

Université de Montréal

Etude du trafic intracellulaire de protéines membranaires de la famille de la néprilysine

Par

Françoise Cailler

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

Février 1999

© Françoise Cailler, 1999



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Etude du trafic intracellulaire de protéines membranaires de la famille de la néprilysine

présentée par:
Françoise Cailler

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Pr. Ivan.R. NABI - Université de Montréal – Président du Jury, représentant du Doyen.

Pr. Philippe CRINE – Université de Montréal – Directeur de Recherche.

Pr. Luis ROCKEACH – Université de Montréal – membre du jury

Pr. Jean-Marie FRANCOIS – Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse
(DGBA) – Examineur externe.

Thèse acceptée le: 18 Juin 1999.

SOMMAIRE

La néprilysine (E.C.3.4.24.11, endopeptidase neutre, NEP) est une protéine membranaire de type II, abondante dans la bordure en brosse du rein, qui a souvent été utilisée comme modèle pour l'étude du ciblage des protéines dans les cellules polarisées. Dans ce travail, nous avons construit diverses formes chimériques de la NEP pour étudier les déterminants moléculaires du ciblage entre le réseau *trans*-Golgi (RTG) et la surface cellulaire, dans les cellules épithéliales polarisées de la lignée Madin-Darby Canine Kidney (MDCK).

Au cours de nos travaux, nous nous sommes particulièrement attachés à étudier l'effet de l'addition d'un glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) sur l'incorporation des protéines dans les "glycolipid rafts". Ces structures, riches en glycosphingolipides et en cholestérol, peuvent être isolées des homogénats de cellules polarisées en mettant à profit leur insolubilité dans le Triton X-100 à 4°C. Dans ce but, nous avons utilisé diverses formes chimériques de la NEP disponibles dans notre laboratoire. La NEP de type sauvage (WT-NEP) est une protéine membranaire de type II. La GPI-NEP est constituée du domaine extracellulaire de la NEP ancré à la membrane plasmique par un GPI ajouté à son extrémité C-terminale. La forme à double ancrage (DA-NEP) contient à la fois une ancre GPI en C-terminal et l'ancre peptidique de la NEP de type sauvage en N-terminal.

Nous avons pu montrer que la DA-NEP, comme la GPI-NEP, s'associe aux "glycolipid rafts" au niveau du Golgi, alors que la WT-NEP reste soluble dans le Triton X-100 à 4°C tout au long de son transport le long de la voie vacuolaire centrale. Il

semble donc que le signal porté par l'ancre GPI soit dominant sur celui présent dans la WT-NEP pour le choix d'une vésicule de transport entre le Golgi et la membrane apicale des cellules MDCK.

La deuxième partie de nos travaux concerne l'étude du mécanisme de rétention intracellulaire de l'isoforme -1b de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE-1). Cette protéine membranaire de type II est responsable de la maturation de la "big endothéline-1" en endothéline-1. C'est une métallopeptidase à zinc dont la séquence partage 45% d'identité avec celle de la WT-NEP. Elle existe sous trois isoformes (ECE-1a, -1b, et -1c) qui diffèrent uniquement par la nature de leur domaine intracellulaire N-terminal. Seule l'ECE-1b est retrouvée dans un compartiment intracellulaire alors que les isoformes -1a et -1c se retrouvent à la surface cellulaire. Le fait que l'isoforme -1b corresponde à l'isoforme -1c rallongée d'une séquence additionnelle de 17 acides aminés N-terminaux suggère que cette séquence contient un signal responsable de la rétention intracellulaire de la protéine.

Les similarités de structure qui existent entre l'ECE et la NEP, et la disponibilité des outils immunologiques pour la NEP dans le laboratoire, nous ont poussé à réaliser différentes constructions de chimères ECE/NEP. Nous avons pu observer au microscope confocal à fluorescence la localisation intracellulaire d'une chimère comprenant les 17 acides aminés N-terminaux de ECE-1b fusionnés à la NEP de type sauvage. Cette localisation a ensuite été confirmée par des expériences d'immunoprécipitation de surface. Ceci nous a permis de conclure que cette portion de l'ECE-1b contenait au moins un signal de rétention intracellulaire, et que ce signal était suffisant pour

provoquer l'internalisation d'une autre protéine sur laquelle il était greffé. La diminution du taux de rétention intracellulaire subséquente à la mutation des résidus Leu¹² et Leu¹³ en Ala dans la chimère ECE/NEP nous a ensuite permis d'identifier ces deux résidus comme faisant partie intégrante du signal de localisation intracellulaire de l'ECE-1b. Ces résultats suggèrent qu'un signal de type di-Leu, de même nature que ceux couramment décrits dans la voie de transport endosomal, serait responsable de l'internalisation de l'ECE-1b.

TABLE DES MATIERES

Sommaire.....	iii
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xiv
Dédicace.....	xv

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION 1

1.1 - TRANSPORT DES PROTÉINES MEMBRANAIRES LE LONG DE LA VOIE VACUOLAIRE CENTRALE ET DE LA VOIE D'ENDOCYTOSE DANS LES CELLULES EUCARYOTES 2

1.1.1 - Biosynthèse des protéines membranaires.....3

1.1.1.1 - Protéines intégrales membranaires 3

1.1.1.2 - Protéines à ancrage GPI..... 5

1.1.1.3 - Protéines à double-ancrage 8

1.1.2 - Transport RE - Golgi..... 8

1.1.2.1- Bourgeonnement des vésicules 9

1.1.2.2 - Attachement et fusion des vésicules 9

1.1.3 - Transport intra-Golgi.....12

1.1.3.1 - Transport vésiculaire.....12

1.1.3.2 - Modèle de maturation ou progression de saccules13

1.1.4 - Transport post-Golgi	16
1.1.4.1 - Modèle des cellules épithéliales polarisées - la lignée cellulaire MDCK	18
1.1.4.2 - Transport basolatéral	19
1.1.4.3 - Transport apical	21
1.1.5 - Endocytose	25
1.1.5.1 - Transport via les vésicules recouvertes de clathrine	25
1.1.5.1.1 - Formation des vésicules recouvertes de clathrine	25
1.1.5.1.2 - Tri protéique au niveau des endosomes	28
• <i>Pendant le processus d'endocytose</i>	28
• <i>Cas particulier de la transcytose</i>	29
1.1.5.2 - Endocytose indépendante de la clathrine: macropinocytose, caveolae	30
1.1.5.3 - Phagocytose	32
1.2 - SIGNAUX DE CIBLAGE PROTEIQUE DANS LES CELLULES EPITHELIALES POLARISEES ET DANS LES FIBROBLASTES	33
<u>1.2.1 - Signaux de ciblage apical - cas particulier de l'ancrage GPI</u>	33
1.2.1.1 - Différents signaux de ciblage apical	33
1.2.1.2 - Rôle de l'ancrage GPI à la surface cellulaire	37
1.2.1.3 - Rôle de l'ancrage GPI dans la voie d'endocytose via les VRCs	39
<u>1.2.2 - Signal Tyr et signal di-Leu</u>	39
1.2.2.1 - Signal Tyr	40
1.2.2.2 - Signal di-Leu	41
1.2.2.3 - Interaction avec les protéines adaptateur	41

<u>1.2.3 - Relation entre les signaux de transport basolatéral et d'endocytose.....</u>	45
1.3 - ENDOPEPTIDASE NEUTRE ET ENZYME DE CONVERSION DE L'ENDOTHELINE	47
<u>1.3.1 - Endopeptidase Neutre ou NEP.....</u>	47
<u>1.3.2 - Enzyme de conversion de l'endothéline ou ECE.....</u>	50
1.4 - OBJECTIFS DU PRÉSENT TRAVAIL ET STRATÉGIES DÉVELOPPÉES.....	52
<u>1.4.1 - Rôle de l'ancrage GPI dans le choix d'une voie de transport entre le RTG et la surface cellulaire.....</u>	53
<u>1.4.2 - Identification du signal de rétention intracellulaire de ECE-1b</u>	<u>56</u>
<u>CHAPITRE 2 - PREMIER ARTICLE</u>	58
Abstract.....	60
Introduction.....	60
Experimental procedures.....	61
Results.....	63
Discussion.....	66
Acknowledgements.....	67
References.....	67

<u>CHAPITRE 3 - SECOND ARTICLE</u>	69
Synopsis	72
Introduction	73
Materials and Methods	77
Results	82
Discussion	88
Acknowledgements	92
References	93
Figure Legends	97
Figures	100
<u>CHAPITRE 4 - DISCUSSION</u>	107
4.1 - INFLUENCE DE L'ADDITION D'UNE ANCRE GPI SUR LE TRANSPORT DE LA NEP.	108
4.2 - IDENTIFICATION D'UN SIGNAL DI-LEUCINE PARTICIPANT A LA RETENTION INTRACELLULAIRE DE L'ECE-1b.	118
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	127

LISTE DES TABLEAUX

	Page
CHAPITRE I	
Tableau I : signaux d'internalisation	42

LISTE DES FIGURES

	Page
 CHAPITRE 1	
Figure 1 : Classification des protéines intégrales membranaires selon leur mode d'insertion dans la membrane plasmique.	4
Figure 2 : Structure de l'ancrage glycosyl-phosphatidylinositol.	6
Figure 3 : Transport vésiculaire contre maturation des cisternae du Golgi.	14
Figure 4 : Schéma de synthèse des principales voies de transport post-Golgi.	17
Figure 5 : Voies de transport apicale et basolatérale dans différents types cellulaires.	20
Figure 6 : Organisation des lipides des "glycolipid rafts".	23
Figure 7 : Modèle des complexes AP-1, AP-2 et AP-3.	27
Figure 8 : Représentation schématique des diverses formes de l'endopeptidase neutre.	49
Figure 9 : Structures primaires de l'endopeptidase neutre et de l'enzyme de conversion de l'endothéline.	51
 CHAPITRE 2	
Figure 1 : Localization of transfected NEP in MDCK cells : vertical optical sections.	62
Figure 2 : Kinetics of passage through the Golgi apparatus of WT-NEP, GPI-NEP and DA-NEP.	63
Figure 3 : NEP cell-surface immunoprecipitation.	64

Figure 4 : Distribution of WT-NEP, GPI-NEP and DA-NEP on sucrose density gradients at steady state.	64
Figure 5 : Sucrose density gradient analysis of WT-NEP and DA-NEP after a 15 min pulse.	65
Figure 6 : Sucrose density gradient analysis of WT-NEP and DA-NEP after a 90 min chase at 20 or 37°C.	65
Figure 7 : Localization of GPI-NEP on a sucrose gradient after a 90 min chase at 37°C.	66
 CHAPITRE 3	
Figure 1 : Schematic representation of the different ECE/NEP chimeras.	100
Figure 2 : Expression of the different chimeras in MDCK cells.	101
Figure 3 : Intracellular localisation of ECE/NEP and ECE(1-17)/NEP.	102
Figure 4 : Cell surface immunoprecipitation of ECE/NEP and ECE(1-17)/NEP.	103
Figure 5 : Intracellular localisation of the ECE(1-17)/NEP mutants.	104
Figure 6 : Cell surface immunoprecipitation of Ala ^{12/13} -ECE(1-17)/NEP.	105
Figure 7 : Ala ²¹ -ECE/NEP localisation.	106

LISTE DES ABREVIATIONS

CHO : Chinese Hamster Ovary

DIG : detergent-insoluble glycolipid-enriched - insoluble dans le détergent et enrichi en glycolipides

EGFR : epidermal growth factor receptor

Endo H : endo- β -N-acetyl-glucosaminidase H

EP : endosome précoce

ET : endosome tardif

GDP : guanosine di-phosphate

GPI : glycosyl-phosphatidylinositol

GSL : glycosphingolipides

GTP : guanosine tri-phosphate

HA : haemagglutinine du virus influenza

MDCK : Madin-Darby Canine Kidney

NEP : endopeptidase neutre

NEP : endopeptidase neutre

NSF : N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein

PC : phosphatidylcholine

RE : réticulum endoplasmique

RER : réticulum endoplasmique rugueux

RTG : réseau *trans*-Golgi

SNAP : soluble NSF attachment protein

TX-100 : Triton X-100

VR : vésicule de recyclage

VRC : vésicule recouverte de clathrine

VSV G : protéine G du virus vesicular stomatitis

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de recherche, le Dr. Philippe Crine, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et soutenue tout au long de la réalisation de mes travaux. Qu'il soit remercié ici pour la patience dont il a su faire preuve et les encouragements qu'il m'a toujours prodigués. Mes remerciements les plus sincères vont également à l'équipe enseignante de l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, en particulier aux Professeurs Gérard Goma et Jean-Marie François, pour leur confiance et leur soutien.

J'aimerais aussi remercier ici les Drs. Guy Boileau et Luc Desgroseillers, ainsi que le Dr. I. Robert Nabi, pour les innombrables conseils qu'ils m'ont prodigués au cours de ces quatre dernières années, et les idées qu'ils ont bien voulu me faire partager.

Je remercie également mes nombreux collègues de travail pour leur support scientifique, technique et moral. Steven Howell, Louise Cournoyer et Line Lespérance ne sont que quelques unes de ces personnes, dont je tiens à souligner l'importance. Un merci spécial à Guillaume Lesage, dont l'amitié, la patience et l'humour m'ont permis de garder confiance.

Enfin, je remercie ma famille, et tout particulièrement mes parents et ma soeur Hélène, qui m'ont encouragée et soutenue, et qui ont toujours cru en moi. Sans eux j'aurais à maintes occasions risqué de tout abandonner. L'assentiment et les encouragements de Jean-Pierre et Alain m'ont également toujours été fort précieux.

Les remerciements sont bien peu de choses pour exprimer ma reconnaissance à Jacques, pour sa patience, ses encouragements perpétuels...et pour tout le reste.

*A mes parents,
Pierre et Renée Cailler.*

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION

1.1 - TRANSPORT DES PROTÉINES MEMBRANAIRES LE LONG DE LA VOIE VACUOLAIRE CENTRALE ET DE LA VOIE D'ENDOCYTOSE DANS LES CELLULES EUCARYOTES

Les protéines qui transitent le long de la voie vacuolaire centrale sont transportées de leur lieu de synthèse, le réticulum endoplasmique rugueux (RER), vers l'appareil de Golgi, puis d'une saccule du Golgi à la suivante jusqu'au Réseau Trans Golgi (RTG). Elles sont ensuite dirigées vers la membrane plasmique, ou distribuées à divers organites tels que les lysosomes. Tout au long de ce transport, des vésicules bourgeonnent du compartiment donneur et fusionnent de façon spécifique avec la membrane cible. La voie d'endocytose, par contre, permet le transport des protéines de la surface cellulaire vers les endosomes précoces et tardifs, puis les lysosomes.

Dans la majorité des modèles proposés à ce jour, le transport entre le RER et le RTG est non sélectif, et met en jeu des vésicules recouvertes d'un manteau protéique. Le RTG est considéré comme le siège du tri protéique de la cellule eucaryote. Deux voies principales en sortent : la voie constitutive permet le ciblage des protéines vers la surface cellulaire, les voies apicale et basolatérale des cellules polarisées en étant considérées comme deux variantes. La voie régulée dirige les protéines vers des granules de sécrétion (Tooze, 1998) ou vers le système endosomal.

Nous nous intéresserons ici tout particulièrement aux phénomènes de transport et de ciblage des protéines membranaires.

1.1.1 - Biosynthèse des protéines membranaires

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 formeront un canal transmembranaire après assemblage. 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'ancrage 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 (Figure 1).

1.1.1.1 - Protéines intégrales membranaires

La plupart des protéines membranaires destinées à être intégrées à la membrane des divers compartiments cellulaires, ou à la membrane plasmique, sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique rugueux. C'est dans ce compartiment qu'elles acquièrent leur topologie particulière. Le ciblage initial des protéines transmembranaires -ou sécrétées- vers le RER nécessite la présence d'un "signal d'initiation de transfert", situé en N-terminal de la protéine. Dans le cas d'une protéine sécrétée, cette séquence polypeptidique sera clivée par une peptidase signal après que l'extrémité C-terminale de la protéine aura traversé la membrane du RER. La protéine est ainsi relarguée dans la

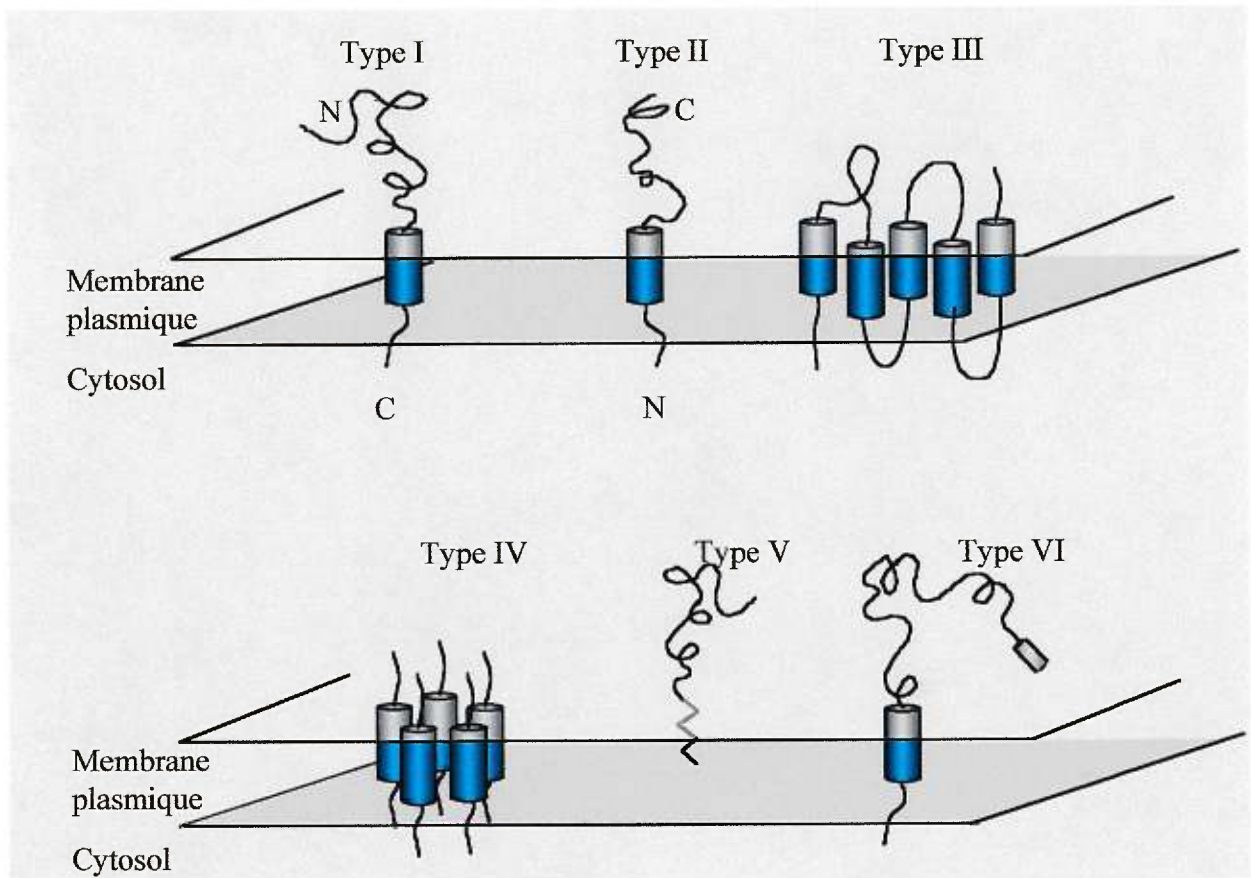


Figure 1 : Classification des protéines intégrales membranaires selon leur mode d'insertion dans la membrane plasmique.

D'après Howell, S. et Crine, P. (1996). Type VI membrane proteins? Trends Biochem. Sci. 21, 171-172.

lumière du réticulum. Dans le cas des protéines intrinsèques à un seul passage transmembranaire, un signal hydrophobe additionnel arrête le transfert avant que la chaîne polypeptidique ne soit transloquée dans son entier à l'intérieur du RER. La situation particulière de cette séquence hydrophobe sur la chaîne polypeptidique déterminera l'orientation de la protéine par rapport à la membrane du réticulum. En ce qui concerne les protéines à plusieurs passages transmembranaires, l'ordre des signaux d'initiation et d'arrêt de transfert successifs sera responsable de l'orientation du polypeptide final dans la membrane du RER.

1.1.1.2 - Protéines à ancrage GPI

De nombreuses protéines possèdent une ancre glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) comme seul moyen d'insertion dans la membrane. Cette structure, attachée en C-terminal de nombreuses protéines, comprend un oligoglycane complexe lié à un phosphatidylinositol, lui-même inséré dans la bicouche lipidique.

L'association covalente entre un GPI et une protéine a été mise en évidence par les travaux de Low et coll. (1986). Depuis, plus d'une centaine de protéines GPI ont été décrites dans des organismes allant des protozoaires aux mammifères. La structure complète de l'ancrage GPI a pour la première fois été déterminée sur une protéine de trypanosome, VSG (pour "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. Celle-ci assure la liaison avec le cycle inositol du phosphatidylinositol inséré dans la bicouche lipidique grâce au caractère hydrophobe des chaînes aliphatiques du diacylglycérol (Figure 2). Une

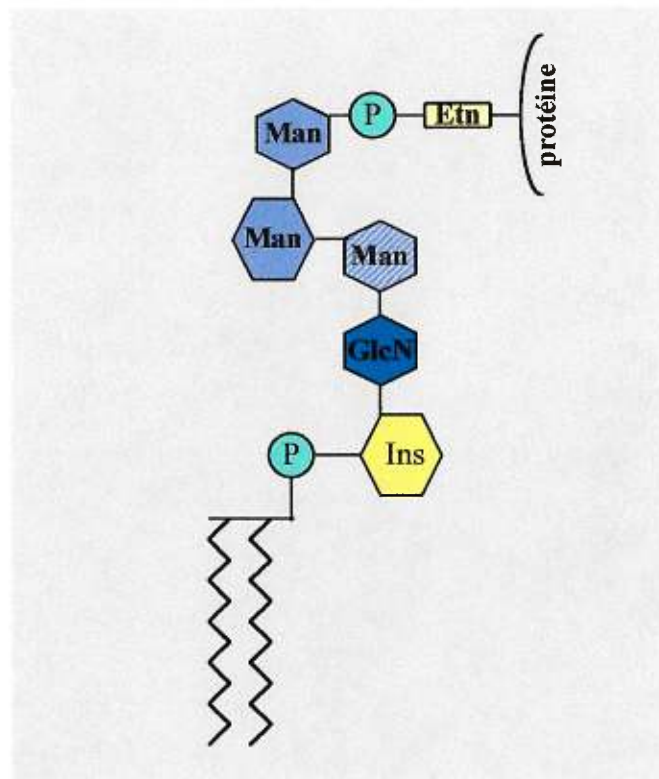


Figure 2 : Structure de l'ancrage glycosyl-phosphatidylinositol.

P, phosphate; Ins, inositol; GlcN, galactosamine; Man, mannose; Etn, éthanolamine.

Représentation schématique de la partie conservée de l'ancrage GPI. La diversité réside au niveau de la portion lipidique et de l'ajout d'un résidu éthanolamine et/ou de différentes combinaisons de chaînes latérales de résidus galactose sur un résidu mannose (hachuré) de la structure consensus.

D'après Stevens, V.L. (1995). Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Biochem. J.* 310, 361-370.

grande hétérogénéité existe cependant dans la structure de l'ancre d'une espèce à l'autre. La chaîne de sucres peut comporter des résidus mannose et/ou galactose additionnels, ainsi qu'une phosphoéthanolamine additionnelle. Le cycle inositol est parfois acylé, et les chaînes aliphatiques du diacylglycérol inséré dans la membrane sont de longueur et de degré de saturation variables (Stevens, 1995; Nosjean *et coll.*, 1997).

La synthèse du GPI est un processus multi-enzymatique qui débute sur la face cytoplasmique du RE (Vidugiriene et Menon, 1994) et se termine sur sa face luminale, suite à un mécanisme de "flip-flop" (Ferguson et Williams, 1988; Stevens, 1995). L'addition de l'ancre GPI préformée sur une protéine se fait en une étape, probablement suite à l'action d'une transamidase, et de façon rapide (environ une minute après la fin de la traduction de la chaîne polypeptidique (Bangs *et coll.*, 1985; Ferguson *et coll.*, 1986). La protéine naissante contient un signal N-terminal qui dirige son insertion dans la lumière du RE, et un signal C-terminal qui conditionne l'ajout de l'ancrage. On obtient ainsi une protéine dont la topologie se rapproche de celle des protéines transmembranaires de type I : ancrage GPI C-terminal inséré dans la membrane, et ectodomaine N-terminal dans la lumière du RE. Le signal C-terminal d'addition de l'ancre 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 et la nature de l'acide aminé situé après le site de clivage déterminent l'ajout du GPI (Low, 1989; Englund, 1993) : le résidu auquel l'ancre est ajouté est toujours un petit acide aminé (Gly, Asn, Ala, Ser, Cys). De plus, les deux résidus en amont du site de clivage/d'addition de l'ancre ont généralement des chaînes latérales de petite taille.

1.1.1.3 - Protéines à double-ancrage

Stahl et coll. (1990) ont montré que la protéine du prion, sous sa forme native comme sous sa forme infectieuse, semblait être rattachée à la membrane par deux types d'ancrage à la fois : un ancrage GPI en C-terminal de la protéine, ainsi qu'un polypeptide hydrophobe N-terminal. Quelques années plus tard, les travaux de Hitt et coll. sur la ponticuline sont venus corroborer cette hypothèse. Ils ont en effet pu montrer que cette protéine, impliquée dans la liaison entre la membrane plasmique et les filaments d'actine, contient entre quatre et six segments transmembranaires N-terminaux en plus d'une ancre GPI C-terminale (Hitt *et coll.*, 1994). Ces observations ont été à la base de l'étude menée par Howell et coll. dans notre laboratoire (1994a). En fusionnant à l'extrémité C-terminale de l'endopeptidase neutre (NEP) la séquence d'attachement de l'ancrage GPI du "decay accelerating factor", on a pu provoquer la synthèse d'une protéine à double ancrage à partir d'une protéine transmembranaire de type II. Cette démonstration prouvait que le clivage du signal peptide N-terminal n'est pas un prérequis pour l'addition d'une ancre GPI.

1.1.2 - Transport RE - Golgi

Après leur synthèse et leur repliement au niveau du RE, les protéines sont transportées vers l'appareil de Golgi par des vésicules de transport formées à partir de la

membrane du RE. Ces vésicules fusionnent de façon sélective avec la membrane du *cis*-Golgi. L'analyse de la formation des vésicules de transport a permis de démontrer l'existence d'une enveloppe protéique sur la face cytosolique de la membrane du compartiment donneur.

1.1.2.1- Bourgeonnement des vésicules

Deux enveloppes différentes, formées à partir de sept sous-unités protéiques appelées COPs, sont formées au niveau du Golgi et du RE (Harter, 1995; Rothman et Wieland, 1996; Bednarek *et coll.*, 1996; Cosson et Letourneur, 1997; Nickel et Wieland, 1998). On distingue les enveloppes COPI et COPII en fonction de la nature des sous-unités impliquées dans la formation de l'enveloppe. Dans les deux cas, une guanosine triphosphatase (ARF pour COPI et SAR pour COPII) contrôle le processus de bourgeonnement. Une enzyme localisée sur le compartiment donneur catalyse l'échange de GDP pour du GTP. Les molécules résultantes actives (ARF-GTP ou SAR-GTP), se lient à la membrane du compartiment donneur, qui reste aplatie. Les sous-unités cytosoliques de l'enveloppe se lient alors à ARF-GTP ou à SAR-GTP et s'assemblent en une enveloppe, entraînant le bourgeonnement de vésicules.

1.1.2.2 - Attachement et fusion des vésicules

Au moment de l'attachement de la vésicule de transport avec le compartiment cible, le GTP lié à ARF est hydrolysé en GDP par une enzyme présente sur la membrane de ce compartiment. Ceci entraîne un changement de la conformation de ARF, et la

dissociation du manteau protéique. La fusion de la vésicule de transport avec la membrane du compartiment accepteur peut alors avoir lieu.

Le processus de fusion met en jeu les protéines SNAREs (Anderson, 1993). L' "hypothèse SNARE" (Sollner *et coll.*, 1993) implique que chaque vésicule de transport porte une v-SNARE spécifique, qui pourra interagir de façon unique avec une t-SNARE localisée sur la membrane du compartiment accepteur. Ce couple de protéines v-SNARE et t-SNARE correspond à la machinerie minimale de reconnaissance entre deux membranes. Bien que les protéines v- et t-SNARE puissent interagir de façon spontanée lorsqu'elles sont toutes deux présentes en solution, l'assemblage d'un complexe v-SNARE/t-SNARE est régulé *in vivo* par plusieurs protéines (Rothman et Sollner, 1997). En modulant le taux d'assemblage des complexes SNARE à des sites précis, et en concentrant localement les vésicules de transport, ces protéines régulatrices permettent d'augmenter la spécificité d'assemblage de deux compartiments, et peuvent même créer des sous-domaines au niveau de chaque compartiment intracellulaire. Un nouveau complexe protéique présent sur les membranes du cis-Golgi a récemment été impliqué dans le ciblage et la fusion des vésicules (Sacher *et coll.*, 1998). Il semblerait que ce complexe agisse en amont des SNAREs. On pense qu'il servirait à la capture des vésicules de transport à certains sites spécifiques sur le Golgi, rapprochant les SNAREs pour former un complexe préalable à la fusion.

Il semblerait cependant que les mécanismes de régulation ne soient pas essentiels et que la délétion d'un gène régulateur puisse dans certains cas être compensée par l'altération d'autres gènes impliqués dans la régulation, sans que le trajet des vésicules de transport ne soit modifié (Dascher *et coll.*, 1991; Brennwald et Novick, 1993; Dunn *et*

coll., 1993; Lupashin et Waters, 1997). Ceci implique donc que la base de la spécificité du transport ne repose pas sur ces protéines régulatrices, mais que les v- et t-SNAREs représentent effectivement la machinerie minimale de transport et de reconnaissance entre deux membranes.

Les récents travaux de Weber et coll. (1998) ont permis de montrer que les protéines SNAREs représentent également la machinerie minimale de fusion entre deux bicouches lipidiques. Les protéines NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) et SNAP (soluble NSF attachment protein), identifiées à l'origine comme initiatrices de la fusion des vésicules de transport avec la membrane cible (pour revue voir (Rothman et Wieland, 1996), semblent être seulement nécessaires au recyclage des protéines SNAREs entre deux cycles de fusion successifs. L'énergie nécessaire à la fusion de deux membranes serait portée par les protéines SNAREs elles-même, qui se lieraient pour former une "épingle-SNARE" (SNAREpin) entre deux bicouches. Pendant la fusion membranaire, l'épingle se relâchant, l'énergie qui était utilisée pour maintenir chacune de ses extrémités dans une membrane différente serait disponible et pourrait servir comme source d'énergie à la fusion.

Ces résultats, en plus de définir la machinerie minimale de fusion entre deux membranes, permet d'expliquer les conclusions des travaux récents de Presley *et coll.* (1997) et de Scales *et coll.* (1997). Ces études montrent en effet que les vésicules dérivées du RE s'agrègent et fusionnent entre elles pour former des amas tubulovésiculaires. Ces amas sont ensuite dirigés vers le Golgi avec les membranes duquel ils fusionnent. La présence de t-SNAREs a de plus été montrée à la surface de vésicules issues du RE (Lian et Ferro-Novick, 1993; Rowe *et coll.*, 1998), observation

qui semble confirmer l'hypothèse d'une fusion homotypique des vésicules qui précéderait la fusion hétérotypique avec la membrane du Golgi. Si l'on admet que deux t-SNAREs peuvent former une épingle comme le peuvent une v- et une t-SNARE, le même mécanisme de fusion des membranes peut expliquer cette fusion homotypique.

Les protéines Rab, qui constituent la plus grande famille de petites GTPases, ont été identifiées à l'origine comme régulateurs de l'association entre les SNAREs (pour revue voir (Novick et Zerial, 1997; Martinez et Goud, 1998)). Ces protéines sont maintenues sous une conformation inactive liée au GDP par un co-facteur appelé Rab GDI (pour Rab GDP-dissociation inhibitor). Alors que Rab-GDP se lie à la membrane du compartiment donneur, son association avec la protéine GDI est détruite, et le GDP est remplacé par du GTP. Cet échange de nucléotide permet l'activation de la protéine Rab. La vésicule se détache du compartiment donneur et se lie avec le compartiment accepteur, avant que le GTP ne soit hydrolysé. La protéine GDI peut alors à nouveau se lier à Rab, et la recycler vers le compartiment donneur. Une quarantaine de protéines Rab ont été identifiées à ce jour dans les cellules mammifères, nombre qui reflète la diversité des voies de transport dans les différents types cellulaires.

1.1.3 - Transport intra-Golgi

1.1.3.1 - Transport vésiculaire

La plupart des observations en faveur d'un transport vésiculaire entre les saccules de l'appareil de Golgi ont été faites au cours d'expériences de reconstitution du transport *in vitro* par l'équipe de Rothman (1994). Dans cette approche expérimentale, on utilise une

population “donneur” de membranes de Golgi, provenant de cellules mutantes incapables de synthétiser des oligosaccharides complexes, parce qu’elles sont déficientes en N-acétylglucosamine I transférase. Ces cellules ont été infectées par le virus VSV et contiennent la protéine VSV G. La population “donneur” de membranes de Golgi est incubée avec une population “accepteur” de membranes de Golgi de type sauvage capable d’ajouter la N-acétylglucosamine I sur une protéine, mais ne contenant pas la protéine G. Lors de l’incubation ensemble des deux populations de membranes de Golgi, en présence de cytosol, d’ATP, et de N-acétylglucosamine tritiée, la glycoprotéine virale acquiert des oligosaccharides complexes radioactifs, indiquant l’existence d’un transport entre le compartiment *cis* du Golgi “donneur” et le compartiment *medial* du Golgi “accepteur”. Le transport entre les compartiments successifs du Golgi étant unidirectionnel, et la protéine G glycosylée étant séquestrée dans le compartiment “accepteur”, on a conclu que ce transport implique des intermédiaires vésiculaires qui pouvaient diffuser dans le cytosol.

Il semblerait que COP II soit impliquée dans le transport antérograde entre le RE et le compartiment intermédiaire. L’enveloppe COP I recouvrirait quant à elle les vésicules impliquées dans le transport antérograde entre les différentes cisternes du Golgi, ainsi que les vésicules impliquées dans le transport rétrograde du Golgi au RE (Figure 3) (pour revue, voir Nickel et Wieland, 1998).

1.1.3.2 - Modèle de maturation ou progression de saccules

Il semblerait cependant que dans certaines conditions *in vitro*, ces vésicules ne soient pas indispensables au transport entre les saccules de l’appareil de Golgi (Mellman

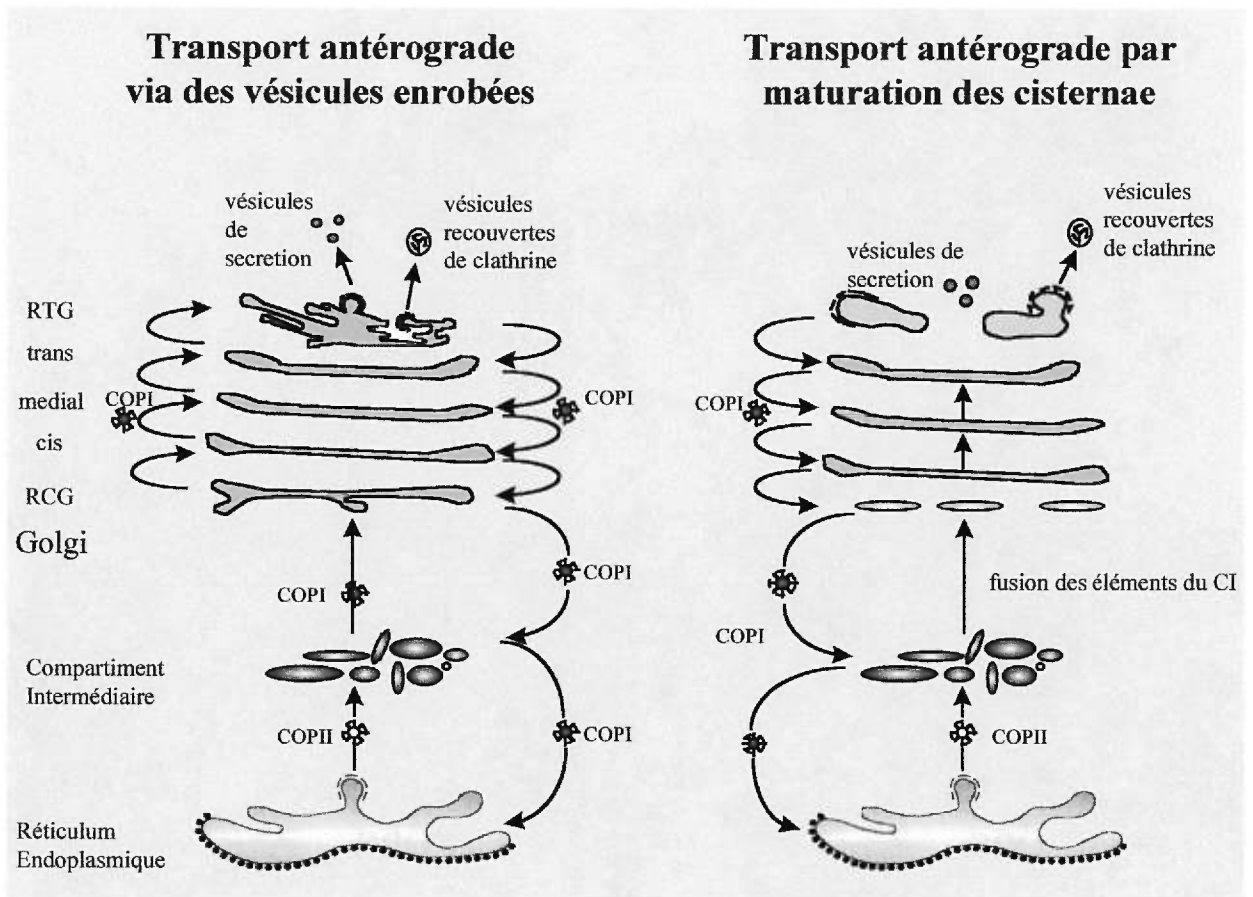


Figure 3 : Transport vésiculaire contre maturation des cisternae du Golgi.
 RCG : réseau *cis*-Golgi, RTG : réseau *trans*-Golgi, CI : compartiment intermédiaire.

D'après Nickel, W. et Wieland, F.T. (1998). Biosynthetic protein transport through the early secretory pathway. *Histochem. Cell. Biol.* 109, 477-486.

et Simons, 1992). L'addition de Brefeldine A (BFA) dans des cellules intactes entraîne le transport rétrograde rapide des composants du Golgi vers le RE via un système d'extensions tubulaires (Lippincott-Schwartz *et coll.*, 1990). Ainsi en utilisant des membranes isolées de cellules traitées par la BFA, on ne peut détecter aucun bourgeon enveloppé ni aucune vésicule. Néanmoins, le transport de la protéine G du Golgi "donneur" au Golgi "accepteur" continue avec une cinétique et une efficacité comparables à celle de l'expérience de contrôle. La seule différence est que le transport n'est plus inhibable par le GTP γ S, un analogue non hydrolysable du GTP qui bloque normalement le transport vésiculaire et provoque l'accumulation de vésicules.

Des observations morphologiques de l'appareil de Golgi ont en outre montré des distensions à l'extrémité des saccules renfermant les produits de sécrétion. De plus on a remarqué que le transport de certains gros oligomères de glycoprotéines, ou de certaines particules virales ne pouvait se faire via des vésicules, celles-ci étant de taille trop faible pour pouvoir contenir un seul de ces oligomères ou une seule de ces particules (pour revue voir (Fullekrug et Nilsson, 1998)). Ces observations, combinées à celles des effets de la BFA sur le transport, ont entraîné la résurgence de la théorie de progression des saccules pour expliquer la structure et la fonction de l'appareil de Golgi. Ce modèle explique le transport antérograde au sein du Golgi comme étant la migration des différentes saccules du côté *cis* vers le côté *trans* de l'appareil de Golgi.

Les résultats qui mènent à deux théories opposées semblent cependant pouvoir être accommodés dans un modèle qui rassemble le transport vésiculaire et la progression des saccules (Glick et Malhotra, 1998). Ce modèle a pour origine les trois hypothèses de travail suivantes : (i) les vésicules COP II fusionnent entre elles pour former les sous-

unités du compartiment intermédiaire. Ces sous-unités fusionneront ensuite pour former une nouvelle saccule du Golgi. (ii) Chaque saccule progresse du côté *cis* au côté *trans* du complexe de Golgi, pour finalement se fragmenter en vésicules de transport. (iii) Les protéines résidentes du Golgi sont continuellement recyclées via des vésicules qui assurent leur transport rétrograde. La distribution asymétrique des protéines du Golgi serait donc expliquée par leur capacité différente à intégrer une vésicule de transport rétrograde, et ceci permettrait d'expliquer la présence de protéines résidentes de l'appareil de Golgi dans plusieurs saccules successives.

Chacune de ces hypothèses soulève cependant de nouvelles questions, et on est encore loin d'un modèle consensus et définitif de l'appareil de Golgi.

1.1.4 - Transport post-Golgi

Le réseau *trans*-Golgi est le siège principal du tri des protéines et des lipides le long de la voie vacuolaire centrale. C'est de cette organelle qu'émergent un grand nombre de voies constitutives ou régulées, vers la surface cellulaire ou vers le système endosomal. Ce transport est facilité par différents éléments du cytosquelette, en particulier les microtubules et les protéines moteur qui leur sont associées (Cole et Lippincott-Schwartz, 1995; Lafont et Simons, 1996). La figure 4 résume les différentes voies de transport post-Golgi.

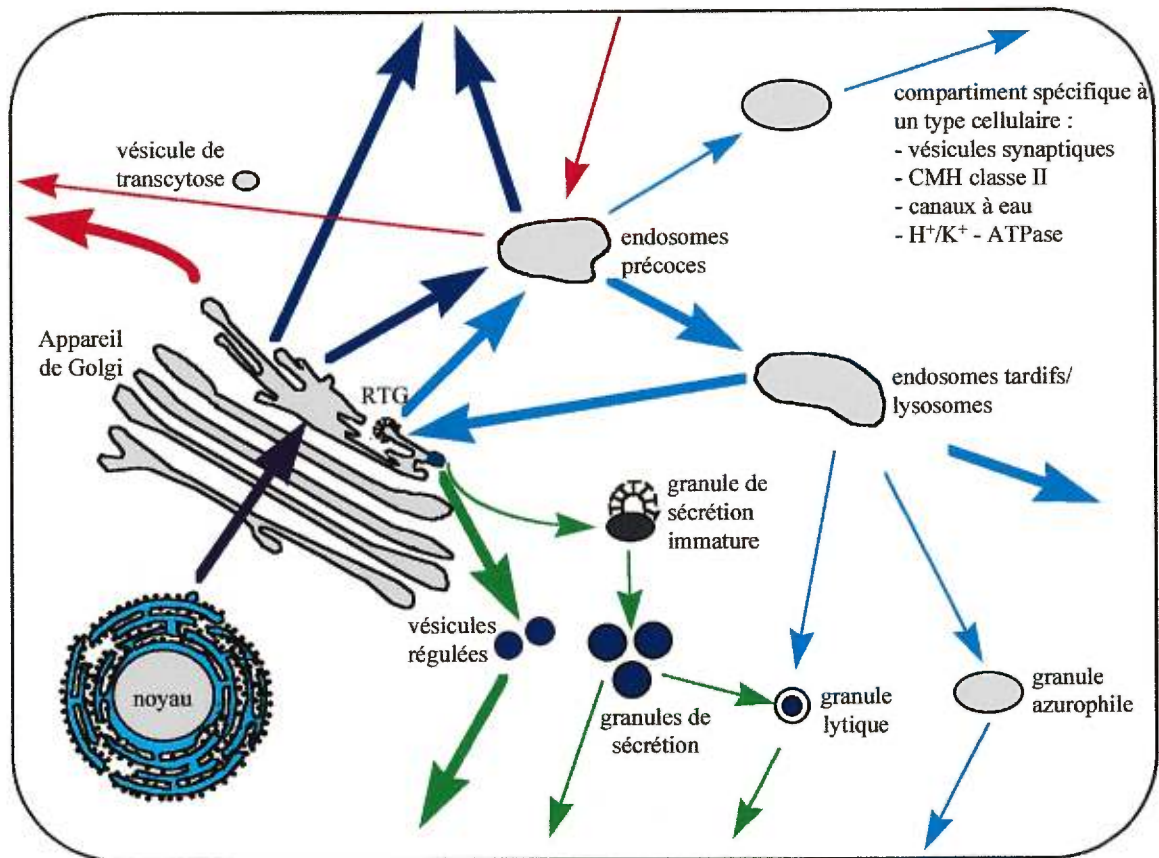


Figure 4 : Schéma de synthèse des principales voies de transport post-Golgi.

Les voies de transport communes à tous les types cellulaires sont représentées par les flèches en traits épais, celles présentes seulement dans certains sont représentées par les flèches en traits fins. Le centre de tri principal de la voie vacuolaire centrale est le réseau *trans*-Golgi (RTG), à partir duquel émergent des voies directes vers la membrane apicale (rouge), la membrane basolatérale (bleu foncé), et le système endosomal (bleu clair). De plus, le RTG donne naissance à des granules de sécrétion "classiques", ainsi qu'à une voie de sécrétion régulée dans les cellules spécialisées (vert). Le second centre de tri de la voie de biosynthèse se situe au niveau des endosomes précoces. Ils trient les protéines apicales dans les cellules qui utilisent une voie de transcytose (rouge), et seraient impliqués dans le tri de certaines protéines basolatérales (bleu sombre). Ils donnent également naissance à des compartiments cellulaires spécifiques qui contiennent les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, les canaux à eau, H^+/K^+ -ATPase, ou les protéines des vésicules synaptiques par exemple. Les granules azurophiles des neutrophiles seraient dérivées des endosomes tardifs/lysosomes et pourraient elles-même subir une exocytose stimulée par le calcium.

D'après Keller, P. et Simons, K. (1997). Post-Golgi biosynthetic trafficking. *J. Cell. Sci.* 110, 3001-3009.

1.1.4.1 - Modèle des cellules épithéliales polarisées - la lignée cellulaire

MDCK

Les cellules épithéliales polarisées sont caractérisées par la distribution asymétrique des protéines et des lipides de la membrane cellulaire entre un domaine apical et un domaine basolatéral. Sur la membrane plasmique, ces domaines sont séparés par des jonctions serrées qui forment des barrières à la diffusion latérale des ions et des macromolécules. Des molécules d'adhésion permettent la formation d'interactions cohésives entre deux cellules. Ces caractéristiques structurales sont responsables de plusieurs des rôles physiologiques des cellules épithéliales polarisées, qui peuvent former une barrière sélective au transport entre les différents compartiments biologiques. La composition de ces compartiments biologiques est en outre largement régulée par les fonctions vectorielles d'absorption, de transcytose, et de sécrétion des cellules épithéliales, fonctions qui dépendent de la distribution polarisée des différents canaux et enzymes de transport sur les différents domaines de la membrane. (Pour revue, voir Rodriguez-Boulan et Nelson, 1989; Simons et Fuller, 1985).

Les cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) qui présentent les caractéristiques morphologiques et enzymatiques du tubule distal de rein, représentent l'une des lignées cellulaires épithéliales les mieux caractérisées. La polarité structurale de l'épithélium, nécessaire à l'établissement du transport vectoriel, est conservée lors de leur culture. De plus les microvillosités caractéristiques du domaine apical des cellules épithéliales polarisées sont présentes sur les cellules MDCK, et deux cellules adjacentes sont reliées par des jonctions serrées, comme c'est le cas *in vivo*, ce qui permet

l'établissement d'une monocouche cellulaire continue à la surface d'un Pétri de cellules confluentes. Le transport vectoriel, notamment de solutions salines, est également conservé en culture.

La polarité de distribution des glycoprotéines virales après infection est souvent utilisée comme modèle de transport (Spiess, 1995; Pfeiffer *et coll.*, 1985; Matlin et Simons, 1984). Il a été clairement démontré que des vésicules distinctes sont responsables du transport des protéines membranaires vers les domaines apical et basolatéral des cellules MDCK (Wandinger-Ness *et coll.*, 1990). L'existence de deux voies distinctes vers la surface cellulaire n'est cependant pas une caractéristique des seules cellules polarisées : elles sont aussi retrouvées dans les fibroblastes non polarisés (Matlin et Simons, 1984; Yoshimori *et coll.*, 1996). Il est de plus en plus souvent admis que les caractéristiques du ciblage intracellulaire propres aux cellules épithéliales polarisées se retrouvent à des degrés divers dans les différents types de cellules mammifères. La figure 5 présente les voies apicale et basolatérale dans les cellules épithéliales polarisées, et leur équivalent dans plusieurs autres types cellulaires.

1.1.4.2 - Transport basolatéral

La voie de transport basolatérale, dans les cellules épithéliales polarisées, est médiée par des signaux cytoplasmiques sur la queue cytosolique des protéines destinées à l'emprunter. Cependant l'existence d'une enveloppe recouvrant les vésicules de transport basolatérales est encore sujet à controverse. En outre, il semblerait que les protéines sécrétées et les protéines membranaires n'empruntent pas la même voie vers la membrane basolatérale dans les cellules MDCK (Boll *et coll.*, 1991). Différents travaux

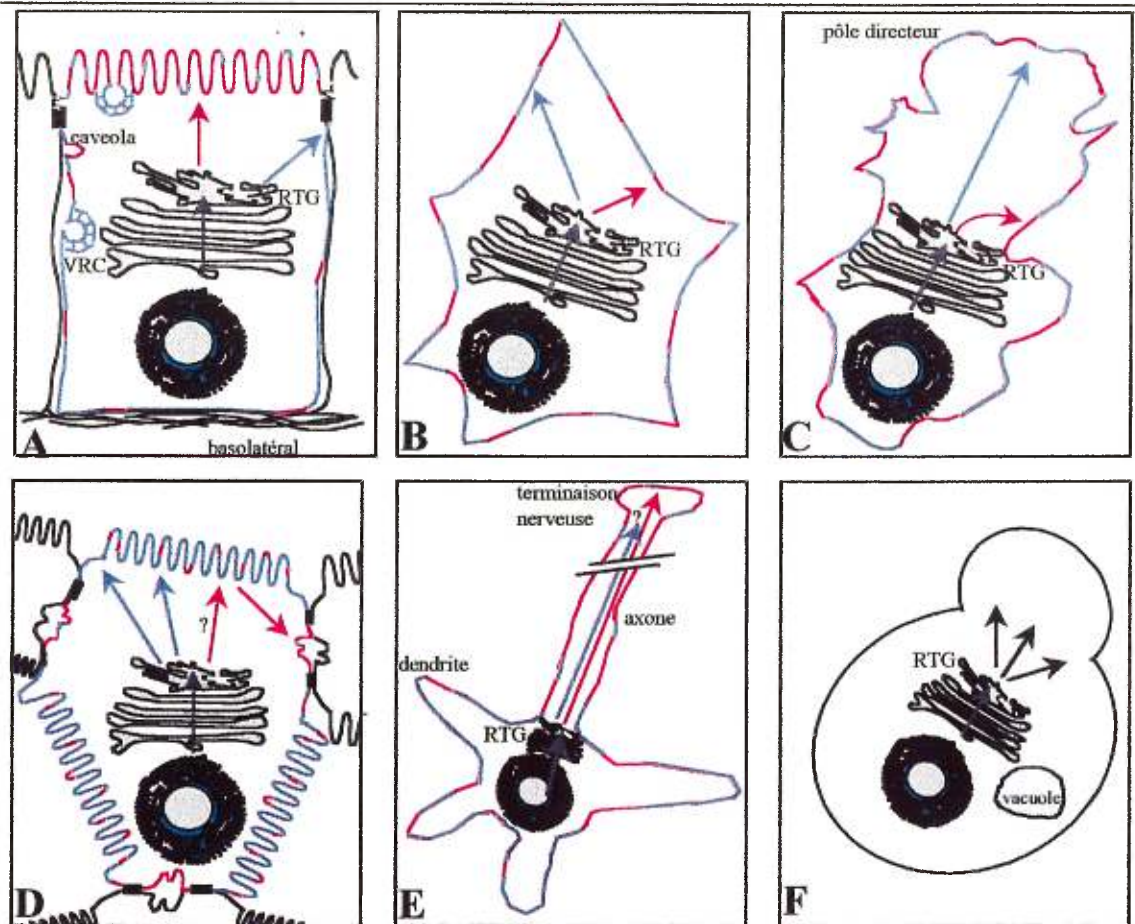


Figure 5 : Voies de transport dans différents types cellulaires.

VRC : Vésicules recouvertes de clathrine, RTG : Réseau Trans Golgi.

Les membranes équivalentes aux surfaces apicale et basolatérale des cellules MDCK (A) sont dessinées en rouge et bleu respectivement.

Dans un fibroblaste au repos (B), les voies de transport "apicale" et "basolatérale" atteignent la surface au hasard, alors que dans un fibroblaste migrant (C) la voie "basolatérale" est utilisée pour le transport des protéines nouvellement synthétisées vers le pôle directeur. Les hépatocytes (D) contiennent au moins deux routes différentes vers la surface "basolatérale", mais n'ont pas de voie "apicale" directe. Comme l'indique le point d'interrogation, on ne sait pas si les protéines apicales utilisent les "glycolipid rafts" pour atteindre la surface "basolatérale" des hépatocytes. Dans les neurones de l'hippocampe (E) les membranes axonale et somatodendritique correspondent respectivement aux domaines apical et basolatéral des cellules MDCK. La levure (F) contient au moins trois voies de transport parallèles vers la surface cellulaire.

D'après Keller, P. et Simons, K. (1997). Post-Golgi biosynthetic trafficking. *J. Cell. Sci.* 110, 3001-3009.

ont mis en évidence l'implication de la protéine Rab8 dans la voie de transport basolatérale dans les cellules mammifères, ainsi que de la machinerie NSF-SNAP-SNARE pour la fusion des vésicules de transport (Ikonen *et coll.*, 1995).

1.1.4.3 - Transport apical

L'autre voie de transport majeure dans les cellules épithéliales polarisées, la voie de transport apicale, reste à ce jour l'objet de nombreuses études. Low *et coll.* ont récemment démontré l'implication de la machinerie SNARE dans le transport apical dans les cellules MDCK (Low *et coll.*, 1998), mettant ainsi en lumière une similitude notable entre les voies de transport apicale et basolatérale. Cependant, de nombreux travaux suggèrent à ce jour l'existence d'une voie de transport apicale radicalement différente de la voie de transport basolatérale. Cette voie de transport mettrait en jeu des plateformes lipidiques servant à l'attachement et au transport des protéines dans la cellule. Ces plateformes lipidiques, appelées "glycolipid rafts" par Simons et Ikonen (1997), résultent de l'association latérale de sphingolipides et de cholestérol dans la membrane du réseau *trans*-Golgi (RTG). Les radeaux ainsi créés "flottent" dans un environnement riche en glycérophospholipides.

L'association latérale des glycosphingolipides entre eux se ferait via des interactions faibles entre leurs sous unités glucosidiques et entre leurs chaînes acylées. La tête des molécules de glycosphingolipides occupe une surface plus importante dans le plan de la bicouche lipidique que leurs chaînes saturées. Le cholestérol, dont l'affinité est plus importante pour les sphingolipides que pour les glycérolipides insaturés, s'intercalerait dans les espaces libres entre deux chaînes de céramide. Ces amas de

cholestérol-glycosphingolipides s'assembleraient dans le feuillet exoplasmique de la bicouche lipidique, où les régions fluides sont occupées par des molécules insaturées de phosphatidylcholine (PC). Des molécules de cholestérol pourraient aussi s'intercaler entre deux molécules de PC, mais la structure coudée de la chaîne acylée de la PC ne permettrait pas de former un amas aussi serré que dans le cas des "glycolipid rafts". La figure 6 donne une représentation schématique du mode d'interaction de ces molécules entre elles.

L'utilisation du Triton X-100 (TX-100) à 4°C permet d'extraire les "glycolipid rafts" en tant que complexes insolubles dans le détergent enrichis en glycolipides (DIGs pour detergent-insoluble glycolipid-enriched), par flottation sur gradient de sucrose. La fraction DIG flotte au sein de tels gradients à une densité faible, et est bien séparée du reste du matériel insoluble dans le TX-100. Cette fraction est de plus nettement enrichie en glycosphingolipides et en sphingomyéline. Une forte proportion du cholestérol membranaire lui est associée alors que la plupart des glycérophospholipides sont solubilisés par le TX-100.

L'annexine II et l'annexine XIIIb sont des membres de la famille des protéines qui lient les phospholipides de façon Ca^{2+} dépendante, et sont retrouvées dans la fraction DIG (Davitz *et coll.*, 1989). L'annexine XIIIb est de plus retrouvée dans des vésicules de transport apicales dans les cellules MDCK, et aurait un rôle dans le transport apical des vésicules dérivées du RTG (Fiedler *et coll.*, 1995). L'annexine II quant à elle est relarguée de la membrane en cas de perturbation artificielle des taux de cholestérol, en même temps que les protéines du cytosquelette, ce qui suggère qu'elle serait impliquée dans la connection entre les "glycolipid rafts" et le cytosquelette cortical. On pense donc

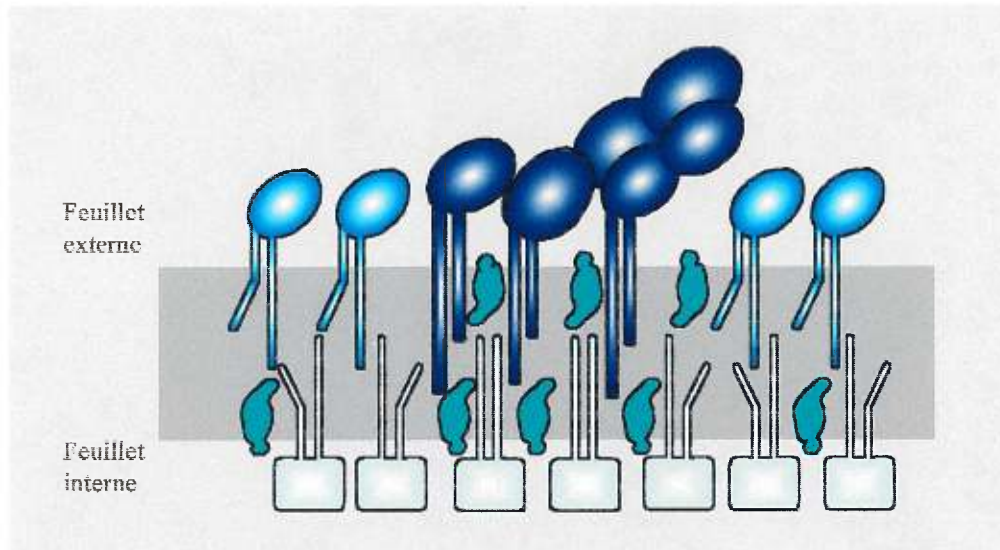


Figure 6 : Organisation des lipides des "glycolipid rafts".

Les sphingolipides (bleu sombre) et le cholestérol (vert) forment des microdomaines denses dans un environnement riche en phosphatidylcholine (bleu roi). Les régions riches en phosphatidylcholine sont moins denses et plus fluides que les domaines riches en sphingolipides et en cholestérol. Celui-ci doit adopter un mode d'intercalation avec la région de la membrane riche en phosphatidylcholine différent du mode d'intercalation avec les sphingolipides, à cause de la forme coudée d'une des chaînes acylées insaturées de la phosphatidylcholine. Les lipides du feuillet externe de la membrane sont des sphingolipides, de la sphingomyéline et de la phosphatidylcholine, et les lipides du feuillet interne sont représentés par la phosphatidyléthanolamine.

D'après Harder, T. et Simons, K. (1997). Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 534-542.

que les deux annexines II et XIIIb pourraient agir en tant que stabilisateurs des lipides des “glycolipid rafts”. Les récents travaux de Lafont et coll. suggèrent également un rôle pour l’annexine XIIIb dans l’étape de fusion, ou dans l’établissement de la spécificité de liaison, d’une vésicule à la membrane apicale (Lafont *et coll.*, 1998).

La caveoline est une autre protéine que l’on retrouve associée aux DIGs dérivés du RTG. Sa présence est plus souvent associée à l’existence de caveolae, invaginations de la membrane plasmique impliquées dans les voies d’endocytose, et la distinction entre caveolae et DIGs sera plus amplement discutée ici dans le chapitre consacré à l’endocytose.

Parmi les protéines qui s’associent aux DIGs pour leur transport vers la membrane apicale, on retrouve également les protéines GPI, certaines enzymes digestives de l’épithélium intestinal, l’haemagglutinine du virus influenza (HA) et la neuraminidase du virus influenza (pour revue voir (Davitz *et coll.*, 1989; Simons et Ikonen, 1997)). Cependant, il a été montré que la protéine gp80, sécrétée du côté apical des cellules MDCK, n’emprunte pas les “glycolipid rafts” pour son transport vers le milieu extracellulaire. Saucan et Palade (1994) avaient déjà montré que les protéines apicales membranaires et sécrétées empruntaient des vésicules de transport différentes dans les hépatocytes. De plus, plusieurs protéines apicales membranaires comme l’endopeptidase neutre (NEP, EC 3.4.24.11) sont parfaitement solubles dans le Triton X-100 (Hooper et Turner, 1988; Cailler *et coll.*, 1998), et semblent donc exclues des “glycolipid rafts”.

Il a cependant été proposé que cette exclusion visible ne soit que l’image d’un équilibre entre les “glycolipid rafts” et la membrane environnante (Danielsen, 1995), et

nombreux sont ceux qui favorisent encore aujourd'hui l'hypothèse selon laquelle un seul type de vésicules transiterait entre le RTG et la membrane apicale des cellules polarisées, à savoir les "glycolipid rafts" insolubles dans le Triton X-100.

1.1.5 - Endocytose

Un certain nombre de protéines qui atteignent la membrane plasmique par l'une des voies de transport décrites ci-dessus doivent être réinternalisées et recyclées de façon perpétuelle vers la surface cellulaire. Cette réinternalisation se fait via une voie d'endocytose. (Pour revue, voir Mellman, 1996).

1.1.5.1 - Transport via les vésicules recouvertes de clathrine

1.1.5.1.1 - Formation des vésicules recouvertes de clathrine

Dans la plupart des types cellulaires, l'internalisation de récepteurs et de leurs ligands, et de fluide extracellulaire, se fait par endocytose, suite à la formation de vésicules recouvertes de clathrine (VRCs). Le même type de vésicules est impliqué dans le transport sélectif de certaines protéines entre le RTG et les lysosomes. C'est le cas par exemple pour les hydrolases lysosomales solubles qui contiennent des résidus mannose-6-phosphate, lesquels sont responsables de la liaison à des récepteurs spécifiques (MPRs). Le complexe hydrolase-MPR est introduit dans une VRC destinée aux endosomes précoces (EPs), au niveau du RTG.

Le manteau vésiculaire est composé d'un squelette de clathrine préformé, et d'un complexe adaptateur hétérotétramérique, appelé adaptine, qui joue un rôle crucial dans l'attachement des cages de clathrine à la membrane donneur. On connaît à ce jour trois principaux adaptateurs de clathrine (AP-1, AP-2 et AP-3). Chacun d'entre eux se compose de trois sous-unités communes: une sous-unité β , une sous-unité μ (chaîne moyenne), une sous-unité σ (petite chaîne), et d'une quatrième sous-unité différente selon le type de complexe : γ dans le cas de AP-1, α dans le cas de AP-2, et δ dans le cas de AP-3. Les quatre sous-unités sont associées de façon stable et ne peuvent être séparées que par des dénaturants forts. La structure hétérotétramérique de l'adaptateur, représentée dans la figure 7, a l'apparence caractéristique d'une tête avec deux oreilles (Hirst et Robinson, 1998). Le complexe AP-1, localisé au niveau du RTG, est impliqué dans le bourgeonnement des VRCs et dans le tri protéique à ce niveau de la cellule. AP-2 remplit des fonctions similaires au niveau de la membrane plasmique (pour revue voir Lewin et Mellman, 1998). Le troisième adaptateur récemment identifié, AP-3 (Dell'Angelica *et coll.*, 1997), interagit *in vivo* et *in vitro* avec la clathrine (Dell'Angelica *et coll.*, 1998), et serait actif dans la formation de vésicules synaptiques à partir des endosomes (Faundez *et coll.*, 1998).

Le recrutement des protéines adaptateurs vers les membranes semble être la première étape dans la formation d'une VRC. Au niveau du RTG, on sait que le recrutement de AP-1 est influencé par le facteur de ribosylation de l'ADP (ARF) et le GTP (Kirchhausen *et coll.*, 1997). La présence de protéines qui se lient à AP-1 via leur queue cytosolique semble aussi stimuler son recrutement à la membrane du RTG. L'étape suivante dans la formation des VRCs consiste dans le recrutement de la clathrine

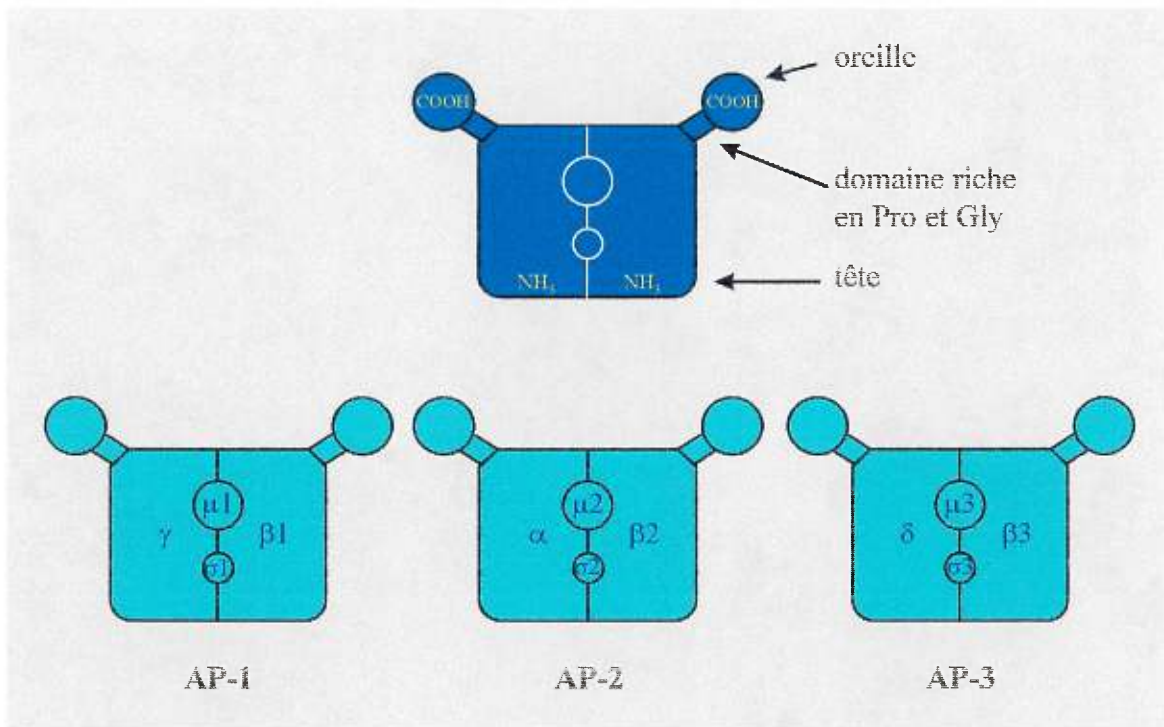


Figure 7 : Modèle des complexes AP-1, AP-2 et AP-3.

Les hétérotétramères d'adaptine consistent en deux chaînes lourdes, deux moyennes et deux légères. Les chaînes lourdes consistent en une tête amino-terminale, un domaine riche en proline et en glycine, et un domaine "en oreille" carboxy-terminal.

qui se lie à la chaîne β de l'adaptateur. Le détachement de la VRC de la membrane donneur met en jeu de nombreuses protéines cytosoliques, dont la GTPase dynamine (Al-Hasani *et coll.*, 1998), et l'amphiphysine qui interagirait avec celle-ci via ses domaines SH3 (Riezman *et coll.*, 1997; McNiven, 1998; Schmid *et coll.*, 1998).

1.1.5.1.2 - Tri protéique au niveau des endosomes

- *Pendant le processus d'endocytose*

Un premier tri ayant été effectué au niveau de la membrane donneur pour assurer l'inclusion sélective des protéines dans les VRCs, le deuxième événement de tri se produit au niveau des endosomes. Les EPs, qui représentent un réseau dynamique de tubules et de vésicules dispersés à travers le cytoplasme, ont un pH légèrement acide (entre 6.3 et 6.8), et sont le lieu de la séparation entre les ligands et leur récepteur. Les EPs s'engagent alors dans la séparation physique et le tri des récepteurs libres et de leurs ligands, ainsi que des autres macromolécules de la phase fluide. Les récepteurs et autres protéines membranaires sont accumulés dans les extensions tubulaires des EPs en fonction de signaux qui contrôlent leur recyclage, alors que le contenu soluble s'accumule dans les régions vésiculaires. Les éléments tubulaires se détacheraient alors, ou serviraient de site au bourgeonnement de transporteurs impliqués dans le recyclage, alors que les éléments vésiculaires plus gros continueraient vers les endosomes tardifs (ETs) et les lysosomes.

Les vésicules de recyclage (VRs) émergent des extensions tubulaires des EPs. Si certaines de ces vésicules fusionnent directement avec la membrane plasmique. La majorité d'entre elles s'accumulent dans le cytoplasme périnucléaire, en étroite relation

avec le centre d'organisation des microtubules, avant d'atteindre la membrane plasmique. La distinction entre EP et VR n'est pas seulement fonctionnelle, mais également biochimique. La GTPase rab4 par exemple est présente dans les EPs, mais est absente des VRs qui se regroupent autour du noyau (Daro *et coll.*, 1996).

Les endosomes tardifs sont définis comme des structures vésiculaires qui accumulent et concentrent le contenu internalisé, après passage dans les EPs. Ils contiennent des hydrolases lysosomales actives et seraient peut être le lieu de l'initiation du processus de dégradation, ce qui explique qu'on les qualifie parfois de compartiment pré-lysosomal. Il s'agirait donc d'un équilibre, plutôt que d'un transfert, entre ET et lysosome.

- *Cas particulier de la transcytose*

La transcytose, couramment observée dans les cellules MDCK, permet le ciblage protéique d'une membrane vers la membrane opposée de la cellule, après passage dans les EPs (Brändli *et coll.*, 1990), (voir Figure 4). Les protéines internalisées au niveau de la membrane cellulaire, et qui transitent par les endosomes, peuvent cependant être aussi recyclées vers la membrane d'où elles viennent, ou envoyées vers les lysosomes pour être dégradées. Certaines protéines traverseraient les endosomes avant d'être ciblées au RTG depuis la surface basolatérale des cellules MDCK (Leitinger *et coll.*, 1995; Futter *et coll.*, 1995). Des travaux récents de microscopie électronique montrent que le récepteur polymérique de l'immunoglobuline, couplé à son ligand, et internalisé à 20°C via la surface basolatérale des cellules MDCK, est distribué dans un groupe de vacuoles et de tubules interconnectés, qui contiennent également les récepteurs à la transferrine, et au

facteur de croissance épidermique. Ces groupes d'éléments endosomaux trient alors les récepteurs pour les partitionner sur leurs membranes, avant qu'ils ne soient ciblés vers différents compartiments cellulaires (Gibson *et coll.*, 1998).

De plus, les endosomes peuvent donner naissance à des compartiments spécialisés comme le compartiment qui contient le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II dans certains types cellulaires, ou les vésicules synaptiques (Leborgne et Hoflack, 1998). D'autres cellules contiennent des compartiments d'entreposage dérivés des endosomes qui permettent un ciblage rapide de certaines protéines vers la membrane cellulaire en réponse à des signaux extérieurs (Keller et Simons, 1997; Haney et Mueckler, 1994; Brown et Sabolic, 1993; Urushidani et Forte, 1998).

1.1.5.2 - Endocytose indépendante de la clathrine: macropinocytose, caveolae

La macropinocytose correspond à l'internalisation passive de fluide extracellulaire au niveau de la membrane cellulaire. Les vésicules ou vacuoles formées au cours de ce phénomène peuvent atteindre 1.5 μm de diamètre, et les macromolécules internalisées dans les macropinosomes peuvent être soit recyclées soit dirigées vers les lysosomes.

Les caveolae ont été originellement définies comme des invaginations de la membrane plasmique de 60 nm de diamètre trouvées dans un grand nombre de types cellulaires (Parton, 1996; Harder et Simons, 1997). Les fonctions qui leur ont été assignées incluent la potocytose, la transcytose dans les cellules endothéliales, et la transduction de signal (Schlegel *et coll.*, 1998). Plutôt qu'utiliser ces critères morphologiques, on préfère maintenant définir les caveolae comme des invaginations de

la membrane cellulaire qui contiennent la protéine marqueur caveoline (ou VIP21) (Rothberg *et coll.*, 1992), et sont enrichies en protéines GPI, en glycosphingolipides et en cholestérol.

L'abondance des caveolae varie énormément d'un type cellulaire à un autre. Certaines cellules qui n'expriment pas la caveoline en sont complètement dépourvues, mais ont la capacité d'en former en cas d'expression de caveoline *de-novo* (Fra *et coll.*, 1995; Lipardi *et coll.*, 1998). L'association de la caveoline en homo-oligomères de 14 à 16 unités, et l'interaction de ces homo-oligomères, entraîneraient la formation de particules de 25 à 50 nm de diamètre. La caveoline interagirait alors de façon spécifique avec des glycosphingolipides et du cholestérol, ce qui permettrait la formation des vésicules finales (Schlegel *et coll.*, 1998). C'est cette composition particulière en lipides qui confère aux caveolae des propriétés semblables à celles des DIGs quant à leur solubilité dans des détergents non ioniques comme le TX-100 et CHAPS (voir 1.1.4.1-c).

Différentes théories existent en ce qui concerne la dynamique des caveolae. Anderson *et coll.* (1992, 1993) ont proposé un modèle selon lequel les caveolae se refermeraient de façon transitoire et relargueraient leur contenu dans la cellule, mais sans se détacher de la membrane plasmique. Dans certains types cellulaires, les caveolae sont retrouvées sur la membrane plasmique en arrangements complexes (Parton, 1996), parfois associés à des VRCs, en particulier à la surface des adipocytes et des fibroblastes. La formation de ces groupements pourrait être une indication que l'invagination des caveolae n'est pas nécessairement couplée à leur séparation de la membrane plasmique. Selon un tel modèle, le recrutement de la caveoline et la formation de nouvelles caveolae autour d'un site de nucléation serait plus rapide que le détachement des caveolae de la

membrane immédiatement après leur formation, et résulterait dans la formation de ces groupements VRCs/caveolae.

De nombreux travaux, résumés par Parton (1996), suggèrent cependant que les caveolae peuvent effectivement se détacher de la membrane plasmique. Un traitement des cellules avec un inhibiteur de phosphatases entraîne une décroissance rapide du nombre de caveolae attachées à la surface cellulaire (Parton *et coll.*, 1994). Un tel processus d'internalisation impliquerait la fusion des caveolae avec les endosomes et se ferait en collaboration avec le cytosquelette d'actine. De plus, des caveolae purifiées contiennent la machinerie moléculaire typique nécessaire à la formation de vésicules, à leur détachement de la membrane, et à leur fusion (Schnitzer *et coll.*, 1995a; Schnitzer *et coll.*, 1995b).

Une autre série de travaux montre l'implication des caveolae dans une voie d'endocytose indépendante de la clathrine et du système endosomal. En 1989, Kartenbeck *et coll.* ont montré que l'internalisation du virus SV-40, de la famille des papovavirus, se fait selon une telle voie, et que les particules virales internalisées sont ciblées directement vers le RE. La description morphologique qu'ils ont donnée des vésicules où se regroupent les particules virales à la surface cellulaire a permis de les identifier comme des caveolae. Les travaux récents rapportés par Benlimame *et coll.* (1998) permettent d'étayer ces observations. Cette équipe a en effet montré que le récepteur du facteur de motilité autocrine (AMF-R) est présent dans les caveolae de la surface cellulaire dans des fibroblastes NIH-3T3, et dans des cellules HeLa. Ils ont de plus montré que la protéine AMF-R est internalisée suivant une voie indépendante de la clathrine, et ciblée directement vers les tubules AMF-R, une organelle tubulaire

intracellulaire dérivée du réticulum endoplasmique lisse (Nabi *et coll.*, 1992, Benlimame *et coll.*, 1995). Les auteurs proposent donc l'existence d'une voie d'internalisation directe vers le RE, qui impliquerait les caveolae en tant que vésicules de transport. Il semblerait donc que l'internalisation via cette voie soit une caractéristique intrinsèque des cellules observées, et non pas une voie spécifique au virus SV-40, comme cela avait été proposé à l'origine par Kartenbeck *et coll.* (1989). Il reste cependant à identifier de façon précise un signal permettant le ciblage direct d'une protéine de la membrane plasmique vers le RE lisse, ainsi que la machinerie de transport impliquée dans le transit intracellulaire des caveolae vers cette organelle.

Les informations dont on dispose actuellement ne sont pas suffisantes pour définir avec précision la structure des caveolae. Il a été proposé qu'il existe des sous-populations de caveolae impossibles à différencier du point de vue morphologique, mais impliquées dans des phénomènes cellulaires différents (Benlimame *et coll.*, 1998). On connaît aujourd'hui leur implication dans de nombreux phénomènes de transduction de signal. On sait aussi qu'elles sont impliquées dans certaines pathologies comme - entre autres - certains types de cancer, de dystrophie musculaire, ou la maladie d'Alzheimer (pour revue voir Schlegel *et coll.*, 1998), et la définition plus précise de leur rôle fera sans nul doute l'objet d'études intensives au cours des prochaines années.

1.1.5.3 - Phagocytose

La phagocytose est une forme particulière d'endocytose par laquelle de grosses particules comme des microorganismes ou des débris cellulaires sont ingérés par de grosses vésicules endocytiques appelées phagosomes. Alors que la phagocytose est

utilisée par les protozoaires comme moyen de nutrition, chez les mammifères elle est utilisée par les macrophages et les neutrophiles pour protéger l'organisme contre les infections. Elle est également un moyen important d'élimination des débris cellulaires et des cellules sénéscentes.

1.2 - SIGNAUX DE CIBLAGE PROTEIQUE DANS LES CELLULES EPITHELIALES POLARISEES ET DANS LES FIBROBLASTES

La distribution polarisée des protéines résulte d'un tri sélectif qui a lieu dans le RTG. On a identifié plusieurs signaux responsables de l'incorporation de protéines dans des vésicules de transport spécifiques, ou de leur exclusion de ces vésicules.

1.2.1 - Signaux de ciblage apical - cas particulier de l'ancrage GPI

1.2.1.1 - Différents signaux de ciblage apical

Lisanti et coll. (1988) ont observé que les protéines GPI endogènes, dans les cellules MDCK, étaient absentes de la membrane basolatérale, et regroupées sur la membrane apicale, et ont les premiers émis l'hypothèse selon laquelle l'ancrage GPI contiendrait l'information nécessaire au ciblage apical des protéines dans les cellules polarisées. Des travaux subséquents, dans lesquels ils ont fusionné le signal d'attachement de l'ancrage GPI du "Decay Accelerating Factor" (DAF) à plusieurs protéines intrinsèques ont permis de confirmer leur première observation (Lisanti *et coll.*,

1989). Après ajout d'une ancre GPI en C-terminal de la protéine native, ils ont en effet pu observer la relocalisation d'une protéine basolatérale, et d'une protéine sécrétée de façon non polarisée, à la membrane apicale des cellules MDCK. Brown et Rose (1992), ont montré que les protéines GPI s'associent avec des glycosphingolipides au niveau de l'appareil de Golgi des cellules MDCK pour former des complexes de faible densité insolubles dans le Triton X-100. De plus, ces complexes ne contiennent pas de protéines basolatérales. Les observations rapportées plus tard par Zurzolo et coll. (1993, 1994) ont permis de raffiner le modèle proposé. En effet, dans les cellules Fisher Rat Thyroid (FRT), qui ne contiennent pas de caveoline, cette équipe a observé que les protéines GPI et les glycosphingolipides sont ciblés vers la membrane basolatérale. Dans cette lignée cellulaire, les protéines à ancrage GPI ne semblent cependant jamais s'associer aux complexes de faible densité insolubles dans le Triton X-100. De plus, en comparant le transport des protéines GPI dans les cellules MDCK, FRT, et MDCK-résistantes à la concanavaline A (MDCK-ConA') ils ont pu avancer l'hypothèse selon laquelle la protéine VIP21/caveoline jouerait un rôle clef dans la formation des vésicules de transport apicales. Ils ont aussi montré que l'association des protéines GPI avec des glycosphingolipides, si elle était nécessaire au ciblage apical, n'était pas suffisante. Des travaux plus récents de la même équipe (Lipardi *et coll.*, 1998) ont permis de montrer que la transfection du gène codant pour la caveoline-1 dans les cellules FRT permet la formation de caveolae à la surface cellulaire, mais n'influence pas le ciblage des protéines GPI, qui restent solubles dans le Triton X-100 tout au long de leur transport. Ces protéines s'associent cependant aux caveolae de la surface cellulaire en cas d'interaction avec un anticorps. Ces observations permettent donc d'éliminer un rôle

direct de la protéine caveoline dans la formation des vésicules de transport apicales, et de distinguer de façon définitive les caveolae de la surface cellulaire de ces vésicules de transport enrichies en caveoline. L'absence, dans les cellules FRT, d'un facteur capable de reconnaître le signal de ciblage apical porté par l'ancrage GPI et de promouvoir l'association des protéines à ancrage GPI avec les plateformes riches en GSL, serait la cause de leur ciblage basolatéral dans cette lignée.

On sait également que l'ancrage GPI fonctionne comme signal de ciblage apical *in vivo*, puisqu'il est suffisant pour diriger des polypeptides hétérologues vers la lumière de l'intestin de souris transgéniques (Ali *et coll.*, 1996).

Les observations de l'équipe de K. Simons ont permis d'intégrer à ce modèle un rôle pour les carbohydrates dans le ciblage des protéines apicales sécrétées. Scheiffelle *et coll.* (1995) ont en effet montré que l'ajout de N-glycans sur une protéine sécrétée de façon non polarisée permet son ciblage à la membrane apicale des cellules MDCK. La

protéine VIP36, une lectine isolée à partir des complexes glycosphingolipides-protéines insolubles dans le Triton X-100, interagirait avec les glycoprotéines, les glycolipides, ou les ancrages GPI, et interviendrait dans leur ciblage vers la membrane apicale (Fiedler *et coll.*, 1994), (Fiedler et Simons, 1995). Les sucres N-liés ont de plus été décrits récemment comme signaux de ciblage apical sur des protéines membranaires (Gut *et coll.*, 1998). Il serait donc possible que les protéines transmembranaires se lient elles aussi à VIP36 (ou à une autre lectine) qui permettrait, via sa queue cytosolique, la connexion avec une machinerie de tri située sur la face cytosolique de la vésicule de transport. Les sucres O-liés semblent aussi être impliqués dans le processus de ciblage apical de certaines protéines, comme le montre l'étude récente de Yeaman *et coll.* (1997) qui démontrent que l'information structurelle nécessaire au ciblage apical des récepteurs aux neurotrophines transmembranaires se situe dans une région du domaine extracellulaire proche de la membrane, et riche en résidus Ser/Thr O-glycolysés.

En plus de l'ancrage GPI ou des sucres N- ou O-liés, le segment transmembranaire de certaines protéines peut contenir un signal de ciblage apical. En effet, en introduisant des mutations dans la partie du domaine transmembranaire de l'hémagglutinine (HA) du virus influenza en contact avec le feuillet exoplasmique de la membrane plasmique, on abolit le tri de cette protéine dans les cellules MDCK. Elle devient alors soluble dans le Triton X-100 (Lin *et coll.*, 1998; Scheiffele *et coll.*, 1997). Certains de ces mutants sont même envoyés vers la membrane basolatérale, et les auteurs proposent comme raison à cela leur inability à intégrer les "glycolipid rafts", ou à créer avec eux une association suffisamment forte. Cette hypothèse est appuyée par d'autres observations qui démontrent que le cholestérol est indispensable au transport apical de

HA, et, contrairement à ce qui avait été précédemment décrit (Graichen *et coll.*, 1996), au transport apical de la protéine gp80 (Keller et Simons, 1998).

Un modèle récent intègre toutes ces observations, et propose que seules les protéines qui possèdent un signal approprié (ancrage GPI, sucres N- ou O-liés, ou signal dans le domaine transmembranaire de la protéine) peuvent s'associer aux domaines de la membrane du RTG enrichis en sphingolipides, et ainsi rentrer en contact avec la machinerie de transport apical associée à ces domaines (Lin *et coll.*, 1998). Cependant, seules les protéines capables de se lier suffisamment fortement aux éléments de la machinerie de tri pourront être effectivement transportés vers la membrane apicale.

Les observations des mutants de HA indiquent que dans certaines conditions, l'incapacité d'une protéine de s'associer avec les "glycolipid rafts" peut être suffisante pour entraîner son transport vers la membrane basolatérale. Cependant, l'inverse peut également être envisagé, à savoir qu'une partition efficace dans les DIGs prévient une association des protéines avec la voie de transport basolatérale. On peut donc envisager que les protéines GPI soient envoyées vers la membrane apicale de cette façon, sans interaction aucune avec la machinerie de tri des protéines apicales transmembranaires.

L'existence éventuelle d'un autre signal de ciblage apical a été récemment évoquée par Marzolo *et coll.* (1997). Les travaux de cette équipe montrent en effet que l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) suit un trajet apical qui n'est pas médié par les sucres N-liés, et qui n'interagit pas avec la machinerie de transport des protéines GPI. Les travaux de Alonso *et coll.* (1998), suggèrent quant à eux l'existence de plusieurs signaux de ciblage organisés de façon hiérarchique sur une même protéine transmembranaire non glycosylée de type I. Le segment transmembranaire de cette

protéine contient un signal de ciblage basolatéral, alors que son ectodomaine et son domaine cytosolique contiennent des déterminants apicaux. La protéine de type sauvage est transportée vers la membrane apicale des cellules MDCK, par une voie de transport indépendante des glycolipides. Finalement, Chuang et Sung (1998) ont décrit un signal de ciblage apical dans la queue cytosolique de la rhodopsine. Ceci indiquerait qu'une machinerie de tri cytoplasmique existerait pour les protéines apicales dans MDCK, tout comme pour les protéines basolatérales.

1.2.1.2 - Rôle de l'ancrage GPI à la surface cellulaire

Il est intéressant de remarquer ici que les glycosylphosphatidylinositols, qui sont synthétisés dans le RE en excès par rapport à la quantité nécessaire à l'ancrage des protéines, sont distribués dans le feuillet cytoplasmique de la membrane des cellules MDCK de façon non polarisée, et que leur transport n'est pas influencé par les processus de ciblage des protéines GPI (van't Hof *et coll.*, 1995).

Si le coefficient de diffusion latérale de la plupart des protéines GPI est relativement similaire à celui des phospholipides ($1-4 \cdot 10^9 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), ce qui correspond à une grande mobilité dans le plan de la membrane, on les retrouve cependant parfois regroupées dans des domaines spécialisés. L'utilisation d'anticorps pour la détection des protéines GPI à la surface cellulaire peut créer des artefacts (Mayor *et coll.*, 1994). C'est la raison pour laquelle on a longtemps cru que les protéines GPI étaient nécessairement regroupées dans les caveolae (pour revue voir Nosjean *et coll.*, 1997). En 1995, les travaux de Schnitzer suggéraient que les protéines GPI se trouvaient non pas dans les caveolae, mais autour de celles-ci (Schnitzer *et coll.*, 1995c). Kenworthy et Edidin

(1998) viennent de montrer que la protéine 5' nucléotidase est distribuée au hasard à la surface des cellules MDCK. Par contre, deux séries de résultats publiées en même temps semblent montrer que les protéines GPI se regroupent en microdomaines, dont l'intégrité dépend de la présence de cholestérol dans la membrane cellulaire (Varma et Mayor, 1998; Friedrichson et Kurzchalia, 1998). Cette divergence alimentera certainement de nombreuses recherches concernant le devenir des protéines GPI après leur arrivée à la surface cellulaire.

L'aggrégation des protéines à ancrage GPI permettrait de faciliter leur interaction avec d'autres protéines telles que des tyrosine-kinases impliquées dans l'activation cellulaire, via la sous-unité α des protéines G (Solomon *et coll.*, 1996). Dans ce cas, la transmission du signal ne dépend pas de la partie protéique des protéines GPI, mais de leur ancrage. De plus, la dégradation de l'ancrage GPI par diverses phospholipases et protéases peut donner naissance à de nombreuses molécules impliquées dans une cascade de signalisation. On peut ainsi observer l'apparition de dérivés inositol-phosphoglycane dans le milieu extracellulaire (utilisé comme signal cellulaire entre autres par l'insuline, l'interleukine-2 et certains facteurs de croissance) (Jones et Varela-Nieto, 1998), et du 1,2-diacylglycérol ou de l'acide phosphatidique dans la membrane. Les caveolae permettraient alors le regroupement des messagers dans des domaines membranaires spécifiques, facilitant leur interaction avec les autres messagers dans les diverses cascades de transmission du signal (pour revue voir Nazih et Delbart, 1998).

1.2.1.3 - Rôle de l'ancrage GPI dans la voie d'endocytose via les VRCs

Les protéines GPI intracellulaires sont majoritairement localisées dans les endosomes, et sont internalisées à des taux correspondant à ceux de la machinerie d'endocytose via les VRCs (Mayor *et coll.*, 1998). Après internalisation, les protéines GPI seraient retenues dans les endosomes de tri. Cette rétention les exposerait au milieu acide des endosomes plus longtemps que les récepteurs qui contiennent une ancre transmembranaire traditionnelle. Cette hypothèse permet d'expliquer la maturation plus efficace de la protéine ancrée par un GPI du prion scrapie, par rapport à la forme transmembranaire. Cette maturation est dépendante du pH acide des endosomes et est inhibée par une déplétion des membranes en cholestérol. L'ancre GPI serait donc dans ce cas responsable de la rétention de la protéine dans l'environnement acide des endosomes pour une durée suffisante. De plus les mécanismes de tri dépendant des domaines insolubles dans les détergents seraient toujours valides au sein de la machinerie d'internalisation via les VRCs.

1.2.2 - Signal Tyr et signal di-Leu

Différents signaux ont été mis en évidence qui, lorsqu'ils sont présents sur la portion cytosolique d'une protéine transmembranaire, entraînent son ciblage vers les vésicules recouvertes de clathrine. Ces signaux consistent en des séquences ou des motifs structuraux, et peuvent être répartis en trois groupes : (i) les signaux qui dépendent d'un

résidu tyrosine, ceux (ii) qui dépendent d'une paire de résidus leucine et ceux (iii) pour lesquels aucune séquence consensus n'a été mise en évidence. Dans les cellules épithéliales polarisées, en plus d'entraîner l'internalisation à partir de la membrane plasmique, ces signaux sont impliqués dans le tri vers les endosomes, les lysosomes, le RTG, et peuvent donc être reconnus par les protéines récepteurs à différents sites intracellulaires (Kirchhausen *et coll.*, 1997).

1.2.2.1 - Signal Tyr

L'implication d'un résidu Tyr dans un signal d'internalisation a été mise en évidence par l'étude de mutants du récepteur au LDL qui présentaient un défaut d'internalisation et par l'analyse de mutations spontanées dans ce même récepteur chez des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale (pour revue voir (Trowbridge *et coll.*, 1993).

De nombreux travaux ultérieurs ont permis de mettre en évidence l'implication d'une tyrosine dans différents signaux entraînant l'internalisation d'une protéine membranaire à partir de la membrane plasmique. L'analyse structurale des motifs Tyr semblait montrer qu'il forment un feuillet β . Les travaux récents d'Owen et Evans (1998) remettent cependant cette hypothèse en doute. Les auteurs exposent en effet des résultats concernant la structure cristalline du domaine de liaison au signal d'internalisation de $\mu 2$, complexé au signal d'internalisation des protéines TGN38 ou EGFR (pour epidermal growth factor receptor). Dans les deux cas, le peptide portant le signal adopte une conformation étendue, et non le feuillet β attendu. L'absence de séquence consensus pour le signal Tyr porte à croire cependant que c'est la structure,

plus que la séquence en acides-aminés, qui est responsable de l'interaction du signal avec les protéines adaptateurs.

1.2.2.2 - Signal di-Leu

Un motif di-Leu, suffisant pour entraîner l'endocytose de l'antigène Tac, ainsi que sa dégradation dans les lysosomes, a été mis en évidence par Letourneur et Klausner (1992). Bien qu'étant essentielles pour un ciblage correct vers les lysosomes, les deux Leu identifiées ne sont pas suffisantes pour entraîner la dégradation de l'antigène Tac. Cependant, l'analyse des résidus adjacents n'a pas permis de mettre en évidence une séquence consensus. Des motifs di-Leu ont par la suite été identifiés sur différentes protéines comme le transporteur de glucose GLUT4 (Corvera *et coll.*, 1994), ou le récepteur de l'insuline (Renfrew Haft *et coll.*, 1994). Une variante de ce signal a été mise en évidence sous la forme du doublet Leu-Ile dans la queue cytoplasmique de Limp II (Ogata et Fukuda, 1994). Dans ce cas, comme dans celui de la sous-unité CD3 γ du récepteur des cellules T (Dietrich *et coll.*, 1994), la phosphorylation d'un résidu Ser jouerait un rôle dans la présentation du signal de ciblage.

1.2.2.3 - Interaction avec les protéines adaptateur

Les nombreux travaux réalisés au cours des dernières années ont permis de mettre en évidence l'extrême diversité des signaux d'internalisation. Ceci s'applique non seulement aux signaux Tyr ou di-Leu, dont on sait qu'ils sont particulièrement dégénérés, mais aussi à tout un assortiment de séquences cytosoliques qui ne portent aucune ressemblance évidente avec les signaux classiques d'internalisation (Tableau I).

La diversité du signal pourrait être une particularité de la machinerie de transport via les VRCs, et permettrait une régulation particulièrement fine du phénomène.

Tableau I : signaux d'internalisation

Signal	Exemple de séquence signal	Protéine contenant ce signal
Signal Tyrosine (type NPXY)	FDNPVY	Récepteur LDL
Signal Tyrosine (type YXXØ)	YKYSKV	MPR cation-independant
Signal di-Leucine	DKQTLL	CD3- γ
Signal Acide	WQEECPDSEEDGRGER	Furine
Dilysine	KRFY	VIP36
Addition de l'ubiquitine	DAKSS	récepteur de l' α -facteur
Ciblage des vésicules synaptiques	EVVDIMRVNV	VAMP-2

Le code à une lettre est utilisé ici pour les acides aminés . X représente un acide aminé quelconque, et Ø un acide aminé hydrophobe volumineux. Les résidus cruciaux sont en caractères gras.

LDL : Low Density Lipoprotein, MPR : Mannose-6-Phosphate Receptor, VIP36 : vesicle integral protein 36, VAMP-2 : vesicle-associated membrane protein-2.

D'après (Kirchhausen et al., 1997).

De nombreuses observations démontrent l'interaction des signaux Tyr ou di-Leu avec les protéines adaptateurs AP-1 et AP-2. Des études de double hybride ont permis de montrer que les chaînes $\mu 1$ et $\mu 2$ interagissent avec différents signaux Tyr (Ohno *et coll.*, 1995), et des travaux de sélection combinatoire ont permis de montrer que le tri vers la voie d'endocytose peut être gouverné par une interaction simple entre la chaîne $\mu 2$ et un térapeptide contenant un résidu Tyr (Boll *et coll.*, 1996). L'analyse des déterminants structuraux importants pour l'interaction avec $\mu 1$ et $\mu 2$ a montré que la composition exacte en acides aminés du signal d'internalisation, et surtout sa position sur la chaîne peptidique, étaient deux déterminants majeurs de son interaction avec les sous-unités des

adapteurs (White *et coll.*, 1998). La comparaison de différentes protéines chimériques portant chacune un signal Tyr différent suggère l'existence d'au moins trois voies distinctes et saturables d'endocytose via les VRCs (Warrej *et coll.*, 1998). De plus, on sait maintenant que les signaux Tyr semblent interagir de façon préférentielle avec la sous-unité $\mu 2$ de AP-2 à la surface cellulaire, l'interaction avec la machinerie de tri présente au niveau du RTG étant moins importante (Ohno *et coll.*, 1996).

Les signaux di-Leu semblent médier des processus semblables à ceux qui dépendent des signaux Tyr. Il a été démontré que le ciblage dépendant des signaux di-Leu est lui aussi un phénomène saturable, qui dépend de composantes distinctes de celles mises en jeu par les signaux Tyr de type YXX \emptyset (où Y est la Tyr, X un acide aminé quelconque, et \emptyset un acide aminé à chaîne volumineuse hydrophobe (Leu, Ile, Phe, Met, Val)) (Marks *et coll.*, 1996).

On a pu mettre en évidence une interaction spécifique entre des peptides contenant un signal di-Leu et la sous-unité $\beta 1$ de l'adaptateur AP-1 au niveau du RTG (Rapoport *et coll.*, 1998). Il semblerait que les motifs di-Leu puissent interagir avec différentes molécules adaptateurs de la même façon que les signaux Tyr (Renfrew Haft *et coll.*, 1998).

Ces observations ont permis d'élaborer un modèle de transport des protéines à partir du RTG (Rapoport *et coll.*, 1997; 1998; 1998). Les protéines transmembranaires portant un signal Tyr ou di-Leu susceptible d'être reconnu par AP-1 seront capturées par AP-1 au niveau du RTG. A partir de là, elles seront envoyées vers un compartiment endosomal pour être ensuite dirigées vers des vésicules de sécrétion spécialisées ou vers les lysosomes. Les autres protéines continueront jusqu'à la membrane plasmique. A ce

niveau là, celles portant un signal susceptible d'être reconnu par AP-2 (l'affinité de cet adaptateur étant plus importante pour les signaux Tyr que pour les signaux di-Leu) seront réinternalisées. L'efficacité de chacune de ces étapes dépend de l'affinité des adaptateurs pour les différents signaux.

La mise en évidence d'un troisième complexe adaptateur, AP-3, permet d'envisager un degré de raffinement plus poussé encore pour cette machinerie de transport. On sait à ce jour que AP-3 est essentiel pour le transport de protéines cargo vers la vacuole chez la levure (Cowles *et coll.*, 1997). De plus, chez la levure, il semblerait qu'un signal di-Leu soit responsable de l'interaction entre AP-3 et la phosphatase alcaline, et du tri de cette dernière vers la vacuole (Darsow *et coll.*, 1998). Si l'on tient compte de l'homologie qui existe entre le complexe AP-3 chez la levure et chez les mammifères, et des similarités entre les deux systèmes de transport, il est possible qu'une voie de transport Golgi-lysosome mette aussi en jeu le complexe AP-3 chez les mammifères.

Malgré les différences observées, il semblerait que les sous-unités $\mu 1$, $\mu 2$ et $\mu 3$ de AP-1, AP-2 et AP-3 respectivement aient des domaines de spécificité qui se recourent (Ohno *et coll.*, 1998). Ceci impliquerait que des facteurs de régulation additionnels jouent un rôle dans le ciblage de celle-ci. La position du signal sur la protéine est un de ces facteurs, tout comme l'état d'aggrégation dans lequel elle se trouve. Par exemple, la microaggrégation causée par la liaison d'un ligand, ou par un changement d'environnement ionique lorsque la protéine traverse un compartiment cellulaire, augmenterait l'affinité de la protéine pour les adaptateurs membranaires. Aucun schéma général ne peut donc à ce jour être proposé de façon précise, et il est encore impossible

de déterminer les interactions moléculaires mises en jeu par les différents signaux au vu seulement de leur séquence en acides aminés. Il a par exemple été montré que l'habilité de AP-1 à lier la furine dépend de la phosphorylation d'un groupe d'acides aminés acides contenant deux sites pour la caséine kinase II dans la queue cytosolique de la protéine (Dittie *et coll.*, 1997). La phosphorylation par une protéine kinase C de résidus Ser avait déjà auparavant été mise en évidence comme un prérequis à l'interaction entre le signal di-Leu et les protéines adaptateurs, notamment en ce qui concerne la sous-unité CD3 γ du récepteur des cellules T (Dietrich *et coll.*, 1994). L'analyse de chaque signal putatif sur une protéine donnée est donc encore nécessaire pour pouvoir déterminer avec certitude les voies par lesquelles cette protéine transite dans la cellule.

1.2.3 - Relation entre les signaux de transport basolatéral et d'endocytose

Différents signaux, partiellement semblables aux signaux responsables de la localisation dans les vésicules recouvertes de clathrine, et pour lesquels la même classification a été adoptée (voir 1.2.2), ont été mis en évidence sur les domaines cytoplasmiques de plusieurs protéines basolatérales (Rodriguez-Boulan et Zurzolo, 1993). La séquence des signaux de transport des protéines basolatérales étant particulièrement variable, il est probable que la machinerie de tri reconnaisse un motif structural commun plutôt qu'une séquence particulière en acides aminés, comme c'est le

cas pour la machinerie de transport le long de la voie d'endocytose. Ce motif serait un feuillet β dans le cas d'un signal Tyr, mais aucune indication n'existe quant à la possibilité d'une telle structure en présence d'un signal di-Leu (Brown et Stow, 1996).

De nombreux travaux ont tenté de différencier les signaux de ciblage basolatéral d'une protéine des signaux d'intégration aux VRCs. En ce qui concerne le récepteur LDL (Mellman *et coll.*, 1993), deux signaux Tyr ont été impliqués dans le ciblage basolatéral du récepteur, et dans son internalisation dans des vésicules enrobées. Les travaux récemment présentés par Odorizzi et Trowbridge (1997) indiquent par contre que, dans le cas du récepteur de la transferrine (RT), les signaux d'internalisation et de ciblage basolatéral sont distincts et ont des caractéristiques structurales différentes. Une des hypothèses avancées pour expliquer cette observation est que le ciblage du RT vers la membrane basolatérale peut se faire soit au niveau du RTG, soit dans les endosomes. Les machineries de tri mises en jeu sont différentes dans ces deux compartiments, et reconnaissent des signaux différents.

Qu'en est-il cependant des protéines basolatérales qui portent des signaux de ciblage différents, mais sont ciblées à partir du RTG seulement? Trois différentes voies ont été décrites pour le transport des protéines vers la surface cellulaire chez la levure (Figure 5F) (Harsay et Bretscher, 1995; Roberg *et coll.*, 1997). Deux routes distinctes ont aussi été décrites vers la surface basolatérale des hépatocytes (Figure 5D) (Saucan et Palade, 1994). Ceci semblerait donc appuyer l'hypothèse selon laquelle il existe plusieurs voies de transport distinctes émergeant du RTG, et pour lesquelles différents signaux sont reconnus par des machineries de tri différentes.

En outre, il a été montré que différents types cellulaires interprètent différemment les mêmes signaux de ciblage : le motif Tyr situé dans la queue cytosolique de la sous-unité β de la protéine H,K,-ATPase entraîne la localisation de cette protéine à la membrane basolatérale des cellules MDCK, mais à la membrane apicale des cellules LLC-PK₁. De plus, la mutation de ce signal affecte le ciblage de la protéine dans les cellules MDCK, mais n'a aucun effet dans les cellules LLC-PK₁ (Roush *et coll.*, 1998). Ceci semble indiquer que chaque type de cellules épithéliales peut réguler différemment la distribution de ses protéines membranaires, afin de remplir les rôles physiologiques particuliers qui lui sont assignés.

1.3 - ENDOPEPTIDASE NEUTRE ET ENZYME DE CONVERSION DE L'ENDOTHELINE

1.3.1 - Endopeptidase Neutre ou NEP

L'endopeptidase neutre (néprilysine, NEP, E.C. 3.4.24.11) a été mise en évidence en 1974 par Kerr et Kenny dans les cellules des tubules proximaux du rein (1974a; 1974b). Cette protéine apicale est particulièrement abondante dans la bordure en brosse du rein où elle représente environ 4% des protéines totales. C'est la raison pour laquelle elle a été souvent utilisée comme modèle pour l'étude du transport apical dans les cellules épithéliales polarisées. Elle a été clonée en 1987 chez le lapin (Devault *et coll.*,

1987), chez l'humain (Malfroy *et coll.*, 1987), et chez le rat (Malfroy *et coll.*, 1988). C'est une protéine membranaire de type II qui contient une courte queue cytosolique N-terminale de 27 acides aminés, une région transmembranaire de 22 acides aminés, et un ectodomaine extracellulaire de 700 résidus. Ce domaine extracellulaire contient la séquence consensus de liaison du Zn^{2+} : HEXXH, ainsi que d'autres résidus importants impliqués dans la liaison au substrat (Roques *et coll.*, 1993; Devault *et coll.*, 1988; Beaumont *et coll.*, 1991; LeMoual *et coll.*, 1991; Dion *et coll.*, 1993; LeMoual *et coll.*, 1993; LeMoual *et coll.*, 1994; Dion *et coll.*, 1995). Bien qu'il ne semble y avoir qu'une seule forme de la protéine *in vivo*, plusieurs formes chimériques de la NEP ont été construites et exprimées dans différents types cellulaires. La figure 8 montre une représentation schématique de ces variantes, qui ont permis non seulement de mieux comprendre le fonctionnement de cette enzyme, mais aussi de l'utiliser comme modèle pour l'étude de son ciblage intracellulaire.

Le remplacement des domaines cytoplasmique et transmembranaire de la NEP par le peptide signal d'une protéine sécrétée, la pro-opiomélanocortine, a permis l'expression d'une forme sécrétée de la protéine (secNEP) dans les cellules COS-1 (Lemay *et coll.*, 1989). La caractérisation enzymatique de cette forme recombinante a permis d'établir que le domaine extracellulaire de la NEP est suffisant à l'activité de la protéine. Dans les cellules MDCK, la secNEP et la protéine native WT-NEP sont toutes deux ciblées du côté apical des cellules (Corbeil *et coll.*, 1992; Jalal *et coll.*, 1991), ce qui semble indiquer que le signal de ciblage éventuel de la protéine se situe dans son ectodomaine. Une forme de la NEP ancrée par un glycosyl-phosphatidylinositol (GPI-NEP) a été construite et exprimée dans les cellules COS-1 (Howell *et coll.*, 1994b).

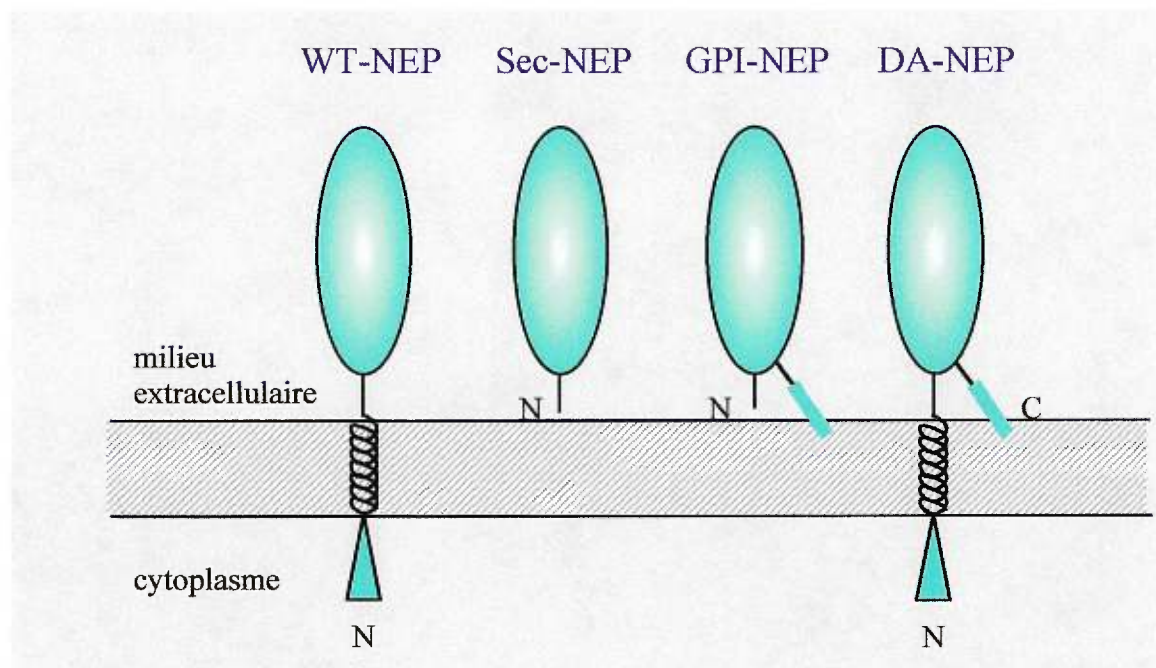


Figure 8 : Représentation schématique des diverses formes de l'endopeptidase neutre (NEP).

WT-NEP, NEP de type sauvage; Sec-NEP, forme sécrétée de la NEP; GPI-NEP, NEP à ancrage glycosyl-phosphatidylinositol; DA-NEP, NEP à double ancrage.

Cette forme a une sensibilité aux inhibiteurs comparable à celle de la protéine sécrétée et un Km pour la [D-Ala²,Leu⁵]enkephaline similaire à celui de l'enzyme native. Enfin, une forme de la NEP contenant l'ancre transmembranaire de la protéine native en plus d'un ancrage GPI C-terminal a été construite et exprimée dans les cellules COS-1 (Howell *et coll.*, 1994a). Cette NEP à double ancrage (DA-NEP), retrouvée à la surface cellulaire, a également des caractéristiques enzymatiques comparables à celles de l'enzyme native.

1.3.2 - Enzyme de conversion de l'endothéline ou 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). 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), avant d'être finalement maturée en endothéline par l'ECE (pour revue voir Turner et Tanzawa, 1997; Ortega Mateo et De Artinano, 1997). On a isolé différents ADNc, qui codent pour trois formes de l'ECE : 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). Ces métallopeptidases à zinc ont des similarités de séquence importantes avec la NEP (Valdenaire *et coll.*, 1995) (Voir figure 9). 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,

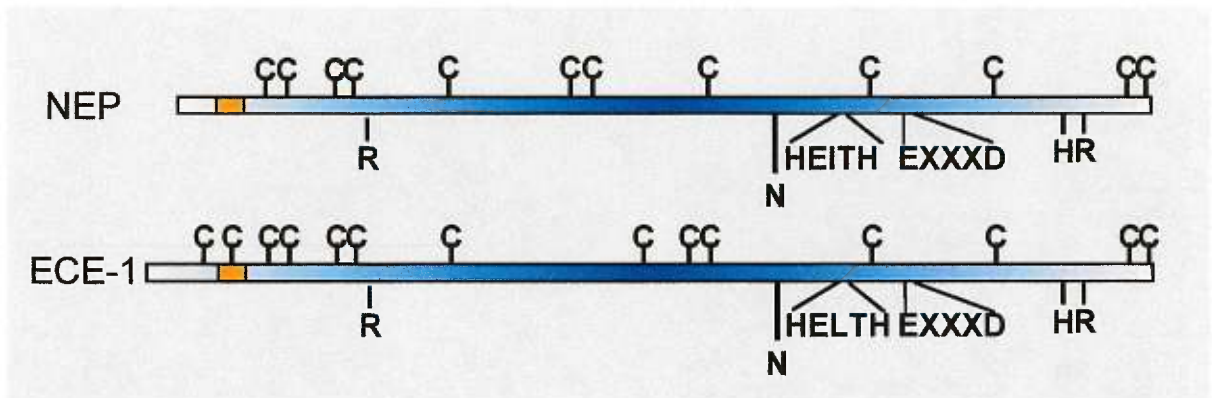


Figure 9 : Structures primaires de l'endopeptidase neutre (NEP) et de l'enzyme de conversion de d'endothéline (ECE-1).

Le segment transmembranaire est représenté en orange. Les acides aminés sont représentés suivant le code à une lettre. Les acides aminés impliqués dans le site catalytique sont indiqués sous chacune des protéines.

mais la conversion de big-endothéline en endothéline mature se fait principalement dans les cellules endothéliales. C'est certainement le cas de l'endothéline-1.

Trois 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) et ECE-1c (Schweizer *et coll.*, 1997). Ces trois isoformes sont codées par le même gène par le biais de trois promoteurs différents (Orzechowski *et coll.*, 1997), et ne diffèrent que par la séquence de leur domaine cytosolique N-terminal (Shimada *et coll.*, 1995).

Les trois isoformes de l'ECE-1 ont une distribution tissulaire qui varie d'une forme à l'autre. De plus la localisation intracellulaire de ces trois protéines varie (Schweizer *et coll.*, 1997). L'ECE-1b est la seule isoforme présente dans des vésicules intracellulaires (Schweizer *et coll.*, 1997; Azarani *et coll.*, 1998). ECE-1c, qui correspond à une forme tronquée de ECE-1b amputée e ses 17 premiers acides aminés, est majoritairement présente à la surface cellulaire. On n'en retrouve que 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 dans la lignée de cellules épithéliales polarisées MDCK.

1.4 - OBJECTIFS DU PRÉSENT TRAVAIL ET STRATÉGIES DÉVELOPPÉES

Les cellules eucaryotes ont développé des machineries complexes pour distribuer les protéines et les lipides dans différents compartiments situés en aval de l'appareil de Golgi. Contrairement au modèle qui a longtemps prévalu, on sait aujourd'hui que le

transport des protéines vers la membrane cellulaire n'est pas un processus par défaut. Une protéine membranaire peut emprunter de nombreuses routes qui émergent du RTG pour se diriger soit vers la surface cellulaire, soit vers un organite intracellulaire. De nombreux travaux ont été réalisés au cours des dernières années, qui permettent d'éclairer certaines de ces voies de transport. On comprend notamment de mieux en mieux la machinerie impliquée dans la formation de certaines vésicules (Weber *et coll.*, 1998) et les différents signaux responsables de l'envoi d'une protéine dans un type donné de vésicules.

1.4.1 - Rôle de l'ancrage GPI dans le choix d'une voie de transport entre le RTG et la surface cellulaire

L'ancrage GPI, que l'on retrouve sur diverses protéines ancrées à la membrane, a été identifié comme signal de ciblage apical dans plusieurs types cellulaires, dont les cellules MDCK. Ces cellules sont à ce jour le modèle le plus utilisé pour les travaux concernant le ciblage des protéines dans les cellules épithéliales polarisées (Lisanti *et coll.*, 1988; Lisanti *et coll.*, 1989; Zurzolo *et coll.*, 1994; Arreaza et Brown, 1995). L'ancrage GPI permettrait l'association des protéines avec la machinerie de transport apicale au niveau du RTG. Cette association peut être mise en évidence par l'insolubilité des protéines dans les détergents tels que le Triton X-100 (Brown et Rose, 1992).

Les méthodologies employées pour arriver à de telles conclusions suscitent diverses critiques. Les protéines chimériques construites pour vérifier que l'addition d'un ancrage GPI permet effectivement de rediriger une protéine basolatérale vers la membrane apicale de cellules MDCK ont été construites en remplaçant l'ancrage transmembranaire original par un ancrage GPI (Arreaza et Brown, 1995). Si cette stratégie permet effectivement de tester l'influence de l'addition de l'ancrage GPI sur une protéine, elle ne permet pas d'interpréter les conséquences de l'enlèvement de l'ancrage transmembranaire.

De plus, la théorie des "glycolipid rafts", développée principalement par l'équipe de Kai Simons (pour revue voir Simons et Ikonen, 1997), implique l'association de toutes les molécules apicales avec ces vésicules dans les cellules MDCK. Certains travaux montrent cependant que les protéines apicales sécrétées atteignent le milieu extracellulaire sans interagir avec les vésicules insolubles dans le Triton X-100 (Graichen *et coll.*, 1996). Des observations semblables avaient été faites auparavant sur des protéines membranaires et sécrétées, transportées vers le domaine basolatéral dans des vésicules de transport distinctes (Boll *et coll.*, 1991).

L'utilisation des diverses formes de la NEP construites précédemment dans notre laboratoire (Figure 8) nous a semblé être un excellent moyen pour déterminer le rôle joué par l'ancrage GPI dans le choix d'une vésicule de transport vers la membrane apicale des cellules MDCK. En utilisant la forme à double ancrage de la NEP (DA-NEP), et en comparant son comportement à celui de la protéine native et à celui de la GPI-NEP, on peut en effet déterminer l'effet net de l'addition de l'ancrage GPI, sans avoir à tenir compte de l'enlèvement de l'ancre transmembranaire. De plus, les trois protéines étant

ciblées du côté apical des cellules MDCK, nous avons voulu déterminer s'il existait effectivement un ou plusieurs types de vésicules de transport entre le RTG et la membrane apicale.

Pour ce faire, après avoir mis en place des lignées stables de cellules MDCK exprimant GPI-NEP et DA-NEP, nous avons comparé la cinétique d'apparition de ces protéines à la membrane cellulaire avec celle de WT-NEP dans les mêmes cellules (Jalal *et coll.*, 1991). Il a ensuite été possible, par des expériences de "pulse-chase" dans différentes conditions, et en isolant sur gradient de sucrose les protéines insolubles dans le Triton X-100 à 4°C avant immunoprécipitation de la NEP, de déterminer lesquelles des formes chimériques de la NEP restaient solubles dans ce détergent tout au long de leur transport vers la surface cellulaire.

Le premier article présenté ici montre que DA-NEP et GPI-NEP, initialement synthétisées sous une forme soluble dans le Triton X-100 au niveau du RE, deviennent insolubles dans ce détergent au niveau de l'appareil de Golgi. Ces protéines s'associeraient donc à des vésicules enrichies en glycosphingolipides et en cholestérol à cet endroit de la cellule (Brown et Rose, 1992). WT-NEP au contraire reste soluble dans le Triton X-100 tout le long de la voie de transport dans les cellules MDCK. Il semble donc que non seulement l'ajout de l'ancrage GPI entraîne l'association de la protéine aux "glycolipid rafts", mais aussi que le signal de ciblage porté par l'ancre GPI soit dominant sur le signal présent dans la NEP de type sauvage.

1.4.2 - Identification du signal de rétention intracellulaire de ECE-1b

Différentes études proposent des conclusions opposées concernant la maturation de l'endothéline par l'ECE. Certaines d'entre elles indiquent que l'activité majeure de l'ECE est réalisée en tant qu'ectoenzyme, c'est à dire à la surface cellulaire (Harrison *et coll.*, 1993; Corder *et coll.*, 1995; Takahashi *et coll.*, 1995). D'autres suggèrent que l'ECE est surtout active dans un compartiment intracellulaire (Gui *et coll.*, 1993). Le clonage de différentes isoformes de l'ECE-1, et l'identification de l'ECE-1b comme forme intracellulaire localisée au niveau de l'appareil de Golgi des cellules CHO et de la lignée de cellules endothéliales HUVEC (Schweizer *et coll.*, 1997), ou dans les endosomes des cellules MDCK (Azarani *et coll.*, 1998), ont récemment permis de valider les observations rapportées précédemment. Il nous a alors paru intéressant de chercher à déterminer la nature du signal qui contrôle la rétention intracellulaire de l'ECE-1b. L'identification d'un tel signal nécessite deux vérifications complémentaires : (i) le signal isolé doit permettre l'internalisation d'une protéine rapporteur normalement exprimée à la surface cellulaire, et (ii) des mutations ponctuelles au sein de ce signal doivent inhiber, au moins partiellement, la rétention de la protéine au sein de la cellule.

La seule différence entre l'ECE-1b et l'ECE-1c résidant dans les 17 acides aminés N-terminaux de ECE-1b, il nous a paru probable qu'un éventuel signal de ciblage se situe dans cette portion de la chaîne polypeptidique. Les similitudes de structure qui existent entre l'ECE et la NEP, et la disponibilité des outils immunologiques pour la NEP dans notre laboratoire nous ont poussé à réaliser différentes constructions de

chimères ECE-NEP. Le deuxième article présenté dans le cadre de cette thèse expose les observations que nous avons pu réaliser concernant le ciblage de ces différentes chimères.

Dans un premier temps, nous avons choisi de construire une protéine comprenant la totalité des segments cytosolique et transmembranaire de l'ECE-1b fusionnés à l'ectodomaine de la NEP. La localisation intracellulaire de cette protéine chimérique, observée en immunohistochimie, et confirmée par des expériences d'immunoprécipitation de surface, suggère la présence d'un ou de plusieurs signaux de rétention intracellulaire sur la portion ECE-1b de la chimère. Le même type de résultat observé pour une chimère comprenant les 17 acides aminés N-terminaux de ECE-1b fusionnés à la NEP de type sauvage, nous a permis de conclure à la présence d'un tel signal dans cette portion de l'ECE-1b. La diminution du taux de rétention intracellulaire subséquente à la mutation des résidus Leu¹² et Leu¹³ en Ala dans cette chimère nous a ensuite permis d'identifier ces deux résidus comme faisant partie intégrante du signal de localisation intracellulaire de l'ECE-1b.

CHAPITRE 2 - PREMIER ARTICLE

BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA

BBA

Biochimica et Biophysica Acta 1415 (1998) 1–9

Role of the glycosyl-phosphatidylinositol anchor in the intracellular transport of a transmembrane protein in Madin-Darby canine kidney cells

Françoise Cailler, Steven Howell ¹, Philippe Crine *

Université de Montréal, Faculté de Médecine, Département de Biochimie, P.O. Box 6128, succursale Centre ville, Montréal, Que. H3C 3J7, Canada

Received 26 May 1998; accepted 19 August 1998





ELSEVIER

Biochimica et Biophysica Acta 1415 (1998) 1–9

BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA

BBA

Role of the glycosyl-phosphatidylinositol anchor in the intracellular transport of a transmembrane protein in Madin-Darby canine kidney cells

Françoise Cailler, Steven Howell¹, Philippe Crine^{*}

Université de Montréal, Faculté de Médecine, Département de Biochimie, P.O. Box 6128, succursale Centre ville, Montréal, Que. H3C 3J7, Canada

Received 26 May 1998; accepted 19 August 1998

Abstract

In order to compare the trafficking of proteins with different membrane anchors, we have constructed and expressed three different recombinant forms of neutral endopeptidase (NEP) in MDCK cells. The wild type form of NEP (WT-NEP) is attached to the plasma membrane by a single N-terminal membrane spanning domain, whereas the glycosylphosphatidylinositol-anchored form of the protein (GPI-NEP) contains a C-terminal GPI anchor. A double anchored form of NEP (DA-NEP) was also constructed, that contains both the original N-terminal membrane spanning domain and a C-terminal GPI anchor. We show here that WT-NEP, GPI-NEP and DA-NEP, which are all apically targeted in MDCK cells, behave differently when subjected to Triton X-100 solubilisation: despite the presence of the transmembrane anchor DA-NEP behaves as a GPI-anchored protein. This suggests that the GPI anchor of DA-NEP is dominant over the transmembrane anchor of the native protein to determine its pattern of solubility in Triton X-100. © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Glycosyl-phosphatidylinositol; MDCK cells; GPI-anchored protein; Triton-X 100; Membrane protein

Abbreviations: MDCK, Madin-Darby canine kidney cells; TGN, *trans*-Golgi network; GPI, glycosyl-phosphatidylinositol; FRT, Fisher rat thyroid; PLAP, placental alkaline phosphatase; NEP, neutral endopeptidase; WT-NEP, wild-type NEP; GPI-NEP, GPI-anchored NEP; DA-NEP, double anchored NEP; RER, rough endoplasmic reticulum; Endo H, endo- β -*N*-acetylglucosaminidase H; PI-PLC, phosphatidylinositol-phospholipase C

^{*} Corresponding author. Fax: +1 (514) 343-2210; E-mail: crinep@bch.umontreal.ca

¹ Present address: Unilever Research, Colworth House, Sharnbrook, Bedford MK44 1LQ, UK.

1. Introduction

Polarised epithelial cells are characterised by the existence of tight junctions that join adjacent cells and separate their plasma membrane into distinct apical and basolateral domains. This cell polarity is necessary to the diverse functions of secretion, absorption, and ion transport in epithelia [1,2]. In addition to its specific protein composition, the apical membrane is also enriched in sphingolipids, especially glycosphingolipids [3]. This particular lipid composition serves as a protection against harsh environmental conditions.

Madin-Darby canine kidney cells (MDCK) pro-

vide a useful model for the study of proteins and lipids trafficking in epithelial cells. In these cells, apical and basolateral membrane proteins are confined to separate transport vesicles that emerge from the TGN to reach the appropriate membrane domain [1,4].

Membrane proteins that are exposed to the cell surface can be anchored in the plasma membrane either by one or more hydrophobic amino acid segments or a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) anchor [5–7]. In the latter case, proteins have been shown to be targeted to the apical membrane of epithelial cells [8] in a vast majority of epithelial cell lines, including MDCK cells. During their sorting to the apical membrane, it has been suggested that GPI-anchored proteins associate in the Golgi apparatus with domains or rafts that are enriched in glycosphingolipids, sphingomyelin and cholesterol [9,10]. In MDCK cells these domains can be isolated by virtue of their low density and their insolubility in Triton or CHAPS at low temperature [11,12]. From the TGN, these glycolipid rafts are thought to bud into vesicles that are stabilised by intermolecular hydrogen bonds and carry the GPI-anchored proteins to the apical surface [10,13]. In MDCK cells these rafts were shown to be distinct from the basolaterally directed vesicles [4].

Here we wanted to determine the importance of the GPI anchor for Triton X-100 solubility and transport to the cell surface. For that purpose we compared the behaviour of variants of neprilysin (EC 3.4.24.11, neutral endopeptidase, NEP) differing by their membrane anchor. NEP is a major component of the brush border membrane of epithelial cells of the kidney proximal tubule and intestine (reviewed in [14]). In its native state wild-type NEP (WT-NEP) is a type II membrane protein anchored by a hydrophobic segment located at its N-terminus. GPI-anchored NEP (GPI-NEP) is a constructed chimaeric form of NEP lacking the original N-terminus hydrophobic segment, and attached to the cell membrane by a C-terminus GPI anchor [15]. Double anchored NEP (DA-NEP) contains both the N-terminal transmembrane anchor of WT-NEP and a C-terminal GPI anchor [16,17]. DA-NEP constitutes a unique protein model, which allows monitoring directly the effect of a GPI anchor when added to a transmembrane protein. This strategy can thus distinguish be-

tween the effects of the removal of the transmembrane anchor and those of the GPI addition, contrary to previous reports on the targeting of a chimaeric GPI anchored protein [18].

As expected, the three chimaeric enzymes were targeted to the apical membrane of MDCK cells. They also were shown to have an enzymatic activity comparable to that of the native membrane-bound NEP purified from kidney brush border membranes [15,16,19,20]. Moreover, at the steady state, WT-NEP was recovered in fractions of sucrose gradients corresponding to Triton X-100-soluble proteins, whereas GPI-NEP and DA-NEP partitioned in light fractions together with Triton X-100-insoluble proteins. In pulse-chase studies WT-NEP, GPI-NEP and DA-NEP were initially found as soluble proteins. Both GPI-NEP and DA-NEP acquired Triton-insolubility only after a chase time corresponding to transfer of newly synthesised molecules to the Golgi apparatus. When chase incubation was repeated at 20°C to prevent targeting of newly synthesised molecules to the cell surface, GPI-NEP and DA-NEP were still recovered as Triton X-100-insoluble proteins. Our results suggest that Triton insolubility is acquired only when GPI-anchored forms of NEP reach an intracellular compartment tentatively identified here as the Golgi apparatus.

2. Experimental procedures

2.1. Expression vectors and cell lines

Construction of the vectors pRcCMVGPINEP and pRcCMVDANEP encoding respectively GPI-NEP and the DA-NEP is described in [16]. They were transfected into MDCK cells using the CaPO₄ precipitation method [21]. The neomycin analogue G418 was used to select pools of resistant MDCK cells. The isolation of MDCK cells expressing GPI-NEP or DA-NEP was then performed with a Fluorescence-Activated Cell Sorter as described in [22]. Construction of the stable cell line expressing WT-NEP is described in [22].

2.2. Culture of MDCK cells

MDCK cells were cultured as described in [22]. All

the experiments on transfected cells were performed within 50 subsequent passages. Before each experiment, cells were incubated overnight in medium containing 10 mM sodium butyrate to enhance the production of NEP.

2.3. Immunofluorescence

The guinea pig polyclonal antibody raised against rabbit NEP was described earlier [23]. The antibody recognises WT-NEP, GPI-NEP and DA-NEP. The monoclonal anti-NEP antibody 2B12 recognises an

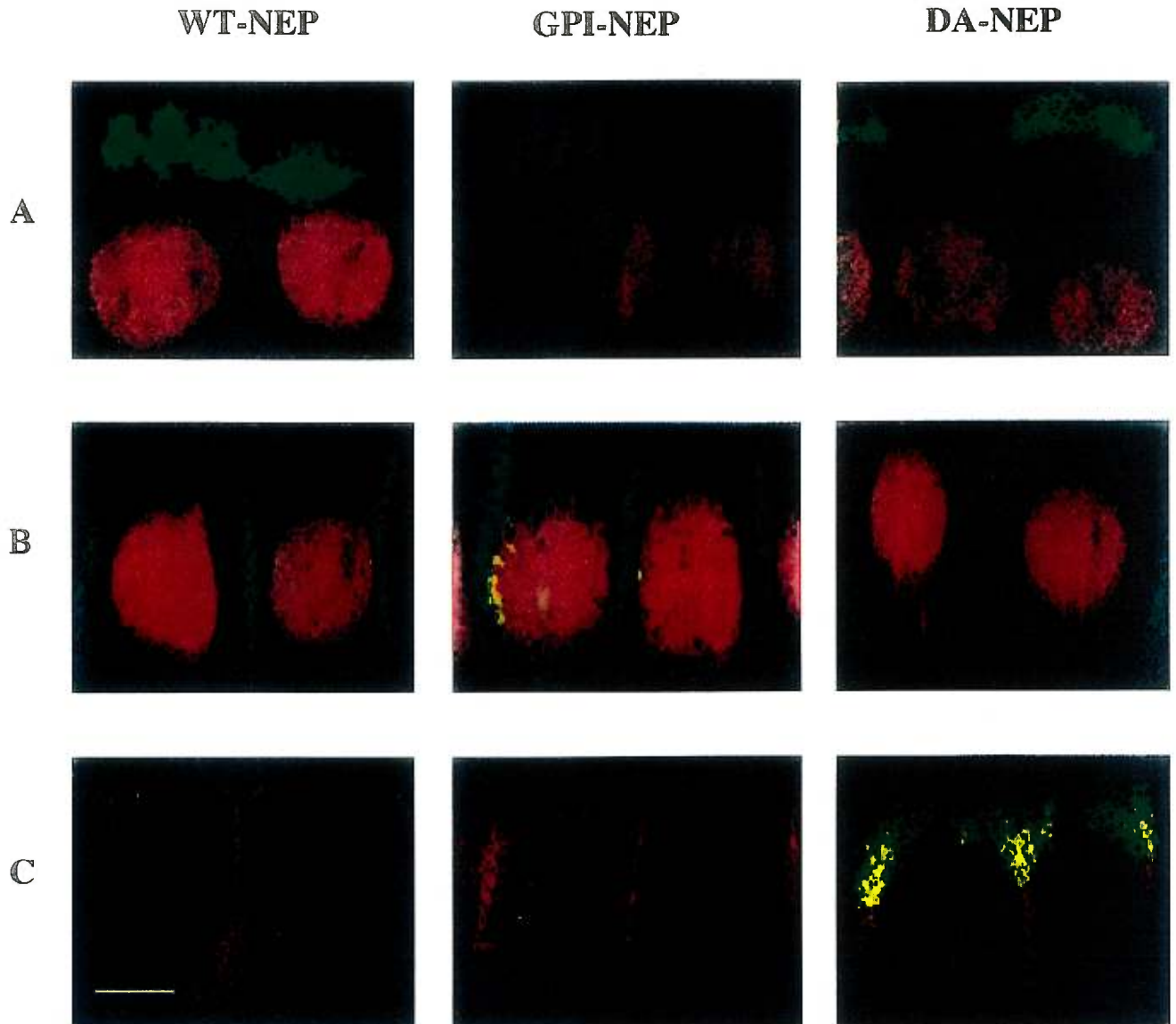


Fig. 1. Localisation of transfected NEP in MDCK cells: vertical optical sections. MDCK cells expressing either WT-NEP, GPI-NEP or DA-NEP, as indicated at the top of the figure, were grown on filters to form a polarised monolayer, fixed, and stained immunocytochemically for NEP, using antibodies that recognise both forms of the protein, or for E-cadherin. Scale bar: 20 μm . (A) The cells were labelled with a monoclonal anti-NEP antibody followed by labelling with FITC-conjugated anti mouse IgG (green). For a better definition of the cell orientation, nuclei were stained with propidium iodide (red). (B) The cells were labelled with a monoclonal anti-cadherin antibody revealed with FITC conjugated anti-mouse IgG (green) and propidium iodide for visualisation of the nuclei (red). (C) For a better definition of the apical versus basolateral membrane, the cells were labelled with guinea pig polyclonal anti-NEP antibody (green) and co-stained for the lateral protein E-cadherin (red).

extracellular conformational epitope on rabbit NEP [24]. The monoclonal antibody against the lateral-membrane E-cadherin was a generous gift of Dr. I.R. Nabi (University of Montreal). Rhodamine-conjugated anti-guinea pig antibody was purchased from Jackson Labs. FITC-conjugated anti-guinea pig antibody came from Chemicon. Anti-mouse FITC- or rhodamine-conjugated antibodies were from Dako-patts a/s. Indirect immunofluorescence staining was performed on cells grown to confluence in Costar Transwell cell culture chambers essentially as described [25]. Filters were visualised in a dual channel laser scanning confocal microscope (Scanning confocal microscope Bio-Rad MRC 600 Ar–Kr laser).

2.4. Cell-surface immunoprecipitation and pulse-chase studies

MDCK cells expressing various recombinant forms of NEP were metabolically labelled with Trans[³⁵S] label (ICN biomedical) and cell-surface immunoprecipitation was performed exactly as described previously [15,22]. Treatment with endo- β -N-acetyl-glucosaminidase H (Endo H; New England Biolabs) was performed as described by the manufacturer.

2.5. Sucrose gradients

Sucrose gradient analysis of Triton X-100-insoluble residue was performed as previously described [11]. Fractions of 1 ml were harvested from the top of the gradient. NEP was then immunoprecipitated from each fraction using the polyclonal antibody against NEP before being subjected to SDS-PAGE. Radiolabelled proteins were visualised by fluorography. For non-radioactive proteins Western blotting was performed with a monoclonal anti-(rabbit NEP) antibody that recognises all the different forms of the NEP.

3. Results

3.1. Apical expression of WT-NEP, GPI-NEP and DA-NEP in MDCK cells at steady state

Confocal immunofluorescence microscopy of

MDCK cells grown on filters reveals a clear apical localisation for WT-NEP, GPI-NEP and DA-NEP (Fig. 1A,C). E-cadherin is visible exclusively on the lateral membrane of MDCK cells (Fig. 1B,C). Negative controls were done by omitting the primary antibody against either NEP or E-cadherin and showed no labelling of these proteins for any of the three stable cell lines (data not shown), thus confirming the specificity of the antibodies used. Moreover, as labelling was performed after permeabilisation of the cells, a lack of intracellular staining indicates that at the steady state, the vast majority of these three forms of NEP are present at the apical surface of MDCK cells.

3.2. WT-NEP, GPI-NEP and DA-NEP transit rapidly from the Golgi apparatus to the cell surface

To determine the kinetics of the intracellular transport of the various forms of NEP from their site of synthesis in the rough ER to the cell surface, cells were pulsed for 15 min in medium containing [³⁵S]Met and chased as indicated in Fig. 2. NEP immunoreactive material was immunoprecipitated, and treated with Endo H. NEP-related molecules were then analysed by SDS-PAGE. Fig. 2 shows that for WT-NEP and DA-NEP, Endo H resistance is observed between 20 and 40 min after the beginning of the chase. At that time it is thus likely that most of these NEP-related molecules have passed through the Golgi apparatus where Endo H resistance is ac-

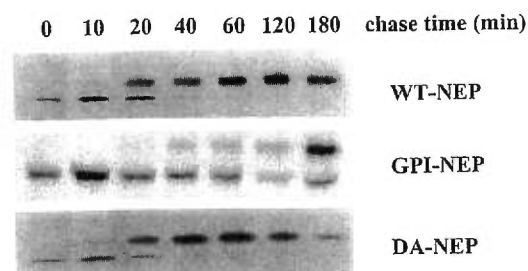


Fig. 2. Kinetics of passage through the Golgi apparatus of WT-NEP, GPI-NEP and DA-NEP. MDCK cells expressing either WT-NEP, GPI-NEP or DA-NEP were labelled with [³⁵S]methionine for 15 min before being chased for the indicated times. Cells were then solubilised in 1-*O*-*n*-octyl- β -D-glucopyranoside and NEP was immunoprecipitated from the lysates, before being subjected to Endo H digestion. Proteins were resolved by SDS-PAGE and visualised by fluorography.

quired. Fig. 2 also shows that for GPI-NEP, Endo H resistance first appears after 40 min of chase. However, an important proportion of the protein is still sensitive to Endo H after 180 min of chase, suggesting that the protein is trapped somewhere between its site of synthesis in the ER and the *cis*-Golgi where complex glycosylation occurs.

To determine the kinetics of appearance of WT-NEP, GPI-NEP and DA-NEP at the cell surface, MDCK cells were pulsed for 15 min in medium containing [³⁵S]Met and chased at 37°C as indicated in Fig. 3 before being subjected to cell-surface immunoprecipitation. For both WT-NEP and DA-NEP, the protein was found to appear at the cell surface between 20 and 40 min after the beginning of the chase. By comparing the time of transport through the Golgi apparatus with that of cell-surface delivery, it can be seen that transport from the Golgi to the cell surface of these two forms of NEP occurs very rapidly in MDCK cells. The same experiment was performed on MDCK cells expressing GPI-NEP. Fig. 3

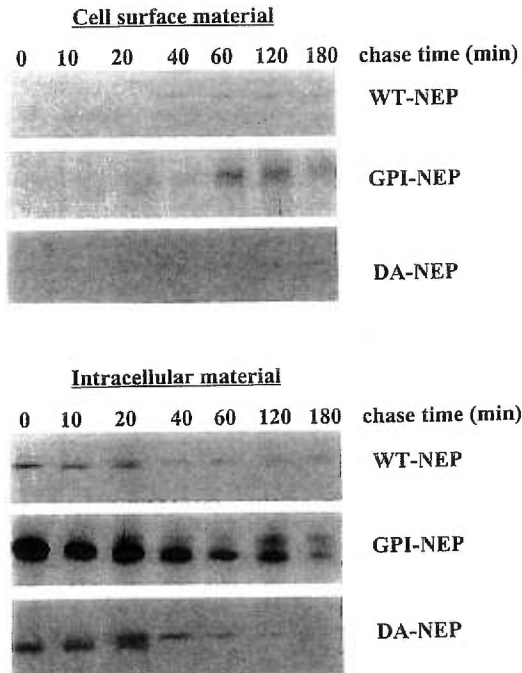


Fig. 3. NEP cell-surface immunoprecipitation. MDCK cells expressing either WT-NEP, GPI-NEP or DA-NEP were labelled with 100 μ Ci [³⁵S]methionine before being subjected to various chase times. Cell-surface immunoprecipitation of NEP was then performed as described in Section 2. Shown here are fluorographs of cell-surface NEPs and fluorographs of the intracellular proteins.

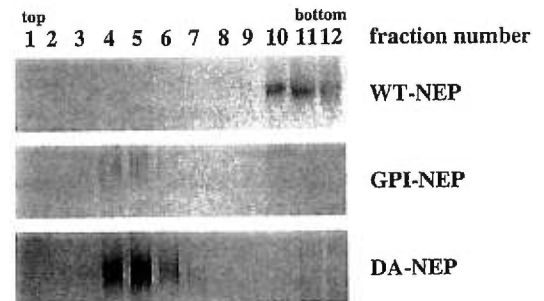


Fig. 4. Distribution of WT-NEP, GPI-NEP and DA-NEP on sucrose density gradients at steady state. Confluent MDCK cells stably expressing either WT-NEP, GPI-NEP or DA-NEP were lysed in Triton X-100 at 4°C and subsequently homogenised with 8 strokes of a Dounce homogeniser before being run through a linear 5–30% sucrose gradients. Fractions of 1 ml were collected from the top of the gradient after centrifugation to equilibrium and a sample of each was submitted to SDS-PAGE and Western blotting with the monoclonal antibody 18B5 that recognises all forms of NEP. WT-NEP is enriched in the heavy fractions of the gradient (fractions 10–12), whereas GPI-NEP and DA-NEP are enriched in the low density fractions 4–6. Top and bottom of the gradient are indicated on the figure.

shows that this protein appears at the cell surface only between 40 and 60 min after the beginning of the chase. Thus, although GPI-NEP seems to be retained in the ER longer than WT-NEP and DA-NEP, it appears at the cell surface almost immediately after its mature form is detected. As can be observed on the bottom part of Fig. 3, the apparition of cell-surface material is simultaneous with a diminution of the intracellular immunoreactive proteins for the three chimeras.

In the previously reported secNEP construct, the original transmembrane domain of WT-NEP was replaced by the pro-opiomelanocortin signal peptide. The resulting chimaeric protein retains full enzymatic activity, and is apically secreted in MDCK cells [23,26]. The maturation and cell-surface delivery of both secNEP and GPI-NEP were found to be slower than for WT-NEP. Thus it seems that the presence of the N-terminus transmembrane anchor of NEP would be necessary for either the proper folding of the protein or its eventual association with a chaperone protein in the ER. Moreover, as was already discussed by Howell et al. [15], the addition of the GPI anchor reverses the topology of the ectodomain. This too may result in a longer time for the correct

6

F. Cailler et al. / Biochimica et Biophysica Acta 1415 (1998) 1–9

folding of the protein and hence for its exit from the ER.

3.3. DA-NEP and GPI-NEP associate with low density fractions at steady state whereas WT-NEP is recovered with the soluble proteins

To study the detergent partition of the different forms of NEP at the cell surface, MDCK cells expressing either WT-NEP, GPI-NEP or DA-NEP were grown to confluence before being lysed in Triton X-100 and subsequently fractionated on a sucrose gradient as described in Section 2. An aliquot of each fraction was then subjected to SDS-PAGE and Western blotting using NEP-specific monoclonal antibody 18B5 [27]. As seen in Fig. 4, WT-NEP is recovered in the higher density fractions of the gradient together with Triton X-100-soluble proteins. In contrast, GPI-NEP and DA-NEP, which both contain a GPI anchor, partition in the light fractions where the GPI-anchored proteins that associate with low-density lipids are usually recovered [11,18,28–30]. The behaviour of DA-NEP indicates that the GPI anchor is the dominant determinant for the partition of NEP into low-density fractions after Triton X-100 solubilisation at low temperature.

At that stage we cannot exclude the possibility that the behaviour of these chimaeric forms of NEP is an artefact of the extraction procedure due to some peculiar physico-chemical properties of the chimaeric

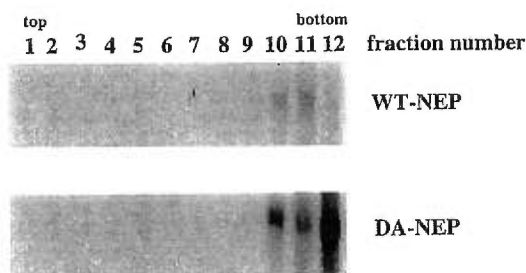


Fig. 5. Sucrose density gradient analysis of WT-NEP and DA-NEP after a 15 min pulse. Confluent MDCK cells stably expressing WT-NEP or DA-NEP were pulse-labeled with [35 S]methionine at 37°C before lysis in Triton X-100 at 4°C. Lysates were then fractionated on sucrose gradients as described in Section 2. NEP was immunoprecipitated from the fractions before being subjected to SDS-PAGE and fluorography. Fraction 1 is the top of the gradient. Both WT-NEP and DA-NEP are enriched in the heavy fractions at the bottom of the gradients when still located in the ER.

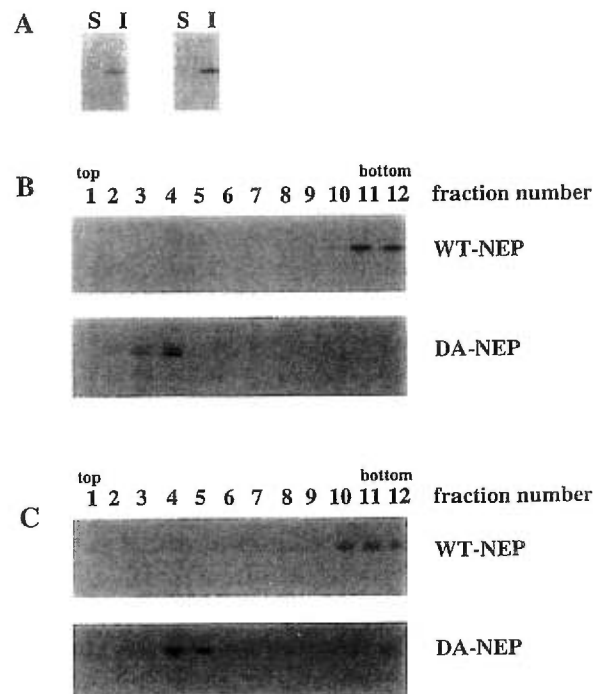


Fig. 6. Sucrose density gradient analysis of WT-NEP and DA-NEP after a 90 min chase at 20 or 37°C. Confluent MDCK cells expressing either WT-NEP or DA-NEP were pulse labeled with 100 μ Ci [35 S]methionine before a 90 min chase at either 20°C (A and B) or 37°C (C). (A) Cell-surface immunoprecipitation of WT-NEP or DA-NEP after the 20°C chase. Lanes S: cell-surface material. Lanes I: intracellular material. (B and C) Cells were lysed in Triton X-100 at 4°C after the 90 min chase. The cell lysates were then subjected to sucrose gradient fractionation. NEP was immunoprecipitated from 1 ml fractions, counted from top to bottom of the gradient, and analysed by fluorography.

proteins. To rule out this possibility, we decided to study the partition of newly synthesised NEP molecules at different stages of their intracellular transport. Indeed, GPI addition occurs in the rough ER within minutes after translocation of the newly synthesised molecule [31–33] whereas detergent insolubility is acquired only when the protein reaches the glycolipid rafts in the Golgi complex [11,10].

3.4. Newly synthesised DA-NEP is soluble in Triton X-100 when still in the rough ER

Cells expressing either WT-NEP or DA-NEP were pulsed for 15 min in medium containing [35 S]Met and immediately lysed in Triton X-100 at 4°C. Cell lysates were centrifuged on sucrose gradients and

NEP-related molecules were immunoprecipitated from each fraction. Immunoprecipitates were then analysed by SDS-PAGE and fluorography. After the 15 min pulse, WT-NEP and DA-NEP were found to contain Endo H sensitive oligosaccharide side chains (see Fig. 2). Fig. 5 shows that at that stage, WT-NEP and DA-NEP are both recovered from bottom of the gradient, colocalising with the Triton X-100-soluble proteins.

3.5. The insolubility of DA-NEP in Triton X-100 appears in the Golgi apparatus

It was previously observed that by cultivating MDCK cells at reduced temperature (20°C) the transport of proteins is blocked in the Golgi, whereas their glycosylation program was at least partially completed [34].

Cells were pulsed for 15 min in medium containing [³⁵S]Met at 37°C, and chased for 90 min at 20°C. Cell-surface immunoprecipitation in these conditions shows that WT-NEP and DA-NEP were still localised inside the cell (Fig. 6A). Separation of Triton X-100 lysates on sucrose gradients shows that WT-NEP colocalises with Triton X-100-soluble proteins in the bottom fractions of the sucrose gradient whereas DA-NEP is found in the light fractions (Fig. 6B). This pulse-chase experiment was repeated in the same conditions except that the chase incubation was done at 37°C. In this case WT-NEP colocalises with Triton-soluble proteins whereas DA-NEP migrates to the light fractions of the gradient, with Triton-insoluble proteins (Fig. 6C). Under those conditions proteins have reached the cell surface and exhibit the same behaviour as non-labelled molecules previously recovered at the steady state.

3.6. GPI-NEP behaves like DA-NEP

In order to verify that the behaviour observed for DA-NEP was a direct consequence of the presence of the GPI anchor, we performed the same type of experiments with the MDCK cell-line stably expressing GPI-NEP. As a consequence of the delayed cell-surface delivery for this form of NEP, we had to treat the immunoprecipitated material with Endo H to determine the form of the protein that was present at each time-point throughout the kinetic experi-



Fig. 7. Localisation of GPI-NEP on a sucrose gradient after a 90 min chase at 37°C. Confluent MDCK cells expressing GPI-NEP were pulse labeled with 100 μ Ci [³⁵S]methionine before a 90 min chase at 37°C. Cells were lysed in Triton X-100 at 4°C after the chase. Cell lysates were then subjected to sucrose gradient fractionation, and NEP was immunoprecipitated from 1 ml fractions. The immunoprecipitated material was subjected to Endo H digestion before being analysed by SDS-PAGE and fluorography.

ment. At the end of a 15 min pulse, with [³⁵S]Met, immediately followed by lysis of the cells in Triton X-100 at 4°C, fully Endo H-sensitive GPI-NEP was recovered in the high density fractions of the gradient (data not shown), as was previously observed for both WT-NEP and DA-NEP (see Fig. 5).

After an additional 90 min chase at 37°C, part of GPI-NEP is still Endo H sensitive (see Fig. 2), suggesting these molecules have not yet reached the *cis*-Golgi. These proteins however are fully soluble in Triton X-100 and consequently localise at the bottom of the gradient. Moreover, when the proteins acquire Endo H resistance, they shift from the high-density to the low-density fractions of the sucrose gradients (from lanes 10–12 to lanes 4–5 in Fig. 7). Thus the association of GPI-NEP with the low-density material occurs shortly after the acquisition of complex carbohydrate side chains in the Golgi apparatus, as indicated by the presence of high molecular weight bands in lanes 10–12 (Fig. 7).

4. Discussion

Glycosphingolipids (GSL) are synthesised in the Golgi complex and must be delivered preferentially to the apical membrane of epithelial cells to achieve their polarised cell-surface distribution [13]. It has been proposed that they associate in the Golgi apparatus and form microdomains called glycolipid rafts [10,35]. These glycolipid rafts have been claimed to be indistinguishable from the Triton X-100-insoluble structures recovered in the lighter fraction of sucrose density gradients after cell fractionation [1,13]. GPI-anchored proteins have been proposed to associate

with these microdomains via their GPI moiety [10]. These clusters would then bud off from the TGN membrane to serve as transport vesicles to the apical membrane [1,10,35]. It is still unclear whether the same targeting mechanisms apply for both GPI- and peptide-anchored apical proteins.

Several observations support this theory. Arreaza and Brown [18] have shown that GPI-anchored placental alkaline phosphatase (PLAP) associates with Triton-insoluble glycolipid rafts in MDCK cells whereas transmembrane forms of PLAP do not appear to associate with GSL-enriched microdomains. More recently, Graichen et al. have shown that gp80 (clusterin), an apically secreted glycoprotein, is not included in detergent-insoluble complexes in MDCK cells [29]. Furthermore, in FRT cells, which target GPI-anchored proteins preferentially to the basolateral surface, gp80 was shown to be secreted apically. Finally, GPI-anchored proteins but not transmembrane apical proteins have been shown to be mis-sorted in FRT cells [17] and in concanavalin A-resistant MDCK cells [28]. Taken together, these results suggest the existence of distinct intracellular routes for GPI-anchored proteins, transmembrane proteins, and secreted glycoproteins.

However, the structural determinants responsible for sorting proteins into different transport vesicles are still unknown. To better understand the mechanisms leading to the choice of one particular vesicle, we decided to study the transport of different forms of NEP to the cell surface of MDCK cells.

The results presented in this paper show that GPI-NEP and DA-NEP both behave as previously studied GPI-anchored proteins [11,28] with regard to their solubility in Triton X-100 and migration in sucrose gradient after equilibrium sedimentation. As DA-NEP contains both a transmembrane and a GPI anchor, these results suggest that the GPI anchor constitutes the predominant element to determine solubility in Triton X-100 and association with low density material in sucrose gradients. In our study, DA-NEP and WT-NEP differ only by the presence of the GPI anchor. The strategy developed in this paper thus allowed to rule out any effect due the removal of the transmembrane anchor of the reporter protein.

Many argue that the separate phases observed after Triton X-100 extraction might not exist in

membranes until detergent exposure. In that case, the differences observed in their behaviour after solubilisation in Triton X-100 could simply reflect differences in their physicochemical properties once they have entered the TGN where they can or not associate with other membrane proteins and lipids that cluster in this compartment [28]. However, a recent paper by Schroeder et al. [36] provides substantial evidence that detergent extraction does not induce the artifactual formation of ordered domains. In view of these recent results, it is most likely that the partitioning of both GPI-NEP and DA-NEP in Triton X-100-insoluble fractions reflects their physiological association in specialised domains of the Golgi membrane. These domains could bud off into apical transport vesicles that would be different from the ones used by WT-NEP. Isolation of the TGN-derived vesicles containing either DA-NEP or WT-NEP, and further analysis of the factors that regulate the transport of these two proteins would make it possible to confirm this hypothesis beyond any doubt. In this respect, monoclonal antibodies that recognise the cytosolic region present in both NEP and DA-NEP [37] would constitute very useful tools for the isolation of these vesicles.

Acknowledgements

We thank Dr. I.R. Nabi (Department of Anatomy, University of Montreal, Montreal, Que., Canada) for the generous gift of anti E-cadherin antibodies and for helpful discussions. We thank Dominic Falconi for his assistance with the work concerning GPI-NEP, Diane Gingras for her help with the confocal microscope, Louise Cournoyer for her assistance with cell culture, and Yves Pontbriand for his help in the FACS analysis of infected MDCK cells. This work was supported by a Medical Research Council grant to P. Crine. F. Cailler was the recipient of a Medical Research Council studentship.

References

- [1] K. Simons, A. Wandinger-Ness, *Cell* 62 (1990) 207–210.
- [2] E. Rodriguez-Boulant, W.J. Nelson, *Science* 245 (1989) 718–725.

- [3] K. Simons, S.D. Fuller, *Annu. Rev. Cell Biol.* 1 (1985) 243–288.
- [4] A. Wandinger-Ness, M.K. Bennet, C. Antony, K. Simons, *J. Cell Biol.* 111 (1990) 987–1000.
- [5] M.A.J. Ferguson, A.F. Williams, *Annu. Rev. Biochem.* 57 (1988) 285–320.
- [6] M.G. Low, A.R. Saltiel, *Science* 239 (1988) 268–275.
- [7] G.A.M. Cross, *Annu. Rev. Cell Biol.* 6 (1990) 1–39.
- [8] M.P. Lisanti, I.W. Caras, M.A. Davitz, E. Rodriguez-Boulan, *J. Cell Biol.* 109 (1989) 2145–2156.
- [9] R.G. Parton, K. Simons, *Science* 269 (1995) 1398–1399.
- [10] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* 387 (1997) 569–572.
- [11] D.A. Brown, J.K. Rose, *Cell* 68 (1992) 533–544.
- [12] K. Fiedler, T. Kobayashi, T.V. Kurzchalia, K. Simons, *Biochemistry* 32 (1993) 6365–6375.
- [13] K. Simons, G. van Meer, *J. Biochem.* 27 (1988) 6197–6202.
- [14] B.P. Roques, F. Noble, V. Daugé, M.C. Fournié-Zaluski, A. Beaumont, *Pharmacol. Rev.* 45 (1993) 87–146.
- [15] S. Howell, C. Lanctôt, G. Boileau, P. Crine, *Biochem. J.* 299 (1994) 171–176.
- [16] S. Howell, C. Lanctôt, G. Boileau, P. Crine, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 16993–16996.
- [17] C. Zurzolo, M.P. Lisanti, I.W. Caras, L. Nitsch, E. Rodriguez-Boulan, *J. Cell Biol.* 121 (1993) 1031–1039.
- [18] G. Arreaza, D.A. Brown, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 23641–23647.
- [19] C. Lanctôt, H. Fournier, S. Howell, G. Boileau, P. Crine, *Biochem. J.* 305 (1995) 165–171.
- [20] M.A. Kerr, A.J. Kenny, *Biochem. J.* 137 (1974) 477–488.
- [21] F.L. Graham, A.J. van der Eb, *Virology* 52 (1973) 456–467.
- [22] F. Jalal, G. Lemay, M. Zollinger, A. Berteloot, G. Boileau, P. Crine, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 29826–29832.
- [23] G. Lemay, G. Waksman, B.P. Roques, P. Crine, G. Boileau, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 15620–15623.
- [24] P. Crine, C. LeGrimellec, E. Lemieux, L. Labonté, S. Fortin, A. Blachier, M. Aubry, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131 (1985) 255–261.
- [25] I.R. Nabi, A.P. Mathews, L. Cohen-Gould, D. Gundersen, E. Rodriguez-Boulan, *J. Cell Sci.* 104 (1993) 37–49.
- [26] D. Corbeil, G. Boileau, G. Lemay, P. Crine, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 2798–2801.
- [27] F. Jalal, C. Jumarie, W. Bawab, D. Corbeil, C. Malo, A. Berteloot, P. Crine, *Biochem. J.* 288 (1992) 945–951.
- [28] C. Zurzolo, W. van't Hof, G. van Meer, E. Rodriguez-Boulan, *EMBO J.* 13 (1994) 42–53.
- [29] R. Graichen, A. Löscher, D. Appel, C. Koch-Brandt, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 15854–15857.
- [30] R. Schroeder, E. London, D. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 12130–12134.
- [31] J. Vidugiriene, A.K. Menon, *J. Cell Biol.* 127 (1994) 333–341.
- [32] M.J. McConville, M.A.J. Ferguson, *Biochem. J.* 294 (1993) 305–324.
- [33] P.T. Englund, *Annu. Rev. Biochem.* 62 (1993) 121–138.
- [34] K.S. Matlin, K. Simons, *Cell* 34 (1983) 233–243.
- [35] T. Harder, K. Simons, *Curr. Opin. Cell Biol.* 9 (1997) 534–542.
- [36] R. Schroeder, S.N. Ahmed, Y. Zhu, E. London, D.A. Brown, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 1150–1157.
- [37] M. Aubry, M. Zollinger, S. Fortin, C. Venien, C. Legrimellec, P. Crine, *Biochim. Biophys. Acta* 967 (1988) 56–64.

CHAPITRE 3 - SECOND ARTICLE

sous presse dans

The Biochemical Journal

The N-terminal segment of ECE-1b contains a di-leucine motif that can redirect neprilysin to an intracellular compartment in MDCK cells

Françoise CAILLER, Jacques P. ZAPPULLA, Guy BOILEAU and Philippe CRINE¹

University of Montreal, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, CP 6128,
Succursale Centre Ville, Montreal (Quebec), H3C 3J7 Canada.

¹ To whom correspondence should be addressed (e-mail crinep@BCM.UMontreal.CA)

Tel.: 1-514-343-6111 ext 5006

Fax: 1-514-343-2210

Page heading title: Intracellular retention of ECE-1b.

Abbreviations: ECE: Endothelin-converting enzyme; NEP: Neprilysin, Neutral Endopeptidase 24.11; MDCK: Madin-Darby Canine Kidney; ET: Endothelin; PBS: Phosphate Buffer Saline; WT-NEP: Wild-Type NEP; Endo-H: endo- β -N-acetylglucosaminidase H; TGN: Trans-Golgi Network.

Keywords: Endothelin-converting enzyme; intracellular retention signal; di-leucine.

SYNOPSIS

Endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) is a membrane-bound metallopeptidase of the neprilysin (NEP) family. ECE-1 is responsible for the conversion of inactive big-endothelins into active endothelins. Three different isoforms of human ECE-1 (ECE-1a, ECE-1b and ECE-1c) have been identified. They differ in their N-terminal cytosolic regions, have distinct tissue distribution and intracellular localization. ECE-1a and ECE-1c are both located at the cell surface whereas ECE-1b is targeted to an intracellular compartment. To better understand the nature of the signal responsible for the targeting of ECE-1b to the intracellular compartment, we have constructed several ECE/NEP chimaeric proteins and expressed them by transfection into Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells. This allowed us to identify a nine amino-acid segment in the cytosolic tail of ECE-1b that is sufficient to relocate NEP from the cell surface to an intracellular compartment. Site-directed mutagenesis on these chimeras led to the identification of two leucine residues as part of the intracellular retention signal.

INTRODUCTION

Endothelin-1 (ET-1) was first described by Yanagisawa and co-workers in 1988 [1] as an endothelium-derived 21-residue vasoconstrictor peptide. Later studies demonstrated the existence of two other endothelins [2]: endothelin-2 (ET-2) and endothelin-3 (ET-3). These three peptides, encoded by three different genes, have been implicated in the maintenance of basal vascular tone and plasma volume, in the regulation of water balance, in hormone production (for a review see [3]), as well as in several developmental processes [4]. They are also involved in the pathophysiological mechanism of a number of vascular conditions [5].

ETs are processed from big endothelins by cleavage of the Trp²¹-Val/Ile²² bond. A putative endopeptidase activity responsible for this cleavage was described as endothelin-converting enzyme by Yanagisawa and co-workers [1]. Complementary DNA encoding two ECE forms, termed ECE-1 and ECE-2 have been isolated [7-11]. Recently, a novel endothelin-converting enzyme specific for big ET-3 was purified from bovine iris microsomes by Hasegawa and coworkers [6].

ECE-1 and -2 are type II integral membrane-bound proteases with sequence similarities to neprilysin (Neutral Endopeptidase-24.11, NEP) and Kell blood group protein [7]. They consist of a short N-terminal cytosolic domain, a single transmembrane segment, and a large C-terminal ectodomain, which contains the catalytic Zn²⁺-binding motif (HEXXH). Three isoforms of human ECE-1 have been described to date: ECE-1a and ECE-1b [7], also termed ECE-1 β and ECE-1 α , respectively [8], and more recently ECE-1c [9]. These three isoforms are encoded by the same gene with three distinct promoters [8],[10]. ECE-2 however is encoded by a distinct gene [11]. The three

isoforms of human ECE-1 differ in their N-terminal cytosolic sequence only. Whereas ECE-1a and ECE-1b have completely different N-terminal amino acid sequences, ECE-1c corresponds to a truncated form of ECE-1b, lacking its first 17 N-terminal amino acids (Figure 1) [7, 9].

Besides having different tissue distributions ECE-1a, 1b and 1c have also major differences in their intracellular localisation both in transfected CHO cells and in the ECV304 endothelial cell line [9]. Whereas ECE-1a and ECE-1c are expressed on the cell surface of these cells, ECE-1b was found predominantly intracellular. Similarly, human ECE-1b was also found in an intracellular compartment tentatively identified as early or late endosomes when transfected in MDCK cells [12].

Retention of a transmembrane protein along the secretory pathway as well as internalisation of a protein from the cell surface requires some form of targeting or sorting information on the protein itself. Usually this information resides in sorting signals encoded in the cytoplasmic domain. These signals consist in sequences or structural motifs, many of which have either a critical tyrosine residue or a pair of leucine or bulky hydrophobic residues (reviewed in [13], [14], and [15]). Tyrosine-based motifs have been identified in a variety of endocytosed molecules including the transferrin receptor [16]. It was proposed that one of the principal features of this motif is to induce the formation of a tight turn conformation. In 1992, Letourneur and Klausner first identified a di-leucine motif that could also mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains [17]. Since then, several such signals have been identified, on the GLUT4 glucose transporter [18] and on the insulin receptor for example [14, 19].

The aim of this study was to identify a targeting signal in the N-terminal amino-acid sequence of ECE-1b. The only difference between ECE-1b and ECE-1c being the 17 amino-acids N-terminal to ECE-1b, it is most likely that the putative intracellular retention signal would be located within these 17 amino-acids. The identification of such a signal nevertheless requires direct confirmation using two complementary strategies. First, the isolated internalisation/intracellular retention signal must be able to induce the intracellular targeting of an other protein normally expressed at the cell surface. Second, point mutations in the putative signal should at least partially inhibit the internalisation process.

To identify the ECE-1b internalisation signal(s) we thus decided to study the fate of several chimaeric molecules containing the ectodomain of NEP fused to the cytoplasmic and transmembrane domains of ECE-1b. The choice of NEP as a reporter protein was dictated by three different considerations. First, as members of the same family of endopeptidases, ECE-1 and NEP have amino acid sequences with more than 50% identity [20]. Thus, fusion of the ectodomain of NEP with the cytoplasmic and transmembrane domains of ECE-1b is expected to result in a chimaeric protein with topological characteristics similar to those of their native natural parents. Second, previous studies on NEP expression in polarised epithelial cells allowed to clearly establish the main features of the intracellular targeting of this protein [25-27]. Third, specific high affinity antibodies against the ectodomain of NEP are available, allowing immunohistochemical studies and immunoprecipitation experiments on NEP/ECE chimeras.

Here, we have identified a nine amino acid segment present in the N-terminal portion of the ECE-1b cytosolic tail that appears to constitute a dominant signal for the intracellular retention of NEP/ECE-1b chimeras. Site directed mutagenesis then allowed us to identify two leucine residues as part of this signal.

MATERIALS AND METHODS

DNA constructions

Vector pCDNA3/RSV was a generous gift of Dr. M. Bouvier (University of Montreal). The cytosolic and transmembrane domains of ECE-1b were fused to NEP ectodomain by polymerase chain reaction (PCR)-based techniques, resulting in pCDNA3/RSV-ECE/NEP, coding for ECE/NEP. We then generated pCDNA3/RSV- $\Delta(1-8)$ -ECE/NEP from this template, by a two steps PCR strategy, using oligonucleotides carrying the appropriate deletion, thus obtaining $\Delta(1-8)$ -ECE/NEP.

Two complementary oligonucleotides corresponding to the coding sequence for the 17 amino acids N-terminal sequence of ECE-1b were then synthesised. After annealing of these oligonucleotides, the resulting fragment was ligated 5' from the complete coding sequence of NEP and the whole resulting DNA fragment was cloned into pCDNA3/RSV, thus giving pCDNA3/RSV-ECE(1-17)/NEP. The same strategy was used for the introduction of mutations in this chimera, resulting in pCDNA3/RSV-Ala¹²-ECE(1-17)/NEP, pCDNA3/RSV-Ala¹³-ECE(1-17)/NEP, and pCDNA3/RSV-Ala^{12/13}-ECE(1-17)/NEP. These four vectors would produce ECE(1-17)/NEP, Ala¹²-ECE(1-17)/NEP, Ala¹³-ECE(1-17)/NEP and Ala^{12/13}-ECE(1-17)/NEP, respectively.

All PCR products were confirmed by DNA sequencing after cloning in pCDNA3/RSV. Each of these expression vectors was then transfected into MDCK cells using the CaPO₄ precipitation method [21]. The neomycin analog geneticin was used to select pools of resistant MDCK cells. Construction of the stable cell line expressing WT-

NEP is described in [22]. A schematic representation of all the constructs is shown in Figure 1.

Culture of MDCK cells

MDCK cells were a generous gift from Dr. I.R. Nabi (University of Montreal). They were cultured in a medium consisting of 50% Ham's F-12 medium and 50% Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum (Gibco), penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 µg/ml), Fungizone (25 µg/ml), 15mM HEPES pH 7.4 and 5mM selenium. Transfected cells were routinely cultured in atmosphere of 5% CO₂ in air at 37°C in medium containing geneticin. Cells were plated at a density of approximately 10⁶ cells/Petri dish and the incubation medium was changed every second day. All the experiments on transfected cells were performed within the subsequent 50 passages, on confluent cells. Before each experiment, cells were incubated overnight in medium containing 10mM sodium butyrate to enhance the production of the protein of interest.

Western blotting

MDCK cells expressing one of the chimeras were cultured as described. Cells were then lysed in PBS containing 1% 1-0-n-octyl-β-D-glucopyranoside, and the nuclei were removed by centrifugation at 1400 X g for 20 min. Aliquots containing 40µg of total proteins were then either incubated for 1 hour at 37°C with the endo-β-N-acetylglucosaminidase H (endo H) or with PNGase F (endo F) (New England Biolabs) as

described by the manufacturer. Control experiments where the glycosidase was omitted were run in parallel. Protein samples were then analysed on 7.5 % SDS-polyacrylamide gels before transfer to a nitrocellulose membrane. Antibody 18B5 was then used (1:500 dilution) for the detection of ECE-NEP chimeras using the Vectastain kit.

Immunofluorescence

The guinea pig polyclonal antibody raised against rabbit NEP was described in [23]. The antibody recognises all the chimeras used in this study. Rhodamine- FITC- or Texas Red-conjugated anti-guinea pig antibody was purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Confluent MDCK cells expressing the protein of interest were grown to confluence on Labtek chamber glass slides (Gibco). Cells were rinsed 3 times for 10 min in PBS containing 1 mM MgCl₂ and 0.1 mM CaCl₂ (Buffer A) and fixed for 20 minutes at room temperature in Buffer A containing 4% paraformaldehyde. Cells were then washed in Buffer A and permeabilized by incubation in Buffer A containing 0.075% saponin and 1% BSA (Buffer B) for 30 minutes. Cells were then incubated for 10 min at room temperature in Buffer C (Buffer B + 50mM NH₄Cl). After being washed in Buffer B, cells were then incubated for 30 to 60 min at room temperature with anti-NEP antibody diluted 1:200 in Buffer B. Cells were again washed three times, 10 min each, in Buffer B and incubated with either Texas-Red- or Rhodamine-conjugated anti guinea-pig secondary antibody (diluted 1:100) for 1 hour in the dark. Finally, cells were washed three times, 10 min each in Buffer B, and one time in Buffer A before being mounted for immunofluorescence in Immuno Fluore Mounting

Medium (ICN). Cells were then visualised using a dual channel laser scanning confocal microscope (Biorad MRC 600. Ar-Kr laser). For cell-surface labelling, the same protocol was followed, except that saponin was omitted in all the solutions prior to incubation with primary antibody.

Cell Surface immunoprecipitation

MDCK cells expressing various chimeras were cultured in 60mm Petri dishes, and were metabolically labelled with 100 μ Ci Trans[³⁵S] label (ICN Biomedicals), before being submitted to various chase times. The cells were then washed twice with ice-cold PBS containing bovine serum albumin (0.01mg/ml) and incubated for 3 hours at 4°C in the same buffer with a 1/200 dilution of the NEP polyclonal antibody. This allowed the selective immunoprecipitation of the newly synthesised chimeras that had reached the plasma membrane. After the incubation period, monolayers were rinsed three times with cold PBS and 40 μ l cold lysate was added to remove excess antibody. Cells were then scraped from the Petri dishes and lysed in 500 μ l of PBS buffer containing 1% 1-0-n-octyl- β -D-glucopyranoside, and the nuclei were removed by centrifugation at 1400Xg for 20 min. The post-nuclear supernatant were diluted in 500 μ l of 2X immunoprecipitation buffer (20mM Tris-HCl, pH 7.4, 100mM NaCl, 2% sodium deoxycholate, 2% Triton X-100, 0.2% SDS, 0.2% BSA) and transferred to a tube containing protein A-sepharose beads. This allowed the precipitation of radiolabelled ECE/NEP chimeras present at the cell surface. The supernatant resulting from this first immunoprecipitation contained radioactive molecules present in intracellular

compartments at the end of the chase incubation. These molecules were recovered by submitting this supernatant to an identical immunoprecipitation procedure. After subsequent rinsing in immunoprecipitation buffer and in PBS buffer, immunoprecipitates were boiled in electrophoresis sample buffer and analysed on 7.5 % SDS-polyacrylamide gels. The radiolabelled proteins on the gels were finally revealed by fluorography.

RESULTS

Expression of the ECE/NEP chimeras in MDCK cells

All the vectors described in the “Material and Methods” section were transfected in MDCK cells and stable transfectants were isolated based on their resistance to the neomycin analog geneticin. Cells were then solubilized in PBS containing 1% 1-0-n-octyl- β -D-glucopyranoside and analysed under reducing conditions by Western blotting using the 18B5 monoclonal antibody raised against the ectodomain of Wild-Type NEP (WT-NEP) [24]. In all cases a double band of approximately 95 kDa was observed in transfected MDCK cells. As seen in figure 2, the chimeras are expressed at comparable levels. When cellular extracts were digested with peptide N-glycosidase F, the double band disappeared and was replaced in all cases by a sharp band of about 85 kDa. Treatment of cell extracts with endo- β -N-acetyl-glucosaminidase H (endo H) only digested a very small fraction of the total proteins, indicating that the majority of the produced chimeras had acquired complex oligosaccharides after passing through the Golgi apparatus.

ECE-1b cytosolic tail is sufficient to retain NEP intracellularly

Previous studies showed that ECE-1b remains in an intracellular compartment when expressed in MDCK cells [12]. To examine the subcellular distribution of the different ECE/NEP chimeras, indirect immunofluorescence microscopy was performed.

Stable cell lines expressing either the chimeras or WT-NEP were fixed with paraformaldehyde and permeabilized with saponin to stain both intracellular and cell-surface proteins. In some experiments, cells were not permeabilized in order to detect cell surface labelling only. A polyclonal antibody against WT-NEP, that recognises an epitope in the NEP ectodomain, present in all the different chimeras, was used as a primary antibody. Non transfected MDCK cells showed no staining with this anti-NEP antibody (data not shown).

As we showed previously [25], NEP in its native state is expressed on the surface of MDCK cells. By contrast, the ECE/NEP chimera resulting from the fusion of entire cytoplasmic and transmembrane domains of ECE-1b to the NEP ectodomain failed to exhibit an immunofluorescence signal in non-permeabilized MDCK cells (Figure 3C). Immunofluorescence was observed only in cells permeabilized with saponin (Figure 3A and B) and was found associated with cytoplasmic vesicular structures, sometimes in a perinuclear location (Figure 3B). This observation suggests the presence of an intracellular retention signal in either the cytosolic or the transmembrane domain of ECE-1b, this signal being sufficient to mediate the intracellular retention of the NEP ectodomain.

Since ECE-1b differs from ECE-1c only by the presence of an additional sequence of 17 amino acid residues at its N-terminus, it is likely that this sequence is responsible for the intracellular retention of ECE-1b. We thus decided to fuse the 17 amino acid N-terminal segment of ECE-1b to the N-terminus of NEP and assess the effect of this fusion on the intracellular transport of the protein. As shown on Figure 3, ECE(1-17)/NEP was mainly localized intracellularly where it was found in vesicular

structures similar to the ones identified for ECE/NEP. However, in this case, a faint staining was visible on the cell surface of non-permeabilized cells. These observations indicate the presence of a dominant intracellular retention signal within the 17 amino acid sequence characteristic of ECE-1b.

In order to confirm the cellular localisation of the chimaeric proteins and to determine the kinetics of their intracellular transport, MDCK cells expressing the various chimaeric proteins were pulsed for 15 min in medium containing [³⁵S]Met and chased as indicated in Figure 4 before being submitted to cell surface immunoprecipitation (see the “Experimental Procedures” section). For ECE/NEP, no trace of the protein was detectable at the surface of the cells, even after a 180 min chase. However, in the case of ECE(1-17)/NEP, a small proportion of the chimaeric protein appeared at the cell surface between 20 and 40 minutes of chase. This kinetics of transport was identical to the one previously observed for WT-NEP in MDCK cells [25]. The fact that only a very small proportion of the total labelled ECE(1-17)/NEP proteins was found at the cell surface was consistent with the faint immunofluorescence labelling of non-permeabilized cells and confirmed that the majority of the chimaeric enzyme molecules were retained inside the cells.

Leu¹² and Leu¹³ are part of the intracellular retention signal of ECE-1b

From the results presented above, it appears that the stretch of 17 N-terminal amino acids that is specific to ECE-1b constitutes a dominant signal capable of mediating the intracellular retention of WT-NEP, which would otherwise be targeted to the apical

plasma membrane [25]. To determine more precisely which amino-acids within this sequence were part of the internalisation signal we first designed $\Delta(1-8)$ -ECE/NEP, a chimaeric construct identical to ECE/NEP except for the lack of the first 8 amino acid residues of the N-terminal cytosolic tail of ECE. This chimera is also retained inside transfected cells (data not shown) suggesting that the signal is not located within the first 8 amino acid residues of the N-terminal segment. We thus turned our attention to other features, which might be located between residues 9 and 17.

Di-leucine sequences have previously been described as part of internalisation signals in a number of proteins [17, 26]. We thus decided to assess the role of Leu¹² and Leu¹³ in ECE-1b by mutating either one or both of these leucine residues in the ECE(1-17)/NEP chimera. As shown in Figure 5, these mutations had a dramatic effect on the localisation of the chimera. Even though a large proportion of the protein was still present in the same cytosolic vesicular structures than those seen in Figure 3, a more intense immunofluorescence signal was observed on cells stained without prior permeabilisation (no saponin). These results suggest that mutations in the di-leucine sequence considerably reduce the efficiency of the intracellular retention mechanism. It is also interesting to note that the cell-surface fluorescent signal observed with these di-leucine mutants exhibited a punctate pattern similar to the one we previously observed for WT-NEP [25]. MDCK cells join to form a continuous epithelial sheet on the dish surface when grown to confluence, as was always the case in our experiments. In these experimental conditions, we have previously shown that the antibody can neither reach the inside of the cells nor pass the tight junctions between two adjacent cells [22]. Thus in the conditions used, the cell surface proteins that can be reached by the antibody are

only apical. The punctate staining that can be observed without saponin on Figure 5 thus concerns proteins that are present at the apical cell surface. Moreover, as was the case for Figure 3, the optical sections shown for the non permeabilised cells were taken at the cell surface, and an optical section through the centre of the cell showed no staining at all (data not shown).

To confirm the immunohistochemistry results we next decided to monitor the kinetics of the apparition of Ala^{12/13}-ECE(1-17)/NEP at the cell surface during a pulse-chase experiment followed by cell surface immunoprecipitation. As shown in Figure 6, Ala^{12/13}-ECE(1-17)/NEP appeared at the cell surface between 20 and 40 minutes after the beginning of the chase, as previously observed for ECE(1-17)/NEP (Figure 4) and for WT-NEP [25]. Thus, it appears that when the intracellular retention machinery fails, the endogenous apical targeting signal presumably present in the NEP ectodomain [27] still appears to be functional in the chimaeric proteins. Taken together these results suggest that Leu¹² and Leu¹³ are part of a signal responsible for either the intracellular retention or the internalisation of ECE-1b.

Tyr²¹ is part of the targeting signal for the intracellular localisation of ECE-1b

Tyrosine residues have been previously reported to be part of several internalisation signals [17, 28-30]. In the endoprotease furin for example, which is involved in the first step of endothelin maturation, a Tyr residue was shown to be responsible for the retrieval of the protein from the cell surface [31]. The amino-acid sequence of the cytoplasmic tail of ECE-1b contains several Tyr residues. One of those,

Tyr²¹, is located only five residues from a stretch of acidic amino acids, and in the vicinity of several Ser residues. This environment is very similar to the one of furin, where it was shown important for the proper targeting of the protein.

In order to study an eventual role of the Tyr²¹ residue in the targeting of ECE-1b, we mutated it into an Ala residue in the ECE/NEP chimera, thus obtaining Ala²¹-ECE/NEP (see Figure 1). Immunohistochemistry experiments (Figure 7) showed that the mutated protein was mainly expressed intracellularly in MDCK cells, apparently in the same cytosolic vesicles as ECE/NEP and ECE(1-17)/NEP. However, the immunoprecipitation experiments shown in Figure 7 indicated that some of the ECE/NEP chimera was found at the cell surface after the mutation of Tyr²¹ to Ala. The quantity of protein mistargeted to the cell-surface by this point mutation appears to be much less important than in the case of the Leu¹² and Leu¹³ mutations.

DISCUSSION

Several isoforms of ECE-1 have been cloned that differ exclusively in their cytosolic tail [7]. Considering the fact that the intracellular ECE-1b isoform is identical to the cell-surface ECE-1c, except for an additional N-terminal 17 amino acid sequence, it is likely that the intracellular retention signal of ECE-1b is contained within this N-terminal extension.

When the cytosolic and transmembrane domains of ECE-1b were fused to the ectodomain of NEP there was a complete intracellular retention of this typical cell-surface protein [24]. The nature of the intracellular compartment where the chimaeric protein was retained was not thoroughly studied in this paper. However the staining pattern, as observed in confocal microscopy, was identical to the one previously reported for ECE-1b in the same experimental conditions by Azarani et al. [13]. Thus it appears most likely that the chimaeric NEP/ECE-1b proteins studied in this paper localise to the MDCK endosomal compartment as previously indicated.

The fact that the first 17 amino acid residues of ECE-1b were able to prevent most of the ECE(1-17)/NEP chimera from reaching the cell surface indicates that a major component of the intracellular retention signal resides in this segment unique to ECE-1b. Since the $\Delta(1-8)$ -ECE/NEP chimera remained intracellular, it appears unlikely that amino acids 1 to 8 are part of the targeting signal. Finally, mutations of Leu¹² and/or Leu¹³ to Ala, which restored a partial cell-surface expression of the chimera, allowed the identification of these two residues as crucial components of the intracellular retention signal of ECE-1b.

A recent study by Marks et al. [32] showed that the targeting through di-leucine- and tyrosine-based motifs use distinct saturable components. Rapoport and co-workers described the interaction of a di-leucine motif with the $\beta 1$ subunit of AP-1 [33]. These results, combined with previous observations [34], suggest that AP-1 and AP-2 act like differential filters for proteins with one or more sorting signals in their cytoplasmic tail. Transmembrane proteins with an AP-1 di-leucine or tyrosine signal would be captured by AP-1 and sorted to an endosomal/lysosomal compartment before continuing towards their final destination. A few transmembrane proteins would however bypass this filter and reach the plasma membrane. Those with AP-2 directed tyrosine signals would then be re-internalised.

The presence of a small amount of ECE(1-17)/NEP at the surface of MDCK cells, together with the internalisation of small amounts of ECE-1c as reported by Schweizer et al. [9], suggest the presence of another signal in the cytosolic or transmembrane domain of the chimera that is common to ECE-1b and ECE-1c. Preliminary results shown in Figure 7 seem to indicate a role for a tyrosine residue in this phenomenon. This Tyr could interact with AP-2 to redirect a certain amount of proteins to intracellular compartments. However, as the main role of this internalisation machinery would be to redirect intracellularly the small amount of ECE-1b molecules that bypassed the Golgi/AP-1 retention system, it is most likely of low capacity. Thus most of the ECE-1c proteins would escape it and remain at the cell surface.

The question remains about the putative role of an intracellular form of ECE. Endothelin-1 is first synthesised as an inactive precursor. It is then cleaved by the prohormone convertase furin in the trans-Golgi network [35], before the final maturation

step by ECE-1. The cytoplasmic domain of furin was shown to mediate its localisation to the trans-Golgi network where it fulfills its proteolytic processing functions [36]. It also recycles back and forth between the Golgi apparatus and the cell surface. Takahashi and co-workers [31] recently showed that the cytoplasmic domain of furin contains a unique Tyr residue within a possible TGN localisation motif. When this Tyr was mutated to Ala, retention of the mutated protein in the TGN was not impaired, but retrieval of furin from the cell surface was significantly retarded. The same machinery could be involved in the retrieval of both furin and ECE-1b from the cell surface.

Although the experiments presented here do not allow the precise identification of the intracellular vesicular compartment in which the different chimaeric proteins are located, recent observations propose that ECE-1b is located in endosomes when transfected in MDCK cells [12]. The presence of both furin and ECE-1b in two consecutive compartments of the secretory pathway could provide a very efficient way for rapidly processing pre-proendothelin into mature ET-1. Indeed, cell surface conversion of exogenous big ET-1 has been reported to be less efficient than intracellular conversion of endogenous big ET-1 [20]. Moreover, Russel *et al.* recently published observations concerning the presence of both endothelin and ECE in the cytoplasmic matrix as well as in Weibel-Palade bodies and secretory vesicles of endothelial cells in the human coronary artery [37]. They propose that the intracellular maturation of the endothelin precursor and the subsequent release of ET-1 via the regulated secretory pathway would induce a rapid constriction in response to compromised endothelial-cell integrity. Gui *et al.* also presented evidence for the intracellular localisation of membrane-bound ECE from rat lung [38] and suggest that big ET-1 may be converted to

ET-1 during its transit through the secretory pathway. We therefore suggest that ECE-1b could serve for the intracellular maturation of big-endothelin to endothelin in response to a yet unknown signal. ECE-1a and/or ECE-1c would themselves be implicated in the maturation of big endothelin-1 at the cell surface.

The use of specific antibodies to differentiate the three ECE-1 isoforms would allow to further test this hypothesis in endothelial cells. A more precise characterisation of the molecular machinery involved in the intracellular retention process would also provide a better understanding of the intracellular trafficking of the various isoforms of ECE.

Acknowledgements:

We thank Louise Cournoyer for her assistance with cell culture. Confocal microscopy was performed in the laboratory of Dr. M. Bendayan (University of Montreal) with the technical assistance of Ginette Guay. We are grateful to Dr I.R. Nabi (University of Montreal) for the generous gift of MDCK cells, and for helpful discussion. This work was supported by a grant from the Medical Research Council to P. Crine. F. Cailler was the recipient of a MRC studentship.

REFERENCES

1. Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T. (1988) *Nature* **332**, 411-415
2. Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, J., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K. and Masaki, T. (1989) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **86**, 2863-2867
3. Rubany, G.M. and Polokoff, M.A. (1994) *Pharmacol.Rev.* **46**, 325-412
4. Yanagisawa, H., Yanagisawa, M., Kapur, R.P., Richardson, J.A., Williams, S.C., Clouthier, D.E., de Wit, D., Emoto, N. and Hammer, R.E. (1998) *Development* **125**, 825-836
5. Haynes, W.G. and Webb, D.J. (1998) *J.Hypertens.* **16**, 1081-1098
6. Hasegawa, H., Hiki, K., Sawamura, T., Aoyama, T., Okamoto, Y., Miwa, S., Shimohama, S., Kimura, J. and Masaki, T. (1998) *FEBS Lett.* **428**, 304-308
7. Valdenaire, O., Rohrbacher, E. and Mattei, M.-G. (1995) *J.Biol.Chem.* **270**, 29794-29798
8. Shimada, K., Takahashi, M., Ikeda, M. and Tanzawa, K. (1995) *FEBS Lett.* **371**, 140-144
9. Schweizer, A., Valdenaire, O., Nelbock, P., Deuschle, U., Dumas Milne Edwards, J.B., Stumpf, J.G. and Loffler, B.M. (1997) *Biochem.J.* **328**, 871-877

-
10. Orzechowski, H.D., Richter, C.M., Funke-Kaiser, H., Kroger, B., Schmidt, M., Menzel, S., bohnemeir, H. and Paul, M. (1997) *J.Mol.Med.* **75**, 512-521
 11. Emoto, N. and Yanagisawa, M. (1995) *J.Biol.Chem.* **270**, 15262-15268
 12. Azarani, A., Boileau, G. and Crine, P. (1998) *Biochem.J.* **333**, 439-448
 13. Kirchhausen, T., Bonifacino, J.S. and Riezman, H. (1997) *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**, 488-495
 14. Renfrew Haft, C., Klausner, R.D. and Taylor, S.I. (1994) *J.Biol.Chem.* **269**, 26286-26294
 15. Mellman, I. (1996) *Ann.Rev.Cell.Dev.Biol.* **12**, 575-625
 16. Collawn, J.F., Stangel, M., Kuhn, L.A., Esekogwu, V., Jing, S.Q., Trowbridge, I.S., Tainer and J.A. (1990) *Cell* **63**, 1061-1072
 17. Letourneur, F. and Klausner, R.D. (1992) *Cell* **69**, 1143-1157
 18. Corvera, S., Chawla, A., Chakrabarti, R., Joly, M., Buxton, J. and Czech, M. (1994) *J.Cell Biol.* **126**, 979-989
 19. Renfrew Haft, C., De La Luz Sierra, M., Hamer, I., Carpentier, J.L. and Taylor, S.I. (1998) *Endocrinology* **139**, 1618-1629
 20. Xu, D., Emoto, N., Glaid, A., Slaughter, C., Kaw, S., deWit, D. and Yanagisawa, M. (1997) *Cell* **78**, 473-485

-
21. Graham, F.L. and van der Eb, A.J. (1973) *Virology* **52**, 456-467
 22. Jalal, F., Lemay, G., Zollinger, M., Berteloot, A., Boileau, G. and Crine, P. (1991) *J.Biol.Chem.* **266**, 29826-29832
 23. Lemay, G., Waksman, G., Roques, B.P., Crine, P. and Boileau, G. (1989) *J.Biol.Chem.* **264**, 15620-15623
 24. Jalal, F., Jumarie, C., Bawab, W., Corbeil, D., Malo, C., Berteloot, A. and Crine, P. (1992) *Biochem.J.* **288**, 945-951
 25. Cailler, F., Howell, S. and Crine, P. (1998) *Biochim.Biophys.Acta.* **1415**, 1-9
 26. Hamer, I., Renfrew Haft, C., Paccaud, J.-P., Maeder, C., Taylor, S. and Carpentier, J.-L. (1997) *J.Biol.Chem.* **272**, 21685-21691
 27. Corbeil, D., Boileau, G., Lemay, G. and Crine, P. (1992) *J.Biol.Chem.* **267**, 2798-2801
 28. Itin, C., Kappeler, F., Linstedt, A.D. and Hauri, H.P. (1995) *EMBO J.* **14**, 2250-2256
 29. Warrej, R.A., Green, F.A., Stenberg, P.E. and Enns, C.A. (1998) *J.Biol.Chem.* **273**, 17056-17063
 30. Williams, M.A. and Fukuda, M. (1990) *J.Cell Biol.* **111**, 955-966
 31. Takahashi, S., Nakagawa, T., Banno, T., Watanabe, T., Murakami, K. and Nakayama, K. (1995) *J.Biol.Chem.* **270**, 28397-28401

-
32. Marks, M.S., Woodruff, L., Ohno, H. and Bonifacino, J.S. (1996) *J.Cell Biol.* **135**, 341-354
 33. Rapoport, I., Chen, Y.C., Cupers, P., Shoelson, S.E. and Kirchhausen, T. (1998) *EMBO J.* **17**, 2148-2455
 34. Rapoport, I., Miyazaki, M., Boll, W., Duckworth, B., Cantley, L.C., Shoelson, S.E. and Kirchhausen, T. (1997) *EMBO J.* **16**, 2240-2250
 35. Seidah, N.G., Day, R., Marcinkiewicz, M. and Chrétien, M. (1993) *Ann.NY.Acad.Sci.* **680**, 135-146
 36. Bosshart, H., Humphrey, J., Deignan, E., Davidson, J., Drazba, J., Yuan, L., Oorschot, V., Peters, P.J. and Bonifacino, J.S. (1994) *J.Cell Biol.* **126**, 1157-1172
 37. Russel, F.D., Skepper, J.N. and Davenport, A.P. (1998) *J.Cardio.Pharmaco.* **31**, 424-430
 38. Gui, G., Xu, D., Emoto, N. and Yanagisawa, M. (1993) *J.Cardio.Pharmaco.* **22**, S53-S56

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Schematic representation of the different ECE/NEP chimeras.

A : CY corresponds to the cytosolic segment of the protein. TM represents the transmembrane domain. Shaded boxes correspond to the ECE portion of the proteins, clear boxes represent the NEP portion of the proteins. The sequence of part of the cytosolic domain of ECE-1b is indicated, with Leu¹² and Leu¹³ in bold. B: Sequence of the cytosolic segments of the chimeras. Shaded and clear areas represent ECE and NEP residues respectively. Leu¹², Leu¹³ and Tyr²¹ and/or the corresponding Ala in the mutants are in bold.

Figure 2: Expression of the different chimeras in MDCK cells.

Stably transfected MDCK cells expressing either WT-NEP or one of the chimeras were solubilized in PBS containing 1-0-n-octyl- β -D-glucopyranoside. 40 μ g of total proteins were then either incubated for 1 hour at 37°C (-), or treated for 1 hour with endo H (+H) or with PNGase F (+F) before Western blotting with antibody 18B5, as described in the "Material and Methods" section. The level of expression is similar for every protein. The glycosylated proteins have a molecular weight of about 95 kDa and are resistant to Endo H digestion.

Figure 3 : Intracellular localization of ECE/NEP and ECE(1-17)/NEP.

Stably transfected MDCK cells expressing ECE/NEP or ECE(1-17)/NEP, as indicated on the figure, were grown to confluency on Labtek chamber glass slides, fixed with paraformaldehyde, and either permeabilized (A and B-saponin) or not (C-no saponin). They were then stained for the different chimaeric proteins, using a polyclonal antibody that recognises an epitope in the ectodomain of NEP and observed from the cell surface. ECE/NEP is located exclusively in intracellular vesicular structures, whereas a small proportion of ECE(1-17)/NEP is also visible on the cell surface, when no permeabilisation is performed. B : A horizontal section through the nucleus shows the perinuclear localisation of the chimeras. Scale bar: 20 μ m.

Figure 4: Cell surface immunoprecipitation of ECE/NEP and ECE(1-17)/NEP.

Confluent MDCK cells expressing ECE/NEP or ECE(1-17)/NEP were labelled with 100 μ Ci [35 S]methionine before being submitted to various chase times. Cell surface immunoprecipitation of the chimeras was then performed as described in the “Material and Methods” section. Proteins were resolved by SDS-PAGE and visualised by fluorography. Autoradiograms were then scanned using the HP Deskscan software. ECE/NEP is not visible in the cell surface fractions whereas some of the ECE(1-17)/NEP chimera appears at the cell surface between 20 and 40 min after the beginning of the chase, which corresponds to the kinetics of transport observed for NEP.

Figure 5: Intracellular localisation of the ECE(1-17)/NEP mutants.

Stably transfected MDCK cells expressing Ala¹²-ECE(1-17)/NEP, Ala¹³-ECE(1-17)/NEP, or Ala¹²¹³-ECE(1-17)/NEP, as indicated on the figure, were grown to

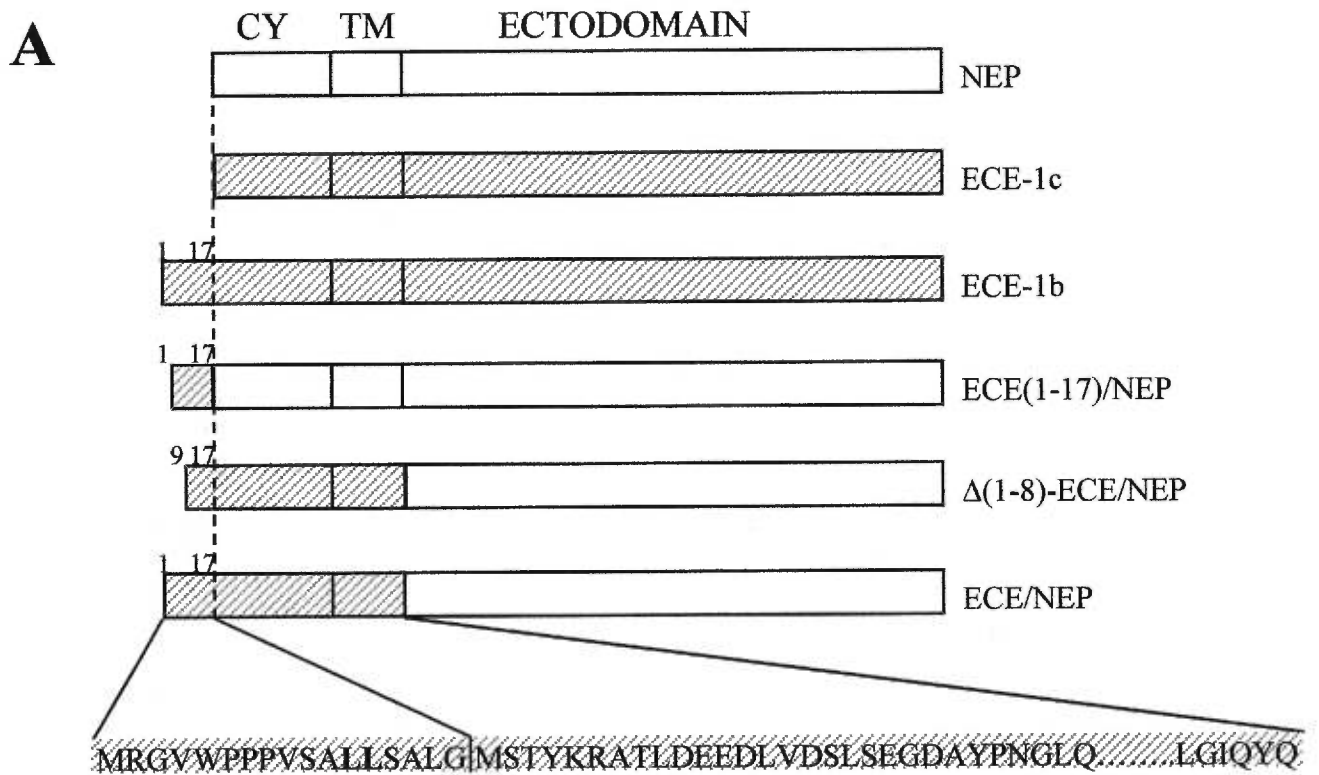
confluence on Labtek chamber glass slides, and subsequently treated as indicated in Figure 3. The three chimeras are present in intracellular vesicular structures, and are also found on the cell surface of MDCK cell when no permeabilisation is performed prior to the primary antibody incubation (no saponin). Scale bar: 20µm.

Figure 6: Cell surface immunoprecipitation of Ala^{12/13}-ECE(1-17)/NEP.

Confluent MDCK cells expressing Ala¹²¹³-ECE(1-17)/NEP were labelled with 100 µCi [³⁵S]methionine before being submitted to various chase times, as indicated. Cell surface immunoprecipitation of the chimera was then performed as described in the “Material and Methods” section. Proteins were resolved by SDS-PAGE and visualised by fluorography. Autoradiograms were then scanned using the HP Deskscan software.

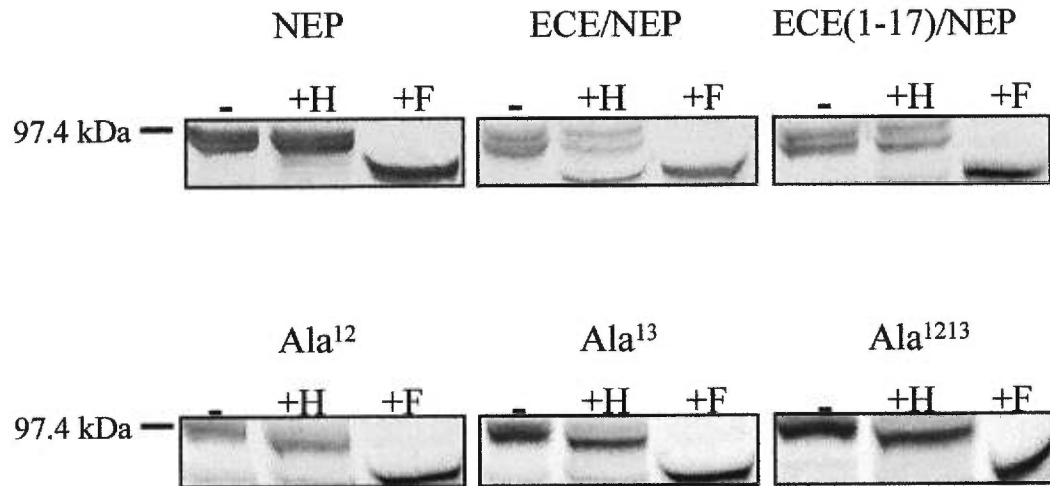
Figure 7: Ala²¹-ECE/NEP localisation.

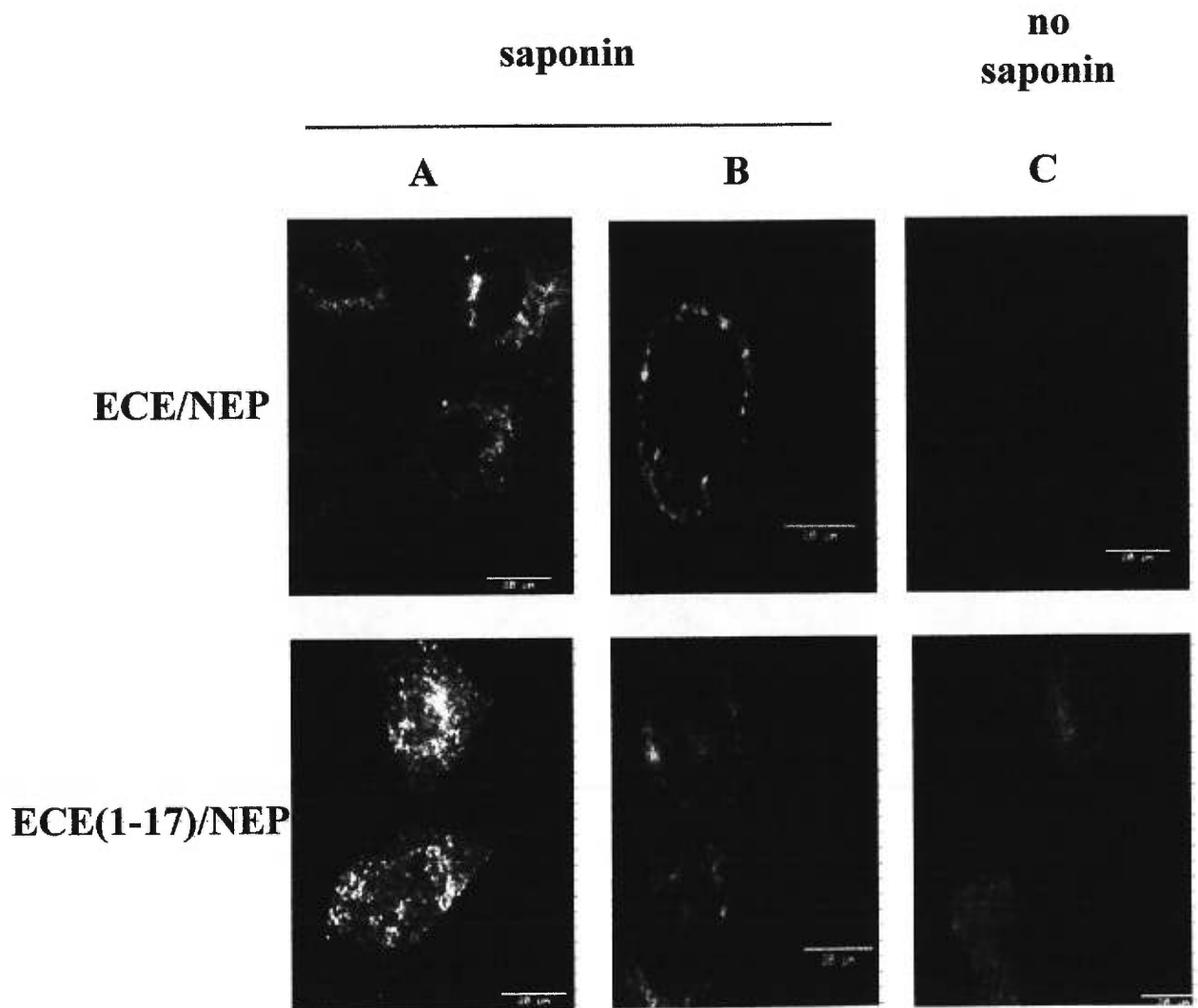
A: Stably transfected MDCK cells expressing Ala²¹-ECE/NEP were grown to confluence on Labtek chamber glass slides. Cells were then fixed with paraformaldehyde before being permeabilized with saponin and subsequently stained immunocytochemically. The majority of the mutated chimaeric protein appears to be localized in the same cytosolic vesicular structure as ECE/NEP. B: Stably transfected MDCK cells expressing Ala²¹-ECE/NEP were grown to confluence and labelled with 100 µCi [³⁵S]Met before being submitted to various chase times. Cell surface immunoprecipitation of the chimeras was then performed before the proteins were resolved by SDS-PAGE and visualised by fluorography. A very small proportion of the mutated chimera appears at the cell surface between 20 and 40 minutes of chase.

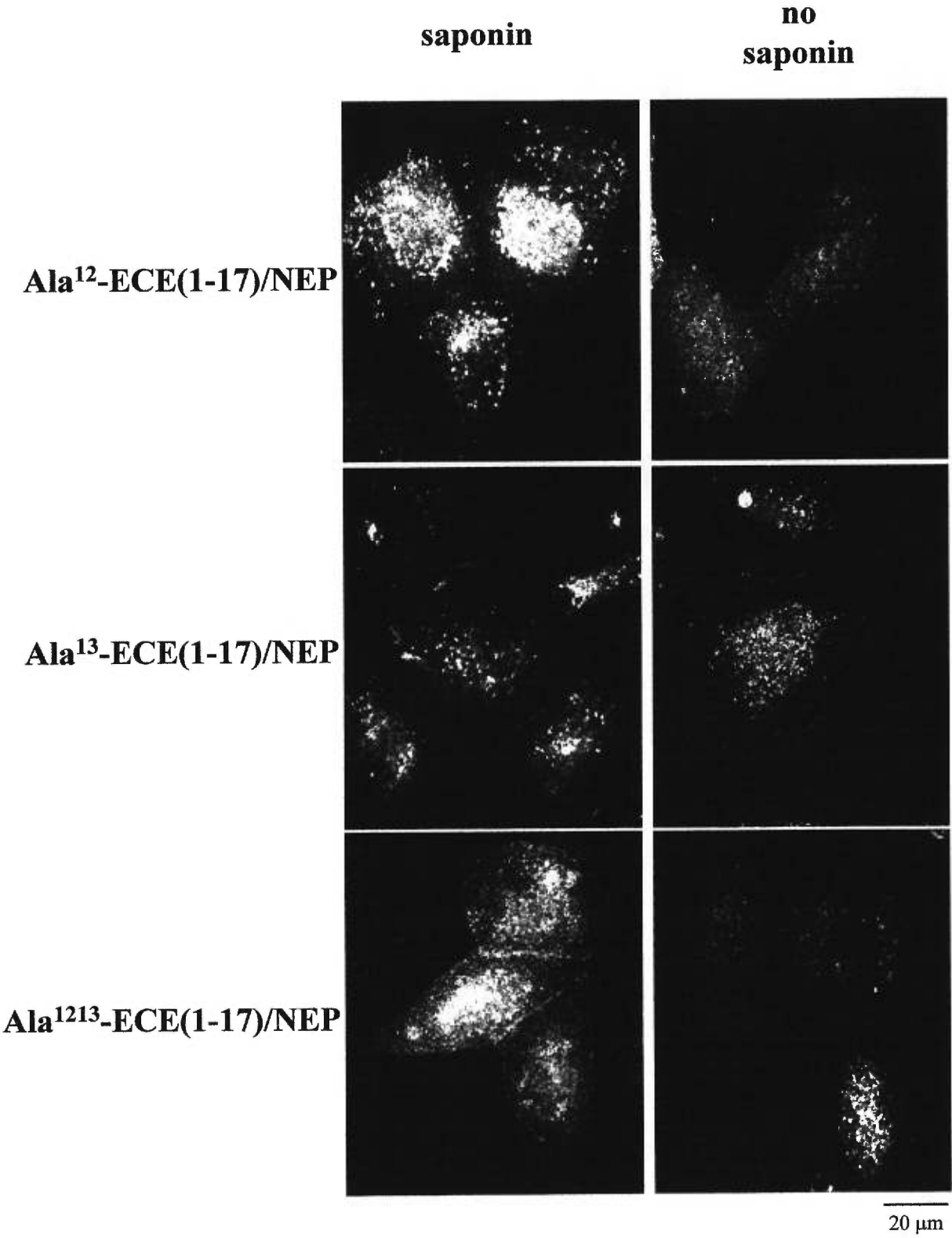


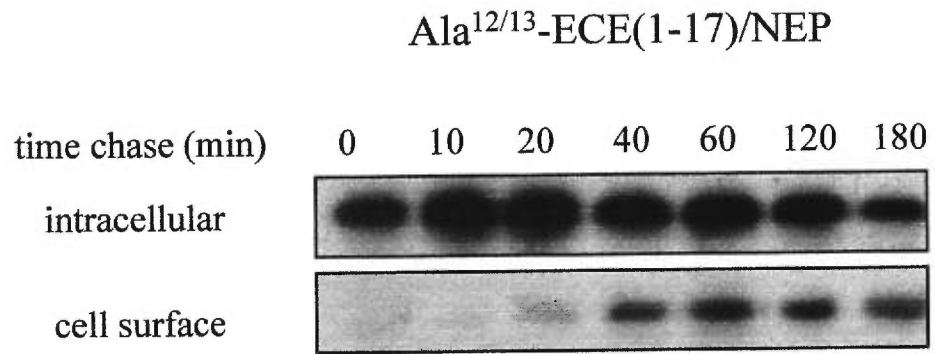
B

1	9	17	
MRGVWPPPVSALLSALGMSTYKTLD.....LGIQYQTRSPS			ECE-1b
	MMSTYKTLD.....LGIQYQTRSPS		ECE-1c
	MGRSES.....YNNHI		NEP
MRGVWPPPVSALLSALGMSTYKTLD.....LGIQYQYNNHI			ECE/NEP
	VSALLSALGMSTYKTLD.....LGIQYQYNNHI		$\Delta(1-8)$ -ECE/NEP
MRGVWPPPVSALLSALGMGRSES.....YNNHI			ECE(1-17)/NEP
MRGVWPPPVSAALSALGMGRSES.....YNNHI			Ala ¹² -ECE(1-17)/NEP
MRGVWPPPVSALASALGMGRSES.....YNNHI			Ala ¹³ -ECE(1-17)/NEP
MRGVWPPPVSAASALGMGRSES.....YNNHI			Ala ^{12/13} -ECE(1-17)/NEP
MRGVWPPPVSALLSALGMSTAKTLD.....LGIQYQYNNHI			Ala ²¹ -ECE/NEP

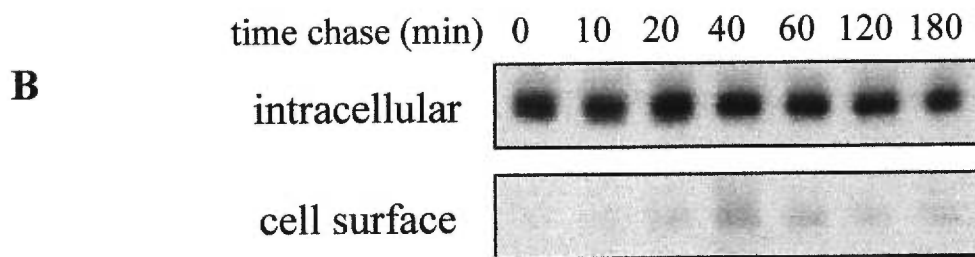
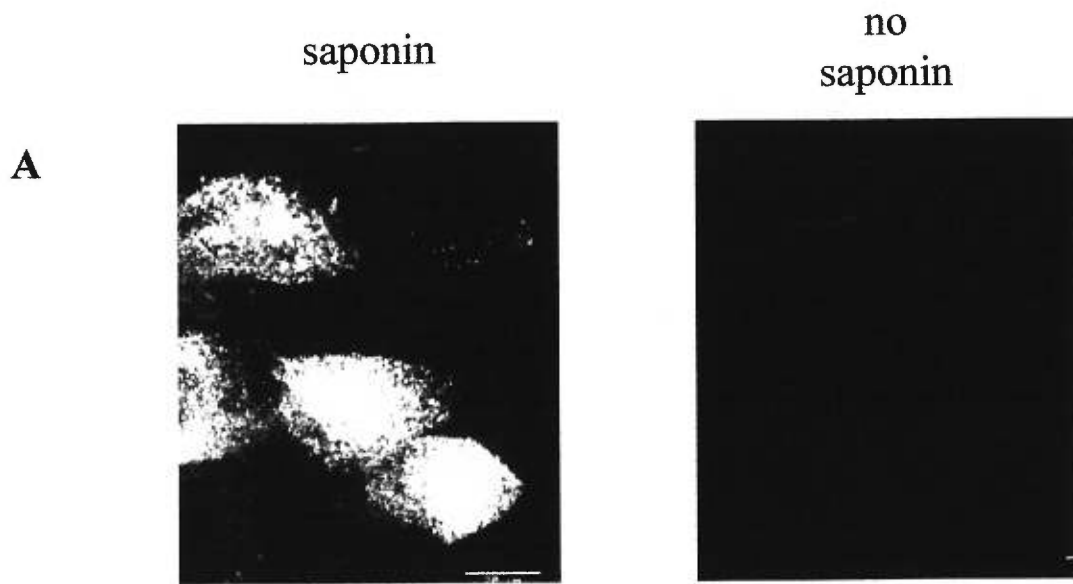








Ala²¹-ECE/NEP



CHAPITRE 4 - DISCUSSION

Les protéines membranaires intrinsèques empruntent la voie vacuolaire centrale lors de leur translocation dans la membrane du RER. Après leur passage à travers les saccules du Golgi, elles rejoignent le RTG, d'où elles sont dirigées vers leur membrane cible. Différents signaux encodés dans la séquence de la chaîne polypeptidique déterminent la localisation finale de la protéine, et la voie de transport qu'elle empruntera pour y arriver.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons utilisé la NEP, une protéine membranaire de type II, pour étudier deux types de signaux de ciblage différents. Dans un premier temps, nous avons observé l'influence de l'addition d'une ancre GPI sur le transport de la NEP du RTG à la surface cellulaire dans les cellules polarisées MDCK. Nous avons ensuite utilisé la NEP comme protéine rapporteur pour étudier le signal qui détermine la rétention intracellulaire d'une autre protéine membranaire de type II de la même famille : l'ECE.

4.1 - INFLUENCE DE L'ADDITION D'UNE ANCRE GPI SUR LE TRANSPORT DE LA NEP.

Différentes vésicules sont responsables du transport apical et basolatéral des protéines dans les cellules épithéliales polarisées (Wandinger-Ness *et coll.*, 1990). Les signaux qui déterminent le choix d'une voie de transport sont cependant encore mal compris. Dans les cellules MDCK, les protéines GPI sont envoyées vers le domaine apical de la membrane cellulaire (Lisanti *et coll.*, 1988; 1989). L'ancre GPI est donc

considérée comme un signal de ciblage apical. Les glycosphingolipides (GSL) sont synthétisés dans l'appareil de Golgi, et distribués à la surface apicale des cellules polarisées (Simons et van Meer, 1988). Ils s'assembleraient en microdomaines appelés "glycolipid rafts" au niveau de l'appareil de Golgi (Simons et Ikonen, 1997; Harder et Simons, 1997). Ces microdomaines sont similaires aux structures de faible densité et insolubles dans le Triton X-100 auxquels les protéines GPI s'associeraient par leur ancre (Simons et Wandinger-Ness, 1990). Les "glycolipid rafts" se détacheraient ensuite de la membrane du Golgi pour servir de vésicule de transport vers la membrane apicale (Simons et Ikonen, 1997).

De nombreux travaux corroborent cette théorie, dont ceux d'Arreaza et Brown (1995). La question qui se pose à l'heure actuelle est cependant de savoir si toutes les protéines apicales empruntent la même voie de transport ou si différentes vésicules se détachent du RTG pour transporter différentes protéines vers la membrane apicale des cellules MDCK. On ne sait donc pas si le même mécanisme régit à la fois le ciblage des protéines ancrées dans la membrane par un GPI et celui des protéines ancrées par un segment hydrophobe.

Les observations de Graichen et coll. (1996) montrent que la protéine gp80, sécrétée à la membrane apicale des cellules MDCK, ne s'associe pas aux complexes insolubles dans le Triton X-100 pendant son transport entre l'appareil de Golgi et le milieu extracellulaire. De plus, dans les cellules FRT et les cellules MDCK résistantes à la Concanavaleine-A, où l'ancre GPI ne sert pas de signal de ciblage apical, (Zurzolo *et coll.*, 1993; Zurzolo *et coll.*, 1994), les protéines apicales transmembranaires conservent le ciblage qu'elles ont dans la lignée MDCK. Il semblerait donc que les protéines apicales

sécrétées, ou ancrées dans le membrane par un segment polypeptidique hydrophobe, n'empruntent pas la même voie de transport entre le Golgi et la membrane plasmique que les protéines GPI.

Cependant, les récents travaux rapportés par Scheifelle et coll. (1997) semblent appuyer la théorie contraire, selon laquelle les protéines membranaires intrinsèques comme l'hémagglutinine du virus influenza utiliseraient elles aussi les "glycolipid rafts" comme vésicules de transport apical.

Nous avons choisi d'étudier le transport de différentes formes de la NEP vers la surface des cellules MDCK, afin de mieux comprendre les paramètres qui dictent le choix d'une vésicule en particulier. La WT-NEP est une protéine transmembranaire de type II normalement ciblée à la membrane apicale dans les cellules MDCK et LLC-PK₁ (Lanctôt *et coll.*, 1995; Jalal *et coll.*, 1991; Crine *et coll.*, 1993). Une forme sécrétée de la NEP, construite en remplaçant le peptide signal original de la protéine par celui de la pro-opiomélanocortine, est également ciblée vers le pôle apical des cellules MDCK, ce qui suggère la présence d'un signal de ciblage dans l'ectodomaine de la protéine (Corbeil *et coll.*, 1992). Deux autres formes de la protéine ont été construites plus tard dans le laboratoire : la GPI-NEP contient un ancrage GPI C-terminal à la place du segment hydrophobe N-terminal de la protéine sauvage (Howell *et coll.*, 1994b); la DA-NEP contient quant à elle un ancrage GPI C-terminal en plus du segment hydrophobe N-terminal original (Howell *et coll.*, 1994a). Ces deux formes chimériques de la NEP ont des caractéristiques enzymatiques comparables à celles de la protéine native.

Après avoir établi des lignées stables de cellules MDCK qui expriment l'une ou l'autre de ces trois protéines, et en utilisant un anticorps dirigé contre leur ectodomaine,

nous avons pu montrer par des expériences d'immunohistochimie que la WT-NEP, la GPI-NEP et la DA-NEP sont toutes les trois ciblées vers la membrane apicale des cellules MDCK.

Brown et Rose (1992) ont montré que les protéines GPI pouvaient être isolées sur gradient de sucrose, à partir de lysats de cellules épithéliales dans le Triton X-100 à 4°C. On retrouve les protéines GPI dans des fractions de faible densité enrichies en glycosphingolipides et en cholestérol, qui ne contiennent pas de protéines basolatérales. Il est aujourd'hui admis que le matériel retrouvé dans ces fractions correspond aux composantes des vésicules apicales qui sont utilisées pour le transport des protéines GPI, ou aux caveolae de la surface cellulaire, selon la nature des membranes à partir desquelles l'extraction a été faite.

Nous avons effectué un marquage métabolique à la [³⁵S]Met des cellules MDCK exprimant les différentes formes de la NEP. Après différentes périodes de chasse à 37°C, nous avons immunoprécipité la WT-NEP, la GPI-NEP ou la DA-NEP, et nous avons traité chacune de ces formes à l'endo-H. En déterminant la durée de chasse nécessaire à l'apparition de la résistance à l'endo-H pour chaque forme de la NEP, nous avons pu établir leurs cinétiques de passage dans le Golgi. En procédant à une immunoprécipitation des protéines à la surface des cellules nous avons pu ensuite déterminer la cinétique d'arrivée à la surface apicale des différentes formes de la NEP. Ainsi les trois formes de la NEP apparaissent sous forme résistante à l'Endo H entre 20 et 40 minutes après le début de la chasse. Cependant, une faible partie de la GPI-NEP reste sensible à l'endo-H jusqu'à 3 heures après le début de la chasse : elle semble être bloquée entre le RE et le *cis*-Golgi. Il est possible que le changement de topologie

entraîné par le remplacement de l'ancre polypeptidique originale par une ancre GPI soit responsable d'un mauvais repliement de la protéine, et de sa rétention au niveau du RE. Les expériences d'immunoprécipitation de surface nous ont permis de déterminer que pour les trois formes de la NEP, l'apparition de la protéine à la surface cellulaire se fait également entre 20 et 40 minutes après le début de la chasse, ce qui semble indiquer un transit extrêmement rapide entre l'appareil de Golgi et la surface cellulaire.

Avant d'étudier l'association des différentes formes de la NEP avec différentes vésicules de transport, il nous a paru intéressant de déterminer les caractéristiques de leur distribution à l'état d'équilibre. Dans ce but, des cellules MDCK exprimant l'une ou l'autre des formes de la NEP ont été lysées dans du Triton X-100 à 4°C, et les lysats ont été fractionnés sur gradient de sucrose. Nous avons alors réalisé un buvardage Western sur les différentes fractions du gradient, à l'aide d'un anticorps monoclonal contre la NEP, qui reconnaît les différentes formes de la protéine. Ceci nous a permis de mettre en évidence une distribution différente de la WT-NEP et des deux formes chimériques contenant l'ancrage GPI. La protéine sauvage est en effet soluble dans le Triton X-100 à la surface apicale des cellules MDCK, alors que la GPI-NEP et la DA-NEP sont insolubles dans ce détergent, ce qui semble indiquer une association de ces deux dernières avec des structures lipidiques enrichies en glycosphingolipides et en cholestérol au niveau de la membrane plasmique.

Nous avons par la suite voulu déterminer à quel endroit dans la cellule se produit l'association de la GPI-NEP et de la DA-NEP avec ces structures lipidiques. Pour ce faire, nous avons réalisé les mêmes expériences de fractionnement des lysats dans le Triton X-100 à 4°C après un marquage métabolique des cellules. Nous avons ensuite

immunoprécipité la WT-NEP, la DA-NEP ou la GPI-NEP à partir des différentes fractions du gradient de sucrose. Ces expériences ont cependant été réalisées à partir de cellules soumises à des temps de chasses qui nous permettaient de limiter la localisation intracellulaire des protéines marquées à un compartiment cellulaire donné. Dans un premier temps, nous avons voulu observer l'état des protéines au niveau du RE. Après 15 minutes de marquage à 37°C, et sans aucune chasse subséquente, les protéines sont encore sensibles à l'action de l'endo H, ce qui indique qu'elles n'ont pas atteint le *cis*-Golgi. Comme l'addition de l'ancre GPI se fait dans le RE, immédiatement après la synthèse de la protéine (Bangs *et coll.*, 1985; Ferguson *et coll.*, 1986), il est logique de penser que les protéines chimériques DA-NEP et GPI-NEP observées sous forme radioactive après un marquage métabolique de 15 minutes ont déjà leur ancre GPI. Dans de telles conditions, les trois formes de la NEP sont présentes dans les fractions lourdes du gradient. L'association avec des glycosphingolipides et du cholestérol dans des microdomaines de faible densité n'a donc pas encore eu lieu au niveau du RE. Après 15 minutes de marquage à 37°C, et une chasse de 90 minutes à 20°C, les protéines radioactives sont accumulées au niveau de l'appareil de Golgi (Matlin et Simons, 1983). Après de telles conditions de culture, nous avons réalisé les mêmes expériences de fractionnement des lysats cellulaires dans du Triton X-100 à 4°C, avant d'immunoprécipiter la NEP. Nous avons pu observer que, au niveau de l'appareil de Golgi, les seules formes de la NEP qui sont associées à du matériel de faible densité insoluble dans le Triton X-100 à 4°C sont GPI-NEP et DA-NEP. En effet, la distribution des protéines sur le gradient dans ce compartiment est semblable à celle que l'on observe au niveau de la surface cellulaire.

Les résultats apportés par cette étude montrent donc que non seulement la GPI-NEP, mais aussi la DA-NEP, se conduisent comme des protéines à ancre GPI, en ce qui concerne leur solubilité dans le Triton X-100 à 4°C et leur association avec des domaines enrichis en GSLs et en cholestérol. La protéine sauvage au contraire ne s'associerait jamais avec ces domaines. La technique de fractionnement de lysat cellulaire sur gradient de sucrose après lyse dans le Triton X-100 à 4°C a été utilisée à l'origine pour isoler les caveolae de la surface cellulaire (Chang *et coll.*, 1994). Si l'on se restreint à l'observation des phénomènes qui ont lieu au niveau du RTG, on peut cependant considérer que le matériel de faible densité que l'on isole sur le gradient correspond à des vésicules de transport riches en GSLs et en cholestérol (Brown et Rose, 1992). Deux conclusions semblent donc émerger de ces travaux : (i) la forme de la NEP qui ne contient pas d'ancrage GPI semble emprunter des vésicules de transport différentes de celles utilisées par GPI-NEP et DA-NEP entre l'appareil de Golgi et la surface cellulaire; (ii) la DA-NEP contenant deux types d'ancrage, il semble que l'ancrage GPI prédomine sur l'ancrage transmembranaire polypeptidique pour déterminer le choix d'une vésicule de transport au niveau de l'appareil de Golgi.

Certains pensent que la séparation des phases observées après l'extraction au Triton X-100 serait un phénomène artéfactuel provoqué par le traitement des membranes au détergent. Les différences de comportement des protéines dans le Triton X-100 après solubilisation pourraient en effet refléter seulement des différences de propriétés physicochimiques (Zurzolo *et coll.*, 1994). Une étude publiée récemment par Schroeder *et coll.* (1998) a cependant apporté les preuves suffisantes pour mettre fin à cette polémique et valider définitivement le modèle de travail présenté ici. Les domaines de la

membrane résistant à la solubilisation par les détergents sont en effet très similaires à la phase liquide ordonnée observée dans des membranes synthétiques, et peuvent coexister au sein d'une membrane avec les domaines en phase gel ou en phase cristalline liquide, qui représentent un degré d'ordre moindre. La formation d'une phase liquide ordonnée a pu être observée dans des mélanges de cholestérol et de lipides ayant un haut degré de saturation de leur chaîne acylée, comme la phosphatidylcholine et la sphingomyéline (Ipsen *et coll.*, 1987; Almeida *et coll.*, 1992; Sankaram et Thompson, 1990a; Sankaram et Thompson, 1990b; Mateo *et coll.*, 1995). Schroeder et coll. ont montré, en utilisant des membranes synthétiques, que si l'extraction par un détergent comme le Triton X-100 pouvait entraîner une sous-estimation du taux de lipides en phase ordonnée au sein d'une membrane, elle n'entraînait pas la formation artéfactuelle de domaines ordonnés qui n'existaient pas avant l'extraction. Le point important de cette étude réside cependant dans l'observation que la phosphatase alcaline placentaire, protéine à ancre GPI utilisée dans de nombreux modèles, et la sphingomyéline, devaient obligatoirement faire partie des domaines ordonnés insolubles dans le détergent avant extraction, et ne pouvaient pas s'associer avec ceux-ci au cours de l'étape de solubilisation. L'association de GPI-NEP et DA-NEP avec le matériel de faible densité insoluble dans le Triton X-100 n'est donc pas le résultat d'artéfacts expérimentaux mais reflète un phénomène qui existe au sein de la cellule.

Si l'association de certaines protéines apicales comme la WT-NEP avec les microdomaines insolubles dans le détergent ne peut être mise en évidence, est-ce parce que cette interaction n'existe pas, ou parce qu'elle est trop faible pour être détectée en utilisant les techniques que nous avons à ce jour à notre disposition? Lin et coll. (1998),

suite à leurs travaux sur une forme mutée de la protéine HA du virus influenza, proposent qu'au niveau du RTG, la machinerie de transport apicale (annexine II, annexine XIIIb, lectines) est confinée au sein des domaines insolubles dans le détergent et enrichis en glycolipides (DIGs). Seules les protéines capables de s'associer d'une manière ou d'une autre aux domaines DIGs pourraient donc entrer en contact avec cette machinerie. Cependant, seules des liaisons suffisamment fortes pourraient être détectées après extraction dans le Triton X-100.

Les protéines portant un signal de ciblage apical comme les sucres N- ou O-liés (voir 1.2.1.1.) interagiraient directement avec la machinerie protéique de ciblage apical au sein des DIGs. Les protéines à ancre GPI ne seraient envoyées vers la membrane apicale que parce qu'elles sont capables, du fait de la présence de leur ancre, de s'associer aux lipides des DIGs. Cependant, l'interaction lipide/lipide qui existe entre l'ancre GPI et les DIGs résisterait mieux à l'extraction dans le Triton X-100 que l'interaction protéine/protéine mise en jeu par les signaux de ciblage apical "classiques". WT-NEP et DA-NEP emprunteraient donc la même vésicule de transport entre le RTG et la surface cellulaire, mais les interactions permettant cette association ne seraient pas les mêmes. DA-NEP serait associée aux domaines DIGs en raison de l'interaction de son ancre GPI avec les GSLs et le cholestérol. L'association de WT-NEP avec ces domaines se ferait par contre par l'intermédiaire d'une lectine (Gut *et coll.*, 1998).

Le modèle de DA-NEP permet d'éliminer l'influence de l'enlèvement de l'ancrage transmembranaire original sur le ciblage de la protéine. Il permet aussi de conserver sur la protéine chimérique un épitope cytosolique, également présent dans la protéine sauvage, et reconnu par un anticorps monoclonal. En considérant les résultats

qui font l'objet de cette thèse, et en tenant compte des observations rapportées ci-dessus (Lin *et coll.*, 1998), on peut considérer l'éventualité que WT-NEP et DA-NEP soient associées aux mêmes vésicules de transport, mais avec des affinités différentes. Ceci expliquerait la distribution des deux protéines dans des fractions différentes des gradients de saccharose. Une méthode intéressante pour tester cette hypothèse serait d'isoler par immunoaffinité des vésicules de transport contenant soit WT-NEP soit DA-NEP à l'aide de l'anticorps monoclonal 23B11 dirigé contre la portion cytosolique présente dans ces deux formes de NEP (Mayor *et coll.*, 1994). L'analyse et la comparaison de ces vésicules de transport permettrait de mettre en lumière de façon non équivoque les différences éventuelles de composition de ces vésicules, ainsi que leur association éventuelle avec la machinerie de transport précédemment décrite (Fiedler *et coll.*, 1994; Fiedler et Simons, 1995; Lafont *et coll.*, 1998). Le principal obstacle à de telles expériences reste à ce jour le faible niveau d'expression des différentes protéines dans le système étudié. En effet, l'isolement de vésicules de transport issues du RTG dans des cellules semi intactes (Musch *et coll.*, 1996) s'accompagne d'une perte de matériel importante, et la faible quantité de matériel récupéré ne permet pas dans notre cas une analyse subséquente des vésicules qui soit fiable.

Un système permettant un haut niveau d'expression dans un sous-clône de la lignée de cellules MDCK (MDCK-umn), basé sur le vecteur commercial pCR3.1-uni (Invitrogen, CA) portant le promoteur CMV a récemment été mis au point (Pei et Yi, 1998). Les auteurs décrivent la production d'une protéine sécrétée à des taux avoisinant 15% des protéines totales sécrétées dans le milieu de culture. L'utilisation de ce système d'expression, ou d'un système basé sur une infection virale par VSV ou par le virus de

l'influenza recombinants devrait permettre l'augmentation des niveaux de production des diverses formes de la NEP. Ceci permettrait alors l'isolement des vésicules d'intérêt et leur caractérisation.

4.2 - IDENTIFICATION D'UN SIGNAL DI-LEUCINE PARTICIPANT A LA RETENTION INTRACELLULAIRE DE L'ECE-1b.

L'ECE-1 et la NEP sont deux protéines membranaires de type II qui appartiennent à la même famille d'endopeptidases à zinc. Trois formes de l'ECE-1 ont été identifiées. Elles diffèrent seulement dans la première partie de leur queue cytosolique N-terminale. Elles sont obtenues suite à l'utilisation de trois promoteurs différents dans la structure du gène. Les 32 acides aminés N-terminaux de l'ECE-1a lui sont particuliers. Par contre, l'ECE-1b correspond à l'ECE-1c, rallongée d'un segment N-terminal de 17 acides aminés (Valdenaire *et coll.*, 1995).

Alors que les isoformes -1a et -1c sont toutes deux exprimées à la membrane plasmique de cellules CHO, et de cellules épithéliales HUVEC et ECV304, l'ECE-1b est intracellulaire dans ces lignées cellulaires (Schweizer *et coll.*, 1997), ainsi que dans les cellules MDCK (Azarani *et coll.*, 1998). Etant donné les similarités de séquence entre ECE-1c et -1b, il nous a paru probable que le signal responsable de l'internalisation de l'ECE-1b soit compris dans les 17 acides aminés particuliers à cette isoforme. En tenant

compte des similarités de structure qui existent entre la NEP et l'ECE-1, nous avons choisi d'utiliser la NEP comme protéine modèle afin de caractériser ce signal. Pour cela, nous avons choisi de fusionner tout ou partie des segments cytosolique et transmembranaire de l'ECE-1b, soit à l'ectodomaine, soit à la totalité de la NEP.

La première protéine chimérique que nous avons construite, ECE/NEP, correspond aux domaines cytosolique et transmembranaire de l'ECE-1b fusionnés à l'ectodomaine de la NEP. Après transfection de cette chimère dans des cellules MDCK, et établissement de lignées stables, des expériences d'immunohistochimie nous ont permis d'observer au microscope confocal à fluorescence une relocalisation totale de la NEP dans un compartiment intracellulaire, montrant une distribution périnucléaire. Des expériences d'immunoprécipitation de surface de l'ECE/NEP nous ont permis de confirmer l'absence de la molécule à la surface cellulaire. Ceci nous a permis de conclure à la présence, dans la portion de l'ECE fusionnée à la NEP, d'un signal dominant responsable de la localisation intracellulaire de la protéine.

Comme les 17 acides aminés N-terminaux de l'ECE-1b se retrouvent uniquement dans cette isoforme, il est probable que ce signal d'internalisation se trouve dans cette partie de la protéine. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons fusionné cette séquence d'acides aminés en amont de la NEP, pour obtenir ECE(1-17)/NEP. Nous avons ensuite établi une lignée stable de cellules MDCK exprimant cette chimère, que nous avons utilisée dans des expériences d'immunohistochimie et d'immunoprécipitation de surface. Ces expériences nous ont permis de mettre en évidence la présence de la majorité des protéines chimériques dans les mêmes vésicules intracellulaires que celles identifiées pour ECE/NEP. Ceci suggère donc l'existence d'un signal de rétention intracellulaire, ou

d'internalisation, au sein de ces 17 acides aminés. Ce signal est suffisamment fort pour entraîner la localisation intracellulaire de la NEP qui normalement rejoint très rapidement la surface cellulaire. L'analyse de la séquence des 17 acides aminés spécifiques à l'ECE-1b démontre la présence de deux motifs susceptibles de constituer des signaux de rétention intracellulaire : une suite de trois prolines (Pro⁶⁻⁸), ainsi qu'un doublet de leucines en positions 12 et 13.

La construction et l'étude du ciblage de la chimère $\Delta(1-8)$ -ECE/NEP nous ont permis d'éliminer la possibilité d'une influence des acides aminés 1 à 8, et donc des trois prolines, sur la localisation de l'ECE-1b. En effet, cette chimère montrait un comportement totalement similaire à celui de ECE/NEP.

Pour étudier l'influence des résidus Leu¹² et Leu¹³, nous avons construit trois formes mutantes de la chimère ECE(1-17)/NEP : Ala¹²-ECE(1-17)/NEP, Ala¹³-ECE(1-17)/NEP et Ala^{12/13}-ECE(1-17)/NEP. Nous avons étudié le ciblage de ces trois chimères dans les cellules MDCK. Les études immunohistochimiques effectuées sur les lignées stables exprimant ces protéines montrent une relocalisation importante des mutants à la surface cellulaire. Cette observation est confirmée par l'immunoprécipitation de surface du mutant Ala^{12/13}-ECE(1-17)/NEP. Il est remarquable que dans le cas où les protéines chimériques mutées sont exprimées à la surface cellulaire, elles atteignent celle-ci avec une cinétique de transport similaire à celle observée pour la NEP de type sauvage. Lorsque le mécanisme de rétention intracellulaire n'est pas sollicité, la machinerie de transport utilisée normalement par la NEP semble donc être entièrement fonctionnelle. De plus, lorsqu'elles sont présentes à la surface cellulaire, les trois chimères mutées provoquent, lors des expériences d'immunofluorescence, un marquage ponctuel similaire

à celui observé dans le cas de WT-NEP, et caractéristique d'une distribution apicale des protéines.

Ces résultats nous permettent donc de conclure à la présence d'un signal de rétention intracellulaire dans les 17 acides aminés particuliers à l'isoforme -1b de l'ECE. Ce signal est suffisamment fort pour provoquer la rétention de la NEP, une protéine membranaire normalement ciblée à la surface cellulaire. En outre, nos expériences permettent de démontrer l'implication des résidus Leu¹² et Leu¹³ dans la localisation intracellulaire de la chimère ECE(1-17)/NEP, et donc de l'ECE-1b.

Nous avons réalisé des expériences d'internalisation d'anticorps anti-NEP sur les lignées de cellules MDCK exprimant soit la chimère ECE/NEP, soit la chimère ECE(1-17)/NEP. Ces expériences n'ont pas permis de détecter le transit des protéines chimériques par la surface cellulaire. Il semblerait donc, comme cela avait été suggéré par Azarani *et coll.*(1998), que le transport de l'ECE-1b se fasse directement du Golgi vers les endosomes, et que le signal di-Leu décrit ici soit un signal de rétention intracellulaire, et non d'internalisation.

Des études préliminaires, réalisées sur différents mutants de la chimère ECE/NEP, semblent en outre indiquer l'implication d'un résidu tyrosine (Tyr²¹) dans le mécanisme de ciblage intracellulaire de l'ECE-1b. La même tyrosine pourrait être la cause de la présence intracellulaire d'une faible quantité de ECE-1c, rapportée par Schweizer *et coll.* (1997). En effet, nous avons pu observer, en mutant les résidus Leu¹² et Leu¹³ de la chimère ECE/NEP que ces mutations entraînent une relocalisation partielle de la chimère à la surface cellulaire, mais que la proportion de matériel intracellulaire semble plus importante dans ce cas que dans le cas du mutant Ala^{12/13}-ECE(1-17)/NEP.

Ceci suggère la présence dans ECE/NEP d'un signal qui permettrait de renvoyer vers l'intérieur de la cellule les protéines qui, du fait de la mutation du signal di-Leu, ont atteint la surface cellulaire.

Pour vérifier ceci, nous avons construit une chimère ECE/NEP mutée sur le résidu Tyr²¹. Cette chimère mutée a été exprimée dans les cellules MDCK. Les études de ciblage montrent que cette mutation semble entraîner la relocalisation d'une faible proportion des protéines chimériques à la surface cellulaire. Il est donc probable que la Tyr²¹, présente dans l' ECE-1b et l'ECE-1c, soit impliquée dans la localisation intracellulaire de ces deux isoformes.

Les signaux Tyr, ainsi que les motifs di-Leu, ont été identifiés dans de nombreuses protéines comme médiateurs de la rétention intracellulaire, ou de l'internalisation à partir de la surface cellulaire (Voir chapitre I.2.2). On a montré l'interaction des signaux Tyr avec AP-1 et AP-2 (Ohno *et coll.*, 1995). Cependant leur affinité serait plus importante pour la chaîne moyenne $\mu 2$ de l'adaptateur AP-2, localisé à la surface cellulaire, que pour la chaîne $\mu 1$ de AP-1, qui se trouve au niveau du RTG (Ohno *et coll.*, 1996). L'interaction de peptides portant un signal di-Leu avec l'adaptateur AP-1 a également été démontrée, mais elle se ferait au niveau de la sous-unité $\beta 1$, et non $\mu 1$, de l'adaptateur. Les sites de liaison aux signaux Tyr et di-Leu sur AP-1 seraient donc séparés physiquement, et seraient de plus régulés de façon indépendante (Rapoport *et coll.*, 1998). Il semble donc que AP-1 et AP-2 pourraient agir en tant que filtres différentiels pour des protéines portant un ou plusieurs motifs de tri dans leur queue cytosolique.

Dans le cas de l'ECE-1b, le signal di-Leu spécifique à cette isoforme interagirait avec AP-1 au niveau du RTG, ce qui provoquerait la rétention intracellulaire de la

protéine. La machinerie de tri étant saturable (Marks *et coll.*, 1996), certaines protéines peuvent passer ce premier barrage et atteindre la surface cellulaire. Un signal Tyr peut alors permettre l'interaction de la protéine avec AP-2 et la machinerie d'endocytose, pour la réinternaliser. La Tyr²¹ de l'ECE-1b serait susceptible de faire partie d'un tel signal. De plus, la présence de ce type de signal sur la partie de la queue cytosolique commune à ECE-1b et ECE-1c permettrait d'expliquer l'observation de Schweizer *et coll.* (1997), d'après laquelle ECE-1c est présente à l'intérieur de la cellule, mais en quantité extrêmement faible. L'interaction de ECE-1c avec AP-2 via son signal Tyr entraînerait son internalisation, mais cette voie étant très rapidement saturée, seule une très faible proportion de l'ECE-1c pourrait l'emprunter, trop faible pour être détectée par des expériences d'internalisation d'anticorps.

Les endothélines sont produites sous forme de précurseurs qui doivent subir deux étapes de maturation pour être activés. La première de ces deux étapes est réalisée par la furine (Denault *et coll.*, 1995; Laporte *et coll.*, 1993). La furine est une endoprotéase membranaire qui catalyse le clivage de précurseurs protéiques à des sites Arg-X-Lys/Arg-Arg. Son action donne naissance à la big-endothéline. L'étape finale de maturation par l'ECE permet ensuite d'obtenir le peptide mature et actif (Yanagisawa *et coll.*, 1988). A l'équilibre, la furine est principalement localisée au niveau du RTG, mais circule également entre ce dernier et la membrane plasmique (Molloy *et coll.*, 1994). Des travaux récents ont montré que des résidus Ser et Tyr du domaine cytoplasmique de la protéine sont impliqués dans la localisation de la furine (Takahashi *et coll.*, 1995). Le résidu Tyr est principalement responsable du retour de la protéine de la surface cellulaire

vers l'appareil de Golgi : la liaison du motif Tyr au récepteur AP-2, et en particulier à sa sous-unité $\mu 2$, a été mise en évidence par Boll et coll. (1996). Un second résidu Tyr est présent en position 41 sur la queue cytosolique de l'ECE-1b. Il serait donc intéressant de déterminer son éventuelle implication avec la machinerie de tri décrite ci-dessus.

De plus, l'interaction de la furine avec AP-1 dépend de la phosphorylation de son domaine cytoplasmique par la caséine kinase II, phosphorylation qui se fait sur deux résidus Ser (Dittie *et coll.*, 1997; Jones *et coll.*, 1995; Schafer *et coll.*, 1995; Takahashi *et coll.*, 1995). Il serait donc intéressant de vérifier si les résidus Ser en positions 10 et 14 sur la portion de la queue cytosolique particulière à ECE-1b font ou non partie du signal de rétention intracellulaire qui met aussi en jeu les Leu 12 et 13. Si tel est le cas, la phosphorylation de l'une ou l'autre de ces Ser pourrait être importante pour l'interaction de la protéine avec l'adaptateur, comme cela a été montré pour la protéine gp130 (Dittrich *et coll.*, 1996), pour la sous-unité CDC γ du récepteur des cellules T (Dietrich *et coll.*, 1994) ainsi que pour la furine.

Les travaux présentés dans cette thèse ne permettent pas de trancher sur la localisation intracellulaire précise de l'ECE-1b. Des observations rapportées récemment suggèrent cependant que cette isoforme de l'ECE-1 se trouverait au niveau du RTG dans les cellules CHO (Schweizer *et coll.*, 1997), ou dans les endosomes des cellules MDCK (Azarani *et coll.*, 1998). En outre, la maturation de big-endothéline-1 exogène à la surface cellulaire se fait de façon moins efficace que la conversion intracellulaire de big-endothéline-1 endogène en endothéline-1 (Xu *et coll.*, 1997). La coordination entre les activités furine et de ECE sur la maturation du précurseur pourrait être la cause de l'augmentation de cette efficacité. Cette coordination pourrait être optimisée par la

localisation de la furine et de l'ECE dans le même compartiment intracellulaire, ou dans deux compartiments successifs. La similitude entre les signaux de ciblage présents sur ces deux protéines supporte l'idée qu'elles interagissent avec la même machinerie intracellulaire de ciblage.

Russel *et coll.* (1998a) ont récemment rapporté la présence de l'endothéline dans les vésicules de sécrétion de cellules endothéliales. Cette observation est en accord avec l'hypothèse selon laquelle l'endothéline serait sécrétée de l'endothélium de l'artère coronaire via une voie de sécrétion constitutive (Yanagisawa *et coll.*, 1988). Cependant, l'endothéline peut également être sécrétée via une voie régulée, puisqu'elle est présente dans les granules de sécrétion spécifiques aux cellules endothéliales appelées corps de Weibel-Palade. Ces structures, qui sont dérivées du RTG, sont mobilisées en présence d'un stimulus chimique ou mécanique qui résulterait en une augmentation du flux intracellulaire de calcium. Ceci semble confirmer les observations selon lesquelles une sécrétion rapide d'endothéline peut être provoquée par un stress mécanique sur des cellules endothéliales bovines d'aorte en culture (Macarthur *et coll.*, 1994) et par l'exposition au froid lors d'expériences *in vivo* (Fyhrquist *et coll.*, 1990). De plus, des travaux récents ont permis de démontrer la localisation de l'ECE-1 dans les corps de Weibel-Palade qui contiennent aussi l'endothéline-1 (Russel *et coll.*, 1998b).

Le schéma général qui émerge de toutes ces observations serait le suivant : la furine, au niveau du RTG, maturerait la pré-proendothéline-1 en big-endothéline-1. La big-endothéline-1 serait alors envoyée dans les corps de Weibel-Palade, où elle pourrait être maturée par l'ECE-1b en réponse à un stimulus extérieur.

Il serait intéressant, afin de vérifier cette hypothèse, d'observer la localisation des chimères ECE/NEP dans les cellules endothéliales, et de la comparer à la localisation de la furine dans le même système. De plus, la fabrication d'anticorps spécifiques à chacune des isoformes de l'ECE-1b permettrait d'identifier de façon claire et définitive laquelle de l'ECE-1a, -1b ou -1c est présente dans les corps de Weibel-Palade.

Une description plus précise des signaux impliqués dans la rétention intracellulaire de l'ECE-1b, ainsi que la vérification, dans des lignées de cellules endothéliales, des modèles établis dans les cellules MDCK, permettraient de préciser le rôle éventuel d'une forme intracellulaire de l'ECE-1.

Les différentes chimères de la NEP utilisées dans ces travaux s'avèrent être d'excellents outils pour l'analyse des déterminants moléculaires impliqués dans les mécanismes de ciblage intracellulaire. En effet, la disponibilité des outils immunologiques pour la NEP dans le laboratoire, ainsi que la connaissance des mécanismes de ciblage de cette protéine membranaire en font une protéine rapporteur de choix. L'unicité du modèle de la DA-NEP, et le fait qu'elle semble se comporter comme une protéine à ancre GPI en font également un modèle particulièrement intéressant. Les diverses constructions présentées dans ces travaux, et d'autres réalisées sur le même modèle pourraient être utilisées pour l'étude de la localisation subcellulaire de protéines comme l'ECE. Ces protéines représentent en effet des cibles thérapeutiques potentielles, et la connaissance précise de leur localisation intracellulaire est indispensable à la conception de nouveaux médicaments.

BIBLIOGRAPHIE

- Al-Hasani, H., Sanders Hinck, C., et Cushman, S.W. (1998). Endocytosis of the Glucose Transporter GLUT4 Is Mediated by the GTPase Dynamin. *J.Biol.Chem.* **273**, 17504-17510.
- Ali, S., Hall, J., Hazlewood, G.P., Hirst, B.H., et Gilbert, H.J. (1996). A protein targeting signal that functions in polarized cells *in vivo*. *Biochem.J.* **315**, 857-862.
- Almeida, P.F., Vaz, W.L., et Thompson, T.E. (1992). Lateral diffusion and percolation in two-phase, two-component lipid bilayers. Topology of the solid-phase domains in-plane and across the lipid bilayer. *Biochemistry* **31**, 6739-6747.
- Alonso, M.A., Fan, L., et Alarcón, B. (1998). Multiple Sorting Signals Determine Apical Localization of a Nonglycosylated Integral Membrane Protein. *J.Biol.Chem.* **272**, 30748-30752.
- Anderson, R.G.W. (1993). Caveolae : where incoming and outgoing messenger meet. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **90**, 10909-10913.
- Anderson, R.G.W., Kamen, B.A., Rothberg, K.G., et Lacey, S.W. (1992). Potocytosis : sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* **255**, 410-411.
- Arreaza, G. et Brown, D.A. (1995). Sorting and intracellular trafficking of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein and two hybrid transmembrane proteins with the same ectodomain in Madin-Darby Canine Kidney epithelial cells. *J.Biol.Chem.* **270**, 23641-23647.
- Azarani, A., Boileau, G., et Crine, P. (1998). Recombinant human Endothelin-Convertng Enzyme ECE-1b is located in an intracellular compartment when expressed in polarised MDCK cells. *Biochem.J.* **333**, 439-448.
- Bangs, J.D., Hereld, D., Krakow, J.L., Hart, G.W., et Englund, P.T. (1985). Rapid processing of the carboxyl terminus of a trypanosome variant surface glycoprotein. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **82**, 3207-3211.
- 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**, 214-220.
- Bednarek, S.Y., Orci, L., et Schekman, R. (1996). Traffic COPs and the formation of vesicle coats. *Trends Cell Biol.* **6**, 468-473.
- Benlimame, N., Simard, D., and Nabi, I.R. (1995). Autocrine motility factor receptor is a marker for a distinct tubular membrane organelle. *J.Cell Biol.* **129**, 459-471.
- Benlimame, N., Le, P.U., and Nabi, I.R. (1998). Localization of autocrine motility factor receptor to caveolae and clathrin-independent internalization of its ligand to smooth endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell.* **9**, 1773-1786.

- Boll, W., Ohno, H., Songyang, Z., Rapoport, I., Cantley, L.C., Bonifacino, J.S., et Kirchhausen, T. (1996). Sequence requirements for the recognition of tyrosine-based endocytic signals by clathrin AP-2 complexes. *EMBO J.* **15**, 5789-5795.
- Boll, W., Partin, J.S., Katz, A.I., Caplan, M.J., et Jamieson, J.D. (1991). Distinct pathways for basolateral targeting of membrane and secretory proteins in polarized epithelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **88**, 8592-8596.
- Brändli, A.W., Parton, R.G., et Simons, K. (1990). Transcytosis in MDCK Cells: Identification of Glycoproteins Transported Bidirectionally between Both Plasma Membrane Domains. *J.Cell Biol.* **111**, 2909-2921.
- Brennwald, P. et Novick, P. (1993). Interactions of three domains distinguishing the Ras-related GTP-binding proteins Ypt-1 and Sec4. *Nature* **362**, 560-563.
- Brown, D. et Sabolic, I. (1993). Endosomal pathways for water channel and proton pump recycling in kidney epithelial cells. *J.Cell Sci. suppl.* **17**, 49-59.
- Brown, D. et Stow, J.L. (1996). Protein Trafficking and Polarity in Kidney Epithelium: From Cell Biology to Physiology. *Physiol.Rev.* **76**, 245-297.
- Brown, D.A. et Rose, J.K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533-544.
- Cailler, F., Howell, S., et Crine, P. (1998). Role of the glycosyl-phosphatidylinositol anchor in the intracellular transport of a transmembrane protein in Madin-Darby Canine Kidney cells. *Biochim.Biophys.Acta.* **1415**, 1-9.
- Chang, W.J., Ying, Y.S., Rothberg, K.G., Hooper, N.M., Turner, A., Gambliel, H.A., De Gunzburg, J., Mumby, S.M., Gilman, A.G., et Anderson, R.G.W. (1994). Purification and Characterization of Smooth Muscle Cell Caveolae. *J.Cell Biol.* **126**, 127-138.
- Chuang, J.Z. et Sung, C.H. (1998). The Cytoplasmic Tail of Rhodopsin acts as a Novel Apical sorting Signal in Polarized MDCK Cells. *J.Cell Biol.* **142**, 1245-1256.
- Cole, N.B. et Lippincott-Schwartz, J. (1995). Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. *Curr.Opin.Cell Biol.* **7**, 55-64.
- Corbeil, D., Boileau, G., Lemay, G., et Crine, P. (1992). Expression and polarized apical secretion in Madin-Darby Canine Kidney Cells of Recombinant Soluble form of neutral endopeptidase lacking the cytosolic and transmembrane domains. *J.Biol.Chem.* **267**, 2798-2801.
- Corder, R., Khan, N., et Harrison, V.J. (1995). A simple method for isolating human endothelin converting enzyme free from contamination by neutral endopeptidase 24.11. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **207**, 355-362.

-
- Corvera, S., Chawla, A., Chakrabarti, R., Joly, M., Buxton, J., et Czech, M. (1994). A Double Leucine Within the BLUT4 Glucose Transporter COOH-Terminal Domain Functions as an Endocytosis Signal. *J.Cell Biol.* **126**, 979-989.
- Cosson, P. et Letourneur, F. (1997). Coatomer (COPI)-coated vesicles: roles in intracellular transport and protein sorting. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**, 484-487.
- Cowles, C.R., Odorizzi, G., Payne, G.S., et Emr, S.D. (1997). The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole. *Cell* **91**, 109-118.
- Crine, P., Jalal, F., Lanctôt, C., Corbeil, D., Waksman, G., Lemay, G., Withers, K., et Boileau, G. (1993). Targeting of neutral endopeptidase 24.11 in polarized cells. *Biochem.Soc.Transactions* **21**, 668-672.
- Danielsen, E.M. (1995). Involvement of Detergent-Insoluble Complexes in the Intracellular Transport of Intestinal Brush Border Enzymes. *Bochemistry* **34**, 1596-1605.
- Daro, E., van der Sluijs, P., Galli, T., et Mellman, I. (1996). Rab4 and cellubrevin define distinct populations of endosomes on the pathway of transferrin recycling. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **93**, 9559-9564.
- Darsow, T., Burd, C.G., et Emr, S.D. (1998). Acidic di-Leucine motif essential for AP-3-dependent sorting and restriction of the functional specificity of the VAM3P vacuolar T-SNARE. *J.Cell Biol.* **142**, 913-922.
- Dascher, C., Ossig, R., Gallwitz, D., et Schmitt, H.D. (1991). Identification and structure of four yeast genes (SLY) that are able to suppress the functional loss of YPT1, a member of the RAS superfamily. *Mol.Cell.Biol.* **11**, 872-885.
- Davitz, M.A., Hom, J., et Schenkman, S. (1989). ?? *J.Biol.Chem.* **264**, 13760-13764.
- Dell'Angelica, E.C., Klumperman, J., Stoorvogel, W., et Bonifacino, J.S. (1998). Association of the AP-3 adaptor Complex with Clathrin. *Science* **280**, 431-434.
- Dell'Angelica, E.C., Ohno, H., Eng Ooi, C., Rabinovich, E., Roche, K.W., et Bonifacino, J.S. (1997). AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *EMBO J.* **16**, 917-928.
- 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.
- Devault, A., Lazure, C., Nault, C., LeMoual, H., Seidah, N.G., Chrétien, M., Kahn, P., Powell, J., Mallet, J., Beaumont, A., Roques, B.P., Crine, P., et Boileau, G. (1987).

- Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) deduced from a complementary DNA. *EMBO J.* **6**, 1317-1322.
- Devault, A., Sales, V., Nault, C., Beaumont, A., Roques, B.P., Crine, P., et Boileau, G. (1988). Exploration of the catalytic site of endopeptidase 24.11 by site directed mutagenesis. *FEBS Lett.* **231**, 54-58.
- Dietrich, J., Hou, X., Wegener, A.M.K., et Geisler, C. (1994). CD3g contains a phosphoserine-dependent di-leucine motif involved in down-regulation of the T cell receptor. *EMBO J.* **13**, 2156-2166.
- 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**, 301-304.
- Dion, N., LeMoual, H., Fournié-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**, 623-627.
- Dittie, A.S., Thomas, L., Thomas, G., et Tooze, S.A. (1997). Interaction of furin in immature secretory granules from neuroendocrine cells with the AP-1 adaptor complex is modulated by casein kinase II phosphorylation. *EMBO J.* **16**, 4859-4870.
- Dittrich, E., Haft, C.R., Muys, L., Heinrich, P.C., et Graeve, L. (1996). A di-Leucine motif and an upstream serine in the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 mediate ligand-induced endocytosis and down-regulation of the IL-6 receptor. *J.Biol.Chem.* **271**, 5487-5494.
- Dunn, B., Stearns, T., et Botstein, D. (1993). Specificity domains distinguish the Ras-related GTPases Ypt1 and Sec4. *Nature* **362**, 563-565.
- Emoto, N. et Yanagisawa, M. (1995). Endothelin-converting Enzyme-2 Is a Membrane-bound, Phosphoramidon-sensitive Metalloprotease with Acidic pH Optimum. *J.Biol.Chem.* **270**, 15262-15268.
- Englund, P.T. (1993). The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu.Rev.Biochem.* **62**, 121-138.
- Faundez, V., Horng, J.T., et Kelly, R.B. (1998). A Function for the AP3 Coat Complex in Synaptic Vesicle Formation from Endosomes. *Cell* **93**, 423-432.
- Ferguson, M.A.J., Duszenko, M., Lamont, G.S., Overath, P., et Cross, G.A.M. (1986). Biosynthesis of Trypanosoma brucei variant surface glycoproteins. N-glycosylation and addition of a phosphatidylinositol membrane anchor. *J.Biol.Chem.* **261**, 356-362.

-
- Ferguson, 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., Lafont, F., Parton, R.G., et Simons, K. (1995). Annexin XIIIb: A Novel Epithelial Specific Annexin Is Implicated in Vesicular Traffic to the Apical Plasma Membrane. *J.Cell Biol.* **128**, 1043-1053.
- 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. et Simons, K. (1995). The Role of N-Glycans in the Secretory Pathway. *Cell* **81**, 309-312.
- Fra, A.M., Williamson, E., Simons, K., et Parton, R.G. (1995). *DE novo* formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **92**, 8655-8659.
- Friedrichson, T. et Kurzchalia, T.V. (1998). Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature* **394**, 802-805.
- Fullekrug, J. et Nilsson, T. (1998). Protein sorting in the golgi complex. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Cell Research* **1404**, 77-84.
- Futter, C.E., Connolly, C.N., Cutler, D.F., et Hopkins, C.R. (1995). Newly synthesized transferrin receptors can be detected in the endosome before they appear on the cell surface. *J.Biol.Chem.* **270**, 10999-11003.
- Fyhrquist, F., Saijonmaa, O., Metsärinne, K., Tikkanen, I., Rosenlöf, K., et Tikkanen, T. (1990). Raised plasma endothelin-1 concentration following cold pressor test. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **169**, 217-221.
- Gibson, A., Futter, C.E., Maxwell, S., Allchin, E.H., Shipman, M., Kraehenbuhl, J.P., Domingo, D., Odorizzi, G., Trowbridge, I.S., et Hopkins, C.R. (1998). Sorting Mechanisms Regulating Membrane Protein Traffic in the Apical Transcytotic Pathway of Polarized MDCK Cells. *J.Cell Biol.* **143**, 81-94.
- Glick, B.S. et Malhotra, V. (1998). The Curious Status of the Golgi Apparatus. *Cell* **95**, 889
- Graichen, R., Lösch, A., Appel, D., et Koch-Brandt, C. (1996). Glycolipid-independent Sorting of a Secretory Glycoprotein to the Apical Surface of Polarized Epithelial Cells. *J.Biol.Chem.* **271**, 15854-15857.
- Gui, G., Xu, D., Emoto, N., et Yanagisawa, M. (1993). Intracellular Localization of Membrane-bound Endothelin-Converting Enzyme from Rat Lung. *J.Cardio.Pharmac.* **22**, S53-S56

- Gut, A., Kappeler, F., Hyka, N., Balda, M.S., Hauri, H.P., et Matter, K. (1998). Carbohydrate-mediated Golgi to cell surface transport and apical targeting of membrane proteins. *EMBO J.* **17**, 1919-1929.
- Haney, P.M. et Mueckler, M. (1994). Subcellular targeting and regulation of glucose transporters. *Curr.Top.Membr.* **41**, 89-107.
- Harder, T. et Simons, K. (1997). Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**, 534-542.
- Harrison, V.J., Corder, R., Angaard, E.E., et Vane, J.R. (1993). Evidence for vesicles that transport endothelin-1 in bovine aortic endothelial cells. *J.Cardiovasc.Pharm.* **22**, S57-S60
- Harsay, E. et Bretscher, A. (1995). Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. *J.Cell Biol.* **131**, 297-310.
- Harter, C. (1995). COP-coated vesicles in intracellular protein transport. *FEBS Lett.* **369**, 89-92.
- 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**, 304-308.
- Hirst, J. et Robinson, M.S. (1998). Clathrin and adaptors. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Cell Research* **1404**, 173-193.
- Hitt, A.L., Hong Lu, T., et Luna, E.J. (1994). Ponticulin Is An Atypical Membrane Protein. *J.Cell Biol.* **126**, 1421-1431.
- Hooper, N.M. et Turner, A.J. (1988). Ectoenzymes of the kidney microvillar membrane. *Biochem.J.* **250**, 865-869.
- Howell, S., Lanctôt, C., Boileau, G., et Crine, P. (1994a). A Cleavable N-terminal Signal Peptide Is Not a Prerequisite for the Biosynthesis of Glycosylphosphatidylinositol-anchored Proteins. *J.Biol.Chem.* **269**, 16993-16996.
- Howell, S., Lanctôt, C., Boileau, G., et Crine, P. (1994b). Expression of an enzymically active glycosylphosphatidylinositol-anchored form of neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in Cos-1 cells. *Biochem.J.* **299**, 171-176.
- Ikonen, E., Tagaya, M., Ullrich, O., Montecucco, C., et Simons, K. (1995). Different Requirements for NSF, SNAP, and Rab Proteins in Apical and Basolateral Transport in MDCK Cells. *Cell* **81**, 571-580.
- 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.
- Ipsen, J.H., Karlstrom, G., Mouritsen, O.G., Wennerstrom, H., et Zuckermann, M.J. (1987). Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim.Biophys.Acta.* **905**, 162-172.
- Jalal, F., Lemay, G., Zollinger, M., Berteloot, A., Boileau, G., et Crine, P. (1991). Neutral endopeptidase, a major brush border protein of the kidney proximal nephron, is directly targeted to the apical domain when expressed in Madin-Darby Canine Kidney cells. *J.Biol.Chem.* **266**, 29826-29832.
- 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.
- Jones, D.R. et Varela-Nieto, I. (1998). The role of glycosyl-phosphatidylinositol in signal transduction. *Int.J.Biochem.Cell B.* **30**, 313-326.
- Kartenbeck, J., Stukenbrok, H. et Helenius, A. (1989). Endocytosis of Simian Virus 40 into the endoplasmic reticulum. *J.Cell Biol.* **109**, 2721-2729.
- Keller, P. et Simons, K. (1997). Post Golgi biosynthetic trafficking. *J.Cell Sci.* **110**, 3001-3009.
- Keller, P. et Simons, K. (1998). Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *J.Cell Biol.* **140**, 1357-1367.
- Kenworthy, A.K. et Edidin, M. (1998). Distribution of a Glycosylphosphatidylinositol-anchored Protein at the apical surface of MDCK cells examined at a resolution of <100 Å using imaging fluorescence resonance energy transfer. *J.Cell Biol.* **142**, 69-84.
- 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**, 489-495.
- Kerr, M.A. et Kenny, A.J. (1974b). The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem.J.* **137**, 477-488.
- 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.
- Kirchhausen, T., Bonifacino, J.S., et Riezman, H. (1997). Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**, 488-495.

-
- Lafont, F., Lecat, S., Verkade, P., et Simons, K. (1998). Annexin XIIIb Associates with Lipid Microdomains to Function in apical delivery. *J.Cell Biol.* **142**, 1413-1427.
- Lafont, F. et Simons, K. (1996). The role of microtubule-based motors in the exocytic transport of polarized cells. *Semin.Cell Dev.Biol.* **7**, 343-355.
- Lanctôt, C., Fournier, H., Howell, S., Boileau, G., et 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.
- 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
- Leborgne, R. et Hoflack, B. (1998). Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Cell Research* **1404**, 195-209.
- Leitinger, B., Hille-Rehfeld, A., et Spiess, M. (1995). Biosynthetic transport of the asialoglycoprotein receptor H1 to the cell surface occurs via endosomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **92**, 10109-10113.
- Lemay, G., Waksman, G., Roques, B.P., Crine, P., et Boileau, G. (1989). Fusion of a Cleavable Signal Peptide to the Ectodomain of Neutral Endopeptidase (EC 3.4.24.11) Results in the Secretion of an Active Enzyme in Cos-1 Cells. *J.Biol.Chem.* **264**, 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** , 15670-15674.
- 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**, 475-480.
- 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.
- 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.
- Lewin, D.A. et Mellman, I. (1998). Sorting out adaptors. *Biochim.Biophys.Acta.* **1401**, 129-145.

- Lian, J.P. et Ferro-Novick, S. (1993). BosIp, an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum to Golgi transport vesicles, is required for their fusion competence. *Cell* **73**, 735-745.
- Lin, S., Naim, H.Y., Rodriguez, A.C., et Roth, M.G. (1998). Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells. *J.Cell Biol.* **142**, 51-57.
- Lipardi, C., Mora, R., Colomer, V., Paladino, S., Nitsch, L., Rodriguez-Boulan, E., et Zurzolo, C. (1998). Caveolin transfection results in caveolae formation but not apical sorting of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins in epithelial cells. *J.Cell Biol.* **140**, 617-626.
- Lippincott-Schwartz, J., Donaldson, J.G., Schweizer, A., Berger, E.G., Hauri, H.P., Yuan, L.C., et Klausner, R.D. (1990). Microtubule-dependant retrograde transport of proteins into the ER in the presence of Brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell* **60**, 821-836.
- 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 polarized epithelial cells. *J.Cell Biol.* **109**, 2145-2156.
- Lisanti, M.P., Sargiacomo, M., Graeve, L., Saltiel, A.R., et Rodriguez-Boulan, E. (1988). Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **85**, 9557-9561.
- Low, M.G. (1989). The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochim.Biophys.Acta.* **988**, 427-454.
- Low, M.G., Ferguson, M.A.J., Futerman, A.H., et Silman, I. (1986). Covalently attached phosphatidylinositol as a hydrophobic anchor for membrane proteins. *Trends Biochem.Sci.* **11**, 212-215.
- Low, S.H., Chapin, S.J., Wimmer, C., Whiteheart, S.W., Kömüves, L.G., Mostov, K.E., et Weimbs, T. (1998). The SNARE Machinery Is Involved in Apical Plasma Membrane Trafficking in MDCK Cells. *J.Cell Biol.* **141**, 1503-1513.
- Lupashin, V.V. et Waters, M.G. (1997). t-SNARE activation Through Transient Interaction with a Rab-Like Guanosine Triphosphatase. *Science* **276**, 1255-1258.
- Macarthur, H., Warner, T.D., Wood, K.G., Corder, R., et Vane, J.R. (1994). Endothelin-1 release from endothelial cells in culture is elevated both acutely and chronically by short periods of mechanical stretch. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **200**, 395-400.
- 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**, 206-210.

- 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**, 59-66.
- 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.
- Martinez, O. et Goud, B. (1998). Rab proteins. *Biochim.Biophys.Acta.* **1404**, 101-112.
- Marzolo, M.P., Bull, P., et Gonzalez, A. (1997). Apical sorting of hepatitis B surface antigen (HBsAg) is independent of N-glycosylation and glycosylphosphatidylinositol-anchored protein segregation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **94**, 1834-1839.
- Mateo, C.R., Acuna, A.U., et Brochon, J.C. (1995). Liquid-crystalline phases of cholesterol lipid bilayers as revealed by the fluorescence of trans-parinaric acid. *Biophys.J.* **68**, 978-987.
- Matlin, K.S. et Simons, K. (1983). Reduced temperature prevents transfer of a membrane glycoprotein to the cell surface but does not prevent terminal glycosylation. *Cell* **34**, 233-243.
- Matlin, K.S. et Simons, K. (1984). Sorting of an apical plasma membrane glycoprotein occurs before it reaches the cell surface in cultured epithelial cells. *J.Cell Biol.* **99**, 2131-2139.
- Mayor, S., Rothberg, D.G., et Maxfield, F.R. (1994). Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking. *Science* **264**, 1948-1951.
- Mayor, S., Sabharanjak, S., et Maxfield, F.R. (1998). Cholesterol-dependent retention of GPI-anchored proteins in endosomes. *EMBO J.* **17**, 4626-4638.
- McNiven, M.A. (1998). Dynamin: A molecular motor with pinchase action. *Cell* **94**, 151-154.
- Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Ann.Rev.Cell.Dev.Biol.* **12**, 575-625.
- Mellman, I. et Simons, K. (1992). The Golgi Complex: In Vitro Veritas? *Cell* **68**, 829-840. *Cell* **68**, 829-840.
- Mellman, I., Yamamoto, E., Whitney, J.A., Kim, M., Hunziker, W., et Matter, K. (1993). Molecular sorting in polarized and non-polarized cells: common problems, common solutions. *Journal of Cell Science, sup.* **17**, 1-7.
- 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.

- Musch, A., Xu, H., Shields, D., et Rodriguez-Boulan, E. (1996). Transport of Vesicular Stomatitis Virus G Protein to the Cell Surface Is Signal Mediated in Polarized and Nonpolarized Cells. *J.Cell Biol.* **133**, 543-558.
- Nabi, I.R., Watanabe, H., and Raz, A. (1992). Autocrine motility factor and its receptor: role in cell locomotion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **11**, 5-20.
- Nazih, F. et Delbart, C. (1998). Transmission du signal intracellulaire par les proteines ancrees par un glycosyl-phosphatidylinositol. *Medecine Science* **14**, 275-282.
- Nickel, W. et Wieland, F.T. (1998). Biogynthetic protein transport through the early secretory pathway. *Histochem Cell Biol* **109**, 477-486.
- Nosjean, O., Briolay, A., et Roux, B. (1997). Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions. *Biochim.Biophys.Acta.* **1331**, 153-186.
- Novick, P. et Zerial, M. (1997). The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**, 496-504.
- Odorizzi, G. et Trowbridge, I.S. (1997). Structural Requirements for Basolateral Sorting of the Human Transferrin Receptor in the Biosynthetic and Endocytic Pathways of Madin-Darby Canine Kidney Cells. *J.Cell Biol.* **137**, 1255-1264.
- Ogata, S. et Fukuda, M. (1994). Lysosomal Targeting of Limp II Membrane Glycoprotein Requires a Novel Leu-Ile Motif at a Particular Position in Its Cytoplasmic Tail. *J.Biol.Chem.* **269**, 5210-5217.
- Ohno, H., Aguilar, R.C., Yeh, D., Taura, D., Saito, T., et Bonifacino, J.S. (1998). The Medium subunits of Adaptor Complexes Recognize Distinct but Overlapping Sets of Tyrosine-based Sorting Signals. *J.Biol.Chem.* **273**, 25915-25921.
- Ohno, H., Fournier, M.C., Poy, G., et Bonifacino, J.S. (1996). Structural Determinants of Interaction of Tyrosine-based Sorting Signals with the Adaptor Medium Chains. *J.Biol.Chem.* **271**, 29009-29015.
- Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M.C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., Saito, T., Gallusser, A., Kirchhausen, T., et Bonifacino, J.S. (1995). Interaction of Tyrosine-Based Sorting Signals with Clathrin-Associated Proteins. *Science* **269**, 1872-1875.
- Ortega Mateo, A. et De Artinano, 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., bohneir, 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.
- Owen, D.J. et Evans, P.R. (1998). A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytic signals. *Science* **282**, 1327-1332.

-
- Parton, R.G. (1996). Caveolae and caveolins. *Curr.Opin.Cell Biol.* **8**, 542-548.
- Parton, R.G., Joggerst, B., et Simons, K. (1994). Regulated internalization of caveolae. *J.Cell Biol.* **127**, 1199-1215.
- Pei, D. et Yi, J. (1998). A High-Level Mammalian Expression System Based on the Madin-Darby Canine Kidney Cell Line. *Protein Expres.Purif.* **13**, 277-281.
- Pfeiffer, S., Fuller, S.D., et Simons, K. (1985). Intracellular sorting and basolateral appearance of the G protein of vesicular stomatitis virus in Madin-Darby canine kidney cells. *J.Cell Biol.* **101**, 470-476.
- Presley, J.F., Cole, N.B., Schroer, T.A., Hirschberg, K., Zaal, K.J.M., et Lippincott-Schwartz, J. (1997). ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* **389**, 81-85.
- Rapoport, I., Chen, Y.C., Cupers, P., Shoelson, S.E., et Kirchhausen, T. (1998). Dileucine-based sorting signals bind to the β chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *EMBO J.* **17**, 2148-2455.
- Rapoport, I., Miyazaki, M., Boll, W., Duckworth, B., Cantley, L.C., Shoelson, S.E., et Kirchhausen, T. (1997). Regulatory interactions in the recognition of endocytic sorting signals by AP-2 complexes. *EMBO J.* **16**, 2240-2250.
- Renfrew Haft, C., De La Luz Sierra, M., Hamer, I., Carpentier, J.L., et Taylor, S.I. (1998). Analysis of the Juxtamembrane Dileucine Motif in the Insulin Receptor. *Endocrinology* **139**, 1618-1629.
- Renfrew Haft, C., Klausner, R.D., et Taylor, S.I. (1994). Involvement of Dileucine Motifs in the Internalization and Degradation of the Insulin Receptor. *J.Biol.Chem.* **269**, 26286-26294.
- Riezman, H., Woodman, P.G., van Meer, G., et Marsh, M. (1997). Molecular Mechanisms of Endocytosis. *Cell* **91**, 731-738.
- Roberg, K.J., Rowley, N., et Kaiser, C.A. (1997). Physiological regulation of membrane protein sorting late in the secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* **137**, 1469-1482.
- Rodriguez-Boulau, E. et Nelson, W.J. (1989). Morphogenesis of the Polarized Epithelial Cell Phenotype. *Science* **245**, 718-725.
- Rodriguez-Boulau, E. et Zurzolo, C. (1993). Polarity signals in epithelial cells. *Journal of Cell Science, sup.* **17**, 9-12.

- Roques, B.P., Noble, F., Daugé, V., Fournié-Zaluski, M.C., et Beaumont, A. (1993). Neutral endopeptidase 24.11 : Structure, Inhibition, and Experimental and Clinical Pharmacology. *Pharmacol.Rev.* **45**, 87-146.
- Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R., et Anderson, R.G.W. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**, 673-682.
- Rothman, J.E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**, 55-63.
- Rothman, J.E. et Sollner, T.H. (1997). Throttles and Dampers: Controlling the Engine of Membrane Fusion. *Science* **276**, 1212-1213.
- Rothman, J.E. et Wieland, F.T. (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**, 227-234.
- Roush, D.L., Gottardi, C.J., Naim, H.Y., Roth, M.G., et Caplan, M.J. (1998). Tyrosine-based Membrane Protein Sorting Signals Are Differentially Interpreted by Polarized Madin-Darby Canine Kidney and LLC-PK₁ epithelial Cells. *J.Biol.Chem.* **273**, 26862-26869.
- 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.
- Russel, F.D., Skepper, J.N., et Davenport, A.P. (1998a). Evidence Using Immunoelectron Microscopy for Regulated and Constitutive Pathways in the Transport and Release of Endothelin. *J.Cardio.Pharmacol.* **31**, 424-430.
- Russel, F.D., Skepper, J.N., et Davenport, A.P. (1998b). Human Endothelial Cell Storage Granules - A novel intracellular Site for Isoforms of the Endothelin - Converting Enzyme. *Circ.Res.* **83**, 314-321.
- Sacher, M., Jiang, Y., Barrowman, J., Scarpa, A., Burston, J., Shang, L., Schieltz, D., Yates, J.R.I., Abeliovich, H., et Ferro-Novick, S. (1998). TRAPP, a highly conserved novel complex on the cis-Golgi that mediates vesicle docking and fusion. *EMBO J.* **17**, 2494-2503.
- Sankaram, M.B. et Thompson, T.E. (1990a). Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes. *Biochemistry* **29**, 10670-10675.
- Sankaram, M.B. et Thompson, T.E. (1990b). Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **88**, 8686-8690.
- Saucan, L. et Palade, G.E. (1994). Membrane and Secretory Proteins Are Transported from the Golgi Complex to the Sinusoidal Plasmalemma of Hepatocytes by Distinct Vesicular Carriers. *J.Cell Biol.* **125**, 733-741.

- Scales, S.J., Papperkok, R., et Kreis, T.E. (1997). Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COP II and COP I. *Cell* **90**, 1137-1148.
- Schafer, W., Stroh, A., Berghofer, 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.
- Scheiffele, P., Peränen, J., et Simons, K. (1995). N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature* **378**, 96-98.
- Scheiffele, P., Roth, M.G., et Simons, K. (1997). Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *EMBO J.* **16**, 5501-5508.
- Schlegel, A., Volonté, D., Engelman, J.A., Galbiati, F., Mehta, P., Zhang, X.L., Scherer, P.E., et Lisanti, M.P. (1998). Crowded Little Caves: Structure and Function of Caveolae. *Cell.Signal.* **10**, 457-463.
- Schmid, S.L., McNiven, M.A., et De Camilli, P. (1998). Dynamin and its partners: a progress report. *Curr.Opin.Cell Biol.* **10**, 504-512.
- 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**, 238-243.
- Schnitzer, J.E., Allard, J., et Oh, P. (1995a). NEM inhibits transcytosis, endocytosis, and capillary permeability: implication of caveolae fusion in endothelia. *Am.J.Physiol.* **268**, H48-H55
- Schnitzer, J.E., Liu, J., et Oh, P. (1995b). Endothelial Caveolae Have the Molecular Transport Machinery for Vesicle Budding, Docking, and Fusion Including VAMP, NSF, SNAP, Annexins, and GTPases. *J.Biol.Chem.* **270**, 14399-14404.
- Schnitzer, J.E., McIntosh, D.P., Dvorak, A.M., Liu, J., et Oh, P. (1995c). Separation of caveolae from associated microdomains of GPI-anchored proteins. *Science* **269**, 1435-1438.
- Schroeder, R., Ahmed, S.N., Zhu, Y., London, E., et Brown, D.A. (1998). Cholesterol and Sphingolipid Enhance the Triton X-100 Insolubility of Glycosylphosphatidylinositol-anchored Proteins by Promoting the Formation of Detergent -insoluble Ordered Membrane Domains. *J.Biol.Chem.* **273**, 1150-1157.
- Schweizer, A., Valdenaire, O., Nelbock, P., Deuschle, U., Dumas Milne Edwards, J.B., Stumpf, J.G., et Loffler, B.M. (1997). Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochem.J.* **328**, 871-877.

-
- Shimada, K., Takahashi, M., Ikeda, M., et Tanzawa, 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**, 18275-18278.
- Simons, K. et Fuller, S.D. (1985). Cell Surface Polarity In Epithelia. *Annu.Rev.Cell Biol.* **1**, 243-288.
- Simons, K. et Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572.
- Simons, K. et van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *J.Biochem.* **27**, 6197-6202.
- Simons, K. et Wandinger-Ness, A. (1990). Polarized sorting in epithelia. *Cell* **62**, 207-210.
- Singer, S.J. (1990). The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Annu.Rev.Cell Biol.* **6**, 247-296.
- Sollner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., et Rothman, J.E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318-324.
- Solomon, K.R., Rudd, C.E., et Finberg, R.W. (1996). The association between glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and heterotrimeric G protein α subunits in lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **93**, 6053-6058.
- Spieß, M. (1995). Heads or tails - what determines the orientation of proteins in the membrane. *FEBS Lett.* **369**, 76-79.
- Stahl, N., Borchelt, D.R., et Prusiner, S.B. (1990). Differential Release of Cellular and Scrapie Prion Proteins from Cellular Membranes by Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C. *Biochemistry* **29**, 5405-5412.
- Stevens, V.L. (1995). Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Biochem.J.* **310**, 361-370.
- Takahashi, M., Fukuda, K., Shimada, K., Barnes, K., Turner, A.J., Ikeda, M., Koike, H., Yamamoto, E., et Tanzawa, K. (1995). Localization of rat endothelin-converting enzyme to vascular endothelial cells and some secretory cells. *Biochem.J.* **311**, 657-665.

- 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.
- Tooze, S.A. (1998). Biogenesis of secretory granules in the trans-Golgi network of neuroendocrine and endocrine cells. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Cell Research* **1404**, 231-244.
- Trowbridge, I.S., Collawn, J.F., et Hopkins, C.R. (1993). Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu.Rev.Cell Biol.* **9**, 129-161.
- Turner, A.J. et Tanzawa, K. (1997). Mammalian membrane metallopeptidases: NEP,ECE,KELL, and PEX. *FASEB Journal* **11**, 355-364.
- Urushidani, T. et Forte, J.G. (1998). Stimulation-associated redistribution of H⁺,K⁺-ATPase activity in isolated gastric glands. *Am.J.Physiol.* **252**, G458-G465
- 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**, 29794-29798.
- van't Hof, W., Rodriguez-Boulant, E., et Menon, A.K. (1995). Nonpolarized distribution of glycosylphosphatidylinositols in the plasma membrane of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J.Biol.Chem.* **270**, 24150-24155.
- Varma, R. et Mayor, S. (1998). GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* **394**, 798-801.
- Vidugiriene, J. et Menon, A.K. (1994). The GPI anchor of cell surface proteins is synthesised on the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum. *J.Cell Biol.* **127**, 333-341.
- Wandinger-Ness, A., Bennet, M.K., Antony, C., et Simons, K. (1990). Distinct transport vesicles mediate the delivery of plasma membrane proteins to the apical and basolateral domains of MDCK cells. *J.Cell Biol.* **111**, 987-1000.
- Warrej, R.A., Green, F.A., Stenberg, P.E., et Enns, C.A. (1998). Distinct Saturable Pathways for the Endocytosis of different Tyrosine Motifs. *J.Biol.Chem.* **273**, 17056-17063.
- Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T., et Rothman, J.E. (1998). Snarepins - minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**, 759-772.

- White, S., Hatton, S.R., Siddiqui, M.A., Parker, C.D., Trowbridge, I.S., et Collawn, J.F. (1998). Analysis of the Structural Requirements for Lysosomal Membrane Targeting Using Transferrin Receptor Chimeras. *J.Biol.Chem.* **273**, 14355-14362.
- Xu, D., Emoto, N., Glaid, A., Slaughter, C., Kaw, S., deWit, D., et Yanagisawa, M. (1997). ECE-1: a Membrane-bound Metalloprotease That Catalyzes the Proteolytic Activation of Big Endothelin-1. *Cell* **78**, 473-485.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., et Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**, 411-415.
- Yeaman, C., Le Gall, A.H., Baldwin, A.N., Monlauzeur, L., Le Bivic, A., et Rodriguez-Boulan, E. (1997). The O-glycosylated Stalk Domain Is Required for Apical Sorting of Neurotrophin Receptors in Polarized MDCK cells. *J.Cell Biol.* **139**, 929-940.
- Yoshimori, T., Keller, P., Roth, M.G., et Simons, K. (1996). Different Biosynthetic Transport Routes to the Plasma Membrane in BHK and CHO Cells. *J.Cell Biol.* **133**, 247-256.
- Zurzolo, C., Lisanti, M.P., Caras, I.W., Nitsch, L., et Rodriguez-Boulan, E. (1993). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins are preferentially targeted to the basolateral surface in Fischer Rat Thyroid epithelial cells. *J.Cell Biol.* **121**, 1031-1039.
- Zurzolo, C., van't Hof, W., van Meer, G., et Rodriguez-Boulan, E. (1994). VIP21/caveolin, glycosphingolipid clusters and the sorting of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in epithelial cells. *EMBO J.* **13**, 42-53.