côté cytoplasmique (von Heijne et Gavel, 1988). La seconde règle, «*charge-difference rule*» tient également compte des 15 résidus adjacents au segment hydrophobe mais la somme des charges de chaque côté doit être déterminée (Arg et Lys= +1, His=+0.5 et Asp et Glu=-1); le différentiel de charge entre l'extrémité C-terminale et N-terminale détermine l'orientation

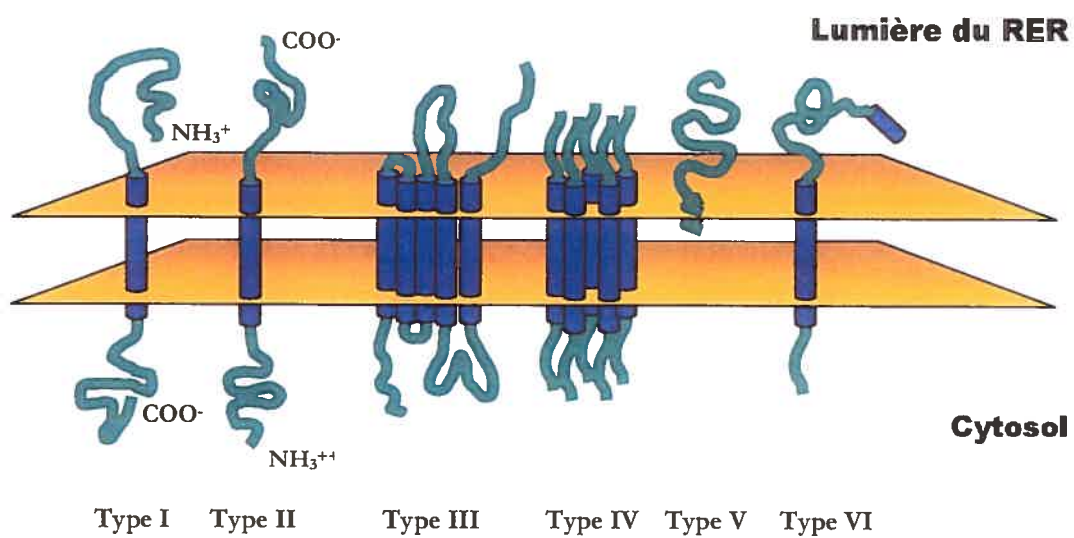


Figure 1 : Classification des protéines intégrales membranaires selon leur mode d'insertion dans la membrane
(D'après Singer (1990) ; Howell et Crine (1996)).

du segment hydrophobe. Alors qu'un résultat négatif ($\Delta(C-N) < 0$) prédit une orientation de type II, l'inverse indique une protéine de type I (Hartmann *et coll.*, 1989).

Concernant les protéines à multiples passages transmembranaires, l'ordre des signaux d'initiation et d'arrêt de transfert successifs sera responsable de l'orientation du polypeptide dans la membrane du RE. Plus spécifiquement, l'orientation du premier passage transmembranaire va jouer le rôle le plus déterminant et les autres vont successivement s'ancrer dans l'orientation opposée au segment précédent pour assurer l'intégration de toutes les régions hydrophobes dans la membrane.

1.2.3 Protéines à ancrage glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)

Au-delà des segments hydrophobes assurant une insertion membranaire, il existe aussi une structure, généralement attachée en C-terminal de certaines protéines, qui permet de lier ces protéines à la membrane. L'ancre glycosyl-phosphatidylinositol (ancre GPI) comprend un oligoglycane complexe lié à un phosphatidylinositol étant lui-même inséré dans la bicouche lipidique. À ce propos, la première protéine étudiée utilisant ce système de liaison membranaire fut la VSG (*Variant Surface Glycoprotein*) (Ferguson et Williams, 1988). L'acide aminé C-terminal de la protéine est lié de façon covalente à une chaîne formée d'une phosphoéthanolamine, de trois mannoses et d'une glucosamine. Ce dernier assure la liaison avec le cycle inositol du phosphatidylinositol inséré dans la bicouche lipidique grâce au caractère hydrophobe des chaînes aliphatiques du diacylglycérol. Le signal C-terminal d'addition de l'ancre GPI comprend une zone relativement polaire de 7 à 14 acides aminés et un domaine hydrophobe de 15 à 20 résidus, pour lequel on ne connaît pas de séquence consensus. Seules la longueur du domaine hydrophobe ainsi que la nature de l'acide aminé situé après le site de clivage déterminent l'ajout de l'ancre GPI (Low, 1989 ; Englund,

1993) ; le résidu auquel l'ancre est ajouté s'avère être un acide aminé à petite chaîne latérale (Gly, Asn, Ala, Ser, Cys). De plus, les deux résidus en amont du site de clivage/addition de l'ancre ont généralement des chaînes latérales de petite taille.

Certaines protéines peuvent utiliser deux types d'ancrage membranaire, un segment hydrophobe intégré dans la membrane (segment transmembranaire) et un ancrage GPI en C-terminal de la protéine, par exemple (Hitt *et coll.*, 1994).

1.3 Modifications co- et post-traductionnelles des protéines empruntant la voie d'exocytose

1.3.1 **Repliement et contrôle de qualité**

Au moins deux classes de protéines semblent impliquées dans la formation de la structure tridimensionnelle des protéines au niveau du RE. La première comprend l'isomérase des ponts disulfures (PDI) et la peptidylprolyl *cis-trans* isomérase (PPIase) (Freedman, 1989). Deux résidus cystéine de différentes parties d'une chaîne polypeptidique mais adjacents dans la structure tridimensionnelle d'une protéine peuvent être oxydés pour former un pont disulfure. Cette réaction requiert un environnement oxydatif et ces ponts ne sont généralement pas retrouvés dans des protéines cytoplasmiques qui baignent dans un milieu essentiellement réducteur. Ces ponts sont, à l'opposé, fréquemment retrouvés dans des protéines empruntant la voie de sécrétion et, chez les eucaryotes, la formation de ces ponts se produit dans la lumière du réticulum endoplasmique, le premier compartiment de cette voie. Ces ponts disulfures stabilisent la structure tridimensionnelle d'une protéine. De même, un pont disulfure peut retenir différentes chaînes polypeptidiques ensemble. Cette

stabilisation se traduit généralement par une moins grande susceptibilité à une dégradation rapide. L'enzyme PDI favorise ces réactions tout en contrôlant et en accélérant, avec PPIase, le repliement des structures (Freedman, 1989; Freedman *et coll.*, 1989).

La seconde classe de protéines englobe les chaperons, qui jouent un rôle stabilisateur de structures dépliées ou partiellement repliées et préviennent l'agrégation de résidus hydrophobes ou, encore, la formation inadéquate d'interactions intra- ou intermoléculaires (Gething et Sambrook, 1992). À titre d'exemple, la calnexine, une protéine résidente du RE s'associe de façon transitoire avec plusieurs protéines durant leur repliement et leur assemblage (Bergeron *et coll.*, 1994). Cependant, l'association de la calnexine peut se prolonger si ces protéines sont mal repliées, et cette association durera jusqu'à ce que ces dernières soient dégradées (Hammond et Helenius, 1995).

1.3.2 Glycosylation

La glycosylation constitue une modification co-translationnelle retrouvée sur une très grande majorité des protéines empruntant la voie de sécrétion (Rothman et Lodish, 1977). On observe chez les eucaryotes deux types de glycosylation : O- et N-glycosylation. La O-glycosylation se caractérise par un oligosaccharide attaché à un groupement hydroxyl d'une sérine ou thréonine, alors que la N-glycosylation, plus commune, est caractérisée par un oligosaccharide attaché au groupement amide d'une asparagine d'un motif Asn-{Pro}-Ser/Thr où {Pro} représente tous les acides aminés, mis à part la proline (Marshall, 1974). Il est à noter que la composition des deux types d'oligosaccharides diffère. Dans les deux cas, il a été proposé que l'ajout de sucres revêtait une importance pour la conformation adéquate de la structure protéique et augmentait aussi la résistance de ces structures protéiques à la dégradation, notamment face aux protéases (Jentoft, 1990 ; Kozarsky *et coll.*,

1988). Alors que la O-glycosylation s'effectue dans la lumière du *cis*-Golgi (Han et Martinage, 1992), la N-glycosylation se fait dans la lumière du RE et la maturation de la structure saccharidique se voit complétée dans la lumière du *cis*-Golgi (Abeijon et Hirschberg, 1990 ; Kornfeld et Kornfeld, 1985). La N-glycosylation serait nécessaire pour assurer une distribution de charges, un repliement et une stabilité adéquate lors de la maturation protéique et ceci semble dépendre de la nature de la protéine (Paulson, 1989). La maturation d'une glycosylation N-liée est illustrée à la page suivante (Figure 2).

1.3.3 Autres modifications post-traductionnelles

D'autres modifications post-traductionnelles sont aussi possibles, telle l'endoprotéolyse au niveau d'une paire d'acides aminés basiques. Cette protéolyse survient préférentiellement en aval d'une paire KR, mais peut aussi se produire au niveau des paires RR et RK, avec peu de clivage suite à des paires KK. Dans certains cas plus rares un simple acide aminé basique, habituellement une arginine, suffit (Benoit *et coll.*, 1987; Devi, 1991; Nakayama *et coll.*, 1992). Il est connu que cette paire de résidus doit se retrouver dans un environnement spécifique formant un tour β , un *random coil* ou un tour Ω (Rholam *et coll.*, 1986; Brakch *et coll.*, 1993). On retrouve généralement un résidu basique en position -2, -4, -6 en amont de la paire dibasique (Beck et Berry, 1990).

On peut assister aussi à une acétylation des résidus N-terminaux par des acétyltransférases. Cette modification peut avoir comme conséquence l'augmentation ou la diminution de l'activité biologique, comme dans le cas de l' α MSH ou de la β -endorphine (Bennett, 1985; Mains *et coll.*, 1983). Cette modification peut aussi servir d'agent protecteur contre l'action de dégradation des aminopeptidases. Plusieurs protéines sont α -amidées à leur extrémité C-terminale. Cette transformation provoquée par la *peptidylglycine α -amidating*

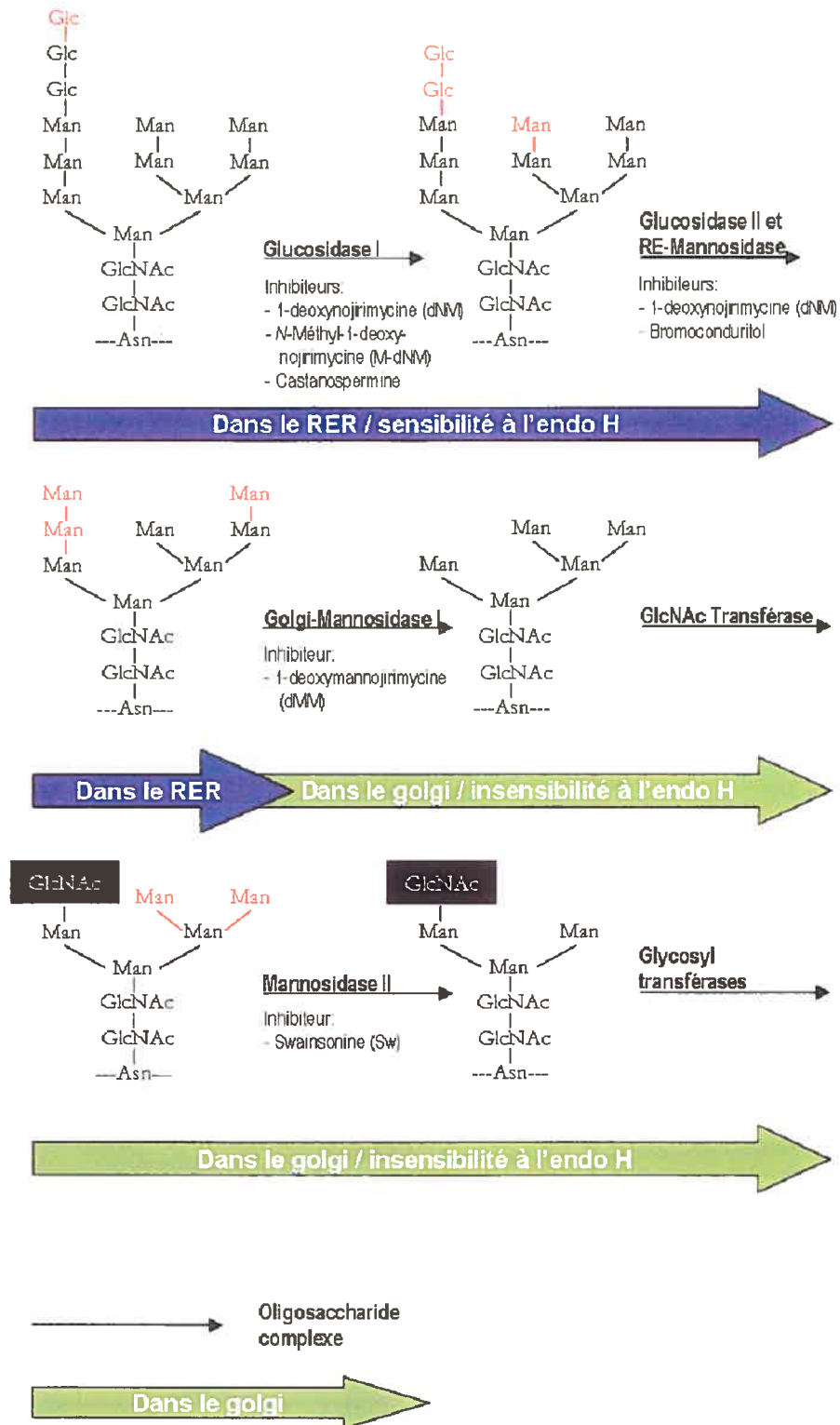


Figure 2 : Représentation schématique de la maturation des sucres N-liés

L'endo H est inactive sur les oligosaccharides qui suivent l'intervention de la golgi-mannosidase I. Man, mannose; Glc, glucose; GlcNAc, N-acétylglucosamine.

monooxygenase, qui convertit un résidu glycine-COOH en amides C-terminales (Eipper *et coll.*, 1992; Eipper *et coll.*, 1993), est souvent essentielle pour l'activité ainsi que la stabilité des peptides. Finalement, la *glutaminyl cyclase* provoque la formation de pyroglutamate par la cyclisation d'une glutamine localisée en N-terminal d'une protéine. Cette modification permet une certaine protection contre une dégradation aminopeptidasique (Pohl *et coll.*, 1991).

Tableau I : Modifications des protéines empruntant la voie de sécrétion.

Organite	Modification
RER	<ul style="list-style-type: none"> - Clivage du peptide signal (pour protéines solubles) - Repliement assisté par des chaperons - Addition de N-glycosylation ([glucose]₃-[mannose]₉-[N-acétylglucosamine]₂) - Formation de ponts disulfure, assistée par la PDI - Hydroxylation de prolines ou lysines par prolyl et lysyl hydroxylases - Oligomérisation - Addition d'ancrage GPI
Golgi	<ul style="list-style-type: none"> - Modifications de N-glycosylations : <ul style="list-style-type: none"> - coupure de mannoses - addition de N-acétylglucosamine, galactose, acide sialique et fucose - O-glycosylation - Sulfatation - Phosphorylation - Endoprotéolyse par endoprotéases - Exoprotéolyse par amino ou carboxypeptidases - Modifications N- et C-terminales: <ul style="list-style-type: none"> - amidation par la <i>peptidylglycine α-amidating monooxygenase</i> - acétylation par la <i>N-Acetyl transférase</i> - formation de pyroglutamate par la <i>N-Glutaminyl cyclase</i>

1.4 Les protéines membranaires et les signaux de localisation cellulaire

La voie de sécrétion agit comme répartiteur et dirige une variété impressionnante de protéines vers le compartiment intracellulaire adéquat ou vers le milieu extracellulaire. Cette livraison se fait à travers une séquence de translocations membranaires dirigées, d'événements de bourgeonnement membranaire et de fusion membranaire guidant les protéines à leur destination ultime. Plusieurs indices indiquent que des éléments de ciblage enfouis dans les structures protéiques sont reconnus par la machinerie de transport intracellulaire (Pelham, 1996). Dans les prochaines pages, nous étudierons les principaux signaux permettant aux protéines transmembranaires d'être aiguillées dans ce capharnaüm.

1.4.1 Signaux de localisation au RER

Des études ont montré que le transport bidirectionnel entre le RER et le Golgi était très dynamique (Ward *et coll.*, 2001), et permettrait aux protéines sécrétées d'avancer dans la voie de sécrétion et aux protéines résidentes du RER d'être récupérées.

Plusieurs types de signaux de retour ont été caractérisés chez les protéines résidentes du RER. En premier lieu, un tétrapeptide carboxyterminal, KDEL, est retrouvé dans la séquence de plusieurs protéines solubles, telles BiP et PDI. Les protéines affichant ce signal peuvent s'échapper du RER, mais sont récupérées par interaction avec des récepteurs reconnaissant le signal KDEL (Munro et Pelham, 1987; Lewis et Pelham, 1990; Lewis *et coll.*, 1990; Semenza *et coll.*, 1990; Vaux *et coll.*, 1990; Tang *et coll.*, 1993), parfois même depuis le réseau *trans*-Golgien (Misenböck et Rothman, 1995). Il convient cependant de noter que ce signal KDEL est généralement retrouvé sur des protéines solubles et non membranaires. En effet, ces dernières exhibent d'autres signaux. Par exemple, les protéines

de type I possèdent, dans leur extrémité C-terminale, un signal formé de deux lysines (KKXX ou KXXKXX, où X peut être n'importe quel acide aminé) (Jackson *et coll.*, 1993). Ce signal peut être dégénéré de sorte que les lysines puissent être remplacées par des arginines. Le caractère basique sert donc de déterminant moléculaire. La calnexine, par exemple, affiche une séquence RKPRRE essentielle à sa localisation (Bergeron *et coll.*, 1994; Rajagopalan *et coll.*, 1994). Certaines protéines de type II possèdent, comme signal de localisation, deux arginines (RR) situées dans les cinq premiers résidus de l'extrémité N-terminale (Schutze *et coll.*, 1994). Des études plus récentes proposent qu'un signal RRR (3 arginines consécutives) soit nécessaire à la localisation, tel que remarqué pour la protéine GIM9 (Hardt *et coll.*, 2003). Cependant, ce signal semble dépendant d'autres facteurs car son transfert sur d'autres protéines n'est pas fonctionnel (Hardt *et coll.*, 2003).

Finalement, il a été rapporté que certaines séquences transmembranaires sont responsables de la localisation au RER. Toutefois, rien n'indique qu'un contenu spécifique en acides aminés soit responsable de cette localisation (Sato *et coll.*, 2003; Parker *et coll.*, 2004).

1.4.2 Signaux d'export du RER

Il existe deux types de vésicules de transport impliquées dans le transport entre le RER et l'appareil de Golgi. Elles sont caractérisées par deux types d'enveloppes différentes, toutes deux formées de sept sous-unités protéiques appelées COPs, et bourgeonnent du RER ou du Golgi (Harter, 1995 ; Rothman et Wieland, 1996 ; Bednarek *et coll.*, 1996 ; Cosson et Letourneur, 1997 ; Nickel et Wieland, 1998). Ce qui distingue les deux enveloppes COPI et COPII, c'est la nature des sous-unités impliquées dans la formation des vésicules respectives. Il semble de plus en plus évident que les vésicules enveloppées

par les sous-unités COPII soient impliquées dans le transport antérograde, c'est-à-dire le transport du réticulum endoplasmique rugueux au compartiment intermédiaire (*ER-Golgi intermediate compartment* ou ERGIC)(Scales *et coll.*, 1997). De l'autre côté, les vésicules COPI seraient responsables du transport antérograde – du ERGIC au Golgi – puis entre les différentes cisternes de l'appareil de Golgi. De plus, les vésicules COPI semblent être les uniques responsables du transport rétrograde, soit du Golgi au RER (Nickel et Wieland, 1998).

Récemment, des signaux d'export du RER ont été identifiés sur des protéines transmembranaires. Ces signaux semblent absents des protéines solubles du RER et il a été proposé que des protéines transmembranaires servent de récepteurs pour les protéines solubles. Différentes approches expérimentales ont montré que pour être intégrées dans les vésicules d'export du RER, les protéines possédant les signaux d'export doivent posséder une affinité de liaison à certaines sous-unités formant le manteau vésiculaire (complexe COPII) (Kuehn *et coll.*, 1998; Aridor *et coll.*, 1998 ; Bi *et coll.*, 2002). Le complexe protéique COPII étant responsable de la formation vésiculaire sur la membrane du RER, il y collecte donc les protéines pour les diriger vers l'appareil de Golgi.

Finalement, la machinerie d'export est dépendante du processus de contrôle de qualité, car les protéines cargos destinées à l'export ne sont apparemment pas reconnues par COPII avant d'être complètement repliées et/ou assemblées (Ellgaard et Helenius, 2003). Plusieurs types de signaux d'export ont été identifiés. Les principaux signaux sont décrits dans les pages qui suivent.

La queue cytoplasmique de la glycoprotéine VSV-G (*vesicular stomatitis virus glycoprotein*) contient une séquence YTDIEM, motif aussi retrouvé dans d'autres protéines membranaires de type I (Nishimura et Balch, 1997 ; Sevier *et coll.*, 2000). Il a été démontré

que le transfert d'une séquence YXDXE sur une protéine quelconque en accélère sa vitesse d'export. Cette séquence est appelée motif diacide ou DXE (Ma *et coll.*, 2001 ; Malkus *et coll.*, 2002 ; Kappeler *et coll.*, 1997) et lierait le complexe de sous-unités Sec23-Sec24 de COPII (Malkus *et coll.*, 2002). La démonstration que le canal Kir possède une séquence FXYENEV importante pour l'export nous force à croire que le motif diacide puisse être dégénéré en conservant son caractère acide (Stockklausner *et coll.*, 2001).

Plusieurs autres protéines exportées ne contiennent pas ce motif; d'autres signaux ont été identifiés. Une paire de résidus hydrophobes, connue aussi sous les noms motif diaromatique ou motif dihydrophobe, permettrait l'export. Une protéine membranaire de type I, ERGIC53 par exemple, contiendrait un tel signal à l'extrémité C-terminale de sa séquence (Kappeler *et coll.*, 1997; Nufer *et coll.*, 2002). Ces résidus lieraient les sous-unités COPII (Kappeler *et coll.*, 1997; Nufer *et coll.*, 2002). D'autres motifs diaromatiques (FF, YY ou FY) sont retrouvées en des positions semblables dans d'autres familles de protéines (Fiedler *et coll.*, 1996 ; Dominguez *et coll.*, 1998; Otte et Barlowe, 2002).

Un autre signal d'export a été identifié plus récemment dans la queue des protéines de la famille ERGIC53 (Sato et Nakano, 2002). Il s'agit d'un motif tyrosine, situé à douze acides aminés du motif d'export d'ERGIC53 mentionné précédemment. Les deux motifs sont requis notamment pour l'export du RER, mais aussi pour d'autres fonctions (Sato et Nakano, 2002).

D'autres mécanismes semblent influencer l'export de protéines. Il a été démontré que l'homodimérisation du récepteur β_2 -adrénergique jouait un rôle important dans l'export et la présence du dimère à la surface cellulaire (Salahpour *et coll.*, 2004).

Il a été aussi observé que la présence d'un résidu phénylalanine à l'extrémité C-terminale de ERGIC-53 semble responsable d'une interaction au complexe COPII, ce qui

suggère une certaine implication dans l'export protéique (Nufer *et coll.*, 2003). Cette phénylalanine peut en outre être remplacée par une valine mais sous une restriction positionnelle (Nufer *et coll.*, 2003). La longueur du domaine transmembranaire semble aussi avoir une incidence sur l'export, vingt-et-un acides aminés s'avérant être la longueur optimale (Nufer *et coll.*, 2003).

Pour conclure, une autre classe de protéines, les glycosyltransférases (résidentes du Golgi), semblent être caractérisées par la présence du signal [R/K](X)[R/K] dans la queue cytoplasmique de ces protéines membranaires de type II (Giraud et Maccioni, 2003). Ce motif dibasique est localisé près du domaine transmembranaire et des expériences de *cross-linking* sur des membranes de microsomes ainsi que des essais de liaison à des peptides immobilisés ont démontré qu'il interagissait avec Sar1, une composante de COPII (Giraud et Maccioni, 2003).

1.4.3 Signaux de localisation dans l'appareil de Golgi

Il semble que la présence d'un court domaine transmembranaire d'environ 17 résidus, ainsi que les résidus environnants, soient les déterminants responsables d'une localisation golgienne (Machamer, 1991; Machamer, 1993; Munro, 1991; Munro, 1995; Nilsson *et coll.*, 1993; Nilsson *et coll.*, 1994; Nilsson et Warren, 1994). Ces domaines transmembranaires effectueraient une ségrégation basée sur l'interaction lipidique dépendante de l'épaisseur de la membrane, de sa composition et de sa rigidité (Munro, 1991; Bretscher et Munro, 1993). Ce mécanisme impliquerait un gradient de cholestérol intégré dans la membrane et ce, à travers l'appareil de Golgi (Bretscher et Munro, 1993; Nilsson et Warren, 1994; Munro, 1995; Simons et Ikonen, 1997). La longueur du domaine

transmembranaire des différentes enzymes déterminerait donc leur distribution à travers l'appareil de Golgi.

Un deuxième mécanisme de localisation golgienne a été proposé. Celui-ci tient compte de l'observation de certaines enzymes du Golgi qui s'associent pour former des oligomères (Nilsson *et coll.*, 1993). Ces oligomères seraient de taille trop importante pour être inclus dans les vésicules de transport et demeureraient donc au Golgi. Les deux mécanismes proposés ne sont pas mutuellement exclusifs, et pourraient aussi bien être complémentaires dans la localisation de protéines membranaires golgiennes (Munro, 1995).

Il existe, dans le Golgi, un transport protéique à contresens où des protéines quittent le TGN – compartiment en aval – pour ensuite revenir dans le Golgi. Le transport de GLUT4 du TGN au Golgi, à titre d'exemple, est contrôlé par un motif dileucine, et la relâche de GLUT4 du Golgi impliquerait une tyrosine ainsi que la séquence PDGND (Pro-Asp-Glu-Asn-Asp) adjacente, à l'extrémité C-terminale (Martinez-Arca *et coll.*, 2000).

1.4.4 Signaux de localisation au réseau *trans*-Golgi (TGN)

Comme le réseau *cis*-Golgi, le réseau *trans*-Golgi est un compartiment spécialisé où les protéines sont confrontées à une ségrégation dans le but de les distribuer adéquatement vers leur lieu de résidence (Orci *et coll.*, 1987). À ce niveau, les protéines se voient offrir une pléiade de destinations : les lysosomes, les endosomes, la membrane plasmique, et les granules de sécrétion dans certaines cellules spécialisées. Contrairement aux protéines résidentes du Golgi, il n'y a pas d'évidence biochimique qu'il y ait de signaux de localisation directs vers ce compartiment; autrement dit, elles circuleraient entre ce compartiment et d'autres régions sous-cellulaires. Cela dit, il semble par contre exister des signaux qui permettent le recyclage de protéines de compartiments en aval du TGN vers ce dernier.

Un bon exemple de cela est la furine : cette protéine possède un signal de recyclage au TGN dans sa queue cytosolique, ressemblant au signal d'internalisation de récepteurs membranaires (Bosshart *et coll.*, 1994; Chapman et Munro, 1994; Molloy *et coll.*, 1994; Jones *et coll.*, 1995; Schäfer *et coll.*, 1995; Takahashi *et coll.*, 1995; Voorhees *et coll.*, 1995). Le signal basé sur une tyrosine consiste en un térapeptide YXXØ (Ø équivaut à un résidu hydrophobe). Ce motif est à la fois nécessaire et suffisant pour la récupération de protéines membranaires, de la surface cellulaire au TGN (Trowbridge *et coll.*, 1993). La mutation de ce signal résulte en une accumulation de ces protéines à la surface.

De plus, un signal dileucine a été caractérisé comme étant un signal d'internalisation (Johnson et Kornfeld, 1992; Stroh *et coll.*, 1999). Finalement, un amas de résidus acides (CPSDSEED) pouvant être phosphorylé sur des résidus sérines par des enzymes homologues à la caséine kinase II (CK-II) (*CK-II-like enzymes*), jouerait un rôle modulateur important dans le recyclage de protéines au TGN (Jones *et coll.*, 1995; Takahashi *et coll.*, 1995; Stroh *et coll.*, 1999):

1.4.5 Signaux de ciblage vers les lysosomes

Les enzymes solubles destinées aux lysosomes possèdent un motif mannose-6-phosphate ajouté aux oligosaccharides de type N-glycosylation. Ce signal est reconnu par deux récepteurs membranaires spécifiques localisés au TGN (von Figura, 1991).

De leur côté, les protéines membranaires (tel que le récepteur mannose-6-phosphate) sont dirigées vers le lysosome par la présence de signaux enfouis dans leur queue cytosolique (Peters *et coll.*, 1990; Johnson et Kornfeld, 1992; Lehman *et coll.*, 1992). Ce signal peut prendre la forme d'un résidu tyrosine entouré de résidus polaires ou basiques (Luzio et Banting, 1993), ou de leucine et/ou isoleucine adjacentes (Johnson et Kornfeld,

1992; Letourneur et Klausner, 1992). Il a été démontré que le ciblage par ces signaux dépend de deux mécanismes distincts et saturables (Marks *et coll.*, 1996).

1.4.6 Signaux de ciblage vers les endosomes

Plusieurs signaux d'internalisation vers les endosomes ont été caractérisés. Ces signaux consistent en une courte série de quatre à six acides aminés formant un tour serré (*tight turn*) (Collawn *et coll.*, 1990; Trowbridge, 1991; Gruenberg et Maxfield, 1995). Un autre signal a aussi été décrit, ressemblant au signal KKXX de retour vers le RER (Itin *et coll.*, 1995).

1.4.7 Transport à la membranaire plasmique : le cas de cellules polarisées et/ou spécialisées

Il a été suggéré que dans les cellules non polarisées, les protéines sans signal spécifique soient envoyées par *défaut*, du TGN à la surface cellulaire. À l'opposé, dans les cellules polarisées, les protéines peuvent être envoyées vers deux types membranaires différents : la membrane apicale ou la membrane basolatérale.

1.4.7.1 Transport vers la membrane apicale

Un signal de transport vers la membrane apicale est l'ancre GPI (Lisanti *et coll.*, 1989; Lisanti et Rodriguez-Boulan, 1990; Simon et Ikonen, 1997). Le ciblage par ce signal pourrait employer un mécanisme similaire à celui utilisé par des protéines de la membrane golgienne, à savoir qu'une association et/ou une agrégation sélective ainsi qu'une interaction avec des glycosphingolipides de la surface apicale permettraient cette localisation (Brown *et coll.*, 1992; Matter et Mellman, 1994; Simons et Ikonen, 1997). Les cellules neuronales

montrent aussi une certaine polarité membranaire, entre leur axone et leurs dendrites. Dans ces cellules, les protéines liées à une ancre GPI ne sont retrouvées que dans les axones (Dotti et Simons, 1990; Dotti *et coll.*, 1991).

Les oligosaccharides N-liés ont été proposés comme signal pour la localisation à la membrane apicale de certaines glycoprotéines dans les cellules épithéliales (Rodriguez-Boulan et Powell, 1992; Fiedler et Simons, 1995; Scheiffle *et coll.*, 1995; Ponnambalam et Banting, 1996). De plus, il a été démontré que la protéine VIP36 pouvait favoriser le transport des protéines O-glycosylées vers la membrane apicale (Fiedler *et coll.*, 1994; Fiedler et Simons, 1995; Fiedler et Simons, 1996).

1.4.7.2 Transport vers la membrane basolatérale

Plusieurs types de ciblage vers la membrane basolatérale ont été décrits. Le premier implique un signal tyrosine similaire à celui impliqué dans l'internalisation de protéines de la surface (Brewer et Roth, 1991; Hunziker *et coll.*, 1991; Mostov *et coll.*, 1992). De même, il semble qu'un motif dileucine soit responsable de la présence de certaines protéines du côté basolatéral (Hunziker *et coll.*, 1991; Matter *et coll.*, 1994). Un autre signal de ciblage basolatéral prend la forme d'une séquence acide de dix-sept acides aminés dans la queue cytosolique de protéines (Casanova *et coll.*, 1991; Maitlin, 1992; Mostov *et coll.*, 1992). Plus récemment, un *loop* cytoplasmique a été proposé comme responsable du ciblage apical/basolatéral de protéines, notamment les transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT5 dans les cellules polarisées CaCo2 (Inukai *et coll.*, 1997).

Jusqu'à aujourd'hui, un seul signal positif a été démontré comme étant nécessaire pour la transcytose (c'est à dire le transport de la membrane basolatérale à la membrane apicale). La phosphorylation d'une sérine dans la queue cytosolique du récepteur

d'immunoglobulines polymériques permet le ciblage de celui-ci à la surface apicale (Casanova *et coll.*, 1990; Casanova *et coll.*, 1991).

1.4.7.3 Transport via la voie de sécrétion régulée

Les cellules neuronales et certaines cellules endocrines possèdent deux voies de sécrétion parallèles du TGN vers la membrane plasmique (Burgess et Kelly, 1987). Alors que toutes les cellules possèdent une voie de sécrétion dite «constitutive», où les protéines qui l'utilise sont envoyées de façon continue, sans quelconque influence, les cellules énumérées ci-haut possèdent aussi une voie de sécrétion dite «régulée», où les protéines sélectionnées pour emprunter cette voie sont généralement emmagasinées dans des granules de sécrétion qui permettent l'exocytose suite à une stimulation (Gumbiner et Kelly, 1982; Rivas et Moore, 1989).

Une étude comparative tridimensionnelle d'extrémités N-terminales de protéines envoyées vers la voie de sécrétion régulée, a permis de considérer une région hélice α pouvant servir de tel motif de ciblage (Gorr et Darling, 1995). Le ciblage d'autres protéines semble dépendre de la présence d'un domaine riche en proline (Stahl *et coll.*, 1996), mais il a été constaté que ce motif n'était pas toujours efficace (Seethaler *et coll.*, 1991).

Sur la page suivante, un tableau des signaux de localisation retrouvés sur les protéines empruntant la voie de sécrétion de la cellule a été incorporé, dans l'intention d'en faire une synthèse (Tableau II).

Tableau II : Signaux de localisation de protéines membranaires.

Fonction du signal	Motif
Rétention au RER	<ul style="list-style-type: none"> - KDEL en C-terminal (protéines solubles et membranaires de type II) - KKXX ou KXXXX du côté cytosolique (protéines membranaires de type I) - RR sur la queue cytoplasmique (protéines membranaires de type II) - RRR sur la queue cytoplasmique - Domaine transmembranaire
Export du RER	<ul style="list-style-type: none"> - Motif diacide (DXE) - Motif dihydrophobe - Motif tyrosine - Homodimérisation - Phénylalanine à l'extrémité C-terminale (jumlée à une glutamine) - Longueur du domaine transmembranaire (21 aa = optimal) - [RK](X)[RK], à l'extrémité C-terminale (protéines membranaires de type II)
Golgi	<ul style="list-style-type: none"> - Courte région transmembranaire (environ 17 aa) (protéines membranaires de type II (et possiblement type I)) - Motif dileucine (TGN au Golgi)
TGN	<ul style="list-style-type: none"> - YXXØ (protéines membranaires de type I) - amas d'acides aminés acides (protéines membranaires de type I) - Signal dileucine (protéines membranaires de type I)
Lysosome	<ul style="list-style-type: none"> - Mannose-6-phosphate (protéines solubles) - Motif cytoplasmique basé sur une tyrosine (protéines membranaires de type I) - Signal dileucine (protéines membranaires de type I)
Surface apicale	<ul style="list-style-type: none"> - Ancrage GPI - Oligosaccharides N-liés - O-glycosylation
Surface basolatérale	<ul style="list-style-type: none"> - Motif tyrosine - Séquence acide dans la queue cytoplasmique - Courte séquence cytoplasmique de type dileucine (protéines membranaires de type I)
Endosomes	<ul style="list-style-type: none"> - β-turn avec un résidu tyrosine, du côté cytoplasmique (protéines membranaires de type I et II) - Motif KKXX-like
Granules de sécrétion	<ul style="list-style-type: none"> - Hélice α hydrophobe en N-terminal - Région riche en proline

1.5 Les systèmes de communication intercellulaires via l'intégration peptidergique

Les organismes supérieurs ont développé des mécanismes complexes permettant une communication efficace et régulée entre leurs divers constituants tissulaires et cellulaires. Des peptides sont souvent utilisés comme inducteurs de réactions physiologiques.

La synthèse et la sécrétion de ces peptides sont effectuées par la cellule émettrice. Suite à leur relâche, ces molécules vont stimuler la cellule cible par le biais de l'association à un récepteur localisé sur la membrane cellulaire. La cellule cible peut parfois être la cellule émettrice (activation autocrine), une cellule environnante (activation paracrine) ou encore une cellule d'un tissu différent (activation endocrine). La liaison du peptide au récepteur déclenche une cascade de signaux intracellulaires ayant pour conséquence d'induire une réponse biologique spécifique.

Un moyen de contrôler ou de moduler la fréquence et l'intensité de cette propagation d'information passe par l'activation et la dégradation de ces messagers. Ce contrôle est confié à plusieurs enzymes, protéases ou peptidases, qui participent à la maturation de peptides – activation de précurseurs biologiquement inactifs en produits actifs – ainsi qu'à la dégradation des molécules actives.

1.5.1 **Maturation peptidique par les peptidases**

Les peptides bio-actifs sont d'abord synthétisés sous forme de précurseurs inactifs. Ces précurseurs peuvent contenir un seul peptide, plusieurs copies du même peptide ou plusieurs peptides différents. Au même titre que toutes les protéines empruntant la voie de

sécrétion cellulaire, la séquence primaire de ces précurseurs protéiques/peptidiques contient une région N-terminale nommée *peptide signal*. Celle-ci permet un ciblage et une translocation dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE), première station de la voie de sécrétion. De manière générale, cette séquence est rapidement clivée par la *peptidase signal* dans le RE. À ce point, la molécule est acheminée dans l'appareil de Golgi pour terminer son voyage, le plus souvent, dans les grains de sécrétion de la voie régulée. Il arrive qu'une maturation protéolytique supplémentaire soit nécessaire lors du passage dans les compartiments en aval du RE (Seidah *et coll.*, 1998 ; Khan et James, 1998 ; Mizuno et Matsuo, 1994). Des protéases à sérine de la famille de la subtilisine, telle la furine, sont en grande partie responsables de cette maturation (voir section 1.3.3). D'autres phénomènes de maturation sont aussi possibles, tels l'acétylation et l'amidation (Seidah, 1995 ; Nakayama, 1997).

Certains peptides, une fois relâchés, se retrouvent tout de même sous une forme biologiquement inactive. Une étape de maturation supplémentaire est donc nécessaire, et il a été démontré que des enzymes de type métallopeptidases à zinc localisées à la surface cellulaire sont impliquées dans cette activité (Turner et Tanzawa, 1997). Nous en verrons plusieurs exemples dans les sections qui suivent.

1.5.2 Dégradation de molécules peptidiques

Tel que mentionné précédemment, un moyen employé par l'organisme pour interrompre un signal peptidergique est d'inactiver le messenger. Alors que certaines protéases s'affairent à hydrolyser un ou plusieurs lien(s) peptidique(s) pour activer ces peptides, le contraire est tout aussi possible, à savoir que des peptidases dégradent des peptides actifs en sous-produits biologiquement inactifs (Turner et Tanzawa, 1997).

L'endopeptidase neutre (voir section 1.7) est très certainement un excellent exemple de ce processus (Crine *et coll.*, 1997). La page suivante illustre les processus de dégradation ou d'activation d'un peptide par une peptidase (Figure 3).

1.6 Des enzymes aux fonctions variées : les protéases/peptidases

Les protéases sont très largement répandues dans la nature, où elles participent à une variété de fonctions physiologiques, certaines étant vitales. De manière générale, les protéases/peptidases (E. C. 3. 4. X. X., *Nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology*, 1972) sont des enzymes hydrolysant des liaisons peptidiques. Les protéases sont subdivisées en deux groupes: endopeptidases et exopeptidases (carboxypeptidases ou aminopeptidases). Toutes les protéases bien caractérisées font partie d'une des quatre familles suivantes: les protéases à sérine, les protéases à cystéine, les protéases à aspartate et les métalloprotéases (Barrett et Rawlings, 1991 ; Rawlings et Barrett, 1993). Cette classification est basée sur la nature du groupe fonctionnel le plus important dans le site actif. Il est intéressant de constater que les membres de mêmes familles sont souvent reliés évolutivement. Les métallopeptidases à zinc, faisant partie du dernier groupe, sont, dans le cadre de notre étude, d'un intérêt beaucoup plus marqué.

En effet, cette catégorie d'enzymes (métallopeptidases à zinc) se caractérise par la présence d'un atome de zinc au site actif de l'enzyme. Cet atome de zinc participe directement au mécanisme catalytique. Ces enzymes possèdent dans leur séquence primaire, une séquence appelée «signature de liaison au zinc» (Joneneel *et coll.*, 1989). Cette séquence est formée des résidus impliqués dans la liaison au zinc, plus l'acide

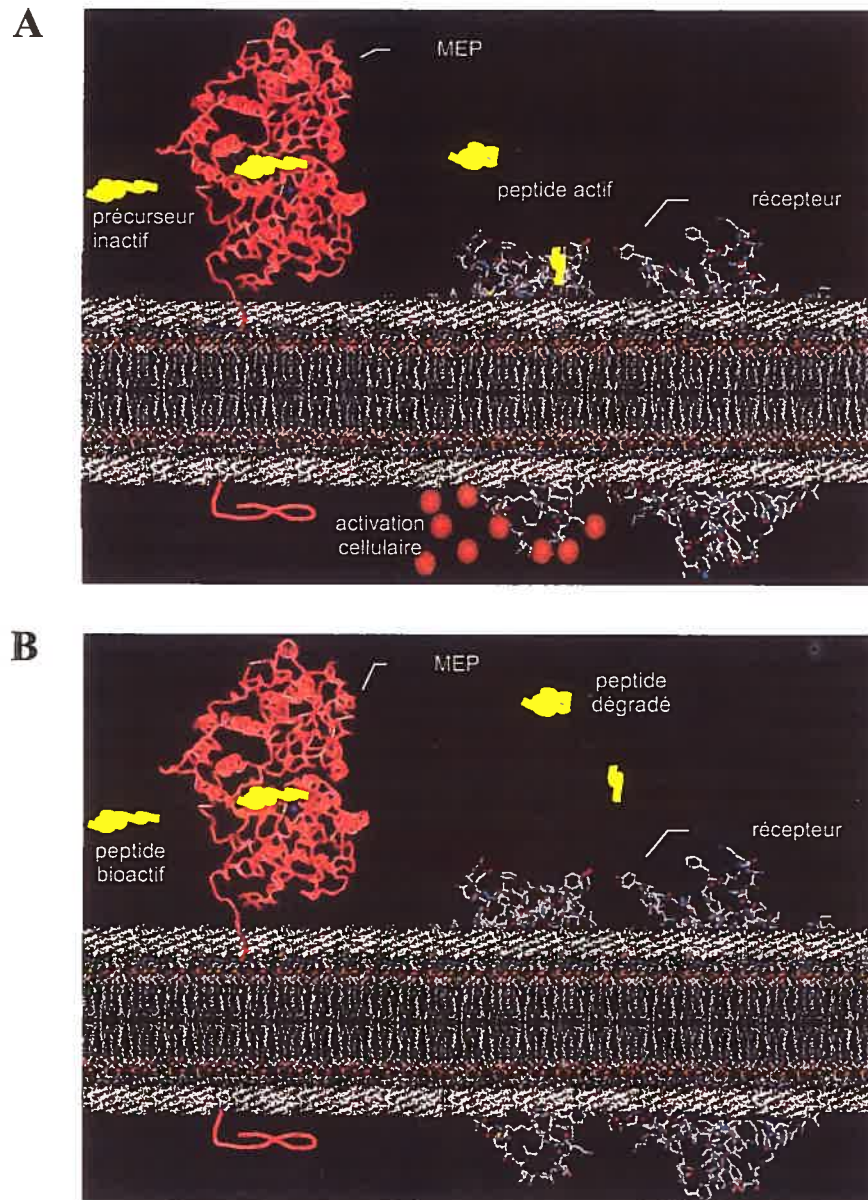


Figure 3 : Schéma illustrant l'activation (A) ou la dégradation (B) de peptides via la protéolyse
A : Représentation de la maturation d'un précurseur inactif (propeptide) en produit biologiquement actif. Suite à cette maturation, le peptide est apte à lier son récepteur. **B :** Représentation de l'arrêt du signal peptidergique par la dégradation d'un produit biologiquement actif en sous-produits inactifs. Ceci empêche la transduction du signal via la liaison au récepteur.

glutamique catalytique (voir section 1.6.2). La nature et l'organisation des résidus formant cette séquence consensus permet une sous-classification additionnelle caractérisant les zincines, les inverzincines, les carboxypeptidases et les DD-carboxypeptidases (Bode *et coll.*, 1993 ; Hooper, 1994). Dans le but d'abrégé le texte, nous n'allons aborder qu'une des classes : les zincines. Cette classe renferme la famille de peptidases pertinente à notre étude. Pour bien situer le lecteur, un tableau synthèse du classement des protéases à zinc est présenté plus loin (Figure 4).

1.6.1 Les zincines

Cette classe est constituée de métallopeptidases possédant un motif signature **HEXXH** (X étant un acide aminé quelconque). Les histidines (**H**) lient l'atome de zinc, alors que l'acide glutamique (**E**) est l'acide glutamique catalytique. Une classification supplémentaire permet de fractionner cette classes en deux sous-groupes, les gluzincines et les metzincines.

Les gluzincines doivent leur nom au troisième ligand de l'atome de zinc, un acide glutamique retrouvé en aval (généralement à 24 à 64 résidus) du motif signature basal (**HEXXH.....E**). Les aminopeptidases, la famille de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, la famille de la thermolysine et finalement, la famille de l'endopeptidase neutre (EPN) forment ce sous-groupe.

Les metzincines sont quant à elles dotées d'une séquence consensus légèrement plus complexe que les gluzincines, **HEBXHXBGBXH**, où *B* représente un acide aminé volumineux non-polaire. Contrairement aux gluzincines, le troisième ligand est une histidine. Le nom provient de la structure *Met-turn* (englobant une méthionine) formée par cette séquence. Les familles des astacines, des serralysines, des reprotolysines (ou

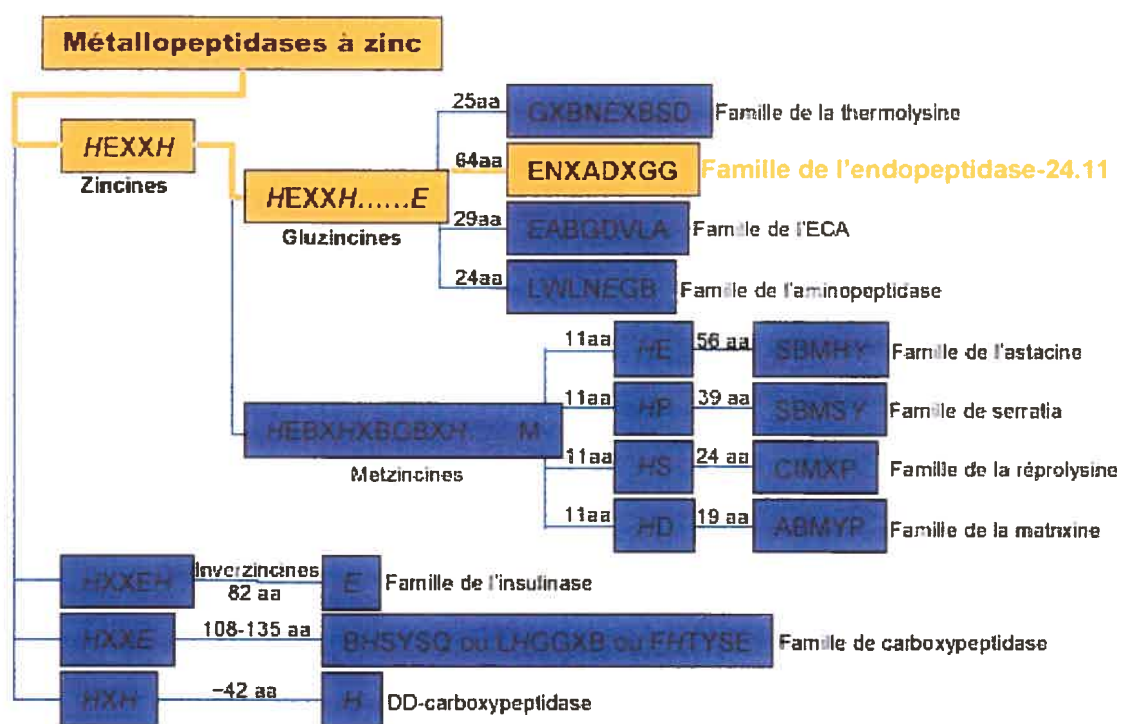


Figure 4 : Classification des métallopeptidase à zinc

adamalysines) et des matrixines forment ce sous-groupe.

1.6.2 Mécanisme général d'action des gluzincines

Les travaux de Matthews (1988) ont permis de comprendre le mécanisme d'action de ces enzymes via l'étude de l'archétype de cette famille, la thermolysine, une enzyme de la bactérie *Bacillus thermoproteoliticus*. Le mécanisme catalytique est représenté à la Figure 5. L'atome de zinc y joue un rôle crucial. En effet, il est retenu au site actif par trois résidus, avec l'ordre préférentiel suivant : histidine>>acide glutamique>acide aspartique ou cystéine (Vallee et Falchuk, 1993).

La catalyse s'amorce par la formation d'une liaison de coordination entre l'atome de zinc et l'atome d'oxygène du groupement carbonyle du lien peptidique ciblé, provoquant le changement d'état du zinc, de tétracoordination à celui de pentacoordination. Ceci induit la polarisation d'une molécule d'eau associée à un acide glutamique du site actif de l'enzyme, appelé acide glutamique catalytique. Cette molécule d'eau polarisée prend alors la forme d'un puissant nucléophile apte à attaquer le carbone du lien peptidique. Finalement, la protonation de l'atome d'azote du lien peptidique provoque la scission de ce lien et un relâchement de deux sous-produits s'ensuit.

1.7 Les métallopeptidases membres de la famille de l'endopeptidase neutre

Entre la découverte, par Kerr et Kenny (1974), de l'endopeptidase neutre et celle de l'ECE-1 purifiée à partir d'une préparation de microsomes de poumons de rats par l'équipe de Takahashi (1993), une vingtaine d'années se sont écoulées. Cette période a permis de

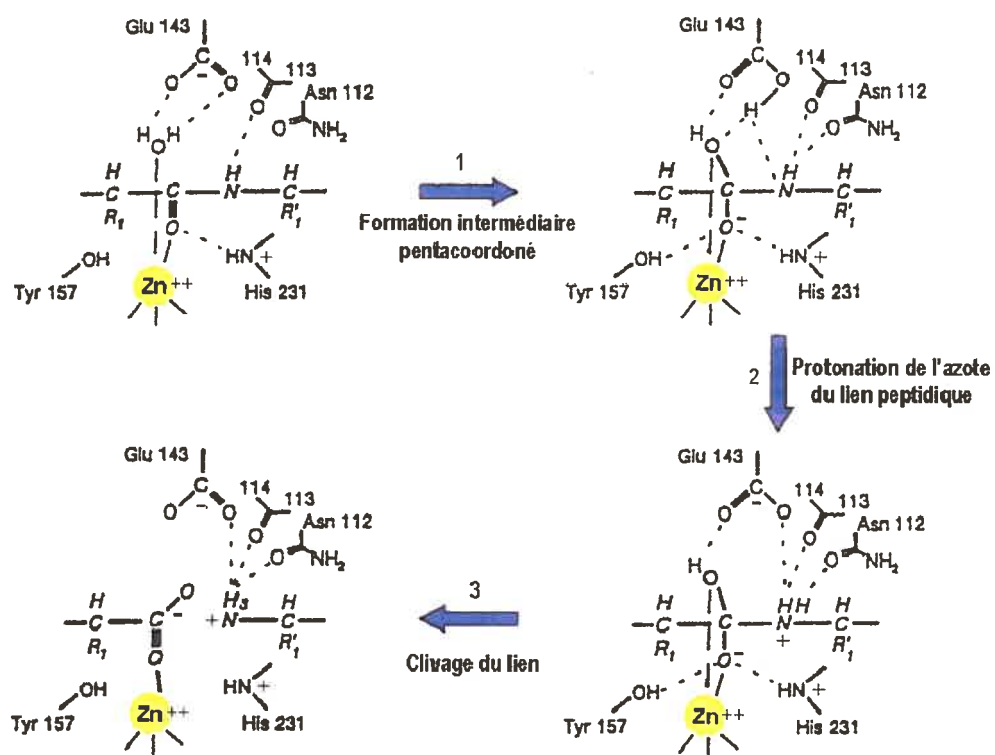


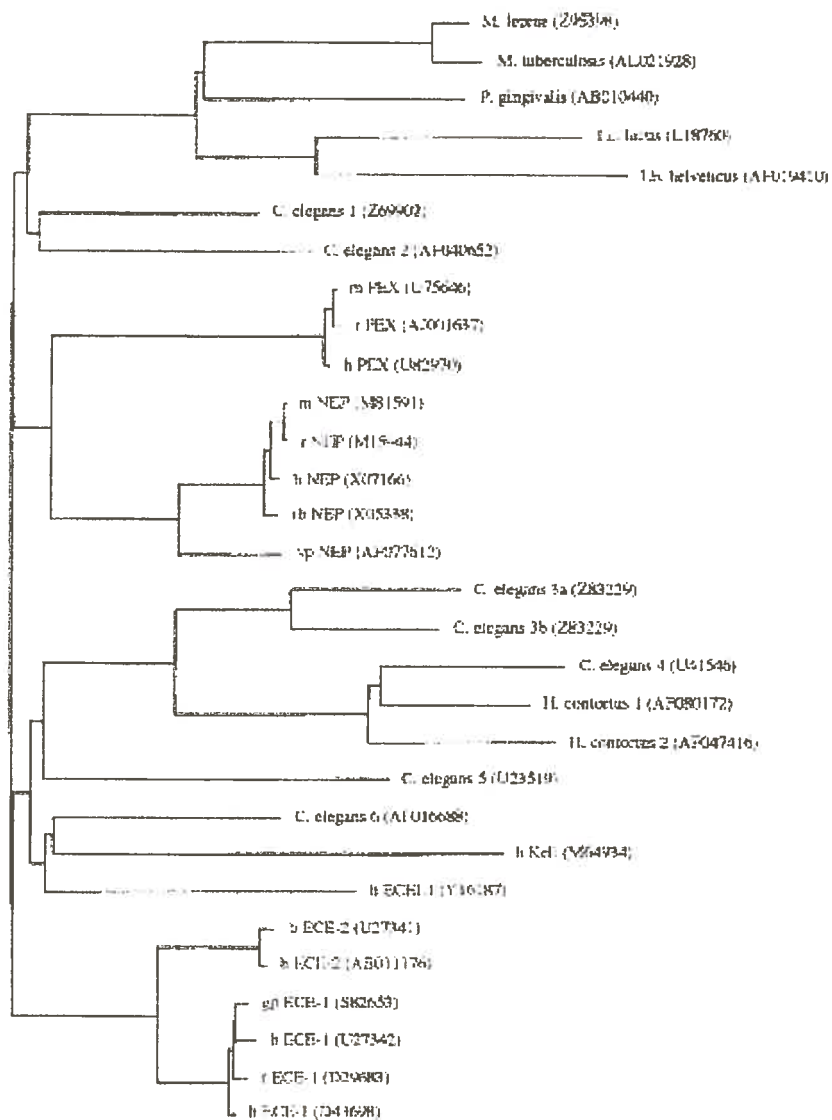
Figure 5 : Mécanisme d'action des gluzincines

Ce schéma illustre le mécanisme d'action général des métallopeptidases à zinc (D'après Matthews, 1998).

caractériser de façon détaillée l'endopeptidase neutre, qui allait devenir le modèle de toute une série de peptidases. Les années 1990 ont marqué l'explosion des connaissances dans ce domaine ; à une plus grande connaissance et une plus profonde caractérisation de ces deux premiers membres se sont ajoutés la découverte et le clonage de nouveaux membres possédant une similarité de séquence impressionnante (Figure 6). À ce jour, cette famille regroupe quelque sept membres : EPN, ECE-1, ECE-2, *le complexe antigénique Kell des érythrocytes*, PHEX, NL1/SEP/NEP2 et, tout dernièrement, ECEL1/DINE. Ce sont toutes des glycoprotéines membranaires de type II, formées d'une courte queue cytoplasmique (N-terminale), d'un domaine transmembranaire et d'un long domaine luminal ou extracellulaire (C-terminal). C'est dans ce dernier domaine que l'activité enzymatique réside.

Au niveau génique, les positions de 11 jonctions exon/intron sont exactement conservées entre au moins cinq gènes (KELL, ECE-1, ECEL1, EPN et PHEX)(Valdenaire *et coll.*, 2000). Ces exons encodent approximativement les 500 derniers acides aminés des enzymes. Cette conservation reflète le fait qu'un nombre important de résidus essentiels pour la catalyse sont localisés dans ces régions extracellulaires des enzymes. Alors que les queues cytosoliques sont assez variables, les domaines extracellulaires affichent un degré de conservation remarquable (Valdenaire *et coll.*, 2000). À titre d'exemple, on note la présence de résidus cystéines conservés, suggérant fortement des structures tridimensionnelles stabilisées par des ponts disulfures assez semblables. De plus, un haut niveau de conservation est aussi observé pour les résidus impliqués dans la catalyse, suggérant des mécanismes enzymatiques très similaires (Valdenaire *et coll.*, 1995; D'Adamio *et coll.*, 1989; Lee *et coll.*, 1995; Francis *et coll.*, 1997; Holm *et coll.*, 1997). Tous ces résidus sont importants pour le repliement ainsi que la fonction enzymatique, ce qui explique que ces exons aient été placés sous une forte pression durant l'évolution. En contraste, les régions génomiques

A



B

	EPN	NEP2	ECE-1	ECE-2	PHEX	ECEL1	KELL
EPN		52%	39.1%	33.3%	34.9%	30.9%	23.1%
NEP2			39%	38%	38%	36.0%	26%
ECE-1				60.2%	37.9%	37.1%	30.4%
ECE-2					33.6%	36.5%	29.5%
PHEX						31.8%	24.4%
ECEL1							23.3%
KELL							

Figure 6 : (A) Arbre phylogénétique de métallopeptidases et (B) Identité de séquences des membres de la famille de l'EPN

correspondant aux 200 premiers résidus (incluant les domaines intracellulaires et transmembranaires) sont différemment organisées d'un gène à un autre et cette variabilité s'observe, entre autres, tant dans la longueur des queues cytosoliques que dans le contenu en acides aminés de ces dernières (SEP/NL1/NEP2, 17 aa jusqu'à ECE-2, 82 aa) (Figure 7). En addition, huit jonctions ne sont conservées que parmi deux, trois ou quatre gènes, délimitant les relations entre ces cinq gènes. Une analyse génomique suggère que la plus récente duplication génomique ayant pris place pour produire ces cinq gènes concerne ECE-1 et KELL d'un côté, et l'EPN et PHEX d'un autre côté (Valdenaire *et coll.*, 2000).

1.7.1 L'endopeptidase neutre

L'endopeptidase neutre a été révélée à la communauté scientifique en 1974 lorsque Kerr et Kenny ont publié deux articles portant sur la purification, la détermination de la masse moléculaire ainsi que sur les propriétés enzymatiques de celle-ci. Elle a été nommée *endopeptidase neutre* pour refléter sa capacité d'hydrolyse de liens peptidiques internes de la chaîne B de l'insuline et ce, à un pH neutre. L'endopeptidase neutre allait devenir la porte d'entrée d'une famille de protéines d'une importance cruciale dans plusieurs phénomènes de régulation métabolique.

L'endopeptidase neutre (Néprilysine, NEP, E.C.3.4.24.11) a été identifiée comme une glycoprotéine de 90-100 kDa dans les cellules de tubules proximaux du rein (Kerr et Kenny, 1974a ; Kerr et Kenny, 1974b). Cette peptidase apicale est particulièrement abondante dans la bordure en brosse du rein, représentant 4-5% des protéines totales. L'existence de l'endopeptidase neutre a pris un nouveau parcours lorsqu'elle a été identifiée pour la deuxième fois, par Malfroy *et coll.*, en 1978 : ces derniers décrivent en effet une nouvelle enzyme localisée dans le cerveau et participant à la dégradation des enképhalines.

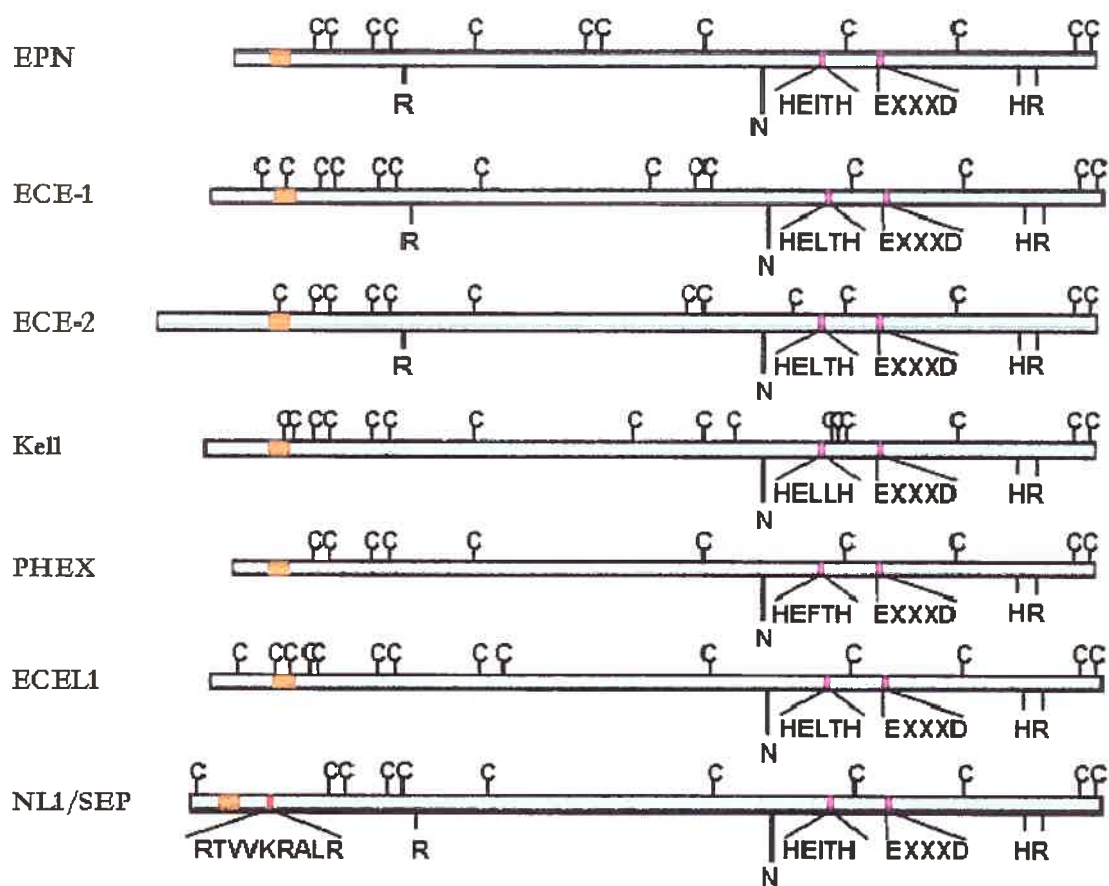


Figure 7 : Alignement des séquences des membres de la famille de l'EPN

Cette peptidase fut conséquemment appelée enképhalinase. Et ce n'est que quelques années plus tard que d'autres travaux permirent de confirmer que l'EPN et l'enképhalinase étaient en réalité la même enzyme (Llorens *et coll.*, 1981 ; Matsas *et coll.*, 1983 ; Almenoff et Orłowski, 1984 ; Turner, 1987). L'enzyme allait être «découverte» une troisième fois, par Letarte *et coll.*, en 1988, dans un contexte néanmoins différent pouvant justifier cette redondance. En effet, le clonage de l'ADNc de CALLA (*common acute lymphoblastic leukemia antigen*), un antigène localisé à la surface des lymphocytes B immatures et marqueur du développement de la leucémie lymphoblastique aiguë de type B (Greaves *et coll.*, 1975), révéla qu'il n'était nul autre que l'EPN. On fait encore référence à ces divers noms lorsqu'on parle de cette enzyme. Toutefois, le nom d'endopeptidase neutre est celui qui est favorisé.

1.7.1.1 Structure protéique de l'endopeptidase neutre

La structure primaire de l'EPN a été dévoilée grâce au clonage et au séquençage de son ADNc obtenu à partir d'ARNm de rat (Malfroy *et coll.*, 1987), de lapin (Devault *et coll.*, 1987), d'humain (Malfroy *et coll.*, 1988) et de souris (Chen *et coll.*, 1992). Les séquences en acides aminés de l'EPN de ces différentes espèces de mammifères sont identiques à plus de 90%, indiquant un degré de conservation évolutif très élevé, généralement indicateur d'une fonction biologique particulièrement importante.

L'EPN est une protéine membranaire (Kerr et Kenny, 1974 ; Booth et Kenny, 1980) de 749 acides aminés dont la topologie est de type II (Fulcher *et coll.*, 1986 ; Devault *et coll.*, 1988a). Elle possède un court domaine cytoplasmique de 27 acides aminés à son extrémité N-terminale, un segment à haut contenu hydrophobe transmembranaire de 23 acides aminés et un long domaine extracellulaire (ou ectodomaine) de 699 acides aminés à son

extrémité C-terminale (voir Figure 7). Cet ectodomaine adopte une structure globulaire compacte localisée très près de la membrane plasmique (Kenny *et coll.*, 1983). C'est sur cet ectodomaine qu'est situé le site catalytique de la protéine. Il contient également 12 cystéines formant 6 ponts disulfures qui contribuent à stabiliser et à maintenir la métallopeptidase à zinc dans une conformation active (Tam *et coll.*, 1985). La patron d'appariement de ces ponts est maintenant connu grâce à la détermination de la structure tridimensionnelle (Oefner *et coll.*, 2000)(voir Figure 8).

En plus des caractéristiques énoncées ci-haut, l'EPN possède plusieurs sites potentiels de N-glycosylation (Asn-Xaa-Ser/Thr, où Xaa peut être n'importe quel acide aminé sauf une proline) sur le domaine extracellulaire. L'enzyme de lapin en contient cinq, alors que les protéines de rat, de souris et d'humain en contiennent six. La glycosylation de l'EPN est essentielle pour lui assurer un repliement correct, un transport adéquat jusqu'à la membrane plasmique et une activité enzymatique normale (Lafrance *et coll.*, 1994). L'influence des sucres de l'EPN sur son ciblage résulte d'un effet cumulatif de l'ensemble des sites glycosylés plutôt que de la participation unique d'un site donné. Toutefois, l'activité catalytique maximale de l'enzyme dépend de la glycosylation de deux sites seulement : les sites Asn 145 et Asn 629.

L'EPN possède beaucoup de points en commun avec la thermolysine, une enzyme bactérienne dont le mécanisme d'action est décrit et la structure cristallographique connue (Coleman *et coll.*, 1972 ; Holmes *et coll.*, 1982). Les résidus cruciaux pour son activité enzymatique, que ce soit au niveau de la catalyse ou du maintien de la structure de la protéine, sont donc identifiés. Par comparaison, certains de ceux-ci sont conservés chez l'EPN. Ainsi, les études de mutagenèse dirigée visant à déterminer les acides aminés

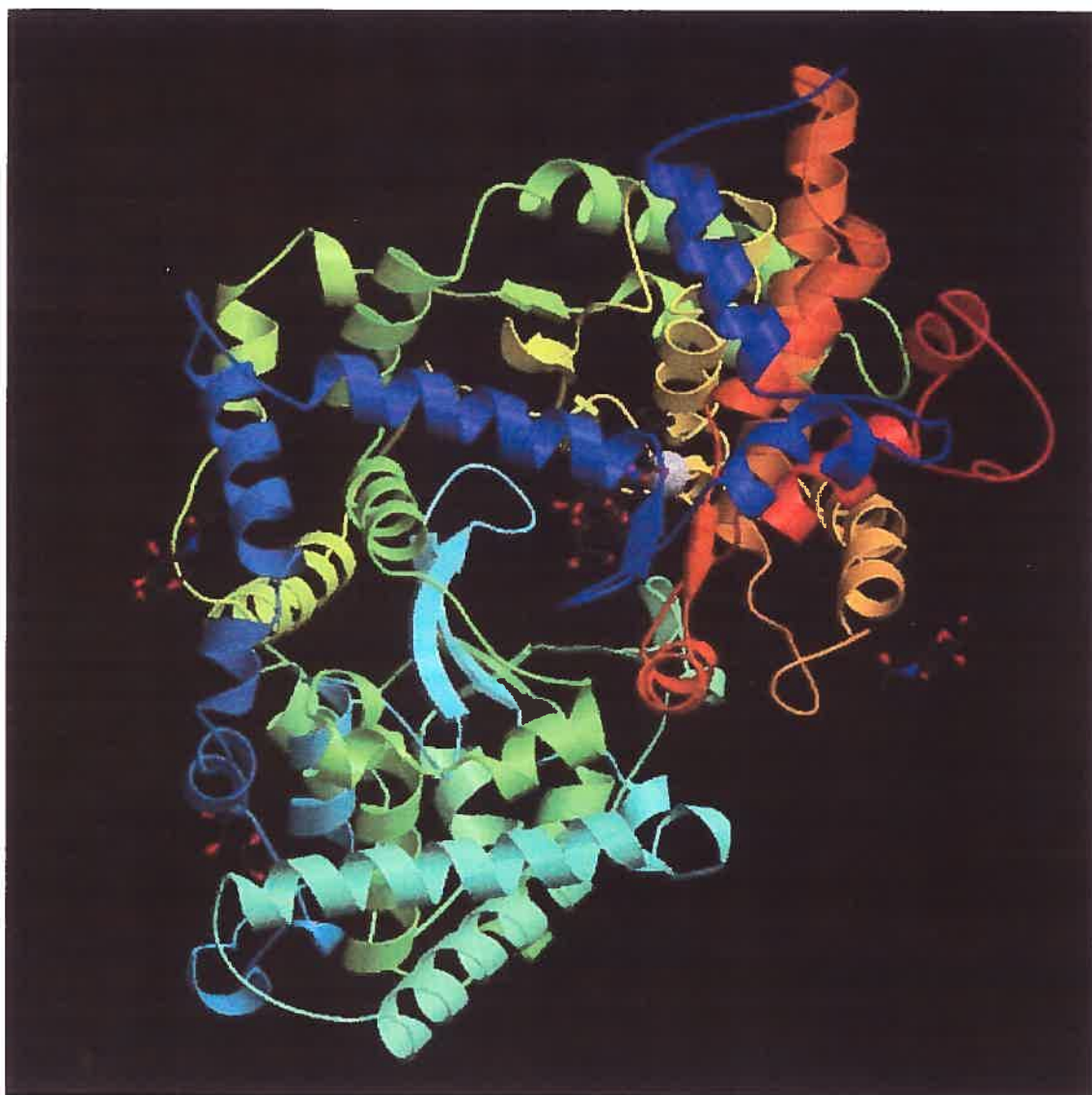


Figure 8 : Structure tridimensionnelle de l'EPN
(D'après Oefner *et coll.*, 2000)

importants pour son activité ont été guidées par les connaissances acquises avec la thermolysine.

1.7.1.2 Activité enzymatique et site actif de l'endopeptidase neutre

L'EPN est capable de cliver, *in vivo* et *in vitro*, un grand nombre de peptides de nature variée, dont la taille ne peut cependant pas excéder de beaucoup 40 acides aminés, soit environ 3.5 kDa (voir Tableau III). De façon générale, l'EPN hydrolyse des liens peptidiques situés du côté amino-terminal de résidus hydrophobes (Turner *et coll.*, 1985). L'EPN accepte spécifiquement des résidus hydrophobes au niveau du sous-site S₁, de son site actif.

Il est cependant d'intérêt de préciser que bien que l'EPN soit, comme son nom l'indique, une endopeptidase, elle se comporte plutôt comme une dipeptidyl carboxypeptidase avec certains substrats (Llorens *et coll.*, 1980 ; Malfroy *et coll.*, 1982 ; Pozsgay *et coll.*, 1986 ; Hersh et Morihara, 1986). *In vivo*, elle dégrade plusieurs peptides bioactifs comme les enképhalines, la substance P ou l'ANF (*atrial natriuretic factor*), ce qui l'implique dans divers phénomènes physiologiques. Une liste non exhaustive des substrats de l'EPN est rapportée dans le tableau III.

Les études de Devault *et coll.* (1988) et de LeMoual *et coll.* (1991) ont permis d'identifier les résidus responsables de la liaison à l'atome de zinc qui, lui, est impliqué dans les réactions catalytiques de l'EPN. Ainsi, les résidus auxquels il est associé sont indispensables pour assurer l'activité de l'enzyme.

Il a été démontré que les acides aminés qui lient le zinc sont deux histidines et un acide glutamique (HEXXH.....E) ; les histidines 583 et 587 et l'acide glutamique 646 servent donc de ligands du zinc (Devault *et coll.*, 1988 ; LeMoual *et coll.*, 1991) (voir Figure 9).

Tableau III : Substrats de l'endopeptidase neutre

Substrats	Sites de clivage/séquence	Km (μM)	Références
Leu-enképhaline	YGG↓FL	86; 73	(Matsas <i>et coll.</i> , 1984)
Met-enképhaline	YGG↓FM	62; 17	(Matsas <i>et coll.</i> , 1984; Hersh, 1984)
D-Ala ² -leu-enképhaline	YdAG↓FL	88	(Matsas <i>et coll.</i> , 1984)
Dynorphine ₁₋₉	YGG↓F↓LRRIR	219	(Matsas <i>et coll.</i> , 1984)
Dynorphine ₁₋₁₃	YGG↓FLRR↓IRPK↓LK	n.d.	(Hersh, 1984)
γ-Endorphine	YGG↓FMTSEKSQTP↓LVTL	42; 4	(Matsas <i>et coll.</i> , 1984)
α-néo-endorphine	YGG↓FLRKYPK	K _i ≥ 500	(Hersh, 1984)
β-néo-endorphine	YGG↓FLRKYPK	K _i ≥ 500	(Hersh, 1984)
MCH	DFDMLRC↓MLGR↓VYRPC↓WQV	12	(Checler <i>et coll.</i> , 1992)
LHRH (lulibérine)	pEH↓WS↓YG↓LRPGM-NH ₂	755	(Matsas <i>et coll.</i> , 1984)
Bradykinine	RPPG↓FSP↓FR	92	(Matsas <i>et coll.</i> , 1984)
Substance P	RPKPQQ↓F↓FG↓LM-NH ₂	32; 37.8	(Matsas <i>et coll.</i> , 1983; Matsas <i>et coll.</i> , 1983; Katayama <i>et coll.</i> , 1991)
Physalaemin	EADPNK↓F↓YG↓LM-NH ₂	105	(Matsas <i>et coll.</i> , 1984)
DimeC7	EQ(MeF)(MeG) ↓LM-NH ₂	2567	(Matsas <i>et coll.</i> , 1984)
Angiotensine I	DR↓VY↓IHP↓FHL	n.d.	(Stephenson et Kenny, 1987a)
Angiotensine II	DRVY↓IHPF	n.d.	(Stephenson et Kenny 1987a)
Neurotensine	pELYENKPRRP↓Y↓IL	78	(Matsas <i>et coll.</i> , 1984; Turner <i>et coll.</i> , 1987)
Cholécystokinine-8	DYMG↓WMD↓F-NH ₂	67.4	(Matsas <i>et coll.</i> , 1984; Kenny <i>et coll.</i> , 1985)
Cholécystokinine-8 (SO ₃ H)	DY(SO ₃ H)MG↓W↓MD↓F-NH ₂	296	(Matsas <i>et coll.</i> , 1984; Kenny <i>et coll.</i> , 1985; Durieux <i>et coll.</i> , 1985)
Neurokinine A	HKTDS↓FVG↓LM-NH ₂	113	(Hooper <i>et coll.</i> , 1985a)
Endothéline-1	CSCSS↓LMDKECVYFCH↓L↓DIW	2.3	(Vijayaraghavan <i>et coll.</i> , 1990a)
Big endothéline-1	CSCSSLMDKECVYFCHLDIIV↓N TPEHVVPYGLGGSPRS	n.d.	(Held <i>et coll.</i> , 1997)
α-MSH	AcS↓YS↓ME↓HFR↓WGKP↓V-CO-NH ₂	n.d.	(Deschodt-Lanckman <i>et coll.</i> , 1990)
α-hANP	SLRRSSC↓FGGRMDRIGAQSGLGC NSFRY	26; 34; 121	(Kenny <i>et coll.</i> , 1993)
pBNP ₃₂	SPKTMRDSCFGRR↓LDRIGS↓LS GLGCNVLRRY	111; 151	(Kenny <i>et coll.</i> , 1993; Norman <i>et coll.</i> , 1991)
hCNP-22	GLSKGCFGLKLDRIIGSMSGLGC-NH ₂	2.5; 13	(Kenny <i>et coll.</i> , 1993)
hBNP ₃₂	SP↓KM↓VQSGSCFGRKMDR↓IGSL SGLGCNVLRRY	K _i =172; 151	(Kenny <i>et coll.</i> , 1993; Norman <i>et coll.</i> , 1991)
Urodilatine	APRLSLRRSSCFGGRMDRIGAQSG LGCNSFRY	31; 62	(Kenny <i>et coll.</i> , 1993)

↓ Site de coupure

Peptide β -Amyloïde 1-40/42	DAE \uparrow FRHDSG \uparrow YEVVHHQKLVF \uparrow F AEDVGSNKGA \uparrow IIG \downarrow LMVG \uparrow GVV	2.8 (1-42)	(Howell <i>et coll.</i> , 1995; Takaki <i>et coll.</i> , 2000; Shirovani <i>et coll.</i> , 2001; Iwata <i>et coll.</i> , 2000)
OGP	ALKRQ \downarrow GRT \downarrow LYGFGG	n.d.	(Frota-Ruchon <i>et coll.</i> , 2000)
PTHrP ₁₋₃₄	AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRFF \downarrow LHH \downarrow L \downarrow IAEIHTA	n.d.	(Frota-Ruchon <i>et coll.</i> , 2000)
Ostéostatine	TRSAQLDSGVTGSGLEGDHLSDT STTS \downarrow LELDSR	n.d.	(Frota-Ruchon <i>et coll.</i> , 2000)
Calcitonine	CGNLSTCMLGTYTQDFNK \downarrow FHTF PQTAIGVVGAP	n.d.	(Howell <i>et coll.</i> , 1993)
α -CGRP	SCNTATC \downarrow VTHR \downarrow LAG \downarrow LLSRGG \downarrow VVKDN \downarrow FVPTN \downarrow VGSE \downarrow AF-NH ₂	105	(Katayama <i>et coll.</i> , 1991; Davies <i>et coll.</i> , 1992)
β -Endorphine	YGGFMTSEKSQTPLVTLFKNAIIK NAYKKGE	K _i \geq 500	(Hersh, 1984)
β -Lipotropine 61-69	YGGFMTSEK	K _i =19	(Hersh, 1984)
NPY	YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSA LRHYINLITRQRY-NH ₂	n.d.	(Baraniuk <i>et coll.</i> , 1990)
PYY	YPIKPEAPGEDASPEELN \downarrow RYYAS LRHYLNLVTRQRY-NH ₂	n.d.	(Medeiros <i>et coll.</i> , 1994)
VIP	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKY \downarrow LNS \downarrow ILN-NH ₂	15	(Gourlet <i>et coll.</i> , 1997)
PACAP 1-27	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKY \downarrow LAA \downarrow VL-NH ₂	100-200	(Gourlet <i>et coll.</i> , 1997)
Interleukine-1 β	17 kDa	n.d.	(Pierart <i>et coll.</i> , 1988)
Gastrine	pEGPW \downarrow LEEEEEEA \downarrow YG \downarrow WMD \downarrow F- NH ₂	33; 57	(Deschodt-Lanckman <i>et coll.</i> , 1988; Pauwels <i>et coll.</i> , 1989)
Oxytocine	CYIQNCP \downarrow LG-NH ₂	n.d.	(Riley <i>et coll.</i> , 1995; Ottlecz, 1991; Johnson <i>et coll.</i> , 1984)
GLP-1 7-36	HAEGTFTSD \downarrow VSS \downarrow Y \downarrow LEGQAAKE \downarrow F \downarrow IAW \downarrow LVKGR-NH ₂	n.d.	(Hupe-Sodmann <i>et coll.</i> , 1995)
Glucagon	HSQGTFTSDYSKYLDSTRRAQDFV QWLMNT	n.d.	(Hupe-Sodmann <i>et coll.</i> , 1995)
Sécrétine	HSDGTFTSELSRLREGARLQRLQ GLV	n.d.	(Hupe-Sodmann <i>et coll.</i> , 1995)
Somatostatine	AGCKNFFWKTFSTC	n.d.	(Sakurada <i>et coll.</i> , 1990)
Proadrénomédulline (PAMP)	AR \downarrow LDVASE \downarrow FRKK \downarrow WNK \downarrow W \downarrow A \downarrow L SR-CO-NH ₂	6.1	(Nagatomo <i>et coll.</i> , 1996)
Gastrin-releasing-peptide (GRP10)	GNHWAVGHLMN ₂	n.d.	(Burnett, Turner <i>et coll.</i> , 1988; Burnett, Debas <i>et coll.</i> , 1988)

\downarrow Site de coupure

Peptides identifiés comme non substrats de l'EPN : Vasopressine, Interleukine-1 β (travaux contradictoires, réf: Kimura *et coll.*, 1991), Interleukine-1 α , TNF- α , TGF- α , EGF, NGF, IGF, Exendin 4, GIP (*gastrin inhibitory peptide*), NEI (autre peptide présent sur l'ADNc de MCH).

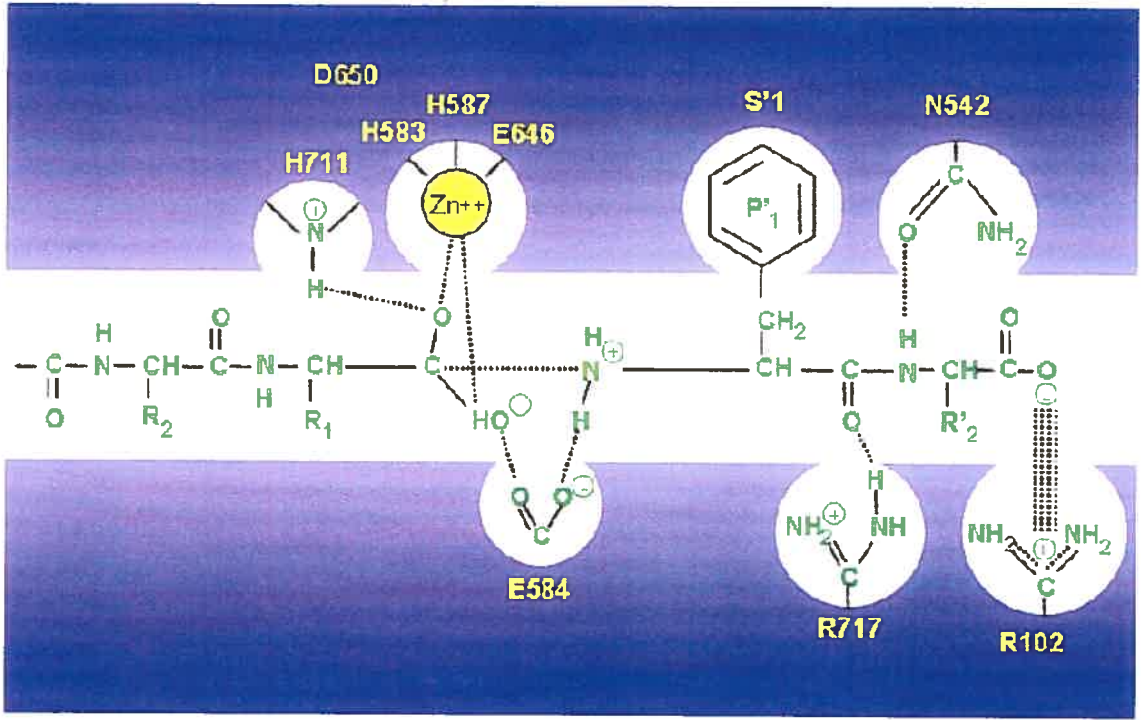


Figure 9 : Modélisation du site actif de l'EPN

Ces résultats, obtenus par mutagenèse dirigée, concordent avec les observations réalisées à partir de la cristallisation de l'EPN (Oefner *et coll.*, 2000).

Trois résidus ont été identifiés comme étant cruciaux dans la catalyse (Devault *et coll.*, 1988; Bateman *et coll.*, 1990; Dion *et coll.*, 1993; LeMoual *et coll.*, 1994). Les premiers résultats ont permis d'établir l'implication de l'acide glutamique 584 dans l'hydrolyse du substrat via son rôle de polarisateur d'une molécule d'eau (Devault *et coll.*, 1988). Par la suite, deux études ont permis d'impliquer un résidu histidine dans la catalyse de l'EPN. L'histidine 711 jouerait un rôle dans la stabilisation de l'intermédiaire tétraédrique de l'état de transition (Bateman *et coll.*, 1990; Dion *et coll.*, 1993). Il semble que l'histidine 711 interagisse avec plusieurs résidus en plus de l'oxanion pour former un réseau stabilisateur de ponts hydrogènes. En tout dernier, le groupe de LeMoual *et coll.* (1994) a identifié un troisième résidu impliqué dans la catalyse de l'EPN. L'acide aspartique 650 serait impliqué dans une interaction avec l'histidine 583 qui coordonne l'atome de zinc (LeMoual *et coll.*, 1994). L'ion métallique serait donc précisément positionné dans le site actif, par l'implication de cette triade catalytique.

Tout dernièrement, le groupe de Oefner *et coll.* (2000) a proposé une deuxième triade catalytique formée par l'acide aspartique 590 et qui impliquerait cette fois l'histidine 587 (Oefner *et coll.*, 2000). Ces deux derniers résidus seraient contributives au maintien de la structure du site actif de l'EPN; d'ailleurs, l'alignement des séquences des membres de la famille de l'EPN ont permis d'observer la présence d'un résidu conservé équivalant à l'acide aspartique 590.

Les premières informations recueillies quant à la nature des résidus impliqués dans la liaison de l'enzyme au substrat révélaient la présence d'arginine(s) dans le site actif de l'EPN, démontrée à l'aide de réactifs chimiques spécifiques inactivant la peptidase (Jackson

et Hersh, 1986 ; Malfroy et Schwartz, 1982). La mutagenèse dirigée a permis de constater que l'arginine 102 est impliquée dans la liaison au substrat (Bateman *et coll.*, 1989 ; Beaumont *et coll.*, 1991). L'arginine 102 interagirait avec le groupement carboxyle libre du résidu P₂ de certains peptides (i.e. enképhalines); elle serait responsable de l'activité dipeptidyl carboxypeptidase de l'EPN parfois observée (Llorens *et coll.*, 1980; Malfroy et Schwartz, 1982; Beaumont *et coll.*, 1991; Pozsgay *et coll.*, 1986; Jackson et Hersh, 1986). Cependant, Oefner *et coll.* (2000) ont déterminé, par analyse cristallographique de l'EPN, que l'arginine 102 n'était pas impliquée dans une interaction avec le phosphoramidon, un inhibiteur de l'EPN (Oefner *et coll.*, 2000). L'hypothèse de l'implication de l'arginine 102 dans la liaison du substrat est donc remise en question.

Dion *et coll.* (1995) ont identifié un acide aminé impliqué dans une interaction avec le résidu P₂ du substrat. Ils ont démontré que l'asparagine 542, située dans une séquence qui formerait un feuillet β retiendrait le substrat dans le site actif, interagissant directement avec ce dernier (Dion *et coll.*, 1995).

En tout dernier lieu, Marie-Claire *et coll.* (1997) ont suggéré qu'une arginine, l'arginine 717 serait impliqué dans la liaison au substrat. L'arginine jouerait un rôle dans la liaison au phosphoramidon ainsi que dans l'hydrolyse du substrat.

1.7.1.3 Localisation tissulaire

L'EPN est exprimée dans un nombre impressionnant de tissus, sans pour autant être ubiquitaire. Elle est retrouvée dans le système nerveux central (SNC), les reins, les intestins, les nœuds lymphatiques, le placenta, les poumons, les testicules, la prostate, les fibroblastes, les neutrophiles, les chondrocytes du cartilage articulaire, la moelle osseuse, les os du crâne et de la mandibule, les vertèbres, les glandes salivaires, les glandes exocrines et

dans une variété de cellules épithéliales et endocrines (Roques *et coll.*, 1993). Les rôles physiologiques qu'elle exerce à ces divers endroits ne sont pas tous connus.

1.7.1.4 Fonctions

Plusieurs travaux ont démontré que l'EPN était impliquée dans la régulation de l'équilibre hydro-sodé, de la transmission du message nociceptif, de l'inflammation, du transit gastro-intestinal, dans la différenciation et la prolifération cellulaires et, plus récemment, dans la maladie d'Alzheimer. Ces fonctions sont abordées dans les sous-sections suivantes.

1.7.1.4.1 *Régulation de la tension artérielle et de l'équilibre hydro-sodé*

Le tissu dans lequel l'EPN est retrouvée en plus grande quantité est le rein. Localisée dans la bordure en brosse des cellules épithéliales des tubules proximaux droits et contournés, c'est à cet endroit que l'EPN est impliquée dans le maintien de l'équilibre hydro-sodé, où elle dégrade des peptides cruciaux à l'homéostasie de la pression artérielle. Bien que sa contribution soit moindre, l'EPN située dans les vaisseaux sanguins, les poumons et le cerveau participe aussi à cet équilibre en hydrolysant les mêmes peptides : l'ANF, les kinines et l'ET-1 mais aussi la substance P et l'angiotensine II (Gros *et coll.*, 1990 ; Llorens-Cortez *et coll.*, 1992 ; Bourne et Kenny, 1990 ; Soleilhac *et coll.*, 1992 ; Wilkins *et coll.*, 1993 ; Vlahovic et Stefanovic, 1998 ; Corti *et coll.*, 2001 ; Wilkins, 1993 ; Sonnenberg *et coll.*, 1988).

L'ANF, synthétisée et sécrétée par les oreillettes du cœur, et les kinines (telle que la bradykinine), synthétisées au niveau du tubule distal du rein, possèdent une action diurétique et natriurétique (Sonnenberg *et coll.*, 1988 ; Erdös, 1990 ; Carretero et Scicli,

1991). Ils sont ainsi capables de faire diminuer la pression artérielle, et cet aspect peut être exploité afin de traiter l'hypertension. Effectivement, l'inhibition spécifique de l'EPN protège ces peptides et favorise l'excrétion d'eau et d'électrolytes, ce qui induit un effet hypotenseur (Gros *et coll.*, 1989 ; Richards *et coll.*, 1991 ; Singer *et coll.*, 1991 ; Richards *et coll.*, 1993).

L'endothéline (ET) est, pour sa part, un puissant vasoconstricteur produit et sécrété par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, ainsi que par les cellules médullaires du tubule collecteur du rein (Kohan, 1991). Dans cet organe, l'ET diminue localement le flot sanguin, ce qui ralentit la filtration glomérulaire, abaissant ainsi le volume urinaire et faisant augmenter la pression artérielle. Ainsi, les concentrations sanguines d'ET et d'ANF doivent être en équilibre afin d'assurer une tension artérielle normale. L'EPN est la principale enzyme rénale impliquée dans le maintien de cet équilibre.

L'angiotensine II agit aussi comme vasoconstricteur en favorisant la rétention hydro-sodée et en induisant une augmentation de la pression sanguine. C'est en hydrolysant l'angiotensine II que l'EPN joue un rôle d'hypotenseur, empêchant ainsi l'action vasoconstrictrice.

En dernier lieu, la substance P relâchée par les neurones sensoriels au niveau des vaisseaux sanguins, provoque leur vasodilatation, engendrant un effet hypotenseur. Il est donc logique qu'une modulation des concentrations peptidiques sériques, tissulaires ou urinaires par l'endopeptidase neutre engendre un changement de la tension artérielle.

Il est intéressant de remarquer que l'EPN semble jouer des rôles paradoxaux dans la régulation de la tension artérielle. Elle clive, par exemple, l'angiotensine II, provoquant une hypotension, ou encore, elle hydrolyse l'ANF, la substance P ou les kinines, empêchant leur action vasodilatatrice. Malgré ce paradoxe, il semble que l'endopeptidase neutre ait à jouer

un rôle plus important dans le catabolisme de peptides hypotensifs, alors que son inhibition sélective chez l'humain conduit à une légère baisse de tension artérielle chez des patients normotensifs et hypertensifs essentiels (Roques, 1998). Cette observation est plus notoire chez les souris déficientes en EPN, où on observe une réduction moyenne de 20% de la tension artérielle par rapport aux souris de type sauvage (Lu *et coll.*, 1997). Le système reste néanmoins complexe, et la modulation de tous les éléments impliqués amène un lot de questions encore sans réponses.

1.7.1.4.2 *Modulation de la perception de la douleur*

L'EPN retrouvée dans le cerveau, particulièrement abondante dans le plexus choroïde, la substance noire, le putamen caudé, le globus pallidus et le tubercule olfactif, est localisée à la membrane synaptique des neurones et, bien qu'en plus faible quantité, à la membrane plasmique des oligodendrocytes et astrocytes (Llorens *et coll.*, 1982 ; Matsas *et coll.*, 1986 ; Walksman *et coll.*, 1986 ; Pollard *et coll.*, 1987, 1989 ; Llorens-Cortes *et coll.*, 1986 ; Back et Gorenstein, 1989 ; Wilcox *et coll.*, 1989 ; Gaudoux *et coll.*, 1993). Elle est présente dans les centres nerveux qui contrôlent la perception de la douleur, où elle se situe dans les mêmes régions que les enképhalines (Pollard *et coll.*, 1989) et/ou leurs récepteurs (les récepteurs opioïdes μ et δ) (Walksman *et coll.*, 1986 et 1987). Ces peptides ont la capacité d'engendrer un effet anti-nociceptif analogue à celui de la morphine et ils sont de bons substrats de l'EPN. Celle-ci peut aussi moduler l'intensité et la durée de l'effet analgésique dont ces peptides sont responsables. Toutefois, une autre enzyme, l'aminopeptidase N (APN), contribue à la dégradation des enképhalines et, donc, à la régulation de leur activité biologique (Hambrook *et coll.*, 1976 ; Vogel et Alstein, 1979 ; De La Baume *et coll.*, 1983). L'inhibition simultanée de l'EPN et de l'APN fait augmenter de façon significative la demi-

vie des enképhalines endogènes libérées dans l'espace extracellulaire, ce qui induit un effet anti-douleur (Bourgoin *et coll.*, 1986 ; Llorens-Cortes *et coll.*, 1986). Par conséquent, l'emploi d'inhibiteurs mixtes de l'EPN et de l'ANP est à la base d'une stratégie menant à l'élaboration d'agents analgésiques. En ce sens, il semble que ces inhibiteurs n'auraient pas l'inconvénient de créer de dépendances physique et psychologique comme le fait la morphine (Noble *et coll.*, 1992 et 1993).

D'un autre côté, l'EPN retrouvée dans la substance noire du cerveau est localisée dans les mêmes régions que la substance P (Barnes *et coll.*, 1993), un autre neurotransmetteur impliqué dans le contrôle de la perception de la douleur (Oblin *et coll.*, 1989). Il a été démontré, *in vitro*, que la substance P est clivée par l'EPN (Matsas *et coll.*, 1983, 1984). Cependant, malgré certains indices suggérant que la substance P est effectivement un substrat de l'EPN dans le cerveau, cette hypothèse n'a pas encore été clairement validée (Mauborgne *et coll.*, 1987).

1.7.1.4.3 *Modulation de l'inflammation*

L'association de l'endopeptidase neutre avec certains processus inflammatoires a été révélée et démontrée par une panoplie d'études indépendantes (Koehne *et coll.*, 1998 ; Nadel, 1990 ; Nadel, 1991, Nadel, 1992 ; Kirkwood *et coll.*, 2001). L'EPN intervient notamment dans la régulation de l'inflammation des voies respiratoires (pouvant être causée par de nombreux facteurs) de même que dans la modulation du choc septique.

Du moment qu'ils sont stimulés par des éléments chimiques ou électriques, les neurones sensoriels des voies respiratoires peuvent initier d'importantes réactions inflammatoires locales en sécrétant des tachykinines (famille de neuropeptides à laquelle appartient la substance P) (Borson, 1991 ; Nadel, 1992). Un large éventail de cellules des

voies respiratoires (épithélium, muscles lisses, glandes, vaisseaux sanguins et neurones) expriment l'EPN et cette dernière peut dégrader ces peptides, notamment la substance P (Borson *et coll.*, 1989), permettant une modulation de l'intensité et de la durée de l'inflammation neurogénique. L'inflammation neurogénique est une caractéristique commune à certaines conditions pathologiques respiratoires, entraînant une réaction inflammatoire exagérée dans les cas de crises d'asthme, d'infections virales, de bronchites ou de fibrose kystique. La potentialisation de l'activité de l'EPN pourrait avoir un effet bénéfique (Borson *et coll.*, 1991). De cette façon, la prise exogène d'EPN, ou une stimulation de son expression, pourrait contribuer au traitement de ces maladies.

Il a été démontré que certains produits chimiques ainsi que certaines infections virales peuvent diminuer l'activité de l'EPN dans les voies respiratoires, ayant comme conséquence la toux, mais aussi des sécrétions anormales, une perméabilité vasculaire augmentée et une bronchoconstriction (Borson *et coll.*, 1989). Un des effets de la fumée de cigarette est une régulation à la baisse de l'EPN. Comme cette dernière hydrolyse en temps normal les peptides bombesin-like, une accumulation de ces peptides provoque la toux observée chez les fumeurs (Borson *et coll.*, 1989).

Aussi, l'EPN peut réguler l'inflammation des voies respiratoires causée par infection bactérienne en exerçant son activité à un niveau supplémentaire. En effet, ces bactéries produisent et relâchent des peptides qui se lient à des récepteurs situés à la surface des neutrophiles, ce qui mène à la libération de molécules chimioattractives provoquant une réponse inflammatoire. Ces peptides, comme le N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine, peuvent être inactivés par l'EPN, qui est également localisée à la surface des neutrophiles (Connelly *et coll.*, 1985 ; Painter *et coll.*, 1988). L'EPN pourrait ainsi moduler la chimiotaxie, donc l'intensité de l'inflammation.

Pour conclure, la participation de l'EPN au contrôle du choc septique, ou choc aux endotoxines, a également été démontrée. L'enzyme module encore une fois l'intensité de la réponse inflammatoire, l'empêchant de prendre des allures disproportionnées. On remarque chez les souris dont le gène de l'EPN a été inactivé, que la sensibilité aux endotoxines est décuplée, et qu'elles sont 100 fois plus susceptibles de mourir que des souris de type sauvage (Lu *et coll.*, 1995 ; Lu *et coll.*, 1996). Il reste cependant à élucider le mécanisme impliquant cette peptidase et ses substrats dans la protection aux chocs septiques.

1.7.1.4.4 *Digestion et régulation du transit gastro-intestinal*

L'EPN, présente dans l'intestin au niveau des cellules de l'épithélium, des muscles lisses et de la sous-muqueuse, présente une activité intéressante. D'une part, l'enzyme des cellules épithéliales participe à la digestion de peptides du bol alimentaire et favorise leur absorption par le tractus gastro-intestinal. D'autre part, l'EPN musculaire intervient dans le transit gastro-intestinal et influence la concentration de neuropeptides tels que la substance P (Nau *et coll.*, 1985 ; Marçais-Collado *et coll.*, 1987). Cette dernière favorisant la contraction du muscle lisse, il serait logique de considérer l'EPN des cellules musculaires et des neurones comme un candidat impliqué dans le contrôle du péristaltisme en inactivant la substance P (Matsas *et coll.*, 1983 ; Burnett *et coll.*, 1985 ; Burnett, Turner *et coll.*, 1988 ; Burnett, Debas *et coll.*, 1988).

Enfin, l'EPN localisée dans les neurones myentériques et entériques de la sous-muqueuse dégraderait les enképhalines, mais l'action de l'enzyme à cet endroit aurait un effet contraire à celui qu'elle provoque dans la couche musculaire (Marçais-Collado *et coll.*, 1987). Les enképhalines ont la capacité de diminuer le mouvement gastro-intestinal en

agissant sur le transport des ions et des fluides à travers la membrane cellulaire de la muqueuse intestinale (Schang *et coll.*, 1986 ; Coupar, 1987). L'effet antidiarrhéique causé par des inhibiteurs tels que le thiorphan et l'acétorphan permet de penser que l'action peptidasique de l'EPN sur les enképhalines serait prédominante. Cette observation rend ces inhibiteurs attirants; ils pourraient, en effet, être utilisés comme agents pharmacologiques pour contrer ce problème.

1.7.1.4.5 *Différenciation et prolifération cellulaires*

L'EPN pourrait jouer un rôle dans les processus de différenciation et de prolifération cellulaires de plusieurs tissus. Elle serait entre autres impliquée dans la modulation de la réponse proliférative des cellules à des facteurs mitogènes, comme la bombésine et des peptides qui lui sont apparentés (*bombesin-like peptides*, BLP). Par exemple, la croissance de l'épithélium pulmonaire fœtal est en partie stimulée par des BLP, qui peuvent être clivés par l'EPN (Sunday *et coll.*, 1992 ; King *et coll.*, 1993). Il a aussi été démontré que l'épithélium pulmonaire en développement et certains types de carcinomes pulmonaires présentent une faible quantité d'EPN (Ganju *et coll.*, 1994 ; Cohen *et coll.*, 1996 ; Yamazaki *et coll.*, 2001). Ainsi, l'EPN contribuerait à protéger les cellules d'une stimulation trop importante par des peptides mitogènes pouvant mener à une prolifération exagérée. D'ailleurs, cet effet protecteur aurait aussi lieu dans d'autres tissus, car il a été montré que la perte d'EPN observée dans les cancers de la prostate indépendants des androgènes favoriserait la croissance des tumeurs (Papandreou *et coll.*, 1998 ; Cohen *et coll.*, 1996 ; Freedland *et coll.*, 2003). De plus, des travaux ont également prouvé que l'EPN modulait la réponse proliférative à la bombésine de certaines lignées de cellules de cancer du sein (Burns *et coll.*, 1999). Pour reprendre un exemple cité plus tôt, la fumée de cigarette

contribuerait à augmenter les risques de développement de carcinomes pulmonaires en régulant à la baisse l'expression de l'EPN pulmonaire, ce qui augmente directement l'activité BLP.

Il semble que l'action protectrice conférée à l'EPN ne soit pas seulement d'ordre peptidasique. Il a été démontré qu'une forme inactive de l'EPN est capable d'inhiber partiellement la migration cellulaire, suggérant un rôle à un tout autre niveau, indépendant de la dégradation de substrats (Sumitomo *et coll.*, 2000 ; Shen *et coll.*, 2002). L'EPN pourrait jouer ce rôle par une association avec la Lyn kinase phosphorylée, permettant de former un complexe avec la PI-3 kinase. L'EPN agirait comme inhibiteur compétitif de la liaison de la PI-3 kinase avec FAK (*focal adhesion kinase*) aux points de contacts focaux, impliqués dans la migration cellulaire (Sumimoto *et coll.*, 2000 ; Ganju *et coll.*, 1996).

Dans un autre ordre d'idées, l'EPN se présente à la surface des précurseurs des lymphocytes B phénotypiquement normaux alors qu'elle n'est retrouvée qu'en très faible quantité sur les cellules B et T matures (Beaumont *et coll.*, 1989 ; Mari *et coll.*, 1992 ; Mari *et coll.*, 1994 ; Guerin *et coll.*, 1997). Ces observations suggèrent que l'EPN régulerait l'activation de la différenciation et de la maturation des lymphocytes en contrôlant un signal peptidique important pour ces processus (Le Bien et McCormack, 1989). Ce signal reste cependant à identifier.

1.7.1.4.6 *L'EPN et la maladie d'Alzheimer*

La maladie d'Alzheimer se caractérise par une cascade d'événements, l'un d'entre eux étant l'accumulation du peptide Amyloïde bêta ($A\beta$), prenant la forme de plaques séniles au niveau du cerveau (Octave, 1995 ; Gandy et Petanceska, 2001). Le peptide $A\beta$ est un peptide produit de façon constitutive et métabolisé en conditions normales : sa fonction

physiologique reste cependant encore nébuleuse. On ne retrouve pas seulement cette accumulation chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer ; plus de la moitié des personnes d'au-dessus de soixante-dix ans montre en fait cette accumulation d' $A\beta$, faisant de celle-ci un facteur de la maladie d'Alzheimer, mais aussi une caractéristique liée au vieillissement (Yamada *et coll.*, 1987).

Or, des études récentes démontrent que l'EPN est un candidat intéressant dans la modulation de l'accumulation de plaques séniles, étant donné que le peptide amyloïde- $\beta_{1,42}$ serait principalement métabolisé par l'EPN (Iwata *et coll.*, 2000). De plus, l'utilisation chronique de thiorphan et de phosphoramidon, des inhibiteurs de l'EPN, provoque l'accumulation de ce peptide endogène. De toutes les enzymes sensibles à ces inhibiteurs, l'EPN est la plus efficace à dégrader le peptide amyloïde- $\beta_{1,42}$, affichant un K_m de 2,5 μM (Takaki *et coll.*, 2000 ; Shirotani *et coll.*, 2001).

Il est bon de noter que l'expression de l'EPN semble diminuer avec le temps, et ce, dans des régions correspondant aux zones cérébrales où la pathologie de la maladie d'Alzheimer est observable (Iwata *et coll.*, 2002 ; Carpentier *et coll.*, 2002). Cette corrélation donne un poids important à la thèse de l'implication de l'EPN dans la digestion des peptides $A\beta$, rendant cette peptidase responsable, du moins en partie, de l'accumulation de plaques séniles lorsque son activité diminue. Cette découverte fait de l'EPN une cible pharmacologique extrêmement intéressante dans le traitement de cette maladie neurodégénérative.

1.7.2 Les enzymes de conversion de l'endothéline (ECE)

L'existence d'une protéine capable de convertir spécifiquement la big-endothéline-1 en endothéline mature a été proposée au moment du clonage de l'endothéline-1 (ET-1) de

porc (Yanagisawa *et coll.*, 1988). En effet, ce puissant peptide vasoconstricteur de 21 acides aminés est initialement synthétisé sous forme de préproendothéline, laquelle est clivée en big-endothéline par la furine (Laporte *et coll.*, 1993 ; Denault *et coll.*, 1995 ; Kido *et coll.*, 1997). La maturation en ET-1 requérait donc l'action d'une autre peptidase appelée *Endothelin-converting enzyme* (ECE) (pour revue voir Turner et Tanzawa, 1997 ; Ortega Mateo et De Artinano, 1997). L'activité vasoconstrictrice des endothélines est impliquée dans diverses physiopathologies cardiovasculaires, allant de l'hypertension à l'insuffisance cardiaque.

Trois formes de l'ECE ont été identifiées: ECE-1, ECE-2 et ECE-3 (Xu *et coll.*, 1997 ; Schmidt *et coll.*, 1994 ; Shimada *et coll.*, 1994 ; Ikura *et coll.*, 1994 ; Emoto et Yanagisawa, 1995 ; Hasegawa *et coll.*, 1998). Seules les structures de ECE-1 et ECE-2 sont connues. Ces métallopeptidases à zinc ont des similarités de séquences importantes avec l'EPN (Valdenaire *et coll.*, 1995). Ce sont des protéines membranaires de type II qui possèdent un court domaine cytosolique, un segment hydrophobe transmembranaire, et un grand ectodomaine dans lequel on retrouve la séquence consensus du site de liaison au zinc : HEXXH.

On les retrouve dans de nombreux tissus, mais la conversion de la big-endothéline en endothéline mature se fait principalement dans les cellules endothéliales. C'est certainement le cas de l'endothéline-1. Chacune de ces protéines possède une distribution tissulaire et cellulaire caractéristique et une activité enzymatique différente permettant une spécialisation fonctionnelle. Les deux premières ECE ont été clonées, alors que la troisième n'a été qu'identifiée à partir de son activité dans des microsomes d'iris bovin, sans avoir été clonée (Hasegawa *et coll.*, 1998).

Les ECE hydrolysent préférentiellement les liens peptidiques contenant un résidu hydrophobe en position P₁ et possèdent une activité dipeptidyl carboxypeptidase sur

certaines substrats (Johnson *et coll.*, 2002). La poche du site actif de ECE-1 serait plus profonde que celle retrouvée chez l'EPN (Bur *et coll.*, 2001). Toutefois, l'activité enzymatique de ECE-1, *in vitro*, s'étend sur un spectre beaucoup plus restreint que l'EPN. À titre d'exemple, ECE-1 possède très peu d'affinité pour les substrats composés de moins de six acides aminés tels les enképhalines (Johnson *et coll.*, 1999).

1.7.2.1 ECE-1

Une première ECE (ECE-1) fut purifiée à partir d'une préparation de microsomes de poumons de rats par l'équipe de Takahashi (1993), en raison de sa capacité à cliver un précurseur inactif de l'ET (la préET) en ET mature, un des plus puissants vasoconstricteurs connus à ce jour. Le clonage de son ADNc à partir d'ARNm bovin en 1994 par Xu *et coll.* a permis de relever une importante similitude de séquence entre l'ECE-1 et l'EPN. Quatre isoformes de l'ECE-1 humaine ont été décrites à ce jour : ECE-1a et ECE-1b (Valdenaire *et coll.*, 1995) (aussi nommées ECE-1 β et ECE-1 α respectivement (Shimada *et coll.*, 1995)), ECE-1c (Schweizer *et coll.*, 1997) et ECE-1d (Tougaard et Michel, 1999). Ces quatre isoformes sont encodées par le même gène via quatre promoteurs différents (Orzechowski *et coll.*, 1997; Valdenaire *et coll.*, 1999) et ne diffèrent que par la séquence de leur domaine N-terminal cytosolique (Shimada *et coll.*, 1995).

Les quatre isoformes de l'ECE-1 ont une distribution tissulaire variable d'une forme à l'autre. De plus, la localisation intracellulaire de ces quatre protéines varie (Schweizer *et coll.*, 1997). ECE-1a est principalement exprimée à la surface cellulaire alors que ECE-1b est présente dans des vésicules intracellulaires, soient les endosomes tardifs et corps vésiculaires (Schweizer *et coll.*, 1997 ; Azarani *et coll.* 1998 ; Muller *et coll.*, 2003). ECE-1c, qui correspond à ECE-1b amputée de ses 17 premiers acides aminés, est majoritairement

présente à la surface cellulaire, mais aussi, de façon minoritaire, dans des compartiments intracellulaires. On en trouve de faibles quantités dans les mêmes structures intracellulaires que ECE-1b (Schweizer *et coll.*, 1997). Ces observations ont été faites dans les cellules CHO, dans la lignée de cellules endothéliales ECV304, ou encore dans la lignée de cellules épithéliales polarisées MDCK. En dernier lieu, ECE-1d est présente à la fois au niveau des endosomes et à la membrane plasmique (Muller *et coll.*, 2003). Ces localisations sous-cellulaires sont néanmoins dépendantes du type cellulaire étudié (Turner *et coll.*, 1998). Un motif dileucine d'internalisation endosomiale, retrouvé dans les 17 premiers acides aminés de ECE-1b, semble responsable de sa localisation intracellulaire et explique que ECE-1c se retrouve à la surface cellulaire (Cailler *et coll.*, 1999). Emoto a démontré que ECE-1 possédait un signal de localisation lysosomiale dans sa queue cytoplasmique, mais sa fonctionnalité reste à démontrer (Emoto *et coll.*, 1999).

La structure primaire de l'ECE-1 rapportée par Xu *et coll.* (1994) a révélé qu'elle était identique à 37% à l'EPN en acides aminés. Tous les acides aminés importants pour l'activité enzymatique identifiés chez l'EPN, excepté l'arginine 102, sont retrouvés dans l'ECE-1. Tel que pour l'EPN, son pH optimal d'activité enzymatique est neutre (Shimada *et coll.*, 1996 ; Sansom *et coll.*, 1998). En outre, elle contient quatre cystéines qu'on ne retrouve pas chez l'EPN. Un de ces résidus est impliqué dans la formation d'un pont disulfure entre molécules d'ECE-1. En effet, l'ECE-1 existe sous forme d'homodimère covalent, et bien que cette forme soit préférable pour assurer son activité enzymatique, elle ne semble pas essentielle (Schmidt *et coll.*, 1994 ; Shimada *et coll.*, 1996). Une étude suggère que la localisation intracellulaire de ECE-1b permettrait une régulation de la localisation et de l'activité des autres isoformes (Muller *et coll.*, 2003). Il appert que les isoformes de ECE-1 peuvent former des hétérodimères et que les hétérodimères formés entre ECE-1a et

ECE-1b se retrouvent dans un compartiment intracellulaire, diminuant ainsi l'activité de ECE-1a. Tous les sites de glycosylation de l'EPN sont conservés chez l'ECE-1, mais peu d'études ont été réalisées sur cet aspect des ECE. Il a toutefois été rapporté que les asparagines 632 et 651 (de l'isoforme 1b) sont importantes pour l'expression d'une ECE-1 fonctionnelle (Nelbroeck *et coll.*, 1998).

Il y a encore peu de temps, les big-ET étaient les seuls substrats connus des ECE. Toutefois, Hoang *et coll.* ont rapporté en 1997 que l'ECE-1 pouvait dégrader la bradykinine, *in vitro*. De surcroît, très récemment, des travaux exécutés par Johnson *et coll.* (1999) ont révélé que l'ECE-1 était capable d'hydrolyser, *in vitro*, plusieurs peptides de nature variée, comme la calcitonine, l'ANF et la chaîne B de l'insuline oxydée, l'angiotensine I, la bradykinine, la neurotensine et la substance P.

ECE-1 est retrouvée dans les cellules endothéliales d'aorte, de poumons, de reins, de foie, de cœur et dans certaines cellules sécrétrices telles des îlots pancréatiques. Elle est également exprimée dans les testicules (dans les cellules interstitielles uniquement) ainsi que dans le cerveau, au niveau de l'hippocampe. Elle serait en plus exprimée dans le placenta et dans les ovaires (Turner, 1997). Néanmoins, par son action sur les ET, elle serait aussi impliquée de manière importante dans le développement. En effet, des souris dont le gène ECE-1 a été inactivé meurent *in utero* ou meurent peu de temps après la naissance (Yanagisawa *et coll.*, 1998). Ces souris ECE-1 *-/-* présentent des phénotypes similaires à ceux des souris déficientes en endothélines ou, encore, déficientes en récepteurs d'endothélines (Yanagisawa, Hammer *et coll.*, 1998 ; Yanagisawa, Yanagisawa *et coll.*, 1998 ; Kurihara *et coll.*, 1994 ; Kurihara *et coll.*, 1995 ; Clouthier *et coll.*, 1998 ; Hosoda *et coll.*, 1994). Ces souris présentent des malformations craniofaciales et cardiaques (Yanagisawa, Yanagisawa *et coll.*, 1998), une absence de mélanocytes de l'épiderme et de neurones

entériques de l'intestin distal, comme c'est le cas des souris déficientes en ET-3 (Hosoda *et coll.*, 1994). ECE-1 contribue aussi à l'étiologie de quelques cas de syndrome de *Hirschprung* (*Hirschprung disease*) (Hofstra *et coll.*, 1999).

Tableau IV : Substrats de ECE-1

Substrats	Sites de clivage/séquence	K _m (μM)	Références
Big endothéline-1	CSCSSLMDKECVYFCHLDIIWV↓NTPE HVVPYGLGSPRS	2 ¹	(Shimada <i>et coll.</i> , 1994)
Big endothéline-2	CSCSSWLDKECVYFCHLDIIW↓VNTPE QTAPVGLGNPP	n.d. ¹	(Shimada <i>et coll.</i> , 1994)
Big endothéline-3	CTCFTYKDKECVYYCHLDIIW↓INTPE QTVPYGSNYRGSFR	n.d. ¹	(Shimada <i>et coll.</i> , 1994)
Angiotensine I	DRV↓Y↓IHP↓FHL	2500	(Johnson <i>et coll.</i> , 1999)
Bradykinine	RPPGFSP↓FR	340	(Johnson <i>et coll.</i> , 1999; Hoang et Turner, 1997)
Neurotensine	pEL↓YENKPRRP↓YIL	78	(Johnson <i>et coll.</i> , 1999)
Substance P	RPKPQQ↓F↓FG↓LM-NH ₂	90	(Johnson <i>et coll.</i> , 1999)
Chaîne β oxydée de l'insuline	FVNQHLCGSH↓L↓VE↓A↓L↓Y↓LVCGE RGFFYT↓PKA	n.d.	(Johnson <i>et coll.</i> , 1999)
Calcitonine	CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHITFPQT AIGVGAP	n.d.	(Johnson <i>et coll.</i> , 1999)
ANP	SLRRSSCFGGRMDRIGASGLGCNSFR Y	> 500	(Johnson <i>et coll.</i> , 1999)
Peptide amyloïde β ₁₋₄₂	DAEFRHDSGYEVHHQK↓L↓VF↓FAED VGSNKGAIIGLMVGGVV	$K_{cut}/K_m \geq$ ET-1	(Eckman <i>et coll.</i> , 2001)

↓ Site de coupure

¹ L'efficacité de clivage 4 : 2 : 1 pour BigET-1 : BigET-2 : BigET-3

1.7.2.2 ECE-2

L'ADNc bovin d'une autre enzyme pouvant convertir la préET en ET (ECE-2) fut cloné par Emoto *et coll.* (1995). L'ECE-2 est une protéine de 787 acides aminés identiques à 59% à l'ECE-1 et à 37% à l'EPN (Emoto *et coll.*, 1995). Bien qu'elle contienne, comme

l'ECE-1, tous les acides aminés impliqués dans la catalyse enzymatique reconnus chez l'EPN, elle possède également des déterminants moléculaires qui lui sont propres et qui permettent la catalyse avec un pH optimal acide (pH 5.5) plutôt que neutre. D'ailleurs, l'ECE-2 se situerait uniquement dans un compartiment intracellulaire (réseau *trans*-Golgi ou compartiment en aval dans la voie de sécrétion) et non à la surface cellulaire, ce qui pourrait expliquer cette différence au niveau du pH optimal (Emoto *et coll.*, 1995). D'autre part, les cystéines situées sur le domaine extracellulaire de l'ECE-2 sont toutes retrouvées chez l'ECE-1, incluant un résidu correspondant à celui qui permet la formation d'un homodimère covalent. Ceci suggère que l'ECE-2 pourrait aussi exister sous forme dimérique, ce qui n'a par contre pas encore été vérifié.

L'ARNm de ECE-2 est beaucoup moins abondant que celui de ECE-1, mis à part dans certains tissus neuronaux (Emoto et Yanagisawa, 1995 ; Ikeda *et coll.*, 1999). À l'image de ECE-1, ECE-2 possède aussi quatre isoformes : ECE-2a-1, ECE-2a-2, ECE-2b-1 et ECE-2b-2 (Lorenzo *et coll.*, 2001, Ikeda *et coll.*, 1999). On remarque le même phénomène que pour ECE-1, à savoir que ces isoformes diffèrent au niveau de leur extrémité N-terminale et possèdent des distributions tissulaires distinctes. Le tableau suivant montre les substrats de ECE-2 connus (Tableau V).

Enfin, les souris déficientes en ECE-2 sont viables, n'affichent aucun phénotype apparent et possèdent une longévité comparable aux souris de type sauvage (Yanagisawa *et coll.*, 2000).

1.7.2.3 ECE-3

Enfin, la purification à partir d'iris de bœuf d'une autre ECE (ECE-3), dont l'ADNc n'a cependant pas encore été cloné, fut rapportée en 1998 (Hasegawa *et coll.*, 1998).

L'activité de cette dernière a pu être inhibée par le phosphoramidon, ce qui suggère qu'elle serait aussi un membre de la famille de l'EPN.

Tableau V : Substrats de ECE-2

Substrats	Sites de clivage/séquence	Km (μ M)	Références
Big endothéline-1	CSCSSLMDKECVYFCHLDIIW↓VNTPEH VVPYGLGSPRS	n.d.	(Mzhavia <i>et coll.</i> , 2003)
Bradykinine	RPPGFSP↓FR	n.d.	(Mzhavia <i>et coll.</i> , 2003)
Angiotensine I	DRVYIHP↓FHL	n.d.	(Mzhavia <i>et coll.</i> , 2003)
Bradykinine	RPPGFSP↓FR	n.d.	(Mzhavia <i>et coll.</i> , 2003)
Neurotensine	pEL↓YENKPRRP↑Y↓IL	n.d.	(Mzhavia <i>et coll.</i> , 2003)
Substance P	RPKPQQFFG↓LM-NH ₂	n.d.	(Mzhavia <i>et coll.</i> , 2003)
BAM-18P	YGGFMRRVGRPE↓WWMDTQ	n.d.	(Mzhavia <i>et coll.</i> , 2003)
Dynorphine B	YGGFLRRQ↓FK↑VVT	n.d.	(Mzhavia <i>et coll.</i> , 2003)
Little Pen-Len	AVDQDLGPEVPPENVLGA↓LL↓R↓VKRL ENSSPQAPA	n.d.	(Mzhavia <i>et coll.</i> , 2003)

↓ Site de coupure

1.7.2.4 Caractéristiques enzymatiques des ECE

Les ECE ont été identifiées en raison de leur capacité à cliver spécifiquement, *in vitro* et *in vivo*, la préET en ET. Il existe en fait trois peptides reliés, groupés sous le nom d'ET : ET-1, ET-2 et ET-3. Toutes les ECE ne se comportent pas de la même façon envers leurs précurseurs. Il a été rapporté que l'ECE-1 humaine les clive selon l'efficacité suivante (Schmidt *et coll.*, 1994) : préET-1 >> préET-2 > préET-3, alors que l'ECE-1 bovine se montre plus efficace dans cet ordre (Xu *et coll.*, 1994) : préET-1 >> préET-3 > préET-2. Malgré le comportement opposé de l'ECE-1 humaine et de l'ECE-1 bovine envers la préET-2 et la préET-3, il est clair que la préET-1 est le meilleur substrat de l'ECE-1. L'ECE-2 coupe aussi préférentiellement la préET-1, et ne semble pas mieux agir sur la

préET-2 que la préET-3 (Emoto *et coll.*, 1995). Cependant, l'ECE-3 est très spécifique à la préET-3, ne clivant que faiblement les deux autres précurseurs (Hasegawa *et coll.*, 1998).

Tel qu'abordé plus tôt, l'ET est l'un des plus puissants vasoconstricteurs connus et les ECE participent à sa formation. Elles constituent par conséquent des cibles thérapeutiques intéressantes pour le traitement de problèmes cardio-vasculaires. La recherche et le développement d'inhibiteurs des ECE ont donc été rapidement mis en branle, sans pour autant arriver à synthétiser un inhibiteur efficace des ECE qui n'inhibe pas l'EPN. En général, les inhibiteurs synthétiques de l'ECE-1 ont même tendance à mieux inhiber l'EPN. À titre d'exemple, un des plus puissants inhibiteurs synthétiques non peptidiques de l'ECE-1, le CGS 26303, est 20 fois plus efficace avec l'EPN (De Lombaert *et coll.*, 1994 ; Turner, 1997). Néanmoins, un composé naturel sécrété par *Saccharothrix* inhibe ECE-1 avec une efficacité supérieure de 30 fois à celle avec laquelle il inhibe l'EPN (Tsurumi *et coll.*, 1995). Malgré tout, l'usage d'inhibiteurs mixtes de l'ECE et de l'EPN est une avenue intéressante à suivre pour traiter l'hypertension en prévenant la formation d'ET et en prolongeant l'action de l'ANF.

1.7.3 Le complexe antigénique Kell des érythrocytes

Le système de groupe sanguin Kell est basé sur un complexe antigénique retrouvé à la surface des érythrocytes humains. Les quelque 20 antigènes composant ce système appartiennent à une glycoprotéine membranaire, la protéine Kell (Marsh, 1992 ; Redman et Lee, 1995). En présence d'incompatibilité de l'antigène, Kell revêt une importance clinique, causant des réactions hémolytiques sévères lors de transfusions sanguines et causant également l'érythroblastose chez le nouveau-né. Le clonage de l'ADNc de Kell, effectué en 1991, révéla une similarité évidente à l'endopeptidase neutre (Lee *et coll.*, 1991).

Kell est une protéine de 732 acides aminés dont 25% des résidus sont identiques à ceux de l'EPN. Elle est ainsi le membre de la famille le plus distant de l'EPN. Des équivalents des acides aminés importants pour l'activité enzymatique de type endopeptidase neutre sont retrouvés chez Kell, à l'exception de l'arginine 102. En raison de l'absence d'équivalent de ce résidu, Kell ne posséderait pas d'activité dipeptidyl carboxypeptidase, comme PHEX (revues par Marsh, 1992 ; Redman et Lee, 1995 ; Turner et Tanzawa, 1997). Cependant, Kell et l'EPN semblent utiliser des résidus différents pour la liaison au substrat. De plus, la substitution par mutagenèse dirigée de certains résidus du site actif de Kell et de l'EPN n'affecte pas l'activité des deux enzymes de la même façon, laissant croire que le site actif de Kell serait plus flexible et permissif que celui de l'EPN quant à la composition des résidus admis dans cette poche catalytique (Lee *et coll.*, 2003). Kell possède 6 sites potentiels de N-glycosylation et 15 cystéines dans son ectodomaine (10 étant conservées avec celles de l'EPN). Sa queue intracellulaire, composée de 47 acides aminés, est ancrée au cytosquelette. Une des grandes particularités de Kell repose sur sa capacité à former un hétérodimère avec une protéine à dix passages transmembranaires, la protéine XK. Des études de mutagenèse prouvent qu'un pont disulfure permet une liaison covalente entre la cystéine 72 de Kell et la cystéine 347 de XK (Russo *et coll.*, 1998). Cette association reste néanmoins dépourvue de rôle physiologique connu, mais des études d'immunoprécipitation ont permis la détection du complexe dans au moins deux tissus, soient le muscle squelettique et les érythrocytes (Jung *et coll.*, 2001). On ne peut qu'extrapoler sur la possibilité que cette association s'étende à d'autres tissus.

Tel que mentionné au début de la section sur cette protéine, Kell est un antigène localisé à la surface des érythrocytes. Son transcrite est par contre présent dans la moelle osseuse et dans le foie fœtal et il est probable qu'il ne soit exprimé que dans les tissus

érythroïdes (Lee *et coll.*, 1993). Cependant, l'ARNm de Kell a récemment été détecté dans d'autres tissus, notamment le cerveau, le cœur, la moelle épinière, le foie, le rein, les intestins, l'estomac, le muscle squelettique, le pancréas, le thymus, la glande thyroïde, la vessie, la prostate, le testicule, l'utérus, la glande mammaire, les ovaires et autres à moindre degré (Russo *et coll.*, 2000).

La protéine Kell ne semble pas posséder de fonction biologique indispensable car des individus chez qui elle n'est pas exprimée ne présentent aucun phénotype évident (Marsh, 1992 ; Redman et Lee, 1995). À l'opposé, les individus déficients en protéine XK souffrent du syndrome de Mcleod, caractérisé entre autres par une morphologie atypique des érythrocytes, par une dystrophie musculaire tardive, ainsi que des problèmes d'ordre neurologique (Danek *et coll.*, 2001). Cette observation laisse croire que la protéine XK aurait certaines fonctions physiologiques nécessairement distinctes de son association à Kell.

De nombreux essais ont été effectués afin d'évaluer l'activité enzymatique de Kell avec des peptides synthétiques et naturels qui sont des substrats de l'EPN. Cependant, Kell n'a pu hydrolyser aucune des molécules testées (revues par Marsh, 1992 ; Redman et Lee, 1995 ; Turner et Tanzawa, 1997). Par contre, Lee *et coll.* (1999) ont démontré que l'enzyme pouvait hydrolyser la Big endothéline 3 (BigET-3) entre les résidus Trp 21-Ile 22, résultant en endothéline-3. L'activité de Kell est maximale dans un environnement légèrement acide (pH 6 à 6.5). Kell peut aussi cliver la BigET-1 et 2 (générant ET-1 et ET-2, respectivement), mais avec une efficacité réduite. D'ailleurs, la formation d'hétérodimère XK-Kell n'affecte en rien l'activité enzymatique, tel qu'observé lors de l'hydrolyse *in vitro* de la BigET-3. Il est à noter que la pertinence physiologique de l'hydrolyse des Big ET par Kell reste à être démontrée.

1.7.4 PHEX

Le gène PHEX (***P**hosphate regulating gene with homologies to **e**ndoptidases on the **X** chromosome*), préalablement appelé PEX, fut identifié lors de la recherche du (des) gène(s) responsable(s) d'un type d'hypophosphatémie héréditaire, le rachitisme hypophosphatémique familial lié au chromosome X (XLH). XLH est une maladie à caractère dominant et s'affiche comme étant la forme la plus commune de rachitisme familial, démontrant une incidence d'un cas pour 20 000 naissances. Cette maladie est caractérisée par la diminution de la réabsorption du phosphate au niveau du rein et par un dérèglement du métabolisme de la vitamine D. Les manifestations cliniques les plus évidentes sont un retard de croissance, une petite stature, du rachitisme, des abcès au niveau des dents et une difformité des membres inférieurs. Plus de 157 mutations dans le gène PHEX sont répertoriées comme causant le XLH (www.phexdb.mcgill.ca).

Le gène isolé par clonage positionnel et une séquence partielle de la protéine qu'il encode ont révélé une similitude évidente avec l'EPN (*The HYP Consortium*, 1995). L'ADNc de PHEX de souris a d'abord été cloné en 1996 (Du *et coll.*, 1996), celui de l'humain a ensuite été caractérisé (Grieff *et coll.*, 1997 ; Lipman *et coll.*, 1998). PHEX est une protéine de 749 acides aminés dont la structure primaire présente une identité de 34% à celle de l'EPN. Les équivalents de tous les acides aminés importants pour l'activité enzymatique identifiés chez l'EPN sont retrouvés dans la séquence de PHEX, sauf l'arginine 102, suggérant que cette dernière fonctionne uniquement en tant qu'endopeptidase (Lipman *et coll.*, 1998). PHEX possède 9 sites potentiels de N-glycosylation et après maturation, la protéine se présente sous une forme de 100-105 kDa (Sabbagh *et coll.*, 2001 ; Boileau *et coll.*, 2001). 10 cystéines conservées par rapport aux autres membres de la famille de l'EPN sont retrouvées dans l'ectodomaine. Ces cystéines jouent, comme pour les autres protéines, un

rôle essentiel dans le maintien de la structure tridimensionnelle de la protéine (Oefner *et coll.*, 2000).

PHEX serait une protéine assurant l'homéostasie du phosphate (Econs *et coll.*, 1997 ; Rowe, 1998 ; Tenenhouse, 1999). En raison de ses similitudes avec les protéines de la famille de l'EPN, il a été proposé que l'implication de PHEX dans ce phénomène se situerait dans l'activation ou l'inactivation d'hormones peptidiques. Ces hormones joueraient un rôle dans la minéralisation osseuse, la réabsorption du phosphate au niveau du rein et dans le métabolisme de la vitamine D. La présence prédominante de son ARNm dans les os, au niveau des ostéoblastes (Du *et coll.*, 1996 ; Frota-Ruchon *et coll.*, 1998), et dans les dents, au niveau des odontoblastes (Frota-Ruchon *et coll.*, 1998), appuie cette thèse. Il reste néanmoins que l'ARNm de PHEX est également retrouvé, chez la souris, dans les poumons, les muscles, le cerveau et les testicules (Beck *et coll.*, 1997). Il est aussi exprimé dans les poumons, les ovaires, les muscles squelettiques et le foie des fœtus humains (Beck *et coll.*, 1997 ; Grieff *et coll.*, 1997), de même que dans les ovaires et les poumons des humains adultes (Grieff *et coll.*, 1997). Ceci suggère que PHEX pourrait également intervenir dans des processus non reliés à l'homéostasie du phosphate.

Toutefois, bien que pour la plupart des tissus étudiés l'expression de l'ARNm de PHEX ait été détectée par plus d'une technique (RT-PCR, protection à la RNase, buvardage de type Northern et/ou hybridation *in situ*), il n'en a pas été ainsi pour tous. En effet, pour certains tissus, comme le cerveau et les testicules, la seule méthode qui a été utilisée est la RT-PCR. Comme cette dernière est très sensible, elle peut, dans certaines conditions, permettre l'amplification de molécules apparentées à celle qui est recherchée. Les résultats obtenus doivent donc être interprétés avec prudence.

Une banque combinatoire de peptides synthétiques fluorogéniques testée sur une forme recombinante sécrétée et purifiée de PHEX a permis de caractériser la spécificité de clivage de l'enzyme (Campos *et coll.*, 2003). PHEX est caractérisée par sa spécificité stricte pour les résidus acides (de type glutamate, aspartate) au niveau de la position P'₁, avec une préférence pour un résidu aspartate. La position P'₂ montre une spécificité modérée pour les acides aminés avec des chaînes latérales aromatiques (de type phénylalanine ou tyrosine) ou polaire (sérine ou thréonine). Par contre, les substrats contenant une proline, une glycine ou une leucine à cette position ne sont pas hydrolysés par PHEX. Le site S₁, quant à lui, accepte beaucoup de résidus (mis à part l'histidine, l'isoleucine et la valine). Il est intéressant de remarquer que contrairement à l'EPN, le site S₁' de PHEX contient une arginine (basique) qui pourrait former un lien ionique avec la chaîne latérale du résidu aspartate du substrat. PHEX clive donc en N-terminal de résidus acides (les autres membres de la famille préfèrent les résidus hydrophobes). En dernier lieu, un résidu non amidé est généralement favorisé en position C-terminale, autant pour PHEX que pour l'EPN.

Un tableau montre les quelques substrats connus jusqu'à présent (Tableau VI). Le PTHrP_{1-34/38}, suivi de la leu-enképhaline, de FGF-23 et du peptide synthétique ZAAL-pNA sont hydrolysés par PHEX, *in vitro* (Lipman *et coll.*, 1998 ; Guo *et coll.* 2001 ; Bowe *et coll.*, 2001 ; Shirotani *et coll.*, 2001). Cependant, il faut demeurer critique face à ces résultats car, à l'exception de FGF-23, les résultats n'ont pu être confirmés (Lipman *et coll.*, 1998 ; Boileau *et coll.*, 2001). Notre groupe de recherche a pu identifier PTHrP₁₀₇₋₁₃₉ comme substrat, *in vitro*, qui est clivé à trois positions (toujours en N-terminal d'un résidu aspartate) (Boileau *et coll.*, 2001).

Il a été démontré que l'ostéocalcine peut jouer un rôle d'inhibiteur de PHEX, au même titre que le phosphate inorganique (P) ou que le pyrophosphate (PP) (Boileau *et coll.*, 2001). L'inhibition causée par l'ostéocalcine est contrecarrée par la présence de Ca^{2+} . Tous ces éléments sont naturellement retrouvés dans l'os, ce qui laisse croire qu'ils pourraient intervenir dans la modulation de la minéralisation. Le mécanisme demeure cependant encore flou, le défaut primaire de minéralisation osseuse et le problème de réabsorption de phosphate semblant dépendre d'un facteur circulant non identifié jusqu'à présent. Ce facteur inconnu, nommé phosphatonine, serait clivé par PHEX et ainsi le rôle de l'enzyme pourrait être associé au mécanisme.

Tableau VI : Substrats de PHEX

Substrats	Sites de clivage/séquence	K _m (μ M)	Références
PTHrP ₁₀₇₋₁₃₉	TRSAWL↓DSGVTGSGLEGDHLS↓DTSTT SLEL↓DSR	n.d.	(Boileau <i>et coll.</i> , 2001)
PTH _{1-34/38}	AVSEIQFMHNLGKHLSSMERVEWLRKK LQ↓DVHNFVALG	n.d.	(Lipman <i>et coll.</i> , 1998)
Leu-enképhaline	YGGFL	n.d.	(Guo <i>et coll.</i> , 2001)
FGF-23	Genebank no : AY336491.1	n.d.	(Bowe <i>et coll.</i> , 2001)
ZAAL-pNA		n.d.	(Shirotani <i>et coll.</i> , 2001)

↓ Site de coupure

1.7.5 SEP/NL1/NEP2

Une étude récente effectuée sur des souris ECE-1 $-/-$ montrait une quantité significative de peptides ET-1 maturés (Ikeda *et coll.*, 1999). Ce résultat suggérait qu'une ou plusieurs protéases puissent être impliquées dans cette maturation. Cette hypothèse a

permis l'identification d'une nouvelle métallopeptidase, nommée *Soluble Secreted Endopeptidase* (SEP). La séquence propose une protéine membranaire de type II. De manière surprenante, la transfection de cellules CHO (*Chinese hamster ovary*), a résulté en une accumulation de la protéine SEP dans la fraction membranaire, mais surtout dans le milieu de culture, suggérant la libération d'une forme sécrétée.

De manière parallèle, d'autres études utilisant la RT-PCR basée sur des régions conservées de l'EPN, ECE-1 et PHEX ont permis d'identifier la même protéine, connue sous le nom de *Neprilysin-like 1* (NL1) (Ghaddar *et coll.*, 2000). Chez le rat, cette protéine est connue sous le nom de NEP2 (Ouimet *et coll.*, 2000). Les séquences de souris et de rat étant identiques à 91%, il a été établi d'office qu'il s'agissait d'orthologues (Ouimet *et coll.*, 2000).

L'ADNc de SEP s'étend sur 2925 nucléotides et inclut une région 5' non traduite de 331 pb, une région codante de 2295 pb et région 3' non traduite de 299 pb (Ghaddar *et coll.*, 2000). Il encode une protéine de 765 acides aminés affichant les caractéristiques importantes de la famille de l'EPN. La séquence protéique est séparée en une queue N-terminale de 17 résidus, un domaine transmembranaire de 21 résidus et un ectodomaine de 727 résidus (en C-terminal). SEP possède 9 sites consensus de N-glycosylation, suggérant une structure très glycosylée. Il y a aussi dans l'ectodomaine, 10 cystéines qui sont conservées parmi les autres membres de la famille (Ikeda *et coll.*, 1999 ; Ghaddar *et coll.*, 2000).

Il a été démontré que le gène de souris SEP générerait deux protéines, SEP Δ (742 aa) et SEP (765 aa), la première séquence montrant une délétion de 69 paires de bases immédiatement après la séquence transmembranaire (Ikeda *et coll.*, 1999). Les séquences de SEP et SEP Δ sont identiques, à l'exception de cette délétion de 23 résidus dans le cas de

SEPA. Il a également été montré que SEP est sécrétée et que SEPA est intracellulaire. Il a donc été proposé que le court domaine de 23 acides aminés était responsable de la sécrétion. Une analyse de cette séquence permet d'ailleurs d'identifier une paire de résidus basiques, Lys₆₂-Arg₆₃, un site commun de clivage des précurseurs protéiques (Benjannet *et coll.*, 1997). Des études de mutagenèse du site, ainsi que des essais avec l' α 1-anti-trypsine Portland variant (α 1-PDX ou *α 1-anti-trypsin Portland variant*), un inhibiteur des convertases de type subtilisine (Ghaddar *et coll.*, 2000), ont permis de corroborer cette hypothèse. Des études d'immunofluorescence jumelées à l'utilisation d'endo H permettent d'avancer que la forme membranaire (SEPA) se retrouverait dans le RE (Ikeda *et coll.*, 1999). Une analyse des séquences démontre que SEPA est retenue dans le RE grâce à son domaine luminal (Raharjo *et coll.*, 2001). Il y aurait donc un isoforme de SEP sécrétée et un deuxième, lié à la membrane, présent dans le RE.

1.7.5.1 Distribution tissulaire

Des études de buvardage de type *Northern* révèlent une expression circonscrite du transcrit de SEP dans les testicules et les ovaires (Ikeda *et coll.*, 1999 ; Ghaddar *et coll.*, 2000). À l'opposé, des études de RT-PCR permettant d'amplifier les deux isoformes (SEP et SEPA) montrent des résultats positifs dans tous les tissus testés. Ces résultats permettent de proposer une expression dominante de SEP dans les testicules, alors que SEPA serait exprimée dans les autres tissus (Ikeda *et coll.*, 1999 ; Ghaddar *et coll.*, 2000).

Dans les testicules, le marquage est restreint aux cellules germinales de la face luminale des tubules séminifères. Ces cellules ont été identifiées comme étant des spermatides longs et allongés ; le marquage est visible à toutes les étapes de maturation de la

spermatogénèse. Les spermatozoïdes, les spermatocytes, les spermatogonies ou encore les cellules de Sertoli n'ont cependant montré aucun marquage (Ghaddar *et coll.*, 2000).

Le groupe de Ouimet *et coll.* (2000) a de plus démontré, que cette protéase est distribuée de façon hétérogène dans le système nerveux central. Cette distribution se fait de manière abondante dans plusieurs noyaux du tronc cérébral, dans l'hypothalamus, dans l'hypophyse et dans le mésencéphale, alors qu'une expression réduite est observée dans le cortex du tronc cérébral et l'hippocampe (Ouimet *et coll.*, 2000 ; Carpentier *et coll.*, 2003). Aucune expression ne peut être détectée lors des étapes embryonnaires et chez les nouveau-nés. L'expression était cependant évidente dans les cerveaux, l'hypophyse et la colonne vertébrale d'adultes. Dans le système nerveux central (SNC), les régions ventro-postérieures associées à certaines fonctions végétatives ont montré un marquage prédominant (Carpentier *et coll.*, 2003).

1.7.5.2 Caractéristiques enzymatiques

La caractérisation enzymatique de la forme sécrétée SEP montre que cette dernière hydrolyse plusieurs substrats de l'EPN et/ou de ECE : par exemple, BigET-1, ET-1, l'angiotensine, l'ANP, la bradykinine ou encore la substance P (Ikeda *et coll.*, 1999 ; Ghaddar *et coll.*, 2000 ; Rose *et coll.*, 2002 ; Carpentier *et coll.*, 2003). L'activité de SEP peut être inhibée par les inhibiteurs connus de l'EPN : 1, 10-phéphantroline, le phosphoramidon, et le thiorphan. Autant le phosphoramidon que le thiorphan inhibent l'activité SEP de manière dose-dépendante (Ikeda *et coll.*, 1999 ; Ghaddar *et coll.*, 2000). L'inhibiteur spécifique de ECE, FR901533, inhibe partiellement l'activité, alors que le captopril (inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine) n'inhibe pas l'activité de SEP (Ikeda *et coll.*, 1999). Le pH optimal semble être neutre (7.4), semblable à celui de l'EPN.

Toutefois, l'EPN et la SEP affichent des affinités distinctes par rapport aux inhibiteurs. Le thiorphan montre, par exemple, une affinité 30 fois supérieure pour l'EPN que pour la SEP (Rose *et coll.*, 2002). De plus, certaines différences sont observées quant à la préférence des résidus impliqués au site de clivage, notamment en P'₁ et P'₂ (Rose *et coll.*, 2002). Le tableau VII fait la synthèse des peptides clivés par SEP.

1.7.5.3 Phénotypes associés à la délétion du gène SEP/NL1/NEP2

Récemment, des souris NL1 *-/-* ont été générées (Carpentier *et coll.*, 2004). Ces souris sont viables et se développent normalement, indiquant qu'une expression zygotique de NL1 n'est pas essentielle lors des stades de développement. Toutefois, une réduction de fertilité résultant partiellement d'un retard dans la division cellulaire et dans le développement de l'œuf a été observé. Le phénotype semble prédominant chez les mâles, où on observe une diminution de la fertilité de l'ordre de 30%. Il est à noter que ces problèmes ne sont pas la résultante d'un déficit de la spermatogenèse, les paramètres étudiées affichant des valeurs normales. NL1 jouerait donc un rôle dans la fonction spermatique, probablement dans la capacité des spermatozoïdes à fertiliser les ovules.

Il a été proposé que la prohormone convertase PC4 soit impliquée, par le clivage au site consensus de la furine, dans la maturation de SEP. Les souris PC4 *-/-* affichent aussi une diminution de fertilité, avec cependant une incidence beaucoup plus marquée (Mbikai *et coll.*, 1997). L'hypothèse d'un rôle dans le contrôle de la fertilité est donc intéressante ; le mécanisme reste cependant à être élucidé.

Tableau VII : Substrats de SEP/NL1/NEP2

Substrats	Sites de clivage/séquence	K _m (μM)	Références
[3,5- ³ H] tyrosyl-D-Ala ² -Leu ⁵ -enképhaline		18	(Ghaddar <i>et coll.</i> , 2000)
[Leu ⁵]enképhaline	YGG↓FL	K _i = 3	(Ghaddar <i>et coll.</i> , 2000; Rose <i>et coll.</i> , 2002; Carpentier <i>et coll.</i> , 2003)
Suc AAF-AMC	Suc AA↓F-AMC	50	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
Suc AAV-AMC	Suc AA↓V-AMC	100	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
MeOSuc GLF-AMC	MeOSuc G↓LF-AMC	35	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
[Met ⁵]-enképhaline	YGG↓FM	19	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
[Met ⁵]-enképhaline-NH ₂	YGG↓FM-NH ₂	K _i = 25	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
[Des-Tyr ¹ , Met ⁵]enképhaline	GG↓FM	K _i = 14	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
[L-Ala ³ , Met ⁵]enképhaline	YGA↓FM	K _i = 30	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
[D-Ala ³ , Met ⁵]enképhaline	YG(dA)FM	K _i = 50	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
[Leu ⁵]enképhaline-NH ₂	YGG↓FL-NH ₂	K _i = 21	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
Cholécystokinine -8 (SO ₃ H)	DY(SO ₃ H)MG↓WMDF-NH ₂	K _i = 21	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
Cholécystokinine-8	DYMG↓WMDF-NH ₂	K _i = 50	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
Substance P	RPKPQQ↓FFG↓LM-NH ₂	K _i = 4	(Rose <i>et coll.</i> , 2002; Carpentier <i>et coll.</i> , 2003)
GnRH	pEHWSYG↓LRPG-NH ₂	K _i = 18	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
Angiotensine I	DRVYIHP↓FHL	K _i = 6	(Rose <i>et coll.</i> , 2002; Carpentier <i>et coll.</i> , 2003)
Bradykinine	RPPGFSP↓FR	K _i = 2	(Rose <i>et coll.</i> , 2002; Carpentier <i>et coll.</i> , 2003)
αANP (1-28)	...NS↓FRY	K _i = 12	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
NPY	YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYS ALRHYINLITRQRY-NH ₂	n.d.	(Carpentier <i>et coll.</i> , 2003)
Orexine B		n.d.	(Carpentier <i>et coll.</i> , 2003)
α-MSH	AcSYSMEHFRWGKPV-CO-NH ₂	n.d.	(Rose <i>et coll.</i> , 2002; Carpentier <i>et coll.</i> , 2003)
ACTH		n.d.	(Rose <i>et coll.</i> , 2002; Carpentier <i>et coll.</i> , 2003)
Angiotensine II	DRVYIHPF	n.d.	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
BigET-1 ₍₁₉₋₃₆₎		n.d.	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
VIP	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKK YLNSILN-NH ₂	n.d.	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
PACAP _{1-27}}	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKY LAAVL-NH ₂	n.d.	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
PACAP _{1-38}}		n.d.	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
Orphanine FQ		n.d.	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
Somatostatine-14	AGCKNFFWKTFTSC	n.d.	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
Somatostatine-28		n.d.	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
Neurotensine	pELYENKPRRP↓Y↓IL	n.d.	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
CRH		n.d.	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
galanine		n.d.	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
Oxytocine	CYIQNCPLG-NH ₂	n.d.	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
vasopressine		n.d.	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)

↓ Site de coupure

GHRH		n.d.	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
Gastrine	pEGPWLEEEEEAYGWMDF-NH ₂	n.d.	(Rose <i>et coll.</i> , 2002)
↓ Site de coupure			

Peptides identifiés comme non substrat de NL1 : l'heptapeptide enképhaline (YGGFMRF), endomorphine I (YPYF-NH₂), β -endorphine (YGGFM..... 31 aa) (Rose *et coll.*, 2002).

1.7.6 L'*Endothelin-converting enzyme-like 1* (ECE1)

Comme NEP2, l'*Endothelin-converting enzyme-like 1* (ECE1) a été identifiée récemment (Valdenaire *et coll.*, 1999 ; Kiryu-Seo *et coll.*, 2000 ; Kawamoto *et coll.*, 2003). L'ADNc complet de ECE1 fut obtenu par criblage d'une banque d'ADNc de cerveau humain (noyau caudé) avec un EST (*expressed sequence tag*) dont la séquence était similaire à l'ECE-1 (Valdenaire *et coll.*, 1999). L'ADNc, de 2859 pb, encode une protéine de 775 acides aminés, nommée XCE, pour *X-converting enzyme* (Valdenaire *et coll.*, 1999). Cette dénomination fait référence au caractère orphelin de l'enzyme car aucun substrat n'avait été identifié. L'enzyme est maintenant appelé ECE1 (Valdenaire et Schweizer, 2000).

De son côté, le groupe de Kiryu-Seo *et coll.* (2000) a tenté d'identifier des molécules étant régulées à la hausse en réponse aux dommages nerveux. À l'aide de la technique de *differential display PCR* (DD-PCR) utilisant les noyaux hypoglosses de rats normaux et axotomisés, ainsi qu'en effectuant un clonage aléatoire avec une librairie spécifique d'ADNc dérivée de noyaux hypoglosses de nerfs endommagés (Kiryu *et coll.*, 1995 ; Tanabe *et coll.*, 1999), ils ont réussi à cloner une peptidase chez le rat possédant une séquence primaire très similaire à celles des membres de la famille de l'EPN. Cette nouvelle protéine fut nommée DINE, pour *Damage-induced neuronal endopeptidase*, conséquence de l'augmentation marquée de son expression lors de certaines lésions neuronales.

Finalement, le groupe de Kawamoto *et coll.* (2003) a tenté d'identifier de nouveaux gènes exprimés de façon différentielle, entre les conditions favorables et non favorables de croissance de neuroblastomes. En utilisant une librairie d'ADNc provenant de différents sous-types de neuroblastomes, ils ont criblé la librairie en identifiant, par RT-PCR, l'expression différentielle de certaines gènes. Un de ces gènes possédait la caractéristique d'être fortement exprimé dans les neuroblastomes en conditions favorables, nommé Nbla03145. L'analyse de la séquence nucléotidique leur a permis de constater que ce gène était en fait celui de ECEL1.

1.7.6.1 Caractéristiques de la protéine ECEL1

Au niveau protéique, ECEL1 est identique à 42% à l'ECE-1 et à 37% à l'EPN. La comparaison des séquences protéiques de ECEL1/DINE de souris, de rat et d'humain révèle une identité supérieure à 94%, traduisant un niveau de conservation très élevé chez ces mammifères.

Ces 775 acides aminés forment une glycoprotéine transmembranaire de type II ayant un domaine N-terminal cytoplasmique de 59 acides aminés, un segment hautement hydrophobe de 23 acides aminés et un domaine C-terminal luminal de 693 acides aminés. Cette dernière région possède les caractéristiques retrouvées chez les autres membres de la famille, essentielles pour le repliement protéique ainsi que pour son activité enzymatique potentielle.

ECEL1 possède trois séquences consensus de N-glycosylation (Asn-{Pro}-Ser/Thr où {Pro} représente n'importe quel résidu mis à part une proline). Cette présence de sucres sur la protéine a été démontrée à l'aide de l'endoglycosidase PNGaseF (Valdenaire *et coll.*, 1999). La digestion provoque la diminution de la masse protéique d'environ 10 kDa,

équivalant à la masse de trois N-glycosylations. Les orthologues de rat et de souris en contiennent aussi trois.

ECEL1 possède 14 cystéines dans son domaine luminal, incluant les 10 cystéines conservées chez tous les membres de la famille. Chez l'EPN ces résidus cystéine sont impliquées dans la formation de ponts disulfure, et par le fait même, participent à la stabilisation de la conformation de l'enzyme (Tam *et coll.*, 1985; Oefner *et coll.*, 2000). Cette similitude laisse croire que la protéine ECEL1 doit adopter une structure tridimensionnelle très similaire à celle observée pour l'EPN, qui possède à la surface cellulaire, une structure globulaire très compacte (Kenny *et coll.*, 1983; Oefner *et coll.*, 2000).

Il a été montré que ECE-1 formait, grâce à la cystéine 416, des homodimères (Shimada *et coll.*, 1996). Il est intéressant de noter que bien que sa séquence s'apparente plus à celle de l'ECE-1 qu'à celle de l'EPN, ECEL1 ne contient pas de cystéine équivalente à la cystéine impliquée dans la formation de dimères covalents chez l'ECE-1 (Valdenaire *et coll.*, 1999). On pourrait donc penser que ECEL1 ne se présente pas sous forme dimérique. Néanmoins, une analyse électrophorétique en conditions non réductrices laisse croire que ECEL1 pourrait former des agrégats ou des oligomères (Valdenaire et Schweizer, 2000).

1.7.6.2 Régulation de l'expression du gène ECEL1

L'analyse de protection à la RNase suggère la présence d'un seul transcrit pour ECEL1 (Valdenaire *et coll.*, 1999). La région promotrice ne contient pas de boîte TATA mais contient une région riche en purines contenant des sites potentiels d'interaction pour certains facteurs de transcription, tels Sp1, boîte E (*E-box*). Ces derniers, seuls ou en combinaison, peuvent être nécessaires mais aussi suffisants pour promouvoir la transcription de certains gènes (Ji *et coll.*, 1997 ; Li et Seetharam, 1998 ; Vaishnav *et coll.*,

1998). On peut aussi supposer la présence de séquences potentielles de reconnaissance pour d'autres facteurs de transcription tels NF- κ B, etc.

Le groupe de Kiryu-Seo *et coll.* (2000) a identifié ECEL1 suite à des lésions neuronales. Des lésions de la moelle épinière, telles que celles résultant d'une scission des nerfs hypoglossaux, faciaux et sciatique ont provoqué une augmentation de l'expression du transcrit dans les motoneurones et neurones sensoriels dans les ganglions du tronc cérébral. Dans le cas de dommages axonaux du système nerveux central, des augmentations de la même amplitude ont été observés.

Il semble que cette augmentation soit rapide et stable; une augmentation du signal d'hybridation a été observée environ 6 heures après dommage neuronal. L'intensité atteint son zénith à 3 jours, puis régresse graduellement jusqu'à un niveau basal après 5 semaines (Kiryu-Seo *et coll.* 2000). Des dommages occasionnés au nerf sciatique augmentent significativement l'expression de DINE. Il y a jusqu'à 18% d'augmentation dans les 5 jours suivant les dommages neuronaux. Ce niveau d'expression se maintient pendant une période pouvant s'étendre à 60 jours suivant ces dommages.

L'injection de colchicine, qui bloque la polymérisation de tubuline et, du même fait, bloque le flot axonal, a aussi résulté en une augmentation drastique de l'expression de ECEL1.

Il est intéressant de mentionner que les proprotéines convertases (PC) ne sont pas régulées à la hausse lors de ces dommages (Kiryu-Seo *et coll.*, 2000), ECE subit une légère augmentation d'expression (Kiryu-Seo *et coll.*, 2000) et l'EPN est régulée à la baisse dans les motoneurones hypoglossaux axotomisés (Back et Gorenstein, 1994). Aucune augmentation d'expression de ECEL1 n'est observée suite à des stress psychologiques (stress

d'immobilisation), stress osmotiques (injection saline hypertonique), ou encore l'hyperactivation induite par la kainate (Kiryu-Seo *et coll.* 2000).

L'influence de facteurs neurotrophiques sur la régulation transcriptionnelle de DINE, autant *in vitro* qu'*in vivo*, a été étudiée (Kiryu-Seo *et coll.* 2000). Des facteurs tels que le *nerve growth factor* (NGF), le *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), le *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF), la *neurotrophine-3* (NT-3), l'*insulin-like growth factor I* (IGF-I), le *leukemia inhibitory factor* (LIF), le *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) et l'*interleukine-6* (IL-6) augmentent de façon marquée l'expression de DINE. Les observations ont permis l'identification de LIF comme facteur modulateur de l'expression de DINE. En utilisant un anticorps anti-gp130, reconnu pour bloquer la signalisation induite par des cytokines (telles que LIF, CNTF, IL-6), l'augmentation de l'expression de DINE disparaît.

Finalement, dans un autre ordre d'idées, l'hybridation *in situ* de ECEL1/DINE a confirmé des niveaux plus élevés d'expression de ECEL1 dans les souris *Hyp* (absence d'expression de PHEX) que dans des cellules normales. On observe aussi une augmentation d'EPN (Dubois *et coll.*, 2002).

1.7.6.3 Distribution tissulaire

Suivant les techniques utilisées, le transcrite de ECEL1 semble exprimé dans un spectre très étendu de tissus. On peut noter une certaine variation chez les différentes espèces étudiées (que ce soit le rat, la souris ou l'humain), ce qui peut s'expliquer partiellement par les différentes méthodes employées.

Cependant, il reste clair que les plus forts patrons d'expression sont retrouvés dans le système nerveux central (SNC). On retrouve aussi l'ARNm de ECEL1 dans l'utérus, les ganglions sympathiques, les muscles squelettiques, le pancréas et les ovaires chez ces trois

espèces (Valdenaire *et coll.*, 1999, Kiryu-Seo *et coll.*, 2000). Dans le SNC, il est exprimé abondamment dans la moelle épinière, la medulla, le noyau subthalamique et le putamen. Il est également présent en quantité importante dans le noyau caudal, le thalamus et l'amygdale (Valdenaire *et coll.*, 1999).

Dans les tissus du SNC, ECEL1/DINE n'est pas exprimée dans les cellules gliales (comme les cellules de Schwann, les oligodendrocytes, les astrocytes ou les microglies) mais semble circonscrite aux cellules neuronales.

1.7.6.4 Caractérisation enzymatique de ECEL1

ECEL1 conserve jusqu'à maintenant tout son mystère quant à son activité peptidasique. Il a cependant été rapporté que l'orthologue chez le rat, la DINE, possède une activité caractéristique des métallopeptidases. La DINE tronquée de sa région intracellulaire et transmembranaire (produite dans des cellules Sf9, en utilisant un système d'expression baculovirus), hydrolyse un substrat synthétique fluorescent, soit Z-Gly-Gly-Leu-pNA – un substrat aussi hydrolysé par l'EPN. Le phosphoramidon, l'EDTA (un chélateur d'ion bivalents), la 1,10-phenantroline ainsi que le thiorphan bloquent cette hydrolyse. Ces résultats laissent croire que DINE posséderait les caractéristiques pharmacologiques et enzymatiques d'une métallopeptidase, tout au moins de l'ordre de celles retrouvées pour l'EPN (Kiryu-Seo *et coll.*, 2000).

Les tentatives d'identification de substrats biologiques se sont révélées infructueuses. En utilisant des préparations membranaires de cellules CHO-K1 ainsi que de cellules HeLa, toutes deux transfectées, Valdenaire *et coll.* (1999) se sont butés à une accumulation de résultats négatifs concernant les peptides ET-1, préET-1, galanine, calcitonine, bradykinine, met-enképhaline et leu-enképhaline. De plus, l'analyse de la

conversion des trois préET (préET-1, préET-2, préET-3) par ECEL1, vérifiée par essai radioimmunologique, s'est avérée négative.

1.7.6.5 Rôles de ECEL1

Malgré le fait qu'aucun substrat naturel ne soit connu pour le moment, il demeure que ECEL1 semble impliquée dans certains mécanismes physiologiques.

1.7.6.5.1 *Implication de ECEL1 dans le contrôle de la respiration autonome*

En 1999, le groupe de Schweizer *et coll.* (1999) a montré un rôle fonctionnel de ECEL1. C'est en effet par l'inactivation du gène ECEL1 que des résultats très intéressants ont été mis à jour. Tous les homozygotes négatifs ont montré les mêmes caractéristiques : les nouveaux-nés peuvent ouvrir leur mâchoire mais demeurent cyanosés (contrairement aux sauvages qui tournent au rose après quelques minutes) et meurent d'anoxie après 10-30 minutes. Aucun homozygote n'a survécu au-delà de ce stade néonatal, ce qui suggère que ECEL1 jouerait un rôle physiologique essentiel (Schweizer *et coll.*, 1999).

L'examen des poumons a montré une absence de ventilation pour la vaste majorité des nouveaux-nés homozygotes négatifs. Toutefois, les problèmes respiratoires ne sont pas dus à une occlusion de la trachée. Au stade néonatal, ces souris meurent rapidement à cause d'une absence de respiration, ce qui suggère que ECEL1 est importante dans le contrôle autonome de la respiration. L'atélectasie congénitale a été observée sur 75% des animaux analysés. Sur les autres 25%, 60% d'entre eux étaient seulement minimalement aérés (en contraste, les poumons des sauvages étaient tous normalement aérés). Mis à part l'atélectasie, la structure pulmonaire n'a montré aucune anomalie (Schweizer *et coll.*, 1999).

L'arrêt respiratoire postnatal n'est pas dû à la déficience en surfactants : les protéines SP-A, SP-B, SP-C et SP-D affichent des niveaux d'expression transcriptionnelle normaux. Il est connu que la délétion du gène de la protéine surfactante B résulte en une détresse respiratoire postnatale létale accompagnée d'atélectasie (Clark *et coll.*, 1995; Tokieda *et coll.*, 1997). Aucun changement n'est retrouvé en regard à la protéine *Clara cell 10-kDa* (CC10), un autre marqueur de différenciation pulmonaire (Schweizer *et coll.*, 1999). Le problème n'est donc peut-être pas intrinsèque à cet organe. Finalement, il y a absence de malformation thoracique, éliminant la possibilité d'un problème mécanique (i.e. obstruction des voies respiratoires). Des examens viscéraux et histopathologiques d'embryons de 18.5 jours (E18.5) ne montrent aucune anomalie anatomique spécifique à l'invalidation. Aucun changement dans la morphologie ainsi que dans la distribution des cellules neuronales n'a été détecté.

La respiration autonome spontanée est contrôlée par le centre respiratoire localisé dans la medulla et transmis, via la moelle épinière, à des motoneurones qui contrôlent les muscles respiratoires. Chez le rat, par exemple, les neurones respiratoires phasiques ont été localisés dans la partie ventrale du bulbe rachidien (Bystrzycka et Nail, 1985). Ceci revêt une importance cruciale car ce sont des tissus à haut niveau d'expression de ECEL1. Il est possible que des changements subtils dans ces structures provoquent la perte de fonction vitale. Ces changements pourraient, par exemple, toucher les connections synaptiques ou de transmission. ECEL1 pourrait donc servir à la maturation d'un ou plusieurs transmetteurs neuropeptidiques impliqués dans la respiration (Schweizer *et coll.*, 1999).

1.7.6.5.2 *Implication de ECEL1/DINE dans la survie lors de lésions cellulaires*

Les cellules COS-7 transfectées avec la DINE montrent une plus grande résistance

lorsqu'elles sont exposées au C2-ceramide. Même si le mécanisme responsable de la mort cellulaire induite par le C2-ceramide n'est pas bien compris, il semble évident qu'il y a une diminution rapide de phosphorylation oxydative mitochondriale suivie par une augmentation de la génération de radicaux d'oxygène (France-Lanord *et coll.*, 1997). L'expression d'ARNm d'enzymes anti-oxydantes telles la Cu/Zn-superoxyde dismutase (Cu/Zn-SOD), la Mn-superoxyde dismutase (Mn-SOD) et la glutathione peroxydase (GPX) est augmentée dans ces cellules transfectées exprimant ECEL1/DINE. De plus, l'activité de SOD est aussi induite. Ceci suggère que l'activité catalytique de ECEL1/DINE provoque un signal intracellulaire induisant la transcription de ces enzymes, qui sont essentielles pour la réduction du stress oxydatif causé par la production de radicaux libres. Mn-SOD est une molécule de réponse au stress, ce qui explique son induction lors de dommages nerveux. Il est possible qu'un mécanisme protéolytique soit en jeu lors de dommages neuronaux.

On note que les ECE et EPN sont, comme ECEL1/DINE, impliquées dans une activité indirecte de protection neuronale. Ces membres joueraient donc peut-être des rôles neuroprotecteurs (Carson et Turner, 2002). La ECEL1/DINE pourrait, de plus, avoir une fonction potentielle dans la régénération de neurones sensoriels endommagés ainsi que dans la douleur neuropathique (i.e. allodynie) (Kiryu-Seo *et coll.*, 2000).

1.7.6.5.3 *ECEL1 pourrait être impliquée dans la régulation tumorale*

Les neuroblastomes sont des tumeurs embryonnaires de cellules neuroectodermes dérivées de la crête neurale et destinées à la formation de la médullosurrénale et du système nerveux sympathique. Cette pathologie représente 6% des cas de cancers infantiles (Castleberry, 1997). Les mécanismes moléculaires de croissance, de différenciation et de

mort cellulaire programmée de neuroblastomes sont peu connus. On sait cependant que les cellules tumorales de neuroblastomes affichent des combinaisons complexes d'aberrations génétiques acquises telles, entre autres, un changement ploïdique, des délétions de bras chromosomiques 1p et 11q, une amplification de l'oncogène MYCN et, plus fréquemment, des gains de bras chromosomiques 17q (Bown, 2001). Certaines de ces anomalies sont de puissants marqueurs pronostiques. Alors que les tumeurs survenant chez des patients de plus d'un an sont souvent agressives et provoquent la mort précoce, celles de patients de moins d'un an régressent de manière spontanée (Evans *et coll.*, 1976).

L'expression de ECEL1 est considérablement accrue lors des étapes précoces du développement de neuroblastomes, mais elle a ensuite tendance à diminuer spontanément (Kawamoto *et coll.*, 2003). Par l'accumulation d'évidences, il a été suggéré que les endothélines, notamment l'ET-3, jouent un rôle important dans le développement de lignées cellulaires dérivées de la crête neurale, de neurones ganglionnaires myentériques ainsi que de mélanocytes épidermiques (Baynash *et coll.*, 1994). L'équipe de Kawamoto *et coll.* (2003) a de plus rapporté que l'expression de ECEL1 était associée directement à celle du récepteur tyrosine kinase, TrkA. À partir de cette observation, ils ont proposé un lien potentiel entre un substrat ou ligand de ECEL1 et TrkA. D'une certaine façon, ECEL1 pourrait jouer un rôle dans la croissance de neuroblastomes – les mécanismes l'impliquant restent cependant à élucider (Kawamoto *et coll.*, 2003).

1.8 Description du projet de recherche

Il y a 30 ans, Kerr et Kenny (1974) rapportaient la caractérisation d'une nouvelle peptidase qu'ils nommaient endopeptidase neutre. Au cours des années passées, l'endopeptidase neutre a été étudiée sous plusieurs aspects. Mais ce n'est qu'au cours de la dernière décennie que l'identification et la caractérisation biochimique d'autres protéines affichant des similitudes significatives avec l'EPN ont été rapportées. Cette découverte de nouvelles peptidases a permis l'établissement d'une nouvelle famille d'enzymes dont l'EPN aura été le prototype. De récents travaux ont souligné l'importance physiologique de l'EPN, mais aussi des ECE (enzymes de conversion de l'endothéline), de PHEX (*Phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome*) et de KELL. L'EPN et les ECE sont actuellement des cibles thérapeutiques très intéressantes. L'élargissement de cette famille permet évidemment le ciblage de nouvelles voies physiopathologiques, mais demande l'élaboration d'inhibiteurs de métallopeptidases beaucoup plus spécifiques.

Lors de mon arrivée dans le laboratoire, une toute récente stratégie de RT-PCR venait d'être conçue. Celle-ci avait été préparée dans l'espoir d'identifier de nouveaux membres de la famille de l'EPN. À cet effet, les résultats n'ont pas tardé à suivre : un fragment d'ADNc, correspondant à un nouveau membre de la famille nommé NL1 (*NEP-like 1*), avait été obtenu à partir de testicules de souris. Suivant cette découverte, un autre fragment d'ADNc provenant d'une banque de cerveau s'est révélé correspondre à un autre membre, appelé aujourd'hui ECEL1 (*endothelin-converting enzyme-like 1*).

Mon projet de doctorat a donc débuté par le clonage et le séquençage de l'ADNc complet de ECEL1. La séquence de cet ADNc a été définie et la séquence en acides aminés déduite à partir de celui-ci a été analysée. Une des premières étapes aura été la

production d'un anticorps monoclonal de souris, ce qui nous a permis d'effectuer la plupart des autres expériences qui ont suivi. Comme il le sera démontré (Chapitre 3), cet anticorps s'est avéré extrêmement spécifique à ECEL1, ne reconnaissant aucun des autres membres de la famille. Ensuite, nous avons utilisé l'ADNc ECEL1 cloné dans un vecteur d'expression eucaryote pour transfecter des lignées cellulaires HEK293 (*human embryonic kidney cells*) et LLC-PK₁ (*porcine kidney cells*) et ainsi produire la protéine. Les principaux objectifs de mes travaux ont donc été de :

- 1) Cloner l'ADNc de ECEL1;
- 2) Produire un anticorps monoclonal anti-ECEL1;
- 3) Déterminer la localisation sous-cellulaire de ECEL1;
- 4) Comprendre et étudier les mécanismes responsables de cette localisation;
- 5) Entreprendre l'étude de la stabilité protéique de ECEL1;
- 6) Produire et purifier une protéine chimérique permettant la sécrétion de l'ectodomaine de ECEL1 qui englobe les résidus formant le site actif;
- 7) Identifier un substrat et caractériser l'activité enzymatique de ECEL1;
- 8) Étudier l'effet de certaines conditions physiologiques sur la régulation du gène ECEL1.

Ces différentes étapes nous ont permis d'acquérir une quantité appréciable d'informations sur ECEL1, que vous trouverez dans les sections subséquentes. Ces informations nous ont permis, d'une part d'intégrer ECEL1 dans la famille de l'EPN, de par son identité de séquence primaire ainsi que par l'homologie structurale de la protéine ECEL1 envers les autres membres connus; d'autre part, de se rendre compte que ECEL1 possédait des caractéristiques particulières et distinctes en comparaison aux autres membres. C'est donc surtout cette dernière facette qui donne tout le lustre à ces travaux.

CHAPITRE 2 – MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Clonage de ECEL1 humain et construction de vecteurs d'expression

Toutes les manipulations ont été effectuées suivant les protocoles standards (Ausubel *et coll.*, 1988 ; Sambrook et Russel, 2001). L'ADNc complet de ECEL1 humain a été obtenu par criblage d'une librairie d'ADNc de cerveau humain λ gt10 (Clontech) en utilisant comme amorce un ADNc de ECEL1 humain partiel obtenu par clonage d'homologie tel que décrit précédemment (Ghaddar *et coll.*, 2000). Un clone de 2800 pb a été isolé et son séquençage a révélé une séquence nucléotidique pratiquement identique à celle rapportée par Valdenaire *et coll.* et initialement appelée XCE (Valdenaire *et coll.*, 1999).

Pour l'expression de la protéine ECEL1 humaine dans des cellules de mammifère en culture, un fragment d'ADN HindIII/XbaI contenant 200 nucléotides de la région 5' non traduite, la région codante entière et 339 nucléotides de la région 3' non traduite de l'ARNm de ECEL1 a été cloné dans un vecteur pCDNA3/RSV (Jockers *et coll.*, 1996), résultant en plasmide pwtECEL1. Ce vecteur contient, de plus, le gène de l'aminoglycoside phosphotransférase, qui confère une résistance à l'antibiotique généticine (G418).

2.2 Production d'anticorps monoclonaux

2.2.1 Construction du vecteur plasmidique

Un plasmide permettant la production d'une protéine de fusion GST-ECEL1 dans *Escherichia coli* a été construit en utilisant le vecteur d'expression pGEX-2T (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Baie d'Urfé, Canada). La Vent polymérase (New England Biolabs, Mississauga, ON, Canada) ainsi que l'ADNc de ECEL1 ont été utilisés pour amplifier, par PCR, un fragment de 969 pb à l'aide de l'amorce sens 5'-CGGATCCGACAAGCTCACCTCTGGCACCATC-3' (commençant à Asp₁₄₂ de la séquence publiée (Valdenaire *et coll.*, 1999)) et l'amorce anti-sens 5'-CGAATTCTCAGGCAGCTGAGAAGTCTCATGTAC-3' (termine à Ala₄₆₅ de la séquence publiée (Valdenaire *et coll.*, 1999)) contenant respectivement les sites de restriction *Bam*HI et *Eco*RI (soulignés dans les séquences). La PCR a été effectuée dans un thermocycleur Peltier (MJ Research Inc., Boston, MA) avec 200 ng d'ADNc ECEL1 et 1 µl de Vent polymérase dans un volume final de 100 µl, contenant 1 mM MgSO₄, 2 µM de chaque oligonucléotide, 200 µM de dNTP et 5% DMSO. La réaction de PCR s'est déroulée comme suit : une étape initiale de dénaturation de 5 min à 94°C, suivie de 25 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 42°C et 1.5 min à 72°C. Une étape d'extension finale a été effectuée à 72°C pendant 10 min. pGEX-2T et le produit de PCR ont été digérés par *Bam*HI et *Eco*RI, puis soumis à une ligation à l'aide de la DNA ligase.

2.2.2 Production et purification de l'antigène

La souche *Escherichia coli* AP 401 protéase (-) a été transformée à l'aide du plasmide de fusion GST/ECEL1, pour permettre l'expression de cette protéine de fusion. La

purification protéique a été effectuée à 4°C en présence des inhibiteurs de protéases aprotinine (2 µg/ml) (Sigma), leupeptine (0.5 µg/ml) (Sigma) et PMSF (*Phenylmethylsulfonylfluoride*) (100 µg/ml) (Sigma). Le clivage de GST/ECEL1 a été réalisé grâce à la thrombine, en suivant les recommandations du protocole *GST Gene Fusion System* (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Baie d'Urfé, Canada).

L'échantillon a ensuite été séparé par SDS-PAGE sur gel 12%. Les extrémités du gel (des portions du puits) ont été découpées puis colorées au bleu de Coomassie. La portion du gel correspondant à la bande de l'antigène a été découpée puis fragmentée afin de permettre un rendement adéquat lors de l'électroélution. L'électroélution ainsi que l'électrodialyse du SDS de l'échantillon ont été effectuées tel que proposé dans le protocole *Electro-Elution* (BioRad). L'échantillon a ensuite été dosé par SDS-PAGE sur gel 12%.

2.2.3 Immunisation

L'immunisation de 6 souris Balb/c de 60 jours a été effectuée à l'aide de 10 µg du fragment purifié additionné de 10 µg d'adjuvant de Freund complet (Gibco) pour la première injection et d'adjuvant de Freund incomplet pour les injections subséquentes. L'antigène a été injecté 4 fois, de façon intra-péritonéale, à intervalles de 3 semaines. Une injection de rappel sans adjuvant de Freund a été effectuée 4 jours avant la fusion des cellules de rate des souris immunisées et de myélomes en culture de lignée P3x63.AG.653 (ATCC). La fusion a été effectuée telle que décrit par Goding *et coll.*, 1980.

2.2.4 Sélection clonale

Les surnageants de culture des hybridomes ont été testés pour leur réactivité par analyses ELISA, effectuées sur des plaques de polystyrène prétraitées à la glutaraldéhyde et

recouvertes d'antigène ECEL1 (Evan, 1984). Parmi les clones jugés positifs aux tests ELISA, plusieurs clones se sont avérés positifs par immunobuvardage de type Western. Un clone d'hybridome a été amplifié et injecté dans la cavité péritonéale de souris traitées au pristane. Le fluide d'ascite a été récolté, puis utilisé dans des expériences subséquentes. Cet anticorps monoclonal a été nommé 7B6.

2.3 Constructions plasmidiques

2.3.1 Construction de chimères ECEL1/EPN

Pour construire la chimère E/N/N (E : ECEL1 ; N : EPN ou NEP ; cytosolique/transmembranaire/ectodomaine, respectivement), le domaine cytosolique de ECEL1 a été fusionné au domaine transmembranaire et l'ectodomaine de l'EPN par des techniques requérant l'utilisation de la PCR (Yang *et coll.*, 1994), en utilisant les oligonucléotides 5'-GGTCTGACATGGATTGG-3' et 5'-CAGGACAAGGACCGAGAGGCTGATCTCCTCGCGCCGGTTCCAGCGCGGCAG-3', ainsi que 5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3' et 5'-CTGCCGCGCTGGAACCGGCGCGAGGAGATCAGCCTCTCGGTCCTTGTCCTG-3' comme amorces, résultant en pCDNA3/RSV-E/N/N.

Pour construire la chimère E/E/N, les domaines cytosolique et transmembranaire de ECEL1 ont été fusionnés à l'ectodomaine de l'EPN par PCR tel que décrit précédemment, en utilisant les oligonucléotides 5'-GGTCTGACATGGATTGG-3' et 5'-AGTCTGATGACTTGCAAATACCATCATCGAGGGCCAGCATAGCCGCCAGAATGGC-3', ainsi que 5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3' et 5'-

GCCATTCTGGCGGCTATGCTGGCCCTCGATGATGGTATTTGCAAGTCATCAG
ACT-3' comme amorces, résultant en pCDNA3/RSV-E/E/N.

Pour construire la chimère N/E/N, le domaine transmembranaire de l'EPN a été remplacé par celui d'ECEL1 dans le vecteur pRC/CMV-NEP (Lanctôt *et coll.*, 1995), en amplifiant par PCR le vecteur en entier (*all-around PCR*). Pour ce faire, les oligonucléotides contenant la séquence nucléotidique du domaine transmembranaire de ECEL1 ont été utilisés :

GAAGAAACAGCGATGGACTCGACTGGTGTGCCTGCTGTCGGGGCTGGTGTT
CGCCGCCG-3' 5'-
et 5'-
ATGCAGTCTGATGACTTGCAATACCATCATCGAGGGCCAGCATAGCCGCCAG
AATGGCGCAGAGGC-3'. Cette amplification a résulté en un vecteur nommé
pRC/CMV-N/E/N.

La purification des fragments d'ADN amplifiés par PCR a été effectuée en utilisant la trousse de purification de PCR QIAquick (Qiagen). Les réactions de PCR ont été réalisées en utilisant la Pfu DNA polymérase (Stratagene). Les vecteurs résultants ont été vérifiés par séquençage nucléotidique.

2.3.2 Construction de la chimère NEP2-ECEL1

Pour construire la chimère NEP2-ECEL1, les domaines cytosolique et transmembranaire ainsi que le début de l'ectodomaine de NEP2 ont été fusionnés à l'ectodomaine de ECEL1 par PCR tel que décrit précédemment, en utilisant les oligonucléotides

CTGGGATGAGAGGACGGTTGTAACGAAAGTACCTGGGCCCCGGTTCGCGGC
CGGC-3' et 5'-CTGTTCCACAGCGTCTGCACC-3', ainsi que 5'-

ATGGTGGAGAGAGCAGGCTGGTG-3' et 5'-
 GCCGGCCGCGACCGGGCCCAGGTACTTTTCGTTTTACAACCGTCCTCTCATCCC
 AG -3' comme amorces. Une première PCR a servi à amplifier les deux fragments, qui ont
 servi par la suite dans l'obtention du produit final, lors de la deuxième amplification,
 résultant en pCDNA3/RSV-NEP2-ECEL1.

La purification du fragment d'ADN amplifié par PCR a été effectuée en utilisant la
 trousse de purification de PCR QIAquick (Qiagen). Les réactions de PCR ont été réalisées
 en utilisant la Pfu DNA polymérase (Stratagene). Le vecteur résultant a été vérifié par
 séquençage nucléotidique.

2.3.3 Construction du mutant ECEL1 C95G/C99G/P100C/F105C

Le quadruple mutant C95G/C99G/P100C/F105C a été construit par des
 techniques requérant l'utilisation de la PCR (Yang *et coll.*, 1994), en utilisant les
 oligonucléotides 5'-GGCGGCGGCGCCGGTCCCGAGGGCGGCCCTGAGCGCAAG-
 3' et 5'-CTTGCGCTCAGGGCGGCCCTCGGGACCGGCGCCGCCG-3', ainsi que
 5'-
 GGTCCCGAGGGCGGCTGTGAGCGCAAGGCCTGCGCGCGCCGCTCGCTTC-
 3' et 5'-
 GAAGCGAGCGGCGCGCGCAGGCCTTGCCTCACAGCCGCCCTCGGGACC-
 3' comme amorces, résultant en pCDNA3/RSV-ECEL1-C95G/C99G/P100C/F105C.

La purification des fragments d'ADN amplifiés par PCR a été effectuée en utilisant
 la trousse de purification de PCR QIAquick (Qiagen). Les réactions de PCR ont été
 réalisées en utilisant la Vent DNA polymérase (New England Biolabs). Le vecteur résultant
 a été vérifié par séquençage nucléotidique.

2.4 Transfections, culture cellulaire et immunobuvardage

Des cellules de la lignée cellulaire de rein embryonnaire humain, HEK-293 (ATCC no. : CRL-1573) ont été mises en culture, puis transfectées par la méthode de calcium phosphate tel que décrit précédemment (Sabbagh *et coll.*, 2001). Les cellules transfectées stables ont été sélectionnées en ajoutant 4% G418 (BRL Life Technologies, Burlington, ON, Canada) et maintenues dans un milieu DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) (BRL Life Technologies, Burlington, ON, Canada) supplémenté de 10% de sérum bovin fœtal (Medicorp) à 37°C sous 5%CO₂ et 95% air. Vingt-quatre heures avant l'analyse de l'expression protéique, du butyrate de sodium a été ajouté dans le milieu de culture à une concentration finale de 10 mM pour stimuler la production de protéines.

L'expression des protéines ECEL1, PHEX, EPN et NEP2 a été, tel que décrit précédemment, détectée par analyse d'immunobuvardage sur les extraits cellulaires et le milieu de culture (Ghaddar *et coll.*, 2000) en utilisant respectivement les anticorps monoclonaux spécifiques 7B6, 13B12 (Frota-Ruchon *et coll.*, 2000a), 18B5 (Frota-Ruchon *et coll.*, 2000b) ou les anticorps polyclonaux de souris (Ghaddar *et coll.*, 2000). L'état de glycosylation des protéines a été déterminé par digestion par des endoglycosidases appropriées tel que décrit précédemment (Ghaddar *et coll.*, 2000).

Des cellules LLC-PK₁ (*porcine kidney cells*; ATCC #CL-101) maintenues en culture dans du milieu 199 (Gibco/BRL) supplémenté avec 5% (v/v) de sérum bovin fœtal (Medicorp), 100 µg/ml de pénicilline (Gibco/BRL), 100 µg/ml de streptomycine (Gibco/BRL) et 0,25 µg/ml de fongizone (Gibco/BRL) ont été transfectées avec le vecteur pCDNA3/RSV/ECEL1 ou pCDNA3/RSV/NEP2-ECEL1 par la méthode de co-précipitation au calcium phosphate-ADN (Chen et Okayama, 1987). Ces cellules ont servi

notamment à la production d'une forme sécrétée de l'ectodomaine de ECEL1, accumulée dans le milieu de culture.

D'autres lignées cellulaires ont été utilisées au cours de ce travail. Elles ont été maintenues dans un milieu de culture approprié. La lignée cellulaire Neuro₂A (ATCC#CCL-131) a été mise en culture dans le milieu DMEM (BRL Life Technologies, Burlington, ON, Canada) complété de 10% (v/v) de sérum bovin fœtal (Medicorp). La lignée cellulaire MC3T3 (ATCC# CRL-1658) a été mise en culture dans le milieu α MEM (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). La lignée cellulaire GH3 (ATCC#CCL-82.1) a été mise en culture dans le milieu F12 (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) complété de 12.5% (v/v) de cosmic (HyClone Laboratories) et de 2.5% de sérum bovin fœtal (Medicorp). Les cellules AtT-20 (ATCC #CCL-89) ont été mises en culture dans le milieu DMEM complété de 15% (v/v) de cosmic. Lors de la récupération des cellules, le milieu est enlevé et les cellules sont lavées deux fois dans du PBS (1.06 mM KH₂PO₄, 2.97 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 155.17 mM NaCl, pH7.4) froid. Par la suite, un bâtonnet est utilisé pour faire décoller les cellules dans 5 ml de PBS froid. Les cellules récupérées sont centrifugées (300 g), puis le surnageant de PBS est éliminé. Une solution de PBS 1% N-octylglucoside est ajoutée (200 μ l) et l'incubation se prolonge pendant une heure à 4°C. Par la suite, une centrifugation de 15 minutes à 15 000 g à 4°C est effectuée et le surnageant est récupéré. Des échantillons de 30 μ l sont déposés sur gel SDS-PAGE 7.5%. Un transfert sur membrane de nitrocellulose suit et sert pour l'immunobuvardage de type Western avec l'anticorps anti-ECEL1 7B6.

2.5 Biotinylation des protéines de la surface cellulaire

Les cellules HEK-293 transfectées de façon stable ont été mises en culture à une densité de 2×10^5 cellules par puit, sur une plaque de 24 puits et, ce, pendant 3 jours ; le milieu a ensuite été remplacé 24 heures avant l'expérience par un milieu contenant 10mM de butyrate de sodium.

Toutes les étapes subséquentes ont été effectuées à 4°C tel que décrit précédemment (Daniels *et coll.*, 1998). Les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS (1 ml) contenant 0.1 mM CaCl_2 et 1 mM MgCl_2 (PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+}). Les cellules ont ensuite été incubées avec la NHS-SS-biotine (2 mg/ml ; Pierce, Rockford, IL) dans le tampon de biotinylation (100 μl) (2 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl, 10 mM triethanolamine, pH 8.0) pendant 25 minutes avec une légère agitation. Les cellules ont été lavées avec du tampon de biotinylation (1 ml), et la procédure de marquage a été répétée dans les mêmes conditions. La NHS-SS-biotine non liée a été inactivée grâce à l'addition d'un tampon d'inactivation (1 ml) (*quenching buffer*) (100 mM glycine dans le PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+}). Les cellules ont par la suite été lavées deux fois avec le tampon d'inactivation (1 ml), puis incubées dans le même milieu (1 ml) pendant 20 minutes avec une légère agitation ; elles ont ensuite été rincées deux fois avec 1 ml de PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} .

Les cellules ont par la suite été récupérées, puis solubilisées par incubation dans un tampon de lyse (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7.5) pendant 60 minutes à 4°C (1 ml). Les lysats ont été clarifiés par centrifugation à 14000 g pendant 30 minutes. Les protéines marquées à la biotine ont été séparées des autres protéines en ajoutant 0.2 ml de résine NeutrAvidin (Pierce, Rockford, IL) à 0.9 ml de lysat clarifié, puis en incubant à 4°C pendant 16 heures sous rotation constante. La résine a été

récupérée par centrifugation à 5000g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant a été retiré et conservé pour une analyse ultérieure. Le culot a été lavé trois fois avec un tampon de lyse (1 ml), deux fois avec un tampon de lavage riche en sel (1 ml) (0.1% Triton X-100, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7.5), et une fois avec un tampon de lavage sans sel (1 ml) (50 mM Tris, pH 7.5). Il a finalement été mis en suspension dans 0.15 ml de tampon Laemmli (Laemmli, 1970) contenant 143 mM 2-mercaptoethanol.

Les échantillons protéiques ont été déposés sur gel SDS-PAGE 7.5% puis analysés par immunobuvardage. La détection a d'abord été effectuée avec l'anticorps monoclonal 7B6. Par la suite, pour éliminer la possibilité que des protéines intracellulaires soient biotinylées, le buvardage a été refait à l'aide d'un anti-actine de lapin.

2.6 Fractionnement sous-cellulaire

Cinq pétris de 100 mm confluents de cellules HEK-293 transfectées ont été lavés deux fois avec du PBS froid (5 ml) avant la récupération des cellules (à l'aide d'un grattoir). Les cellules ont été culottées à 300 g pendant 5 minutes, puis mises en solution dans 2 ml de tampon d'homogénéisation (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 12.5% sucrose, 50 mM EDTA, 1 mM pepstatine A, 2 µg/ml leupeptine, 2 µg/ml aprotinine, 0.6 mM PMSF and 2 mM β-mercaptoethanol). Les cellules ont été homogénéisées à l'aide d'un homogénéisateur potter Elvehjem à 4°C et centrifugées à 1000 g à 4°C pendant 15 minutes. Le surnageant a été déposé sur un gradient de sucrose discontinu consistant en neuf paliers allant de 22 à 60% (wt/v) et centrifugées à 135,000 g pendant 2.5 heures à 4°C. Le gradient a été fractionné à partir du haut en quatorze fractions de 0.77 ml. Ces fractions ont été analysées par gel SDS-

PAGE 7.5% et immunobuvardage en utilisant l'anticorps 7B6 (1 : 7000) ainsi que des anticorps pour chacun des compartiments cellulaires suivants : calnexine pour le réticulum endoplasmique (1 : 1000) (Sigma-Aldrich), et β -COP pour les vésicules de transports entre le Golgi et le réticulum endoplasmique (1 : 1000) (Sigma-Aldrich).

2.7 Microscopie confocale

Le marquage de cellules HEK-293 (sur plaque de six puits de 35 mm), transfectées de façon stable et exprimant ECEL1, a été effectué en fixant ces cellules et en les perméabilisant en utilisant une solution méthanol/acétone (80/20 v/v) (5 ml). Au préalable, les cellules avaient été rincées deux fois au PBS froid (5 ml). Les cellules ont ensuite été incubées avec l'anticorps anti-ECEL1 (7B6) (1 : 1000) et soit l'anticorps anti-calnexine de lapin (1 : 100) (reçu de Dr. John Bergeron, Université McGill, Montréal) soit l'anti-giantine de lapin (1 : 1000) (Covance, Princeton, NJ).

Les complexes protéines/anticorps ont été révélés avec l'anticorps de chèvre anti-souris Alexa-488 ou l'anticorps de chèvre anti-lapin Alexa-567 (Molecular probes, Eugene, OR). La microscopie confocale a été effectuée à l'aide d'un objectif x100 Nikon Plan Achromat sur un microscope confocal muni d'un canal double BioRad 600 laser scanning, équipé d'un laser krypton/argon ainsi que des réflecteurs dichroïques permettant de distinguer les marquages Alexa-488 et Alexa-567.

2.8 Étude de marquage et de chasse (*Pulse-chase*)

Les cellules HEK-293 transfectées et exprimant ECEL1 ont été cultivées dans des pétris de 60 mm jusqu'à une confluence d'environ 75%, lavées à l'aide de milieu DMEM dépourvu de méthionine (3 ml), puis incubées dans le même milieu (3 ml) pendant une période de 20 minutes à 37°C. Les cellules ont ensuite été placées pendant 30 minutes à 37°C dans un milieu DMEM (3 ml) enrichi de [³⁵S]méthionine (200 µCi/pétri) (ICN, Irvine, CA).

Après ce marquage radioactif, les cellules ont été lavées deux fois avec du milieu DMEM (2 ml) contenant un excès de méthionine non-radioactive (0.15 mg/ml) et une chasse a été effectuée à divers temps d'incubation ($t = 0, 15, 30, 60, 90, 120$ et 180 minutes). Les cellules ont ensuite été lavées et récupérées dans du PBS froid (2 ml). Les cellules ont été culottées par centrifugation (300 g), puis immédiatement solubilisées avec 200 µl de PBS/N-octylglucoside 1% pendant une heure à 4°C et centrifugées (15 000 g). Le surnageant a été recueilli et incubé avec l'anticorps monoclonal 7B6 (1 :1500) pendant 16 heures à 4°C, avec rotation constante. Un anticorps secondaire anti-souris (1 :100) a été ajouté pendant 2 heures à 4°C et mélangé par rotation constante. Des billes de protéine A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Baie d'Urfé, Canada)(25 µl d'une suspension 10%) ont été ajoutées et incubées pendant une période de deux heures à 4°C. Les billes ont été récupérées par centrifugation (15 000 g), lavées trois fois (1 ml) puis mises en suspension directement dans un tampon Laemmli (80 µl) (Laemmli, 1970). Le mélange a été bouilli pendant trois minutes, puis centrifugé (15 000 g). Le surnageant a été analysé par SDS-PAGE sur gel 7.5% et par fluographie. Certains échantillons ont été traités avec

l'endoglycosidase H avant le dépôt sur gel, tel que décrit précédemment (Ghaddar *et coll.*, 2000).

2.9 Solubilisation de ECEL1 de l'hypophyse de souris

Toutes les étapes ont été effectuées à 4°C. Les hypophyses de souris femelles BALB/c (âgées de 3-4 semaines) ont été homogénéisées (10% w/v) dans 5 ml de tampon d'homogénéisation (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 3 M NaCl, 50 mM EDTA, 1 mM pepstatine A, 2 µg/ml leupeptine, 2 µg/ml aprotinine, 0.6 mM PMSF and 2 mM β-mercaptoethanol) en utilisant un homogénéisateur Polytron.

L'homogénat a été centrifugé à 1000 g pendant 15 minutes et le surnageant a été conservé à 4°C. Le culot a été lavé (1 ml) avec le tampon d'homogénéisation contenant 1% Triton X-100, incubé 1 heure puis centrifugé à 100,000 g pendant 60 minutes. Le surnageant (150 µl total, 30 µl par échantillon) a été analysé par SDS-PAGE suivi d'un immunobuvardage à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-ECEL1 7B6 (1 :7000). Des échantillons ont été traités avec l'endo H et la PNGase F préalablement au dépôt sur gel, tel que décrit précédemment (Ghaddar *et coll.*, 2000).

2.10 Production et purification de l'ectodomaine de ECEL1

Des cellules LLC-PK₁ (*porcine kidney cells* ; ATCC #CL-101), transfectées de manière stable avec le vecteur pCDNA3/RSV/NEP2-ECEL1, ont été mises en culture dans du

milieu 199 (Gibco/BRL) supplémenté de 5% (v/v) de sérum bovin fœtal (Mediacorp), de 100 µg/ml de pénicilline (Gibco/BRL), de 100 µg/ml de streptomycine (Gibco/BRL) et de 0,25 µg/ml de fongizone (Gibco/BRL). Lorsque les cellules ont atteint la confluence, elles ont été lavées une fois avec du PBS (10 ml). Puis, 20 ml de milieu de culture (milieu 199 avec 10% Proflix S6 (Bio Media) et 1% de butyrate de sodium) ont été ajoutés par pétri. L'induction a été effectuée pendant 4 jours. Ensuite, le milieu a été récupéré et centrifugé pendant 5 minutes à 1 000g. Le milieu a alors été centrifugé de nouveau pendant 10 minutes à 10 000g à 4°C. Finalement, le surnageant a été filtré sur membrane 0.22 µm.

Le filtrat a été concentré sur membrane Sartocoon micro 50 kDa (Sartorius) jusqu'à 50 ml, puis conservé à 4°C. La conductivité du filtrat concentré a été ajusté à celui du tampon A (25 mM Tris pH 7.5 et 50 mM NaCl), c'est-à-dire à 15Q (\cong 4.5 mmho) en diluant le filtrat avec le tampon A sans NaCl (jusqu'à un volume final de 1 litre). De plus, le pH a été ajusté à 7.5 avec de l'acide acétique 1N. Suite à ces étapes, la solution a été filtrée de nouveau sur membrane 0.22 µm (filtre *low protein binding*).

Une fois le milieu préparé, la purification a été effectuée sur FPLC. Une colonne Source 15Q de 12 ml (Amersham, Arlington Heights, IL) a été utilisée. Le chargement de la colonne a été effectué à 4°C pendant 16 h, à environ 45 ml/heure avec l'utilisation d'une pompe (Pharmacia). Une fois la colonne chargée, elle a été lavée avec du tampon A (5 ml/min) jusqu'à ce que la densité optique atteigne la ligne de base. Tout ce qui a été élué de cette façon a été récupéré en une seule fraction (*Wash*). Par la suite, une élution a été effectuée avec une concentration croissante de tampon B (25 mM Tris pH 7.5, 1 M NaCl) à une vitesse de 1 ml/min. Les produits d'élution ont été récoltés à chaque minute pour un total de 50 fractions.

Ensuite, des échantillons de 30 µl des fractions obtenues ont été déposés sur gel

SDS-PAGE 7.5%, en plus d'échantillons de la solution initiale, de la fraction non-liée (*Flow through*) et de la fraction de lavage (*Wash*). Un immunobuvardage de type Western avec l'anticorps anti-ECEL1 (7B6) a permis l'identification des fractions contenant ECEL1. En parallèle, un gel SDS-PAGE 7.5% chargé des mêmes échantillons a été coloré au nitrate d'argent, permettant la détection de la présence protéique dans chacun des échantillons. Les fractions positives montrant le moins de contaminants ont été mises en commun.

2.11 Hydrolyse de peptides et analyse par chromatographie liquide haute-performance

La galanine, la Met-enképhaline, la Leu-enképhaline, la bradykinine, la calcitonine, la Big-endothéline-1, l'endothéline-1, la substance P, l'OGP, le PTH₁₋₈₄, PTHrP₁₋₃₄, α -CGRP ainsi que le peptide synthétique Z-gly-gly-leu-pNa (Peninsula Laboratories, San Carlos CA) ont été utilisés comme substrat. Pour la détermination de l'activité enzymatique de ECEL1, chaque peptide (110 μ M) a été incubé avec 300 ng de ECEL1 purifiée dans 100 μ l de 50 mM MES ([2-(*N*-morpholino)ethansulfonic acid]) ou 50 mM TRIS (tris(Hydroxymethyl)aminomethane), à des pH variant de 5.5 à 8.5, avec des concentrations en sel (NaCl) variant de 0 à 150 mM, ainsi qu'en présence ou non de 1 mM Ca²⁺ (CaCl₂), à 37°C pendant 1 heure. L'hydrolyse a été stoppée par l'addition d'EDTA, à une concentration finale de 5 mM. Comme contrôle, 5 mM d'EDTA ont été ajoutés dans les mêmes échantillons, avant l'hydrolyse.

L'hydrolyse peptidique a été analysée par HPLC en phase inverse (RP-HPLC). Le RP-HPLC a été effectuée sur une colonne analytique μ Bondapak C18 (Waters, Mississauga,

ON), à l'aide d'un détecteur UV ajusté à 220 nm. La résolution des peptides a été effectuée, en 20 minutes, par un gradient linéaire, à un débit de 1 ml/min (phase mobile A : 0.1% acide trifluoroacétique (TFA) et phase mobile B : 80% acétonitrile [CH₃CN], 0.1% TFA). Chaque réaction enzymatique a été gardée dans la zone de linéarité de détection de l'appareil HPLC. Toutes les digestions enzymatiques ont été effectuées en triplicata ($n = 3$).

2.12 Immunoprécipitation ECEL1/Calnexine

Les cellules GH3 exprimant ECEL1 de façon endogène ont été mises en croissance sur des pétris de 100 mm et maintenues dans un milieu F12 (BRL Life Technologies, Burlington, ON, Canada) supplémenté de 12.5% (v/v) de cosmic (HyClone Laboratories) et de 2.5% de sérum bovin fœtal (Medicorp) à 37°C sous 5% CO₂ et 95% air. À un niveau de confluence d'environ 80%, les cellules ont été lavées et récupérées dans du PBS froid (5 ml).

Les cellules ont été culottées par centrifugation (300 g), puis immédiatement solubilisées avec 200 µl de N-octylglucoside 1% pendant une heure et centrifugées (15 000 g). Le surnageant a été recueilli et incubé avec l'anticorps monoclonal 7B6 (1 : 1000) ou avec l'anticorps anti-calnexine de lapin (1 : 100) (reçu de Dr. John Bergeron, Université McGill, Montréal) pendant 16 heures, à 4°C, avec rotation constante. Des billes de protéine A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Baie d'Urfé, Canada)(25 µl d'une suspension 10%) ont été ajoutées et incubées pendant une période de 2 heures à 4°C. Les billes ont été récupérées par centrifugation (15 000 g), lavées trois fois avec 1 ml de tampon d'immunoprécipitation (10 mM Tris pH7.4, 150 mM NaCl, 1% Na-deoxycholate, 1% triton

X-100, 0.1% SDS, 0.1% BSA, 1 mM méthionine, 1 mM PMSF, 0.0005% aprotinine) puis mises en suspension directement dans un tampon Laemmli (80 μ l), et des échantillons de 25 μ l ont été utilisés (Laemmli, 1970).

Le mélange a été bouilli pendant 3 minutes, puis centrifugé (15 000g). Le surnageant a été analysé par SDS-PAGE sur gel 7.5% suivi d'un immunobuvardage avec soit l'anticorps monoclonal anti-ECEL1 7B6 (1 : 10 000), soit l'anticorps anti-calnexine de lapin (1 : 1 000). Les anticorps secondaires HRP (DAKO) appropriés ont été utilisés pour la révélation (1 : 2 000).

2.13 Immunoprécipitation et immunobuvardage de BiP et ECEL1

Des cellules GH3 exprimant ECEL1 de façon endogène ont été mises en croissance sur des pétris de 100 mm dans le milieu F12 supplémenté de la même façon qu'expliqué dans la section 2.4. Elle ont été incubées en présence ou en absence de DTT (concentration finale 4 mM) pendant une période de 24 heures, à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois au PBS (5 ml) puis récupérées par grattage dans 5 ml de PBS.

Les cellules ont été culottées par centrifugation (300 g), puis immédiatement solubilisées avec 200 μ l de N-octylglucoside 1% pendant une heure, à 4°C et centrifugées (15 000 g). Le surnageant a été recueilli et incubé avec l'anticorps monoclonal 7B6 (1 : 1000) ou l'anticorps de lapin anti-Hsp70 (BiP) (1 : 200) (Santa Cruz Biochemicals, CA) pendant 16 heures, à 4°C, avec rotation constante. Des billes de protéine A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Baie d'Urfé, Canada) (30 μ l d'une suspension 50%) ont été ajoutées et incubées pendant une période d'une heure, à 4°C. Les billes furent

récupérées par centrifugation (15 000 g), lavées trois fois avec 1 ml de tampon d'immunoprécipitation puis mises en suspension directement dans un tampon Laemmli (80 µl). Des échantillons de 25 µl ont été utilisés (Laemmli, 1970).

Le mélange fut bouilli pendant trois minutes, puis centrifugé (15 000g). Le surnageant a été analysé par SDS-PAGE sur gel 7.5%, suivi d'un immunobuvardage de type Western avec l'anticorps monoclonal de souris anti-ECEL1 7B6 (1 : 7 000) ou l'anticorps polyclonal de lapin anti-Hsp70 (BiP) (1 : 1 000). Les anticorps secondaires HRP (DAKO) appropriés ont été utilisés pour la révélation.

2.14 Test au glycérol

Des cellules HEK-293T (*Human embryonic kidney cells*: ATCC) ont été mises en culture dans un milieu DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) (BRL Life Technologies, Burlington, ON, Canada) supplémenté de 10% de sérum bovin fœtal (Medicorp) à 37°C sous 5% CO₂ et 95% air. Vingt-quatre ou quarante-huit heures avant la collecte des cellules, du glycérol a été ajouté à une concentration finale de 1M. Lors de la récupération, le milieu a été enlevé et les cellules ont été lavées deux fois dans du PBS (5 ml). Par la suite, un bâtonnet a été utilisé pour faire décoller les cellules dans 5 ml de PBS. Les cellules récupérées ont été centrifugées (300 g), puis le surnageant de PBS a été éliminé. Une solution de PBS 1% *N*-octylglucoside a été ajoutée (200 µl) et l'incubation s'est prolongée pendant une heure à 4°C. Par la suite, une centrifugation de 15 minutes à 14 000 g à 4°C a été effectuée et le surnageant a été récupéré. Des échantillons de 30 µl ont été déposés sur

gel SDS-PAGE 7.5%. Un transfert sur membrane de nitrocellulose a suivi et a servi à l'immunobuvardage de type Western avec l'anticorps anti-ECEL1 7B6 (1 : 7 000).

2.15 Régulation de l'expression génique de ECEL1

2.15.1 Test d'hypoxie

Des cellules GH3 (ATCC#CCL-82.1) ont été mises en culture dans le milieu F12 (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) complété de 12.5% (v/v) de cosmic (HyClone Laboratories) et de 2.5% de sérum bovin fœtal (MediCorp) sur des pétris de 100 mm. Pour le test d'hypoxie en fonction de la concentration de chlorure de cobalt, différentes concentrations finales de CoCl_2 (50, 100, 150 et 200 μM) ont été ajoutées 4 heures avant la récupération des cellules. Pour le test d'hypoxie en fonction du temps, les cellules ont été mises en présence de 150 μM CoCl_2 pendant différentes périodes de temps (1, 2, 4, 8 ou 24 h). Lors de la récupération des cellules, le milieu a été enlevé et les cellules ont été lavées deux fois dans du PBS (5 ml). Les pétris ont immédiatement été placés à -70°C pour utilisation ultérieure (voir section 2.15.3).

2.15.2 Induction de la réponse des protéines non repliées (*unfolded protein response*)

Des cellules GH3 exprimant ECEL1 de façon endogène ont été mises en croissance sur des pétris de 100 mm dans le milieu F12 supplémenté de la même façon qu'expliqué dans la section 2.15.1. Dans le but d'induire une réponse UPR, elles ont été incubées en présence de DIT à 37°C . Pour l'étude de la réponse UPR en fonction de la concentration

de DTT, les cellules ont été mises en présence de concentrations variées de DTT (1, 2, 4, 6 ou 10 mM) pendant une période d'incubation de 4h. Pour l'étude de la réponse UPR en fonction du temps, les cellules ont été mises en présence de 4 mM DTT pendant des périodes d'incubations variées (1, 2, 4, 8 ou 24 h). Lors de la récupération des cellules, le milieu a été enlevé et les cellules ont été lavées deux fois dans du PBS (5 ml). Les cellules ont ensuite été soumises au protocole d'extraction d'ARN tel qu'expliqué dans la section 2.15.3. Ensuite, les échantillons ont été utilisés pour une amplification RT-PCR, à l'aide des amorces de ECEL1 et β -actine rapportées dans la section 2.15.4.

2.15.3 Extraction d'ARNm des cellules GH3

L'ARN total a été isolé grâce à l'utilisation de la trousse d'extraction RNeasy (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada), en suivant les recommandations du manufacturier. La solution contenant l'ARN a été soumise à une digestion à la désoxyribonucléase (sans RNase) (Qiagen) dans le but d'éliminer toute contamination d'ADN génomique potentielle. La concentration d'ARN a été déterminée par absorbance à 260 nm ; les quantités d'ARN récoltées pour tous les traitements étaient similaires et reproductibles (80-100 μ g d'ARN total par pétri). Tous les échantillons d'ARN possédaient un ratio d'absorbance 260/280 nm plus grand que 1.6.

2.15.4 Semiquantification de l'ARNm de ECEL1 par RT-PCR

Les changements des niveaux d'ARNm de ECEL1 ont été déterminés par RT-PCR semiquantitatif. L'ARN total (0.26 μ g) a été transcrit par transcriptase inverse, et l'ADNc a été amplifié par PCR grâce à l'utilisation de la trousse *One-Step RT-PCR* (Qiagen) en suivant les recommandations du manufacturier, en présence d'un inhibiteur de ribonucléase

(Applied Biosystems, Foster City, CA). Le gène β -actine a été utilisé comme contrôle interne. Pour l'amplification d'ADNc, les oligonucléotides suivant ont été utilisés : 5'-CATGCTGGCGCTCAAATACCTGG-3' et 5'-AGATCATCATATTCTGACACAG-3' pour les brins sens/antisens de l'ADNc ECEL1 de rat (mêmes séquences pour humain et souris), et 5'-CCATGTACGTAGCCATCCAG-3' et 5'-GCACGATTTCCCTCTCAGCTGT-3' pour les brins sens/antisens de l'ADNc de la β -actine de rat (no. d'accès V01217).

Parce que des tests initiaux ont montré un niveau d'amplification linéaire, à différents nombres de cycles, pour chaque produit (ECEL1 et β -actine), les différents ADNc ont été amplifiés en même temps dans différents tubes. Suite à la dénaturation initiale à 95°C pendant 15 minutes, 20 ou 30 cycles ont été effectués pour amplifier la β -actine et ECEL1, respectivement. Chaque cycle consiste en une étape de dénaturation, d'hybridation, et d'amplification de, respectivement, 1 minute à 94°C, 1 minute à 49°C, et 1 minute à 72°C, suivies par une extension finale de 10 minutes, à 72°C.

La RT-PCR a été effectuée à l'aide d'un thermocycleur Peltier (MJ Research Inc., Boston, MA). Les produits de PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%, puis colorés au bromure d'éthidium dans le but de visualiser et quantifier les bandes par densitométrie informatisé, en utilisant le système ChemicDoc ainsi que le logiciel Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Tel que prévu, l'amplification par PCR a résulté en des produits de grandeur égales à, respectivement, 237 et 758 pb, pour la β -actine et ECEL1. Les valeurs densitométriques des produits de RT-PCR de ECEL1 ont été normalisés par rapport à ceux correspondant à la β -actine, tel qu'effectué par Vargas *et coll.* (Vargas *et coll.*, 2003). L'intensité de la β -actine par microgramme total d'ARN n'a pas varié significativement entre les divers traitements. Deux contrôles négatifs et échantillons sans

réaction de RT ou sans ARN ont été inclus et aucun produit n'a été visualisé dans ces conditions, éliminant ainsi la possibilité d'une amplification ou d'une observation d'ADN génomique ou de contaminants exogènes.

CHAPITRE 3 – RÉSULTATS

ÉTUDE DE LA LOCALISATION CELLULAIRE DE ECEL1 (*ENDOTHELIN-CONVERTING ENZYME-LIKE 1*)

3.1 Production d'anticorps monoclonaux de souris

Dans le but d'obtenir les outils nécessaires pour étudier la localisation cellulaire de ECEL1, nous avons immunisé des souris BALB/c avec un fragment de la séquence de ECEL1 (région N-terminale de l'ectodomaine de ECEL1 humain correspondant aux acides aminés Asp₁₄₂-Ala₄₆₅). Après deux injections d'antigène ECEL1, les sérums des souris ont été prélevés (dilution 1 : 750), puis testés par immunobuvardage de type Western sur des échantillons de fragments de ECEL1 purifiés.

Tel qu'observé à la Figure 1, les sérums se sont tous révélés positifs. À titre comparatif, un échantillon sérique de la souris 1 avait été prélevé avant la première immunisation ; celui-ci, lorsque testé sur les mêmes extraits cellulaires, n'est pas en mesure de reconnaître ECEL1. Les mêmes résultats ont été obtenus pour les sérums pré-immuns des autres souris (*données non montrées*), ce qui confirme l'efficacité de l'immunisation des souris. La souris 2 montre un signal lorsque l'antisérum a été testé sur des extraits de cellules HEK-293 transfectées avec ECEL1 (HEK293-ECEL1) et LLC-PK₁ transfectées (LLC-PK₁-ECEL1)(Figure 2, lignes 2 et 4 respectivement). Comme contrôle négatif, des extraits cellulaires de lignées HEK-293 et LLC-PK₁, transfectées avec le plasmide ne contenant pas l'ADNc de ECEL1 (HEK293-mock et LLC-PK₁-mock, respectivement), ont

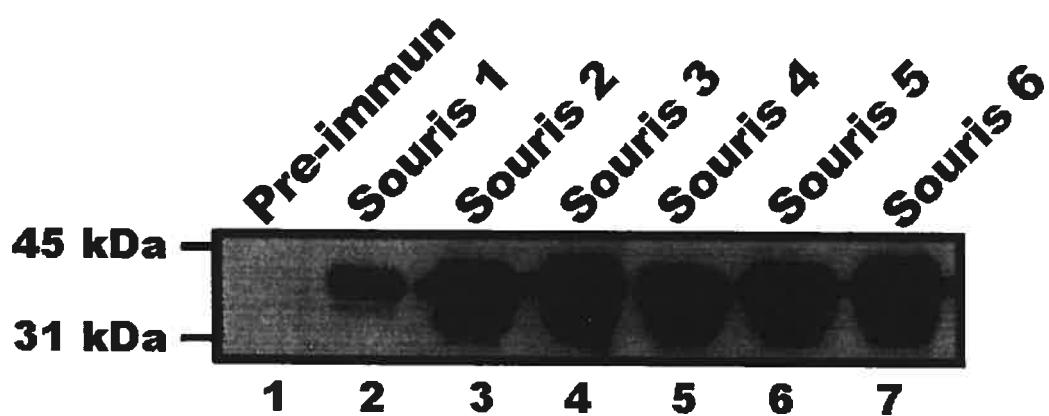


Figure 1 : Évaluation des différents antisérums provenant des souris immunisées avec un fragment de ECEL1 comme antigène

L'efficacité de l'antisérum de chaque souris (souris 1 à 6) a été vérifié par immunobuvardage de type Western sur 1 μ g d'antigène ECEL1 (fragment purifié). Le premier puits (*Pre-immun*) sert de contrôle pré-immun, et provient de la souris 1.

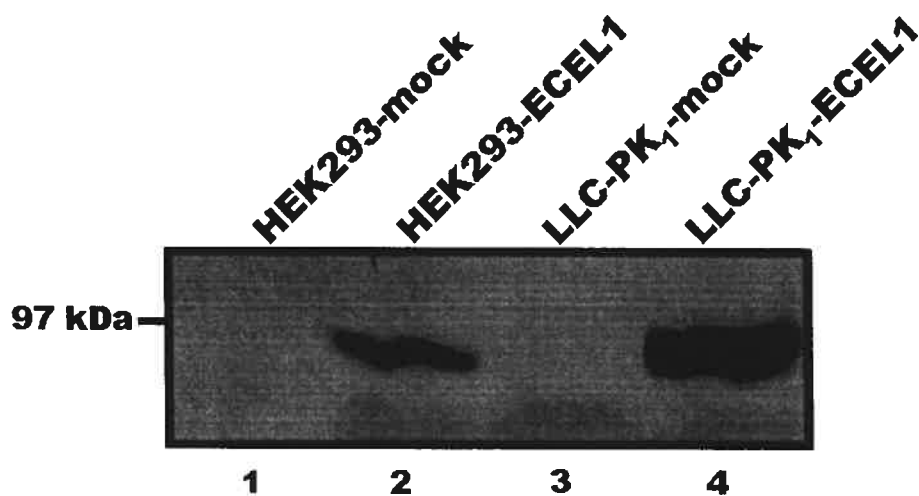


Figure 2 : L'antisérum de la souris 2 immunisée avec l'antigène ECEL1 reconnaît spécifiquement la protéine dans des lignées cellulaires transfectées HEK293-ECEL1 et LLC-PK₁-ECEL1

Des extraits provenant de cellules HEK-293 et LLC-PK₁ transfectées et exprimant ECEL1 (HEK293-ECEL1 et LLC-PK₁-ECEL1, respectivement) ont été séparés par SDS/PAGE sur un gel 7.5 % dans des conditions réductrices, et analysés par immunobuvardage de type Western en utilisant l'antisérum de la souris 2. Les puits HEK293-mock ainsi que LLC-PK₁-mock servent de contrôle négatif.

été utilisés; les antisérums ne reconnaissent aucune protéine dans ces extraits (Figure 2, lignes 1 et 3 respectivement), ce qui confirme la spécificité des antisérums pour la protéine ECEL1. Les mêmes résultats ont été obtenus avec les autres antisérums (*données non publiées*).

Les antisérums de toutes les souris immunisées reconnaissent donc, à différents degrés, l'antigène ECEL1 (*données non publiées*). Toutefois, la souris 2 a montré de meilleures aptitudes lors de l'analyse d'immunobuvardage de type Western. De plus, l'antisérum de cette dernière possède le même titre en immunobuvardage qu'en ELISA (la souris 2 possède un titre de 1 : 7 000) (*données non publiées*). En regard à ces résultats, nous avons procédé à la fusion de cellules de rate de la souris 2 avec des myélomes en culture. Environ 2000 clones ont été obtenus et les surnageant de culture d'environ 800 hybridomes ont été testés par ELISA. Quelques dizaines de clones ont été jugés positifs suite à cette analyse. Les 18 hybridomes montrant les meilleurs résultats lors de l'analyse ELISA ont été testés par immunobuvardage de type Western (Figure 3). Environ la moitié des hybridomes testés a montré des résultats positifs. L'autre moitié a été jugée comme étant des faux positifs au test ELISA. Par la combinaison des résultats des tests ELISA et d'immunobuvardage sur les hybridomes sélectionnés, le clone 7B6 a été choisi. C'est donc cet anticorps monoclonal qui a été utilisé lors de tous les tests requérant l'identification de la protéine ECEL1.

3.2 L'anticorps monoclonal 7B6 reconnaît spécifiquement ECEL1

La spécificité de l'anticorps monoclonal 7B6 vis-à-vis des autres membres de la famille de l'EPN a été vérifiée par l'utilisation d'extraits protéiques de cellules transfectées

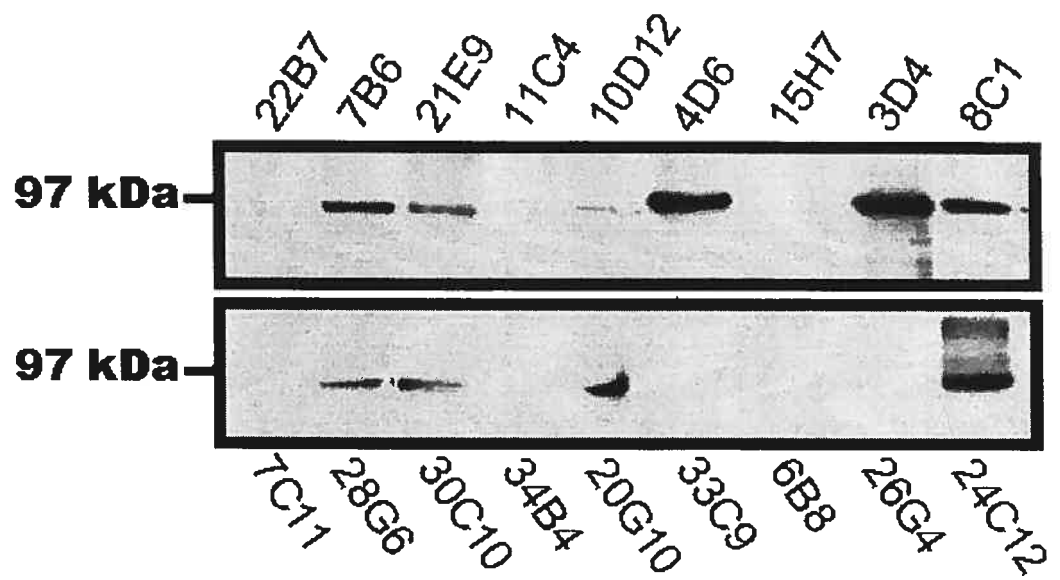


Figure 3 : Analyse par immunobuvardage de type Western des meilleurs hybridomes, selon le test ELISA

L'efficacité de 18 des meilleurs hybridomes, selon le test ELISA, a été testé. Des extraits cellulaires de HEK293-ECEL1 ont été analysés par SDS/PAGE sur un gel 7.5% dans des conditions réductrices, et détectés par immunobuvardage de type Western en utilisant les milieux de culture d'hybridomes.

exprimant soit ECEL1 humaine, PHEX humaine, EPN de lapin, NEP2 de souris ou ECE-1 humain. L'analyse d'immunobuvardage de type Western montre que l'anticorps reconnaît une bande ECEL1 migrant à approximativement 95 kDa (Figure 4, ligne 5). Cet anticorps ne reconnaît pas les protéines recombinantes ECE-1, PHEX, EPN ou NEP2 (Figure 4, lignes 1-4, respectivement). Toutefois, ces protéines ont été détectées lorsque la membrane a été réutilisée avec leur anticorps correspondant (*résultats non montrés*).

3.3 Deux protéines ECEL1, différentes dans leur état de glycosylation, sont présentes dans des cellules transfectées

L'immunobuvardage d'extraits de cellules HEK-293 contrôles et transfectées, avec l'anticorps monoclonal 7B6 spécifique à ECEL1, a permis la détection d'une bande de 95 kDa dans l'extrait des cellules transfectées (Figure 5A, ligne 3), alors qu'aucune bande n'était visible dans les extraits des cellules contrôles (Figure 5A, ligne 1). Aucune protéine n'a été détectée dans le milieu de culture (Figure 5A, lignes 2 et 4, pour les cellules contrôles et transfectées, respectivement). Dans le but de caractériser l'état de glycosylation de ECEL1, la protéine a été soumise à une déglycosylation par la PNGase F (peptide *N*-glycosidase F) et par l'endoglycosidase H (endo H). La PNGase F enlève les oligosaccharides riches en mannose, ainsi que la plupart des complexes *N*-liés ajoutés dans l'appareil de Golgi. En contraste, l'endoglycosidase H enlève les chaînes des oligosaccharides *N*-liés riches en mannose sur des glycoprotéines situées dans le réticulum endoplasmique et qui n'ont pas encore effectué un transit vers l'appareil de Golgi. C'est donc dire qu'une résistance à l'endoglycosidase H peut être utilisée à titre indicatif, signalant ainsi que la glycoprotéine

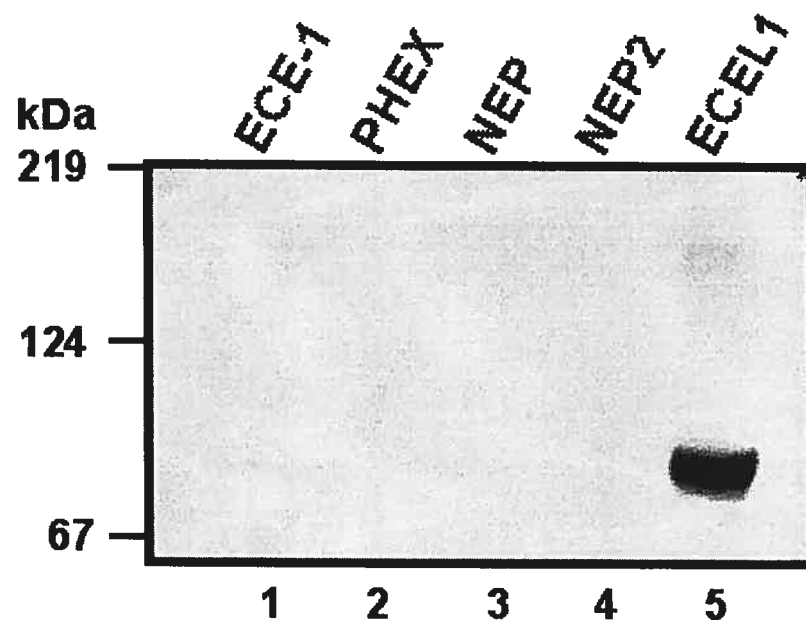


Figure 4 : Spécificité de l'anticorps monoclonal anti-ECEL1 7B6

Des extraits de cellules HEK-293 transfectées avec l'ADNc de ECEL-1, PHEX, NEP ou ECEL1 (lignes 1,2, 3 and 5 respectivement) ou le milieu de culture de cellules HEK 293 transfectées avec l'ADNc de NEP2 (ligne 4) ont été analysés par SDS/PAGE sur un gel 7.5 % dans des conditions réductrices, et détectés par immunobuvardage de type Western en utilisant l'anticorps anti-ECEL1 7B6. La position des marqueurs de masse moléculaire (en kDa) est montrée à gauche.

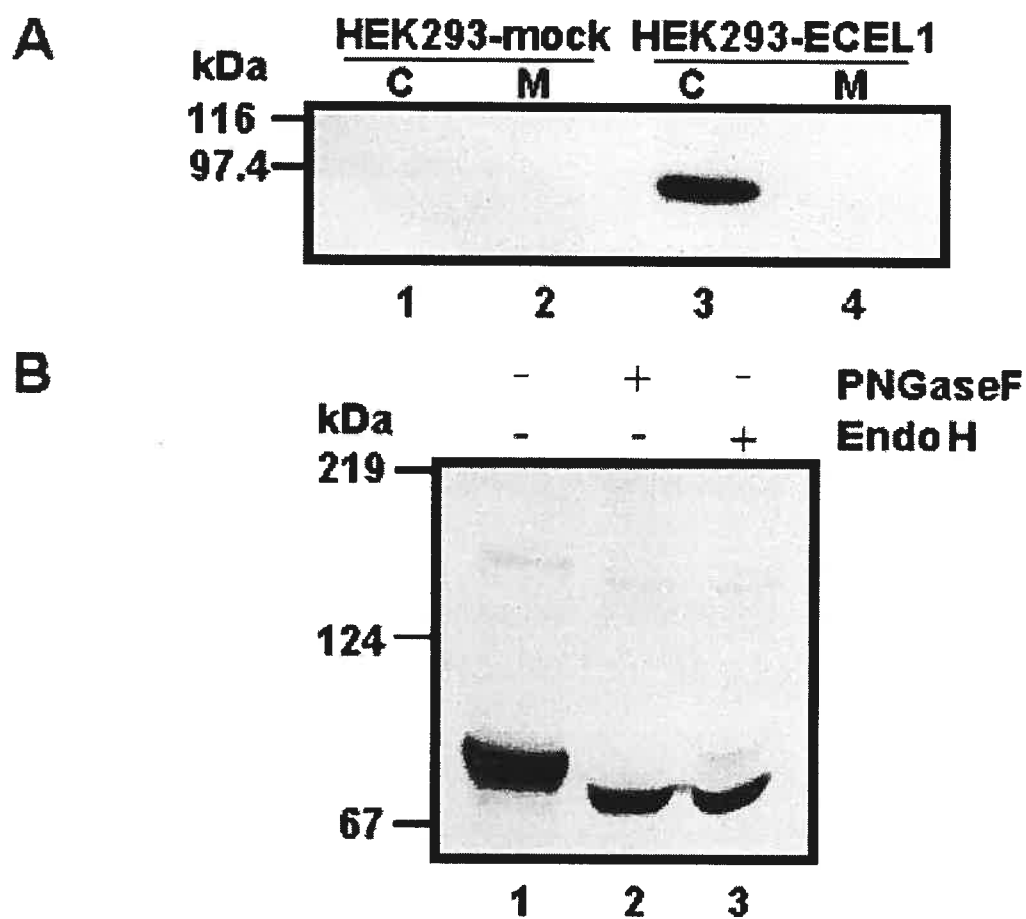


Figure 5 : Analyse par immunobuvardage des cellules HEK-293 transfectées et exprimant ECEL1

(A) Des extraits cellulaires (C) ou le milieu de culture (M) de cellules HEK-293 transfectées avec ECEL1, ou non transfectées, ont été séparés par SDS-PAGE sur un gel 7.5% dans des conditions réductrices, et détectés par immunobuvardage de type Western en utilisant l'anticorps anti-ECEL1 7B6. (B) Des extraits de cellules HEK-293 transfectées avec ECEL1 ont été analysés tel qu'en (A), sans traitement (ligne 1) ou après digestion avec la PNGase F (ligne 2) ou l'endo H (ligne 3). La position des marqueurs de masse moléculaire (en kDa) est montrée à gauche.

s'est rendue à l'appareil de Golgi. Le traitement à la PNGase F révèle que la protéine ECEL1 est N-glycosylée, puisque la masse moléculaire diminue d'environ 10 kDa, soit de 95 kDa à environ 85 kDa (Figure 5B, comparaison des lignes 1 et 2). Une diminution de la masse moléculaire de cet ordre est en accord avec les trois sites potentiels de N-glycosylation dans la séquence primaire de ECEL1 (Valdenaire *et coll.*, 1999). La digestion, par l'endo H, d'extraits de cellules transfectées avec ECEL1, a aussi résulté en une augmentation de la mobilité électrophorétique de la grande majorité des protéines ECEL1 (Figure 5B, ligne 3). Toutefois, une petite portion de ECEL1 affichant une mobilité électrophorétique d'environ 105 kDa, est restée résistante à cette digestion par l'endo H (Figure 5B, ligne 3). Cette espèce n'a cependant pas été observée dans les échantillons non traités (Figure 5B, ligne 1), probablement en raison de la grande intensité de la bande de 95 kDa. À titre de contrôle pour la digestion à l'endo H, l'EPN, un membre de la famille connu pour sa localisation à la membrane plasmique (Devault *et coll.*, 1988), a été exprimé dans des cellules HEK-293 et a montré une résistance lors de la digestion à l'endo H (*résultats non montrés*). Nos résultats indiquent qu'au moins deux formes de protéines ECEL1, différentes dans leur état de glycosylation, sont présentes dans les cellules transfectées HEK-293. L'espèce majoritaire de 95 kDa n'a pas acquis d'oligosaccharides complexes, suggérant qu'elle n'a pas voyagé jusqu'au complexe golgien. À l'opposé, l'espèce minoritaire de 105 kDa a acquis des oligosaccharides complexes, suggérant un transit dans le complexe golgien et, possiblement, jusqu'à la membrane plasmique.

3.4 L'espèce de 105 kDa est présente à la membrane plasmique, alors que celle de 95 kDa est localisée dans le RE

Pour vérifier l'hypothèse que la forme minoritaire ECEL1 105 kDa était localisée à la surface cellulaire, des cellules transfectées HEK-293 ont été soumises à une biotinylation de surface. Le matériel lié à l'avidine contient deux bandes, ayant des masses moléculaires respectives de 100 et 105 kDa (Figure 6, ligne 1). Les deux espèces sont sensibles à la digestion à la PNGase F (Figure 6, ligne 2), alors que seule la protéine de 100 kDa est sensible à la digestion à l'endoH (Figure 6, ligne 3). En contraste, le surnageant contenant le matériel non biotinylé non lié à l'avidine montre seulement la protéine de 95 kDa (Figure 6, ligne 4). Celle-ci est sensible à la PNGase F autant qu'à l'endo H (Figure 6, lignes 5 et 6, respectivement). À titre de contrôle, aucune actine biotinylée n'a été détectée lorsque la membrane a été testée avec l'anticorps anti-actine (*résultats non montrés*). En absence de biotinylation, ECEL1 n'est pas associée avec le culot d'avidine (Figure 6, ligne 7), mais est présente dans le surnageant (Figure 6, ligne 8). L'absence d'oligosaccharides complexes sur la forme majoritaire de ECEL1 suggère qu'elle est présente dans un compartiment en amont de l'appareil de Golgi, possiblement le RE.

Dans le but de confirmer la localisation sous-cellulaire de ECEL1, des cellules HEK-293 ont été fixées, perméabilisées et marquées avec l'anticorps anti-ECEL1 et soit l'anticorps anti-calnexine, soit l'anticorps anti-giantine comme, respectivement, marqueurs du RE (Wada *et coll.*, 1991) et de l'appareil de Golgi (Linstedt et Hauri, 1993). Elles ont par la suite été examinées par microscopie confocale. Les anticorps anti-ECEL1 et anti-calnexine ont affiché un marquage ponctué similaire et la superposition des deux images

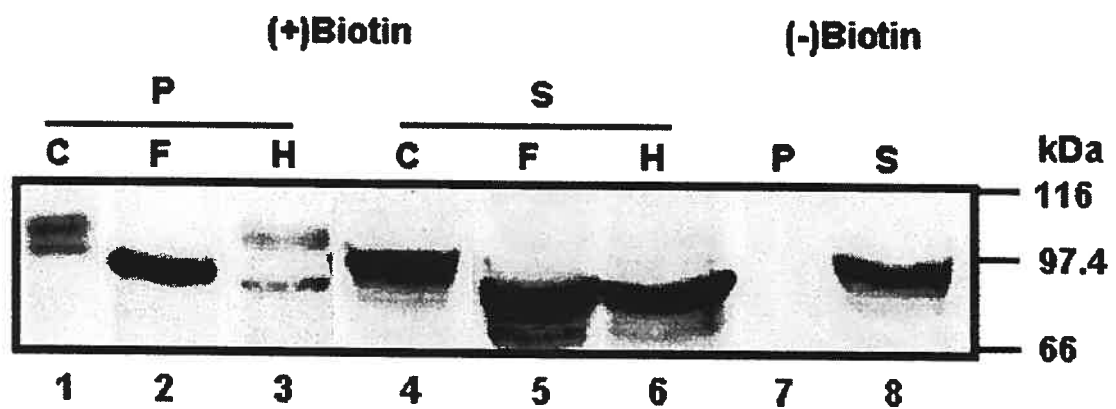


Figure 6 : Biotinylation de ECEL1 sur la surface cellulaire

Des cellules HEK-293 transfectées ont été incubées avec de la biotine NHS-SS puis solubilisées. Les protéines biotinylées ont été séparées des protéines non-marquées par l'addition de résine NeutrAvidin. La présence de ECEL1 dans le culot ou le surnageant a été détectée par immunobuvardage, grâce à l'utilisation de l'anticorps anti-ECEL1 7B6 suite à la séparation des protéines par SDS/PAGE sur gels 7.5%. P, culot ; S, surnageant ; C, contrôle ; F, traitement à la PNGase F ; H, traitement à l'endo H. La position des marqueurs de masse moléculaire (en kDa) est montrée à droite.

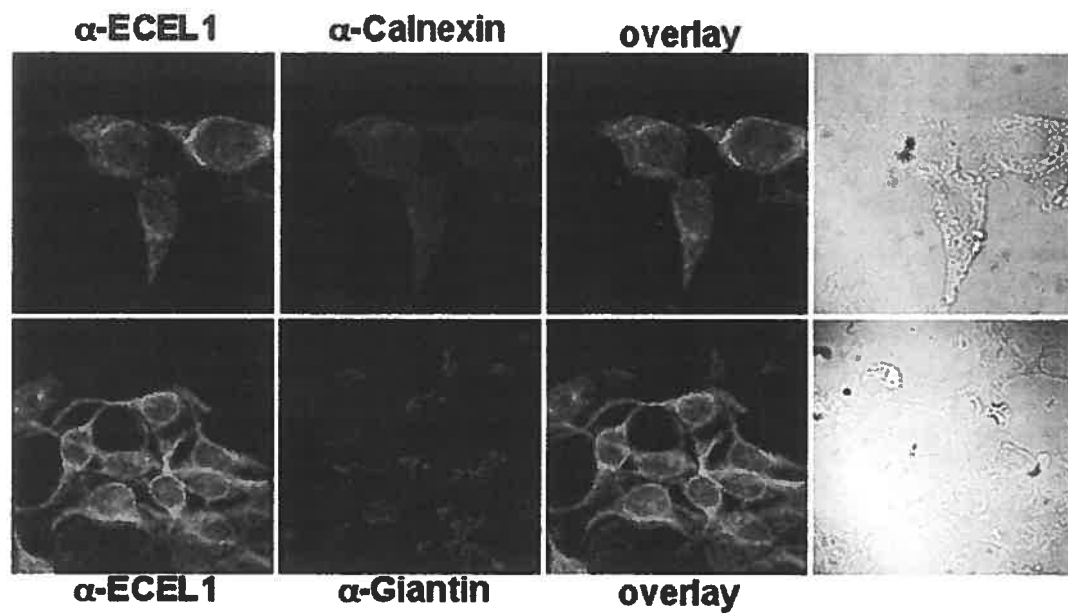


Figure 7 : Colocalisation de ECEL1 avec la calnexine

Des cellules HEK-293 transfectées exprimant ECEL1 ont été perméabilisées et marquées avec l'anticorps anti-ECEL1 (7B6) et l'anticorps anti-souris de chèvre Alexa-488 (images identifiées α -ECEL1). Le même champ a été marqué avec les anticorps anti-calnexine (marqueur du RE) et anti-lapin de chèvre Alexa-567 (images identifiées α -calnexine) ou anti-giantine (marqueur du Golgi *cis* et *médial*) et anti-lapin de chèvre Alexa-567 (images α -giantine). Les images centre-droite montrent la superposition des images de ECEL1 et du marquage du RE ou Golgi (images identifiées *overlay*). Les images de droite représentent l'inversion de phase des mêmes champs.

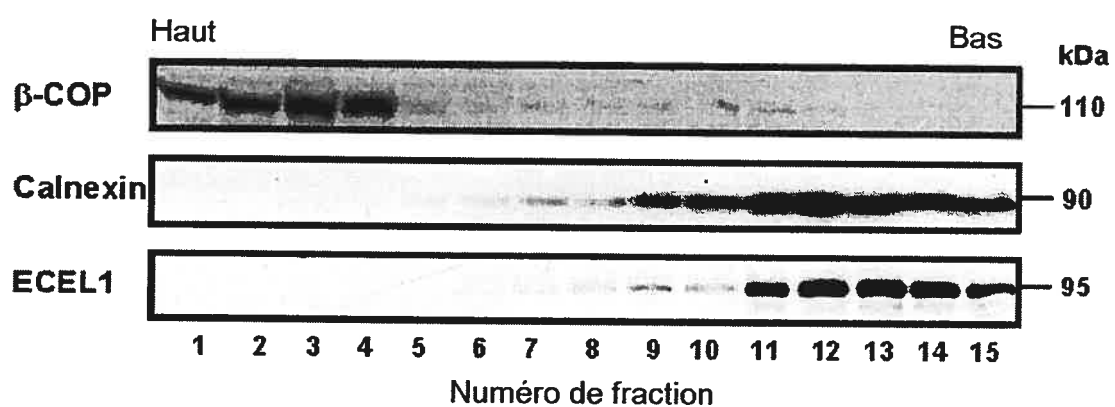


Figure 8 : Fractionnement sous-cellulaire de cellules HEK-293 transfectées avec ECEL1

Des extraits de cellules HEK-293 transfectées exprimant ECEL1 ont été centrifugés sur un gradient de sucrose 22-60% (w/v). Le gradient a été fractionné, et les fractions ont été analysées par SDS/PAGE sur un gel 7.5% et immunobuvardage en utilisant des anticorps dirigés contre la calnexine, β -COP ou ECEL1. La position des marqueurs de masse moléculaire (en kDa) est visible à droite.

montre une colocalisation quasi parfaite (Figure 7, images du haut). En contraste, ECEL1 n'a pas localisé avec le marqueur du Golgi, la giantine (Figure 7, images du bas).

Les cellules HEK-293 transfectées ont aussi été fractionnées sur gradient de sucrose et la distribution de ECEL1 dans ce gradient fut comparée à celle de β -COP (un marqueur des vésicules de transport Golgi au RE) ainsi qu'à la calnexine. La distribution de la protéine ECEL1 s'apparente énormément à celle de la calnexine (Figure 8), ce qui confirme donc la présence de ECEL1 dans le RE.

3.5 L'ECEL1 endogène montre une distribution à la membrane plasmique ainsi qu'au RE, dans les cellules hypophysaires de souris

Dans le but de déterminer si ECEL1 endogène est majoritairement localisée dans le RE, des extraits d'hypophyse de souris, un tissu identifié pour exprimer l'ARNm de ECEL1 (Valdenaire *et coll.*, 1999), ont été analysés par immunobuvardage de type Western à l'aide de l'anticorps monoclonal 7B6. La protéine ECEL1 de 95 kDa a été observée dans ces extraits cellulaires (Figure 9, ligne 1). Cette protéine est sensible à la digestion à la PNGase F (Figure 9, ligne 2), ce qui indique qu'il s'agit d'une glycoprotéine. Comme pour les cellules transfectées, la digestion à l'endo H a révélé la présence de deux espèces (Figure 9, ligne 3). L'espèce majoritaire voit sa masse moléculaire diminuer à 85 kDa par le traitement avec l'endo H, alors que l'espèce minoritaire de 105 kDa est résistante à cette digestion. Ces résultats indiquent que ECEL1 n'a pas acquis de sucres complexes. Si elle est présente, l'espèce de 100 kDa n'a pu être détectée, puisqu'elle serait sensible à la digestion à l'endo H.

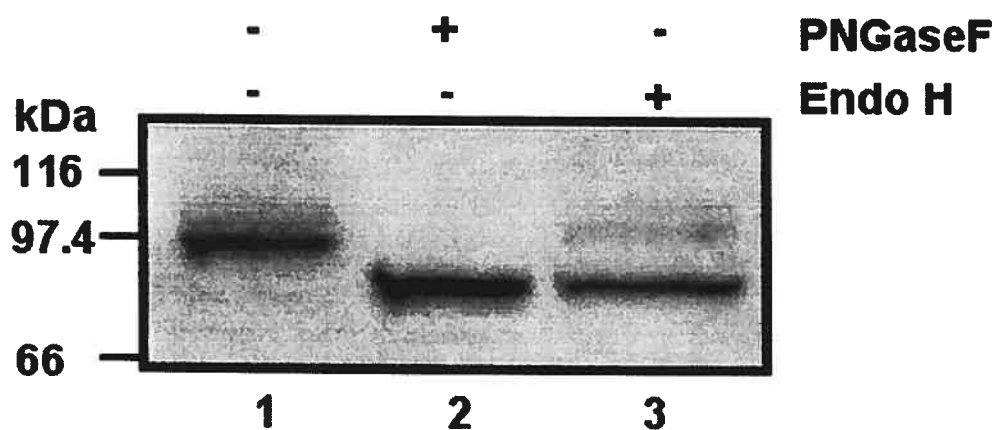


Figure 9 : Analyse par immunobuvardage de ECEL1 endogène d'hypophyse de souris

Des homogénats d'hypophyse de souris ont été séparés par SDS/PAGE sur gels 7.5% en conditions réductrices. ECEL1 a été révélée par immunobuvardage grâce à l'utilisation de l'anticorps monoclonal anti-ECEL1 7B6, sans traitement (ligne 1) ou après traitements avec la PNGase F (ligne 2) ou endo H (ligne 3). La position des marqueurs de masse moléculaire (en kDa) est montrée à gauche.

3.6 L'utilisation d'un chaperon chimique semble influencer le ratio de la localisation sous-cellulaire de ECEL1

Dans le but d'évaluer si le repliement de ECEL1 est impliqué dans le ralentissement ou, à la limite, dans la rétention de ECEL1 au réticulum endoplasmique, nous avons étudié l'effet d'un chaperon chimique sur la biosynthèse de ECEL1. Le glycérol, un petit polyol perméable aux membranes agit comme *chaperon chimique* dans la stabilisation de la structure protéique (Brown *et coll.*, 1996 ; Sato *et coll.*, 1996). Des cellules HEK293 transfectées et exprimant ECEL1 (HEK293-ECEL1) ont été incubées en présence ou non de glycérol (1 M), pendant une période de 24 h. Pour évaluer l'effet de ce *chaperon chimique* et observer si la protéine ECEL1 demeure ou non dans le réticulum endoplasmique, l'analyse de la résistance aux endoglycosidases a été utilisée.

L'immunobuvardage d'extraits de cellules HEK293-ECEL1 en absence de glycérol, avec l'anticorps monoclonal 7B6 spécifique à ECEL1 a détecté la bande de 95 kDa caractéristique de ECEL1 (Figure 10, ligne 1). La protéine recombinante a ensuite été soumise à une déglycosylation par la PNGase F (peptide *N*-glycosidase F) et à l'endoglycosidase H (endo H). Le traitement à la PNGase F a révélé que la protéine ECEL1 est *N*-glycosylée, sa masse moléculaire diminuant d'environ 10 kDa, soit de 95 kDa à environ 85 kDa (Figure 10, ligne 2). La digestion d'extraits de cellules avec l'endo H a aussi résulté en une augmentation de la mobilité électrophorétique de la grande majorité des protéines ECEL1. Seulement environ 10% de la protéine s'est révélée résistante à la digestion (Figure 10, ligne 3). Ces résultats confirment ceux retrouvés en section 3.3 (et voir Figure 5A du chapitre 3).

Par contre, la digestion à l'endo H d'extraits de cellules HEK293-ECEL1 incubées

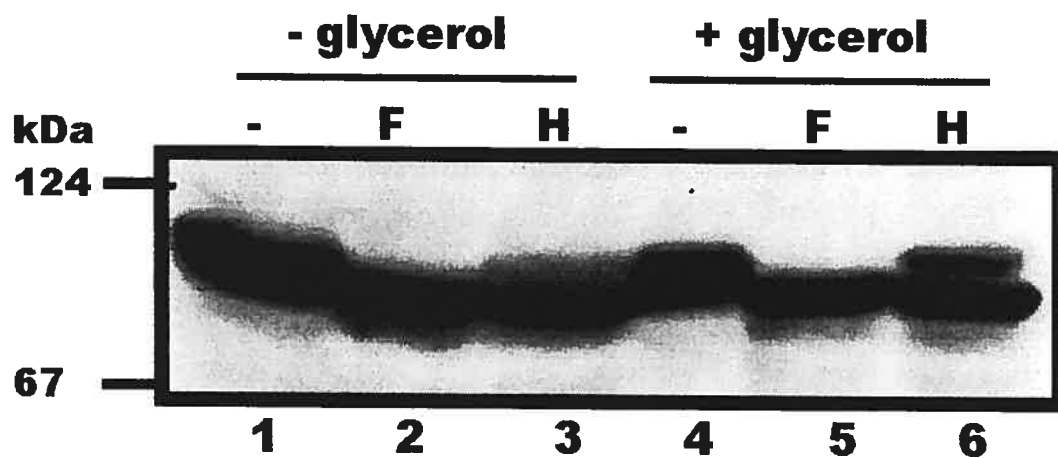


Figure 10 : Effet d'un chaperon chimique (glycérol) sur la localisation de la protéine ECEL1

Des extraits de cellules HEK-293 transfectées avec ECEL1 traitées ou non (- ou + glycérol 1M, incubation d'une durée de 24 h) ont été séparés par SDS-PAGE sur un gel 7.5% dans des conditions réductrices, et détectés par immunobuvardage de type Western en utilisant l'anticorps anti-ECEL1 7B6. Les échantillons ont été analysés sans traitement (lignes 1 et 4), après digestion avec la PNGase F (lignes 2 et 5) ou avec l'endo H (lignes 3 et 6). La position des marqueurs moléculaires (en kDa) est montrée à gauche.

en présence de glycérol a montré qu'une plus grande proportion de ECEL1 (environ 30%) est résistante à la digestion (Figure 10, ligne 6). Ces résultats laissent supposer qu'un chaperon chimique (i.e. glycérol) peut influencer le ratio intracellulaire/membrane plasmique.

3.7 Les deux premières cystéines de l'ectodomaine de ECEL1 ne montrent pas un alignement conservé avec les autres membres de la famille de l'endopeptidase neutre, et ce positionnement n'est pas responsable de la rétention/localisation au RE

L'ectodomaine de l'EPN adopte une structure globulaire compacte localisée très près de la membrane plasmique et stabilisée par les ponts disulfure entre résidus cystéines (Kenny *et coll.*, 1983). Ces résidus cystéine sont conservés chez tous les membres de la famille de l'EPN et leur patron d'appariement est maintenant connu grâce à la détermination de la structure tridimensionnelle de l'EPN (Oefner *et coll.*, 2000). Cependant, en alignant toutes les séquences des membres de la famille de l'EPN, on observe que les deux premières cystéines de ECEL1 sont les seules parmi les divers membres, à ne pas être alignées (Figure 11). De plus, chez les autres membres, les deux premières cystéines sont séparées par quatre acides aminés, alors que seulement trois séparent les même résidus chez ECEL1 (Figure 11). Dans le but de déterminer si le positionnement des deux premières cystéines était responsable de la rétention/localisation de ECEL1 dans le RE, une forme mutée de ECEL1 a été construite. Les deux premières cystéines ont été placées en

alignement parfait par rapport aux autres membres et ont été séparées par quatre résidus de la même manière que pour les cystéines des autres membres (Figure 11, ECEL1 mut). Des cellules HEK-293 ont été transfectées avec la forme mutée et des extraits cellulaires ont été analysés par immunobuvardage de type Western, avec ou sans digestion à la PNGase F ou à l'endo H. Tel qu'observé pour ECEL1, la protéine mutante ECEL1 C95G/C99G/P100C/F105C est sensible à la digestion à la PNGase F autant qu'à l'endo H (Figure 12, lignes 1 à 3), ce qui démontre que la protéine n'a pas acquis de sucres complexes. Ces résultats indiquent que la forme mutée reste, à l'image de ECEL1, localisée dans le RE et que la position inhabituelle des deux premières cystéines de l'ectodomaine de ECEL1 ne semble pas responsable de la rétention/localisation de cette enzyme dans le RE.

3.8 La protéine ECEL1 de 95 kDa est stable dans le RE

La biosynthèse et la maturation de ECEL1 ont été étudiées par des expériences de marquage et de chasse. Des cellules HEK-293 exprimant ECEL1 ont été marquées pendant 30 minutes à l'aide de [³⁵S]méthionine/cystéine et une chasse a ensuite été effectuée pour des périodes de temps indiquées dans la figure 13. À titre comparatif, PHEX, un membre de la famille de l'endopeptidase neutre connu pour être transporté jusqu'à la surface cellulaire, a aussi été exprimé dans des cellules HEK-293 et étudié par marquage et chasse. Tel qu'observé précédemment (Sabbagh *et coll.*, 2001), l'espèce PHEX de 95 kDa correspondant à la protéine glycosylée non-mature a été observée initialement (Figure 13). En-deçà de 60 minutes, une forme migrant plus lentement d'environ 105 kDa était visible, correspondant à la maturation de la protéine dans l'appareil de Golgi, où les étapes finales

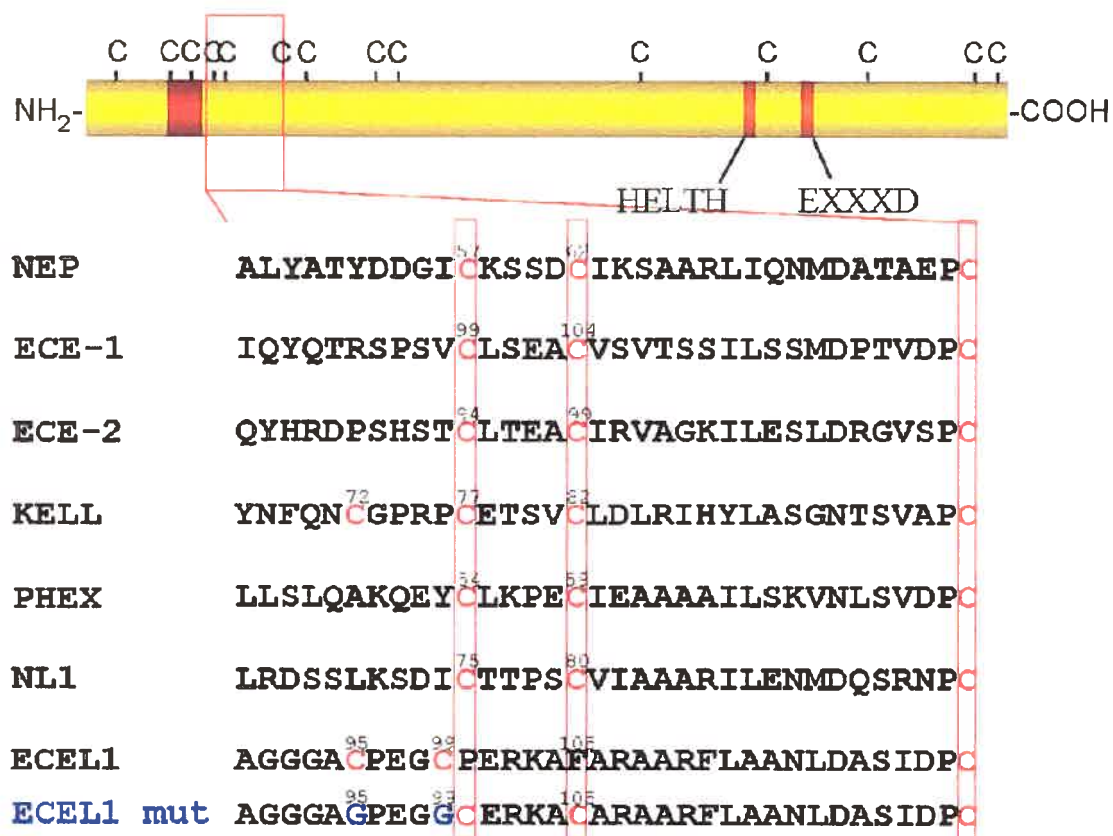


Figure 11: Représentation schématique de la protéine ECEL1 et alignement des séquences protéiques des membres de la famille de l'endopeptidase neutre (EPN) (région N-terminale des ectodomains); Alignement des deux premières cystéines de l'ectodomaine de ECEL1 d'après les autres membres de la famille

(A) Représentation de la protéine ECEL1. C, positions des cystéines; Le rectangle plein rouge positionné près de l'extrémité N-terminale représente le domaine transmembranaire; Le rectangle vide rouge délimite la région étudiée par alignement de séquences. (B) Alignement des séquences des membres de la famille de l'EPN. ECEL1 mut représente la séquence ECEL1 muté (ECEL1 C95G/C99G/P100C/F105C) où deux G (glycine) remplacent les cystéines originales, et les deux C sont maintenant alignées sur la séquence des autres membres de la famille de l'EPN.

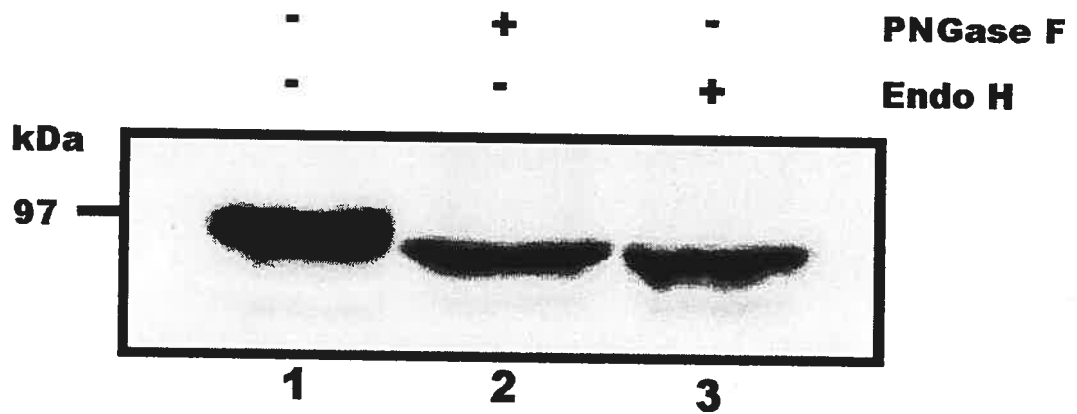


Figure 12 : Analyse par immunobuvardage des cellules HEK-293 transfectées et exprimant ECEL1 C95G/C99G/P100C/F105C

Des homogénats de cellules HEK293-ECEL1 C95G/C99G/P100C/F105C ont été séparés par SDS/PAGE sur gel 7.5% en conditions réductrices. ECEL1 C95G/C99G/P100C/F105C a été révélée par immunobuvardage grâce à l'utilisation de l'anticorps monoclonal anti-ECEL1 7B6, sans traitement (ligne 1) ou avec traitements avec la PNGase F (ligne 2) ou endo H (ligne 3). La position des marqueurs de masse moléculaire (en kDa) est montrée à gauche.

de la glycosylation surviennent. ECEL1 a aussi été synthétisée sous la forme d'une espèce de 95 kDa (Figure 13) sensible à l'endo H (*résultats non montrés*). À l'opposé de PHEX, cette espèce ECEL1 de 95 kDa n'a jamais été maturée en une forme montrant une mobilité électrophorétique plus lente, et n'a montré aucune diminution significative avec le temps. Il est généralement accepté que les protéines mal repliées ou repliées lentement présentes dans le RE sont dégradées rapidement. Dans le but de comparer la stabilité de ECEL1 avec celle d'une protéine mal repliée, nous avons aussi exprimé le mutant PHEX C85R (Cys85Arg), dans des cellules HEK-293. Cette mutation qui cause l'hypophosphatémie liée au chromosome X (*X-linked hypophosphatemia* ou XLH) chez l'humain, provoque la rétention de la protéine dans le RE (Sabbagh *et coll.*, 2001). Dans ce cas, seule la forme PHEX de 95 kDa (glycosylation non maturée) est synthétisée (Figure 13). Cependant, en contraste avec ECEL1, une diminution rapide de la quantité de protéines PHEX C85R a clairement été observée en fonction du temps de chasse, ce qui indique que la protéine mutante est rapidement dégradée. Le fait que l'espèce ECEL1 de 95 kDa soit stable indique que cette protéine n'est pas dégradée et qu'elle réside dans le RE.

3.9 ECEL1 s'associe à la calnexine de manière transitoire dans le RE

Les protéines nouvellement synthétisées sont repliées grâce, notamment, à des chaperons moléculaires localisés dans le RE. De manière générale, la chaîne peptidique néosynthétisée est rapidement reconnue par de tels chaperons, tels que la calnexine ou la calréticuline. Il a été rapporté que cette interaction est transitoire et rapide et qu'elle prend fin lorsque la structure tridimensionnelle de la nouvelle protéine est adéquate. Cependant,

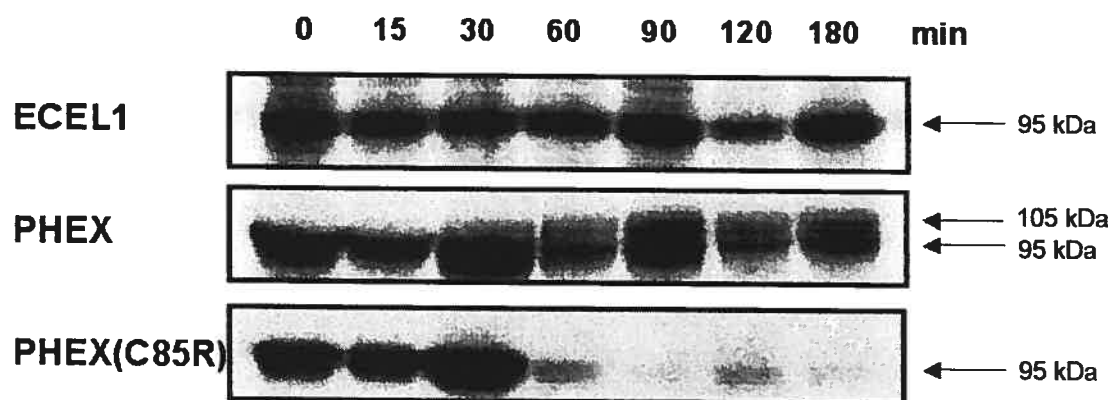


Figure 13 : Biosynthèse des protéines ECEL1, PHEX et PHEX mutante

Des cellules HEK 293 transfectées avec l'ADNc ECEL1, PHEX ou PHEX mutante (C85R) ont été marquées pendant 30 minutes à l'aide de [35 S] méthionine et chassées avec de la méthionine non marquée pendant des durées de temps indiquées en haut. Les lysats cellulaires ont été soumis à l'immunoprécipitation avec les anticorps anti-ECEL1 ou anti-PHEX, puis analysés sur SDS/PAGE sur gels 7.5%. Les flèches indiquent les formes protéiques possédant un état de glycosylation immature ou mature.

cette interaction peut se prolonger si la protéine est mal repliée. Des extraits de cellules HEK-293 transfectées ont été utilisés pour une immunoprécipitation de protéines. L'immunoprécipitation a été faite soit avec un anticorps anti-ECEL1 (7B6), soit avec un anticorps anti-calnexine. Cette étape a été suivie d'un immunobuvardage de type Western, avec l'un ou l'autre des deux anticorps ci-haut mentionnés.

L'immunoprécipitation de la calnexine suivie d'un immunobuvardage à l'aide de l'anticorps anti-ECEL1 a montré une bande, révélant ainsi une interaction entre les deux protéines (Figure 14, ligne 1). Par contre, l'intensité de cette bande était nettement plus faible que celle obtenue par l'immunoprécipitation de ECEL1 suivie d'un immunobuvardage de type Western à l'aide de l'anticorps anti-ECEL1; la bande obtenue par cette séquence d'événements a montré une grande quantité de protéine ECEL1 (Figure 14, ligne 2). La comparaison des deux a permis de conclure que seule une portion minoritaire de protéines ECEL1 est associée avec la calnexine et que la grande majorité ne le serait pas. La portion minoritaire de ECEL1 liée à la calnexine pourrait être formée de protéines nouvellement synthétisées et en processus de repliement. À titre de contrôle, une immunoprécipitation de calnexine suivie d'un immunobuvardage à l'aide de l'anti-calnexine a montré une grande quantité de protéine, alors qu'une immunoprécipitation de ECEL1 suivie d'un immunobuvardage à l'aide de l'anti-calnexine a montré une quantité beaucoup plus restreinte de calnexine (Figure 14, lignes 3 et 4, respectivement).

Ces résultats ont confirmé qu'une association entre ECEL1 et la calnexine survient lors du repliement protéique, mais que cette association est transitoire. Cette association transitoire est en accord avec les résultats de marquage et de chasse qui suggéraient que la présence de ECEL1 au RE n'était pas due à un problème de repliement et que la protéine y résidait dans une conformation stable.

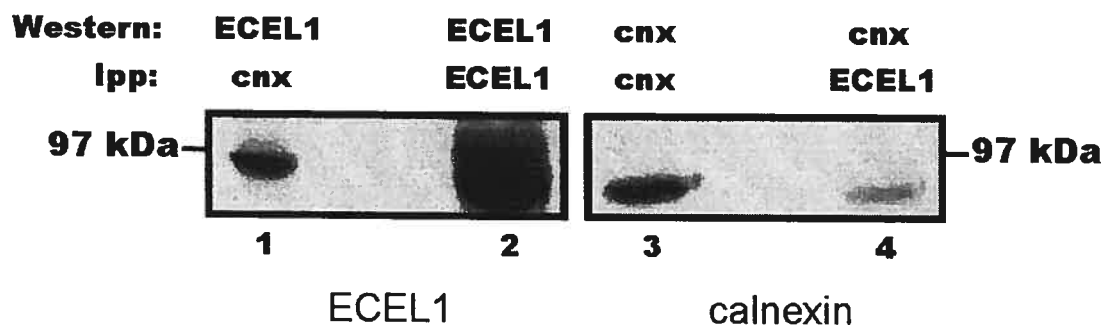


Figure 14 : ECEL1 s'associe de façon transitoire avec le chaperon calnexine, dans le RE de cellules HEK293-ECEL1

Des extraits de cellules HEK293-ECEL1 ont été immunoprécipités par l'anticorps anti-ECEL1 7B6 (lignes 2 et 4) et anti-calnexine (lignes 1 et 3). Les immunoprécipitats ont ensuite été séparés par SDS-PAGE sur un gel 7.5% dans des conditions réductrices, et détectés par immunobuvardage de type Western en utilisant les anticorps ECEL1 (lignes 1 et 2) et calnexine (lignes 3 et 4). La position des marqueurs de masse moléculaire (en kDa) est montrée à gauche et à droite. Western, immunobuvardage de type Western ; Ipp, immunoprécipitation ; ECEL1, endothelin-converting enzyme-like 1 ; cnx, calnexine.

3.10 Les domaines transmembranaire et cytoplasmique de ECEL1 sont impliqués dans la rétention/localisation au RE

Dans le but d'identifier le signal de rétention/localisation au RE de ECEL1, nous avons procédé à la construction de protéines membranaires de type II chimériques, consistants en des parties de ECEL1 fusionnées à des parties complémentaires de l'EPN (Figure 15A). La protéine chimérique E/E/N (voir le chapitre 2 – Matériel et Méthodes pour les détails) a été construite en fusionnant les domaines cytosolique et transmembranaire de ECEL1 à l'ectodomaine de l'EPN, alors que la protéine chimérique E/N/N a été obtenue par la fusion du domaine cytosolique de ECEL1 au domaine transmembranaire et à l'ectodomaine de l'EPN. La protéine chimérique N/E/N résulte du remplacement du domaine transmembranaire de l'EPN par celui de ECEL1 (Figure 15A). Les protéines chimériques ont été exprimées dans des cellules HEK-293, et des extraits cellulaires ont été analysés par immunobuvardage de type Western, avec ou sans digestion à la PNGase F ou à l'endo H. Tel qu'observé pour ECEL1 (Figure 15B, lignes 1 à 3), la protéine chimérique E/E/N est sensible à la digestion à la PNGase F autant qu'à l'endo H (Figure 15B, lignes 4 à 6), ce qui indique que la protéine n'a pas acquis de sucres complexes. En contraste, les protéines chimériques E/N/N et N/E/N sont sensibles à une digestion à la PNGase F et sont résistantes à l'endo H (Figure 15B, lignes 7 à 9 et 10 à 12, respectivement), suggérant ainsi qu'elles ont été transportées jusqu'à l'appareil de Golgi. Ces résultats indiquent que les domaines transmembranaires et cytosolique de ECEL1 sont importants et nécessaires pour la localisation de l'enzyme au RE.

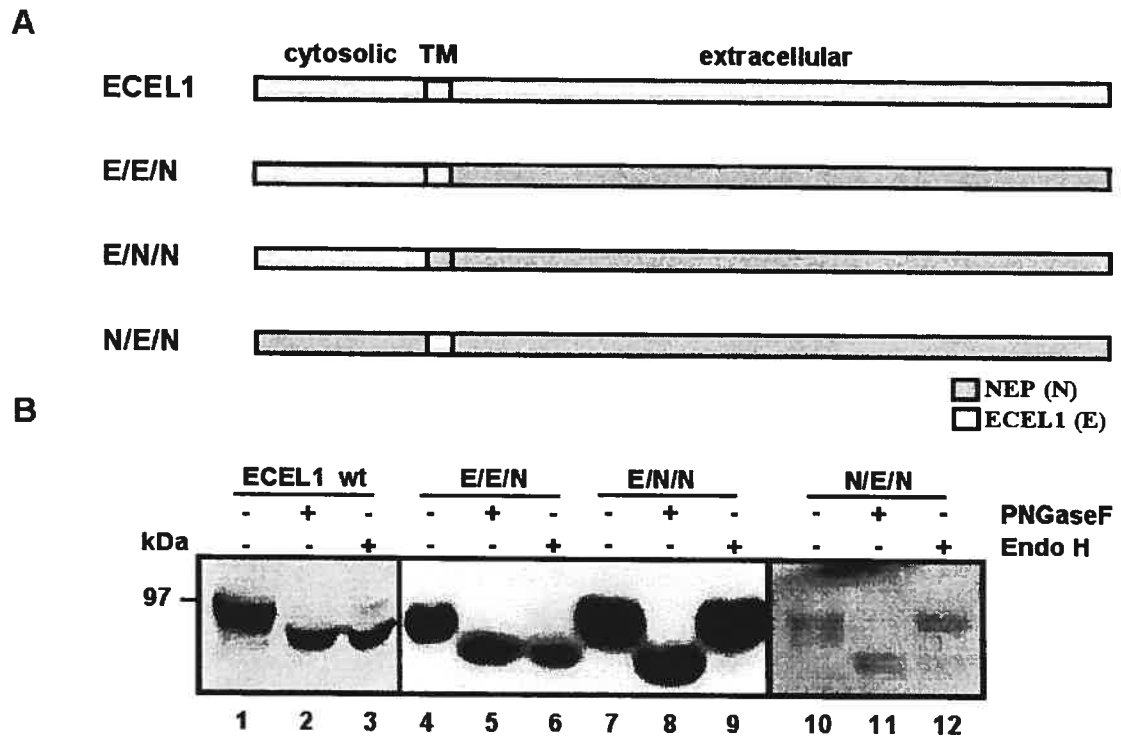


Figure 15 : Représentation schématique de protéines chimériques ECEL1/EPN et analyse d'immunobuvardage des chimères ECEL1/EPN

(A) Représentation schématique des différentes protéines chimériques ECEL1/EPN. Les boîtes blanches représentent ECEL1 (E); les boîtes grises représentent l'EPN (N). Les boîtes identifiées *cytosolic* représentent les domaines cytosoliques ; les boîtes identifiées *TM* représentent les domaines transmembranaires ; et celles identifiées *extracellular* représentent les domaines extracellulaires, ou ectodomains. (B) Des extraits de cellules HEK-293 transfectées de façon transitoire avec l'ADNc de ECEL1 ou celui des chimères ECEL1/EPN ont été traités (+) ou non (-) avec la PNGase F ou l'endo H, avant d'être séparés par électrophorèse sur gels 6% en conditions réductrices. Les protéines ont été révélées par immunobuvardage avec les anticorps anti-ECEL1 ou anti-EPN. La position des marqueurs de masse moléculaire (en kDa) est indiquée à gauche.

CHAPITRE 4 – RÉSULTATS

PURIFICATION DE L'ECTODOMAINE DE ECEL1 ET ÉTUDE DE SON ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

4.1 Production d'une forme sécrétée de l'ectodomaine de ECEL1

ECEL1 a une séquence nous permettant de la classer dans les endopeptidases de la famille de l'EPN et il est logique de penser que cette protéine possède une activité peptidasique. Dans le but d'étudier l'activité enzymatique de la nouvelle métallopeptidase, une protéine chimérique NEP2-ECEL1 a été construite. NEP2 est le seul membre de la famille qui existe sous une forme sécrétée. Cette sécrétion survient suite à un clivage par une prohormone convertase de type furine à un site situé au début de son ectodomaine. Tirant profit de la présence du site de clivage par les prohormones convertases dans la région N-terminale de l'ectodomaine de NEP2, nous avons fusionné l'ectodomaine de ECEL1 immédiatement en aval de ce site (Figure 1).

L'analyse, par immunobuvardage de type Western, du milieu de culture et des extraits de cellules LLC-PK₁ exprimant la chimère NEP2-ECEL1 a montré qu'environ 70% des protéines détectées par l'anticorps monoclonal anti-ECEL1 7B6 se retrouvaient dans le milieu de culture, tandis que 30% des protéines se retrouvaient dans les extraits cellulaires (Figure 2A). La fraction intracellulaire a diminué de masse moléculaire lorsqu'elle a été soumise à une digestion à la PNGase F ou à l'endo H (Figure 2B, lignes 2 et 3, respectivement), suggérant que cette forme de la protéine serait localisée au RE. La fraction

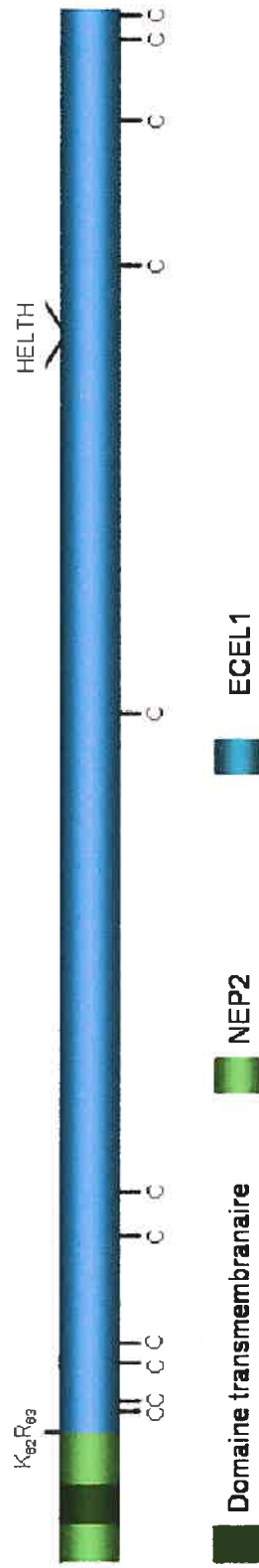


Figure 1 : Représentation schématique de la protéine chimérique NEP2-ECEL1

Représentation de la structure primaire de la protéine chimérique NEP2-ECEL1 où la séquence provenant de NEP2 est illustrée en vert et la séquence provenant de ECEL1 est illustrée en bleu. La boîte vert foncé représente le domaine transmembranaire. Toute la séquence se retrouvant en aval du site de clivage à la furine (K₉₂-R₉₃) provient de la protéine ECEL1.

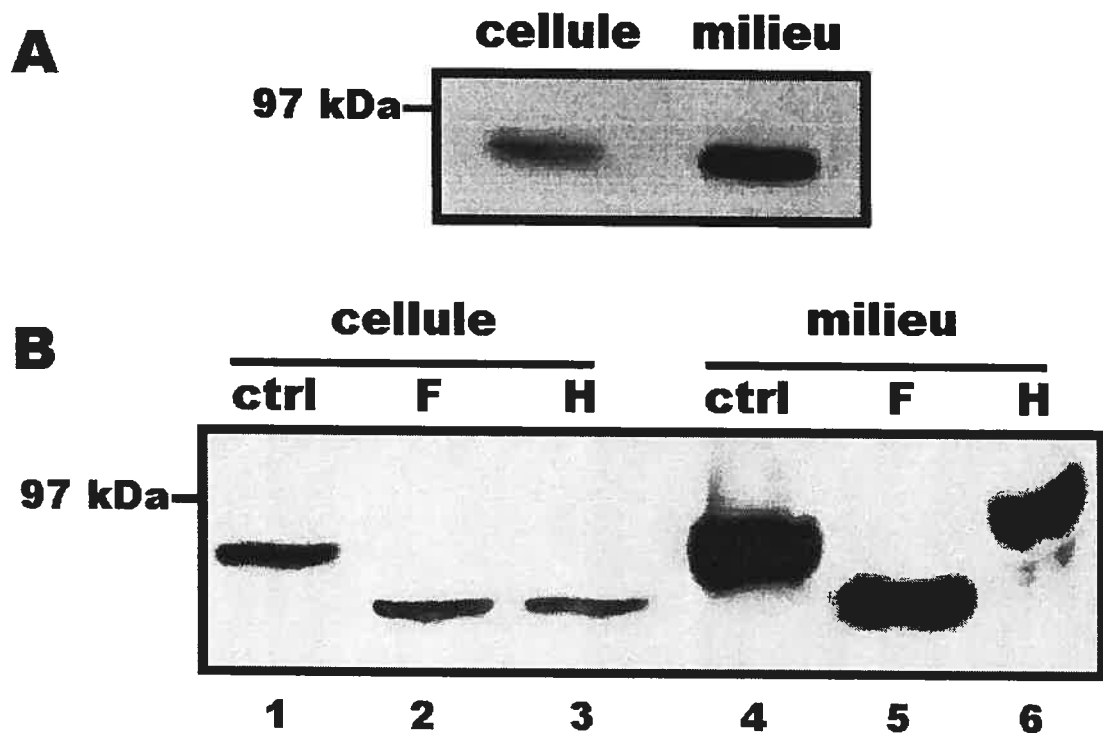


Figure 2 : Analyse par immunobuvardage de type Western des cellules LLC-PK₁ transfectées et exprimant NEP2-ECEL1

(A) Des extraits cellulaires (cellule) ou le milieu de culture (milieu) de cellules LLC-PK₁ transfectées avec NEP2-ECEL1, ont été séparés par SDS-PAGE sur un gel 7.5% dans des conditions réductrices, et détectés par immunobuvardage de type Western en utilisant l'anticorps anti-ECEL1 7B6. (B) Des extraits cellulaires (lignes 1 à 3) de cellules LLC-PK₁ transfectées avec NEP2-ECEL1 ou le milieu de culture (lignes 4 à 6) ont été analysés après digestion avec la PNGase F (lignes 2 et 5) ou l'endo H (lignes 3 et 6). La position du marqueur de masse moléculaire (en kDa) est montrée à gauche.

sécritée, lorsque soumise aux mêmes enzymes, a montré une résistance à l'endo H et une sensibilité à la PNGase F (Figure 2B, lignes 5 et 6, respectivement), ce qui suggère que cette forme de la protéine a acquis des oligosaccharides complexes lors de son transit dans l'appareil de Golgi, avant d'être envoyée par le système vésiculaire vers l'extérieur de la cellule.

4.2 Purification de l'ectodomaine de ECEL1

Le milieu de culture des cellules LLC-PK₁ contenant l'ectodomaine ECEL1 a été soumis à une purification par FPLC sur colonne Source 15Q à l'aide d'un gradient de NaCl (Figure 3). L'analyse des fractions récupérées a été effectuée par SDS-PAGE sur gel 7.5%, suivie d'un immunobuvardage de type Western avec l'anticorps anti-ECEL1 7B6. L'analyse a été concentrée davantage sur les fractions se situant dans la zone de 20% à 80% de tampon B, soit de 200 mM à 800 mM en NaCl. Les échantillons testés (Figure 4, lignes 1 à 45) ont été utilisés dans le but de couvrir les 45 premières fractions sur les 50 fractions récupérées (Figure 3).

L'analyse cumulée de l'immunobuvardage et du graphique chromatographique de l'élution suggère que l'ectodomaine est élué entre 30% et 50% de tampon B, soit environ de 300 mM à 500 mM NaCl (Figure 3). On dénote la présence de la protéine ECEL1 majoritairement dans les fractions 15 à 32. À titre de contrôle, des échantillons du filtrat initial, de l'élution initiale et du lavage final ont été analysés. On ne dénote la présence de ECEL1 que dans la fraction du filtrat initial, signifiant qu'il n'y a eu aucune perte lors de la purification à l'aide du FPLC.

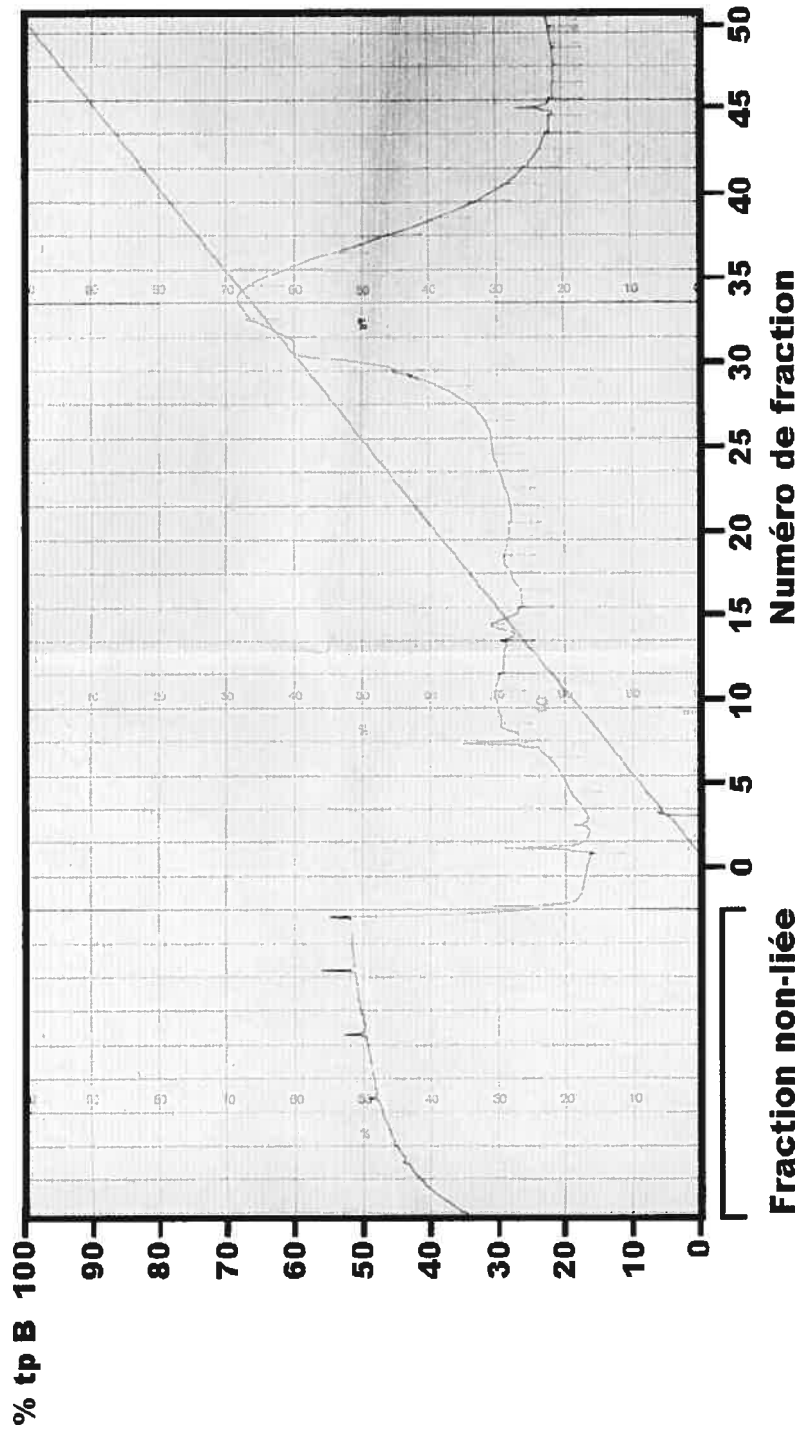


Figure 3 : Graphique chromatographique de la purification de l'ectodomaine de ECELI1 par FPLC. Le trait rouge représente la proportion (en %) de tampon B (et correspond aussi à la concentration en NaCl : 0 % tp B égale 50 mM et 100 % tp B égale 1 M). Le trait bleu représente l'absorbance observée lors de l'éluion.

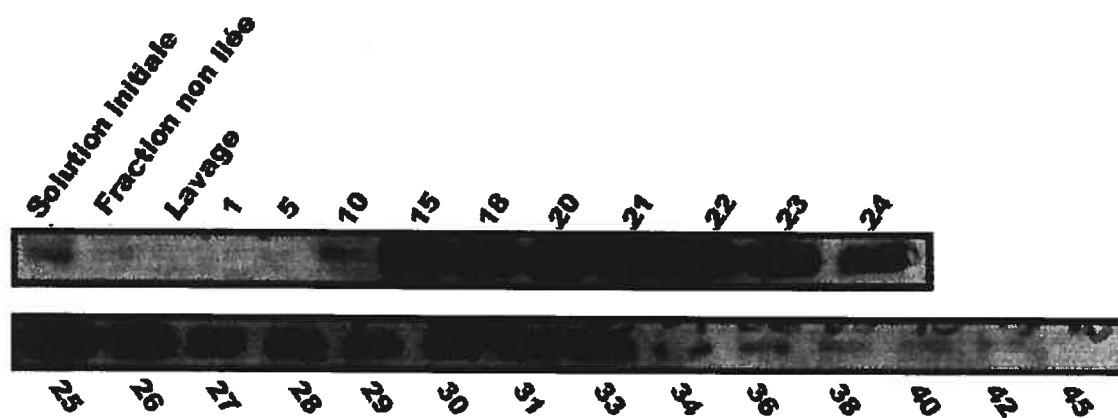


Figure 4 : Analyse par immunobuvardage de type Western des fractions récoltées suite à la purification par FPLC

Les chiffres représentent le numéro de chaque fraction testée (1 à 45). Solution initiale, échantillon de la solution de départ ; Fraction non liée, échantillon après chargement de la colonne ; Lavage, échantillon suite au lavage de la colonne.

Les mêmes fractions ont été analysés par SDS-PAGE sur gel 7.5%, suivi d'une coloration au nitrate d'argent, une méthode possédant une limite de sensibilité de l'ordre du nanogramme. Les fractions 21 à 26 ont montré une quantité significative de protéines (*résultat non montré*); un résultat en accord avec celui obtenu à partir de l'immunobuvardage avec l'anticorps anti-ECEL1. Cependant, le nombre de bandes observées dans ces fractions nous laissent croire qu'un certain niveau de contamination, de l'ordre de 50%, est encore présent. Malgré cela, les fractions 21 à 26 ont été réunies pour l'analyse enzymatique de ECEL1.

4.3 Essais enzymatiques

4.3.1 **Essais enzymatiques avec le peptide synthétique Z-gly-gly-leu-pNa**

Des échantillons contenant l'ectodomaine de ECEL1 semi-purifié du milieu de culture de cellules LLC-PK₁ ont été utilisés dans le but de tester son activité enzymatique. En tout premier lieu, le peptide synthétique Z-gly-gly-leu-pNa, un substrat connu de l'endopeptidase neutre, a été testé. Kiryu-Seo *et coll.* (2000) ont rapporté que ce peptide était clivé par DINE, l'orthologue de rat de ECEL1. Plusieurs réactions enzymatiques effectuées dans des conditions de pH variant de 5.5 à 8.5, ou encore avec des concentrations en sel (NaCl) variant de 0 à 150 mM, ainsi qu'en présence ou non de 1 mM Ca²⁺ (CaCl₂), ont été analysées par HPLC en phase inverse (RP-HPLC). Les chromatogrammes n'ont montré aucune dégradation du peptide, indiquant une absence d'activité ECEL1 face à ce peptide synthétique (*résultats non montrés*).

4.3.2 Essais enzymatiques avec des substrats d'autres membres de la famille de l'endopeptidase neutre

Tel qu'indiqué dans la dernière sous-section, des échantillons de l'ectodomaine de ECEL1 purifié du milieu de culture cellulaire LLC-PK₁ ont servi dans l'étude de l'identification d'un substrat potentiel de cette nouvelle métallopeptidase à zinc. Les peptides utilisés à cette fin ont été : la galanine, la Met-enképhaline, la Leu-enképhaline, la bradykinine, la calcitonine, la Big-endothéline-1, l'endothéline-1, la substance P, l'OGP, le PTH₁₋₈₄, PTHrP₁₋₃₄, ainsi que l' α -CGRP. Les essais enzymatiques de ECEL1 sur tous ces peptides ont été effectués dans des conditions de pH variant de 5.5 à 8.5, ou encore avec des concentrations en sel (NaCl) variant de 0 à 150 mM, ainsi qu'en présence ou non de 1 mM Ca²⁺ (CaCl₂), puis analysés par HPLC en phase inverse (RP-HPLC). Le tableau I présente les peptides et les conditions testés. Aucun de ces peptides n'a été hydrolysé par ECEL1, ce qui révèle une absence d'activité ECEL1 face à ces divers peptides. À titre d'exemple, nous présentons l'essai enzymatique en présence de la substance P (Figure 5) effectué à pH 7.0 et à une concentration en NaCl de 100 mM. En comparant les trois graphiques montrés à la figure 5, on identifie le pic de la substance P, à environ 14.8 minutes. Aucune variation du pic n'est perceptible et il n'y a pas de nouveau pic qui traduirait une activité enzymatique de ECEL1 sur la substance P.

En raison de l'absence d'une quelconque activité métallopeptidase, il nous a été impossible de poursuivre cette voie d'étude pour ce qui concerne, notamment, l'examen de l'efficacité des divers inhibiteurs connus des membres de la famille de l'endopeptidase neutre, tels que le phosphoramidon ou le thiorphan.

Tableau I : Conditions et peptides utilisés pour les essais enzymatiques

Conditions		
<u>Tampons (pH testés)</u>		
Mes 50 mM	5.5 ; 6 ; 6.5	
Tris 50 mM	7.0 ; 7.5 ; 8.0 ; 8.5	
<u>Concentrations finales NaCl (mM)</u>	0 ; 50 ; 100 ; 150	
<u>Ca²⁺ (mM)</u>	0 ; 1	
Peptides testés		
Z-gly-gly-leu-pNa	Substance P	Galanine
Met-enképhaline	Leu-enképhaline	PTH _{1,84}
PTHrP _{1,34}	Big-endothéline-1	Endothéline-1
Calcitonine	Bradykinine	OGP
α -CGRP		

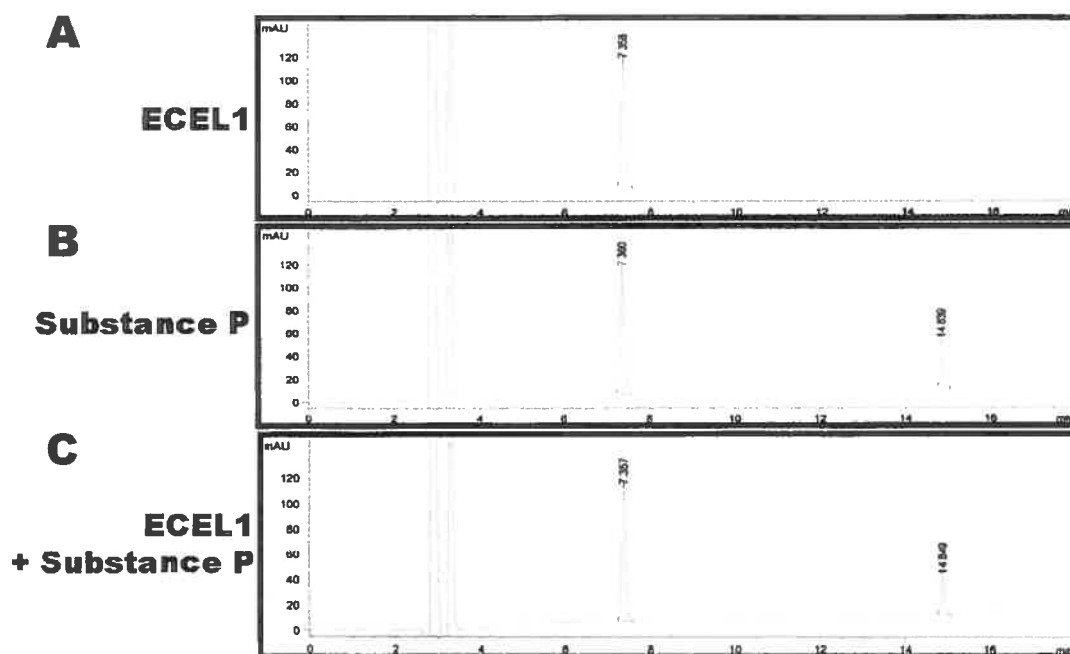


Figure 5 : Analyse par HPLC de l'activité enzymatique de ECEL1 avec la substance P

La substance P a été incubée en présence de l'ectodomaine de ECEL1 purifié par FPLC. Les produits peptidiques ont été analysés par HPLC (C). À titre de contrôle, nous pouvons comparer les profils obtenus à ceux de ECEL1 seul (A), ou de la substance P seule (B).

CHAPITRE 5 – RÉSULTATS

ÉTUDE DE LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE ECEL1

5.1 ECEL1 est exprimée de façon endogène dans la lignée cellulaire lactosomatotrope GH3

Dans le but d'identifier une lignée cellulaire exprimant ECEL1 de façon endogène, plusieurs types cellulaires ont été mis en culture. Les lignées cellulaires Neuro₂A, MC3T3, GH3, AtT-20 et CHO, de même que les cellules HEK293-ECEL1 ou HEK293-mock (non transfectées), ont été utilisées. Des extraits cellulaires totaux ont été analysés par immunobuvardage de type Western à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-ECEL1 7B6. La protéine ECEL1 de 95 kDa n'a été observée que dans l'extrait de la lignée cellulaire GH3 (Figure 1, ligne 4) et pour le contrôle positif représenté par la lignée cellulaire HEK293-ECEL1 (Figure 1, ligne 1). Aucune bande n'était visible dans les extraits des autres lignées, soit Neuro₂A, AtT-20, MC3T3 et CHO (Figure 1, lignes 2, 3, 5, 6 et 7). L'immunobuvardage à l'aide de l'anticorps anti-ECEL1 7B6 des extraits protéiques GH3 a aussi révélé une bande de plus faible masse moléculaire (Figure 1, ligne 4). Cette bande, qui n'a pas été détectée dans d'autres analyses (voir Chapitre 3, Figure 9 par exemple), est probablement due à une dégradation protéolytique lors de l'extraction.

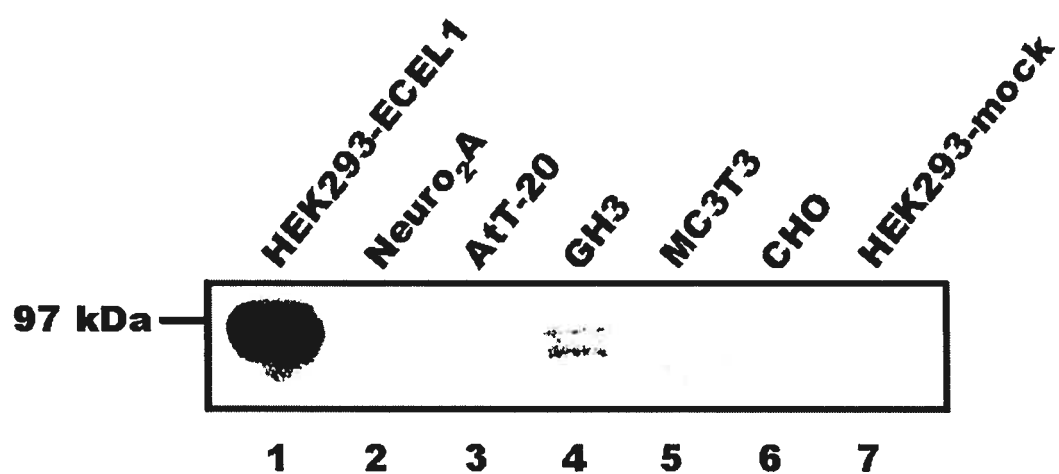


Figure 1 : Identification d'une lignée cellulaire exprimant ECEL1 de façon endogène

Des homogénats de différentes lignées cellulaires ont été séparés par SDS/PAGE sur gels 7.5% en conditions réductrices. ECEL1 a été révélée par immunobuvardage grâce à l'utilisation de l'anticorps monoclonal anti-ECEL1 7B6. La lignée cellulaire HEK293-ECEL1 est utilisée comme contrôle positif (ligne 1), alors que la lignée cellulaire HEK293-mock est utilisée comme contrôle négatif (ligne 7).

5.2 L'expression transcriptionnelle de ECEL1 est influencée par des conditions hypoxiques

Chez les eucaryotes, des systèmes spécifiques permettent la détection de conditions physiologiques dites *hypoxiques*, c'est-à-dire qui montrent un niveau insuffisant d'oxygène moléculaire (O_2), essentiel pour un métabolisme fonctionnant de manière adéquate (D'Angio et Finkelstein, 2000). Ces systèmes répondent aussi à un niveau excessif d'espèces d'oxygène réactives (ROS) et agissent de façon prédominante en contrôlant le potentiel d'activation de facteurs de transcription (Semenza, 2000 ; Wang et Semenza, 1995). Kiryu-Seo *et coll.* (2000) ont remarqué que l'expression d'ARNm d'enzymes anti-oxydantes telles la Cu/Zn-superoxyde dismutase (Cu/Zn-SOD), la Mn-superoxyde dismutase (Mn-SOD), et la glutathione peroxydase (GPX) était augmentée dans les cellules transfectées exprimant ECEL1/DINE. En plus, l'activité de SOD était aussi augmentée. Ceci suggère que ECEL1/DINE provoquerait un signal intracellulaire induisant la production de ces enzymes, qui sont essentielles pour la réduction du stress oxydatif causé par la production de radicaux libres (Kiryu-Seo *et coll.*, 2000). En tenant compte de ces éléments et du fait que le principal phénotype associé avec l'interruption du gène ECEL1 chez la souris soit une mort néonatale par anoxie (rôle de ECEL1 dans le contrôle de la respiration autonome) (Schweizer *et coll.*, 1999), nous avons voulu étudier l'impact de conditions hypoxiques sur la régulation transcriptionnelle du gène ECEL1. Un moyen de provoquer l'hypoxie de manière artificielle est d'incuber des cellules en présence de chlorure de cobalt ($CoCl_2$).

Nous avons donc tiré avantage de la lignée cellulaire hypophysaire GH3 (cellules lactosomatotropes) qui exprime, de façon endogène, la protéine ECEL1. En premier lieu,

nous avons voulu étudier l'impact d'une incubation de cellules GH3 en présence de concentration croissante de CoCl_2 . Nous avons donc étudié les niveaux transcriptionnels du gène ECEL1 en présence de quantité de CoCl_2 variant entre 0 à 200 μM . Pour cette étude, les valeurs densitométriques des produits de RT-PCR pour ECEL1 ont été normalisées en comparaison avec les valeurs d'un contrôle interne, soit celles du gène β -actine. L'incubation des cellules GH3 pendant une période de quatre heures en présence de CoCl_2 à des concentrations variant entre 0 et 200 μM a permis d'observer un effet dose-dépendant de régulation (Figure 2). Cet effet se caractérise par une régulation à la baisse des niveaux transcriptionnels du gène ECEL1.

En second lieu, nous avons voulu étudier l'impact du temps d'incubation en présence de CoCl_2 (150 μM) sur la régulation transcriptionnelle de ECEL1. L'incubation des cellules GH3 pendant différentes périodes (0, 1, 4, 8, 24 heures) en présence de CoCl_2 (150 μM) a permis d'observer un effet temporel de régulation, à la baisse, des niveaux transcriptionnels du gène ECEL1 (Figure 3). Cette baisse ne semble par contre pas linéaire; on assiste à une baisse plus marquée dans les premières quatre heures d'incubation en présence de CoCl_2 (150 μM), suivie d'une baisse moins marquée (Figure 3).

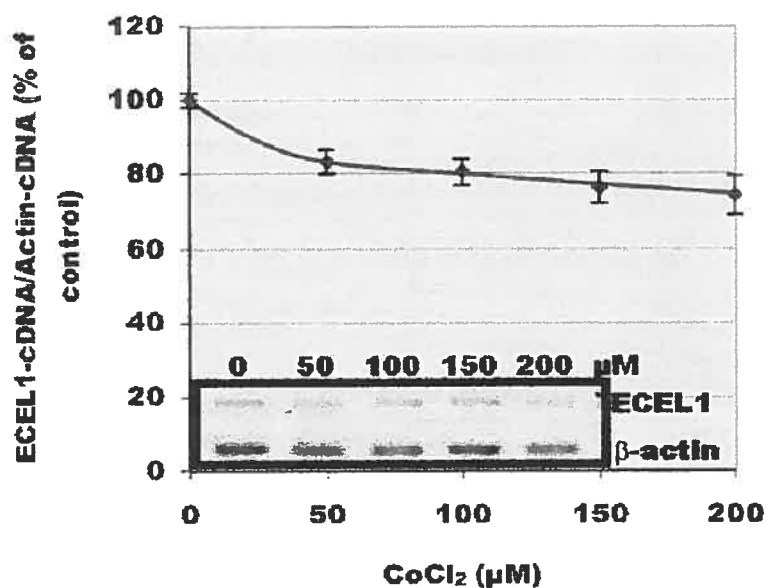


Figure 2 : Effet dose-réponse du CoCl₂ sur les niveaux d'ARNm de ECEL1 dans les cellules GH3

Les cellules ont été incubées avec différentes concentrations de CoCl₂ pendant une période de 4 h. L'ARN a été extrait et les niveaux d'ARNm de ECEL1 ont été déterminés par RT-PCR tel qu'indiqué dans le chapitre Matériel et Méthodes. Les données sont présentées en pourcentage des niveaux d'ARNm ECEL1 contrôle. Les niveaux d'ARNm ECEL1 ont été normalisés avec les niveaux d'ARNm β-actine. Le médaillon représente les résultats d'une amplification RT-PCR. Les valeurs représentent la moyenne ± l'écart-type (n = 3).

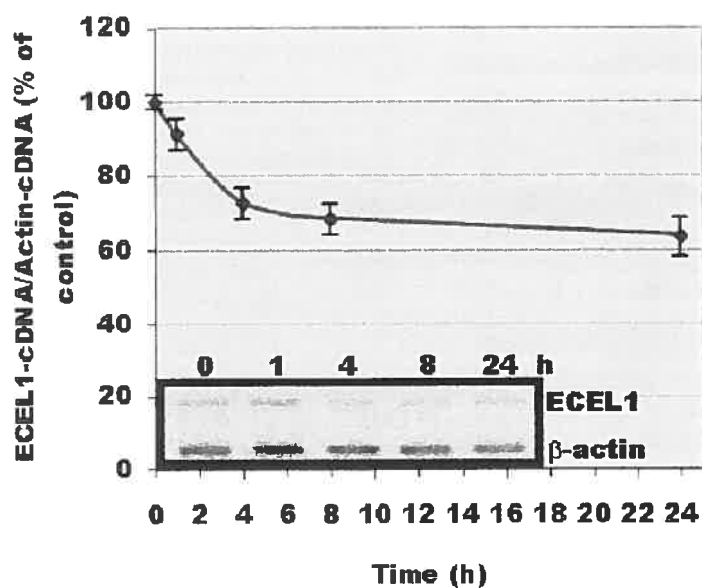


Figure 3 : Effet temporel du CoCl_2 sur les niveaux d'ARNm de ECEL1 dans les cellules GH3

Les cellules ont été incubées avec $150 \mu\text{M}$ CoCl_2 pendant différentes périodes de temps. L'ARN a été extrait et les niveaux d'ARNm de ECEL1 ont été déterminés par RT-PCR tel qu'indiqué dans le chapitre Matériel et Méthodes. Les données sont présentées en pourcentage des niveaux d'ARNm ECEL1 contrôle. Les niveaux d'ARNm ECEL1 ont été normalisés avec les niveaux d'ARNm β -actine. Le médaillon représente les résultats d'une amplification RT-PCR. Les valeurs représentent la moyenne \pm l'écart-type ($n = 3$).

5.3 L'expression transcriptionnelle de ECEL1 est influencée par des conditions provoquant une réponse due à une accumulation de protéines non-repliées (*unfolded protein response*)

La caractéristique principale de la réponse au stress du réticulum endoplasmique (UPR, *Unfolded protein response*) et, surtout, la seule composante de la réponse qui soit vraiment spécifique au RE est la coordination d'une régulation transcriptionnelle, à la hausse, d'au moins une douzaine de résidents protéiques du RE, incluant surtout des chaperons moléculaires (Ellgaard *et coll.*, 1999 ; Lee *et coll.*, 2001). Un des moyens utilisés pour induire une réponse UPR est l'incubation de cellules avec le DTT, un agent réducteur connu, qui empêche la formation de ponts thiols dans les protéines en processus de repliement. Ce milieu réducteur provoque l'accumulation de protéines non ou mal repliées, ce qui engorge le RE et induit la réponse UPR.

La présence de ECEL1 au RE, associée au fait qu'elle semble protéger la cellule lors de stress cellulaires (Kiryu-Seo *et coll.*, 2000), nous poussent à considérer l'hypothèse que ECEL1 puisse être impliquée de manière directe ou indirecte dans cette réponse au stress. Pour tester cette hypothèse, nous avons voulu étudier l'effet de l'agent réducteur DTT, inducteur de réponse UPR, sur la régulation transcriptionnelle du gène ECEL1. À cet effet, des cellules GH3 exprimant ECEL1 de façon endogène ont été incubées en présence ou en absence de DTT, à des concentrations variées (de 0 à 10 mM) ou pendant des périodes variées (de 1 à 6 heures), à 37°C.

Pour cette étude, les valeurs densitométriques des produits de RT-PCR pour ECEL1 ont aussi été normalisées en comparaison avec les valeurs d'un contrôle interne, soit celles du gène β -actine.

En premier lieu, nous avons étudié l'impact d'une incubation de cellules GH3 en présence de concentrations croissantes de DTT (de 0 à 10 mM). L'incubation des cellules GH3 pendant une période de 4 heures en présence de DTT a permis d'observer un effet dose-dépendant de régulation à la baisse des niveaux transcriptionnels du gène ECEL1 (Figure 4).

En second lieu, nous avons étudié l'impact du temps d'incubation en présence de DTT (4 mM) sur la régulation transcriptionnelle de ECEL1. Nous avons observé un effet temporel de régulation à la baisse des niveaux transcriptionnels du gène ECEL1 (Figure 5). Cette baisse a été rapide dans les premières heures d'incubation en présence de DTT (<4 h), alors qu'elle est, bien que présente, beaucoup moins prononcée par la suite.

5.4 L'induction de la réponse due à une accumulation de protéines non-repliées (*unfolded protein response*) provoque une diminution des niveaux protéiques de ECEL1

Lors d'un stress dans le RE, les protéines de la voie cellulaire de sécrétion sont dans l'incapacité de se replier adéquatement et les chaperons doivent alors rester associés à elles dans le but de prévenir leur agrégation (Ma et Hendershot, 2002). Un des facteurs initiaux dans la réponse UPR est, chez les mammifères, la saturation du système de repliement. De façon plus précise, BiP (GRP78), un des chaperons responsables du repliement protéique, sert de *senseur de stress du RE* (Dorner *et coll.*, 1992). En absence de stress dans le RE, BiP est lié au domaine luminal de la protéine kinase Ire1 ou PERK, ce qui les conserve dans un état monomérique inactif. Quand un stress survient et que le niveau de protéines non ou mal

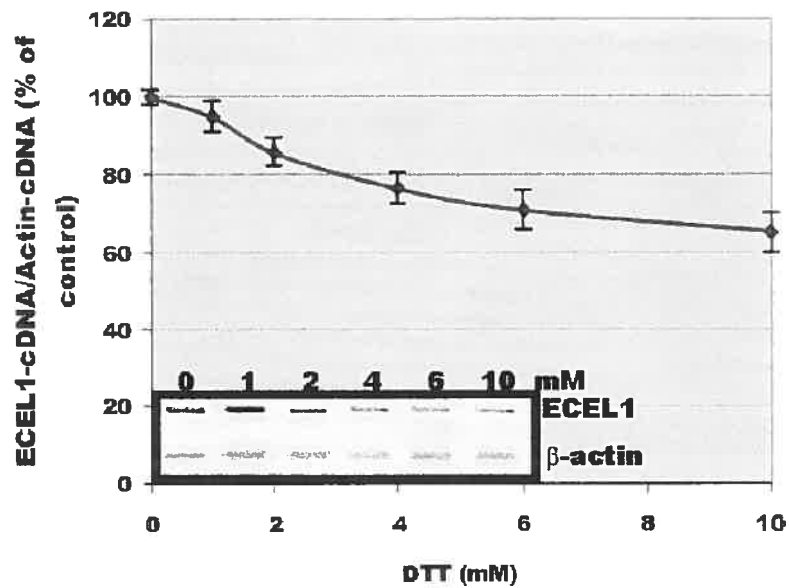


Figure 4 : Effet dose-réponse du DTT sur les niveaux d'ARNm de ECEL1 dans les cellules GH3

Les cellules ont été incubées avec différentes concentrations de DTT pendant une période de 4 h. L'ARN a été extrait et les niveaux d'ARNm de ECEL1 ont été déterminés par RT-PCR tel qu'indiqué dans le chapitre Matériel et Méthodes. Les données sont présentées en pourcentage des niveaux d'ARNm ECEL1 contrôle. Les niveaux d'ARNm ECEL1 ont été normalisés avec les niveaux d'ARNm β -actine. Le médaillon représente les résultats d'une amplification RT-PCR. Les valeurs représentent la moyenne \pm l'écart-type (n = 3).

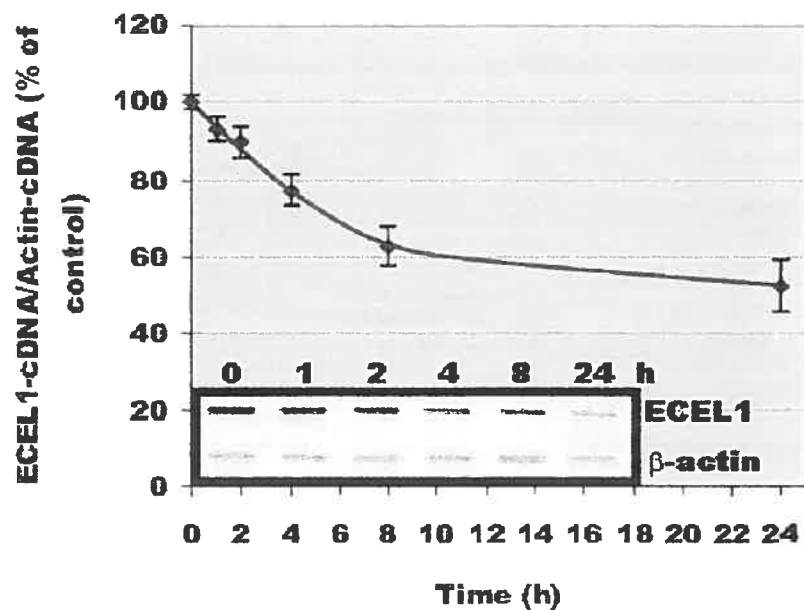


Figure 5 : Effet temporel du DTT sur les niveaux d'ARNm de ECEL1 dans les cellules GH3

Les cellules ont été incubées avec 4 mM DTT pendant différentes périodes de temps. L'ARN a été extrait et les niveaux d'ARNm de ECEL1 ont été déterminés par RT-PCR tel qu'indiqué dans le chapitre Matériel et Méthodes. Les données sont présentées en pourcentage des niveaux d'ARNm ECEL1 contrôlé. Les niveaux d'ARNm ECEL1 ont été normalisés avec les niveaux d'ARNm β -actine. Le médaillon représente les résultats d'une amplification RT-PCR. Les valeurs représentent la moyenne \pm l'écart-type (n = 3).

repliées augmente, BiP est relâché, permettant aux kinases d'homodimériser, ce qui provoque l'induction de la réponse au stress (Bertolotti *et coll.*, 2000 ; Okamura *et coll.*, 2000). De plus, la réponse UPR provoque l'augmentation de la transcription de certains gènes, notamment ceux exprimant des chaperons, ou encore des enzymes impliqués dans le repliement protéique.

Pour faire suite aux résultats obtenus à la section précédente et déterminer l'influence de la réponse UPR sur les niveaux protéiques de ECEL1, nous avons comparé les niveaux protéiques de ECEL1 suite à une incubation de cellules GH3 en présence ou non de DTT (4 mM), pendant 24 heures. À titre de contrôle, nous avons aussi évalué les niveaux protéiques de GRP78/BiP. Cette incubation avec le DTT, comparativement à une incubation sans DTT, a provoqué une diminution marquée des niveaux protéiques de ECEL1. Cette diminution est de l'ordre de 60% (Figure 6).

À l'opposé, les résultats nous montrent clairement une augmentation des niveaux protéiques de GRP78/BiP, ce qui démontre que nous assistons à une réponse UPR induite par l'incubation en présence de DTT (4 mM) (Figure 6).

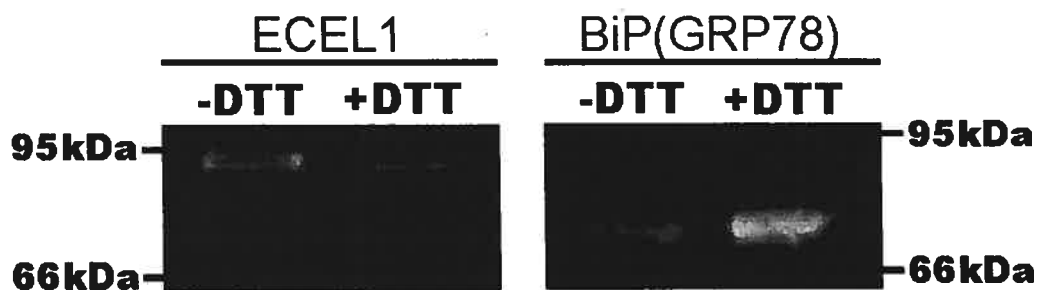


Figure 6 : Effet de la réponse UPR, induite par le DTT, sur les niveaux protéiques de ECEL1 et BiP(GRP78) dans les cellules GH3

Des extraits de cellules GH3 traitées ou non (- ou + DTT 4 mM, incubation d'une durée de 24 h) ont été immunoprécipités par l'anticorps anti-ECEL1 7B6 (pour ECEL1) et anti-GPR78 (pour BiP/GPR78). Les immunoprécipitats ont ensuite été séparés par SDS-PAGE sur un gel 7.5% dans des conditions réductrices, et détectés par immunobuvardage de type Western en utilisant l'anticorps anti-ECEL1 7B6 et GPR78, respectivement. La position des marqueurs de masse moléculaire (en kDa) est montrée à gauche et à droite.

CHAPITRE 6 - DISCUSSION

L'EPN, découverte en 1974 par Kerr et Kenny, est le prototype d'une famille grandissante qui englobe notamment les ECE (*enzymes de conversion de l'endothéline*), PHEX (*Phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome*), KELL et NEP2 (pour revue voir Kenny et Boustead, 1997).

L'*Endothelin-converting enzyme-like 1* (ECE1) est un nouveau membre de cette famille. L'ADNc de XCE/ECEL1 a été isolé, pour la première fois en 1999 par Valdenaire *et coll.* (1999), à partir d'une banque d'ADNc de cerveau humain. Nous avons isolé le même gène avec des sondes possédant une homologie pour l'EPN, d'où le nom que nous lui avons initialement décerné : *Neprihysin-like 3* (NL3). Ce gène est maintenant officiellement nommé ECEL1 (HUGO Gene Nomenclature Committee : www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/).

L'ARNm a été retrouvé de façon majoritaire dans le système nerveux central chez la souris (Valdenaire *et coll.*, 1999) et le rat (Kiryu-Seo *et coll.*, 2000). De plus, l'étude de souris homozygotes ECEL1 *-/-* suggère que l'enzyme joue un rôle crucial dans le contrôle central de la respiration autonome (Schweizer *et coll.*, 1999). Toutefois, le mécanisme par lequel ECEL1 contrôle cette fonction vitale ainsi que le ou les substrat(s) naturel(s) de l'enzyme sont toujours inconnus. La localisation sous-cellulaire de la protéine ECEL1 est, en outre, encore mal définie.

Dans le but d'éclaircir le rôle et la fonction physiologique de ECEL1, nous avons développé un anticorps monoclonal spécifique et nous l'avons utilisé dans l'étude de la biosynthèse de l'enzyme. L'anticorps ainsi produit s'est avéré extrêmement spécifique, ne reconnaissant que le produit du gène de ECEL1 (Chapitre 3, Figure 4). Cette spécificité

s'est avérée essentielle dans la quête de l'identification des sites de localisation de la protéine ECEL1.

6.1 Localisation sous-cellulaire de ECEL1

En accord avec des résultats préliminaires d'immunofluorescence utilisant une protéine de fusion ECEL1/GFP (*Green fluorescent protein*) (Valdenaire *et coll.*, 2000), nous avons démontré, pour la première fois, que ECEL1 était localisée de façon majoritaire dans le réticulum endoplasmique rugueux. Dans le but d'observer cette distribution cellulaire, nous avons utilisé des lignées cellulaires eucaryotes transfectées avec un plasmide contenant la séquence de l'ADNc de ECEL1. L'analyse, par l'utilisation d'endoglycosidases, d'extraits protéiques provenant de ces cellules transfectées nous a permis d'observer une sensibilité à la PNGase F. Ceci nous a permis de confirmer la présence de N-glycosylations (diminution de la masse équivalant à trois N-glycosylations) ainsi qu'une sensibilité à l'endo H, démontrant ainsi que la protéine n'a pas subi de modifications périphériques de ses sucres N-liés (Chapitre 3, Figure 5B). Ces modifications sont faites au niveau de l'appareil de Golgi (plus précisément dans le *cis*-golgi) et l'absence d'oligosaccharides complexes suggère que ECEL1 se retrouve dans un compartiment pré-golgien.

Déjà, cette première caractéristique de ECEL1 est particulière si on la compare à la majorité des autres membres de la famille de l'EPN connus. En effet, toutes les autres métallopeptidases de la famille, exceptée la forme membranaire de NEP2, sont résistantes à l'endo H, ce qui signifie qu'elles sont toutes destinées vers une localisation *post-RE*.

À ce propos, l'EPN a été localisée à la membrane plasmique (Kenny *et coll.*, 1983), tout comme le complexe antigénique Kell (Marsh, 1992 ; Redman et Lee, 1995) et PHEX (Du *et coll.*, 1996 ; Grieff *et coll.*, 1997 ; Lipman *et coll.*, 1998). Les quatre isoformes de l'ECE-1 ont une localisation cellulaire qui varie d'une forme à l'autre (Schweizer *et coll.*, 1997). ECE-1a est principalement exprimée à la surface cellulaire alors que ECE-1b est présente dans des vésicules intracellulaires – les endosomes tardifs (Schweizer *et coll.*, 1997 ; Azarani *et coll.* 1998 ; Muller *et coll.*, 2003) – ou, peut-être même dans le TGN (*trans*-Golgi Network) (Schweizer *et coll.*, 1997). De façon claire, ECE-1b est localisée dans des structures intracellulaires aiguillée par son domaine cytosolique. ECE-1c, qui correspond à une forme de ECE-1b amputée de ses 17 premiers acides aminés, est majoritairement présente à la surface cellulaire. Elle est néanmoins aussi présente, bien que de façon minoritaire, dans des compartiments intracellulaires. On en trouve de faibles quantités dans les mêmes structures intracellulaires que ECE-1b (Schweizer *et coll.*, 1997). ECE-1d est présente à la fois au niveau des endosomes et à la membrane plasmique (Muller *et coll.*, 2003). Finalement, l'absence d'activité à la surface cellulaire indique que ECE-2 se présente aussi dans des compartiments intracellulaires. La localisation particulière des substrats ainsi que la nécessité d'un milieu à pH acide pour une activité optimale, suggère l'hypothèse que ce compartiment serait le TGN (Emoto et Yanagisawa, 1995). Le déterminant structural responsable de cette localisation au TGN n'a pas encore été identifié.

Dans le cas de NEP2, des formes membranaire et sécrétée ont été observées, conséquence d'un épissage alternatif de l'exon contenant le site de clivage protéolytique qui mène à la sécrétion (Ikeda *et coll.*, 1998 ; Ghaddar *et coll.*, 2000 ; Ouimet *et coll.*, 2000 ; Raharjo *et coll.*, 2001). Alors que la forme soluble sécrétée de NEP2 est transportée à la surface cellulaire, des analyses d'immunofluorescence de cellules transfectées, combinées à

une sensibilité à l'endo H, ont suggéré que la forme membranaire était localisée dans les compartiments précoces de la voie de sécrétion, possiblement le RE (Ikeda *et coll.*, 1998 ; Kawamoto *et coll.*, 2003 ; Rose *et coll.*, 2002). Le déterminant structural responsable de la localisation intracellulaire de la forme membranaire de NEP2 n'a pas encore été identifié. Cependant, la région N-terminale du domaine luminal pourrait en être responsable car les régions cytosoliques et transmembranaires des formes sécrétée et intracellulaire sont identiques (Raharjo *et coll.*, 2001).

Dans le but de confirmer la localisation sous-cellulaire de ECEL1, nous avons procédé à l'analyse de cellules HEK293-ECEL1 en immunofluorescence par microscopie confocale ainsi que par fractionnement cellulaire. L'analyse comparative d'immunofluorescence des co-marquages Giantine/ECEL1 et Calnexine/ECEL1 a permis, premièrement, d'écarter l'appareil de Golgi comme site de localisation de ECEL1 et, deuxièmement, de confirmer le RE comme compartiment hôte de ECEL1. En effet la giantine, une protéine retrouvée dans l'appareil de Golgi, n'affiche aucune colocalisation avec ECEL1 ce qui soutient la première affirmation. De son côté, la calnexine affiche une colocalisation quasi-parfaite avec ECEL1, ce qui confirme la deuxième affirmation.

Dans un même ordre d'idées, les études de fractionnement cellulaire nous ont permis de faire la discrimination entre les compartiments situés en amont de l'appareil de Golgi. La distribution de ECEL1 dans le gradient fut comparée avec celle de β -COP (un marqueur des vésicules de transport Golgi-à-RE) et de la calnexine. La distribution de ECEL1 est pratiquement identique à celle de la calnexine, ce qui confirme la présence de la métallopeptidase dans le RE (Chapitre 3, Figure 8).

Ces résultats démontrent hors de tout doute la localisation de ECEL1 dans le RE. Il nous est d'ailleurs possible d'affirmer qu'il s'agit d'un mécanisme de localisation qui

empêche la protéine d'être exportée à l'extérieur du RE (à l'opposé d'un mécanisme de recouvrement (*retrieval*) où les protéines peuvent s'échapper du RE et se rendre jusqu'au *cis*-Golgi). En effet, les protéines empruntant le deuxième mécanisme voient leurs oligosaccharides converties de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ à $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ par la mannosidase I du *cis*-Golgi pour être par la suite récupérées par le RE ; les oligosaccharides de ces protéines sont alors résistantes à l'endo H.

Toutefois, nos travaux montrent aussi de façon claire qu'une petite portion de ECEL1 (probablement moins que 10%) se rend à la surface cellulaire. Cette observation concorde avec l'observation d'une bande fine résistante à l'endo H (Chapitre 3, Figure 5B). Mais cette observation est surtout évidente dans des expériences de biotinylation de surface de cellules HEK-293 transfectées, où deux formes de ECEL1, soit 105 et 100 kDa respectivement, sont détectées à la membrane plasmique (Chapitre 3, Figure 6). Ces deux espèces diffèrent dans leur état de glycosylation : la protéine de 100 kDa est sensible à une digestion à l'endo H, alors que la forme protéique de 105 kDa, elle, est résistante. Il est inhabituel de retrouver une protéine sensible à l'endo H qui se rende à la membrane plasmique, mais l'absence de marquage de biotine pour l'espèce protéique de 95 kDa localisée dans le réticulum endoplasmique rugueux, couplée à l'absence d'actine biotinylée, suggère un marquage spécifique des protéines localisées à la surface cellulaire, telles que le marquage de ECEL1 de 100 kDa. Ceci étant dit, il nous est impossible de confirmer ou d'expliquer qu'une telle forme de glycosylation soit présente sur des protéines retrouvées en aval du *cis*-Golgi.

Une distribution similaire de ECEL1, entre le réticulum endoplasmique rugueux et la surface cellulaire, a été obtenue par l'analyse d'immunobuvardage de type Western d'extraits d'hypophyse de souris. Ceci a indiqué que cette double distribution n'était pas

due à une surexpression de protéines dans les cellules en culture transfectées (Chapitre 3, Figure 9). La présence de ECEL1 à la surface cellulaire a suggéré qu'une des fonctions de l'enzyme pourrait consister en la régulation de l'activité de peptides extracellulaires.

6.2 L'effet de l'utilisation d'un chaperon chimique sur la localisation de ECEL1

Plusieurs observations supportent un modèle cinétique (effet cinétique) de repliement protéique (Drumm *et coll.*, 1991 ; Denning *et coll.*, 1992). Un des corollaires de ce modèle nous ramène au principe qu'une maturation protéique inadéquate ou inefficace peut être améliorée ou corrigée. Tirant profit de protéines mutantes qui montrent des défauts de transport à travers la voie de sécrétion, il a été montré, d'une part, que certains agents chimiques ou certaines conditions de culture cellulaire avaient des effets compensateurs sur l'accumulation de protéines non repliées. D'autre part, il a été montré qu'il était aussi possible de prévenir les problèmes de repliement d'une proportion de ces protéines mal repliées (Brown *et coll.*, 1996). De basses températures de croissance cellulaire (i.e. 26°C), par exemple, permettent ce genre de résultats (Brown *et coll.*, 1996 ; Brown *et coll.*, 1997). D'autres molécules de faible masse moléculaire telles que le glycérol, le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou encore l'eau deutérée (D₂O) peuvent stabiliser les protéines à l'égard d'une dénaturation thermique et, ce, autant *in vitro* (Gerlisma et Sturr, 1972 ; Back *et coll.*, 1979 ; Gekko et Koga, 1983) qu'*in vivo* (Lin *et coll.*, 1981 ; Henle *et coll.*, 1983 ; Edington *et coll.*, 1989). D'une même façon, des méthylamines, telles que la triméthylamine N-oxyde

(TMAO), sont reconnues pour leurs capacités protectrices contre la dénaturation par l'urée ou une concentration élevée en sels (Somero *et coll.*, 1986).

Selon un mécanisme proposé, le glycérol serait préférentiellement exclu des domaines polypeptidiques (Gekko et Timasheff, 1981a ; Gekko et Timasheff, 1981b). Cependant, de plus hautes concentrations de glycérol tendent à accroître le degré relatif d'interaction du solvant avec les protéines. Dans le but de diminuer cette hydratation relative, les polypeptides diminuent leur surface d'interaction protéine-solvant en empruntant une conformation plus compacte ou en augmentant leur auto-association. En d'autres mots, de hautes concentrations de glycérol résultent en l'augmentation d'un «effet hydrophobe», favorisant les interactions intramoléculaires (Brown *et coll.*, 1996).

C'est donc dans le but d'évaluer si ECEL1 rencontrait des défauts de repliement que nous avons traité des cellules avec de hautes concentrations de glycérol (un petit polyol perméable aux membranes) (Brown *et coll.*, 1996 ; Sato *et coll.*, 1996). L'utilisation de ce chaperon chimique permet d'augmenter la proportion de protéines ECEL1 résistantes à l'endo H ; cette proportion de protéine ECEL1 à la surface cellulaire double (Chapitre 3, Figure 10). Cette observation nous permet de croire que le repliement de ECEL1, sans pour autant être défectueux, pourrait ne pas être d'une efficacité optimale. En ce sens, notons que malgré une augmentation marquée de la présence de la protéine hors du réticulum endoplasmique, la majeure partie demeure toutefois dans le compartiment où le repliement s'effectue, à savoir le réticulum endoplasmique (environ 30% à la membrane plasmique vs 70% dans le RE, suite au traitement en présence de glycérol). À titre de comparaison, le mutant thermosensible de *p53* (A135V), ou une forme thermosensible de la protéine pp60^{src} (la protéine transformante encodée par *Rous Sarcoma Virus*), ou encore le mutant CFTR ΔF508 affichent tous des résultats sensiblement plus élevés. Pour ces

dernières, l'augmentation de la quantité de protéines se rendant à la membrane plasmique varie entre 50% et 300% (Brown *et coll.*, 1996 ; Sato *et coll.*, 1996 ; Brown *et coll.*, 1997).

Les chaperons chimiques semblent donc influencer la fidélité générale de la machinerie de repliement protéique, possiblement en réduisant la probabilité que des polypeptides mutants néosynthétisés ne soient plus pris en charge par la voie de repliement et qu'ils aboutissent dans un état dénaturé ou forment des agrégats (Brown *et coll.*, 1997). En ce sens, toutes les protéines néosynthétisées sont donc probablement affectées par l'utilisation du glycérol. C'est donc dire qu'une protéine se repliant normalement, mais à un taux relativement lent, comme c'est peut-être le cas pour ECEL1, est probablement influencée par la présence de chaperons chimiques. La section qui suit nous permettra de confirmer que la protéine ECEL1 ne rencontre pas de problème de repliement qui soit responsable de sa localisation dans le RE.

6.3 La stabilité de la structure de la protéine ECEL1 n'est pas en cause dans sa rétention au RE

Nous avons proposé le réticulum endoplasmique comme site de localisation de ECEL1. Deux types de protéines sont retenues dans le RE : les protéines mal repliées (et/ou non complètement assemblées) et les protéines résidentes du RE. Les protéines mal repliées sont soumises à une rétention suivie d'une dégradation dans le RE, aussi appelées «contrôle de qualité pré-golgien», qui empêche le trafic à travers la voie de sécrétion de polypeptides mal repliés ou de sous-unités de protéines membranaires oligomériques mal assemblées (Klausner et Sitia, 1990 ; Hammond et Helenius, 1995). Il a d'ailleurs été

démontré que suite à la rétention de certaines protéines dans le RE, la voie de dégradation d'ubiquitine était impliquée dans la dégradation de ces protéines mal repliées (Kopito, 1997).

Dans le cas de protéines membranaires, le domaine transmembranaire de ces protéines et, de façon plus spécifique, des résidus chargés dans cette région sont responsables de la rétention au RE ainsi que de la dégradation subséquente (Wileman *et coll.*, 1990 ; Bonifacino *et coll.*, 1990). Ces protéines sont généralement rapidement détruites, affichant une demi-vie de moins d'une heure (Ellgaard *et coll.*, 1999 ; Tang *et coll.*, 1997).

Considérant la présence d'une grande quantité de ECEL1 dans le réticulum endoplasmique, la rétention observée pourrait être la conséquence d'une défectuosité de repliement protéique qui provoquerait sa dégradation subséquente. Par contre, il y a absence de résidus chargés dans le domaine transmembranaire de ECEL1. Dans le but d'étudier cette possibilité, nous avons procédé à une analyse de marquage suivie d'une chasse (*pulse chase*) (Chapitre 3, Figure 13). Deux observations en ont résulté : premièrement, la protéine glycosylée avec des sucres immatures est très stable ; deuxièmement, la sortie de ECEL1, du réticulum endoplasmique rugueux, à la suite de sa biosynthèse est lente, alors qu'après plus de trois heures de chasse, nous n'avons pu détecter de formes protéiques résistantes à l'endo H (la forme protéique de 105 kDa). Cette dernière observation peut expliquer les quantités minimales de ECEL1 à la surface cellulaire. La stabilité protéique de ECEL1 dans le réticulum endoplasmique contraste de façon remarquable avec la stabilité observée pour la forme mutante de la protéine PHEX (PHEX C85R), utilisée comme contrôle dans cette étude et qui est presque entièrement dégradée après seulement soixante minutes de chasse. De son côté, la protéine PHEX affiche une stabilité comparable à ECEL1 mais, à l'opposé de cette dernière, PHEX possède des sucres

maturés (résistants à l'endo H) après environ 1 h de chasse.

De façon similaire, des protéines mal repliées, telles que des formes mutantes de la protéine CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (Ward et Kopito, 1994) ou, encore, des sous-unités mutantes de complexes protéiques (i.e. des sous-unités du complexe du récepteur d'acétylcholine nicotinique) qui restent localisées dans le RE, possèdent la même caractéristique d'avoir de très courtes demi-vies (Wang *et coll.*, 2002). La stabilité de ECEL1 dans le réticulum endoplasmique suggère donc que la protéine est spécifiquement retenue, c'est-à-dire qu'elle n'est pas retenue par la machinerie de contrôle de qualité du RE et qu'elle jouerait donc un rôle dans ce compartiment cellulaire particulier.

En parfaite cohérence avec cette hypothèse, ECEL1 néosynthétisée montre une interaction transitoire avec une protéine transmembranaire du réticulum endoplasmique, la calnexine (Chapitre 3, Figure 14). Ce chaperon joue un rôle particulier en ce sens que sa sélectivité pour des chaînes polypeptidiques est médiée, au moins en partie, par sa capacité de lier de façon *lectin-like* les oligosaccharides riches en mannose monoglucosylés (Helenius, 1994). Toutefois, l'interaction de la calnexine ne se prolonge que pour des chaînes polypeptidiques mal repliées, alors que les chaînes correctement repliées sont libérées du joug de la calnexine (Kopito, 1999). D'une part, les études de marquage et de chasse (*pulse chase*) montrent que ECEL1 possède un niveau de stabilité comparable à des protéines correctement repliées ; d'autre part l'interaction d'une faible proportion de protéine ECEL1 seulement avec la calnexine s'explique par une liaison au chaperon lors de la synthèse protéique. Il peut facilement être proposé que cette interaction prenne fin lors de l'achèvement du repliement de la structure protéique. À titre comparatif, il a été démontré que CFTR ne se lie que de façon transitoire à la calnexine, alors que des mutants CFTR mal repliés y restent liés (Yang *et coll.*, 1993 ; Pind *et coll.*, 1994).

Une autre caractéristique particulière de la plupart des protéines empruntant la voie de sécrétion se traduit par une dépendance aux ponts disulfure dans la formation adéquate ainsi que dans la stabilisation des structures tridimensionnelles. Les membres de la famille de l'endopeptidase neutre n'échappent pas à cette règle (à titre d'exemple, voir Oefner *et coll.*, 2000). L'alignement des cystéines entre les séquences primaires de l'ectodomaine des membres de la famille M13 est relativement bien conservé. À ce propos, ECEL1 possède 14 cystéines dans son domaine luminal, dont 10 démontrent un niveau de conservation élevé parmi les membres de la famille. L'EPN possède, par exemple, 12 résidus cystéines impliqués dans la formation de ponts disulfure et, par le fait même, participant à la stabilisation de la conformation de l'enzyme (Tam *et coll.*, 1985). On peut donc s'attendre à la même importance des résidus cystéines retrouvés dans la région lumineuse de ECEL1. Il a par contre été intrigant de remarquer un léger désalignement des deux premières cystéines conservées de l'ectodomaine de ECEL1 par rapport à tous les autres membres de la famille (voir Chapitre 3, Figure 11). De plus, alors qu'il y a généralement quatre acides aminés qui séparent les deux premières cystéines, on en note seulement trois du côté de la séquence protéique ECEL1.

Cette particularité de la séquence protéique ECEL1 nous donnait la possibilité de poser l'hypothèse d'une contribution structurale de l'ectodomaine dans la rétention au RE. Le mutant ECEL1 C95G/C99G/P100C/F105C qui voit les deux premières cystéines alignées sur les autres séquences protéiques des membres de la famille, se comporte de la même façon que la protéine sauvage lors de digestions au endoglycosidases PNGase F et endo H (Chapitre 3, Figure 12). Le positionnement particulier de ces résidus n'est donc pas responsable de la rétention au réticulum endoplasmique.

6.4 Identification des déterminants responsables de la localisation de ECEL1 au RE

De manière compatible avec l'hypothèse d'une protéine ECEL1 retenue spécifiquement dans le RE, notre objectif a été d'identifier la région protéique responsable de cette localisation au RE. Tel qu'expliqué dans la section 1.4.1, les protéines résidentes du RE possèdent généralement des signaux de localisation ou de recyclage vers le RE. L'analyse sommaire de la séquence protéique de ECEL1 n'a pas permis d'identifier un signal classique de localisation/recyclage. À cet égard, les expériences de permutations de domaines, dans lesquels des domaines de ECEL1 sont remplacés par les régions équivalentes de l'EPN, nous permettent de déterminer l'implication de chacun des trois domaines de ECEL1 (cytoplasmique, transmembranaire ou luminal) (Chapitre 3, Figure 15). L'EPN s'avère un choix judicieux comme protéine contrôle car il s'agit, d'une part, de la métallopeptidase de la famille la mieux caractérisée. Elle possède, d'autre part, la caractéristique d'être localisée à la membrane plasmique. Nos résultats indiquent que le domaine transmembranaire doit fonctionner en synergie avec le domaine cytoplasmique pour provoquer la rétention au RE (Chapitre 3, Figure 15B). C'est donc dire que le domaine cytoplasmique ou encore le domaine transmembranaire uniquement ne peuvent provoquer cette rétention.

Des domaines transmembranaires ont été identifiés comme déterminants primaires de la médiation de la localisation de plusieurs protéines dans le RE (Teasdale et Jackson, 1996). Toutefois, dans plusieurs cas, une contribution des régions cytosolique ou luminale jouxtant le domaine transmembranaire s'avère nécessaire pour que la rétention au RE soit observée. C'est notamment le cas pour les protéines Sec12p de levure (Sato *et coll.*, 1997),

p63 (Schweizer *et coll.*, 1994) ainsi que le cytochrome *b5* (Honscho *et coll.*, 1998) de mammifère. Ces protéines, toutes des protéines transmembranaires de type II au même titre que ECEL1, possèdent des domaines responsables d'une rétention au réticulum endoplasmique rugueux. Tel qu'observé pour ECEL1, la protéine Sec12p de levure requiert des signaux enfouis autant dans sa région transmembranaire que cytosolique pour qu'une rétention dans le réticulum endoplasmique rugueux soit possible. La protéine *p63* de mammifère possède des déterminants pour la rétention au RE dans ses trois domaines (cytosolique, transmembranaire et luminal), alors que le cytochrome *b5* possède de tels déterminants dans ses régions luminale et transmembranaire seulement. Des études supplémentaires seront requises afin d'identifier avec précision les déterminants responsables de cette localisation, présents dans les domaines cytosolique et transmembranaire de ECEL1.

Alors que d'autres enzymes de la famille M13, telles que les ECE (Schweizer *et coll.*, 1997 ; Azarani *et coll.* 1998 ; Muller *et coll.*, 2003 ; Emoto *et coll.*, 1995) et NEP2 (Ikeda *et coll.*, 1999 ; Raharjo *et coll.*, 2001) ont aussi été retrouvés dans des compartiments intracellulaires, ECEL1 s'avère être le premier membre de cette famille semblant posséder des déterminants de localisation dans sa région transmembranaire en plus de sa région cytosolique.

Il n'est pas rare d'observer que plusieurs signaux fonctionnent en synergie ; cette nécessité pourrait servir d'élément important dans le contrôle de qualité du RE. On peut envisager qu'un seul signal d'export, sur une protéine non/mal repliée ou sur des sous-unités non assemblées, ferait en sorte qu'il en résulte un faible degré d'affinité pour COPII ; une protéine repliée adéquatement ou un complexe assemblé présenteraient des signaux combinatoires résultant en une hausse drastique de l'affinité. Cette exigence pourrait travailler de concert avec la machinerie de rétention au RE, qui emprisonne les protéines

mal repliées, ce qui résulte en une exclusion efficace de ces entités dans les vésicules bourgeonnantes (Ellgaard et Helenius, 2003). Un tel mécanisme pourrait expliquer pourquoi le transfert de courts motifs linéaires d'export à certaines protéines augmente la vitesse d'export sans pour autant y conférer la vitesse de la protéine affichant ce signal dans son contexte original (Nishimura et Balch, 1997 ; Nufer *et coll.*, 2002 ; Nakamura *et coll.*, 1998).

Nous proposons ainsi un modèle permettant d'expliquer la localisation de ECEL1 au RE ; ce modèle étant composé de deux variantes possibles (voir Figure 1). La première alternative consisterait en une interaction de ECEL1 avec une protéine cytosolique. Selon cette possibilité, cette protéine cytosolique entrerait en interaction avec des résidus du domaine cytosolique situés à la limite du domaine transmembranaire. De plus, selon cette alternative, des résidus du domaine transmembranaire proximaux au domaine cytosolique seraient impliqués. Cette interaction est possible seulement si l'interaction de ces derniers résidus se situe à la frontière de la membrane du RE (du côté cytosolique), c'est-à-dire au niveau des têtes polaires des phospholipides. La deuxième alternative consisterait en une interaction de ECEL1 avec une protéine transmembranaire. Pour que cette possibilité soit acceptable, il doit y avoir interaction avec des résidus des domaines transmembranaire et cytosolique de façon synergique. De par cette alternative, la protéine interagissant avec ECEL1 doit posséder un signal de localisation au réticulum qui entraînerait ECEL1 avec elle ou, encore, ECEL1 doit posséder un signal d'export camouflé par une interaction avec une protéine transmembranaire. Cette possibilité fait en sorte qu'une dissociation permettrait à ECEL1 de sortir du RE. Mais, surtout, cette hypothèse permettrait d'expliquer pourquoi on observe la présence d'une petite proportion de protéines ECEL1 à la membrane plasmique.

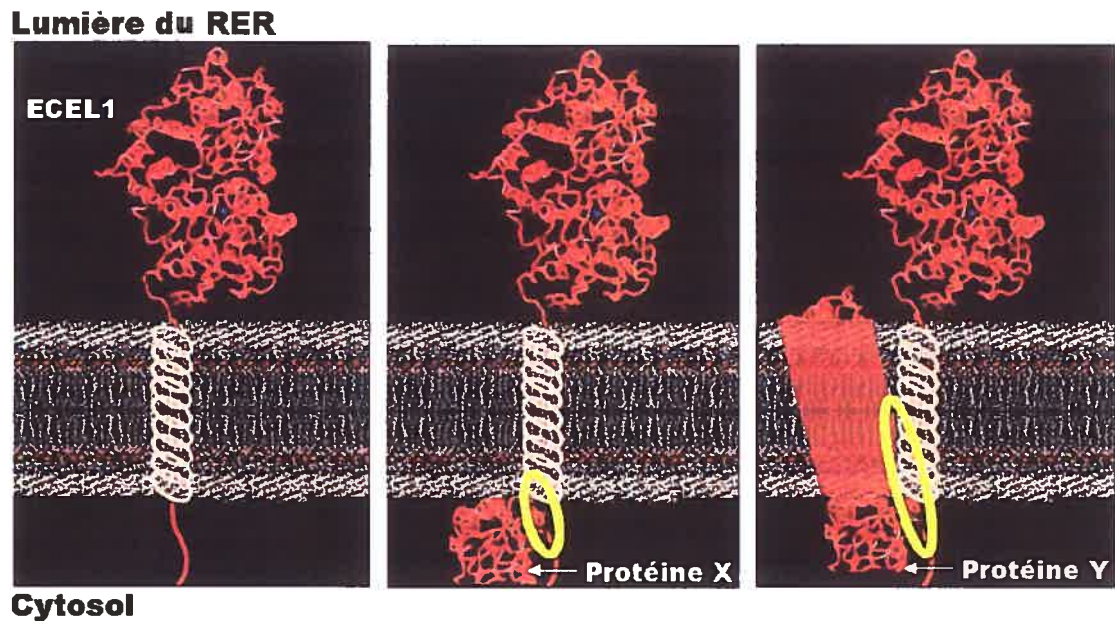


Figure 1: Modèles proposés pour une localisation spécifique de ECEL1 au réticulum endoplasmique rugueux

A. Présence de ECEL1 à la membrane du RER. L'ectodomaine est localisé du côté de la lumière du RER alors que la queue N-terminale se situe du côté cytosolique. Un segment à haut contenu en résidus hydrophobes est ancré à la membrane. **B.** ECEL1 serait retenu dans le RER par son association à une protéine cytosolique (protéine X). **C.** ECEL1 serait retenu dans le RER par son association à une protéine transmembranaire (protéine Y). Les anneaux jaunes représentent les zones d'interaction potentielles.

En effet, des protéines qui possèdent des signaux de localisation/recyclage (de type KDEL ou KKXX) ne sont généralement pas retrouvées à la membrane plasmique, ce qui implique un système de localisation extrêmement efficace. Finalement, une dernière possibilité peut être envisagée. ECEL1 serait indépendant et, par son affinité avec les lipides de la membrane du RE, elle posséderait dans son domaine transmembranaire et cytosolique les déterminants suffisants pour une localisation autonome. Cette dernière hypothèse semble peu probable puisque le domaine transmembranaire à lui seul n'est pas suffisant pour une rétention de ECEL1. On pourrait aussi considérer la possibilité d'une auto-association comme mécanisme de rétention dans le RE, ce qui a déjà été suggéré pour une autre protéine, *p63* (Schweizer *et coll.*, 1994).

6.5 Production d'une forme sécrétée de ECEL1 et purification

Dans le but de contourner la difficulté d'une purification de protéine membranaire, nous avons réussi à construire une protéine chimérique qui nous permet de récupérer l'ectodomaine de ECEL1 dans le milieu de culture de cellules eucaryotes transfectées. La protéine ECEL1 est constituée d'une séquence séparée en trois domaines distincts : le domaine N-terminal cytosolique, le domaine transmembranaire et le domaine luminal. Par la comparaison de sa séquence avec celles des membres de la famille de l'EPN, il a été possible d'identifier les résidus homologues aux résidus impliqués dans la catalyse enzymatique des autres membres de cette famille dans le domaine luminal de ECEL1 (voir Chapitre 1, Figure 7).

D'autre part, des analyses effectuées sur les autres membres de la famille ont permis de constater que l'ectodomaine contenant l'activité enzymatique fonctionne de façon indépendante vis-à-vis le domaine transmembranaire et cytoplasmique (Lemay *et coll.*, 1989). À titre d'exemple, des protéines chimériques sécrétées d'EPN (Fossiez *et coll.*, 1992) et de PHEX (Campos *et coll.*, 2003) ont été produites et permettent la purification de leur seul domaine luminal. Il a d'ailleurs été démontré que leur activité enzymatique n'est pas influencée par rapport à la forme protéique native, ce qui nous indique que la construction d'une forme sécrétée de ECEL1 peut donner des résultats représentatifs de l'activité enzymatique de la forme ECEL1 native. Ceci étant dit, nous avons tiré profit de la présence d'un site de clivage des prohormones convertases de type furine dans la région N-terminale de l'ectodomaine de NEP2. En effet, NEP2 possède la particularité d'être une protéine sécrétée de façon naturelle. De la même façon, nous avons remplacé la région suivant le site de clivage dans la séquence NEP2 par l'ectodomaine de ECEL1 (Chapitre 4, Figure 1).

Tel qu'attendu, un immunobuvardage de type Western nous a permis de détecter la présence de l'ectodomaine de ECEL1 dans le milieu de culture. Cependant, alors que la quasi-totalité des protéines NEP2 se retrouvent dans le milieu de culture, la protéine chimérique NEP2-ECEL1 affiche une distribution différente. Environ le trois quart des protéines sont détectées dans le milieu de culture alors que le quart restant se retrouve dans les extraits cellulaires, ce qui indique une localisation quelconque à l'intérieur de la cellule. Il est possible que cette localisation soit le réticulum endoplasmique rugueux, ce qui irait dans le sens de la sensibilité à l'endoH et indiquerait la présence de glycosylations immatures. Cette constatation nous permet de croire que le domaine luminal de ECEL1 pourrait jouer un rôle mineur dans la localisation de la protéine au RE. Il est cependant plus probable que

ECEL1 sécrétée se replie plus lentement ou encore qu'il y ait une plus grande proportion de protéine mal repliée.

6.6 Essais enzymatiques avec l'ectodomaine de ECEL1

L'ARNm de ECEL1 est retrouvé principalement dans le système nerveux central (SNC), les ganglions sympathiques et l'utérus (Valdenaire *et coll.*, 1999 ; Kiryu-Seo *et coll.*, 2000). L'identification de son ou de ses substrat(s), combinée aux indices révélés par la distribution tissulaire de son ARNm, pourrait éventuellement mieux définir l'ensemble de ses fonctions physiologiques. De plus, l'identification de la protéine dans l'hypophyse ainsi que le cerveau total nous pousse à croire que ECEL1 pourrait jouer un rôle peptidasique à ce niveau. Parallèlement à cette découverte, il est intéressant de constater que le phénotype majeur des souris homozygotes ECEL1 $-/-$ se traduit par une mort néonatale. Les nouveaux-nés peuvent ouvrir leurs mâchoires mais demeurent cyanosés (contrairement aux sauvages qui tournent au rose après quelques minutes) et meurent d'anoxie 10-30 minutes suivant la naissance. Cette observation nous indique que l'enzyme jouerait un rôle important dans le contrôle central de la respiration autonome (Schweizer *et coll.*, 1999). Toutefois, le mécanisme par lequel ECEL1 contrôle cette fonction vitale ainsi que le ou les substrat(s) naturel(s) de l'enzyme sont toujours inconnus.

En ce sens, nous avons voulu évaluer l'activité enzymatique de la protéine ECEL1. En tout premier lieu, le peptide synthétique Z-gly-gly-leu-pNa, un substrat connu de l'endopeptidase neutre, a été testé. Ce peptide semble clivé par l'orthologue de ECEL1 chez le rat (DINE ou *Damage-induced neuronal endopeptidase*) tel que rapporté par Kiryu-Seo *et*

coll. (Kiryo-Seo *et coll.*, 2000). Nous avons donc voulu nous assurer que ce peptide était bel et bien un substrat synthétique de ECEL1 (humaine). Les essais effectués dans des conditions variées (pH, [NaCl], présence de Ca^{2+}) se sont tous avérés négatifs. La différence majeure entre nos essais et ceux réalisés par le groupe de Kiryo-Seo reposent sur la méthode de production et de purification de l'enzyme. Nos analyses ont été effectuées à l'aide de l'ectodomaine de ECEL1 humain purifié, alors que le groupe de Kiryo-Seo s'est servi d'un système d'expression baculovirus (exprimant la DINE de rat). Il nous est en outre impossible de savoir quels ont été les conditions dans lesquelles les essais enzymatiques avec la DINE ont été réalisés puisqu'aucune mention à ce sujet n'a été rapportée. Ceci nous empêche évidemment de pouvoir répéter les mêmes essais dans des conditions similaires.

Nous avons tout de même tenté d'identifier un substrat peptidique potentiel par l'incubation de l'ectodomaine de ECEL1 avec certains peptides reconnus comme étant des substrats d'autres membres de la famille de l'EPN. Tous les peptides testés ont présenté des résultats négatifs : la galanine, la Met-enképhaline, la Leu-enképhaline, la bradykinine, la calcitonine, la Big-endothéline-1, l'endothéline-1, la substance P, l'OGP, le PTH_{1-84} , PTHrP_{1-34} , ainsi que l' α -CGRP ne sont pas clivés par ECEL1. Valdenaire *et coll.* (1999) ont aussi évalué l'efficacité de ECEL1 à cliver certains de ces peptides, et ont obtenu les mêmes résultats négatifs (Valdenaire *et coll.*, 1999).

Il demeure que la présence de ECEL1 à la surface cellulaire suggère qu'une des fonctions de l'enzyme pourrait consister en la régulation de l'activité de peptides extracellulaires. En ce sens l'EPN et la ECE-1, deux enzymes de la famille M13, sont connues pour leur activité envers divers peptides extracellulaires. L'EPN participe dans la dégradation de peptides tels que les enképhalines et la substance P, qui sont impliqués dans

la modulation de la douleur, et le peptide natriurétique atrial (ANP), qui régule la réabsorption de l'eau et des sels au niveau des reins (pour une revue, voir Roques *et coll.*, 1993). ECE-1, de son côté, active les précurseurs d'endothélines, résultant en endothélines actives, se révélant être de puissants vasoconstricteurs (pour une revue, voir Turner, 1997).

Cependant, il se peut aussi que les substrats naturels de ECEL1 soient des peptides ou des protéines qui soient localisés dans le RE ou qui transitent par le RE, site hôte de la métallopeptidase. Ceci expliquerait en partie les résultats négatifs obtenus. Nous pourrions proposer un modèle où ECEL1, localisée dans le RE, clive des peptides intracellulaires qui seraient par la suite sécrétés, se traduisant ainsi en une régulation ^{extrêmement} excessivement rapide de ces substrats.

Notre autre modèle tient compte de la présence de ECEL1 à la membrane plasmique, soit environ 10% du total de protéines ECEL1. Des conditions cellulaires spécifiques induiraient un signal permettant la sortie de ECEL1 du RE, permettant ainsi son accumulation à la membrane plasmique. Rendue à la membrane plasmique, ECEL1 aurait la possibilité de jouer son rôle peptidasique sur des substrats de type autocrine, paracrine ou endocrine. Cette deuxième hypothèse est par contre beaucoup plus sinieuse, puisqu'il n'existe aucune preuve ou aucun indice permettant de croire que la localisation de ECEL1 puisse être modifiée et régulée en ce sens.

Les possibilités en ce qui concerne l'identification d'un substrat de ECEL1 sont nombreuses. Toutefois, certaines voies d'exploration peuvent être privilégiées. DINE, l'orthologue de ECEL1 chez le rat, a été identifiée par l'augmentation de son expression lors de dommages neuronaux (Kiryu-Seo *et coll.*, 2000). En ce sens, nous pouvons considérer l'hypothèse d'une implication de ECEL1 dans la maturation de polypeptides impliqués dans la régulation cellulaire. Certains facteurs de croissance, cytokines et

neuropeptides sont des molécules bien connues comme facteurs de survie lors de dommage neuronal (Hokfelt, 1991). Ces molécules participent aux processus protecteurs comme molécules de signaux intercellulaires via une signalisation autocrine, paracrine ou endocrine. Généralement, les protéines sécrétées comme des neuropeptides et des facteurs de croissance, sont synthétisées en tant que gros précurseurs protéiques et sont maturées dans le réseau *trans*-golgien par des protéases à sérine, qui sont membres de la famille des proprotéines convertases (PC) (Steiner, 1998).

De plus, un nombre croissant d'autres protéines sont maintenant reconnues comme étant dérivées de protéines intégrales de la membrane plasmique par hydrolyse (*shedding*) sur la surface cellulaire (Hooper *et coll.*, 1997). Les protéines sécrétées de cette façon incluent certains récepteurs membranaires, des ligands, des ectoenzymes, ainsi que des molécules d'adhésion cellulaire.

6.7 Identification d'un tissu et d'une lignée cellulaire exprimant ECEL1 de façon endogène

Pour la première fois, il a été possible d'identifier un tissu exprimant la protéine ECEL1. Effectivement, l'hypophyse a été identifié comme un tissu exprimant la protéine ECEL1 (Chapitre 3, Figure 9). Cette observation confirme la présence de ECEL1 dans le SNC tel qu'observé pour les transcrits de ECEL1 (Valdenaire *et coll.*, 1999, Kiryu-Seo *et coll.*, 2000).

L'analyse, par immunobuvardage de type Western, de quelques lignées cellulaires eucaryotes nous a permis d'identifier une seule lignée exprimant la protéine ECEL1 : la

lignée cellulaire eucaryote GH3 (Chapitre 5, Figure 1). Les cellules GH3 sont des cellules lactosomatotropes dérivées de l'adénohypophyse (ou lobe antérieur de l'hypophyse), ce qui semble corrélérer avec l'expression retrouvée dans l'hypophyse de souris. L'adénohypophyse libère une série d'hormones qui régulent un grand nombre d'activités corporelles, allant de la croissance à la reproduction. L'identification d'un tissu et d'une lignée cellulaire exprimant ECEL1 de façon endogène s'avère une découverte importante. Mais surtout, elle s'avère un outil incontournable pour l'étude de la métallopeptidase, notamment en ce qui concerne la validation des résultats obtenus avec des cellules transfectées et exprimant ECEL1. Cette identification permet en outre de croire que l'enzyme puisse jouer un rôle sur un peptide retrouvé, entre autres, au niveau hypophysaire.

6.8 L'expression transcriptionnelle est influencée par l'induction de la réponse aux protéines non repliées (*unfolded protein response*)

Les protéines de conformation anormale constituent une grave menace pour toute cellule vivante. En regard à ce phénomène, on reconnaît maintenant que plusieurs acteurs jouent des rôles clés dans le repliement d'une protéine. C'est en interagissant avec les segments hydrophobes exposés de protéines en cours de synthèse ou de protéines mal repliées que des chaperons préviennent les erreurs de repliement (Wickner *et coll.*, 1999). Alors que cet environnement et les mécanismes le régissant sont généralement optimisés, certaines conditions physiologiques provoquent une accumulation anormale de protéines de conformation inadéquate qui résulte en une saturation de l'équipement cellulaire, soit de chaperons et/ou de protéines impliqués dans la dégradation. Cette situation résulte en un

stress cellulaire et les cellules réagissent rapidement par la réponse UPR (*unfolded protein response*). La réponse UPR autorise alors la survie des cellules dont les protéines sont «réparables» et elle induit l'apoptose des autres cellules (voir Figure 2).

Chez les mammifères, cette réponse contrôle deux fonctions cellulaires. D'une part, l'activation transcriptionnelle de gènes codant pour des chaperons, des protéines de la voie de sécrétion ou des protéines de la voie de dégradation ERAD (*endoplasmic reticulum-associated degradation*), qui a comme objectif de rééquilibrer l'environnement. D'autre part, une répression rapide et intense de la synthèse protéique limite la surcharge au niveau du RE. En somme, la réponse UPR s'explique donc par des protéines «senseurs».

6.8.1 Contrôle de la transcription

Deux mécanismes interviennent dans le contrôle de la transcription. D'une part, le domaine N-terminal de Ire1 est, en collaboration avec GRP78/BiP, impliqué dans ce déclenchement de réponse (Bertolotti *et coll.*, 2000). En absence de protéines dénaturées, GRP78/BiP est présent à l'état basal dans le RE ; il interagit avec Ire1 et maintient la protéine dans un état monomérique. Lors d'un stress cellulaire causé par l'accumulation de protéines mal repliées, GRP78/BiP prend en charge ces protéines mal repliées et se sépare de Ire1, permettant ainsi la dimérisation de celle-ci. Cette dimérisation stimule l'activité kinase et conduit à une autophosphorylation en *trans*. Le cycle de signalisation prend fin lorsque GRP78/BiP, produite en excès en réponse à l'induction de son gène, se lie à nouveau à Ire1 et inhibe sa dimérisation et son activation. Ire1 est dotée d'une activité kinase et d'une activité endoribonucléase dans sa partie cytoplasmique. Cette deuxième activité va permettre le clivage d'un intron de l'ARNm de XBP-1, changeant ainsi son cadre de lecture et provoquant la formation d'un domaine très actif de transactivation de la

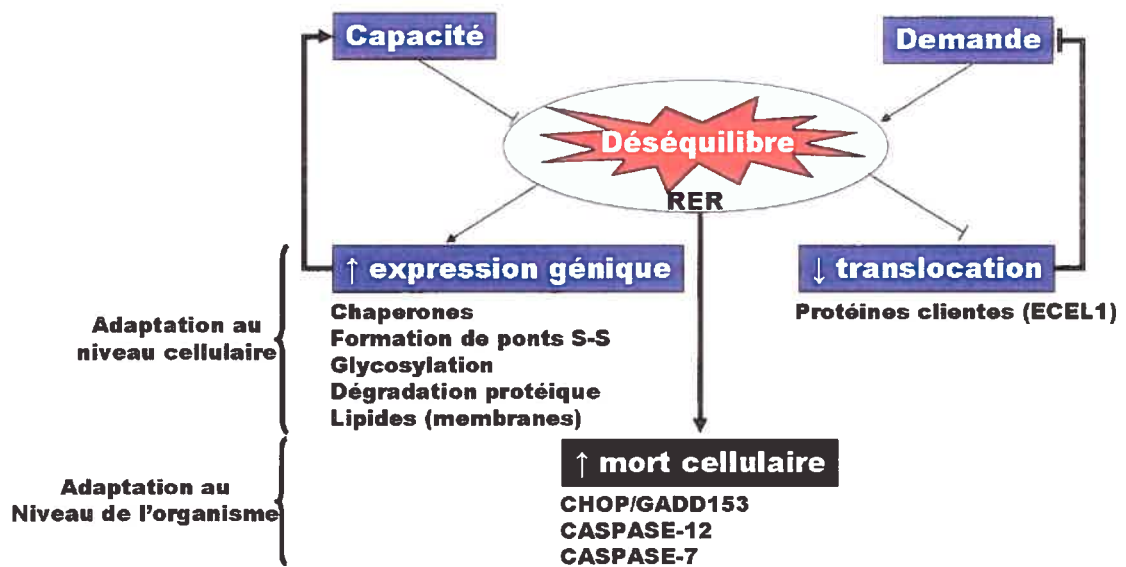


Figure 2 : Les composantes fonctionnelles de la réponse au stress du RE (mammifères)

Un déséquilibre entre la quantité de protéines délivrées au RE et sa capacité à les replier provoque une réponse au stress tripartite. Les gènes produisant des protéines qui augmentent la capacité fonctionnelle du RE ou favorise la dégradation protéique liée au RE sont activés. La traduction est inhibée, et le flux de protéines clientes est alors atténué. Les voies de mort cellulaire sont activées. Les deux premières composantes de la réponse favorisent la résistance cellulaire au stress du RE, alors que la dernière composante est probablement une adaptation à un niveau plus général.

transcription en se liant sur les séquences ERSE (*ER stress element*) de promoteurs de gènes cibles de l'UPR.

D'autre part, une deuxième protéine, ATF-6, un facteur transcriptionnel appartenant à la famille des facteurs ATF-CREB (Cox *et coll.*, 1996), active directement la transcription de gènes cibles de l'UPR, dont GRP78/BiP, GRP74 et la calréticuline (Yoshida *et coll.*, 1998) en se liant à la séquence promotrice ERSE. À l'état basal, le facteur ATF-6 est exprimé de façon constitutive sous forme de précurseur transmembranaire du RE (Haze *et coll.*, 2001). À la suite d'un stress du RE, ce précurseur inactif est clivé par une protéase (Haze *et coll.*, 1999). Le domaine cytoplasmique libéré (composé de domaines de liaison à l'ADN et d'activation de la transcription) est capable de migrer vers le noyau et d'induire les gènes cibles. Une étude de Brown et Goldstein montre que les protéases de site 1 et de site 2 (S1P et S2P), capables de cliver le facteur SREBP (*sterol responsive element binding protein*), sont impliquées dans le clivage du facteur ATF-6 (Ye *et coll.*, 2000). Le mécanisme d'activation de ces protéases par le stress du RE reste cependant à déterminer.

En résumé, deux voies de signalisation sont activées à la suite d'un stress du RE ; elles activent deux facteurs de transcription : ATF-6 et XBP-1. Cependant, un très fort lien existe entre ces deux voies puisqu'en cas de stress du RE, le facteur ATF-6 se lie au promoteur du gène XBP-1 pour activer sa transcription (Yoshida *et coll.*, 2001).

6.8.2 Contrôle de la traduction

L'inhibition de la traduction se fait par l'intermédiaire d'une troisième protéine transmembranaire du RE, PERK (Harding *et coll.*, 2000). Ce blocage général de la traduction a pour but de diminuer l'afflux de protéines dans le RE. En conditions normales, PERK est associé à GRP78/BiP ; par contre, lors d'un stress du RE, PERK est

libérée de BiP, s'oligomérisent et s'autophosphorylent en *trans*. PERK phosphoryle ensuite la sous-unité α du facteur général d'initiation de la traduction eIF-2 avec la conséquence de bloquer la machinerie traductionnelle (Harding *et coll.*, 1999).

6.8.3 ECEL1 et le stress cellulaire

Le groupe de Kiryu-Seo *et coll.* (2000) a identifié des molécules étant régulées à la hausse en réponse aux dommages nerveux chez le rat, dont la DINE, l'orthologue de ECEL1 chez le rat. Cumulée avec la localisation au RE et la nature neuroprotectrice de ECEL1 lors de l'incubation de cellules avec le C2-céramide (agent provoquant la mort cellulaire), il était tentant d'étudier le comportement de ECEL1 lors de stress cellulaires causés par l'accumulation de protéines mal repliées. On pouvait s'attendre à ce que ECEL1 soit impliquée dans la réponse UPR, voyant ainsi son expression transcriptionnelle augmenter ou, encore, diminuer pour protéger le RE d'une accumulation protéique incontrôlée.

De fait, le dithiothreitol (DTT) est un agent réducteur qui déstabilise les processus de repliement protéique, notamment en empêchant la formation de ponts disulfures dans les protéines, provoquant ainsi la réponse UPR. Tel qu'observé lors de l'incubation des cellules GH3 en présence de DTT, les niveaux transcriptionnels de ECEL1 sont légèrement diminués, laissant supposer une régulation classique de la réponse UPR. En ce sens nous voyons une incidence directe entre la concentration de DTT utilisée et la régulation à la baisse de ECEL1 (Chapitre 5, Figure 4). L'effet dose-réponse est par contre beaucoup plus flagrant à 4 mM et semble se stabiliser même si on augmente les doses.

Nous pouvons également déduire de ces résultats que l'effet de la réponse UPR, induite par le DTT, est relativement rapide puisqu'une régulation à la baisse des niveaux

transcriptionnels de ECEL1 est observée après seulement 1 heure d'incubation. Cependant, après 8 heures d'incubation avec le DTT, les niveaux transcriptionnels semblent stabilisés ou, à tout de moins, la diminution de l'expression du gène ECEL1 est beaucoup moins marquée que dans les 8 premières heures de traitement (Chapitre 5, Figure 5). Peut-être pouvons-nous en déduire que les niveaux de chaperons ont suffisamment été régulés à la hausse pour répondre à la demande des protéines mal repliées. Nous aurions donc atteint des niveaux sous-saturés ou contrôlés. Nous en concluons que, malgré un certain rôle cytoprotecteur, la protéine ECEL1 ne semble pas impliquée dans une réponse contre cette condition physiologique spécifique : le stress causé par l'accumulation de protéines mal repliées. Cependant, il est à noter qu'une diminution de ECEL1 pourrait moduler la réponse UPR en contrôlant l'hydrolyse d'un facteur impliqué dans cette réponse, mais ce n'est que pure spéculation.

6.9 L'expression transcriptionnelle de ECEL1 est influencée par des conditions hypoxiques

Le groupe de Schweizer *et coll.* a proposé un rôle crucial dans le contrôle central de la respiration autonome (Schweizer *et coll.*, 1999). Des souris homozygotes ECEL1 *-/-* meurent par anoxie peu de temps après leur naissance. En lien avec cette observation, la présence de l'ARNm ECEL1 dans les régions responsables du contrôle de la respiration (tronc cérébral, moelle épinière cervicale, hypophyse) (Valdenaire *et coll.*, 1999 ; Kiryu-Seo *et coll.*, 2000) nous forcent à croire à cette thèse d'un contrôle de la respiration influencé d'une façon ou d'une autre par la protéine ECEL1. Depuis 1986, la localisation des populations

neuronales contenant les circuits de base générant le rythme et l'intensité respiratoires dans les tissus sus-mentionnés est généralement acceptée et est même appuyée par des expériences *in vivo* (Feldman, 1986 ; Bianchi *et coll.*, 1995 ; Duffin *et coll.*, 1995 ; Smith *et coll.*, 1995 ; Feldman et Smith, 1995 ; Richter *et coll.*, 1996). Toutefois, le mécanisme par lequel ECEL1 contrôle cette fonction vitale ainsi que le ou les substrat(s) naturel(s) de l'enzyme sont toujours inconnus.

Une autre facette intéressante de ECEL1 est sa modulation transcriptionnelle suite à certaines conditions physiologiques, notamment suite à des dommages neuronaux (Kiryu-Seo *et coll.*, 2000) ou lors du développement de neuroblastomes (Kawamoto *et coll.*, 2003). ECEL1 augmente de plus, par un mécanisme inconnu, l'expression et l'activité d'enzymes anti-oxydantes telles que Cu/Zn-superoxyde dismutase (SOD), Mn-SOD et glutathione peroxydase lors de stress oxydatifs (Kiryu-Seo *et coll.*, 2000).

En ce sens nous avons voulu évaluer les effets de conditions hypoxiques sur les niveaux transcriptionnels de ECEL1. L'hypoxie est définie comme une diminution sous la normale, dans un tissu ou des tissus périphériques, du niveau d'oxygène moléculaire (Sharp *et coll.*, 2004). Une des réactions de la cellule affectée passe par la régulation à la hausse autant qu'à la baisse de certains gènes. Le mécanisme le mieux détaillé repose sur l'induction du facteur HIF (*hypoxia-inducible factor*), un facteur de transcription hétérodimérique composé d'une sous-unité inductible (HIF-1 α) et d'une deuxième sous-unité constitutive (HIF-1 β) (Wang *et coll.*, 1995). Ce complexe lie les éléments de réponse d'hypoxie sur plusieurs gènes cibles. Ces gènes peuvent aussi être connus sous les appellations de ORPs (*oxygen-regulated proteins*) ou HRPp (*hypoxia-regulated proteins*) (Sharp *et coll.*, 2001a ; Ratcliffe *et coll.*, 1998 ; Semenza, 2001 ; Sharp *et coll.*, 2001b). Le gène cible le mieux caractérisé et le plus connu est sans nul doute l'érythropoïétine (EPO), qui est régulé

à la hausse dans des conditions hypoxiques (Wang et Semenza, 1993).

À l'opposé, les mêmes conditions hypoxiques peuvent avoir comme conséquence une régulation transcriptionnelle négative. Il a été démontré, à titre d'exemple, qu'une période hypoxique réprimait la transcription du gène *p53* humain (Lee *et coll.*, 2001). Une des méthodes les plus utilisées pour l'étude des effets de conditions carencielles d'oxygène moléculaire repose sur l'utilisation du chlorure de cobalt (CoCl_2). L'incubation de cellules en présence de CoCl_2 ou encore une injection de CoCl_2 provoque une phase hypoxique (Xi *et coll.*, 2004 ; Lee *et coll.*, 2001). Suite à une telle incubation, nos résultats nous poussent à considérer que de telles conditions hypoxiques aient une incidence négative sur la régulation transcriptionnelle du gène *ECEL1*. L'effet semble rapide lors des 4 premières heures d'incubation en présence de chlorure de cobalt, alors qu'on observe une stabilisation de l'effet régulateur pour une période d'incubation dépassant les 4 heures (Chapitre 5, Figure 3). De plus, des concentrations minimales de CoCl_2 (de l'ordre de 50 μM) diminuent les niveaux transcriptionnels d'environ 15-20% (Chapitre 5, Figure 2). Ces données démontrent que la cellule est extrêmement sensible aux variations de niveaux d'oxygène moléculaire et que la réponse qui s'en suit est assez marquée.

L'analyse de la séquence en 5' du gène *ECEL1* ne permet pas d'identifier de séquences caractéristiques d'éléments de réponse à l'hypoxie. Cependant, il a été démontré que la répression transcriptionnelle du gène *p53* était provoquée par le CoCl_2 ainsi que HIF-1 α par l'intermédiaire de l'élément boîte-E (*E-box*) situé dans la région 5' du gène (Lee *et coll.*, 2001). Suite à l'analyse de la séquence nucléotidique de la région 5' du gène *ECEL1*, il a été possible d'identifier la présence potentielle d'un élément boîte-E (*E-box*) (voir Figure 3), ce qui laisse croire qu'un même mécanisme de régulation

expliquerait la répression transcriptionnelle observée. Des études plus ciblées en regard au promoteur de ECEL1 sauront nous dire si la régulation passe effectivement par cet élément de réponse.

6.10 Perspectives et conclusion

Depuis le début de nos recherches sur l'*Endothelin-converting enzyme-like 1* (ECEL1), nous avons réussi à explorer plusieurs facettes de cette nouvelle protéine que ce soit au niveau de la localisation, de la régulation, de la structure ou au niveau enzymatique. Cependant, les avenues explorées doivent être bien maîtrisées, et d'autres facettes émergeront nécessairement suite à cette progression des connaissances sur le sujet. La section suivante propose des avenues qui devront être envisagées et qui sauront répondre aux questions les plus importantes.

6.10.1 Étude du mécanisme de localisation de la protéine ECEL1 au réticulum endoplasmique rugueux

Suite à toutes nos études se rapportant à la localisation sous-cellulaire de la protéine ECEL1, nous avons identifié un rôle synergique de localisation pour les régions cytosolique et transmembranaire. Selon notre modèle (Figure 1), nous pouvons poser l'hypothèse que ECEL1 soit retenue par une protéine cytosolique ou, plus vraisemblablement, par une protéine transmembranaire. Dans le but de comprendre comment cette localisation s'effectue, il serait d'intérêt d'identifier le ou les partenaires impliqués dans cette localisation particulière. Des expériences mutationnelles de résidus sur ces deux domaines (cytosolique

et transmembranaire) pourraient permettre de circonscrire davantage la région ou, encore, les acides aminés impliqués dans la localisation. Des analyses d'immunoprécipitation de ECEL1 suivies de chargement sur gel 2D pourraient également nous mettre sur une piste d'identification de partenaires impliqués dans la rétention. Dans un même ordre d'idée, ces études pourraient nous permettre d'expliquer la présence d'une proportion minoritaire de protéines ECEL1 à la surface cellulaire. Elles pourraient aussi nous permettre de comprendre si cette présence à la membrane plasmique est la conséquence d'un système de rétention au RE inefficace ou si cette proportion peut être modulable, par exemple, en conséquence à une quelconque condition physiologique.

6.10.2 Caractérisation enzymatique et identification de substrats biologiques

À ce jour, l'activité enzymatique de ECEL1 n'a été caractérisée que par la capacité de l'orthologue chez le rat (DINE) à cliver un peptide synthétique : Z-gly-gly-leu-pNa, un substrat connu de l'endopeptidase neutre (Kiryu-Seo *et coll.*, 2000). Afin de comprendre le mécanisme enzymatique de ECEL1 par l'identification de sa spécificité de clivage, la cueillette d'indices sur sa façon d'interagir avec certains peptides et inhibiteurs devra être élaborée. En ce sens, il serait possible d'utiliser une librairie combinatoire de peptides fluorescents contenant l'acide *o*-aminobenzoïque (Abz) comme donneur de fluorescence et le *N*-(2,4-dinitrophényl)éthylènediamine (EDDnp) attaché à une glutamine ou le 2,4-dinitrophényl (Dnp) attaché au groupe amino- ϵ d'une lysine, comme accepteur de fluorescence. Cette combinaison fait en sorte qu'ils agissent comme paire donneur-accepteur, éliminant la fluorescence de façon interne. La librairie pourrait être préparée sous la structure générale Abz-GXXZXK(Dnp)-OH, où la position Z est successivement remplie par un des 19 acides aminés (la cystéine doit être omise pour éviter les

dimérisations) et X représentent des résidus incorporés de manière aléatoire. L'utilisation de cette librairie lors d'essais enzymatiques en présence de l'ectodomaine de ECEL1 que nous avons réussi à faire sécréter et purifier permettrait d'identifier les peptides clivés. Les peptides clivés deviendraient fluorescents, puisqu'il y aurait séparation de la portion donneur et de la portion accepteur. Par cette technique, il serait possible d'identifier les préférences de ECEL1 pour certains résidus.

Suite à cette identification, nous pourrions être en mesure de rechercher des chaînes peptidiques endogènes possédant des telles séquences d'acides aminés ; ces mêmes chaînes pourraient alors être testées par essais enzymatiques dans l'espoir d'identifier un substrat biologique pour la protéine ECEL1.

6.10.3 Étude de la régulation transcriptionnelle de ECEL1

La combinaison de nos résultats portant sur la régulation transcriptionnelle du gène ECEL1 avec toutes les autres études nous permet d'effectuer les observations suivantes :

- l'augmentation transcriptionnelle de DINE lors de dommages neuronaux (Kiryu-Seo *et coll.*, 2000);
- l'augmentation transcriptionnelle de ECEL1 lors de développement de neuroblastomes (Kawamoto *et coll.*, 2003);
- ainsi que diverses autres influences directes et indirectes (Kiryu-Seo *et coll.*, 2000 ; Kato *et coll.*, 2002 ; Ohba *et coll.*, 2004);
- la diminution transcriptionnelle de ECEL1 lors de conditions hypoxiques ou lors de l'induction de la réponse UPR (objet de la présente thèse).

Ceci permet de croire que le gène ECEL1 est soumis à une pléiade de modulateurs influençant sa transcription et, de façon indirecte, modulant son ou ses rôle(s) dans une

cellule (ou, à plus grande échelle, dans un tissu donné). Les études à venir devront permettre d'identifier les voies de signalisation régulant l'expression du gène et, surtout tenter d'expliquer de quelle façon la protéine ECEL1 est impliquée dans le contrôle central de la respiration autonome.

6.10.4 Conclusion générale

Ces dernières années, l'émergence des connaissances sur les membres de la famille de l'endopeptidase neutre (EPN) a été sans équivoque. Tant par l'approfondissement des connaissances sur les membres déjà connus que par l'identification de nouveaux membres, la recherche sur cette famille de métallopeptidases est passée par une période que l'on peut qualifier de mini-révolution. Du point de vue fondamental, ces découvertes permettent une meilleure compréhension des mécanismes régissant le métabolisme humain mais l'intérêt réside surtout au niveau pharmacologique. De fait, l'identification de nouvelles enzymes peut permettre d'expliquer les effets de plusieurs médicaments en cours d'utilisation. Plusieurs produits pharmacologiques ont été synthétisés dans l'intention de réguler l'action de certaines de ces métalloendopeptidases. Ainsi, certains inhibiteurs autrefois jugés spécifiques pourraient s'avérer moins spécifiques qu'on ne le croyait et inhiber plus d'une protéine. Mais, surtout, l'identification d'une nouvelle protéine soulève toujours l'espoir qu'elle puisse permettre de comprendre certaines physiopathologies et, ultimement de les enrayer. En ce sens, le domaine médical sort gagnant lorsqu'une découverte, si minime soit-elle, est annoncée.

BIBLIOGRAPHIE

- Abeijon, C. et Hirshberg, C.B. (1990). Topography of initiation of N-glycosylation reactions. *J. Biol. Chem.* **265**(24), 14691-14695.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. et Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, Fourth Edition. Garland Science.
- Almenoff, J. et Orlowski, M. (1984). Biochemical and immunological properties of a membrane-bound brain metalloendopeptidase: comparison with thermolysin-like kidney neutral metalloendopeptidase. *J. Neurochem.* **42**(1), 151-157.
- Almenoff, J., Teirstein, A.S., Thornton, J.C. et Orlowski, M. (1984). Identification of a thermolysin-like metalloendopeptidase in serum: activity in normal subjects and in patients with sarcoidosis. *J. Lab. Clin. Med.* **103**(3), 420-31.
- Almenoff, J., Wilk, S. et Orlowski, M. (1981). Membrane bound pituitary metalloendopeptidase: apparent identity to enkephalinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **102**(1), 206-214.
- Amara, J.F., Cheng, S.H. et Smith, A.E. (1992). Intracellular protein trafficking defects in human disease. *Trends Cell Biol.* **2**, 145-149.
- Aridor, M., et Balch, W.E. (1996). Principles of selective transport: coat complexes hold the key. *Trends Cell Biol.* **6**, 315-320.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D. et Smith, J. A. (1988). *Current protocols in molecular biology*. Wiley Interscience, New-York.
- Azarani, A., Boileau, G., et Crine, P. (1998). Recombinant human Endothelin-Converting Enzyme ECE-1b is located in an intracellular compartment when expressed in polarized MDCK cells. *Biochem. J.* **333**, 439-448.
- Back, J.F., Oakenfull, D. et Smith, M.B. (1979). Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochem.* **18**, 5191-5199.
- Back, S.A. et Gorenstein, C. (1989a). Fluorescent histochemical localization of neutral endopeptidase-24.11 (enkephalinase) in the rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* **280**(3), 436-50.
- Back, S.A. et Gorenstein, C. (1989b). Histochemical visualization of neutral endopeptidase-24.11 (enkephalinase) activity in rat brain: cellular localization and codistribution with enkephalins in the globus pallidus. *J. Neurosci.* **9**(12), 4439-4455.

- Back, S.A. et Gorenstein, C. (1994). Differential response of neutral endopeptidase 24.11 ("enkephalinase"), and cholinergic and opioidergic markers to hypoglossal axotomy. *J. Comp. Neurol.* **340(2)**, 149–160.
- Baraniuk, J.N., Castellino, S., Lundgren, J.D., Goff, J., Mullo, J., Merida, M., Shelhamer, J.H. et Kaliner, M.A. (1990). Neuropeptide Y (NPY) in human nasal mucosa. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **3(2)**, 165–173.
- Barnes, K., Turner, A.J. et Kenny, A.J. (1993a). Co-localisation of substance P and endopeptidase-24.11 in pig substantia nigra: an ultrastructural study. *Biochem. Soc. Trans.* **21(Pt 3)(3)**, 246S.
- Barnes, K., Turner, A.J. et Kenny, A.J. (1993b). An immunoelectron microscopic study of pig substantia nigra shows co-localization of endopeptidase-24.11 with substance P. *Neuroscience* **53(4)**, 1073–1082.
- Barrett, A.J. et Rawlings, N.D. (1991). Types and families of endopeptidases. *Biochem. Soc. Trans.* **19**, 707–715.
- Baynash, A.G., Hosoda, K., Giaid, A., Richardson, J.A., Emoto, N., Hammer, R.E., et Yanagisawa, M. (1994). Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* **79(7)**, 1277–1285.
- Beaumont, A., Brouet, J.C. et Roques, B.P. (1989). Neutral endopeptidase 24.11 and angiotensin converting enzyme like activity in calla positive and calla negative lymphoid cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160(3)**, 1323–9.
- Beaumont, A., LeMoual, H., Boileau, G., Crine, P. et Roques, B. P. (1991). Evidence that both arginine 102 and arginine 747 are involved in substrate binding to neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11). *J. Biol. Chem.* **266(1)**, 214–20.
- Beck, E. et Berry, R. (1990). Prohormonal cleavage sites are associated with omega loops. *Biochemistry* **29**, 178–183.
- Beck, L., Soumounou, Y., Martel, J., Krishnamurthy, G., Gauthier, C., Goodyer, C.G. et Tenenhouse, H.S. (1997). Pex-PEX tissue distribution and evidence for a deletion in the 3' region of the Pex gene in X-linked hypophosphatemic mice. *J. Clin. Invest.* **99**, 1200–1209.
- Bednarek, S.Y., Orci, L. Et Schekman, R. (1996). Traffic COPs and the formation of vesicle coats. *Trends Cell Biol.* **6**, 468–473.
- Beltzer JP, Fiedler K, Fuhrer C, Geffen I, Handschin C, Wessels HP, Spiess M. (1991). Charged residues are major determinants of the transmembrane orientation of a signal-anchor sequence. *J. Biol. Chem.* **266(2)**, 973–978.

- Benjannet, S., Savaria, D., Laslop, A., Munzer, J.S., Chretien, M., Marcinkiewicz, M. et Seidah, N.G. (1997). Alpha1-antitrypsin portland inhibits processing of precursors mediated by proprotein convertases primarily within the constitutive secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **272(42)**, 26210–26218.
- Bennett, H.P.J. (1985). Peptide hormone biosynthesis – Recent developments. *Recent Results in Cancer Research* **99**, 34-45.
- Benoit, R., Ling, N., et Esch, F. (1987). A new prosomatostatin-derived peptide reveals a pattern for prohormone cleavage at monobasic sites. *Science* **238**, 1126-1129.
- Benoit, A., Vargas, M., DesGroseillers, L. et Boileau, G. (2004). Endothelin-converting enzyme-like 1 (ECE1) is present both in the plasma membrane and in the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* **380(Pt 3)**, 881-888.
- Bergeron, J.J., Brenner, M.B., Thomas, D.Y., et Williams, D.B. (1994). Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 124-128.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P. et Ron D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **2**, 326-332.
- Bi, X., Corpina, R.A., et Goldberg, J. (2002). Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature* **419(6904)**, 271-277.
- Bianchi, A.L., Denavit-Saubie, M. et Champagnat, J. (1995). Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev.* **75(1)**, 1-45.
- Bode, W., Gomis-Ruth, F.X., et Stockler, W. (1993). Astacins, serralyisins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the «metzincins». *FEBS Lett.* **331**, 134-140.
- Boileau, G., Tenenhouse, H.S., Desgroseillers, L. et Crine, P. (2001). Characterization of phex endopeptidase catalytic activity: identification of parathyroid-hormone-related peptide107-139 as a substrate and osteocalcin, ppi and phosphate as inhibitors. *Biochem. J.* **355(Pt 3)**, 707–13.
- Bonifacino, J.S., Cosson, P. et Klausner, R.D. (1990). Colocalized transmembrane determinants for ER degradation and subunit assembly explain the intracellular fate of TCR chains. *Cell* **63(3)**, 503-13.
- Bonvouloir, N., Lemieux, N., Crine, P., Boileau, G. et Desgroseillers, L. (2001). Molecular cloning, tissue distribution, and chromosomal localization of MMEL2, a gene coding for a novel human member of the neutral endopeptidase-24.11 family. *DNA Cell Biol.* **20(8)**, 493–498.

- Booth, A.G. et Kenny, A.J. (1980). Proteins of the kidney microvillar membrane. Asymmetric labelling of the membrane by lactoperoxidase-catalysed radioiodination and by photolysis of 3,5-di[¹²⁵I]iodo-4-azidobenzenesulphonate. *Biochem. J.* **187**(1), 31-44.
- Borson, D.B. (1991). Roles of neutral endopeptidase in airways. *Am. J. Physiol.* **260**(4 Pt 1), 212-25.
- Borson, D.B., Brokaw, J.J., Sekizawa, K., McDonald, D.M. et Nadel, J.A. (1989). Neutral endopeptidase and neurogenic inflammation in rats with respiratory infections. *J. Appl. Physiol.* **66**(6), 2653-8.
- Bosshart, H., Humphrey, J., Deignan, E., Davidson, J., Drazba, J., Yuan, L., Oorschot, V., Peters, P.J., et Bonifacino, J.S. (1994). The cytoplasmic domain mediates localization of furin to the trans-Golgi network en route to the endosomal/lysosomal system. *J. Cell Biol.* **126**(5), 1157-1172.
- Bourgoin, S., Le Bars, D., Artaud, F., Clot, A.M., Bouboutou, R., Fournié-Zaluski, M.C., Roques, B.P., Hamon, M., et Cesselin, F. (1986). Effects of kelatorphan and other peptidase inhibitors on the *in vitro* and *in vivo* release of met-enkephalin-like material from the rat spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **238**, 360-366.
- Bourne, A. et Kenny, A.J. (1990). The hydrolysis of brain and atrial natriuretic peptides by porcine choroid plexus is attributable to endopeptidase-24.11. *Biochem. J.* **271**(2), 381-385.
- Bowe, A.E., Finnegan, R., de Beur, S.M.J., Cho, J., Levine, M.A., Kumar, R. et Schiavi, S.C. (2001). FGF-23 inhibits renal tubular phosphate transport and is a PheX substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**(4), 977-81.
- Bown, N. (2001). Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects. *J. Clin. Pathol.* **54**(12), 897-910.
- Brakch, N., Rholam, M., Boussetta, H., et Cohen, P. (1993). Role of the β -turn in proteolytic processing of peptide hormone precursors at dibasic sites. *Biochemistry* **32**, 4925-4930.
- Breathnach, R. et Chambon, P. (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 349-383.
- Bretscher, M.S. et Munro, S. (1993). Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science* **261**, 1280-1281.
- Brewer, C.B. et Roth, M.G. (1991). A single amino acid change in the cytoplasmic domain alters the polarized delivery of influenza virus hemagglutinin. *J. Cell Biol.* **114**, 413-421.

- Brown, C.R., Hong-Brown, L.Q., Biwersi, J., Verkman, A.S. et Welch, W.J. (1996). Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the $\Delta F508$ cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress Chaperones* **1**, 117-125.
- Brown, C.R., Hong-Brown, L.Q. et Welch, W.J. (1997). Correcting temperature-sensitive protein folding defects. *J. Clin. Invest.* **6**, 1432-1444.
- Brown, D.A., et Rose, J.K. (1992). Sorting of GPI-linked proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical surface. *Cell* **68**, 533-544.
- Bunnett, N.W., Debas, H.T., Turner, A.J., Kobayashi, R. et Walsh, J.H. (1988). Metabolism of gastrin and cholecystokinin by endopeptidase 24.11 from the pig stomach. *Am. J. Physiol.* **255(5 Pt 1)**, 676-84.
- Bunnett, N.W., Kobayashi, R., Orloff, M.S., Reeve, J.R., Turner, A.J., et Walsh, J.H. (1985). Catabolism of gastrin-releasing peptide and substance P by gastrin membrane-bound peptidases. *Peptides* **6**, 277-283.
- Bunnett, N.W., Orloff, M.S. et Turner, A.J. (1985). Catabolism of Substance P in the stomach wall of the rat. *Life Sci.* **37(7)**, 599-606.
- Bunnett, N.W., Turner, A.J., Hryszko, J., Kobayashi, R. et Walsh, J.H. (1988). Isolation of endopeptidase-24.11 (EC 3.4.24.11, "enkephalinase") from the pig stomach. Hydrolysis of Substance P, gastrin-releasing peptide 10, [leu⁵] enkephalin, and [met⁵] Enkephalin. *Gastroenterology* **95(4)**, 952-7.
- Bur, D., Dale, G.E. et Oefner, C. (2001). A three-dimensional model of endothelin-converting enzyme (ECE) based on the x-ray structure of neutral endopeptidase 24.11 (NEP). *Protein Eng.* **14(5)**, 337-341.
- Burgess, T.L. et Kelly, R.B. (1987). Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* **3**, 243-293.
- Burns, D.M., Walker, B., Gray, J. et Nelson, J. (1999). Breast cancer cell-associated endopeptidase EC 24.11 modulates proliferative response to bombesin. *Br. J. Cancer* **79(2)**, 214-20.
- Bychkova, V.E. et Ptitsyn, O.B. (1995). Folding intermediates are involved in genetic diseases? *FEBS Lett.* **359(1)**, 6-8.
- Bystrzycka, E.K. et Nail, B.S. (1983). The source of the respiratory drive to nasolabialis motoneurons in the rabbit; a HRP study. *Brain Res.* **266(2)**, 183-191.
- Cailler, F., Zappulla, J.P., Boileau, G. et Crine, P. (1999). The N-terminal segment of endothelin-converting enzyme (ECE)-1b contains a di-leucine motif that can redirect neprilysin to an intracellular compartment in madin-darby canine kidney (MDCK) cells. *Biochem. J.* **341(Pt 1)**, 119-26.

- Campos, M., Couture, C., Hirata, I.Y., Juliano, M.A., Loisel, T.P., Crine, P., Juliano, L., Boileau, G. et Carmona, A.K. (2003). Human recombinant endopeptidase Phex has a strict S1' specificity for acidic residues and cleaves peptides derived from fibroblast growth factor-23 and matrix extracellular phosphoglycoprotein. *Biochem. J.* **373(Pt 1)**, 271–279.
- Carpentier, M., Bailey, J.L., Jeannotte, L., Boileau, G., Charron, J. et DesGroseillers, L. (2003). Reduced male fertility in mice deficient in the zinc metallopeptidase NL1. Submitted in MCB .
- Carpentier, M., DesGroseillers, L. et Boileau, G. (2003). [m684].Nepriylsin-2, in Elsevier, ed., 'Handbook of proteolytic enzymes', 2nd edition edn, Elsevier.
- Carpentier, M., Marcinkiewicz, M., Boileau, G. et Desgroseillers, L. (2003). The neuropeptide-degrading enzyme NL1 is expressed in specific neurons of mouse brain. *Peptides* **24(7)**, 1083–1091.
- Carpentier, M., Robitaille, Y., Desgroseillers, L., Boileau, G. et Marcinkiewicz, M. (2002). Declining expression of neprilysin in alzheimer disease vasculature: possible involvement in cerebral amyloid angiopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **61(10)**, 849–856.
- Carretero, O.A. et Scicli, A.G. (1991). Local hormonal factors (intracrine, autocrine and paracrine) in hypertension. *Hypertension* **18**, 158-169.
- Carson, J.A. et Turner, A.J. (2002). Beta-amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases?. *J. Neurochem.* **81(1)**, 1–8.
- Casanova, J.E., Apodaca, G., et Mostov, K.E. (1991). An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor. *Cell* **66**, 65-75.
- Casanova, J.E., Breitfeld, P.P., Ross, S.A., et Mostov, K.E. (1990). Phosphorylation of the polymeric immunoglobulin receptor required for its efficient transcytosis. *Science* **248**, 742-745.
- Castleberry, R.P. (1997). Neuroblastoma. *Eur. J. Cancer* **33(9)**, 1437-1438.
- Chabrier, P.E., Roubert, P., Lonchamp, M.O., Plas, P. et Braquet, P. (1990). Receptor regulation of atrial natriuretic factor. *Blood Vessels* **27(2-5)**, 153–161.
- Chapman, R.E. et Munro, S. (1994). Retrieval of TGN proteins from the cell surface requires endosomal acidification. *EMBO J.* **13**, 2305-2312.
- Checler, F., Dauch, P., Barelli, H., Nahon, J.L. et Vincent, J.P. (1992). Hydrolysis of rat melanin-concentrating hormone by endopeptidase 24.11 (neutral endopeptidase). *Biochem. J.* **286(Pt 1)**, 217–21.

- Chen, C.Y., Salles, G., Seldin, M.F., Kister, A.E., Reinherz, E.L. et Shipp, M.A. (1992). Murine common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10 neutral endopeptidase 24.11). molecular characterization, chromosomal localization, and modeling of the active site. *J. Immunol.* **148(9)**, 2817–25.
- Cheng, S.H., Gregory, R.J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D.W., White, G.A., O’Riordan, C.R. et Smith, A.E. (1990). Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* **63**, 827-834.
- Clark, J.C., Wert, S.E., Bachurski, C.J., Stahlman, M.T., Stripp, B.R., Weaver, T.E. et Whitsett, J.A. (1995). Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92(17)**, 7794-7798.
- Clouthier, D.E., Hosoda, K., Richardson, J.A., Williams, S.C., Yanagisawa, H., Kuwaki, T., Kumada, M., Hammer, R.E. et Yanagisawa, M. (1998). Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-a receptor-deficient mice. *Development* **125(5)**, 813–824.
- Cohen, A.J., Bunn, P.A., Franklin, W., Magill-Solc, C., Hartmann, C., Helfrich, B., Gilman, L., Folkvord, J., Helm, K. et Miller, Y.E. (1996). Neutral endopeptidase: variable expression in human lung, inactivation in lung cancer, and modulation of peptide-induced calcium flux. *Cancer Res.* **56(4)**, 831–9.
- Collawn, J.F., Stangel, M., Kuhn, L.A., Esekogwu, V., Jing, S.Q., Trowbridge, I.S., et Taanner, J.A. (1990). Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. *Cell* **63**, 1061-1072.
- Colman, P.M., Jansonius, J.N., et Matthews, B.W. (1972). The structure of thermolysin : an electron density map at 2-3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **70**, 701-724.
- Connelly, J.C., Skidgel, R.A., Schulz, W.W., Johnson, A.R. et Erdös, E.G. (1985). Neutral endopeptidase 24.11 in human neutrophils: cleavage of chemotactic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82(24)**, 8737–41.
- Consortium, T.A. (2000). Autosomal dominant hypophosphatemic rickets is associated with mutations in FGF-23. *Nat. Genet.* **26**, 345–348.
- Corti, R., J.C. Burnett, J., Rouleau, J.L., Ruschitzka, F. et Luscher, T.F. (2001). Vasopeptidase inhibitors: a new therapeutic concept in cardiovascular disease?. *Circulation* **104(15)**, 1856–1862.
- Corvol, P. et Williams, T.A. (1997). Biochemical and molecular aspects of angiotensin-converting enzyme. In *Cell-Surface Peptidases in Health and Disease* (Kenny, A. J. and Boustead, C. M., eds.), pp. 99–117.

- Cosson, P. et Letourneur, F. (1997). Coatamer (COPI)-coated vesicles : roles in intracellular transport and protein sorting. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 484-487.
- Coupar, I.M. (1987). Opioid action of the intestine: the importance of the intestinal Mucosa. *Life Sci.* **41(8)**, 917-25.
- Cox, J.S. et Walter, P. (1996). A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* **87**, 391-404.
- Crine, P., Dion, N. et Boileau, G. (1997). Endopeptidase 24.11. In *Cell-Surface Peptidases in Health and Disease* (Kenny, A. J. and Boustead, C. M., eds.), pp. 79-98, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford
- Crine, P., LeGrimellec, C., Lemieux, E., Labonté, L., Fortin, S., Blachier, A. et Aubry, M. (1985). The production and characterization of a monoclonal antibody specific for the 94,000 Dalton enkephalin-degrading peptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131**, 255-261.
- D'Adamio, L., Shipp, M.A., Masteller, E.L. et Reinherz, E.L. (1989). Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple minixons and separate 5' untranslated regions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86(18)**, 7103-7.
- D'Angio, C.T. et Finkelstein, J.N. (2000). Oxygen Regulation of Gene Expression : A Study in Opposites. *Mol. Genet. and Metabol.* **71**, 371-380.
- Danek, A., Rubio, J.P., Rampoldi, L., Ho, M., Dobson-Stone, C., Tison, F., Symmans, W.A., Oechsner, M., Kalckreuth, W., Watt, J.M., Corbett, A.J., Hamdalla, H.H., Marshall, A.G., Sutton, I., Dotti, M.T., Malandrini, A., Walker, R.H., Daniels, G. Et Monaco, A.P. (2001). McLeod neuroacanthocytosis: genotype and phenotype. *Ann. Neurol.* **50(6)**, 755-764.
- Daniels, G.M. et Amara, S.G. (1998). Selective labeling of neurotransmitter transporters at the cell surface. *Methods Enzymol.* **296**, 307-318.
- Davies, D., Medeiros, M.S., Keen, J., Turner, A.J. et Haynes, L.W. (1992). Eosinophil chemotactic peptide sequences in rat alpha-cgrp. activation of a novel trophic action by neutral endopeptidase 24.11', *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **657**, 405-411.
- de Beur, S.M.J. et Levine, M.A. (2002). Molecular pathogenesis of hypophosphatemic rickets. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87(6)**, 2467-2473.
- De la Baume, S., Yi, C.C., Schwartz, J.C., Chaillet, P., Marcais-Collado, H., et Costentin, J. (1983). Participation of both «enkephalinase» and aminopeptidase activities in the metabolism of enkephalins. *Neuroscience* **8**, 143-151.
- DeLombaert, S., Erion, M.D., Blanchard, L., El-Chehabi, L., Ghai, R.D., Sakane, Y., Berry, C., et Trapani, A.J. (1994). N-phosphonomethyl dipeptides and their

- phosphonate prodrugs, a new generation of neutral endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11) inhibitors. *J. Med. Chem.* **37**, 498-511.
- Denault, J.B., Claing, A., D'Orleans-Juste, P., Sawamura, T., Kido, T., Masaki, T., et Leduc, R. (1995). Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Lett.* **362**, 276-280.
- Denning, G.M., Anderson, M.P., Amara, J.F., Marshall, J., Smith, A.E. et Welsh, M.J. (1992). Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* **358**, 761-764.
- Deschodt-Lanckman, M., Michaux, F., de Prez, E., Abramowicz, D., Vanherweghem, J.L. et Goldman, M. (1989). Increased serum levels of endopeptidase 24.11 ('enkephalinase') in patients with end-stage renal failure. *Life Sci.* **45(2)**, 133-41.
- Deschodt-Lanckman, M., Pauwels, S., Najdovski, T., Dimaline, R. et Dockray, G.J. (1988). In vitro and in vivo degradation of human gastrin by endopeptidase 24.11. *Gastroenterology* **94(3)**, 712-721.
- Deschodt-Lanckman, M., Vanneste, Y., Loir, B., Michel, A., Libert, A., Ghanem, G. et Lejeune, F. (1990). Degradation of alpha-melanocyte stimulating hormone (alphaMSH) by calla/endopeptidase 24.11 expressed by human melanoma cells in culture. *Int. J. Cancer* **46(6)**, 1124-1130.
- Devault, A., Lazure, C., Nault, C., Moual, H.L., Seidah, N.G., Chretien, M., Kahn, P., Powell, J., Mallet, J., Beaumont, A. (1987). Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) deduced from a complementary DNA. *Embo J.* **6(5)**, 1317-22.
- Devault, A., Nault, C., Zollinger, M., Fournie-Zaluski, M.C., Roques, B.P., Crine, P. et Boileau, G. (1988). Expression of neutral endopeptidase (enkephalinase) in heterologous COS-1 cells. Characterization of the recombinant enzyme and evidence for a glutamic acid residue at the active site. *J. Biol. Chem.* **263(8)**, 4033-40.
- Devault, A., Sales, V., Nault, C., Beaumont, A., Roques, B., Crine, P. et Boileau, G. (1988). Exploration of the catalytic site of endopeptidase 24.11 by site-directed mutagenesis. histidine residues 583 and 587 are essential for catalysis. *FEBS Lett.* **231(1)**, 54-8.
- Devi, L. (1991). Consensus sequence for processing of peptide precursors at monobasic sites. *FEBS Lett.* **280**, 189-194.
- Dion, N., Cohen, P., Crine, P., et Boileau, G. (1997). Characterization of neprilysin (EC 3.4.24.11) S2' subsite. *FEBS Lett.* **411**, 140-144.

- Dion, N., LeMoual, H., Crine, P. et Boileau, G. (1993). Kinetic evidence that His-711 of neutral endopeptidase 24.11 is involved in stabilization of the transition state. *FEBS Lett.* **318(3)**, 301–4.
- Dion, N., LeMoual, H., Fournie-Zaluski, M.C., Roques, B.P., Crine, P. et Boileau, G. (1995). Evidence that Asn542 of neprilysin (EC 3.4.24.11) is involved in binding of the P2' residue of substrates and inhibitors. *Biochem. J.* **311(Pt 2)**, 623–7.
- Dorner, A.J., Wasley, L.C. et Kaufman, R.J. (1992). Overexpression of GRP78 mitigates stress induction of glucose regulated proteins and blocks secretion of selective proteins in Chinese hamster ovary cells. *EMBO J.* **11**, 1563-1571.
- Dominguez, M., Dejgaard, K., Fullekrug, J., Dahan, S., Fazel, A., Paccaud, J.P., Thomas, D.Y., Bergeron, J.J., et Nilsson, T. (1998).. gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COP I and II coatomer. *J. Cell Biol.* **140(4)**, 751-765.
- Dotti, C.G. et Simons, K. (1990). Polarized sorting of viral glycoprotein to the axons and dendrites of hippocampal neurons in culture. *Cell* **62**, 63-72.
- Dotti, C.G, Parton, R.G., et Simons, K. (1991). Polarized sorting of glypiated proteins in hippocampal neurons. *Nature* **349**, 158-161.
- Drezner, M.K. (2000). Phex gene and hypophosphatemia. *Kidney Int.* **57(1)**, 9–18.
- Drumm, M.L., Wilkinson, D.J., Smit, L.S., Worrell, R.T., Strong, T.V., Frizzell, R.A., Dawson, D.C. et Collins, F.S. (1991). Chloride conductance expressed by $\Delta F508$ and other mutant CFTRs in *Xenopus* oocytes. *Science* **254**, 1797-1799.
- Du, L., Desbarais, M., Viel, J., Glorieux, F.H., Cawthorn, C., et Ecarot, B. (1996). cDNA cloning of the murine Pex gene implicated in X-linked hypophosphatemia and evidence for expression in bone. *Genomics* **36**, 22-28.
- Duffin, J., Ezure, K. et Lipski, J. (1995). Breathing rhythm generation : focus on the rostral ventrolateral medulla. *News Physiol. Sci.* **10**, 133-140.
- Dubois, S.G., Ruchon, A.F., Delalandre, A., Boileau, G., et Lajeunesse, D. (2002). Role of abnormal neutral endopeptidase-like activities in Hyp mouse bone cells in renal phosphate transport. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **283(5)**, C1414-1421.
- Durieux, C., Charpentier, B., Fellion, E., Gacel, G., Pelaprat, D. et Roques, B.P. (1985). Multiple cleavage sites of cholecystokinin heptapeptide by "enkephalinase". *Peptides* **6(3)**, 495–501.
- Eckman, E.A., Reed, D.K., et Eckman, C.B. (2001). Degradation of the Alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme. *J. Biol Chem.* **276(27)**, 24540-24548.

- Econs, M.J. et Francis, F. (1997). Positional cloning of the PEX gene: new insights into the pathophysiology of X-linked hypophosphatemic rickets. *Am. J. Physiol.* **273**, F489-498.
- Edington, B.V., Whelan, S.A. et Hightower, L.E. (1989). Inhibition of heat shock (stress) protein induction by deuterium oxide and glycerol : Additional support for the abnormal protein hypothesis of induction. *J. Cell. Physiol.* **139**, 219-228.
- Eipper, B.A., Stoffers, D.A., et Mains, R.E. (1992). The biosynthesis of neuropeptides : peptide α -amidation. *Annu. Rev. Neurosci.* **15**, 57-85.
- Eipper, B.A., Milgram, S.L., Husten, E.J., Yun, H.Y., et Mains, R.E. (1993). Peptidylglycine α -amidating monooxygenase : a multifunctional protein with catalytic, processing and routing domains. *Pro. Sci.* **2**, 489-497.
- Ellgaard, L. et Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 181-191.
- Ellgaard, L., Molinari, M. et Helenius, A. (1999). Setting the standards : quality control in the secretory pathway. *Science* **286**, 1882-1888.
- Emoto, N., Nurhantari, Y., Alimsardjono, H., Xie, J., Yamada, T., Yanagisawa, M., et Matsuo, M. (1999). Constitutive lysosomal targeting and degradation of bovine endothelin-converting enzyme-1a mediated by novel signals in its alternatively spliced cytoplasmic tail. *J. Biol. Chem.* **274**(3), 1509-18.
- Emoto, N. et Yanagisawa, M. (1995). Endothelin-converting enzyme-2 is a membranebound, phosphoramidon- sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J. Biol. Chem.* **270**(25), 15262-8.
- Englund, P.T. (1993). The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 121-138.
- Erdös, E.G. (1990). Some old and some new ideas on kinin metabolism. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **15**(Suppl 6), 20-4.
- Evans, A.E., Gerson, J., et Schnauffer, L. (1976). Spontaneous regression of neuroblastoma. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* **44**, 49-54.
- Facchinetti, P., Rose, C., Schwartz, J.C. et Ouimet, T. (2003). Ontogeny, regional and cellular distribution of the novel metalloprotease neprilysin 2 in the rat: a comparison with neprilysin and endothelin-converting enzyme-1. *Neuroscience* **118**(3), 627-639.
- Feldman, J. (1986). Neurophysiology of breathing in mammals. In *Handbook of Physiology. The nervous system. Intrinsic Regulatory System in the Brain*. Ed. FE Bloom, 463-524. Washington DC: *Am. Physiol. Soc.*

- Feldman, J. et Smith, J. (1995). Neural control of respiratory pattern in mammals : an overview. In *Regulation of Breathing*. Ed. J. Dempsey, A Pack, 39-69. New York : Dekker.
- Fergusson, M.A.J. et Williams, A.F. (1988). Cell-Surface Anchoring of Proteins via Glycosyl-Phosphatidylinositol structures. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 285-320.
- Fiedler, K. et Simons, K. (1995). The role of N-glycans in the secretory pathway. *Cell* **81**, 309-312.
- Fiedler, K. et Simons, K. (1996). Characterization of VIP36, an animal lectin homologous to leguminous lectins. *J. Cell Sci.* **109**, 271-276.
- Fiedler, K., Parton, R.G., Kellner, R., Etzold, T., et Simons, K. (1994). VIP36, a novel component of glycolipid rafts and exocytic carrier vesicles in epithelial cells. *EMBO J.* **13**, 1729-1740.
- Fiedler, K., Veit, M., Stamnes, M.A. et Rothman, J.E. (1996). Bimodal interaction of coatomer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science* **273**, 1396-1399.
- Foletti, D., Guerini, D. et Carafoli, E. (1995). Subcellular targeting of the endoplasmic reticulum and plasma membrane Ca²⁺ pumps: a study using recombinant chimeras. *FASEB J.* **9(8)**, 670-80.
- Fossiez, F., Lemay, G., Labonté, N., Parmentier-Lesage, F., Boileau, G. et Crine, P. (1992). Secretion of a functional soluble form of neutral endopeptidase-24.11 from a baculovirus-infected insect cell line. *Biochem J.* **284(Pt 1)**, 53-59.
- France-Lanord, V., Brugg, B., Michel, P.P., Agid, Y. et Ruberg, M. (1997). Mitochondrial free radical signal in ceramide-dependent apoptosis: a putative mechanism for neuronal death in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **69(4)**, 1612-1621.
- Francis, F., Strom, T.M., Hennig, S., Boddrich, A., Lorenz, B., Brandau, O., Mohnike, K.L., Cagnoli, M., Steffens, C., Klages, S., Borzym, K., Pohl, T., Oudet, C., Econs, M.J., Rowe, P.S., Reinhardt, R., Meitinger, T. et Lehrach, H. (1997). Genomic organization of the human PEX gene mutated in X-linked dominant hypophosphatemic rickets. *Genome Res.* **7(6)**, 573-585.
- Freedland, S.J., Seligson, D.B., Liu, A.Y., Pantuck, A.J., Paik, S.H., Horvath, S., Wieder, J.A., Zisman, A., Nguyen, D., Tso, C.L., Palotie, A.V. et Beldegrun, A.S. (2003). Loss of CD10 (neutral endopeptidase) is a frequent and early event in human prostate cancer. *Prostate* **55(1)**, 71-80.
- Freedman, R.B. (1989). Protein disulfide isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. *Cell* **57(7)**, 1069-1072.

- Freedman, R.B., Bulleid, N.J., Hawkins, H.C. et Paver, J.L. (1989). Role of protein disulphide-isomerase in the expression of native proteins. *Biochem. Soc. Symp.* **55**, 167-192.
- Frota-Ruchon, A., Marcinkiewicz, M., Ellefsen, K., Basak, A., Aubin, J., Crine, P. et Boileau, G. (2000). Cellular localization of neprilysin in mouse bone tissue and putative role in hydrolysis of osteogenic peptides. *J. Bone Miner. Res.* **15(7)**, 1266-74.
- Frota-Ruchon, A., Marcinkiewicz, M., Siegfried, G., Tenenhouse, H.S., Desgroseillers, L., Crine, P. et Boileau, G. (1998). Pex mRNA is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts. *J. Histochem. Cytochem.* **46(4)**, 459-68.
- Frota-Ruchon, A., Tenenhouse, H.S., Marcinkiewicz, M., Siegfried, G., Aubin, J.E., Desgroseillers, L., Crine, P. et Boileau, G. (2000). Developmental expression and tissue distribution of pex protein: effect of the *hyp* mutation and relationship to bone markers. *J. Bone Miner. Res.* **15(8)**, 1440-50.
- Fulcher, I.S., Chaplin, M.F. et Kenny, A.J. (1983). Endopeptidase-24.11 purified from pig intestine is differently glycosylated from that in kidney. *Biochem J.* **215(2)**, 317-23.
- Fulcher, I.S., Pappin, D.J. et Kenny, A.J. (1986). The N-terminal amino acid sequence of pig kidney endopeptidase-24.11 shows homology with pro-sucrase-isomaltase. *Biochem. J.* **240(1)**, 305-308.
- Fuller, F., Porter, J.G., Arfsten, A.E., Miller, J., Schilling, J.W., Scarborough, R.M., Lewicki, J.A. et Schenk, D.B. (1988). Atrial natriuretic peptide clearance receptor. complete sequence and functional expression of cDNA clones. *J. Biol. Chem.* **263(19)**, 9395-9401.
- Gandy, S. et Petanceska, S. (2001). Regulation of alzheimer beta-amyloid precursor trafficking and metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **487**, 85-100.
- Ganju, R.K., Shpektor, R.G., Brenner, D.G. et Shipp, M.A. (1996). CD10/neutral endopeptidase 24.11 is phosphorylated by casein kinase II and coassociates with other phosphoproteins including the Lyn Src-related kinase. *Blood* **88(11)**, 4159-65.
- Ganju, R.K., Sunday, M., Tsarwhas, D.G., Card, A. et Shipp, M.A. (1994). CD10/NEP in non-small cell lung carcinomas. relationship to cellular proliferation. *J. Clin. Invest.* **94(5)**, 1784-91.
- Gaudoux, F., Boileau, G. & Crine, P. (1993). Localization of neprilysin (EC 3.4.24.11) mRNA in rat brain by *in situ* hybridization. *J. Neurosci. Res.* **34(4)**, 426-33.
- Gekko, K. et Koga, S. (1983). Increased thermal stability of collagen in the presence of sugars and polyols. *J. Biochem.* **94**, 199-208.

- Gerlsma, S.Y. et Sturr, E.R. (1972). The effects of combining urea and an alcohol on the heat-induced reversible denaturation of ribonuclease. *Int. J. Pept. Proteins Res.* **4**, 372-378.
- Gething, M.-J. et Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* **355**, 33-45.
- Ghaddar, G., Ruchon, A.F., Carpentier, M., Marcinkiewicz, M., Seidah, N.G., Crine, P., Desgroseillers, L. et Boileau, G. (2000). Molecular cloning and biochemical characterization of a new mouse testis soluble-zinc-metalloproteinase of the neprilysin family. *Biochem. J.* **347(Pt 2)**, 419-29.
- Giraud, CG. et Maccioni, HJ. (2003). Endoplasmic reticulum export of glycosyltransferases depends on interaction of a cytoplasmic dibasic motif with Sar1. *Mol. Biol. Cell* **14(9)**, 3753-66.
- Gorr, S.U. et Darling, D.S. (1995). An N-terminal hydrophobic peak is the sorting signal of regulated secretory proteins. *FEBS Lett.* **361**, 8-12.
- Gourlet, P., Vandermeers, A., Robberecht, P. et Deschodt-Lanckman, M. (1997). Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP-27, but not PACAP-38) degradation by the neutral endopeptidase EC 3.4.24.11. *Biochem. Pharmacol.* **4(4)**, 509-515.
- Greaves, M.F. (1975). Proceedings: Surface antigens of leukaemic cells. *Br. J. Cancer* **32(2)**, 280-1.
- Gregory, R.J., Rich, D.P., Cheng, S.H., Souza, D.W., Paul, S., Manavalan, P., Anderson, M.P., Welsh, M.J. et Smith, A.E. (1991). Maturation and function of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator variants bearing mutations in putative nucleotide-binding domains 1 and 2. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3886-3893.
- Grieff, M., Mumm, S., Waeltz, P., Mazzarella, R., Whyte, M.P., Thaker, R.V., et Schleissinger, D. (1997). Expression and cloning of the human X-linked hypophosphatemia gene cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**, 635-639.
- Gros, C., Souque, A. et Schwartz, J.C. (1990). Degradation of atrial natriuretic factor in mouse blood *in vitro* and *in vivo*: role of enkephalinase (EC 3.4.24.11). *Neuropeptides* **17(1)**, 1-5.
- Gros, C., Souque, A., Schwartz, J.C., Duchier, J., Cournot, A., Baumer, P., et Lecomte, J.M. (1989). Protection of atrial natriuretic factor against degradation: diuretic and natriuretic responses after *in vivo* inhibition of enkephalinase (EC 3.4.24.11) by acetophan. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 7580-7584.
- Gruenberg, J. et Maxfield, F.R. (1995). Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 552-563.

- Guerin, S., Mari, B., Fernandez, E., Belhacene, N., Toribio, M.L. et Auberger, P. (1997). CD10 is expressed on human thymic epithelial cell lines and modulates thymopentin-induced cell proliferation. *Faseb. J.* **11(12)**, 1003–11.
- Gumbiner, B. et Kelly, R.B. (1982). Two distinct intracellular pathways transport secretory and membrane glycoproteins to the surface of pituitary tumor cells. *Cell* **28(1)**, 51–59.
- Guo, R., Liu, S., Spurney, R.F. et Quarles, L.D. (2001). Analysis of recombinant Phex: an endopeptidase in search of a substrate. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **281(4)**, 837–47.
- Hambrook, J.M., Morgan, B.A., Rance, M.J., et Smith, C.F. (1976). Mode of deactivation of the enkephalins by rat and human plasma and rat brain homogenates. *Nature* **262**, 782–783.
- Hammond, C. et Helenius, A. (1995). Quality control in the secretory pathway. *Curr. Op. Cell. Biol.* **7**, 523–529.
- Han, K.K. et Martinage, A. (1992). Possible relationship between coding recognition amino acid sequence motif or residue(s) and post-translational chemical modification of proteins. *Int. J. Biochem.* **24(9)**, 1349–63.
- Han, K.K. et Martinage, A. (1992). Post-translational chemical modification(s) of proteins. *Int. J. Biochem.* **24(1)**, 19–28.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H. et Ron, D. (2000). Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol. Cell* **5**, 897–904.
- Harding, H.P., Zhang, Y. et Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**, 271–274.
- Hardt, B., Kalz-Fuller, B., Aparicio, R., Volker, C., et Bause, E. (2003). (Arg)³ within the N-terminal domain of glucosidase I contains ER targeting information but is not required absolutely for ER localization. *Glycobiology* **13(3)**, 159–68.
- Harter, C. (1995). COP-coated vesicles in intracellular protein transport. *FEBS Lett.* **369**, 89–92.
- Hartmann, E., Rapoport, T.A., Lodish, H.F. (1989). Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 5786–5790.
- Hasegawa, H., Hiki, K., Sawamura, T., Aoyama, T., Okamoto, Y., Miwa, S., Shimohama, S., Kimura, J. et Masaki, T. (1998). Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett.* **428(3)**, 304–8.

- Haze, K., Okada, T., Yoshida, H. *et coll.* (2001). Identification of the G13 (camp-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochem. J.* **355**, 19-28.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., et Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* **10**, 3787-3799.
- Held, H.D., Raschak, M., et Uhlig, S. (1997). Rat big endothelin-1-induced bronchoconstriction and vasoconstriction in the isolated perfused rat lung: role of endothelin converting enzyme and neutral endopeptidase 24.11. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **355(5)**, 619-24.
- Helenius, A. (1994). How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **5**, 253-265.
- Henle, K.J., Peck, J.W. et Higashikubo, R. (1983). Protection against heat-induced cell killing by polyols in vitro. *Cancer Res.* **43**, 1624-1633.
- Hersh, L.B. (1984). Reaction of opioid peptides with neutral endopeptidase ("enkephalinase"). *J. Neurochem.* **43(2)**, 487-493.
- Hersh, L.B. et Morihara, K. (1986). Comparison of the subsite specificity of the mammalian neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) to the bacterial neutral endopeptidase thermolysin. *J. Biol. Chem.* **261(14)**, 6433-7.
- Hitt, A.L., Lu, T.H. et Luna, E.J. (1994). Ponticulin is an atypical membrane protein. *J. Cell. Biol.* **126(6)**, 1421-1431.
- Hoang, M.V. et Turner, A.J. (1997). Novel activity of endothelin-converting enzyme: hydrolysis of bradykinin. *Biochem. J.* **327(Pt 1)**, 23-6.
- Hofstra, R.M., Valdenaire, O., Arch, E., Osinga, J., Kroes, H., Loffler, B.M., Hamosh, A., Meijers, C., et Buys, C.H. (1999). A loss-of-function mutation in the endothelin-converting enzyme 1 (ECE-1) associated with Hirschsprung disease, cardiac defects, and autonomic dysfunction. *Am. J. Hum. Genet.* **64(1)**, 304-8.
- Hokfelt, T. (1991). Neuropeptides in perspective: the last ten years. *Neuron* **7**, 867-879.
- Holm, I.A., Huang, X. et Kunkel, L.M. (1997). Mutational analysis of the PEX gene in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Am. J. Hum. Genet.* **60**, 790-797.
- Holmes, M.A. et Matthews, B.W. (1982). Structure of thermolysin refined at 1.6 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **160(4)**, 623-639.

- Honsho, M., Mitoma, J.Y. et Ito, A. (1998). Retention of cytochrome b5 in the endoplasmic reticulum is transmembrane and luminal domain-dependent. *J. Biol. Chem.* **273**, 20860–20866.
- Hooper, N.M. (1994). Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* **354(1)**, 1–6.
- Hooper, N.M., Karran, E.H. et Turner, A.J. (1997). Membrane protein secretases. *Biochem. J.* **321**, 265–279.
- Hooper, N.M., Kenny, A.J. et Turner, A.J. (1985). The metabolism of neuropeptides. Neurokinin A (Substance K) is a substrate for endopeptidase-24.11 but not for peptidyl dipeptidase a (angiotensin-converting enzyme). *Biochem. J.* **231(2)**, 357–361.
- Hosoda, K., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Baynash, A.G., Cheung, J.C., Giaid, A. et Yanagisawa, M. (1994). Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-b receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* **79(7)**, 1267–1276.
- Howell, S., Caswell, A.M., Kenny, A.J. et Turner, A.J. (1993). Membrane peptidases on human osteoblast-like cells in culture: hydrolysis of calcitonin and hormonal regulation of endopeptidase-24.11. *Biochem. J.* **290(Pt 1)**, 159–164.
- Howell, S. et Crine, P. (1996). Type VI membrane proteins? *Trends Biochem. Sci.* **21(5)**, 171–2.
- Howell, S., Nalbantoglu, J., et Crine P. (1995). Neutral endopeptidase can hydrolyze beta-amyloid(1-40) but shows no effect on beta-amyloid precursor protein metabolism. *Peptides* **16(4)**, 647–52.
- HUGO Gene Nomenclature Committee : www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/.
- Hunziker, W., Harter, C., Matter, K., et Mellman, I. (1991). Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant. *Cell* **66**, 907–920.
- Hupe-Sodmann, K., McGregor, G.P., Bridenbaugh, R., Goke, R., Goke, B., Thole, H., Zimmermann, B. et Voigt, K. (1995). Characterisation of the processing by human neutral endopeptidase 24.11 of GLP-1(7-36) amide and comparison of the substrate specificity of the enzyme for other glucagon-like peptides. *Regul. Pept.* **58(3)**, 149–156.
- Ikeda, K., Emoto, N., Raharjo, S.B., Nurhantari, Y., Saiki, K., Yokoyama, M. et Matsuo, M. (1999). Molecular identification and characterization of novel membrane-bound metalloprotease, the soluble secreted form of which hydrolyzes a variety of vasoactive peptides. *J. Biol. Chem.* **274(45)**, 32469–77.
- Ikura, T., Sawamura, T., Shiraki, T., Hosokawa, H., Kido, T., Hoshikawa, H., Shimada, K., Tanzawa, K., Kobayashi, S., Miwa, S., et Masaki, T. (1994). cDNA cloning

- and expression of bovine endothelin-converting enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 1417-1422.
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K. et Masaki, T. (1989). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86(8)**, 2863-2867.
- Inukai, K., Takata, K., Asano, T., Katagiri, H., Isghihara, H., Nakazaki, M., Fukushima, Y., Yazaki, Y., Kikuchi, M., et Oka, Y. (1997). Targeting of GLUT1-GLUT5 chimeric proteins in the polarized cell line CaCo2. *Mol. Endocrin.* **11**, 442-449.
- Itin, C., Kappeler, F., Linstedt, A.D., et Hauri, H.P. (1995). A novel endocytosis signal related to the KKXX ER-retrieval signal. *EMBO J.* **14**, 2250-2256.
- Iwata, N., Takaki, Y., Fukami, S., Tsubuki, S. et Saido, T.C. (2002). Region-specific reduction of a beta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging. *J. Neurosci. Res.* **70(3)**, 493-500.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H.J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y. et Saido, T.C. (2000). Identification of the major abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat. Med.* **6(2)**, 143-50.
- Jackson, D.G. et Hersh, L.B. (1986). Reaction of neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) with arginine reagents. *J. Biol. Chem.* **261(19)**, 8649-54.
- Jackson, M.R., Cohen-Doyle, M.F., Peterson, P.A. et Williams, D.B. (1994). Regulation of MHC class I transport by the molecular chaperone, calnexin (p88, IP90). *Science* **263(5145)**, 384-7.
- Jackson, M.R., Nilsson, T., et Peterson, P.A. (1993). Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **121**, 317-333.
- Jentoft, N. (1990). Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem. Sci.* **15**, 291-294.
- Ji, C., Casinghino, S., McCarthy, T.L. et Centrella, M. (1997). Multiple and essential Sp1 binding sites in the promoter for transforming growth factor-beta type I receptor. *J. Biol. Chem.* **272**, 21260-21267.
- Jockers, R., Da Silva, A., Strosberg, A.D., Bouvier, M. and Marullo, S. (1996). New molecular and structural determinants involved in β_2 -adrenergic receptor desensitization and sequestration. Delineation using chimeric β_3/β_2 -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **271**, 9355-9362.

- Johnson, K.F. et Kornfeld, S. (1992). The cytoplasmic tail of the mannose-6-phosphate/insuline-like growth factor-II receptor has two signals for lysosomal enzyme sorting in the Golgi. *J. Cell Biol.* **119**, 249-257.
- Johnson, A.R., Skidgel, R.A., Galord, J.T. et Erdös, E.G. (1984). Enzymes in placental microvilli: angiotensin I converting enzyme, angiotensinase A, carboxypeptidase, and neutral endopeptidase ("enkephalinase"). *Peptides* **5(4)**, 789-796.
- Johnson, G.D., Stevenson, T. ET Ahn, K. (1999). Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1. A comparison with neprilysin. *J. Biol. Chem.* **274(7)**, 4053-8.
- Johnson, G.D., Swenson, H.R., Ramage, R. et Ahn, K. (2002). Mapping the active site of endothelin-converting enzyme-1 through subsite specificity and mutagenesis studies: a comparison with neprilysin. *Arch. Biochem. Biophys.* **398(2)**, 240-248.
- Jones, B.G., Thomas, L., Molloy, S.S., Thulin, C.D., Fry, M.D., Walsh, K.A., et Thomas, G. (1995). Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation state of a casein kinase II site in its cytoplasmic tail. *EMBO J.* **14**, 5869-5883.
- Jongeneel, C.V., Bouvier, J., et Bairoch, A. (1989). A unique signature identifies a family of zinc-dependent metalloproteinases. *FEBS Lett.* **242(2)**, 211-4.
- Jung, H.H., Russo, D., Redman, C. et Brandner, S. (2001). Kell and XK immunohistochemistry in McLeod myopathy. *Muscle Nerve* **24(10)**, 1346-1351.
- Kappeler, F., Klopfenstein, D.R., Foguet, M., Paccaud, J.P. et Hauri, H.P. (1997). The recycling of ERGIC-53 in the early secretory pathway. ERGIC-53 carries a cytosolic endoplasmic reticulum-exit determinant interacting with COPII. *J. Biol. Chem.* **272**, 31801-31808.
- Kartner, N., Augustinas, O., Jensen, T.J., Naismith, A.L. et Riordan, J.R. (1992). Mislocalization of delta F508 CFTR in cystic fibrosis sweat gland. *Nature Genet.* **1**, 321-327.
- Kato, R., Kiryu-Seo, S. et Kiyama, H. (2002). Damage-induced neuronal endopeptidase (DINE/ECEL1) expression is regulated by leukemia inhibitory factor and deprivation of nerve growth factor in rat sensory ganglia after nerve injury. *J. Neurosci.* **22(21)**, 9410-9418.
- Kawamoto, T., Ohira, M., Hamano, S., Hori, T. and Nakagawara, A. (2003). High expression of the novel endothelin-converting enzyme genes Nbla03145/ECEL1 α and β , is associated with favourable prognosis in human neuroblastomas. *Int. J. Oncol.* **22**, 815-822.
- Kawamoto, T., Shishikura, T., Ohira, M., Takayasu, H., Morohashi, A., Takada, N., Takahashi, M., Suzuki, Y., Sugano, S., Hori, T. et Nakagawara, A. (2000). Association between favorable neuroblastoma and high expression of the novel

- metalloproteinase gene, nbla3145/XCE, cloned by differential screening of the full-length-enriched oligocapping neuroblastoma cDNA libraries. *Med. Pediatr. Oncol.* **35(6)**, 628–31.
- Kenny, A.J. (1977). Endopeptidases in the brush border of the kidney proximal tubule. *Ciba Found. Symp.* **50**, 209–215.
- Kenny, A.J., Bourne, A. et Ingram, J. (1993). Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, c-type natriuretic peptide and some c-receptor ligands by endopeptidase-24.11. *Biochem. J.* **291(Pt 1)**, 83–88.
- Kenny, A.J., Fulcher, I.S., McGill, K.A. et Kershaw, D. (1983). Proteins of the kidney microvillar membrane. reconstitution of endopeptidase in liposomes shows that it is a short-stalked protein. *Biochem. J.* **211(3)**, 755–62.
- Kenny, J. (1993). Endopeptidase-24.11: putative substrates and possible roles. *Biochem. Soc. Trans.* **21(Pt 3)(3)**, 663–668.
- Kerr, M.A. et Kenny, A.J. (1974a). The molecular weight and properties of a neutral metallo-endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem. J.* **137(3)**, 489–95.
- Kerr, M.A. et Kenny, A.J. (1974b). The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem. J.* **137(3)**, 477–88.
- Khan, A.R. et James, M.N. (1998). Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci.* **7(4)**, 815–36.
- Kido, T., Sawamura, T., Hoshikawa, H., D'Orleans-Juste, P., Denault, J.B., Leduc, R., Kimura, J., et Masaki, T. (1997). Processing of proendothelin-1 at the C-terminus of big endothelin-1 is essential for proteolysis by endothelin-converting enzyme-1 *in vivo*. *Eur. J. Biochem.* **244**, 520–526.
- Kimura, A., Iwamoto, I., Nakagawa, N., Tomioka, H. et Yoshida, S. (1991). Neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) does not hydrolyze recombinant human interleukin-1 beta. *Immunol. Lett.* **28(2)**, 109–114.
- King, K.A., Hua, J., Torday, J.S., Drazen, J.M., Graham, S.A., Shipp, M.A. et Sunday, M.E. (1993). CD10/neutral endopeptidase 24.11 regulates fetal lung growth and maturation in utero by potentiating endogenous bombesin-like peptides. *J. Clin. Invest.* **91(5)**, 1969–73.
- Kirkwood, K.S., Bunnett, N.W., Maa, J., Castagliolo, I., Liu, B., Gerard, N., Zacks, J., Pothoulakis, C. et Grady, E.F. (2001). Deletion of neutral endopeptidase exacerbates intestinal inflammation induced by clostridium difficile toxin a. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **281(2)**, G544–G551.

- Kiryu, S., Yao, G.L., Morita, N., Kato, H., et Kiyama, H. (1995). Nerve injury enhances rat neuronal glutamate transporter expression: identification by differential display PCR. *J. Neurosci.* **15**(12), 7872-8.
- Kiryu, S., Morita, N., Ohno, K., Maeno, H., et Kiyama, H. (1995) Regulation of mRNA expression involved in Ras and PKA signal pathways during rat hypoglossal nerve regeneration. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **29**(1), 147-56.
- Kiryu-Seo, S., Sasaki, M., Yokohama, H., Nakagomi, S., Hirayama, T., Aoki, S., Wada, K. et Kiyama, H. (2000). Damage-induced neuronal endopeptidase (DINE) is a unique metallopeptidase expressed in response to neuronal damage and activates superoxide scavengers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**(8), 4345-50.
- Klausner, R.D. et Sitia, R. (1990). Protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell* **62**(4),611-4.
- Koehne, P., Schaper, C., Graf, K. et Kunkel, G. (1998). Neutral endopeptidase 24.11: its physiologic and possibly pathophysiologic role in inflammation with special effect on respiratory inflammation. *Allergy* **53**(11), 1023-1042.
- Kohan, D.E. (1991). Endothelin synthesis by rabbit renal tubule cells. *Am. J. Physiol.* **261**(2 Pt 2), 221-6.
- Kondrakhin, Y.V., Kel, A.E., Kolchanov, N.A., Romashchenko, A.G. et Milanesi, L. (1995). Eukaryotic promoter recognition by binding sites for transcription factors. *Comput. Appl. Biosci.* **11**(5), 477-88.
- Kopito, R.R. (1999). Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol. Rev.* **79**(1), S167-S173.
- Kopito, R.R. (1997). ER quality control : the cytoplasmic connection. *Cell* **88**, 427-430.
- Kornfeld, R. et Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 631-664.
- Kozarsky, K.F., Call, S.M., Dower, S.K., et Krieger, M. (1988). Abnormal intracellular sorting of O-linked carbohydrate-deficient interleukin-2 receptors. *Mol. Cell Biol.* **8**(8), 3357-63.
- Kozarsky, K., Kingsley, D., et Krieger, M. (1988). Use of a mutant cell line to study the kinetics and function of O-linked glycosylation of low density lipoprotein receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**(12):4335-9.
- Kuehn, M.J., Herrmann, J.M. et Schekman, R. (1998). COPII-cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles. *Nature* **391**, 187-190.

- Kumagai, H., Chun, K.T. et Simoni, R.D. (1995). Molecular dissection of the role of the membrane domain in the regulated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.* **270(32)**, 19107-19113.
- Kurihara, Y., Kurihara, H., Oda, H., Maemura, K., Nagai, R., Ishikawa, T. et Yazaki, Y. (1995). Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1. *J. Clin. Invest.* **96(1)**, 293-300.
- Kurihara, Y., Kurihara, H., Suzuki, H., Kodama, T., Maemura, K., Nagai, R., Oda, H., Kuwaki, T., Cao, W.H., Kamada, N. et coll. (1994). Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* **368(6473)**, 703-10.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lafrance, M.H., Vezina, C., Wang, Q., Boileau, G., Crine, P. et Lemay, G. (1994). Role of glycosylation in transport and enzymic activity of neutral endopeptidase-24.11. *Biochem. J.* **302(Pt 2)**, 451-4.
- Lancôt, C., Fournier, H., Howell, S., Boileau, G. and Crine, P. (1995). Direct targeting of neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) to the apical cell surface of transfected LLC-PK1 cells and unpolarized secretion of its soluble form. *Biochem. J.* **305**, 165-171.
- Landry, C., Santagata, P., Bawab, W., Fournie-Zaluski, M.C., Roques, B.P., Vinay, P., et Crine, P. (1993). Characterization of neutral endopeptidase 24.11 in dog glomeruli. *Biochem. J.* **291(Pt 3)**, 773-9.
- Laporte, S., Denault, J.B., D'Orleans-Juste, P., et Leduc, R. (1993). Presence of Furin mRNA in Cultured Bovine Endothelial Cells and Possible Involvement of Furin in the Processing of the Endothelin Precursor. *J. Cardio. Pharmacol.* **22**, S7-S10.
- Laughery, M.D., Todd, M.L., et Kaplan, J.H. (2003). Mutational analysis of alpha-beta subunit interactions in the delivery of Na,K-ATPase heterodimers to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **278(37)**, 34794-803.
- LeBien, T.W. et McCormack, R.T. (1989). The common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10)--emancipation from a functional enigma. *Blood* **73(3)**, 625-35.
- Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X. et coll. (2001). The glucose-regulated proteins : stress induction and clinical applications. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 504-510.
- Lee, S. (1997). Molecular basis of kell blood group phenotypes. *Vox Sang.* **73(1)**, 1-11.
- Lee, S., Debnath, A.K. et Redman, C.M. (2003). Active amino acids of the kell bloodgroup protein and model of the ectodomain based on the structure of neutral endopeptidase 24.11. *Blood.* **102(8)**, 3028-3034.

- Lee, S., Lin, M., Mele, A., Cao, Y., Farmar, J., Russo, D. et Redman, C. (1999). Proteolytic processing of big endothelin-3 by the kell blood group protein. *Blood* **94**(4), 1440–50.
- Lee, S., Russo, D.C., Reid, M.E. et Redman, C.M. (2003). Mutations that diminish expression of kell surface protein and lead to the km^{od} rbc phenotype. *Transfusion* **43**(8), 1121–1125.
- Lee, S., Zambas, E.D., Marsh, W.L. et Redman, C.M. (1991). Molecular cloning and primary structure of kell blood group protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**(14), 6353–7.
- Lee, S., Zambas, E.D., Marsh, W.L. et Redman, C.M. (1993). The human kell blood group gene maps to chromosome 7q33 and its expression is restricted to erythroid cells. *Blood* **81**(10), 2804–2809.
- Lee, S., Zambas, E., Green, E.D. et Redman, C. (1995). Organization of the gene encoding the human Kell blood group protein. *Blood* **85**, 1364–1370. Erratum in: *Blood* (1996) **87**(11). 4922.
- Lee, S.G., Lee, H. et Rho, H.M. (2001). Transcriptional repression of the human *p53* gene by cobalt chloride mimicking hypoxia. *FEBS Lett.* **507**, 259–263.
- Lehman, L.E., Eberle, W., Krull, S., Prill, V., Schmidt, B., Sander, C., von Figura, K., et Peters, C. (1992). The internalization signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase consists of the hexapeptide PGYRHV. *EMBO J.* **11**, 4391–4399.
- Lemay, G., Waksman, G., Roques, B.P., Crine, P. et Boileau, G. (1989). *J. Biol. Chem.* **264**, 15620–15623.
- LeMoual, H., Devault, A., Roques, B.P., Crine, P. et Boileau, G. (1991). Identification of glutamic acid 646 as a zinc-coordinating residue in endopeptidase-24.11. *J. Biol. Chem.* **266**(24), 15670–4.
- LeMoual, H., Dion, N., Roques, B.P., Crine, P. et Boileau, G. (1994). Asp650 is crucial for catalytic activity of neutral endopeptidase 24-11. *Eur. J. Biochem.* **221**(1), 475–80.
- LeMoual, H., Roques, B.P., Crine, P., et Boileau, G. (1993). Substitution of potential metal-coordinating amino acid residues in the zinc-binding site of endopeptidase-24-11. *FEBS Lett.* **324**, 196–200.
- Letarte, M., Vera, S., Tran, R., Addis, J.B., Onizuka, R.J., Quackenbush, E.J., Jongeneel, C.V. et McInnes, R.R. (1988). Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J. Exp. Med.* **168**(4), 1247–53.

- Letourneur, F. et Klausner, R.D. (1992). A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* **69**, 1143-1157.
- Lewis, M.J. et Pelham, H.R. (1990). A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* **348**, 162-163.
- Lewis, M.J., Sweet, D.J., et Pelham, H.R. (1990). The ERD2 gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system. *Cell* **61**, 1359-1363.
- Li, C., Booze, R.M. et Hersh, L.B. (1995). Tissue-specific expression of rat neutral endopeptidase (neprilysin) mRNAs. *J. Biol. Chem.* **270(11)**, 5723-5728.
- Li, N. et Seetharam, B. (1998). A 69-base pair fragment derived from human transcobalamin II promoter is sufficient for high bidirectional activity in the absence of a TATA box and an initiator element in transfected cells. Role of an E box in transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* **273(43)**, 28170-7.
- Lin, P.S., Kwock, L. et Hefter, K. (1981). Protection of heat induced cytotoxicity by glycerol. *J. Cell. Physiol.* **108**, 439-448.
- Linstedt, A.D. and Hauri, H.P. (1993). Giantin, a novel conserved Golgi membrane protein containing a cytoplasmic domain of at least 350 kDa. *Mol. Biol. Cell* **4**, 679-693.
- Lipman, M.L., Panda, D., Bennett, H.P., Henderson, J.E., Shane, E., Shen, Y., Goltzman, D. et Karaplis, A.C. (1998). Cloning of human PEX cDNA. expression, subcellular localization, and endopeptidase activity. *J. Biol. Chem.* **273(22)**, 13729-37.
- Lisanti, M.P., Caras, I.W., Davitz, M.A., et Rodriguez-Boulan, E. (1989). A glycopospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in epithelial cells. *J. Cell Biol.* **109**, 2145-2156.
- Lisanti, M.P. et Rodriguez-Boulan, E. (1990). Glycophospholipid membrane anchoring provides clues to the mechanism of protein sorting in epithelial cells. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 113-118.
- Llorens, C., Gacel, G., Swerts, J.P., Perdrisot, R., Fournie-Zaluski, M.C., Schwartz, J.C. et Roques, B.P. (1980). Rational design of enkephalinase inhibitors: substrate specificity of enkephalinase studied from inhibitory potency of various dipeptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96(4)**, 1710-6.
- Llorens, C., Malfroy, B., Schwartz, J.C., Gacel, G., Roques, B.P., Roy, J., Morgat, J.L., Javoy-Agid, F., et Agid, Y. (1982). Enkephalin dipeptidyl carboxypeptidase (enkephalinase) activity : selective radioassay, properties, and regional distribution in human brain. *J. Neurochem.* **39**, 1081-1089.

- Llorens, C. et Schwartz, J.C. (1981). Enkephalinase activity in rat peripheral organs. *Eur. J. Pharmacol.* **69(1)**, 113-6.
- Llorens-Cortes, C., Gros, C., et Schwartz, J.C. (1986). Steady-state level and turnover rate of the tripeptide Tyr-Gly-Gly as indexes of striatal enkephalin release *in vivo* and their reduction during pentobarbital anesthesia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 6226-6230.
- Llorens-Cortes, C., Huang, H., Vicart, P., Gasc, J.M., Paulin, D. et Corvol, P. (1992). Identification and characterization of neutral endopeptidase in endothelial cells from venous or arterial origins. *J. Biol. Chem.* **267(20)**, 14012-14018.
- Lorenzo, M.N., Khan, R.Y., Wang, Y., Tai, S.C., Chan, G.C., Cheung, A.H. et Marsden, P.A. (2001). Human endothelin-converting enzyme-2 (ECE-2): characterization of mRNA species and chromosomal localization. *Biochim. Biophys. Acta* **1522(1)**, 46-52.
- Low, M.G. (1989). The glycosy-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochem. Biophys. Acta.* **988**, 427-454.
- Lu, B., Figini, M., Emanuelli, C., Geppetti, P., Grady, E.F., Gerard, N.P., Ansell, J., Payan, D.G., Gerard, C. et Bunnett, N. (1997). The control of microvascular permeability and blood pressure by neutral endopeptidase. *Nat. Med.* **3(8)**, 904-907.
- Lu, B., Gerard, N.P., Kolakowski, L.F., Bozza, M., Zurakowski, D., Finco, O., Carroll, M.C. et Gerard, C. (1995). Neutral endopeptidase modulation of septic shock. *J. Exp. Med.* **181(6)**, 2271-5.
- Lu, B., Gerard, N.P., Kolakowski, L.F., Finco, O., Carroll, M.C. et Gerard, C. (1996). Neutral endopeptidase modulates septic shock. *Ann. NY Acad. Sci.* **780**, 156-63.
- Luzio, J.P. et Banting, G. (1993). Eukaryotic membrane traffic : retrieval and retention mechanisms to achieve organelle residence. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 395-398.
- Ma, D., Zerangue, N., Lin, Y.F., Collins, A., Yu, M., Jan, Y.N. et Jan, L.Y. (2001). Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* **291(5502)**, 316-319.
- Ma, Y. et Hendershot, L.M. (2002). The mammalian endoplasmic reticulum as a sensor for cellular stress. *Cell Stress & Chaperones* **7(9)**, 222-229.
- Maack, T., Suzuki, M., Almeida, F.A., Nussenzveig, D., Scarborough, R.M., McEnroe, G.A. et Lewicki, J.A. (1987). Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* **238(4827)**, 675-678.
- Machamer, C.E. (1991). Golgi retention signals : do membranes hold the key? *Trends Cell Biol.* **1**, 141-144.

- Machamer, C.E. (1993). Targeting and retention of Golgi membrane proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 606-612.
- Mains, R.E., Eipper, B.A., Glembotski, C.C., et Dores, R.M. (1983). Strategies for the biosynthesis of bioactive peptides. *Trends Neurosci.* **6**, 229-235.
- Malfroy, B., Kuang, W.J., Seeburg, P.H., Mason, A.J. et Schofield, P.R. (1988). Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). *FEBS Lett.* **229(1)**, 206-10.
- Malfroy, B., Schofield, P.R., Kuang, W.J., Seeburg, P.H., Mason, A.J. et Henzel, W.J. (1987). Molecular cloning and amino acid sequence of rat enkephalinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144(1)**, 59-66.
- Malfroy, B. et Schwartz, J.C. (1982a). Properties of "enkephalinase" from rat kidney: Comparison of dipeptidylcarboxypeptidase and endopeptidase activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **106(2)**, 276-85.
- Malfroy, B. et Schwartz, J.C. (1982b). Purification and substrate specificity of rat kidney "enkephalinase". *Life Sci.* **31(16-17)**, 1745-8.
- Malfroy, B., Swerts, J.P., Guyon, A., Roques, B.P., et Schwartz, J.C. (1978). High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature* **276**, 523-526.
- Malkus, P., Jiang, F., et Schekman, R. (2002). Concentrative sorting of secretory cargo proteins into COPII-coated vesicles. *J. Cell Biol.* **159(6)**, 915-21.
- Marcais-Collado, H., Uchida, G., Costentin, J., Schwartz, J.C. et Lecomte, J.M. (1987). Naloxone-reversible antidiarrheal effects of enkephalinase inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* **144(2)**, 125-32.
- Mari, B., Breittmayer, J.P., Guerin, S., Belhacene, N., Peyron, J.F., Deckert, M., Rossi, B. et Auberger, P. (1994). High levels of functional endopeptidase 24.11 (CD10) activity on human thymocytes: preferential expression on immature subsets. *Immunology* **82(3)**, 433-8.
- Mari, B., Checler, F., Ponzio, G., Peyron, J.F., Manie, S., Farahifar, D., Rossi, B. et Auberger, P. (1992). Jurkat t cells express a functional neutral endopeptidase activity (Calla) involved in t cell activation. *Embo J.* **11(11)**, 3875-85.
- Marie-Claire, C., Ruffet, E., Antonczak, S., Beaumont, A., O'Donohue, M., Roques, B. P. et Fournie-Zaluski, M.C. (1997). Evidence by site-directed mutagenesis that arginine 203 of thermolysin and arginine 717 of neprilysin (neutral endopeptidase) play equivalent critical roles in substrate hydrolysis and inhibitor binding. *Biochemistry* **36(45)**, 13938-45.

- Marks, M.S., Woodruff, L., Ohno, H., et Bonifacino, J.S. (1996). Protein targeting by Tyrosine- and Di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *J. Cell Biol.* **135**, 341-354.
- Marsh, W.L. (1992). Molecular biology of blood groups: cloning the kell gene. *Transfusion* **32(2)**, 98-101.
- Marshall, R.D. (1974). The nature and metabolism of the carbohydrate-peptide linkages of glycoproteins. *Biochem. Soc. Symp.* **40**, 17-26.
- Martinez-Arca, S., Lalioti, V.S., et Sandoval, I.V. (2000). Intracellular targeting and retention of the glucose transporter GLUT4 by the perinuclear storage compartment involves distinct carboxyl-tail motifs. *J. Cell Sci.* **113(Pt 10)**, 1705-15.
- Matlin, K.S. (1992). W(h)ither default ? Sorting and polarization in epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 623-628.
- Matsas, R., Fulcher, I.S., Kenny, A.J. et Turner, A.J. (1983). Substance P and [leu]enkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80(10)**, 3111-5.
- Matsas, R., Kenny, A.J. et Turner, A.J. (1984). The metabolism of neuropeptides. The hydrolysis of peptides, including enkephalins, tachykinins and their analogues, by endopeptidase-24.11. *Biochem. J.* **223(2)**, 433-40.
- Matsas, R., Kenny, A.J. et Turner, A.J. (1986). An immunohistochemical study of endopeptidase-24.11 ("enkephalinase") in the pig nervous system. *Neuroscience* **18(4)**, 991-1012.
- Matter, K., et Mellman, I. (1994). Mechanisms of cell polarity : sorting and transport in epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 545-554.
- Matter, K., Yamamoto, E.M., et Mellman, I. (1994). Structural requirements and sequence motifs for the polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J. Cell Biol.* **126**, 991-1004.
- Matthews, B.W. (1988). Structural basis of the action of thermolysin and related zinc metallopeptidases. *Acc. Chem. Res.* **21**, 333-340.
- Mauborgne, A., Bourgoïn, S., Benoliel, J. J., Hirsch, M., Berthier, J. L., Hamon, M., et Cesselin, F. (1987). Enkephalinase is involved in the degradation of endogenous substance p released from slices of rat substantia nigra. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **243(2)**, 674-680.

- McIver, D.J.L., Schurch, S. et Sridhar, R. (1980). Deuterium oxide protects against hyperthermic cell death. Evidence for role of interfacial water. *Physiol. Chem. Phys.* **12**, 369-376.
- Medeiros, M.D. et Turner, A.J. (1994). Processing and metabolism of peptide-YY: pivotal roles of dipeptidylpeptidase-IV, aminopeptidase-P, and endopeptidase-24.11. *Endocrinology* **134**(5), 2088–2094.
- Misenböck, G. et Rothman, J.E. (1995). The capacity to retrieve escaped ER proteins extends to the *trans*-most cisterna of the Golgi stack. *J. Cell Biol.* **129**, 309-319.
- Mizuno, K. & Matsuo, H. (1994). Processing of peptide hormone precursors, in H. Imura. ed. 'The Pituitary Gland'. 2nd edition edn, Raven Press, Ltd, book chapter 7, pp. 153–178.
- Molloy, S.S., Thomas, L., VanSlyke, J.K., Stenberg, P.E., et Thomas, G. (1994). Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J.* **13**, 18-33.
- Mostov, K., Apodaca, G., Aroeti, B., et Okamoto, C. (1992). Plasma membrane protein sorting in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* **116**, 577-583.
- Muller, L., Barret, A., Etienne, E., Meidan, R., Valdenaire, O., Corvol, P. et Tougard, C. (2003). Heterodimerization of endothelin-converting enzyme-1 isoforms regulates the subcellular distribution of this metalloprotease. *J. Biol. Chem.* **278**(1), 545–555.
- Muller, L., Valdenaire, O., Barret, A., Korth, P., Pinet, F., Corvol, P. et Tougard, C. (2000). Expression of the endothelin-converting enzyme-1 isoforms in endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36**(5 Suppl 1), S15–S18.
- Munro, S. (1991). Sequences within and adjacent to the transmembrane segment of α -2,6-sialyltransferase specify Golgi retention. *EMBO J.* **10**, 3577-3588.
- Munro, S. (1995). An investigation of the role of transmembrane domains in Golgi protein retention. *EMBO J.* **14**, 4695-4704.
- Munro, S. et Pelham, H.R.B. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**, 899-907.
- Murakami, K., Mihara, K. et Omura, T. (1994). The transmembrane region of microsomal cytochrome P450 identified as the endoplasmic reticulum retention signal. *J. Biochem.* **116**(1), 164-175.
- Mzhavia, N., Pan, H., Che, F.Y., Fricker, L.D. et Devi, L.A. (2003). Characterization of endothelin-converting enzyme-2. implication for a role in the nonclassical processing of regulatory peptides. *J. Biol. Chem.* **278**(17), 14704–14711.

- Nadel, J.A. (1990). Decreased neutral endopeptidases: possible role in inflammatory diseases of airways. *Lung* **168(Suppl)**, 123–7.
- Nadel, J.A. (1991). Neutral endopeptidase modulates neurogenic inflammation. *Eur. Respir. J.* **4(6)**, 745–54.
- Nadel, J.A. (1992). Regulation of neurogenic inflammation by neutral endopeptidase. *Am. Rev. Respir. Dis.* **145(2 Pt 2)**, 48–52.
- Nagatomo, Y., Kitamura, K., Kangawa, K., Fujimoto, Y. et Eto, T. (1996). Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide is rapidly cleaved by neutral endopeptidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223(3)**, 539–543.
- Nakamura, N., Yamazaki, S., Sato, K., Nakano, A., Sakaguchi, M. et Mihara, K. (1998). Identification of potential regulatory elements for the transport of Emp24p. *Mol. Biol. Cell* **9**, 3493–3503.
- Nakayama, K. (1997). Furin: a mammalian subtilisin/kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem. J.* **327(Pt 3)**, 625–35.
- Nau, R., Schafer, G. et Conlon, J.M. (1985). Proteolytic inactivation of substance P in the epithelial layer of the intestine. *Biochem. Pharmacol.* **34(22)**, 4019–23.
- Nelbroeck, P., Fuchs, M., Bur, D., et Loffler, B.M. (1998). Glycosylation of Asn-632 and Asn-651 is important for functional expression of endothelin-converting enzyme-1. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **31 Suppl 1**, S4-6.
- Nickel, W. et Wieland, F.T. (1998). Biosynthetic protein transport through the early secretory pathway. *Histochem. Cell Biol.* **109**, 477-486.
- Nilsson, T., Hoe, M.H., Slusarewicz, P., Rabouille, C., Watson, R., Hunte, F., Watzele, G., Berger, E.G., et Warren, G. (1994). Kin recognition between *medial* Golgi enzymes in HeLa cells. *EMBO J.* **13**, 562-574.
- Nilsson, T., Pypaert, M., Hoe, M.H., Slusarewicz, P., Berger, E.G., et Warren, G. (1993). Overlapping distribution of two glycosyltransferases in the Golgi apparatus of HeLa cells. *J. Cell Biol.* **120**, 5-13.
- Nilsson, T. et Warren, G. (1994). Retention and retrieval in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 517-521.
- Nishimura, N. et Balch, W.E. (1997). A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* **277**, 556-558.
- Noble, F., Fournie-Zaluski, M.C., et Roques, B.P. (1993). Unlike morphine the endogenous enkephalins protected by RB101 are unable to establish a conditioned place preference in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **230**, 139-149.

- Noble F, Turcaud S, Fournie-Zaluski MC, Roques BP. (1992). Repeated systemic administration of the mixed inhibitor of enkephalin-degrading enzymes, RB101, does not induce either antinociceptive tolerance or cross-tolerance with morphine. *Eur. J. Pharmacol.* **223(1)**, 83-9.
- Norman, J.A., Little, D., Bolgar, M. et Donato, G.D. (1991). Degradation of brain natriuretic peptide by neutral endopeptidase: species specific sites of proteolysis determined by mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175(1)**, 22-30.
- Nufer, O., Guldbrandsen, S., Degen, M., Kappeler, K., Paccaud, J.P., Tani, K., et Hauri, H.P. (2002). Role of cytoplasmic C-terminal amino acids of membrane proteins in ER export. *J. Cell Sci.* **115**, 819-828.
- Nufer, O. et Hauri, H.P. (2003). ER export: call 14-3-3. *Curr. Biol.* **13(10)**, R391-3.
- Nufer, O., Kappeler, F., Guldbrandsen, S., et Hauri, H.P. (2003). ER export of ERGIC-53 is controlled by cooperation of targeting determinants in all three of its domains. *J. Cell Sci.* **116(Pt 21)**, 4429-40.
- Oblin, A., Danse, M.J. et Zivkovic, B. (1989). Metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11) but not angiotensin converting enzyme is involved in the inactivation of substance P by synaptic membranes of the rat substantia nigra. *Life Sci.* **44(20)**, 1467-74.
- Octave, J.N. (1995). The amyloid peptide precursor in alzheimer's disease. *Acta. Neurol. Belg.* **95(4)**, 197-209.
- Oefner, C., D'Arcy, A., Hennig, M., Winkler, F.K. et Dale, G.E. (2000). Structure of human neutral endopeptidase (neprilysin) complexed with phosphoramidon. *J. Mol. Biol.* **296(2)**, 341-9.
- Ohba, N., Kiryu-Seo, S., Maeda, M., Muraoka, M., Ishii, M. et Kiyama, H. (2004). Transgenic mouse overexpressing the Akt reduced the volume of infarct area after middle cerebral artery occlusion. *Neurosci. Lett.* **359(3)**, 159-162.
- Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, A. et Kohno, K. (2000). Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 445-450.
- Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Powell, S.K., Quinn, D.L., et Moore, H.P. (1987). The trans-most cisternae of the Golgi complex: a compartment for sorting of secretory and plasma membrane proteins. *Cell* **51(6)**, 1039-51.
- Ortega Mateo, A. et DeArtinano, A.A. (1997). Highlights on endothelins : a review. *Pharmacol. Res.* **36**, 339-351.
- Orzechowski, H.D., Richter, C.M., Funke-Kaiser, H., Kroger, B., Schmidt, M., Menzel, S., Bohnemeir, H., et Paul, M. (1997). Evidence of alternative promoters directing

- isoform-specific expression of human endothelin-converting enzyme-1 mRNA in cultured endothelial cells. *J. Mol. Med.* **75**, 512-521.
- Orzechowski, H.D., Richter, C.M., Funke-Kaiser, H., Lemmer, J., Theis, S. et Paul, M. (1999). Cloning and functional characterization of the bovine endothelin-converting enzyme-1a promoter. *Biochim. Biophys. Acta* **1446(3)**, 352-358.
- Otte, S. et Barlowe, C. (2002). The Erv41p-Erv46p complex: multiple export signals are required in trans for COPII-dependent transport from the ER. *EMBO J.* **21(22)**, 6095-104.
- Ottlecz, A., Walker, S., Conrad, M. et Starcher, B. (1991). Neutral metalloendopeptidase associated with the smooth muscle cells of pregnant rat uterus. *J. Cell Biochem.* **45(4)**, 401-411.
- Ouimet, T., Facchinetti, P., Rose, C., Bonhomme, M.C., Gros, C. et Schwartz, J.C. (2000). Neprilysin II: A putative novel metalloprotease and its isoforms in CNS and Testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271(3)**, 565-570.
- Painter, R.G., Dukes, R., Sullivan, J., Carter, R., Erdös, E.G. et Johnson, A.R. (1988). Function of neutral endopeptidase on the cell membrane of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **263(19)**, 9456-61.
- Parker, A.K., Gergely, F.V., et Taylor, C.W. (2004). Targeting of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to the endoplasmic reticulum by multiple signals within their transmembrane domains. *J. Biol. Chem.* **279(22)**, 23797-805.
- Parks, G.D. et Lamb, R.A. (1991). Topology of eukaryotic type II membrane proteins : Importance of N-terminal positively charged residues flanking the hydrophobic domain. *Cell* **64**, 777-787.
- Paulson, J.C., Colley, K.J. (1989). Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J. Biol. Chem.* **264(30)**, 17615-8.
- Pauwels, S., Najdovski, T., Dimaline, R., Lee, C.M. et Deschodt-Lanckman, M. (1989). Degradation of human gastrin and CCK by endopeptidase 24.11: differential behaviour of the sulphated and unsulphated peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **996(1-2)**, 82-88.
- Pelham, H.R. (1996). The dynamic organisation of the secretory pathway. *Cell Struct. Funct.* **21(5)**, 413-419.
- Peters, C., Braun, M., Weber, B., Wendland, M., Schmidt, B., Pohlmann, R., Waheed, A., et von Figura, K. (1990). Targeting of a lysosomal membrane protein: a tyrosine-containing endocytosis signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase is necessary and sufficient for targeting to lysosomes. *EMBO J.* **9**, 3497-3506.

- Pierart, M.E., Najdovski, T., Appelboom, T.E., et Deschodt-Lanckman, M.M. (1988). Effect of human endopeptidase 24.11 ("enkephalinase") on IL-1-induced thymocyte proliferation activity. *J. Immunol.* **140(11)**, 3808-3811.
- Pind, S., Riordan, J.R., et Williams, D.B. (1994). Participation of the endoplasmic reticulum calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* **269**, 12784-12788.
- Pohl, T, Zimmer, M., Mugele, K., et Spiess, J. (1991). Primary structure and functional expression of a glutaminyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 10059-10063.
- Pollard, H., Bouthenet, M.L., Moreau, J., Souil, E., Verroust, P., Ronco, P. et Schwartz, J.C. (1989). Detailed immunautoradiographic mapping of enkephalinase (EC 3.4.24.11) in rat central nervous system: comparison with enkephalins and substance P. *Neuroscience* **30(2)**, 339-76.
- Pollard, H., De la Baume, S., Bouthenet, M.L., Schwartz, J.C., Ronco, P., et Verroust, P. (1987) Characterization of two probes for the localization of enkephalinase in rat brain : [³H]thiorphan and a ¹²⁵I-labelled monoclonal antibody. *Eur. J. Pharmacol.* **133**, 155-164.
- Ponnambalam, S. et Banting, G. (1996). Protein secretion : sorting sweet sorting. *Curr. Biol.* **6**, 1076-1078.
- Pozsgay, M., Michaud, C., Liebman, M. et Orłowski, M. (1986). Substrate and inhibitor studies of thermolysin-like neutral metalloendopeptidase from kidney membrane fractions. Comparison with bacterial thermolysin. *Biochemistry* **25(6)**, 1292-9.
- Quay, T., Slaughter, C., David, T.P., Merrill, B.J. et Hersh, L.B. (1994). Positional effects in the neprilysin (neutral endopeptidase) reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* **308**, 133-136.
- Raharjo, S.B., Emoto, N., Ikeda, K., Sato, R., Yokoyama, M. et Matsuo, M. (2001). Alternative splicing regulates the endoplasmic reticulum localization or secretion of soluble secreted endopeptidase. *J. Biol. Chem.* **276(27)**, 25612-25620.
- Rajagopalan, S., Xu, Y., et Brenner, M.B. (1994). Retention of unassembled components of integral membrane proteins by calnexin. *Science* **263**, 387-390.
- Ratcliffe, P.J., O'Rourke, J.F., Maxwell, P.H. et Pugh, C.W. (1998). Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J. Exp. Biol.* **201**, 1153-1162.
- Rawlings, N.D. et Barrett, A.J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* **290**, 205-218.
- Redman, C.M. et Lee, S. (1995). The Kell Blood group system. *Transfus. Clin. Biol.* **2**, 243-249.

- Rholam, M., Nicolas, P., et Cohen, P. (1986). Precursors for peptide hormones share common secondary structures forming features at the proteolytic processing sites. *FEBS Lett.* **207**, 1-6.
- Richards, A.M., Wittert, G.A., Crozier, I.G., Espiner, E.A., Yandle, T.G., Ikram, H., et Frampton, C. (1993). Chronic inhibition of endopeptidase 24.11 in essential hypertension: evidence for enhanced atrial natriuretic peptide and angiotensin II. *J. Hypertens.* **11(4)**, 407-16.
- Richards, A.M., Wittert, G., Espiner, E.A., Yandle, T.G., Frampton, C., et Ikram, H. (1991). EC 24.11 inhibition in man alters clearance of atrial natriuretic peptide. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **72**, 1317-1322.
- Richter, D., Ballanyi, K. et Ramirez, J. (1996). Respiratory rhythm generation. In *Neural Control of Respiratory Muscles*. Ed. J Dempsey, A Pack, 39-69. New York : Dekker.
- Riley, S.C., Wong, E., Findlay, J.K. et Salamonsen, L.A. (1995). Localization of neutral endopeptidase in the ovine uterus and conceptus during the oestrous cycle and early pregnancy. *Reprod. Fertil. Dev.* **7(1)**, 27-33.
- Rivas, R.J. et Moore, H.P. (1989). Spatial segregation of the regulated and constitutive secretory pathways. *J. Cell Biol.* **109(1)**, 51-60.
- Rodriguez-Boulan, E. et Powell, S.K. (1992). Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 395-427.
- Roques, B.P. (1998). Cell surface metallopeptidases involved in blood pressure regulation: structure, inhibition and clinical perspectives. *Pathol. Biol. (Paris)* **46(3)**, 191-200.
- Roques, B.P., Noble, F., Dauge, V., Fournie-Zaluski, M.C. et Beaumont, A. (1993). Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **45(1)**, 87-146.
- Rose, C., Voisin, S., Gros, C., Schwartz, J.C. et Ouimet, T. (2002). Cell-specific activity of neprilysin 2 isoforms and enzymic specificity compared with neprilysin. *Biochem. J.* **363(Pt 3)**, 697-705.
- Rothman. J.E. et Lodish, H.F. (1977). Synchronised transmembrane insertion and glycosylation of a nascent membrane protein. *Nature* **269(5631)**, 775-80.
- Rothman, J.E. et Wieland, F.T. (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**, 227-234.
- Rowe, T., Dascher, C., Bannykh, S., Plutner, H., et Balch, W.E. (1998). Role of vesicle-associated syntaxin 5 in the assembly of pre-Golgi intermediates. *Science* **279**, 696-700.

- Rump, A., Kasper, G., Hayes, C., Wen, G., Starke, H., Liehr, T., Lehmann, R., Lagemann, D., et Rosenthal, A. (2001). Complex arrangement of genes within a 220-kb region of double-duplicated DNA on human 2q37.1. *Genomics* **73**(1), 50-5.
- Russo, D., Redman, C. et Lee, S. (1998). Association of XK and kell blood group proteins. *J. Biol. Chem.* **273**(22), 13950-6.
- Russo, D., Wu, X., Redman, C.M. et Lee, S. (2000). Expression of kell blood group protein in nonerythroid tissues. *Blood* **96**(1), 340-6.
- Sabbagh, Y., Boileau, G., Desgroseillers, L. et Tenenhouse, H.S. (2001). Disease-causing missense mutations in the phex gene interfere with membrane targeting of the recombinant protein. *Hum. Mol. Genet.* **10**(15), 1539-1546.
- Sakurada, C., Yokosawa, H., et Ishii, S. (1990). The degradation of somatostatin by synaptic membrane of rat hippocampus is initiated by endopeptidase-24.11. *Peptides* **11**(2), 287-92.
- Salahpour, A., Angers, S., Mercier, J.F., Lagacé, M., Marullo, S., et Bouvier, M. (2004). Homodimerization of the β 2-Adrenergic Receptor as a Prerequisite for Cell Surface Targeting. *J. Biol. Chem.* **279**(32), 33390-33397.
- Sambrook, J. et Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sansom, C.E., Hoang, M.V., et Turner, A.J. (1998). Molecular modelling and site-directed mutagenesis of the active site of endothelin-converting enzyme. *Protein Eng.* **11**(12), 1235-41.
- Sato, K., et Nakano, A. (2002). Emp47p and its close homolog Emp46p have a tyrosine-containing endoplasmic reticulum exit signal and function in glycoprotein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **13**(7), 2518-32.
- Sato, M., Sato, K. et Nakano, A. (1996). Endoplasmic reticulum localization of Sec12p is achieved by two mechanisms: Rer1p-dependent retrieval that requires the transmembrane domain and Rer1p-independent retention that involves the cytoplasmic domain. *J. Cell Biol.* **134**, 279-293.
- Sato, K., Sato, M. et Nakano, A. (1997). Rer1p as common machinery for the endoplasmic reticulum localization of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**(18), 9693-9698.
- Sato, K., Sato, M., Nakano, A. (2003). Rer1p, a retrieval receptor for ER membrane proteins, recognizes transmembrane domains in multiple modes. *Mol. Biol. Cell* **14**(9), 3605-16.

- Sato, S., Ward, C.L., Krouse, M.E., Wine, J.J. et Kopito, R.R. (1996). Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J. Biol. Chem.* **271**, 635-638.
- Savitz, S.I., Kessler, J.A. (2000). Leukemia inhibitory factor requires concurrent p75LNTR signaling to induce apoptosis of cultured sympathetic neurons. *J. Neurosci.* **20(11)**, 4198-205.
- Scales, S.J., Pepperkok, R. et Kreis, T.E. (1997). Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell* **90(6)**, 1137-1148.
- Schäfer, W., Stroh, A., Berghöfer, S., Seiler, J., Vey, M., Kruse, M.L., Kern, H.F., Klenk, H.D., et Garten, W. (1995). Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine *trans*-Golgi Network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. *EMBO J.* **14**, 2424-2435.
- Schang, J.C., Hemond, M., Hebert, M. et Pilote, M. (1986). How does morphine work on colonic motility? An electromyographic study in the human left and sigmoid colon. *Life Sci.* **38(8)**, 671-6.
- Scheiffele, P., Peränen, J., et Simons, K. (1995). N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature* **378**, 96-98.
- Schein, C.H. (1990). Solubility as a function of protein structure and solvent components. *Biotechnology* **8(4)**, 308-317.
- Schekman, R. et Orci, L. (1996). Coat proteins and vesicle budding. *Science* **271**, 1526-1533.
- Schmidt, M., Kroger, B., Jacob, E., Seulberger, H., Subkowski, T., Otter, R., Meyer, T., Schmalzing, G. et Hillen, H. (1994). Molecular characterization of human and bovine Endothelin-converting enzyme (ECE-1). *FEBS Lett.* **356(2-3)**, 238-43.
- Schutze, M.P., Peterson, P.A., et Jackson, M.R. (1994). An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **13**, 1696-1705.
- Schweizer, A., Rohrer, J., Hauri, H.P. et Kornfeld, S. (1994). Retention of p63 in an ER-Golgi intermediate compartment depends on the presence of all three of its domains and on its ability to form oligomers. *J. Cell Biol.* **126**, 25-39.
- Schweizer, A., Valdenaire, O., Koster, A., Lang, Y., Schmitt, G., Lenz, B., Bluethmann, H. et Rohrer, J. (1999). Neonatal lethality in mice deficient in XCE, a novel member of the endothelin-converting enzyme and neutral endopeptidase family. *J. Biol. Chem.* **274(29)**, 20450-6.

- Schweizer, A., Valdenaire, O., Nelbock, P., Deuschle, U., Edwards, J.B.D.M., Stumpf, J.G. et Loffer, B.M. (1997). Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochem. J.* **328(Pt 3)**, 871–877.
- Seethaler, G., Chaminade, M., Vlasak, R., Ericsson, M., Griffiths, G., Toffoletto, O., Rossier, J., Stunnenberg, H.G., et Kreil, G. (1991). Targeting of frog prodermorphin to the regulated pathway by fusion to proenkephalin. *J. Cell Biol.* **114**, 1125-1133.
- Seidah, N.G., Day, R., Marcinkiewicz, M. et Chretien, M. (1998). Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Ann. NY Acad. Sci.* **839**, 9–24.
- Seidah, N.G., Hamelin, J., Gaspar, A.M., Day, R. et Chrétien, M. (1992). The cDNA sequence of the human pro-hormone and pro-protein convertase PC1. *DNA Cell Biol.* **11(4)**, 283-289.
- Semenza, G.L. (2001). Hypoxia-inducible factor 1 : oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol. Med.* **7**, 345-350.
- Semenza, G.L. (2000). HIF-1 : Mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J. Appl. Physiol.* **88**, 1474-1480.
- Semenza, J.C., Hardwick, K.G., Dean, N., et Pelham, H.R. (1990). ERD2, a yeast gene required for the receptor mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* **61**, 1349-1357.
- Sevier, C.S., Weisz, O.A., Davis, M. et Machamer, C.E. (2000). Efficient export of the vesicular stomatitis virus G protein from the endoplasmic reticulum requires a signal in the cytoplasmic tail that includes both tyrosine-based and di-acidic motifs. *Mol. Biol. Cell* **11**, 13-22.
- Sharp, F.R., Ran, R., Lu, A., Tang, Y., Strauss, K.I., Glass, T., Ardizzone, T. Et Bernaudin, M. (2004). Hypoxic Preconditioning Protects against Ischemic Brain Injury. *J. Am. Soc. Exp. NeuroTherapeutics* **1**, 26-35.
- Sharp, F.R., Bergeron, M. et Bernaudin, M. (2001a). Hypoxia-inducible factor in brain. *Adv. Exp. Med. Biol.* **502**, 273-291.
- Sharp, F.R., Bernaudin, M., Bartels, M. Et Wagner K.R. (2001b). Glial cell of heat shock proteins (HSPs) and oxygen-regulated proteins (ORPs). *Prog. Brain Res.* **132**, 427-440.
- Shen, R., Milowsky, M.I., Ozaki, N., Navarro, D., Sumitomo, M., Xu, Y. et Nanus, D.M. (2002). Detection of the p110 beta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase complexed with neutral endopeptidase. *Anticancer Res.* **22(5)**, 2533–2538.

- Shimada, K., Takahashi, M., Ikeda, M., et Tansawa, K. (1995). Identification and characterization of two isoforms of an endothelin-converting enzyme-1. *FEBS Lett.* **371**, 140-144.
- Shimada, K., Takahashi, M. et Tanzawa, K. (1994). Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **269(28)**, 18275-8.
- Shimada, K., Takahashi, M., Turner, A.J. et Tanzawa, K. (1996). Rat endothelin-converting enzyme-1 forms a dimer through Cys412 with a similar catalytic mechanism and a distinct substrate binding mechanism compared with neutral endopeptidase-24.11. *Biochem. J.* **315(Pt 3)**, 863-7.
- Shirotni, K., Tsubuki, S., Iwata, N., Takaki, Y., Harigaya, W., Maruyama, K., Kiryu-Seo, S., Kiyama, H., Iwata, H., Tomita, T., Iwatsubo, T. et Saido, T.C. (2001). Neprilysin degrades both amyloid beta peptides 1-40 and 1-42 most rapidly and efficiently among thiorphan- and phosphoramidon-sensitive endopeptidases. *J. Biol. Chem.* **276(24)**, 21895-21901.
- Simons, K. et Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572.
- Singer, S.J. (1990). The structure and insertion of integral preteins in membranes. *Ann. Rev. Cell Biol.* **6**, 247-296.
- Singer, S.J. et Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175(23)**, 720-731.
- Skidgel, R.A., Engelbrecht, S., Johnson, A.R. & Erdös, E.G. (1984). Hydrolysis of substance P and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides* **5(4)**, 769-776.
- Smith, J., Funk, G., Johnson, S. et Feldman, J. (1995). Cellular and synaptic mechanisms generating respiratory rhythms : insights from in vitro and computational studies. In *Ventral Brainstem Mechanisms and Control of Respiration and Blood Pressure*. Ed. C Trouth, R Millis, H Kiwull-Schone, M Schlafke, 463-496. New York : Dekker.
- Soleilhac, J.M., Lucas, E., Beaumont, A., Turcaud, S., Michel, J.B., Ficheux, D., Fournie-Zaluski, M.C. et Roques, B.P. (1992). A 94-kda protein, identified as neutral endopeptidase-24.11, can inactivate atrial natriuretic peptide in the vascular endothelium. *Mol. Pharmacol.* **41(4)**, 609-614.
- Somero, G.N. (1986). Protons, osmolytes and fitness of internal milieu for protein function. *Am. J. Physiol.* **251**, R197-R213.
- Sonnenberg, J.L., Sakane, Y., Jeng, A.Y., Koehn, J.A., Ansell, J.A., Wennogle, L.P. et Ghai, R.D. (1988). Identification of protease 3.4.24.11 as the major atrial natriuretic factor degrading enzyme in the rat kidney. *Peptides* **9(1)**, 173-80.

- Stahl, L.E., Wright, R.L., Castle, J.D., et Castle, A.M. (1996). The unique proline-rich domain of parotid proline-rich proteins functions in secretory sorting. *J. Cell Sci.* **109**, 1637-1645.
- Steiner, D.F. (1998). The proprotein convertases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 31-39.
- Stephenson, S.L. et Kenny, A.J. (1987). The hydrolysis of alpha-human atrial natriuretic peptide by pig kidney microvillar membranes is initiated by endopeptidase-24.11. *Biochem. J.* **243(1)**, 183-187.
- Stockklauser, C., Ludwig, J., Ruppertsberg, J.P. et Klocker, N. (2001). A sequence motif responsible for ER export and surface expression of Kir2.0 inward rectifier K(+) channels. *FEBS Lett.* **493(2-3)**, 129-133.
- Stroh, A., Schafer, W., Berghofer, S., Eickmann, M., Teuchert, M., Burger, I., Klenk, H.D. et Garten, W. (1999). A mono phenylalanine-based motif (F790) and a leucine-dependent motif (LI760) mediate internalization of furin. *Eur. J. Cell Biol.* **78(3)**, 151-160.
- Sumitomo, M., Shen, R., Walburg, M., Dai, J., Geng, Y., Navarro, D., Boileau, G., Papandreou, C.N., Giancotti, F.G., Knudsen, B. et Nanus, D.M. (2000). Neutral endopeptidase inhibits prostate cancer cell migration by blocking focal adhesion kinase signaling. *J. Clin. Invest.* **106(11)**, 1399-1407.
- Sunday, M.E., Hua, J., Torday, J.S., Reyes, B. et Shipp, M.A. (1992). CD10/neutral endopeptidase 24.11 in developing human fetal lung. patterns of expression and modulation of peptide-mediated proliferation. *J. Clin. Invest.* **90(6)**, 2517-25.
- Szczesna-Skorupa, E., Ahn, K., Chen, C.D., Doray, B. et Kemper, B. (1995). The cytoplasmic and N-terminal transmembrane domains of cytochrome P450 contain independent signals for retention in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **270(41)**, 24327-24333.
- Takahashi, M., Matsushita, Y., Iijima, Y. et Tanzawa, K. (1993). Purification and characterization of endothelin-converting enzyme from rat lung. *J. Biol. Chem.* **268(28)**, 21394-8.
- Takahashi, S., Nakagawa, T., Banno, T., Watanabe, T., Murakami, K., et Nakayama, K. (1995). Localization of furin to the *trans*-Golgi Network and recycling from the cell surface involves Ser and Tyr residues within the cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* **270**, 28397-28401.
- Takaki, Y., Iwata, N., Tsubuki, S., Taniguchi, S., Toyoshima, S., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Lee, H.J., Shirotani, K. et Saido, T.C. (2000). Biochemical identification of the neutral endopeptidase family member responsible for the catabolism of amyloid beta peptide in the brain. *J. Biochem.* **128(6)**, 897-902.

- Tam, L.T., Engelbrecht, S., Talent, J.M., Gracy, R.W. et Erdös, E.G. (1985). The importance of disulfide bridges in human endopeptidase (enkephalinase) after proteolytic cleavage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **133(3)**, 1187–92.
- Tanabe, K., Nakagomi, S., Kiryu-Seo, S., Namikawa, K., Imai, Y., Ochi, T., Tohyama, M. et Kiyama, H. (1999). Expressed-sequence-tag approach to identify differentially expressed genes following peripheral nerve axotomy. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **64(1)**, 34–40.
- Tang, B.L., Low, S.H. et Hong, W. (1997). Endoplasmic reticulum retention mediated by the transmembrane domain of type II membrane proteins Sec12p and glucosidase 1. *Eur. J. Cell Biol.* **73**, 98–104.
- Tang, B.L., Wong, S.H., Qi, X.L., Low, S.H., et Hong, W. (1993). Molecular cloning, characterization subcellular localization and dynamics of p23, the mammalian KDEL receptor. *J. Cell Biol.* **120**, 325–328.
- Teasdale, R.D. et Jackson, M.R. (1996). Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **12**, 27–54.
- Tenenhouse, H.S. (1999). X-linked hypophosphataemia: a homologous disorder in humans and mice. *Nephrol. Dial. Transplant.* **14(2)**, 333–41.
- The Hyp Consortium (1995). A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with x-linked hypophosphatemic rickets. *Nat. Genet.* **11(2)**, 130–6.
- Thomas, P.J., Qu, B.H. et Pedersen, P.L. (1995). Defective protein folding as a basis of human disease. *TIBS* **20**, 456–459.
- Thompson, D.L., Sabbagh, Y., Tenenhouse, H.S., Roche, P.C., Drezner, M.K., Salisbury, J.L., Grande, J.P., Poeschla, E.M. et Kumar, R. (2002). Ontogeny of phex/phex protein expression in mouse embryo and subcellular localization in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* **17(2)**, 311–320.
- Tokieda, K., Whitsett, J.A., Clark, J.C., Weaver, T.E., Ikeda, K., McConnell, K.B., Jobe, A.H., Ikegami, M. et Iwamoto, H.S. (1997). Pulmonary dysfunction in neonatal SP-B-deficient mice. *Am. J. Physiol.* **273(4 Pt 1)**, L875–L882.
- Trowbridge, I.S. (1991). Endocytosis and signals for internalization. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 634–641.
- Trowbridge, I.S., Collawn, J.F., et Hopkins, C.R. (1993). Signal-dependant membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 129–161.
- Tsurumi, Y., Fujie, K., Nishikawa, M., Kiyoto, S. et Okuhara, M. (1995). Biological and pharmacological properties of highly selective new endothelin converting enzyme

- inhibitor WS79089B isolated from *Streptosporangium roseum* No. 79089. *J. Antibiot.* **48(2)**, 169-174.
- Turner, A.J. (1987). Endopeptidases-24.11 and neuropeptide metabolism. In *Neuropeptides and their peptidases*, Ed AJ Turner, 183-201. Ellis-Horwood, Chichester.
- Turner, A.J. (1997). Endothelin-converting enzymes. In *Cell-Surface Peptidases in Health and Disease* (Kenny, A. J. and Boustead, C. M., eds.), pp. 137-153, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford
- Turner, A.J., Barnes, K., Schweizer, A. et Valdenaire, O. (1998). Isoforms of endothelin-converting enzyme: why and where? *Trends Pharmacol. Sci.* **19(12)**, 483-6.
- Turner, A.J., Brown, C.D., Carson, J.A. et Barnes, K. (2000). The neprilysin family in health and disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **477**, 229-40.
- Turner, A.J. et Hooper, N.M. (2002). The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* **23(4)**, 177-183.
- Turner, A.J., Isaac, R.E. et Coates, D. (2001). The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: Genomics and function. *Bioessays* **23(3)**, 261-9.
- Turner, A.J., Matsas, R. et Kenny, A.J. (1985). Are there neuropeptide-specific peptidases? *Biochem. Pharmacol.* **34(9)**, 1347-56.
- Turner, A.J. et Murphy, L.J. (1996). Molecular pharmacology of endothelin-converting enzymes. *Biochem. Pharmacol.* **51(2)**, 91-102.
- Turner, A.J. et Tanzawa, K. (1997). Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, Kell, and Pex. *Faseb J.* **11(5)**, 355-64.
- Vaishnav, A.K., Mitchell, T.J., Rose, S.J., Walport, M.J. et Morley, B.J. (1998). Regulation of transcription of the TATA-less human complement component C4 gene. *J. Immunol.* **160**, 4353-4360.
- Valdenaire, O., Lepailleur-Enouf, D., Egidy, G., Thouard, A., Barret, A., Vranckx, R., Tougard, C. et Michel, J.B. (1999). A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization. *Eur. J. Biochem.* **264(2)**, 341-349.
- Valdenaire, O., Richards, J.G., Faull, R.L. et Schweizer, A. (1999). XCE, a new member of the endothelin-converting enzyme and neutral endopeptidase family, is preferentially expressed in the CNS. *Mol. Brain Res.* **64(2)**, 211-21.
- Valdenaire, O., Rohrbacher, E. et Mattei, M.G. (1995). Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1). *J. Biol. Chem.* **270(50)**, 29794-8.

- Valdenaire, O. et Schweizer, A. (2000). Endothelin-converting enzyme-like 1 (ECE1; 'XCE'): a putative metallopeptidase crucially involved in the nervous control of respiration. *Biochem. Soc. Trans.* **28(4)**, 426–30.
- Vallee, B.L. et Falchuk, K.H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* **73**, 79-118.
- Vaux, D., Tooze, J., et Fuller, S. (1990). Identification by anti-idiotypic antibodies of an intracellular membrane protein that recognizes a mammalian endoplasmic reticulum retention signal. *Nature* **345**, 495-502.
- Vijayaraghavan, J., Scicli, A.G., Carretero, O.A., Slaughter, C., Moomaw, C. et Hersh, L.B. (1990). The hydrolysis of endothelins by neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase). *J. Biol. Chem.* **265(24)**, 14150–14155.
- Vlahovic, P. et Stefanovic, V. (1998). Kidney ectopeptidases. structure, functions and clinical significance. *Pathol. Biol.* **46(10)**, 779–786.
- Vogel, Z. et Alstein, M. (1979). The effect of puromycin on the biological activity of Leu-enkephalin. *FEBS Lett.* **98**, 44-48.
- von Figura, K. (1991). Molecular recognition and targeting of lysosomal proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 642-646.
- von Heijne, G. (1984). How signal sequences maintain cleavage specificity. *J. Mol. Biol.* **173**, 243-251.
- von Heijne, G. (1990). Protein targeting signals. *Curr. Op. Cell. Biol.* **2**, 604-608.
- von Heijne, G. et Gavel, Y. (1988). Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* **174**, 671-678.
- Voorhees, P., Deignan, E., van Donselaar, E., Humphrey, J., Marks, M.S., Peters, P.J., et Bonifacino, J.S. (1995). An acidic sequence within the cytoplasmic domain of furin functions as a determinant of *trans*-Golgi Network localization and internalization from the cell surface. *EMBO J.* **14**, 4961-4975.
- Wada, I., Rindress, D., Cameron, P.H., Ou, W.J., Doherty, II, J.J., Louvard, D., Bell, A.W., Dignard, D., Thomas, D.Y. et Bergeron, J.J. (1991). SSR α and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* **266**, 19599–19610.
- Waksman, G., Hamel, E., Bouboutou, R., Besselievre, R., Fournie-Zaluski, M.C. et Roques, B.P. (1984). Regional distribution of enkephalinase in the rat brain by autoradiography. *C R Acad Sci III* **299(14)**, 613–5.

- Waksman, G., Hamel, E., Delay-Goyet, P. et Roques, B.P. (1986). Neuronal localization of the neutral endopeptidase 'enkephalinase' in rat brain revealed by lesions and Autoradiography. *Embo J.* **5(12)**, 3163–6.
- Waksman, G., Hamel, E., Delay-Goyet, P. et Roques, B.P. (1987). Neutral endopeptidase-24.11, mu and delta opioid receptors after selective brain lesions: an autoradiographic study. *Brain Res.* **436(2)**, 205–216.
- Waksman, G., Hamel, E., Fournie-Zaluski, M.C., et Roques, B.P. (1986). Autoradiographic comparison of the distribution of the neutral endopeptidase «enkephalinase» and mu and delta opioid receptors in the rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 1523-1527.
- Wang, G.L. et Semenza, G.L. (1993). General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90(9)**, 4304-4308.
- Wang, G.L. et Semenza, G.L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **270**, 1230-1237.
- Wang, J.M., Zhang, L., Yao, Y., Viroonchatapan, N., Rothe, E. et Wang, Z.Z. (2002). A transmembrane motif governs the surface trafficking of nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Neurosci.* **5**, 963–970.
- Ward, C.L. and Kopito, R.R. (1994). Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J. Biol. Chem.* **269**, 25710–25718.
- Ward, T.H., Polishchuk, R.S., Caplan, S., Hirschberg, K. et Lippincott-Schwartz, J. (2001). Maintenance of Golgi structure and function depends on the integrity of ER export. *J. Cell Biol.* **155(4)**, 557-70.
- Welch, W.J. et Brown, C.R. (1996). Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chap.* **1(2)**, 109-115.
- Wickner, S., Maurizi, M.R. et Gottesman, S. (1999). Posttranslational quality control : folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**, 1888-1893.
- Wilcox, J.N., Pollard, H., Moreau, J., Schwartz, J.C., et Malfroy, B. (1989). Localization on enkephalin mRNA in rat brain by *in situ* hybridization : comparison with immunohistochemical localization of the protein. *Neuropeptides* **14**, 77-83.
- Wileman, T., Carson, G.R., Shih, F.F., Concino, M.F. et Terhorst, C. (1990). The transmembrane anchor of the T-cell antigen receptor beta chain contains a structural determinant of pre-Golgi proteolysis. *Cell Regul.* **1(12)**, 907-919.
- Wilkins, M.R. (1993). Clinical potential of endopeptidase-24.11 inhibitors in cardiovascular disease. *Biochem. Soc. Trans.* **21 (Pt 3)(3)**, 673–678.

- Wilkins, M.R., Unwin, R.J. et Kenny, A.J. (1993). Endopeptidase-24.11 and its inhibitors: potential therapeutic agents for edematous disorders and hypertension. *Kidney Int.* **43(2)**, 273–85.
- Xi, L., Taher, M., Yin, C., Salloum, F. et Kukreja, R.C. (2004). Cobalt Chloride Induces Delayed Cardiac Preconditioning in Mice Through Selective Activation of HIF-1{alpha}/AP-1 and iNOS Signaling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **Jul 29** [Epub ahead of print].
- Xu, D., Emoto, N., Giaid, A., Slaughter, C., Kaw, S., deWit, D. et Yanagisawa, M. (1994). ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* **78(3)**, 473–85.
- Yamada, M. (2000). Cerebral amyloid angiopathy: an overview. *Neuropathology.* **20(1)**, 8–22.
- Yamada, M., Sodeyama, N., Itoh, Y., Takahashi, A., Otomo, E., Matsushita, M. et Mizusawa, H. (2003). Association of neprilysin polymorphism with cerebral amyloid angiopathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **74(6)**, 749–751.
- Yamada, M., Tsukagoshi, H., Otomo, E. & Hayakawa, M. (1987). Cerebral amyloid angiopathy in the aged. *J. Neurol.* **234(6)**, 371–376.
- Yamaguchi, T., Fukase, M., Arao, M., Sugimoto, T. et Chihara, K. (1992). Endothelin 1 hydrolysis by rat kidney membranes. *FEBS Lett.* **309(3)**, 303–306.
- Yanagisawa, H., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Emoto, N., Williams, S.C., Takeda, S., Clouthier, D.E. et Yanagisawa, M. (2000). Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. *J. Clin. Invest.* **105(10)**, 1373–1382.
- Yanagisawa, H., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Williams, S.C., Clouthier, D.E. et Yanagisawa, M. (1998). Role of endothelin-1/endothelin-a receptor-mediated signaling pathway in the aortic arch patterning in mice. *J. Clin. Invest.* **102(1)**, 22–33.
- Yanagisawa, H., Yanagisawa, M., Kapur, R.P., Richardson, J.A., Williams, S.C., Clouthier, D.E., de Wit, D., Emoto, N. et Hammer, R.E. (1998). Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin-converting enzyme-1 gene. *Development* **125(5)**, 825–36.
- Yang, Y., Janich, S., Cohn, J.A., et Wilson, J.M. (1993). The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by Hsp70 and degraded in a pre-golgi non-lysosomal compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 9480–9484.

- Yang, X.F., Fourier, H., Dion, N., Crine, P. et Boileau, G. (1994). Site-directed mutagenesis and transfection methods in the study of prohormone processing. *Neuroprotocols* **5**, 157–168.
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R. *et coll.* (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* **6**, 1355-1364.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., et Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**, 881-891.
- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K. *et coll.* (1998). ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol. Cell Biol.* **20**, 6755-6767.
- Zappulla, J.P. et Desgroseillers, L. (2001). Neutral endopeptidase is expressed on the follicular granulosa cells of rabbit ovaries. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **129(4)**, 863–870.

