

Université de Montréal

**Clonage et caractérisation de MMEL2, une nouvelle peptidase
de la famille de l'endopeptidase neutre**

Par

Nadia Bonvouloir

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.)

en Biochimie

Juin 2001

©Nadia Bonvouloir, 2001



W

4

158

2001

N.083

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:
Clonage et caractérisation de MMEL2, une nouvelle peptidase
de la famille de l'endopeptidase neutre

Présenté par
Nadia Bonvouloir

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Luis Rokeach	président-rapporteur
Dr Luc DesGroseillers	directeur de recherche
Dr Guy Boileau	codirecteur de recherche
Dr Léa Brakier-Gingras	membre du jury

Mémoire accepté le :

SOMMAIRE

La signalisation intercellulaire est un processus complexe requérant dans certains cas, l'utilisation de petites molécules nommées messagers. Ces derniers interagissent avec les cellules cibles et engendrent alors une réponse physiologique. Les peptidases, plus particulièrement les métallopeptidases à zinc, jouent un rôle clé dans l'homéostasie de la signalisation intercellulaire tant au niveau de la dégradation que de la maturation des messagers. La famille de l'endopeptidase neutre (EPN) constitue une famille de métallopeptidases à zinc bien caractérisée et d'intérêt sans cesse croissant. Elle est actuellement composée de sept membres qui exercent des fonctions physiologiques diverses et importantes, allant du contrôle de la perception de la douleur à la régulation du métabolisme du phosphate. Plusieurs inhibiteurs pharmacologiques ont ainsi été créés afin d'interférer sur l'action de certaines peptidases de la famille et permettre de moduler leur action. La spécificité de ces inhibiteurs ne peut cependant être établie que si tous les membres de la famille sont connus.

Dans ce mémoire, nous rapportons le clonage d'une nouvelle peptidase de la famille de l'EPN, MMEL2. MMEL2 a été identifiée à partir d'une banque de cerveau humain. La séquence protéique déduite pour MMEL2 montre bien qu'elle fait partie de la famille de l'EPN, puisqu'elle possède une très grande similarité de séquence et tous les acides aminés importants pour l'activité de cette classe d'enzymes. Parmi les membres de la famille, MMEL2 est la protéine la plus identique (77,5 % d'identité de séquence) à la protéine de souris MMEL1. Cette dernière est la seule protéine de la famille de l'EPN à être produite sous forme soluble suite à son clivage par une enzyme de type furine. L'identification de

deux types de transcrits suggère la présence de deux isoformes de la protéine dont un contient un site potentiel de clivage à la furine permettant de relâcher une forme soluble de la protéine, tout comme c'est le cas pour MMEL1. D'après des études de buvardage de type Northern et de RT-PCR, MMEL2 semble présente dans quelques tissus mais principalement dans les testicules où le transcrit est très abondant. Elle est présente également à des niveaux d'expression plus bas dans le cœur, le rein et le cerveau.

Afin de compléter la caractérisation de la protéine MMEL2 humaine, nous avons développé des anticorps polyclonaux dirigés contre MMEL2 et avons effectué des expériences de localisation cellulaire de la protéine sur des extraits de cellules transfectées. Bien que la protéine MMEL2 contienne dans sa séquence un site potentiel de clivage à la furine, elle se retrouve dans la cellule, probablement au niveau du RER et n'est donc pas sécrétée dans le milieu dans la lignée cellulaire utilisée. La protéine endogène n'a cependant pas encore été détectée dans les tissus. L'élaboration d'un anticorps monoclonal nous permettra de pousser la caractérisation *in vivo* de la protéine.

Le gène *MMEL2* est localisé au locus chromosomique 1p36. Ce locus est associé à certaines maladies affectant le système nerveux central comme la neuropathie sensorielle motrice héréditaire 2A, le syndrome de Schwartz-Jampel-Aberfeld et les neuroblastomes. L'implication réelle de MMEL2 dans ces maladies demeure cependant encore inconnue.

La fonction physiologique de MMEL2 n'a pas encore été identifiée. L'analyse des substrats de l'enzyme ainsi que la détection de la protéine endogène nous donnera des indices sur le rôle de cette nouvelle protéine. Encore plusieurs aspects de la caractérisation de MMEL2 restent obscurs et guideront les recherches futures sur cette nouvelle métallopeptidase.

Mots clés :

Métallopeptidases, endopeptidase neutre, MMEL2, clonage, localisation chromosomique, expression cellulaire

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	iii
Table des matières	vi
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Liste des sigles et des abréviations	xii
Dédicace	xv
Remerciements	xvi

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION 1

1.1	Communication intercellulaire et systèmes peptidergiques	2
1.1.1	Maturation des peptides	5
1.1.2	Dégradation des peptides	7
1.2	Peptidases	8
1.2.1	Premier mode de classification basée sur la spécificité de clivage	8
1.2.1.1	Exopeptidases	8
1.2.1.2	Endopeptidases	9
1.2.2	Deuxième mode de classification basée sur des comparaisons évolutives	10
1.2.2.1	Métallopeptidases	12
1.3	Classification des peptidases à zinc	12
1.3.1	Les Zincines	13

1.3.1.1	Gluzincines	13
1.3.1.2	Metzincines	14
1.3.2	Les Inverzincines	14
1.3.3	Les Carboxypeptidases	15
1.3.4	Les DD-Carboxypeptidases	15
1.4	Mécanisme d'action des gluzincines	15
1.5	La famille de l'endopeptidase neutre	17
1.5.1	L'EPN	18
1.5.1.1	Distribution tissulaire et cellulaire et fonctions physiologiques de l'EPN	19
1.5.1.2	Modulation du signal nociceptif	21
1.5.1.3	EPN vs Alzheimer	22
1.5.1.4	Régulation de l'équilibre eau/électrolytes	23
1.5.1.5	Régulation de la réaction inflammatoire	24
1.5.1.6	Digestion des peptides du bol alimentaire et régulation du transit gastro-intestinal	25
1.5.1.7	Différentiation et prolifération cellulaire	26
1.5.1.8	L'EPN dans les fluides physiologiques	27
1.5.1.9	Souris EPN (-/-)	28
1.5.2	ECE	28
1.5.3	PHEX	30
1.5.4	KELL	31
1.5.5	ECEL1	32
1.5.6	SEP/NL1/NEPII/MMELI	34
1.6	Caractéristiques structurales de la famille de l'EPN	37

1.7	Caractérisation du site actif de l'EPN	39
1.7.1	Comparaison entre l'EPN et les autres membres de la famille	44
1.8	Description du projet de recherche	48

CHAPITRE 2 - ARTICLE 50

Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of MMEL2, a gene coding for a novel human member of the neutral endopeptidase-24.11 family.

Nadia Bonvouloir, Nicole Lemieux, Philippe Crine, Guy Boileau, Luc DesGroseillers

En voie de publication à *DNA and Cell biology*.

Contribution des auteurs	51
<i>Abstract</i>	53
<i>Introduction</i>	54
<i>Material and Methods</i>	56
<i>Results</i>	59
<i>Discussion</i>	61
<i>Acknowledgment</i>	64
<i>References</i>	65
<i>Legends to figures</i>	71

CHAPITRE 3 - RÉSULTATS ADDITIONNELS 76

Des anticorps polyclonaux de lapin permettent de détecter MMEL2 dans le réticulum endoplasmique de cellules transfectées.

Nadia Bonvouloir, Philippe Crine, Guy Boileau et Luc DesGroseillers

Contribution des auteurs	77
3.1 Résumé	79
3.2 Introduction	80
3.3 Matériel et Méthodes	81
3.3.1 Production d'anticorps polyclonaux	81
3.3.2 Production d'anticorps monoclonaux	81
3.3.3 Construction du vecteur d'expression	82
3.3.4 Culture cellulaire et transfection	82
3.3.5 Immunobuvardage de type Western	83
3.3.6 Étude de la glycosylation	84
3.4 Résultats et Discussion	85
3.4.1 Production d'anticorps polyclonaux de lapin	85
3.4.2 Expression de MMEL2 par transfection cellulaire	87
3.4.3 Spécificité des anticorps polyclonaux de lapin	90
3.4.4 Production d'anticorps monoclonaux	92
CHAPITRE 4 - DISCUSSION	94
4.1 Découverte d'un nouveau membre de la famille de l'EPN:MMEL2	95
4.2 Expression de MMEL2 par transfection cellulaire	96
4.3 Activité enzymatique de MMEL2	98
4.4 MMEL2 est-elle l'homologue de MMEL1?	99
4.5 Fonction physiologique de MMEL2	101
4.6 Conclusion	104
BIBLIOGRAPHIE	106

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1:

Tableau I: Comparaison d'identité de séquence entre les différents

membres de la famille de l'EPN.

46

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1:

Figure 1: Mécanismes de signalisation intercellulaire	3
Figure 2: Types de récepteurs cellulaires	4
Figure 3: Structure et maturation de la POMC et de ses produits dérivés de clivage	6
Figure 4: Classification des différentes familles de métalloprotéases à zinc	11
Figure 5: Mécanisme d'action de la thermolysine	16
Figure 6: Modélisation du site actif de l'EPN	40
Figure 7: Cristallisation du site actif de l'EPN conjugué au phosphoramidon	41
Figure 8: Représentation schématique des membres de la famille de l'EPN	45

CHAPITRE 2:

Figure 1: <i>Amino acid sequence comparaison between MMEL2 and MMEL1</i>	73
Figure 2: <i>Tissue expression of MMEL2 in humans</i>	74
Figure 3: <i>Chromosomal localization of the MMEL2 gene</i>	75

CHAPITRE 3:

Figure 1: Production et purification de l'antigène MMEL2 chez <i>E.coli</i> AP401.	86
Figure 2: Expression de MMEL2 dans les cellules HEK-293T transfectées.	88
Figure 3: Spécificité des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre MMEL2.	91

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

%:	Pourcentage
aa:	Acide aminé
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADNc:	ADN complémentaire
α -CGRP:	<i>α-Calcitonine growth related peptide</i>
AMP:	Adénosine monophosphate
ANP:	<i>Atrial natriuretic peptide</i>
ARN:	Acide ribonucléique
ARNm:	ARN messenger
BK:	Bradykinine
BLPs:	<i>Bombesin-like-peptides</i>
CALLA:	<i>Common acute leukemia lymphoblastic antigen</i>
CRLR:	<i>Calcitonine-receptor-like receptor</i>
DINE:	<i>Damage-induced neuronal endopeptidase</i>
ECE:	Enzyme de conversion de l'endothéline
ECEL1:	<i>Endothelin conversion enzyme like 1</i>
EndoH:	Endoglycosidase H
EPN:	Endopeptidase neutre
EST:	<i>Expressed sequence tag</i>
ET:	Endothéline
FISH:	<i>High resolution fluorescence in situ hybridization</i>

GST:	Gluthatione S-transférase
HEK:	<i>Human embryonic kidney</i>
kDa:	kiloDalton
Kell:	Antigène de surface des érythrocytes
mM:	Millimolaire
MME:	<i>Membrane metallo-endorpeptidase</i>
MMEL:	<i>MME-like</i>
NEP:	<i>Neutral endopeptidase</i>
NL:	<i>NEP-like</i>
OGP:	<i>Osteocalcin growth peptide</i>
PAGE:	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
pb:	Paire de bases nucléotidiques
PCR:	<i>Polymerase chain reaction</i>
PHEX:	<i><u>Ph</u>osphate regulating gene with homologies to <u>e</u>ndopeptidases on the <u>X</u> chromosome</i>
PNGaseF:	Peptide N-glycosidase F
POMC:	Pro-opiomélanocortine
PTH:	<i>Parathyroïd hormone</i>
PTHrP:	<i>Parathyroïd hormone related peptide</i>
RACE:	<i>Rapid amplification of a cDNA end</i>
RAMP:	<i>Receptor-activity-modifying protein</i>
RER:	Réticulum endoplasmique rugueux
RT:	<i>Reverse transcription</i>
SEP:	<i>Secreted endopeptidase</i>
SNC:	Système nerveux central

SP: Substance P
TLN: Thermolysine
XCE: *X converting enzyme*

À mes parents

Madeleine Allard-Bonvouloir

Et Albert Bonvouloir

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux patrons, les Dr Luc DesGroseillers, Dr Guy Boileau, Dr Philippe Crine pour m'avoir accueillie dans leurs laboratoires. Leur créativité, leur expertise ainsi que leur détermination m'ont grandement aidée à poursuivre ce projet et furent une source de motivation inestimable. Je les remercie également de leur disponibilité et du précieux temps qu'ils ont pu m'accorder.

Je désire remercier Pierre Melançon pour m'avoir initiée au merveilleux monde de la biologie moléculaire, sans oublier Louise Wickham, Line Lespérance et Claire Vézina qui m'ont grandement aidée à apprivoiser certaines techniques. Merci également à Louise Cournoyer et Mireille Fyfe pour leur assistance technique.

Je remercie également mes deux grandes amies Mélanie Carpentier et Marie-Ève Lane. Merci Mélanie pour toutes ces heures d'étude pénibles, pour tes conseils, tes encouragements et pour avoir supporté mes nombreuses tranches de vie. Merci Marie-Ève pour ton soutien tant scientifique que moral, pour ton amitié, pour toutes nos escapades et nos nombreux 5 à 7 (ou plus...) à caractère éducatif évidemment!

Un gros merci à tous les étudiants des laboratoires des Dr Luc DesGroseillers, Dr Guy Boileau et Dr Philippe Crine avec qui ce fût un plaisir de travailler au cours des dernières années. Merci donc à Demian Barbas, Alexandre Benoit, Thomas Duchaine, Georges Elvira, David Fortin, Andréa Frota-Ruchon, Galia Ghaddar, Guillaume Lesage, Ming Luo,

Miguel Angel Vargas, Nathalie Ventura et Jacques Zappulla. Merci pour votre dynamisme, vos encouragements et vos conseils tous plus judicieux les uns que les autres.

De plus, j'aimerais remercier François-Xavier Campbell, André Galarneau et Alexandre Montpetit qui m'ont tous donné des conseils scientifiques très utiles pour l'accomplissement de mon projet.

Merci aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

Finalement, je remercie du fond du coeur mon copain et confident Michel Diercks. Un gros merci Michel pour ton soutien au quotidien, tes encouragements et pour bien plus encore.

CHAPITRE 1
INTRODUCTION

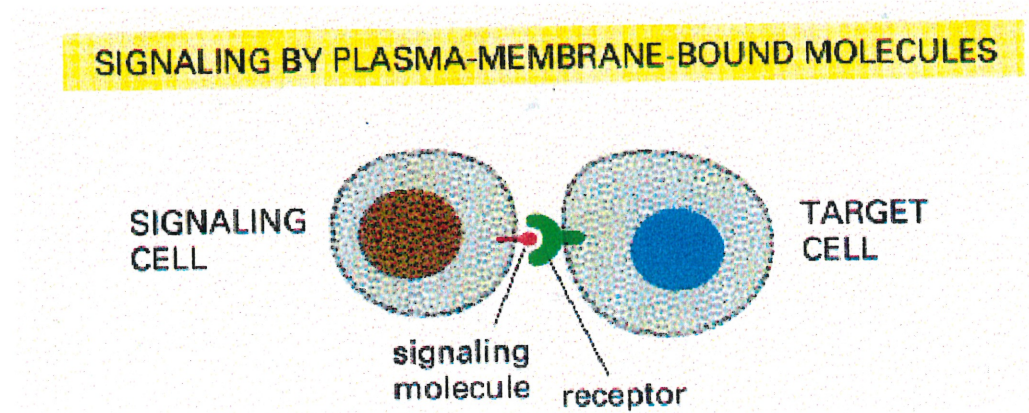
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION

1.1) Communication intercellulaire et systèmes peptidergiques

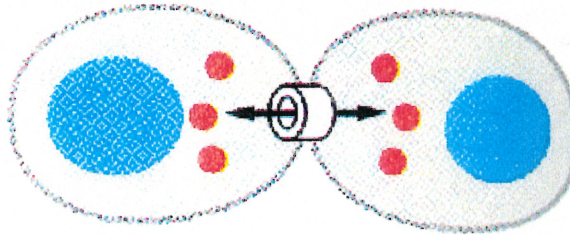
Les cellules eucaryotes communiquent entre elles grâce à deux mécanismes distincts (voir Figure 1) (revue par: Kahn, 1976; Snyder, 1985). Le premier type de mécanisme consiste en un contact direct entre deux cellules voisines. Ce contact peut s'effectuer de deux façons, soit par une interaction entre une protéine de surface d'une première cellule et un récepteur de la cellule cible ou soit via des jonctions de type trouées (*Gap junction*). Cette dernière voie implique une connexion entre les deux cytoplasmes des cellules reliées par des canaux (Caveney, 1985; Warner, 1985). Il y a alors échange de petites molécules de signalisation telles que le calcium et l'AMP cyclique. Le second mode de communication le plus utilisé consiste en la sécrétion et la diffusion extracellulaire d'un messager qui interagira avec un récepteur spécifique sur une cellule cible.

Plusieurs types de molécules sont utilisés dans la communication intercellulaire (revue par: Snyder, 1985). Parmi ces messagers, on retrouve les protéines, les peptides, les acides aminés, les neurotransmetteurs, les nucléotides, les stéroïdes, les rétinoïdes, les gaz et les acides gras dérivés. Certains de ces messagers sont hydrophiles (ex: hormones peptidiques et amines biogènes) et interagissent directement avec leurs récepteurs situés à la surface cellulaire, car ils ne peuvent traverser la membrane lipidique (voir Figure 2). Par contre, d'autres molécules de signalisation telles que les hormones lipidiques sont transportées dans le milieu extracellulaire par des protéines de transport.

A)



SIGNALING BY GAP JUNCTION



B)

SIGNALING BY SECRETED MOLECULES

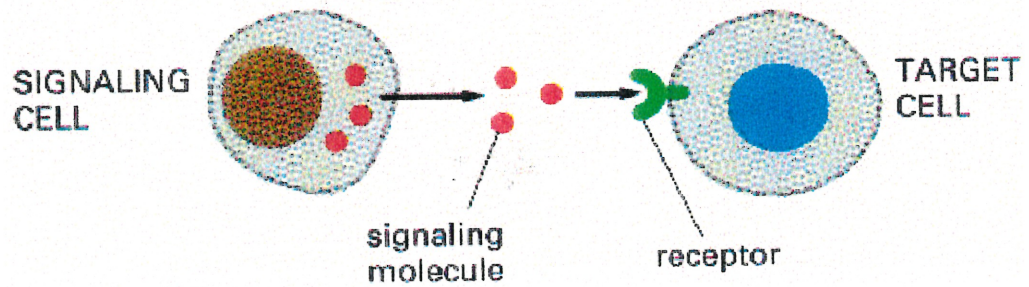


Figure 1: Mécanismes de signalisation intercellulaire (Alberts *et al.*, 1994) A) Signalisation de type contact cellule-cellule B) Signalisation via des molécules sécrétées.

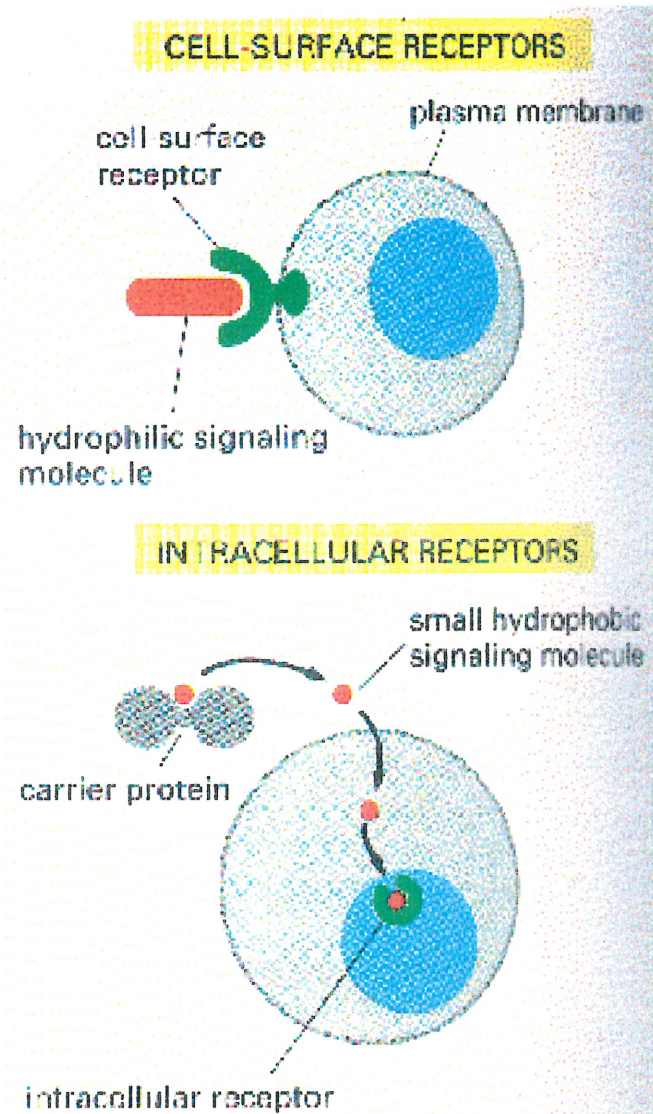


Figure 2: Types de récepteurs cellulaires (Alberts *et al.*, 1994).

Une fois arrivées à destination, ces hormones se dissocient de la protéine de transport et diffusent à l'intérieur de la cellule. Ils pourront alors lier un récepteur spécifique intracellulaire et provoquer une réponse physiologique.

Les molécules messagères hydrophiles de type hormones peptidiques et neurotransmetteurs sont impliquées dans le contrôle d'une grande variété de phénomènes physiologiques. L'utilisation des peptides comme molécules de signalisation implique trois étapes essentielles (revue par: Snyder, 1985) soit 1) la production, la sécrétion et/ou la maturation du peptide par des cellules spécialisées, 2) l'interaction de la molécule active avec un récepteur spécifique à la surface des cellules cibles, 3) la dégradation extracellulaire ou la recapture du messenger afin de terminer son action. Notre groupe tente d'élucider certains mécanismes de régulation des messagers hydrophiles. Les prochaines sections permettront donc d'aborder quelques aspects généraux des mécanismes de régulation de ces messagers.

1.1.1) Maturation des peptides

La première étape d'un signal cellulaire de type peptidergique consiste en la production d'un messenger peptidique, puis sa sécrétion par une cellule productrice spécialisée. Certaines molécules de signalisation doivent cependant subir une étape de maturation intra et/ou extracellulaire essentielle pour leur conférer une activité (pour revue: Seidah *et al.*, 1998; Mizunno et Matsuo, 1994; Khan and James, 1998). Ces molécules dites précurseurs contiennent une prorégion qui les maintient dans un état inactif. Le clivage de cette prorégion par des enzymes protéolytiques permet de retrouver la forme active du peptide. Plusieurs précurseurs comme la pro-opiomélanocortine (voir Figure 3) (revue par : Chretien

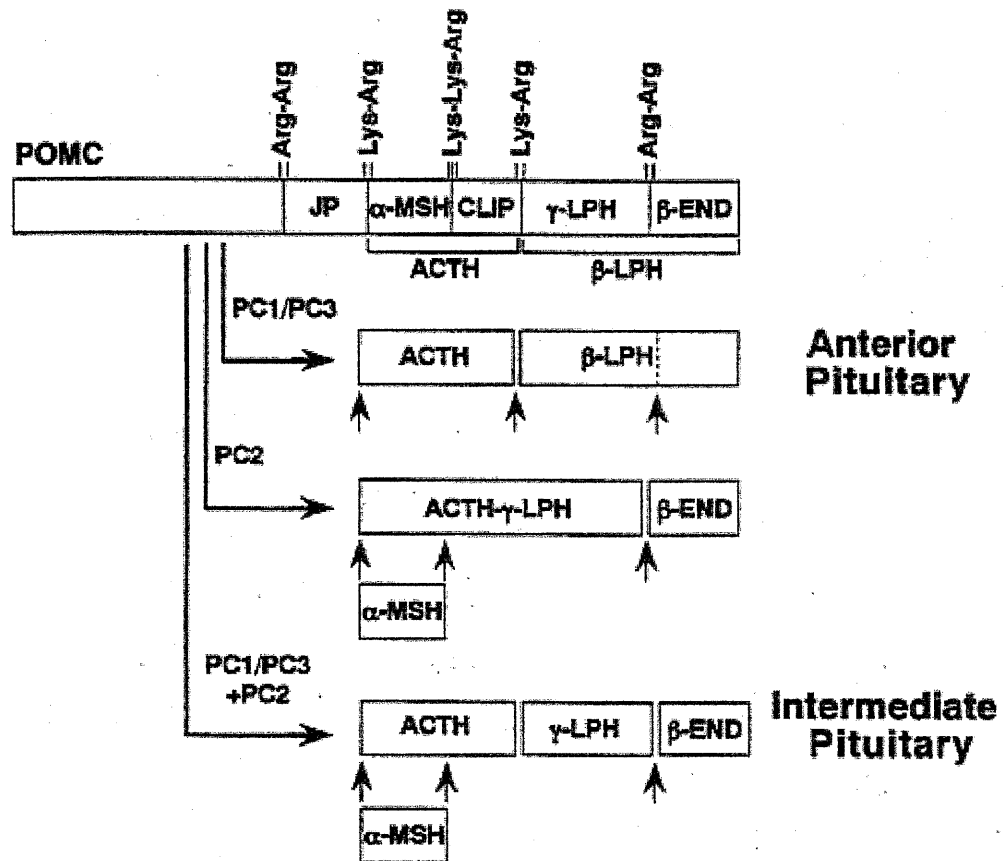


Figure 3: Structure et maturation de la POMC et de ses produits d'origine de clivage (Mizuno et Matsuo, 1994).

and Seidah, 1981; Khachaturian et al., 1985) et la pro-insuline (Steiner and James, 1992) sont activés à l'intérieur de l'appareil *trans*-Golgien, ou dans les granules de sécrétion des cellules, par des protéases de la famille de la subtilisine (Seidah and Chretien, 1994; Nakayama, 1997). Par contre, d'autres peptides tels que l'angiotensine I et l'endothéline sont plutôt relâchés dans la matrice extracellulaire sous forme de précurseurs inactifs. Ces derniers seront ensuite clivés dans le milieu, par des enzymes protéolytiques telles que des métallopeptidases à zinc membranaires, libérant ainsi une ou des molécules actives (revue par : Turner and Tanzawa, 1997). Les peptides bioactifs peuvent alors interagir sur leurs récepteurs spécifiques au niveau des cellules cibles afin de déclencher une réponse physiologique.

1.1.2) Dégradation des peptides

L'homéostasie cellulaire implique non seulement une régulation de la libération des messagers, mais également un contrôle de la durée du signal. La terminaison du signal constitue donc une étape de régulation également très importante. Le signal médié par les molécules de signalisation hydrophiles peut être terminé par divers mécanismes distincts:

- 1) La dégradation du peptide par des protéases de surface cellulaire
- 2) Le découplage du récepteur avec sa protéine G hétérotrimérique ou la déphosphorylation du récepteur
- 3) L'endocytose du récepteur

Pour plusieurs peptides, le clivage de ceux-ci constitue le principal moyen d'arrêt du signal envoyé. La régulation de la bioactivité des peptides constitue donc un phénomène très important dans lequel les peptidases/protéases, souvent des métallopeptidases à zinc, jouent un rôle clé. Ces dernières catalysent toutes la même réaction c'est-à-dire, l'hydrolyse de liens peptidiques (revue par : Turner and Tanzawa, 1997).

1.2) Peptidases

Les peptidases peuvent être regroupées en plusieurs classes qui diffèrent selon leur spécificité de clivage et surtout, selon leur mécanisme catalytique et leur origine évolutive (Barrett and Rawlings, 1991; Rawlings and Barrett, 1993; Hooper, 1994). Deux types de classification ont ainsi pu être établies et seront expliquées dans les prochaines sections.

1.2.1) Premier mode de classification basée sur la spécificité de clivage

Un premier type de classification basée sur la spécificité de clivage permet de distinguer deux super familles de peptidases, soit les exopeptidases et les endopeptidases (Barrett and Rawlings, 1991). Ces deux familles diffèrent selon qu'elles clivent respectivement des acides aminés terminaux ou des liaisons peptidiques internes.

1.2.1.1) Exopeptidases

Les exopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques situées aux extrémités amino- ou carboxy-terminales des protéines cibles. Nous retrouvons dans cette grande famille les

aminopeptidases qui clivent un acide aminé du côté amino-terminal et les carboxypeptidases qui clivent un acide aminé à l'extrémité carboxy-terminale du peptide. Les dipeptidases, les dipeptidyl, tripeptidyl peptidases et peptidyl dipeptidases font également partie de cette famille. Cependant, ces dernières relâchent des dipeptides ou tripeptides situés à l'une ou l'autre des extrémités d'un peptide. Contrairement aux autres peptidases qui clivent des acides aminés terminaux non modifiés, les peptidases omega ont, quant à elles, la capacité d'hydrolyser la liaison peptidique d'acides aminés terminaux modifiés (ex: acylaminoacyl peptidases, pyroglutamyl peptidases, peptidyl glycinamidases).

1.2.1.2) Endopeptidases

Contrairement aux exopeptidases, les endopeptidases induisent des coupures en plein coeur des peptides et non seulement aux extrémités. L'action des endopeptidases n'est généralement pas favorisée par la présence d'une extrémité amino- ou carboxy-terminale libre près du site de clivage. Il est également peu fréquent de trouver une endopeptidase spécifique pour une liaison bien précise qui implique un seul type de chaîne latérale. Ceci empêche donc de les classer selon leur spécificité de clivage comme c'est le cas pour les exopeptidases. Une première méthode de classification permet ainsi de différencier quatre sous-classes d'endopeptidases caractérisées par la nature de leur site actif ainsi que par l'organisation des résidus responsables de leur activité catalytique. La nomenclature de ces classes est basée sur les groupements chimiques responsables de l'activité catalytique de l'enzyme (Barrett and Rawlings, 1991). Nous retrouvons donc les endopeptidases à sérine, les endopeptidases à cystéine, celles à acide aspartique et les métallo-endopeptidases. À ces

quatre grandes familles s'ajoutent également plusieurs protéases dont le mécanisme catalytique demeure, jusqu'à maintenant inconnu. Dans ce mémoire, nous nous intéresserons tout spécialement aux métallo-endopeptidases.

1.2.2) Deuxième mode de classification basée sur des comparaisons évolutives

La facilité d'obtenir des séquences dérivées d'ADNc a ajouté un second niveau de sophistication à la classification des peptidases, basé cette fois sur des considérations évolutives. L'analyse de toutes ces séquences a permis d'identifier certains motifs protéiques conservés chez plusieurs peptidases au cours de l'évolution. En 1993, Rawlings et Barrett ont donc examiné près de 600 séquences de peptidases, les séparant en famille et en groupes de familles nommés clans. Quatre-vingt quatre familles ont ainsi été formées, et partagées en quatre clans familiaux selon leur ressemblance évolutive. Nous pouvons donc distinguer les clans des peptidases à sérine, à cystéine, à acide aspartique et les métallopeptidases. À ces clans s'ajoutent, tout comme dans l'autre classification, des peptidases dont les caractéristiques catalytiques sont encore inconnues. Contrairement à la première méthode de classification, certains clans contiennent des endopeptidases et des exopeptidases. Ce deuxième type de classification n'est donc pas compatible avec la classification des enzymes basée sur les réactions qu'ils catalysent. La plus grande classe, celle des métallopeptidases, contient 25 familles dont 13 constituent le clan zincine (voir Figure 4). Les prochaines sections décriront cette deuxième méthode de classification des peptidases qui est également la plus couramment utilisée (revue par : Hooper, 1994).

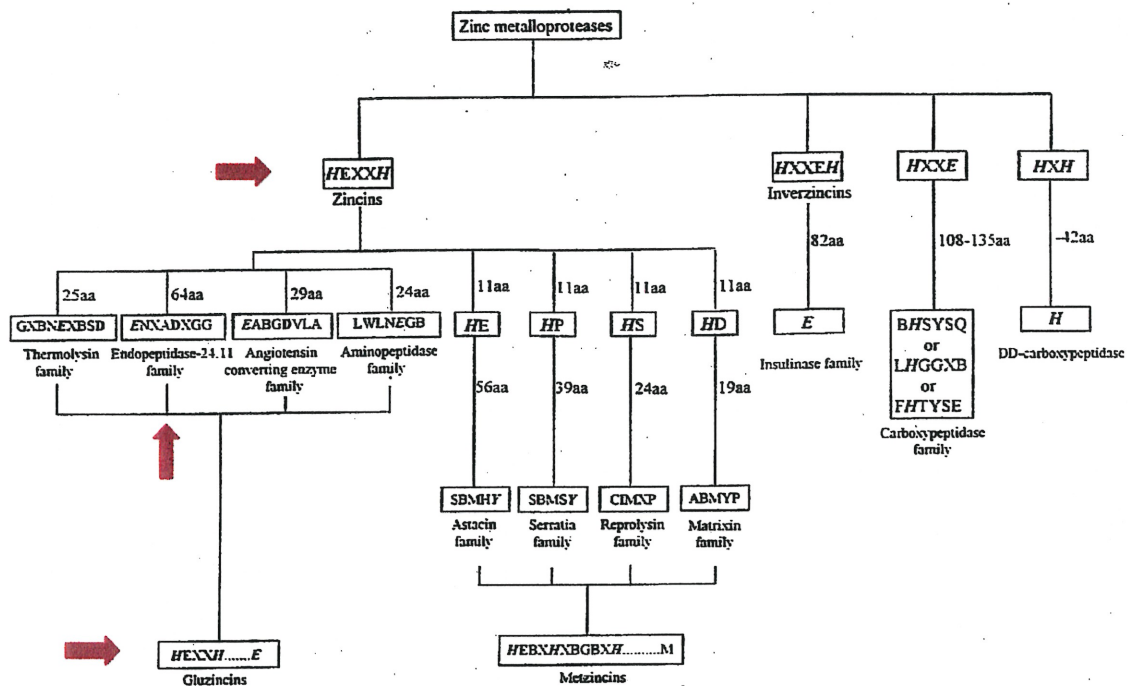


Figure 4: Classification des différentes familles de métalloprotéases à zinc (Hooper, 1994).

1.2.2.1) Métallopeptidases

Cette classe d'enzymes très diversifiée est caractérisée par la présence d'un ion métallique, généralement le zinc, dans le site actif de la peptidase. L'ion constitue un élément essentiel au mécanisme d'action de l'enzyme. Pour plusieurs métallopeptidases, les résidus impliqués dans la liaison du zinc ont été découverts par cristallisation et diffraction aux rayons-X. Tel que mentionné précédemment, le séquençage des ADNc de plusieurs métallopeptidases a permis d'établir un second niveau de classification, basé cette fois sur des considérations de conservations évolutives. Par exemple, la séquence en acides aminés HEXXH, où X représente n'importe quel acide aminé, est très bien conservée chez les métallopeptidases à zinc de type zincine et constitue donc un motif typique à ce clan. Les autres clans contiennent les motifs HXXE, HXXEH et certaines familles peuvent même lier deux atomes de zinc. Les sections 1.4 à 1.7 détailleront le mécanisme d'action et les caractéristiques structurales des différentes métallopeptidases à zinc que nous étudions.

1.3) Classification des peptidases à zinc

Les métallopeptidases à zinc possèdent dans leur séquence une signature du zinc (Jongeneel et al., 1989). Cette dernière consiste en une séquence consensus composée des acides aminés liant le zinc et un acide glutamique dit catalytique. Les peptidases à zinc ont pu être classées en différentes familles en fonction de la nature et de l'organisation des résidus qui constituent leur séquence consensus (voir Figure 4) (revue par : Hooper, 1994). Les peptidases contenant la séquence consensus de liaison au zinc HEXXH (Bode et al., 1993) ont été classées dans le clan des zincines. Les deux histidines du motif consensus

représentent des ligands du zinc alors que l'acide glutamique est impliqué dans la réaction de catalyse. Dans ce mémoire, nous nous attarderons principalement à cette classe qui contient la famille de métallopeptidases qui nous intéresse. Les inverzincines (HXXEH), les carboxypeptidases (HXXE) et les DD-carboxypeptidases (HXH) constituent les trois autres superfamilles de métalloprotéases à zinc. Ces dernières seront rapidement abordées dans les sections suivantes.

1.3.1) Zincines

Le clan des zincines contient plusieurs types de métallopeptidases à zinc que l'on peut regrouper en deux grandes catégories, soit les gluzincines et les metzincines.

1.3.1.1) Gluzincines

Les gluzincines contiennent le motif zincine HEXXH décrit précédemment. Dans le cas des gluzincines, ce motif est également suivi d'un troisième ligand du zinc, un acide glutamique situé 24 à 64 résidus du côté carboxy-terminal du motif zincine. Cette superfamille regroupe la famille de la thermolysine, celle de l'endopeptidase neutre, ainsi que les familles de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et des aminopeptidases. Ces quatre dernières familles se distinguent par les acides aminés entourant l'acide glutamique important pour la liaison du zinc. La famille de l'endopeptidase neutre est impliquée dans un large spectre d'activités physiologiques. Jusqu'à maintenant, sept membres de cette famille ont été identifiés et caractérisés (voir section 1.5 pour la description de ces membres). La famille de l'endopeptidase neutre constitue le point de mire de ce mémoire.

En effet, nous rapportons l'identification et la caractérisation d'un tout nouveau membre de cette famille.

1.3.1.2) **Metzincines**

Les metzincines, quant à elles, contiennent une séquence de liaison au zinc beaucoup plus longue que celle des gluzincines. En effet, la séquence *HEBXHXBGBXH.....M* constitue la séquence consensus de cette famille, où B est un gros acide aminé non-polaire. Chez les metzincines, la dernière histidine du motif susmentionné (indiquée ici en italique) constitue le troisième ligand du zinc. Cette superfamille contient également une méthionine, située 19 à 56 acides aminés en aval de la séquence consensus, qui induit une conformation tridimensionnelle de type tour β (*Methionine-turn*) caractéristique de la famille. Parmi les metzincines, nous pouvons retrouver la famille des astacines, de la serratia (serralysines), de la reprolysine (ou adamalysines) et de la matrixine. Chacune de ces familles se distingue par le résidu en aval du troisième ligand du zinc (histidine en italique) et par les résidus entourant la méthionine dans le motif structural caractéristique de la superfamille.

1.3.2) **Les Inverzincines**

Ce petit groupe de métallopeptidases contient un motif inversé par rapport à celui des zincines et est donc caractérisé par le motif (HXXEH). Dans cette classe, le troisième ligand de l'ion métallique est un acide glutamique situé environ 82 acides aminés en aval du motif. Les inverzincines contiennent une seule sous-famille, soit celle des insulinasés.

1.3.3) Les Carboxypeptidases

La séquence consensus HXXE caractérise bien les carboxypeptidases. Les deux premiers ligands du zinc correspondent à l'histidine et à l'acide glutamique de la séquence consensus. Le troisième résidu associé au zinc est une histidine, localisée 100 acides aminés en carboxy-terminal de la séquence consensus. Les carboxypeptidases A et B, qui respectivement inhibent des zymogènes dans le pancréas (Pascual et al., 1989; Catusus et al., 1992; Vendrell et al., 1992) et activent des plasminogènes (Eaton et al., 1991) sont de bons exemples de cette famille.

1.3.4) Les DD-Carboxypeptidases

Les DD-carboxypeptidases utilisent trois histidines pour lier le zinc. Le motif consensus de cette famille (HXH) contient deux des histidines liant le zinc, alors que le troisième résidu de liaison du zinc se situe, contrairement aux autres familles, en amont du motif.

1.4) Mécanisme d'action des gluzincines

La thermolysine est une enzyme bactérienne de *Bacillus thermoproteoliticus* très bien caractérisée. Elle fût la première enzyme des peptidases à zinc de la famille des gluzincines à être cristallisée. Le mécanisme d'action de l'enzyme sert d'ailleurs de modèle pour cette famille (voir Figure 5).

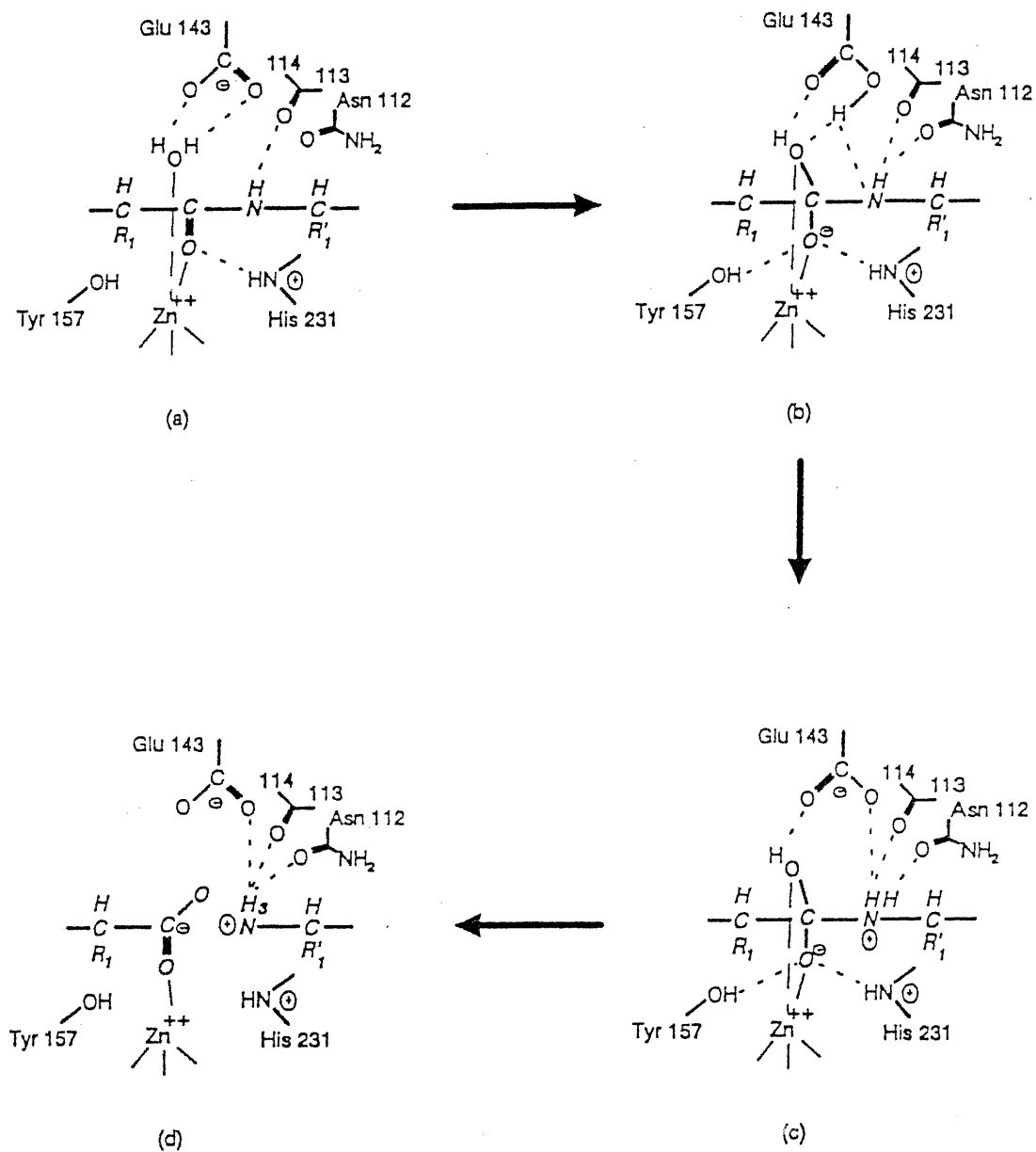


Figure 5: Mécanisme d'action de la thermolysine (Matthews, 1988). Les ponts hydrogènes potentiels sont représentés par des pointillés et les interactions avec le zinc par des lignes brisées. A) Liaison du zinc B) Formation de l'intermédiaire pentacoordonné C) Protonation de l'azote du lien peptidique D) Clivage du lien peptidique.

Dans le cas des métallopeptidases à zinc de type hydrolase comme les gluzincines, l'ion métallique effectue une liaison de coordination avec trois acides aminés de l'enzyme et une molécule d'eau activée qui demeure ainsi retenue dans le site catalytique (Vallee and Auld, 1990). Les ligands du zinc dans le site actif des hydrolases sont le plus fréquemment :
 histidine >> acide glutamique > acide aspartique.

Le mécanisme d'action de la thermolysine débute par la liaison de coordination entre le zinc du site actif et l'oxygène du groupement carbonyle du lien peptidique à cliver. Le zinc passe alors d'un état de tétracoordination à un état de pentacoordination. Ceci induit la polarisation d'une molécule d'eau associée à un acide glutamique du site actif de l'enzyme aussi décrit comme l'acide glutamique catalytique. La molécule d'eau polarisée, devenue un nucléophile puissant, attaque ensuite le carbone du lien peptidique. Il s'ensuit une protonation de l'atome d'azote du lien peptidique provoquant ainsi la scission du lien et le relâchement de deux sous-produits (Matthews, 1988).

1.5) La famille de l'endopeptidase neutre

La famille de l'endopeptidase neutre (EPN, Neutral Endopeptidase-24.11, néprilysine, EC 3.4.24.11 ou MME pour *membrane metallo-endopeptidase* selon le *human genome nomenclature database*) fait partie des gluzincines et porte le nom de la peptidase servant de prototype pour la famille. Pour faire partie de la famille de l'EPN, la peptidase doit contenir, en plus du motif gluzincine, la séquence ENXADXGG où l'acide glutamique est le troisième ligand du zinc (Rawlings and Barrett, 1993). Ce dernier motif se retrouve donc 64 acides aminés en aval de la séquence consensus de liaison au zinc HEXXH. L'acide

aspartique (D) joue, quant à lui, un rôle essentiel dans la stabilisation de l'état de transition et dans l'activité hydrolytique.

La famille de l'EPN est née suite à l'identification de plusieurs peptidases possédant une forte identité de séquence avec l'EPN. La famille est composée à ce jour de sept membres soit: l'EPN, ECE-1, ECE-2, PHEX, KELL, ECEL1, SEP/NL1/NEPII/MMEL1. Une activité de type enzyme de conversion de l'endothéline a été détectée dans l'iris de bœuf et pourrait correspondre à un huitième membre de la famille (Hasegawa et al., 1998). Cependant, comme l'ADNc de la protéine correspondant à cette activité n'a pas été cloné, nous n'en discuterons pas dans ce mémoire. L'alignement de séquence des divers membres de la famille montre une conservation des séquences consensus permettant un mécanisme catalytique semblable (voir section 1.7 et Figure 8). La conservation de dix cystéines entre les différents membres suggère également un repliement tridimensionnel semblable. Tel que mentionné précédemment, nous avons identifié un nouveau membre de la famille de l'EPN. Afin de bien mettre en évidence la famille et l'implication physiologique de ses différents membres, chaque enzyme connue sera d'abord décrite d'un point de vue fonctionnel. La dernière section permettra ensuite de comparer les divers membres selon leurs caractéristiques structurales. Débutons donc avec le premier membre de la famille à avoir été identifié et qui sert de modèle pour cette famille: l'EPN.

1.5.1) L'EPN

L'EPN a tout d'abord été décrite par Kerr et Kenny, en 1974, comme une protéine associée aux membranes de bordure en brosse de rein de lapin. Une fois purifiée du cortex rénal,

L'EPN a été retrouvée dans la fraction microsomiale de l'homogénat et a pu être relâchée suite à un traitement aux protéases, suggérant une localisation membranaire de l'enzyme (Kerr and Kenny, 1974b). L'EPN fut nommée ainsi à cause de sa capacité à pouvoir hydrolyser la chaîne β de l'insuline et ce, à pH neutre. Plus tard, des études ont démontré que la partie active de la protéine se situe à l'extérieur de la cellule, ce qui lui permet de dégrader les substrats à la surface cellulaire (Booth and Kenny, 1980). L'endopeptidase neutre fut beaucoup étudiée au cours des dernières années à cause de son implication dans une grande variété de phénomènes physiologiques importants.

1.5.1.1) Distribution tissulaire et cellulaire et fonctions physiologiques de l'EPN

L'EPN hydrolyse *in vitro*, une panoplie de substrats. Cependant, afin de mieux connaître le rôle physiologique de l'EPN, plusieurs chercheurs se sont tournés vers des études de localisation *in vivo*. Les sites d'expression de l'EPN coïncident avec la cartographie *in vivo* de sites d'expression de ses substrats potentiels et de leurs récepteurs. L'EPN est exprimée dans plusieurs tissus, sans toutefois être ubiquiste. On en retrouve dans le système nerveux central (SNC), les reins, les intestins, les noeuds lymphatiques, le placenta, les poumons, les testicules, la prostate, les fibroblastes, les neutrophiles, les chondrocytes du cartilage articulaire, la moelle osseuse, les os du crâne et de la mandibule, les vertèbres, les glandes salivaires, les glandes exocrines et dans un grand nombre de cellules épithéliales et endocrines (Roques et al., 1993). L'expression de l'EPN varie d'un tissu à l'autre. Elle est en fait constitutive dans certains tissus (ex: cerveau et rein) et régulée dans d'autres tissus (ex: lymphocytes et granulocytes). La fonction de l'EPN n'a cependant pas encore été identifiée dans chacun de ces tissus. Cette différence d'expression provient de l'influence régulatrice

de divers effecteurs présents de façon différente dans les tissus. On retrouve sur le gène humain de l'EPN, trois promoteurs qui permettent de produire quatre transcrits différents (D'Adamio et al., 1989; Ishimaru and Shipp, 1995). Chacun de ces transcrits semble être exprimé de façon tissu spécifique et de façon régulée durant le développement. Les promoteurs du gène *MME* possèdent des éléments de réponse de différents facteurs de transcription (ex: PU.1, PEA3, SP1). L'expression régulée de ces facteurs de transcription fait en sorte de diriger l'expression de l'EPN dans certains tissus préférentiellement, en fonction du stade de développement.

Le rôle physiologique de l'EPN est essentiellement d'inactiver de petits peptides biologiquement actifs. Elle crée également une barrière enzymatique qui permet de contrôler la concentration de certains peptides au niveau de leur cellule cible. En hydrolysant certains peptides, l'EPN permet également de favoriser la réabsorption des peptides au niveau du rein et de l'intestin. La première fonction physiologique de l'EPN à être identifiée fut dans le cerveau, où elle régule la demi-vie de certains neuropeptides, comme la substance P et les enképhalines (Malfroy et al., 1978). L'EPN agit donc sur la transmission du signal nociceptif. De plus en plus d'évidences suggèrent aussi qu'une perte d'expression de l'EPN favorise le développement de la maladie d'Alzheimer (Iwata et al., 2000; Yasojima et al., 2001). On a également démontré l'importance de l'EPN dans d'autres systèmes tels que dans la régulation de l'inflammation, dans la différenciation et la prolifération cellulaire ainsi que dans le transit gastro-intestinal. L'EPN joue aussi un rôle déterminant dans la régulation de l'équilibre eau-électrolyte et de la pression sanguine, car elle contrôle l'activité du peptide natriurétique auriculaire, de la bradykinine et de l'endothéline-1 dans le rein (revue par : Wilkins et al., 1993). Le rôle de l'EPN dépend en

fait de sa localisation cellulaire et de la disponibilité de ses substrats (Roques et al., 1993; Lu et al., 1995; Turner and Tanzawa, 1997). Chacune des implications physiologiques de l'EPN sera détaillée dans les prochaines sections.

1.5.1.2) Modulation du signal nociceptif

L'EPN et son transcrite se retrouvent dans le système nerveux central des mammifères. En effet, des études impliquant l'utilisation d'un inhibiteur spécifique tritié ([³H]HACBO-Gly), ont permis de localiser l'EPN dans le cerveau de rat (Waksman et al., 1984; Waksman et al., 1986). Ces résultats furent également confirmés par des études de détection immunologiques (Matsas et al., 1986; Pollard et al., 1989) par l'utilisation de substrat fluorescent (Back and Gorenstein, 1989) ainsi que par hybridation *in situ* (Gaudoux et al., 1993). L'EPN se retrouve dans de nombreuses régions du cerveau et est particulièrement abondante dans le plexus choroïde du quatrième ventricule, la substance noire, le noyau caudé, le pallidum, la couche glomérulaire du bulbe olfactif, le tubercule olfactif, le noyau accumbens, le gyrus dentelé et la substance gélatineuse de l'épine dorsale. L'EPN est présente dans les zones du cerveau attribuées à la perception de la douleur.

Dans le système nerveux central, l'enzyme semble jouer un rôle important dans la dégradation des enképhalines, des peptides ayant la capacité d'engendrer un effet anti-nociceptif. Cette fonction est appuyée par la corrélation de la localisation de l'enzyme avec celle des enképhalines et de leurs récepteurs opioïdes μ et δ (Waksman et al., 1986). L'inhibition de l'enzyme prolonge donc la demi-vie des enképhalines endogènes diminuant ainsi la perception de la douleur. Il a cependant été démontré que l'aminopeptidase N, une

enzyme également localisée dans le cerveau et le système nerveux (Barnes et al., 1994; Kunz et al., 1994; Olsen et al., 1997), dégrade, elle aussi, les enképhalines (Hambrook et al., 1976; Vogel and Altstein, 1979; de la Baume et al., 1983). De plus en plus d'inhibiteurs mixtes, régulant les deux peptidases, ont été conçus afin de contrôler le niveau d'enképhalines endogènes. Ces analgésiques ont l'avantage de ne pas créer d'effet de dépendance physique et psychologique comme c'est le cas pour la morphine (Noble et al., 1992; Noble et al., 1993). Un autre substrat potentiel de l'EPN dans le SNC est la substance P qui se retrouve dans la substance noire du cerveau (Barnes et al., 1993). Ce neurotransmetteur est impliqué dans le contrôle de la perception de la douleur (Oblin et al., 1989) et peut être clivé par l'EPN *in vitro* (Matsas et al., 1983; Matsas et al., 1984).

1.5.1.3) EPN vs Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est un désordre neurodégénératif caractérisé par l'accumulation d'amyloïde dans le cortex cérébral du cerveau, formant des plaques séniles extracellulaires (Selkoe, 1991; Selkoe, 1993). Le constituant majeur de ces plaques est un peptide de 39-43 acides aminés appelé peptide amyloïde- β qui provient du clivage d'un précurseur amyloïde (Masters et al., 1985; Kang et al., 1987). Des études récentes suggèrent que l'enzyme principalement responsable de la dégradation du peptide amyloïde- $\beta_{(1-42)}$ soit l'EPN ou une enzyme dont l'activité est très liée. En effet, l'infusion d'inhibiteur de l'EPN dans le cerveau provoque une accumulation du peptide amyloïde- $\beta_{(1-42)}$ endogène (Iwata et al., 2000). De plus, en 1995, le groupe de Howell avait déjà démontré que l'EPN dégrade le peptide amyloïde- $\beta_{(1-40)}$ *in vitro*. Ces études proposent donc un rôle neuroprotecteur de l'EPN qui favoriserait l'élimination de fragments peptidiques potentiellement toxiques au

niveau du cerveau. Récemment, un second groupe a rapporté une diminution de l'ARNm de l'EPN dans l'hippocampe et le gyrus temporal de cerveaux de personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer (Yasojima et al., 2001). Ces deux régions sont généralement vulnérables à la formation de plaques séniles. Les diminutions des niveaux d'ARNm sont également reliées à une diminution de la protéine de l'EPN. Ces résultats suggèrent qu'une diminution des niveaux d'expression de l'EPN entraîne une diminution de la dégradation du peptide amyloïde- β , contribuant ainsi au développement de la pathologie.

1.5.1.4) Régulation de l'équilibre eau/électrolytes

L'EPN a tout d'abord été identifiée dans les membranes de rein, plus précisément dans les bordures en brosse des cellules épithéliales des tubules proximaux droits et contournés (Kerr and Kenny, 1974b). Le rein est d'ailleurs le tissu dans lequel l'enzyme est le plus exprimée, représentant 4 à 5 % des protéines totales des cellules épithéliales. L'EPN y joue un rôle prépondérant de maintien de l'équilibre eau-électrolytes en régulant l'activité de certains peptides comme l'ANP, les kinines et l'endothéline (ET) (revue par : Wilkins et al., 1993). L'ANP et les kinines sont des peptides agissant sur la diurèse et la natriurèse (Sonnenberg et al., 1988; Erdos, 1990; Carretero and Scicli, 1991). Ces peptides ont donc la capacité de diminuer la pression artérielle. L'inhibition de l'EPN favorise l'excrétion d'eau et d'électrolytes, induisant ainsi un effet hypotenseur très utilisé dans le traitement de l'hypertension (Gros et al., 1989; Richards et al., 1991; Singer et al., 1991; Richards et al., 1993).

L'ET est plutôt un vasoconstricteur puissant. Il fait diminuer le volume urinaire et augmenter la pression sanguine en diminuant la filtration glomérulaire au niveau du rein (Kohan, 1991). À ce niveau, l'EPN agit en tant qu'hypotenseur. L'EPN est donc impliquée dans deux mécanismes opposés de régulation de la pression sanguine. Son action permet de conserver l'homéostasie du système de pression artérielle.

1.5.1.5) Régulation de la réaction inflammatoire

Lorsque les neurones sensoriels des voies respiratoires sont stimulés par des éléments chimiques ou électriques, ils relâchent des tachykinines (dont la substance P) (Borson, 1991; Nadel, 1992). Ces neuropeptides déclenchent alors une réaction inflammatoire. L'action des neuropeptides est cependant régulée très rapidement par l'EPN qui les inactive (Nadel, 1991; Nadel, 1992; Lilly et al., 1993). La modulation de l'intensité de la réponse inflammatoire des voies respiratoires se fait donc grâce à l'EPN. Cette dernière est exprimée à la surface de plusieurs types cellulaires du système respiratoire, comme par exemple les cellules endothéliales, le muscle lisse, les glandes, les vaisseaux sanguins et les neurones (Borson et al., 1989). Les inhibiteurs de l'EPN potentialisent donc l'effet de la substance P, produisant une réaction inflammatoire plus sévère (revue par : Nadel, 1992). Dans d'autres cas cependant, la prise exogène d'EPN ou l'augmentation des niveaux d'expression de l'enzyme permet de potentialiser l'action de l'EPN. Par exemple, dans certaines situations pathologiques qui entraînent une réaction inflammatoire accrue (crise d'asthme, fibrose kystique, infection virale, bronchite), on tente de diminuer l'effet des tachykinines en augmentant les quantités d'EPN disponibles (revue par : Borson, 1991).

L'EPN est également impliquée dans la modulation de l'inflammation bactérienne des voies respiratoires. Ces bactéries libèrent des peptides comme le N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP). Ces messagers produisent un effet chimioattractif et provoquent la réaction inflammatoire lorsqu'ils se lient à leurs récepteurs situés sur la surface des neutrophiles polymorphonucléaires. Le fMLP peut cependant être dégradé par l'EPN située en surface des neutrophiles polymorphonucléaires (Connelly et al., 1985; Painter et al., 1988). L'EPN pourrait donc moduler la chémotaxie et par conséquent, l'intensité de la réaction inflammatoire.

Le choc septique chez les souris peut être provoqué par l'injection de molécules comme la D-galactosamine et les lipopolysaccharides endotoxiques de *Salmonella enteritidis*. L'EPN semble avoir un rôle protecteur à ce niveau, car elle diminue l'intensité de la réaction inflammatoire. En effet, des souris homozygotes déficientes pour l'EPN sont 100 fois plus sensibles aux chocs septiques que les souris de type sauvage. L'implication exacte de l'EPN dans ce phénomène demeure cependant encore inconnu (Lu et al., 1995).

1.5.1.6) Digestion des peptides du bol alimentaire et régulation du transit gastro-intestinal

L'EPN intestinale intervient soit dans la digestion du bol alimentaire ou dans le transit gastro-intestinal et ce, en fonction de sa localisation cellulaire. Les cellules de l'épithélium de même que les muscles lisses et les sous-muqueuses expriment l'EPN. Au niveau des cellules épithéliales, l'EPN hydrolyse les peptides ingérés et favorise leur absorption par le tractus gastro-intestinal. Par ailleurs, l'EPN du muscle lisse agirait plutôt au niveau du

transit gastro-intestinal en modulant la concentration de certains neuropeptides comme les enképhalines et la substance P (Nau et al., 1985; Marcais-Collado et al., 1987). La substance P favorise la contraction du muscle lisse de l'intestin. L'inactivation de ces neuropeptides, par l'EPN, au niveau du site effecteur permettrait de réguler le péristaltisme (Matsas et al., 1983; Bunnett et al., 1985; Bunnett et al., 1988a; Bunnett et al., 1988b). Les enképhalines, quant à elles, diminuent le mouvement gastro-intestinal en agissant sur le transport des fluides et des ions à travers la membrane cellulaire de la muqueuse intestinale (Schang et al., 1986; revue par : Coupar, 1987); Les inhibiteurs de l'EPN produisent donc un effet antidiarrhéique et sont utilisés comme agents pharmacologiques pour régler ce problème.

1.5.1.7) Différentiation et prolifération cellulaire

CALLA est un antigène cellulaire spécifique exprimé à la surface des cellules malignes. Il a d'ailleurs facilité le diagnostic de certains cancers humains. On retrouve CALLA dans près de 80 % des cas de leucémie aiguë de type lymphoblastique pré-B (Greaves, 1975; Greaves et al., 1983). Le clonage et la caractérisation de CALLA ont en fait démontré qu'elle était identique à l'EPN (Letarte et al., 1988; Shipp et al., 1988). CALLA/EPN ne se retrouve pas seulement sur les lymphoblastes malins, mais également à la surface des précurseurs des lymphocytes phénotypiquement normaux et en faible quantité sur les cellules B et T matures (Beaumont et al., 1989; Mari et al., 1992; Mari et al., 1994; Guerin et al., 1997). Il a d'ailleurs été proposé que l'EPN intervienne dans la différenciation et la maturation des lymphocytes (revue par : LeBien, 1989) en contrôlant un signal peptidique encore non identifié et impliqué dans le processus.

D'autre part, la prolifération de certains types cellulaires est modulée par l'EPN. Les études de Sunday (1992) et King (1993) suggèrent que l'EPN située à la surface de l'épithélium pulmonaire foetal inactive les bombesin-like-peptides (BLPs), de puissants mitogènes. Ceci aurait donc pour effet de ralentir la croissance cellulaire. Par ailleurs, les travaux de Shipp en 1991 ont permis de démontrer qu'une inhibition de l'EPN permettait de stimuler la croissance de carcinomes pulmonaires à petites cellules, en raison de l'augmentation des BLPs. De plus, certains types de carcinomes pulmonaires, de cancer de la prostate indépendants des androgènes et de lignées cellulaires de cancer du sein démontrent un faible taux d'expression de l'EPN (Ganju et al., 1994; Cohen et al., 1996; Papandreou et al., 1998; Burns et al., 1999). L'EPN agit donc dans ces divers cas comme un agent modulateur de la croissance cellulaire et permet de protéger les tissus d'une prolifération cellulaire excessive.

1.5.1.8) L'EPN dans les fluides physiologiques

Une forme soluble de l'EPN a été identifiée en 1984 dans le sérum humain (Almenoff et al., 1984). Par la suite, d'autres fluides physiologiques comme le sang, l'urine, le liquide amniotique, le liquide synovial et le fluide cérébro-spinal semblent contenir une forme d'EPN soluble (Deschodt-Lanckman et al., 1989; Gros et al., 1990; Spillantini et al., 1990; Appelboom et al., 1991; Nortier et al., 1995; Di Marco et al., 1998). Cependant, comme l'EPN se retrouve en faible concentration dans ces fluides, il est difficile de trouver l'importance physiologique de cette forme soluble de la protéine. Jusqu'à maintenant, aucune évidence ne permet de savoir si l'EPN se retrouve physiologiquement dans ces fluides ou si sa présence provient de la dégradation naturelle des cellules.

1.5.1.9) Souris EPN (-/-)

En 1995, Lu et coll. ont généré une lignée de souris déficientes pour le gène *MME*. Ces souris se développent normalement. Par contre, on a noté chez ces animaux, une sensibilité extrême aux chocs endotoxiques par rapport aux souris de type sauvage. En effet, si on induit un choc endotoxique par injection d'endotoxines lipopolysaccharidiques de *S. enteriditis* couplées à la D-galactosamine, les souris déficientes en EPN présentent un taux de mortalité 100 fois supérieur à celui observé chez les souris de type sauvage. De plus, la peptidase serait impliquée dans le maintien à des niveaux de base faibles des peptides pro-inflammatoires SP et BK. L'absence d'EPN conduirait à une augmentation de la perméabilité microvasculaire via les récepteurs de la neurokinine (NK1) et de la bradykinine (B2). Les études sur les souris EPN (-/-) mettent en évidence l'importance de la protéine dans les phénomènes d'hypotension et d'inflammation incontrôlés.

1.5.2) ECE

Les endothélines sont des peptides jouant plusieurs rôles de premier plan. Elles permettent entre autre, de maintenir un bon tonus vasculaire. Trois types d'endothélines ont été caractérisés et logiquement appelés ET1, ET2 et ET3. Ces trois membres sont synthétisés et relâchés dans le milieu extracellulaire sous forme de précurseurs inactifs (big-ET).

La sous-famille de l'ECE (endothelin-converting enzyme) permet d'hydrolyser les précurseurs des endothélines afin de libérer les peptides actifs. Deux membres de la sous-famille de l'ECE ont été identifiés jusqu'à maintenant. Chacune de ces protéines possède

une distribution tissulaire, une localisation cellulaire et une spécificité de clivage différente. ECE-1 fut purifiée d'une préparation de microsomes de poumons de rats (Takahashi et al., 1993). Un an plus tard, le clonage de l'ADNc bovin d'ECE-1 démontra la ressemblance d'ECE-1 avec l'EPN (Xu et al., 1994). Le groupe d'Emoto (1995) clona quant à lui, une seconde enzyme s'apparentant à ECE-1 à partir d'ADNc bovin, soit ECE-2. Cette dernière clive également la big-ET.

ECE-1 est le membre de cette sous-famille le mieux caractérisé. Trois isoformes d'ECE-1 ont été identifiées et nommées a, b et c (revue par : Turner et al., 1998). Ces isoformes proviennent de l'usage de promoteurs différents pour un même gène. ECE-1a humaine se retrouve à la membrane, ECE-1b se situe dans un compartiment intracellulaire, probablement les endosomes précoces ou tardifs alors qu'ECE-1c se retrouve à la membrane plasmique ainsi que dans certains domaines intracellulaires (Azarani et al., 1998). ECE-1 se retrouve dans plusieurs tissus comme dans les cellules de Leydig des testicules, la granulosa et les cellules theca des ovaires, la surrénale, les cellules endothéliales de l'aorte, des poumons, du rein, du foie, du coeur ainsi que dans certaines cellules sécrétrices comme les îlots pancréatiques (revue par : Turner and Tanzawa, 1997; Korth et al., 1999). ECE-1 hydrolyse préférentiellement le précurseur inactif, la big endothéline-1 en endothéline-1, un vasoconstricteur puissant. Récemment, des études ont montré qu'ECE-1 pouvait dégrader *in vitro* d'autres peptides tels que la bradykinine, la calcitonine, l'ANP, la chaîne β de l'insuline oxydée, l'angiotensine, la neurotensine et la substance P (Hoang and Turner, 1997; Johnson et al., 1999). ECE-2 clive également préférentiellement la big-endothéline-1, mais à pH inférieur, probablement à l'intérieur du réseau *trans*-Golgi ou des granules de sécrétion (Emoto and Yanagisawa, 1995). Des souris

homozygotes négatives pour ECE-1 (ECE(-/-)) meurent *in utero* et présentent le même phénotype que les souris déficientes pour les endothélines ou leurs récepteurs. Ceci démontre donc qu'ECE-1 joue un rôle important dans le développement (Yanagisawa et al., 1998). Les souris présentent des anomalies craniofaciales et cardiaques. Les souris ECE-1(-/-) présentent également une absence de mélanocytes de l'épiderme et des neurones entériques de l'intestin distal comme les souris ET-3(-/-).

1.5.3) PHEX

PHEX (PEX) a tout d'abord été identifiée chez des patients souffrants d'hypophosphatémie reliée au chromosome X (XLH) (The HYP Consortium, 1995). Cette maladie héréditaire est caractérisée par une diminution de la réabsorption de phosphate au niveau du tubule rénal (hypophosphatémie) et par un dérèglement du métabolisme de la vitamine D. La maladie cause le rachitisme, des retards de croissance et de l'ostéomalacie. Le gène *PHEX* a été localisé sur le chromosome X au site p22.1, par des marqueurs de microsatellites extrêmement polymorphiques, en utilisant des échantillons d'ADN de 150 familles porteuses de la maladie XLH.

PHEX est exprimée de façon préférentielle dans le tissu osseux ainsi que dans les dents. On retrouve l'ARNm de la protéine plus particulièrement au niveau des ostéoblastes et des odontoblastes d'où son rôle dans la minéralisation (Du et al., 1996; Ruchon et al., 1998). PHEX peut donc être utilisée comme marqueur des cellules différenciées des tissus minéralisés. On retrouve également PHEX dans le foie, les ovaires, les poumons et le muscle squelettique de foetus humains ainsi que dans les poumons, les testicules, le

cerveau, les ovaires d'adultes (Beck et al., 1997; Grieff et al., 1997) et les tissus tumoraux associés à l'ostéomalacie hypophosphatémique (Lipman et al., 1998; revues par : Econs and Francis, 1997; Rowe, 1998; Tenenhouse, 1999). PHEX est une peptidase probablement impliquée dans la régulation de l'homéostasie du phosphate, de la minéralisation osseuse et du métabolisme de la vitamine D, bien qu'aucun substrat physiologique spécifique n'ait été attribué à cette enzyme jusqu'à maintenant. Le substrat pourrait être impliqué dans la réabsorption rénale du phosphate (revue par : Econs and Francis, 1997). PHEX pourrait avoir comme substrat la phosphatonine, une hormone circulante hypothétique phosphaturique qui serait responsable de l'hypophosphatémie (Econs et al., 1994). PHEX est incapable d'hydrolyser l'analogue de la Leu-enképhaline (Lipman et al., 1998), un substrat de l'EPN. La même équipe a également démontré que PHEX pouvait hydrolyser, *in vitro*, la PTH(1-38) et PTH(1-34), deux peptides qui inhibent la réabsorption de phosphate au niveau du rein et qui constituent des candidats de substrats physiologiques de PHEX.

1.5.4) KELL

Kell a été tout d'abord décrite comme un antigène des groupes sanguins. Cette protéine est exprimée sur la membrane des érythrocytes humains (revues par : Marsh, 1992; Redman and Lee, 1995). Elle peut causer des réactions hémolytiques très sévères, en présence d'incompatibilité de l'antigène, lors de transfusions sanguines et peut également engendrer une érythroblastose chez le nouveau-né. Le transcrit de Kell est présent dans la moelle osseuse et le foie foetal et pourrait être exprimé uniquement dans les tissus érythroïdes. Récemment, les travaux de Lee et coll. (1999) ont permis de démontrer que Kell clive spécifiquement la big endothéline 3 au site Trp21-Ile22, produisant ainsi l'endothéline 3.

Kell peut également couper la big ET-1 et 2 afin de relâcher l'ET-1 et ET-2, mais son affinité pour ces substrats est moindre (Lee et al., 1999). Il est à noter cependant que l'importance physiologique du clivage des précurseurs des endothélines par Kell reste à être démontrée *in vivo*. Kell ne semble pas indispensable, car certains individus n'expriment pas la protéine et ne démontrent pas de phénotype marqué (revues par : Marsh, 1992; Redman and Lee, 1995).

1.5.5) ECEL1

Au cours des deux dernières années, deux nouveaux membres de la famille ont été identifiés. Parmi ceux-ci, ECEL1 (XCE/DINE) est préférentiellement exprimée dans le système nerveux central. L'ADNc d'ECEL1 a été rapporté pour la première fois en 1999 par le groupe de Valdenaire. La séquence complète a été obtenue par criblage d'une banque d'ADNc de tissus neuroganglionnaires tumoraux humains à partir de courtes séquences similaires à ECE-1 (ESTs). Contrairement à la plupart des autres membres de la famille qui sont exprimés au niveau des membranes plasmiques, ECEL1 se retrouve préférentiellement dans le réticulum endoplasmique rugueux de cellules transfectées alors qu'une infime proportion se rend à la membrane plasmique (A. Benoit, M.A. Vargas, L. DesGroseillers, G. Boileau en préparation). La distribution cellulaire de la protéine endogène provenant de cerveau et d'hypophyse de souris démontre le même patron d'expression (A. Benoit, M.A. Vargas, L. DesGroseillers, G. Boileau en préparation). Des analyses par buvardage de type Northern et buvardage par point (*dot-blot*) ont permis de détecter l'expression tissulaire de l'ARNm d'ECEL1 (Valdenaire et al., 1999; Valdenaire and Schweizer, 2000). Le transcrit est absent de plusieurs organes périphériques tels que le coeur et le foie. Par contre le

niveau d'ARNm est fortement élevé dans les ovaires, l'hypophyse, la surrénale et dans certaines régions spécifiques du système nerveux comme le noyau caudé, le putamen, le noyau subthalamique, la moelle épinière et le bulbe rachidien. Le patron de distribution de l'ARNm d'ECEL1 suggère une fonction neuro-endocrine de la protéine.

Jusqu'à maintenant, aucun substrat physiologique d'ECEL1 n'a encore été identifié. ECEL1 est incapable de cliver *in vitro* la préET1, préET2, préET3, ET-1, galanine, calcitonine, bradykinine, Met-enképhaline et la Leu-enképhaline (Valdenaire et al., 1999) ainsi que l'OGP, la PTHrP₁₋₃₄, la PTH₁₋₈₄, la substance P et l' α -CGRP (A. Benoit, M.A. Vargas, L. DesGroseillers, G. Boileau en préparation). Par contre, l'homologue de l'enzyme chez le rat (DINE) hydrolyse *in vitro* le peptide fluorogénique Z-Gly-Gly-Leu-pNA, qui est reconnu comme un substrat synthétique de l'EPN (Kiryu-Seo et al., 2000). De plus, ce clivage est inhibé par des inhibiteurs des métallopeptidases tels que le phosphoramidon, l'EDTA, la 1,10-phénanthroline et le thiorphan.

Bien que les substrats *in vivo* d'ECEL1 soient encore inconnus, la peptidase semble être impliquée dans le contrôle de la respiration (Valdenaire and Schweizer, 2000). En effet, les souris transgéniques déficientes en ECEL1 sont caractérisées par une mort néonatale, indiquant une fonction critique et non-redondante de la protéine. Ces souris meurent d'anoxie, causée par une déficience du système respiratoire, immédiatement après la naissance. ECEL1 pourrait donc être impliquée dans le contrôle central de la respiration. D'autre part, l'ARNm de l'enzyme de rat (DINE) est augmenté dans les neurones lésés (Kiryu-Seo et al., 2000). De plus, l'expression de DINE dans les cellules COS inhibe partiellement l'apoptose induite par le céramide C2. L'enzyme pourrait augmenter

l'expression de certaines enzymes anti-oxydantes comme la Cu/Zn-superoxyde dismutase, la Mn-superoxyde dismutase et la glutathione peroxydase (Kiryu-Seo et al., 2000). Bien que cette augmentation d'expression soit insuffisante pour réchapper les cellules endommagées, elle peut moduler le profil apoptotique des cellules neuronales. D'autre part, des études de RT-PCR quantitatives et semi-quantitatives en temps réel suggèrent une implication d'ECEL1 dans la régulation de la croissance et de la différenciation des neuroblastomes puisque les niveaux d'expression du transcrit sont faibles dans ces cellules cancéreuses (Kawamoto et al., 2000). L'identification précise des substrats physiologiques d'ECEL1 ainsi que la localisation de la protéine et de ses substrats potentiels permettront d'éclaircir les fonctions de l'enzyme.

1.5.6) SEP/NL1/NEPII/MMEL1

Vers la fin de l'année 1999 et le début de l'année 2000, trois équipes de chercheurs ont rapporté l'identification d'un autre membre de la famille de l'EPN. SEP (Ikeda et al., 1999), également connue sous le nom de NL1 (Ghaddar et al., 2000), a été amplifiée en utilisant des oligonucléotides dégénérés pour la famille de l'EPN. Des réactions de RT-PCR sur l'ARNm d'embryons de souris ECE (-/-) et sur l'ARNm de testicules de souris sauvages, ont permis d'isoler un premier fragment d'ADN de la protéine. Ce fragment fut utilisée par la suite pour cribler une banque d'ADNc de testicules de souris. Peu de temps après l'identification de la protéine de souris, une troisième équipe de chercheurs a cloné un paralogue chez le rat (NEPII) (Tanja et al., 2000). Dans le reste de ce mémoire, nous utiliserons cependant le nom officiel proposé par la *human genome nomenclature database*, soit MMEL1, pour désigner la protéine SEP/NL1/NEPII.

Les études de transfection cellulaire ont permis de localiser la protéine principalement dans le milieu des cellules en culture (Ikeda et al., 1999; Ghaddar et al., 2000). Contrairement aux autres membres de la famille, MMEL1 est sécrétée dans le milieu extracellulaire et pourrait donc agir de façon paracrine. Des études de glycosylation par les enzymes endoH et PNGase F ont permis de démontrer que la forme sécrétée correspond à une forme mature de la protéine, car elle contient les sucres ajoutés lors de son passage dans l'appareil de Golgi (Ghaddar et al., 2000). Il est à noter qu'une forme membranaire de la protéine a également été identifiée lors de ces expériences. Cependant, la protéine MMEL1 provenant de l'extrait cellulaire est beaucoup moins abondante que la forme soluble et correspondrait à une espèce intracellulaire qui n'aurait pas franchi l'appareil de Golgi. Ces résultats de localisation cellulaire ont également pu être visualisés par des études d'immunocytochimie (Ikeda et al., 1999).

La sécrétion de l'enzyme est due à la présence d'un site potentiel de clivage par une proprotéine convertase de type subtilisine caractérisé par la séquence suivante: Arg58-Thr-Val-Val-Lys-Arg63. Des études de mutagenèse dirigée ont en effet démontré que des mutations dans ce site de clivage (Lys62-Arg63/Asn62-Gly63) bloquent la sécrétion de l'enzyme qui se retrouve alors à l'intérieur de la cellule (Ghaddar et al., 2000). De plus, une cotransfection des cellules avec MMEL1 et avec un inhibiteur des proprotéines convertases de type subtilisine, réduit les niveaux de sécrétion de la protéine qui se retrouve alors dans l'extrait cellulaire (Ghaddar et al., 2000).

Par ailleurs, les travaux d'Ikeda *et al.* (1999) démontrent l'existence de plus d'une isoforme de la protéine et ce, dans différents tissus. L'isoforme la plus courte correspondant à MMEL1^Δ, est le résultat d'un épissage alternatif permettant de retrancher un fragment de 69 pb localisé immédiatement en aval du domaine transmembranaire. La délétion élimine le site potentiel de clivage par la proprotéine convertase de type subtilisine et retient donc la protéine à la membrane.

MMEL1 est l'enzyme de la famille qui ressemble le plus à l'EPN tant pharmacologiquement qu'enzymatiquement. Plusieurs substrats de MMEL1 communs à ECE-1 et à l'EPN ont pu être identifiés *in vitro* comme la d-Ala2-Leu5 enképhaline, l'angiotensine I, l'ANP, la bradykinine, la big-endothéline I et la substance P (Ikeda *et al.*, 1999; Ghaddar *et al.*, 2000). MMEL1 est inhibée par le phosphoramidon, mais également par le thiorphan, un inhibiteur jusqu'à maintenant spécifique à l'EPN (Ikeda *et al.*, 1999; Ghaddar *et al.*, 2000).

MMEL1 est très fortement exprimée dans les testicules de souris adultes (Ghaddar *et al.*, 2000). On en retrouve dans les cellules germinales de la face lumineuse des tubules séminifères, plus spécifiquement dans les spermatides ronds et allongés durant le stade de maturation des spermatozoïdes. Aucun signal n'a cependant pu être détecté dans les spermatozoa, les spermatocytes, les spermatogonies, les cellules de Sertoli et les cellules interstitielles. MMEL1 pourrait donc être impliquée dans la fertilité ou dans la spermatogenèse, bien qu'aucune fonction spécifique n'ait encore été attribuée à cette enzyme. Les ARNm de MMEL1 et MMEL1^Δ sont également présents en faible quantité dans plusieurs tissus notamment l'intestin, le cœur, le rein, le cerveau, le foie, le poumon, les ovaires, la rate, la surrénale (Ikeda *et al.*, 1999). L'homologue de rat est hautement

identique à la forme souris (91%) (Tanja et al., 2000). L'enzyme de rat possède également plusieurs isoformes. Chaque isoforme de la protéine possède une distribution tissulaire différente dans les testicules, le cerveau et l'hypophyse.

1.6) Caractéristiques structurales de la famille de l'EPN

Les techniques de clonage ont beaucoup évolué au cours des dernières années, permettant d'éclaircir la structure de plusieurs protéines. Les quinze dernières années ont permis de caractériser les métallopeptidases de la famille de l'EPN. Dans la section qui suit, je décrirai plus en profondeur la structure de l'EPN, qui sert de modèle pour la famille, puis la structure des autres membres sera comparée avec ce modèle.

La structure primaire de l'EPN a initialement pu être établie grâce au clonage et à l'analyse de l'ADNc de l'enzyme du rein de lapin (Devault et al., 1987). L'EPN est une enzyme membranaire de type II contenant 750 acides aminés (Kerr and Kenny, 1974b; Booth and Kenny, 1980; Fulcher et al., 1986; Devault et al., 1988a). Elle contient un court domaine intracellulaire, en amino-terminal, de 28 acides aminés suivi d'une région hydrophobe de 23 acides aminés correspondant au domaine transmembranaire. La majeure partie de cette enzyme se situe donc à l'extérieur de la cellule et contient le site actif de l'enzyme. Cette dernière région de 699 acides aminés nommée également ectodomaine, se retrouve en carboxy-terminal de la protéine. L'ectodomaine adopte une structure globulaire très compacte grâce entre autre, à 12 cystéines formant 6 ponts disulfures (Kenny et al., 1983; Tam et al., 1985; Oefner et al., 2000). Ces liens disulfures permettent de stabiliser et de maintenir l'enzyme dans sa conformation active.

Plusieurs sites de N-glycosylation sont également présents sur la protéine (cinq chez le lapin et six chez le rat, la souris et l'humain) (Devault et al., 1987; Malfroy et al., 1987; Malfroy et al., 1988; Chen et al., 1992). Ces sites sont décrits par la séquence Asn-X-Ser/Thr où X est n'importe quel acide aminé sauf une proline. La glycosylation confère à l'EPN une masse moléculaire plus élevée que celle théorique due à l'ajout d'oligosaccharides dans l'appareil de Golgi. En effet, au moins 15 % de la masse de l'EPN est constituée de groupements oligosaccharidiques (Kerr and Kenny, 1974a). La N-glycosylation est indispensable au bon repliement, au transport jusqu'à la membrane plasmique et à la stabilité de l'enzyme puisque des mutations dirigées sur les sites de N-glycosylation affectent grandement son activité enzymatique (Lafrance et al., 1994). La masse moléculaire de l'enzyme diffère en fonction du tissu et de l'espèce. Les variations de poids moléculaire observées viennent probablement des différences au niveau du patron de glycosylation de l'enzyme (Relton et al., 1983). Il est à noter que ces différences de glycosylation n'ont pas d'effet sur l'activité enzymatique relative de l'EPN chez ces différents tissus ou espèces (Matsas et al., 1983; Landry et al., 1993). L'influence des sucres de l'EPN sur son ciblage résulte d'un effet cumulatif de l'ensemble des sites glycosylés plutôt que de la participation unique d'un site donné.

L'EPN de rein de lapin consiste en un monomère de 93-95 kilodaltons. De plus, des études récentes de cristallographie ont démontré que l'EPN soluble humaine est présente en solution, sous forme de monomère (Dale et al., 2000). Cependant, chez d'autres espèces comme le rat et le porc, l'enzyme existe plutôt sous forme d'homodimères, chaque monomère correspondant à un fragment de 89-95 kilodaltons. Dans ce dernier cas, les deux

monomères ne sont pas reliés de façon covalente. Chez l'homme, une forme tétramérique de l'enzyme a également été isolée (Ishida et al., 1983). Cependant, aucune fonction n'a encore été attribuée à la structure oligomérique de l'EPN.

1.7) Caractérisation du site actif de l'EPN

L'EPN hydrolyse un grand nombre de peptides dont la taille ne peut cependant pas dépasser plus de 40 résidus. Généralement, l'EPN clive en position amine de liens peptidiques impliquant des acides aminés hydrophobes (Turner et al., 1985)

La thermolysine est une enzyme bactérienne dont le site actif est très bien caractérisé. La cristallographie de l'enzyme a permis d'élucider la composition de son site actif (Colman et al., 1972; Holmes and Matthews, 1982). Bien que l'identité de séquence entre la thermolysine et l'EPN soit très modeste, les acides aminés importants pour la catalyse de la thermolysine sont conservés aux mêmes endroits chez l'EPN. La thermolysine a donc historiquement servi de modèle pour l'EPN. Plusieurs études de mutagenèse dirigée, basées sur les résultats de cristallographie de la thermolysine, ont par la suite appuyé la similitude entre les sites actifs de ces deux protéines et ont permis d'établir la carte du site actif de l'EPN (voir Figure 6). Récemment, la cristallisation de l'EPN soluble humaine interagissant avec l'inhibiteur phosphoramidon a confirmé la plupart des résultats avancés (voir Figure 7) (Oefner et al., 2000).

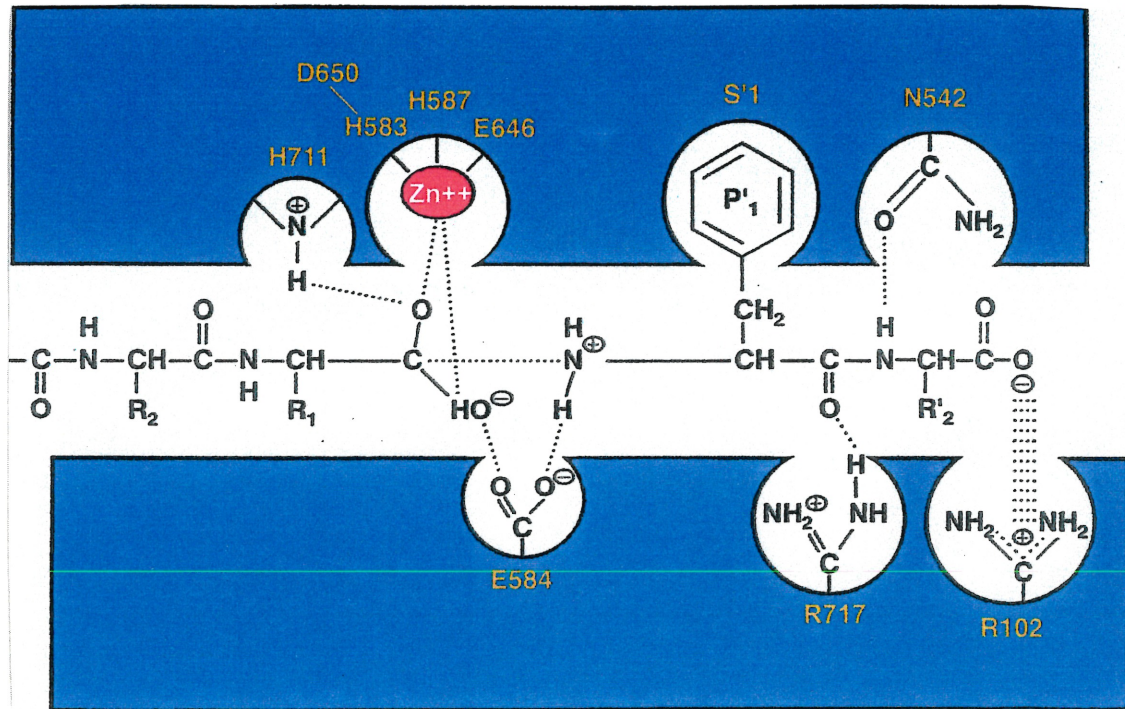


Figure 6: Modélisation du site actif de l'EPN (Crine *et al.*, 1997).

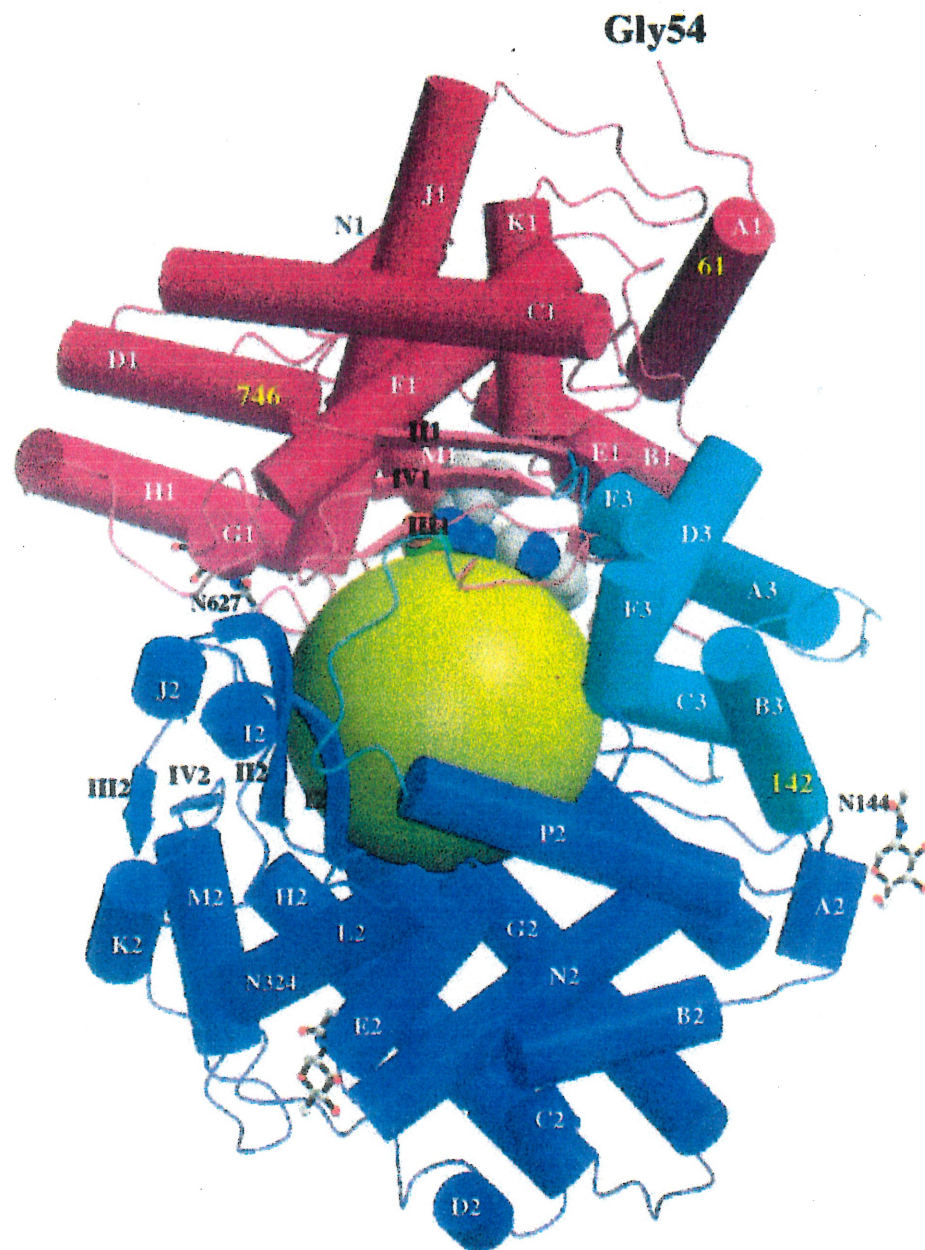


Figure 7: Cristallisation du site actif de l'EPN conjugué au phosphoramidon (Oefner et al., 2000).

Tel que mentionné précédemment, le zinc est un élément important du site actif de l'EPN. Les études de Devault (1988) et Le Moual (1991) ont permis d'identifier spécifiquement les résidus liant le zinc, soit les histidines en position 583 et 587 et l'acide glutamique en position 646 de l'EPN. Ils établissaient que l'EPN est une gluzincine contenant donc un motif **HEXXH.....E**, où les résidus en gras représentent les trois ligands du zinc. La catalyse enzymatique est réalisée grâce à trois résidus importants soit l'acide glutamique 584, l'histidine 711 et l'acide aspartique 650. En effet, l'acide glutamique 584 correspond à un des résidus du motif zincine (HEXXH....E) et porte le nom d'acide glutamique catalytique. Ce résidu joue un rôle important dans l'hydrolyse du substrat (Devault et al., 1988b). Les travaux de Bateman (1990) et Dion (1993) ont ensuite permis de démontrer l'importance de l'histidine 711 dans la stabilisation de l'intermédiaire tétrahédrique de l'état de transition. Ce résidu forme, en effet, un pont hydrogène avec l'oxyanion.

L'acide aspartique 650 interagit, quant à lui, avec un des ligands du zinc, l'histidine 583 (Le Moual et al., 1994). Il formerait ainsi avec l'atome de zinc et l'histidine 583, la triade catalytique. Les acides aminés potentiellement responsables de la liaison du substrat ont été identifiés par comparaison avec la TLN et l'utilisation d'inhibiteurs de l'EPN, puis confirmés par mutagenèse dirigée. Cette dernière méthode a permis d'identifier le résidu arginine 102, absente chez la TLN, comme celui responsable de la liaison au substrat (Bateman et al., 1989; Beaumont et al., 1991). D'autres études ont suggéré que cette arginine soit responsable de l'activité dipeptidyl-carboxypeptidase occasionnelle de l'EPN. Selon ces hypothèses, elle interagirait avec le groupe carboxyle libre du résidu P2' de certains substrats comme les enképhalines (Llorens et al., 1980; Malfroy and Schwartz,

1982; Jackson and Hersh, 1986; Pozsgay et al., 1986; Beaumont et al., 1991). Par contre, les études récentes de cristallisation de l'EPN ont démontré que l'arginine 102 n'est pas impliquée dans la liaison de l'inhibiteur phosphoramidon (Oefner et al., 2000). Ces résultats contradictoires remettent donc en question l'implication réelle de l'arginine 102 dans le mécanisme catalytique de l'EPN. L'arginine 717 présente chez la TLN, serait quant à elle impliquée dans la liaison de l'inhibiteur (Marie-Claire et al., 1997). La chaîne latérale de cette arginine participe à la formation d'un pont salin avec l'acide aspartique 650 et joue un rôle dans l'hydrolyse du substrat et la liaison du phosphoramidon (Marie-Claire et al., 1997; Oefner et al., 2000). Finalement, les travaux de Dion en 1995 ont mis en évidence l'implication de l'asparagine 542 dans la liaison du substrat qui se ferait via un pont hydrogène.

Il est à noter également que les différents acides aminés importants pour la catalyse sont conservés chez tous les membres de la famille de l'EPN. L'élucidation de la structure et de la composition du site actif de l'enzyme a permis de concevoir divers inhibiteurs spécifiques à cette classe d'enzymes. L'augmentation du nombre de membres de la famille de l'EPN implique également le besoin d'inhibiteurs spécifiques pour chaque enzyme. Historiquement, les inhibiteurs de l'EPN possèdent un groupement ayant un pouvoir chélateur fort pour l'ion de zinc, comme par exemple, le phosphoramidate, le thiol, l'hydroxamate ou le carboxylate (Matthews, 1988). Les inhibiteurs doivent également posséder des groupements chimiques pouvant interagir avec les sites S1' et S2'.

1.7.1) Comparaison entre l'EPN et les autres membres de la famille

ECE-1 est 37 % identique à l'EPN et possède tous les acides aminés importants pour l'activité enzymatique de l'EPN (voir Figure 8 et Tableau I) (Xu et al., 1994). Les isoformes a, b et c d'ECE-1 sont respectivement constitués de 758, 770 et 754 acides aminés (revue par : Turner et al., 1998). ECE-1 contient 10 sites de N-glycosylation dans son domaine extracellulaire. Quatorze cystéines sont présentes chez ECE-1, dont dix sont conservées avec l'EPN et les autres membres de la famille. Des quatre cystéines qui ne sont pas conservées, l'une d'elles est responsable de la dimérisation de l'enzyme. ECE-1 existe donc sous forme de dimères covalents actifs (Schmidt et al., 1994; Shimada et al., 1996). La dimérisation d'ECE-1 résulte spécifiquement de la formation d'une liaison disulfure entre deux monomères et ce, via la Cys 412. Des études de mutagenèse dirigée ont d'ailleurs permis de démontrer que cette cystéine est l'unique responsable de l'état de dimérisation de la protéine (Shimada et al., 1996). La dimérisation de l'enzyme est préférable mais non essentielle à son activité d'hydrolyse des substrats.

ECE-2 contient 787 acides aminés et montre 59% d'identité avec ECE-1 et 37% avec l'EPN (Emoto and Yanagisawa, 1995). Tout comme ECE-1, ECE-2 possède 10 sites potentiels de N-glycosylation. ECE-2 contient, tout comme ECE-1, une cystéine additionnelle mais la dimérisation d'ECE-2 reste à prouver.

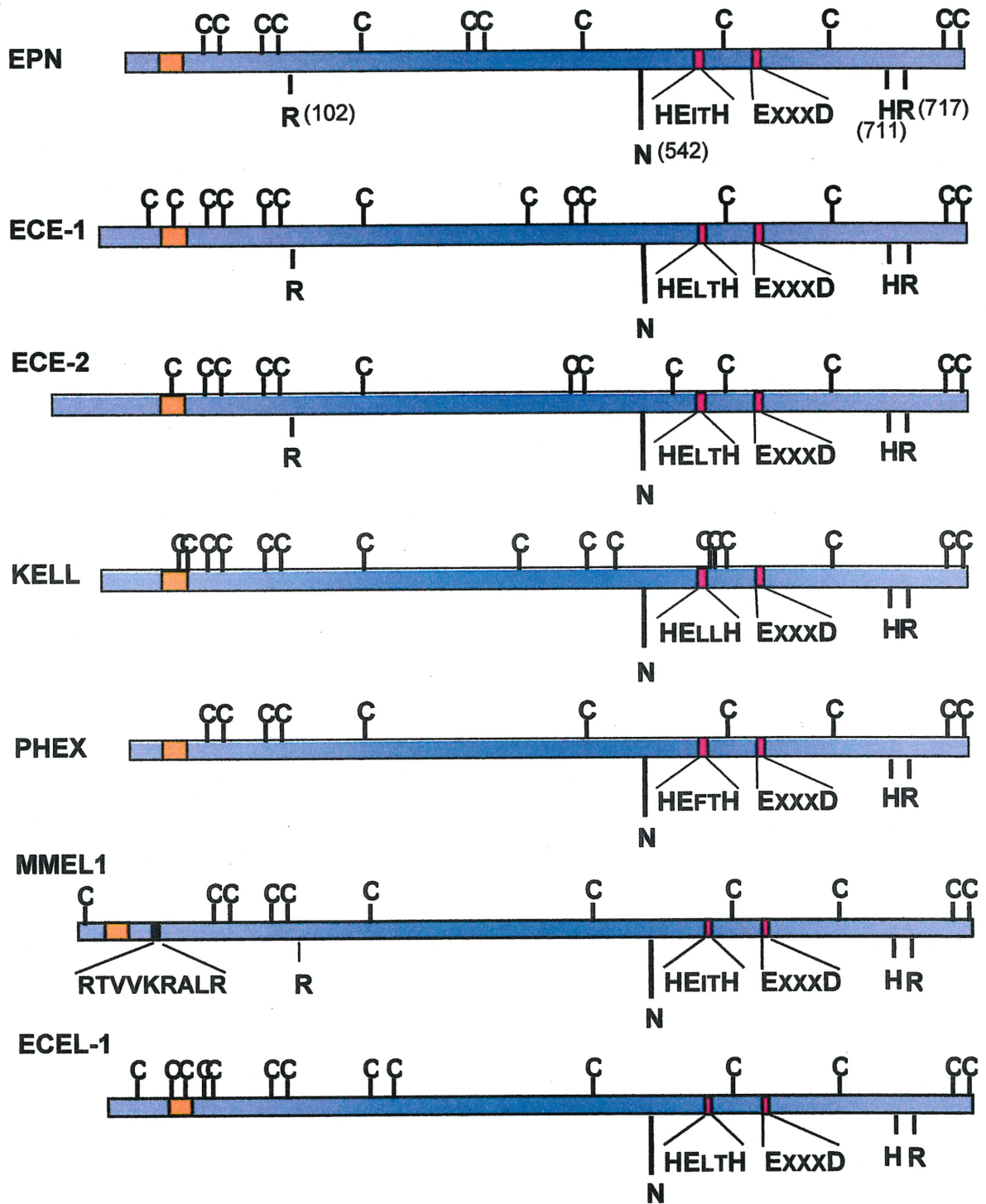


Figure 8: Représentation schématique des membres de la famille de l'EPN.

	EPN	ECE-1	PHEX	KELL	ECEL1	MMEL1
EPN	-----	39,1 %	34,9 %	23,1 %	30,9 %	54,8 %
ECE-1	-----	-----	37,9 %	30,4 %	37,1 %	40,6 %
PHEX	-----	-----	-----	24,4 %	31,8 %	39,4 %
KELL	-----	-----	-----	-----	28,3 %	26,0 %
ECEL1	-----	-----	-----	-----	-----	35,5 %
MMEL1	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Tableau I: Comparaison d'identité de séquence entre les différents membres de la famille de l'EPN.

L'ADNc de PHEX de souris fut cloné par Du en 1996 alors que la forme humaine fut identifiée en 1997-98 par Grieff et Lipman. PHEX est composée de 749 acides aminés et est 34 % identique à l'EPN. PHEX possède dix cystéines conservées avec celles de l'EPN et huit sites de N-glycosylation.

En 1991, Lee et coll. ont publié le clonage de l'ADNc de Kell. Kell est une protéine de 732 acides aminés dont 25 % sont identiques à l'EPN. C'est le membre de la famille qui présente la plus faible identité de séquence par rapport à l'EPN. On retrouve six sites de N-glycosylation sur KELL. Cette dernière contient 16 cystéines, 15 se trouvant dans l'ectodomaine. De ces 15 cystéines, 10 sont également conservées avec l'EPN. Contrairement aux autres membres de la famille de l'EPN, la protéine Kell est liée de façon covalente à la protéine XK, une protéine à 10 passages transmembranaires et forme donc un hétérodimère (Russo et al., 1998).

La séquence codante d'ECEL1 est composée de 2859 nucléotides dont le contenu en GC est très élevé (Valdenaire et al., 1999). On compte en effet près de 65% de GC dans la séquence nucléotidique complète, 82% dans les 700 premiers nucléotides. Il s'agit également d'une protéine de type II de 775 acides aminés. ECEL1 est 37 % identique à l'EPN et 42 % identique à ECE-1 dans les 500 derniers acides aminés. ECEL1 est donc plus similaire à ECE-1 qu'à l'EPN. En effet, la protéine ECEL1 a tout d'abord été identifiée par homologie avec l'enzyme de conversion de l'endothéline. On peut également dénoter trois sites potentiels de N-glycosylation et 11 cystéines du côté luminal de la protéine. De ces 11 cystéines, 9 sont conservés avec les autres membres de la famille. Le rôle des cystéines additionnelles demeure à déterminer. ECEL1 ne contient pas d'équivalent de la cystéine

responsable de la dimérisation d'ECE-1. Des études d'immunobuvardage sur gel non-dénaturant ne permettent pas de détecter une forme homodimérique de la protéine.

L'ADNc complet de MMEL1 code pour une protéine de 765 acides aminés contenant tous les résidus essentiels pour l'activité de cette famille d'enzyme (Ikeda et al., 1999; Ghaddar et al., 2000). De plus, MMEL1 contient dix cystéines conservées avec les autres membres de la famille dans son ectodomaine. Neuf sites de N-glycosylation sont présents sur le domaine extracellulaire de la protéine contrairement à cinq pour l'EPN. Cette dernière est l'une des protéines ressemblant le plus à l'EPN, car elle est 74 % similaire et 55 % identique à l'EPN humaine et murine. Sa localisation cellulaire la distingue cependant de tous les autres membres de la famille de l'EPN qui sont des enzymes membranaires de type II. En effet, MMEL1 est la seule peptidase de cette famille à contenir une région potentielle de clivage par la furine qui est responsable de la forme sécrétée de l'enzyme (Ikeda et al., 1999; Ghaddar et al., 2000).

1.8) Description du projet de recherche

Puisque les enzymes de la famille de l'EPN décrites précédemment sont impliquées dans des fonctions physiologiques très importantes, plusieurs inhibiteurs et agents pharmaceutiques ont été conçus afin d'agir spécifiquement sur ces différentes enzymes. Afin de s'assurer de la spécificité des produits pharmaceutiques, il est important d'identifier et de caractériser tous les membres constituant la famille. Dans ce mémoire, nous avons cloné l'ADNc humain d'un nouveau membre de la famille que nous avons appelé MMEL2. Pour ce faire, nous avons criblé une banque de phage contenant des ADNc de cerveau

humain en utilisant un fragment d'ADNc de MMEL1 comme sonde. Nous avons également caractérisé l'expression tissulaire de son transcrit par des analyses de buvardage de type Northern et par RT-PCR. Nous avons déterminé la localisation chromosomique de MMEL2 par la technique d'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH). De plus, nous avons produit des anticorps dirigés contre la protéine MMEL2 qui nous ont permis de détecter la protéine dans des extraits de cellules eucaryotes transfectées avec un vecteur d'expression fusionné à l'ADNc de MMEL2.

CHAPITRE 2

ARTICLE

CHAPITRE 2 - ARTICLE

Contribution des auteurs

Nadia Bonvouloir a effectué les expériences de clonage et de caractérisation biochimique sous la direction des Dr Luc DesGroseillers, Dr Guy Boileau et Dr Philippe Crine. Les expériences de localisation chromosomique ont été effectuées dans le laboratoire du Dr Nicole Lemieux.

**Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal
localization of *MMEL2*, a gene coding for a novel human
member of the neutral endopeptidase-24.11 family**

Nadia Bonvouloir¹, Nicole Lemieux², Philippe Crine¹, Guy Boileau¹ and Luc
DesGroseillers^{1*}

¹Département de Biochimie and ²Département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Faculté
de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

* To whom correspondence should be addressed,

Dr Luc DesGroseillers

Department of Biochemistry

University of Montreal

P.O. Box 6128, Station Centre Ville

Montreal, (Que), Canada

H3C 3J7

Phone: (514) 343-5802

Fax: (514) 343-2210

E-mail: desgros@bcm.umontreal.ca

Running title : Characterization of a novel NEP-like peptidase

ABSTRACT

Members of the neutral endopeptidase (NEP, also known as MME for membrane metallo-endopeptidase in the Human Gene Nomenclature Database) family have been shown to play significant roles in pain perception, arterial pressure regulation, phosphate metabolism and homeostasis. In this paper, we report the cloning of a new human member of the NEP family that we named MMEL2 for membrane metallo-endopeptidase-like 2. MMEL2 has the structural characteristics of type II trans-membrane proteins although the presence of a furin-like cleavage site in the ectodomain suggests that it may be released in the medium following proteolytic cleavage. MMEL2 contains the zinc binding consensus sequence HEXXH and all the residues known to be essential for the enzymatic activity of other members of the family. MMEL2 mRNA was predominantly detected in testis. Weak expression was also observed in brain, kidney and heart. The human *MMEL2* gene was mapped to locus 1p36 by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). It will be important to test whether MMEL2 defects are associated with diseases such as the hereditary motor sensory neuropathy 2A, the Schwartz-Jampel-Aberfeld syndrome or the neuroblastoma which all map to this locus.

Keywords: neprilysin, testis, FISH, molecular cloning, endopeptidase, chromosomal localization, neuropeptide-degrading enzyme,

INTRODUCTION

Peptides are used as messengers to elicit physiological responses. Peptides are often synthesized as inactive precursors. These precursors are usually processed into bioactive peptides by proteases of the subtilisin family located in the *trans*-Golgi network or in secretory granules (Seidah and Chretien, 1999). Other peptides are released in the extracellular milieu as inactive precursors that have to be cleaved in the medium to become active. Membrane-bound zinc-metallopeptidases such as the endothelin-converting enzymes (ECEs) have been shown to play this role (Turner, 1997). Bioactive peptides then interact with specific receptors on the target cells to produce cellular responses. There is increasing evidence that the signal mediated by the peptides is terminated by the cleavage of the peptides into inactive fragments. Cell-surface zinc-metallopeptidases have also been implicated in the termination of the peptidergic signal.

Neutral Endopeptidase-24.11 (NEP, Neprilysin, EC 3.4.24.11, MME) is probably the best characterized peptidase involved in the physiological degradation of several bioactive peptides (Kenny, 1993). Based on significant structural similarities, NEP appears to be member of a family of peptidases that also includes ECE-1, ECE-2, PHEX, ECEL1 (alias XCE and DINE), SEP/NL1/NEPII (named MMEL1 in the text according to the Genome nomenclature database) and the KELL blood group protein (reviewed in Turner and Tanzawa, 1997; Turner *et al.*, 2000). By regulating the half-life of several bioactive peptides, these enzymes play significant roles in animal physiology, ranging from pain control, regulation of blood pressure, renal tubular phosphate reabsorption, hypophosphatemia and bone mineralization. Interestingly, mouse and rat MMEL1 which are mainly expressed in testis were shown to be expressed either as a membrane-bound or

as a soluble form due to the insertion by differential splicing of a furin-like cleavage site downstream of the transmembrane domain (Ghaddar *et al.*, 2000; Ikeda *et al.*, 1999; Tanja *et al.*, 2000). Other spliced variants have been described and shown to be expressed in a tissue specific manner (Tanja *et al.*, 2000).

Members of the NEP-like family are type II membrane proteins consisting of three distinct domains: a short NH₂-terminal cytosolic sequence, a single transmembrane region, and a large extracellular domain responsible for the catalytic activity of the enzyme. Members of this family are characterized by the presence of a zinc atom coordinated to two histidine residues located in the active site consensus sequence HEXXH, also referred as the zincin motif, and to a glutamic acid located 64 residues on the C-terminal side of the zincin motif. This feature allows the classification of NEP-like family members in the gluzincin family of peptidases (Hooper, 1994). The model enzymes for gluzincins are thermolysin (TLN) and NEP, whose 3D structure has been determined by X-ray crystallography (Holmes and Matthews, 1982; Oefner *et al.*, 2000). Extensive site-directed mutagenesis analyses have also identified several residues involved in zinc binding (Matsumura *et al.*, 1990), catalysis (Dion *et al.*, 1993), or substrate binding (Beaumont *et al.*, 1991; Dion *et al.*, 1995; Marie-Claire *et al.*, 1997; Crine *et al.*, 1997).

Because of their important physiological implications, these enzymes have been identified as possible targets for therapeutic intervention by inhibitors and/or pharmaceuticals agents. To better document the specificity of these inhibitors towards a selected member of the family, it is important to identify and characterize all members of the family. In this study, we have cloned human MMEL2, a new human NEP-like enzyme, determined its tissue distribution and mapped its chromosomal localization by fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

MATERIALS AND METHODS

Molecular cloning

To identify new members of the NEP family, we screened a λ gt10 human fetal brain cDNA library using mouse MMEL1 cDNA (Ghaddar *et al.*, 2000) as a probe. Three positive clones were isolated and the MMEL2 insert was PCR amplified using two primers derived from the phage sequence. Amplification was performed in a final volume of 50 μ l containing 100 ng of phage DNA, 4 μ M of each primer, 200 μ M of each dNTP and 0,5 μ l of *PfuTurbo*TM DNA polymerase (Stratagene, CA). After an initial denaturation step at 95°C for 2 min, amplification conditions were: 41 cycles at 94°C for 30 s, at 52°C for 30 s, and at 72°C for 2:30 min and a final extension step at 72°C for 10 min. The longest PCR product was subcloned into pZAPA-TA (Barbas, Zappulla and DesGroseillers, in preparation) and sequenced by the dideoxynucleotide method according to Sequenase protocols (United States Biochemical Corp.). Missing 5' sequences were obtained by 5'-RACE using human brain cDNA (Human Brain Marathon-ReadyTM cDNA library, Clontech) and two pairs of primers: primers AP1 and AP2 (from the kit) and two nested MMEL2-specific antisense primers (5'-¹²⁴¹GCGGTAGTTCACCTCGTGTGTC¹²²¹-3' and 5'-¹²⁰⁶GCTTAGGCTACCAATGCGGTC¹¹⁸⁶-3'). The PCR fragments were subcloned into pZAPA-TA for sequencing and the full-length MMEL2 cDNA was reconstructed by enzymatic restriction and sequenced using an automatic sequencer (373A Stretch XL).

Northern Blot analysis

Three Human Multiple Tissue Northern blots (MTN[®] Clontech) were hybridized with a [³²P]labeled probe corresponding to nucleotides 503 to 2332 of the MMEL2 sequence as done before (Wickham *et al.*, 1999). The blots were exposed to Fuji RX film for 10 days at -80°C with intensifying screens.

RT-PCR screening of human tissues

cDNA synthesis was performed with 200 ng of Human poly(A)⁺ RNA (Clontech) isolated from human brain, testis, kidney and heart and Random Hexamer using the GeneAmp RNA PCR Core Kit (Perkin-Elmer). Human ovary and bone marrow cDNA libraries (Marathon-Ready[™] cDNA, Clontech) were also used. The PCR reactions were done with the *Taq* DNA polymerase and sense 5'-CGCTGCCCTGGTGGCCTTGGGTGTC-3' (nt 148-172) and antisense 5'-GCTATCACGCAGCCAGGGGTGGTGC-3' (nt 327-303) primers. Amplification of the cDNAs with sense (position 1313-1336; GenBank accession number NM_017454) and antisense (position 1752-1726) primers that recognize the ubiquitously expressed *Staufen* gene (Wickham *et al.*, 1999) was performed as control for RNA integrity and reverse transcription. PCR products were visualized on a 4 % low-melting agarose gel after ethidium bromide staining. Amplified DNA fragments were also transferred onto a nylon membrane and hybridized with an MMEL2-specific probe.

Chromosomal localization

MMEL2 DNA probe fragment corresponding to nucleotides 339 to 2023 subcloned into PCR 2.1 plasmid was purified on a cesium chloride gradient and used as a probe for fluorescent *in situ* hybridization assay (FISH) as described previously (DesGroseillers and Lemieux, 1996).

RESULTS

Molecular cloning of MMEL2

To identify new members of the NEP family, we screened a λ gt10 human fetal brain cDNA library using mouse MMEL1 cDNA as a probe. Missing 5' sequences were obtained by 5'-RACE using human brain cDNA and two nested MMEL2-specific antisense primers. The longest reconstructed cDNA is 2784 nucleotides in length and contains a stretch of 61 adenine residues at one end of the sequence, allowing us to determine the direction of transcription (see GenBank accession number: AF336981). The sequence AGTAAA positioned at nucleotide 2711, 13 nucleotides upstream from the poly(A) tail, is probably used as a polyadenylation signal (AXTAAA, where X could be any nucleotide) (Proudfoot and Brownlee, 1976). The longest open reading frame is initiated at the AUG found at position 65, and codes for a putative protein of 770 amino acids that we named MMEL2 for MME-like 2 (Fig. 1). It is flanked by 64 and 410 of untranslated nucleotides at its 5' and 3' ends, respectively.

MMEL2 is 77,5% identical to mouse MMEL1 and 54, 40, 39, 39, 37 and 27% identical to human NEP, ECE-2, ECE1, PHEX, ECEL1 and KELL, respectively. MMEL2 is characterized by a small intracellular N-terminal domain of 19 aa followed by a transmembrane domain of 20 aa and a large extracellular domain of 731 aa, a structure typical of membrane-bound type II proteins. The motif HEXXH that characterizes enzymes of the zincin family is conserved. In addition, the extracellular domain contains all the residues known to be important for enzymatic activity in NEP and/or thermolysin (Fig. 1). Twelve cysteine residues as well as seven potential N-glycosylation sites are present in the extracellular part of the protein. A putative recognition site for convertases (R⁶⁰TFVKR⁶⁵)

is found downstream of the transmembrane domain, suggesting that MMEL2 is expressed as a soluble protein.

MMEL2 is mainly expressed in testis

To determine the tissue distribution of MMEL2, Northern blot and RT-PCR experiments were done on different human tissues. By Northern blotting, we screened mRNA isolated from 23 tissues. A single transcript of about 4 kb was detected exclusively in testis (Fig. 2A). All other tissues were negative. PCR was performed with cDNA generated from brain, testis, kidney, heart, ovary and bone marrow RNAs. As seen following ethidium bromide staining, a single band of 180 nt was again exclusively amplified from testis RNA, confirming the presence of MMEL2 mRNA in testis (Fig. 2B). However, when hybridized with an MMEL2-specific probe, a band of 180 nt also appeared in brain and kidney, and very weakly in heart (Fig. 2C). An additional band of 100 nt was observed in testis, brain and kidney. Ovary and bone marrow extracts remained negative.

Chromosomal localization of MMEL2

The chromosomal localization of the human *MMEL2* gene was determined by high-resolution fluorescence *in situ* hybridization (FISH). The probe used for FISH was a 1.8-kb fragment, corresponding to the open reading frame sequence. Localization of the *MMEL2* gene was established by analysis of 27 randomly selected metaphases, therefore 54 chromosomes have been observed. We observed 90 chromatids out of 108 showing a fluorescent spot on the short arm of chromosome 1 (Fig. 3). Therefore, 83% of the chromatids were labeled. Under our conditions, the background was low and no specific secondary site was found. The localization was defined to band 1p36.

DISCUSSION

In this paper, we report the molecular characterization, tissue distribution and chromosomal localization of MMEL2, a new member of the NEP family. The cDNA encodes a protein of 770 amino acid residues. This protein displays the main structural features of the NEP family. MMEL2 is a type II membrane protein and contains the zinc-binding motif HEXXH. The extracellular domain also contains all the residues known to be important for coordination of the zinc atom (his⁶⁰⁴, his⁶⁰⁸, glu⁶⁶⁷), catalysis (glu⁶⁰⁵), substrate binding (arg¹²⁶, asn⁵⁶³, ala⁵⁶⁴, arg⁷³⁸) and stabilization of the transition state (asp⁶⁷¹, his⁷³²) in NEP and/or thermolysin (reviewed in Crine *et al.*, 1997). This suggests that MMEL2 may follow the general catalytic process of the NEP family and may display the same substrate specificity as MMEL1 and/or NEP.

As observed with MMEL1 (Ikeda *et al.*, 1999; Ghaddar *et al.*, 2000; Tanja *et al.*, 2000), a putative recognition site for convertases (R⁶⁰TFVKR⁶⁵) is found downstream of the transmembrane domain, suggesting that MMEL2 can be expressed as a soluble protein. However, the presence of a proline residue in P'2 of the consensus sequence may impede the cleavage. In addition, the additional band of 100 nt that we observed by RT-PCR in testis, brain and kidney likely corresponds to the amplification of a differentially spliced transcript coding for the transmembrane form of the protein, as previously observed in mouse for MMEL1 (Ikeda *et al.*, 1999). The ratio of the two bands is similar among tissues, the one coding for the secreted form of the protein being the most abundant. This suggests that the secreted form of the protein is prevalent in each tissue. This is in contrast with MMEL1 isoforms whose ratio varies among tissues. Transcripts coding for the secreted

form are more abundant than those coding for the membrane isoform in testis whereas the reverse is observed in the CNS (Ikeda *et al.*, 1999).

The tissue expression of MMEL2 is quite similar to that of mouse MMEL1, which is mainly expressed in testis. As observed in mouse (Ghaddar *et al.*, 2000; Ikeda *et al.*, 1999), MMEL2 is also weakly expressed in other tissues. In rat, MMEL1 was detected by Northern blot experiment in testis, brain and pituitary (Tanja *et al.*, 2000). It will be interesting to determine whether MMEL2 is expressed in the round and elongated spermatides in humans, as observed in mice and rats for MMEL1 (Ghaddar *et al.*, 2000; Tanja *et al.*, 2000).

Sequence comparisons and tissue expression do not allow us to clearly determine whether MMEL2 is the human homologue of MMEL1. On one hand, these genes share the best sequence identity among members of the family, they both contain a furin-like cleavage site to generate a soluble form of the protein and they show similar tissue distribution. On the other hand, mouse MMEL1 and human MMEL2 only show 77% identity. As comparison, mouse MMEL1 is 91% identical to its rat homologue. Indeed, homologues of other members of the NEP family isolated from different species always share more than 90% sequence identity between each other. Nevertheless, no sequence closer to MMEL-1 can be found so far in the human genome and human EST database. In addition, MMEL2 contains 12 cysteine residues rather than 10 as in NL1. Ten of them are conserved within all members of the family, indicating that MMEL2 adopts a similar conformation. The first additional cysteine (Cys⁵⁴) is located upstream of the putative furin cleavage site and is therefore absent from the putative secreted protein which would contain 11 cysteines. The unpaired cysteine (Cys²⁹⁰) located in the extracellular domain may be involved in dimer formation as observed for ECE-1 (Shimada *et al.*, 1996).

Finally, we mapped the *MMEL2* gene to chromosome 1. Interestingly, the *ECE-1* gene was mapped at the same locus (Valdenaire *et al.*, 1995), suggesting that gene duplication may have generated different members of the gluzincin family. The 1p36 site is of considerable interest due to its association with human genetic diseases. Genetic mapping has localized the hereditary motor sensory neuropathy 2A (neuronal type of Charcot-Marie-Tooth disease)(Ben Othmane *et al.*, 1993), the Schwartz-Jampel-Aberfeld syndrome (Nicole *et al.*, 1995), the dyslexia (Rabin *et al.*, 1993), and the neuroblastoma (Weith *et al.*, 1989; White *et al.*, 1995) to the same locus. It is not known whether or not the metallopeptidase that we describe in this study is involved in any of these genetic diseases. Nevertheless, considering the primordial role of metallopeptidases in metabolism, deletions or mutations in the *MMEL2* gene could induce abnormal cell function. Genetic ablation (NEP, ECE-1, ECE-2, ECEL1) and/or endogenous deletion/mutation (PHEX) of the genes coding for members of this protein family caused major defects or subtler troubles (NEP) (Turner and Tanzawa, 1997). The localization of *MMEL2* on human chromosomes should be useful as a means to look for a possible link between this gene and genetic diseases which have been mapped in this region.

ACKNOWLEDGMENT

We would like to acknowledge the technical assistance of Isabelle Rivard, Pierre Melançon and Fléchère Fortin. This work was supported by grants from Fonds pour Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) and Medical Research Council of Canada (MRC) to P.C., L.D.G. and G.B.

REFERENCES

Beaumont, A., Le Moual, H., Boileau, G., Crine, P., and 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.

Ben Othmane, K., Middleton, L.T., Loprest, L.J., Wilkinson, K.M., Lennon, F., Rozear, M.P., Stajich, J.M., Gaskell, P.C., Roses, A.D., and Pericak-Vance, M.A. (1993). Localization of a gene (CMT2A) for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 to chromosome 1p and evidence of genetic heterogeneity. *Genomics* 17, 370-375.

Crine, P., Dion, N., and Boileau, G. (1997). Endopeptidase-24.11. In *Cell-surface peptidases in health and disease*, A.J.Kenny and C.M.Boustead, eds. (Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers Ltd), pp. 79-98.

DesGroseillers, L. and Lemieux, N. (1996). Localization of a human double-stranded RNA-binding protein gene (STAU) to band 20q13.1 by fluorescence *in situ* hybridization. *Genomics* 36, 527-529.

Dion, N., Le Moual, H., Crine, P., and 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., Le Moual, H., Fournié-Zaluski, M.C., Roques, B.P., Crine, P., and 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.

Ghaddar, G., Ruchon, A.F., Carpentier, M., Marcinkiewicz, M., Seidah, N.G., Crine, P., DesGroseillers, L., and Boileau, G. (2000). Molecular cloning and biochemical characterization of a new mouse testis soluble-zinc-metallopeptidase of the neprilysin family. *Biochem. J.* 347, 419-429.

Holmes, M.A. and Matthews, B.W. (1982). Structure of thermolysin refined at 1.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 160, 623-639.

Hooper, N.M. (1994). Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* 354, 1-6.

Ikeda, K., Emoto, N., Raharjo, S.B., Nurhantari, Y., Saiki, K., Yokoyama, M., and Matsuo, M. (1999). Molecular identification and characterization of novel membrane-bound metalloprotease, the soluble secreted form of which hydrolyzes a variety of vasoactive peptides. *J. Biol. Chem.* 274, 32469-32477.

Kenny, J. (1993). Endopeptidase-24.11: Putative substrates and possible roles. *Biochem. Soc. Trans.* 21, 663-668.

Marie-Claire, C., Ruffet, E., Antonczak, S., Beaumont, A., O'Donohue, M., Roques, B.P., and Fournié-Zaluski, M.C. (1997). Evidence by site-directed mutagenesis that arginine 203 of thermolysin and arginine 717 of neprilysin (neutral endopeptidase) play equivalent critical roles in substrate hydrolysis and inhibitor binding. *Biochemistry* 36, 13938-13945.

Matsumura, Y., Hisaki, K., Takaoka, M., and Morimoto, S. (1990). Phosphoramidon, a metalloproteinase inhibitor, suppresses the hypertensive effect of big endothelin-1. *Eur. J. Pharmacol.* 185, 103-106.

Nicole, S., Ben Hamida, C., Beighton, P., Bakouri, S., Belal, S., Romero, N., Viljoen, D., Ponsot, G., Sammoud, A., and Weissenbach, J. (1995). Localization of the Schwartz-Jampel syndrome (SJS) locus to chromosome 1p34-p36.1 by homozygosity mapping. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1633-1636.

Oefner, C., D'Arcy, A., Hennig, M., Winkler, F.K., and Dale, G.E. (2000). Structure of Human Neutral Endopeptidase (Neprilysin) Complexed with Phosphoramidon. *J. Mol. Biol.* 296, 341-349.

Proudfoot, N.J., and Brownlee, G.G. (1976). 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* 263, 211-214.

Rabin, M., Wen, X.L., Hepburn, M., Lubs, H.A., Feldman, E., and Duara, R. (1993). Suggestive linkage of developmental dyslexia to chromosome 1p34-p36 [letter]. *Lancet* 342, 178.

Seidah, N. and Chretien, M. (1999). Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.* 848, 45-62.

Shimada, K., Takahashi, M., Turner, A.J., and Tanzawa, K. (1996). Rat endothelin-converting enzyme-1 forms a dimer through Cys⁴¹² with a similar catalytic mechanism and a distinct substrate binding mechanism compared with neutral endopeptidase- 24.11. *Biochem. J.* 315, 863-867.

Tanja, O., Facchinetti, P., Rose, C., Bonhomme, M.C., Gros, C., and Schwartz, J.C. (2000). Neprilysin II: A Putative Novel Metalloprotease and Its Isoforms in CNS and Testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271, 565-570.

Turner, A.J. (1997). Endothelin-converting enzymes. In *Cell-surface peptidases in health and disease.*, A.J.Kenny and C.M.Boustead, eds. (Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers Ltd), pp. 137-153.

Turner, A.J., Brown, C.D., Carson, J.A., and Barnes, K. (2000). The neprilysin family in health and disease [In Process Citation]. *Adv. Exp. Med. Biol.* 477, 229-240.

Turner, A.J. and Tanzawa, K. (1997). Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J.* 11, 355-364.

Valdenaire, O., Rohrbacher, E., and Mattei, M.G. (1995). Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1). *J. Biol. Chem.* 270, 29794-29798.

Weith, A., Martinsson, T., Cziepluch, C., Bruderlein, S., Amler, L.C., Berthold, F., and Schwab, M. (1989). Neuroblastoma consensus deletion maps to 1p36.1-2. *Genes Chromosomes. Cancer* 1, 159-166.

White, P.S., Maris, J.M., Beltinger, C., Sulman, E., Marshall, H.N., Fujimori, M., Kaufman, B.A., Biegel, J.A., Allen, C., and Hilliard, C. (1995). A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within human chromosome 1p36.2-36.3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 5520-5524.

Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I.R., and DesGroseillers, L. (1999). Mammalian stau1 is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell Biol.* 19, 2220-2230.

LEGENDS TO FIGURES

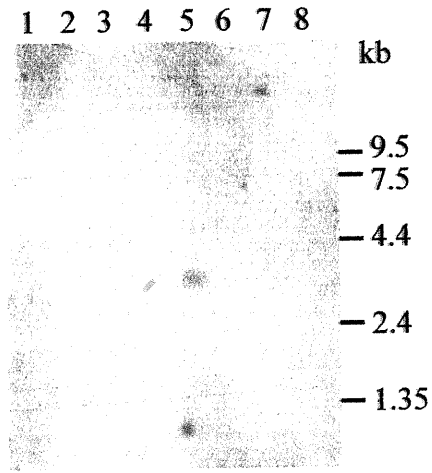
Figure 1. Amino acid sequence comparison between human MMEL2 and mouse MMEL1. Colon and dots represent identical and conserved amino acid residues, respectively. The predicted transmembrane domain is underlined, the furin-like cleavage site is double-underlined, cysteine residues are bold, putative glycosylation sites are italicized, the zincin signature is boxed and amino acids known to be implicated in NEP activity are marked by asterisks (*).

Figure 2. Tissue expression of MMEL2 in humans. A) Three Human Multiple Tissue Northern blots were hybridized with a [³²P]labeled probe corresponding to nucleotides 503 to 2332 of the MMEL2 sequence. One of them is shown. Lane 1, leukocytes. Lane 2, colon. Lane 3, small intestine. Lane 4, ovary. Lane 5, testis. Lane 6, prostate. Lane 7, thymus. Lane 8, spleen. All other tissues (whole brain, heart, placenta, lung, liver, skeletal muscle, kidney, pancreas, stomach, thyroid, spinal cord, trachea, adrenal gland, bone marrow, lymph node) were negative. B) cDNA synthesis was performed with 200 ng of Human poly(A)⁺ RNA (Clontech) isolated from human brain, testis, kidney and heart. Human ovary and bone marrow cDNA libraries were also used. Amplification of the cDNAs with two primers that recognize the ubiquitously expressed *Staufen* gene (Wickham *et al.*, 1999) was performed as control for RNA integrity and reverse transcription. PCR products were visualized on a 4 % low-melting agarose gel after ethidium bromide staining. C) Amplified DNA fragments were also transferred onto a nylon membrane and hybridized with an MMEL2-specific probe. B and C) Lane 1, negative control. Lane 2, brain. Lane 3, heart.

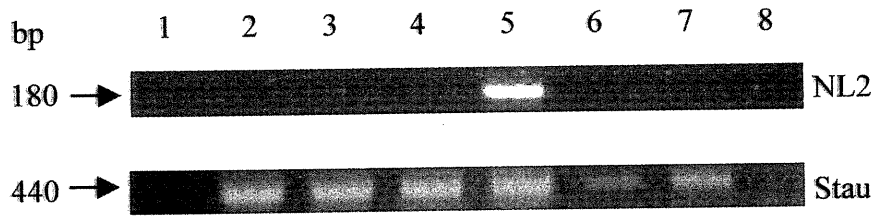
Lane 4, kidney. Lane 5, testis. Lane 6, bone marrow. Lane 7, ovary. Lane 8, negative control.

Figure 3. Chromosomal localization of the *MMEL2* gene. Fluorescence *in situ* hybridization of the human 1.8-kb biotinylated *MMEL2* cDNA probe, on human R-banded BrdU-substituted chromosomes. Fluorescent signals of the *MMEL2* gene are all located on 1p36. Chromosomes were counterstained with propidium iodide.

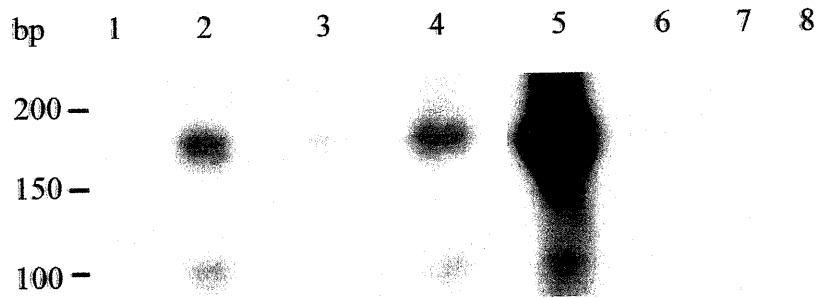
A)

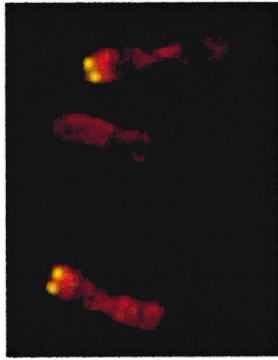
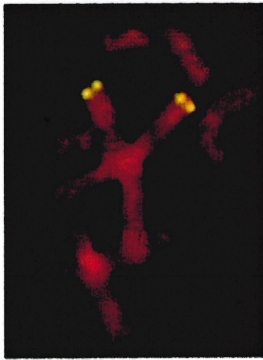
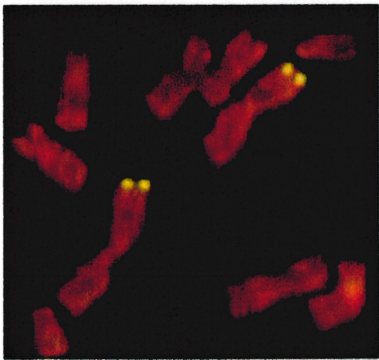
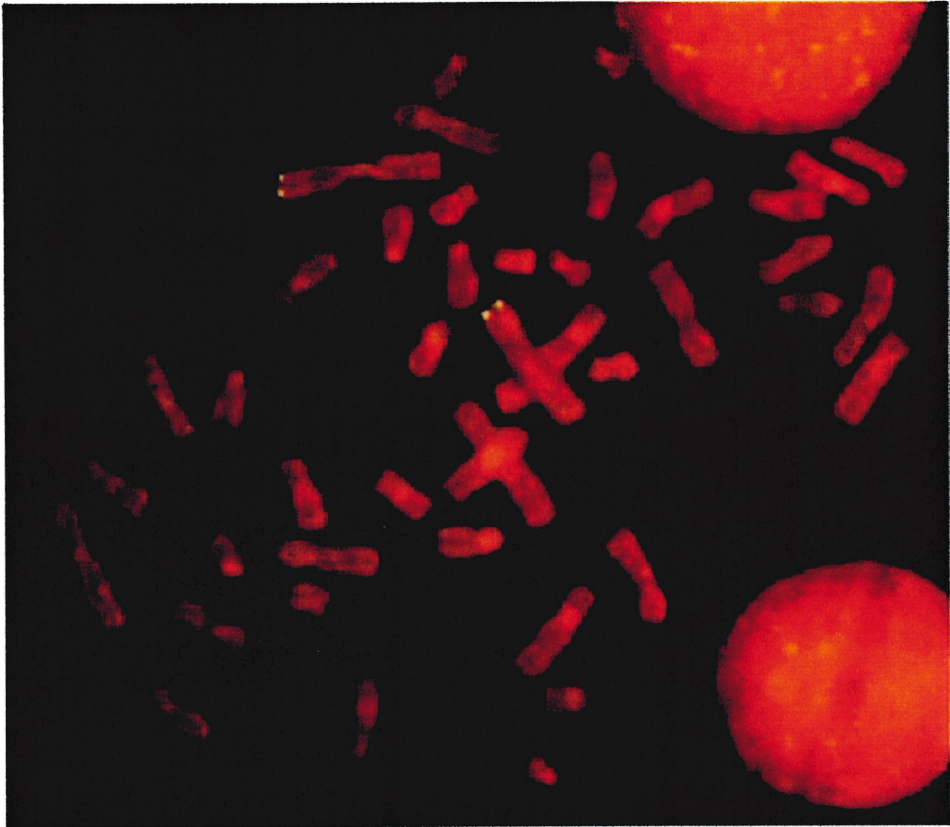


B)



C)





CHAPITRE 3

RÉSULTATS ADDITIONNELS

CHAPITRE 3 - RÉSULTATS

ADDITIONNELS

Contribution des auteurs

Nadia Bonvouloir a développé les anticorps et effectué les expériences de localisation cellulaire sous la direction des Dr Luc DesGroseillers, Dr Guy Boileau et Dr Philippe Crine.

**Des anticorps polyclonaux de lapin permettent de détecter
MMEL2 dans le réticulum endoplasmique de cellules
transfectées.**

Nadia Bonvouloir, Philippe Crine, Guy Boileau et Luc DesGroseillers*

Département de Biochimie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal,
Québec, Canada, H3C 3J7

* Adresse de correspondance:

Dr Luc DesGroseillers

Département de Biochimie

Université de Montréal

P.O. Box 6128, Station Centre Ville

Montréal, (Qué), Canada

H3C 3J7

Téléphone: (514) 343-5802

Fax: (514) 343-2210

E-mail: desgros@bcm.umontreal.ca

3.1) Résumé

La peptidase MMEL2 est un nouveau membre de la famille de l'endopeptidase neutre dont l'ADNc a été cloné à partir d'une banque d'ADNc de cerveau humain. Afin de visualiser la protéine MMEL2, nous avons développé des anticorps polyclonaux de lapin. Ces anticorps polyclonaux reconnaissent MMEL2, mais également MMEL1 et l'EPN. Ces derniers nous ont permis de détecter la protéine dans les extraits de cellules transfectées. Des études de déglycosylation à l'endoglycosidase H et à la PNGase F suggèrent que MMEL2 soit une protéine hautement glycosylée qui se retrouve associée aux cellules, probablement au niveau du réticulum endoplasmique rugueux. Malgré la présence d'un site potentiel de clivage à la furine, MMEL2 ne se retrouve pas dans le milieu de culture des cellules transfectées.

3.2) Introduction

L'article composant le deuxième chapitre de ce mémoire a permis d'identifier le gène d'une toute nouvelle protéine humaine de la famille de l'endopeptidase neutre. Des études de buvardage de type Northern ainsi que des expériences de RT-PCR ont identifié le transcrite de la protéine MMEL2 dans quelques tissus dont les testicules, le coeur, le rein et le cerveau. La séquence protéique déduite pour MMEL2 montre qu'elle contient tous les résidus importants de la famille de l'EPN. MMEL2 est également très identique (77,5 % d'identité de séquence) à la protéine de souris MMEL1. Cette dernière est la seule protéine de la famille de l'EPN à être produite sous forme soluble. En effet, durant son passage dans la voie de sécrétion, la protéine MMEL1 est clivée par une enzyme de type furine en C-terminal du domaine transmembranaire. La protéine MMEL1 se retrouve donc dans le milieu extracellulaire de cellules transfectées. Afin de compléter la caractérisation de la protéine MMEL2 humaine, nous avons développé des anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre MMEL2 et analysé par immunobuvardage des extraits de cellules transfectées. Les sections suivantes permettront de caractériser l'expression de MMEL2 et de la comparer avec l'expression de MMEL1 et des autres membres de la famille de l'EPN.

3.3) Matériel et Méthodes

3.3.1) Production d'anticorps polyclonaux

Un fragment de l'ADNc de MMEL2 correspondant aux acides aminés 74 à 209 a été sous-cloné dans le vecteur d'expression pGEX-4T-3 (Amersham Pharmacia). La protéine MMEL2 fusionnée à la GST a été produite dans la souche d'*Escherichia coli* AP401. La protéine MMEL2 produite a ensuite été clivée de la partie GST par la thrombine et purifiée selon les directives du manufacturier. La visualisation de la production a été effectuée par résolution sur gel SDS-PAGE 15 %. Trois lapins femelles blancs de Nouvelle-Zélande de 2-2,5 kg furent ensuite immunisés avec 50-100 µg du fragment MMEL2 auquel a été ajouté 50 µg de saponine. L'antigène a été injecté aux lapins une fois par mois et les antiséras ont été récoltés environ 10 jours après la 2^e injection ainsi qu'après les deux injections subséquentes.

3.3.2) Production d'anticorps monoclonaux

Cinq souris femelles BALB/c de 43-78 jours (5-6 semaines) ont été immunisées avec 10 µg de fragment MMEL2 (voir section 3.2.1), additionné de 10 µg d'adjuvant de Freud complet pour la première injection et d'adjuvant de Freud incomplet pour les injections subséquentes. L'antigène a été injecté trois fois de façon intra-péritonéale à intervalle de 3 semaines. Les antiséras furent récoltés 10-15 jours après les différentes administrations. Une injection de rappel sans adjuvant fut effectuée intra-péritonéalement 5 jours avant la fusion entre les cellules de rate des souris immunisées et des myélomes en culture de lignée

P3x63.AG.653 (ATCC). La fusion a été effectuée telle que décrit par Goding *et al.*, 1980. Les surnageants de culture des hybridomes ont été testés pour leur spécificité par analyse ELISA. Ces essais ont été effectués dans des plaques de polystyrène prétraitées à la glutéraldéhyde et recouvertes d'antigène MMEL2 purifié (Evan, 1984). Les clones jugés positifs dans ce test ont ensuite été testés par immunobuvardage de type Western.

3.3.3) Construction du vecteur d'expression

L'ADNc de MMEL2 a été obtenu tel que décrit dans l'article présenté dans le chapitre 2. L'ADNc complet a été reconstruit en digérant la partie 5' sous-clonée dans pZAPA-TA par les enzymes de restriction *HindIII* et *HincII* ainsi que l'extrémité 3' de l'ADNc, également sous-cloné dans pZAPA-TA, par *HincII* et *XbaI*. Ces deux fragments ont ensuite été introduits par ligation dans le vecteur pCDNA3/RSV préalablement clivé aux sites *HindIII* et *XbaI* créant ainsi le vecteur d'expression recombinant pCDNA3/RSV-MMEL2.

3.3.4) Culture cellulaire et transfection

Des cellules humaines embryonnaires de rein (HEK-293) maintenues en culture dans du milieu DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum bovin fœtal, 60 µg/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 0,25 µg/ml de fongizone ont été transfectées avec le vecteur d'expression recombinant pCDNA3/RSV-MMEL2 ou avec le vecteur d'expression non recombinant pCDNA3/RSV par la méthode de co-précipitation au calcium phosphate-ADN (Chen and Okayama, 1987). Les cellules sont ensuite incubées pendant 16 heures dans le milieu DMEM comme décrit ci-haut.

Vingt-quatre heures avant l'analyse, l'expression de MMEL2 est induite par l'addition de butyrate de sodium à une concentration finale de 3 mM et les cellules maintenues dans du milieu DMEM synthétique (*Dulbecco's modified Eagle's medium* complétementé avec 100 µg/ml de SBTI, 17,5 µg/ml de transférine B, 2 µg/ml d'éthanolamine, 2,5 µg/ml d'insuline et 10 µg/ml d'aprotinine).

3.3.5) Immunobuvardage de type Western

Les protéines cellulaires ont été solubilisées dans du PBS contenant 1 % de n-octyl glucoside tel que décrit précédemment (Dion et al., 1995). Les protéines sécrétées dans le milieu de culture ont été concentrées 20 fois par ultrafiltration en utilisant les Centripreps YM-50 (Amicon). Les protéines cellulaires et extracellulaires ont été séparées sur gel SDS-PAGE 7,5 % et transférées sur membrane de nitrocellulose. La protéine MMEL2 a été détectée en utilisant un anticorps polyclonal primaire de lapin dirigé contre MMEL2 (dilution de 1/1500), puis un anticorps secondaire de chèvre conjugué à la peroxydase de raifort et dirigé contre les immunoglobulines de lapin (dilution de 1/15 000 (Dako, dimension laboratories compagnie)). La détection du complexe immunitaire fut effectuée par chemiluminescence (NEN Renaissance kit) tel que décrit par le manufacturier. Lorsque les anticorps monoclonaux de souris ont été utilisés, ces derniers ont été détectés par l'anticorps secondaire de chèvre conjugué à la peroxydase de raifort (dilution de 1/2000 (Dako)) et dirigé contre les immunoglobulines de souris.

3.3.6) Étude de la glycosylation

Pour les études de glycosylation, les protéines sécrétées et membranaires furent préalablement incubées avec l'endoglycosidase H (endoH) ou le peptide:N-glycosidase F (PNGase F) tel que décrit par le distributeur (NEB) puis analysées par gel SDS-PAGE 7,5 % et immunobuvardage comme décrit à la section 3.3.4.

3.4) Résultats et Discussion

3.4.1) Production d'anticorps polyclonaux de lapin

Un fragment de 405 paires de bases de l'ADNc de MMEL2 sous-cloné dans un vecteur d'expression procaryote a permis de produire une portion de la protéine MMEL2 chez *E.coli* AP401. La région de 135 résidus choisie correspond à une portion protéique relativement divergente entre MMEL2 et l'EPN ainsi qu'entre MMEL2 et MMEL1. Ceci optimise la production d'anticorps spécifiques à MMEL2. La production de l'antigène a été induite par l'ajout d'IPTG aux cultures bactériennes en phase exponentielle de croissance. En effet, nous pouvons noter l'apparition de deux bandes de plus forte intensité après l'induction à l'IPTG (Figure 1, puits 1 et 2). Ces deux bandes peuvent correspondre à deux formes différentes de la protéine pouvant provenir d'une dégradation de l'antigène. La protéine recombinante est bien extraite des bactéries suite à la lyse de celles-ci (puits 3). L'antigène a ensuite été purifié par liaison d'affinité sur des billes de sépharose couplées à la glutathione. La figure 1 montre qu'une forte proportion de la protéine recombinante se fixe aux billes (puits 5) alors qu'une faible quantité ne peut être retenue (puits 4). L'antigène est par la suite élué des billes par clivage à la thrombine de la protéine recombinante. Le puits 6 nous indique que l'antigène est bien clivé et élué des billes, la protéine restante (≈ 30 kDa) correspondant à la GST. Les puits 7 et 8 montrent la récupération de l'antigène, qui se présente sous forme de doublet. L'antigène MMEL2 purifié a été injecté à des lapins afin qu'ils produisent des anticorps. Les anticorps récoltés ont ensuite été testés pour leur spécificité face à l'antigène purifié (voir section 3.4.3).

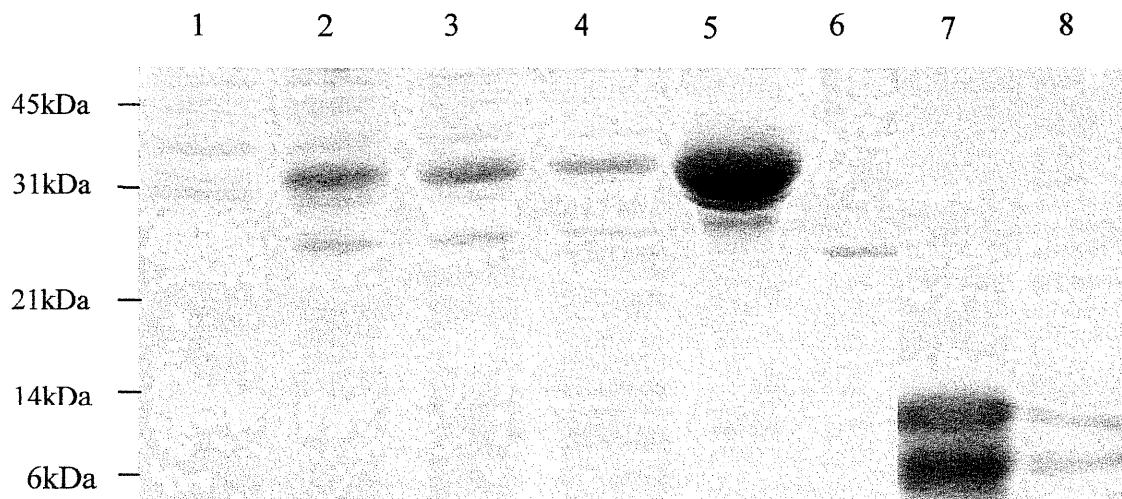


Figure 1 : Production et purification de l'antigène MMEL2 chez *E.coli* AP401. 1) Avant induction à l'IPTG 2) Après deux heures et demi d'induction à l'IPTG 3) Extrait du surnageant après sonication des bactéries 4) Protéines non retenues sur les billes 5) Protéines sur les billes avant le clivage à la thrombine 6) Protéines résiduelles sur les billes après le clivage à la thrombine 7) Solution de thrombine 8) Lavage.

3.4.2) Expression de MMEL2 par transfection cellulaire

Afin de déterminer la localisation de MMEL2, des cellules HEK ont été transfectées de façon transitoire et induites au butyrate de sodium pendant 24 heures. Afin de vérifier si la protéine MMEL2 se retrouve dans les cellules ou sous forme sécrétée, les protéines cellulaires et du milieu de culture ont été recueillies et traitées comme décrit dans le Matériel et Méthodes. Les protéines furent séparées sur gel SDS-PAGE et transférées sur nitrocellulose. La protéine MMEL2 a été détectée spécifiquement à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin. La figure 2 montre que l'enzyme est présente dans l'extrait cellulaire (puits 2), mais est absente du milieu de culture (puits 6). Il est à noter que la protéine MMEL2 ne se retrouve pas dans les extraits de cellules transfectées avec le vecteur d'expression non recombinant pCDNA3-RSV (puits 1). La protéine MMEL2 produite possède une masse moléculaire apparente de 110 kDa.

Les protéines cellulaires ont également été traitées à l'endoglycosidase H et à la PNGase F afin de vérifier leur état de glycosylation. L'endoglycosidase H clive les chaînes latérales oligosaccharidiques N-liées riches en mannose sur les protéines qui se retrouvent dans le réticulum endoplasmique rugueux mais qui n'ont pas franchi l'appareil de Golgi. Ainsi, une résistance du clivage à l'endo H peut indiquer que la protéine ne se retrouve plus dans le RER et qu'elle a franchi l'appareil de Golgi. Par ailleurs, la PNGase F agit plutôt en retranchant les résidus riches en mannose ainsi que la plupart des oligosaccharides complexes N-liés ajoutés dans l'appareil de Golgi. MMEL2 provenant des extraits cellulaires est sensible à la digestion par la PNGase F (puits 4). De plus, MMEL2 est toujours sensible au traitement à l'endo H (puits 3) démontrant que la protéine contient les

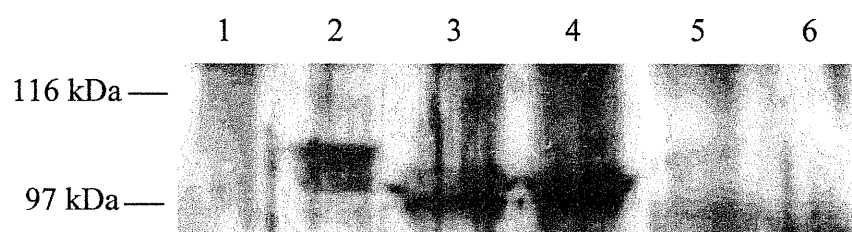


Figure 2: Expression de MMEL2 dans les cellules HEK-293T transfectées. 1) Extraits de cellules transfectées avec pCDNA3-RSV 2, 3, 4) Extraits de cellules transfectées avec pCDNA3-RSV-MMEL2 2) non-traitées 3) traitées à l'endo H 4) traitées à la PNGase F 5) Surnageant de cellules transfectées avec pCDNA3-RSV 6) Surnageant de cellules transfectées avec pCDNA3-RSV-MMEL2.

résidus riches en mannose ajoutés dans le RER, et qu'elle n'a donc pas passé l'appareil de Golgi. Ces résultats proposent que MMEL2 soit une protéine hautement glycosylée qui se localise de façon intracellulaire. La protéine MMEL2 détectée dans les extraits cellulaires n'aurait donc pas franchi l'appareil de Golgi et se situerait probablement au niveau du réticulum endoplasmique rugueux. Ceci est à l'encontre de la présence d'un site de clivage de type furine situé en C-terminal du domaine transmembranaire qui nous laissait suggérer l'hypothèse que la protéine MMEL2 pouvait se retrouver sous forme soluble comme c'est le cas pour MMEL1. Par contre, la présence d'une proline en position P2' du site de clivage pourrait empêcher le clivage de la protéine qui serait donc retenue non pas à la surface cellulaire mais au niveau du RER (Lazure et al., 1998).

Ces dernières études *in vitro* nous donnent de bons indices quant à la localisation subcellulaire *in vivo* potentielle de MMEL2. Nous devons cependant déterminer si la protéine MMEL2 endogène se localise bel et bien au niveau du RER de cellules humaines exprimant la protéine. La détection de MMEL2 dans des extraits protéiques de testicules humains permettrait de confirmer ou d'infirmer la localisation subcellulaire observée *in vitro*. Le testicule constitue un tissu de choix puisque le transcrite de MMEL2 y est très abondant (voir chapitre 2). La visualisation de la protéine endogène permettrait également de déterminer si la localisation observée est due à une erreur dans la séquence de l'ADNc. La machinerie de contrôle de la qualité située dans le RER pourrait dans un tel cas, la séquestrer interférant ainsi avec le transport de la protéine. Par contre, une séquence partielle provenant du projet du génome humain est actuellement disponible sur GenBank et s'avère à 100 % identique à l'ADNc de MMEL2.

D'autre part, la localisation de la protéine MMEL2 pourrait être modulée par des facteurs exogènes comme c'est le cas pour le récepteur CRL (*calcitonine-receptor-like receptor*) (McLatchie et al., 1998). Ce dernier est séquestré au niveau du réticulum endoplasmique et son transport vers la membrane plasmique est régulé par la présence des protéines RAMPs. Tout comme le récepteur CRL, la protéine MMEL2 pourrait être maintenue au niveau du RER dans des conditions de latence, puis être relâchée de façon contrôlée suite à certaines situations physiologiques précises. Ces conditions pourraient, par exemple, favoriser la production d'un cofacteur essentiel au transport de la protéine vers l'appareil de Golgi et la surface cellulaire. Il serait donc intéressant de vérifier l'expression de la protéine suite à certaines conditions de stress comme des changements de température. L'expression de la protéine dans différents types cellulaires pourrait également permettre de vérifier si les cofacteurs présents dans ces souches cellulaires, et probablement absents des cellules HEK293T, sont suffisants pour libérer la protéine du réticulum endoplasmique.

3.4.3) Spécificité des anticorps polyclonaux de lapin

La spécificité de l'anticorps face aux autres membres de la famille a été déterminée par immunobuvardage de type Western. La figure 3 montre que l'anticorps de lapin dirigé contre la protéine MMEL2 reconnaît non seulement MMEL2 (puits 1) mais également l'EPN soluble (puits 2) et MMEL1 (puits 3), les deux protéines les plus semblables de MMEL2. Par contre, il ne détecte pas ECE-1, PHEX, ECEL1 et la protéine Staufen humaine (Wickham et al., 1999). Malgré les précautions prises, l'anticorps polyclonal dirigé contre MMEL2 n'est donc pas spécifique à notre protéine puisqu'il détecte

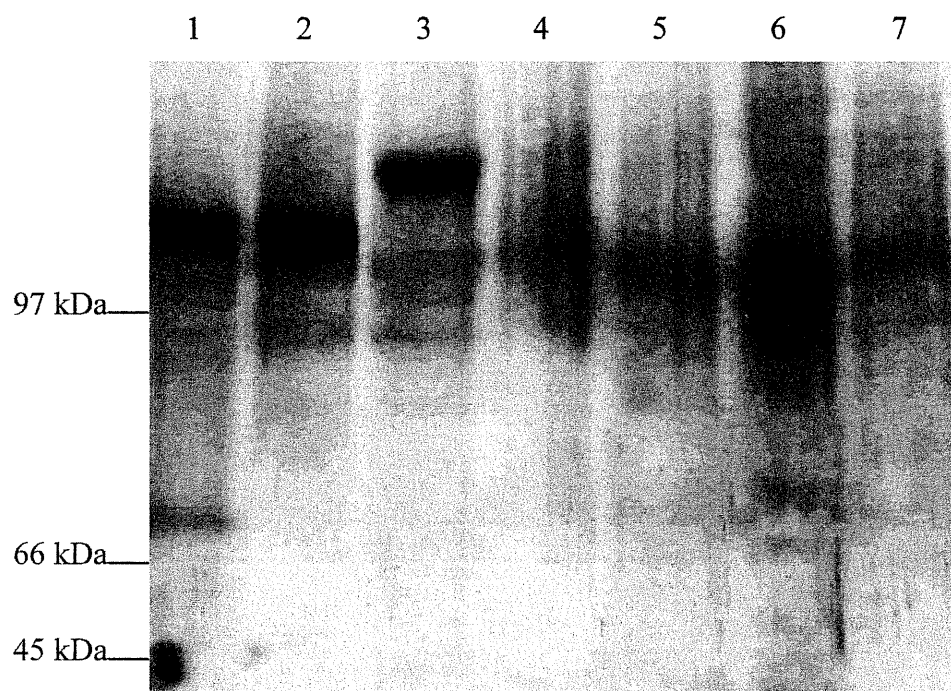


Figure 3: Spécificité des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre MMEL2. 1) MMEL2 membranaire 2) EPN soluble 3) MMEL1 sécrétée 4) PHEX 5) ECE 6) ECEL1 7) Staufén 1.

également d'autres membres de la famille de l'EPN. De ce fait, l'anticorps polyclonal de lapin dirigé contre MMEL2 doit être utilisé avec soin dans certaines expériences.

3.4.4) Production d'anticorps monoclonaux

Les anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre MMEL2 détectent bien la protéine mais ne peuvent discriminer efficacement des autres membres de la famille. Afin d'augmenter la spécificité de détection, des souris BALB/c ont été immunisées avec l'antigène MMEL2 dans le but de produire des anticorps monoclonaux. La même séquence protéique que celle utilisée dans le développement des anticorps polyclonaux a été choisie pour élaborer les anticorps monoclonaux. Sur les 2640 clones obtenus, les surnageants de culture de 818 hybridomes ont été testés par analyse ELISA, puis par immunobuvardage de type Western. Deux clones jugés positifs par ces deux techniques ont été amenés en dilution limite. Un de ces clones a ensuite pu être déclaré monoclonal. La production de liquide d'ascite à partir de souris immunisées avec l'hybridome monoclonal, nous permettra d'avoir assez de matériel pour vérifier la spécificité de l'anticorps vis-à-vis des autres membres de la famille. Si cet anticorps s'avère spécifique, nous pourrions par exemple, l'utiliser afin de détecter la présence de la protéine dans certains tissus humains.

L'article présenté dans le chapitre précédent rapporte l'identification d'un nouveau membre de la famille de l'EPN soit l'enzyme MMEL2. Les analyses comparatives de séquence suggéraient alors que la protéine MMEL2 puisse se retrouver sous forme soluble tout comme MMEL1. Cette forme soluble serait produite à cause de la présence d'un site potentiel de clivage à la furine dans son ectodomaine. Par contre, les expériences *in vitro*

d'expression présentées dans le chapitre 3 suggèrent plutôt une localisation intracellulaire de la protéine MMEL2. Les facteurs cellulaires impliqués dans cette localisation demeurent cependant encore obscurs. La détermination de la localisation de la protéine MMEL2 endogène s'avère donc importante.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

CHAPITRE 4 - DISCUSSION

4.1) Découverte d'un nouveau membre de la famille de l'EPN: MMEL2

La famille de l'EPN composée de sept membres est impliquée dans une grande variété de phénomènes physiologiques allant de la perception de la douleur à la minéralisation (revue par : Turner et al., 2001). Au cours des dernières années, de plus en plus d'agents pharmacologiques ont ainsi été créés afin de moduler l'action de ces enzymes. L'identification récente de certains membres de la famille suggère la présence de nouvelles peptidases encore non-identifiées. Ces dernières pourraient interagir avec les produits pharmacologiques et ainsi mettre en doute la spécificité de ces agents. Le séquençage du génome de *Drosophila melanogaster* et de *Caenorhabditis elegans* permet d'identifier la présence d'une vingtaine de gènes de type MME-like. Ceci nous ouvre une piste intéressante pour la découverte de nouvelles peptidases de la famille de l'EPN dans divers organismes vivants. Actuellement, près de 90% du séquençage du génome humain est achevé. Il est à noter qu'aucune nouvelle métallopeptidase contenant le motif consensus de la famille de l'EPN n'a pu clairement être identifiée jusqu'à maintenant.

Ce mémoire relate le clonage d'un nouveau membre de la famille de l'EPN, la protéine MMEL2. L'ADNc de MMEL2 a été cloné d'une banque d'ADNc de cerveau humain par homologie de séquence avec la protéine de souris MMEL1. MMEL2 est une protéine de 770 acides aminés hautement identique à MMEL1. Il s'agit d'une protéine de type II contenant toutes les caractéristiques structurales de la famille de l'EPN. Par ailleurs, elle

possède un site potentiel de clivage à la furine qui suggère la formation d'une forme sécrétée de l'enzyme comme c'est le cas pour MMEL1. Par contre, les analyses *in vitro* d'expression dans des cellules transfectées indiquent plutôt une localisation intracellulaire de MMEL2 au niveau du RER. Tout comme MMEL1, le transcrit de MMEL2 est fortement exprimé dans le testicule. On en retrouve également, mais à des niveaux moindres, dans le cerveau, le rein et le cœur. Le gène *MMEL2* se retrouve sur le chromosome 1 au locus p36, une région partiellement séquencée par le projet du génome humain. Ce locus est également associé à la neuropathie 2A sensorielle moteur héréditaire, au syndrome de Schwartz-Jampel-Aberfeld et à des neuroblastomes, toutes des maladies affectant le système nerveux central.

4.2) Expression de MMEL2 par transfection cellulaire

Les enzymes de la famille de l'EPN sont, pour la plupart, des protéines transmembranaires de type II. Ces protéines agissent à la surface cellulaire, leur ectodomaine se situant à l'extérieur de la cellule. Il existe cependant certaines exceptions. En effet, la protéine de souris MMEL1 est sécrétée à l'extérieur des cellules et n'est donc pas rattachée à la membrane. Cette protéine contient un site de clivage à la furine qui permet donc de produire une forme soluble de MMEL1 (Ikeda et al., 1999; Ghaddar et al., 2000). De plus, un isoforme humain de la protéine ECE-1, ECE-1b, se retrouve à l'intérieur des cellules transfectées et colocalise avec un marqueur du réseau *trans*-Golgien (Schweizer et al., 1997). D'autre part, la protéine ECEL1 se retrouve principalement au niveau du RER de cellules en culture transfectées (Valdenaire and Schweizer, 2000; A. Benoit, M.A. Vargas, L. DesGroseillers, G. Boileau en préparation) et de cellules hypophysaires (A. Benoit, M.A.

Vargas, L. DesGroseillers, G. Boileau en préparation). Une faible proportion des protéines a également été détectée à la membrane plasmique dans les cellules transfectées et les cellules hypophysaires (A. Benoit, M.A. Vargas, L. DesGroseillers, G. Boileau en préparation). Aucun mécanisme connu de rétention au réticulum endoplasmique ne peut expliquer cette rétention. Notre groupe a observé une différence de position au niveau des deux premières cystéines de l'ectodomaine d'ECEL1. Ceci pourrait ralentir le repliement de la protéine qui serait alors retenue dans le réticulum endoplasmique. Cette hypothèse sera donc vérifiée. La protéine MMEL2, quant à elle, contient tous les résidus importants pour l'activité et le repliement des enzymes de la famille de l'EPN. Malgré la présence d'un site potentiel de clivage à la furine, MMEL2 se localise au niveau du réticulum endoplasmique rugueux tout comme ECEL1. Le mécanisme de rétention dans le réticulum demeure encore indéterminé.

Dans la séquence de MMEL2 nous pouvons dénoter deux cystéines additionnelles qui sont absentes de la protéine MMEL1. Il serait intéressant de muter ces résidus afin de vérifier s'ils ont un rôle à jouer dans la localisation intracellulaire de MMEL2. Nous pourrions également identifier le(s) motif(s) responsable(s) de cette localisation en effectuant tout d'abord, des chimères MMEL1-MMEL2. Ceci nous donnerait une idée des domaines responsables de la localisation intracellulaire. Des mutations ponctuelles permettraient, par la suite, d'identifier spécifiquement les résidus impliqués dans la rétention de la protéine. Des expériences de biotinylation de surface pourraient également être mises sur pied afin d'identifier la présence de traces de MMEL2 au niveau de la membrane cytoplasmique. La détection de la protéine endogène dans des extraits protéiques de testicules humaines ou sur des coupes de tissus nous informerait également de la localisation, mais cette fois *in vivo*,

de MMEL2. Des tests de glycosylation endoH et PNGase F sur les extraits protéiques de tissus humains permettraient de suivre l'état de maturation de la protéine.

Une autre hypothèse serait que MMEL2 soit relâchée du réticulum suite à certains éléments déclencheurs tels que des stress ou la présence de cofacteurs essentiels au transport de la protéine. La transfection du gène *MMEL2* dans d'autres souches cellulaires qui pourraient exprimer des cofacteurs différents, permettrait donc d'identifier certaines conditions favorables au transport de la protéine. L'identification subséquente des cofacteurs facilitant la sortie de la protéine du RER permettra de tracer le mécanisme de contrôle de la relâche de l'enzyme.

4.3) Activité enzymatique de MMEL2

Jusqu'à maintenant, l'activité enzymatique de MMEL2 n'est pas connue. Une des prochaines étapes de caractérisation de la protéine consiste donc à identifier des substrats clivés par l'enzyme. L'identification de ces substrats nous informera des rôles physiologiques potentiels de MMEL2. Comme la protéine MMEL2 est membranaire et probablement intracellulaire, la formation d'une chimère MMEL1-MMEL2 permettrait de faciliter les analyses enzymatiques. En effet, on pourrait substituer la partie N-terminale de MMEL2 par la région de MMEL1 contenant le domaine cytosolique, la région transmembranaire et le site de clivage à la furine. La protéine MMEL2 se retrouverait donc sécrétée et serait ainsi plus facile à purifier. Une autre alternative pour produire une protéine soluble serait de fusionner un peptide signal à l'ectodomaine de MMEL2, comme lors de la production de l'EPN soluble (Lemay et al., 1990). La protéine purifiée pourrait

alors être utilisée dans des essais enzymatiques en utilisant des peptides clivés par les protéines de la famille de l'EPN. D'autres substrats que l'on retrouve spécifiquement dans les tissus exprimant MMEL2 pourront également être testés. De plus, ces analyses de substrats permettront de s'assurer de l'activité de la protéine et donc du bon repliement de cette dernière. De plus, il sera intéressant de vérifier si les inhibiteurs de l'EPN et des autres membres de la famille peuvent également inhiber MMEL2. Ceci permettra de confirmer la spécificité des inhibiteurs connus.

4.4) MMEL2 est-elle l'homologue de MMEL1?

La protéine MMEL2 possède beaucoup de caractéristiques communes avec l'enzyme de souris MMEL1. Jusqu'à maintenant, il est cependant difficile de se prononcer sur l'homologie entre ces deux protéines. D'une part, la protéine MMEL2 n'est qu'à 77,5 % identique à la forme souris MMEL1. Bien que ce pourcentage d'identité semble élevé entre les deux espèces, il n'est pas suffisant pour conclure qu'il s'agit de la même protéine. En effet, les protéines de la famille de la métallo-endopeptidase de membrane possèdent généralement plus de 90 % d'identité de séquence pour une même protéine chez deux espèces différentes (Chen et al., 1992). Pour d'autres familles telles que l'aldolase (Marsh and Lebherz, 1992; Mutoh and Hayashi, 1994), un pourcentage aussi élevé aurait cependant été suffisant pour conclure qu'il s'agit effectivement de la même protéine.

D'autre part, nous avons démontré que le gène *MMEL2* se situe au niveau du locus chromosomique 1p36. Il est intéressant de noter que le gène *MMEL1* se localise sur le chromosome 4 de souris, soit le paralogue du locus 1p36 humain (M. Carpentier, G.

Boileau, L. DesGroseillers en préparation). Cette équivalence de localisation chromosomique peut indiquer qu'il s'agit du même gène. Cependant, on peut également penser qu'il s'est produit une duplication d'un de ces gènes provoquant une localisation très rapprochée des deux gènes. C'est le cas par exemple d'ECE-1 qui se retrouve au niveau du locus 1p36, tout comme MMEL2 (Valdenaire et al., 1995). Ces dernières protéines auraient donc divergé tardivement dans l'évolution.

La localisation cellulaire des protéines MMEL1 et MMEL2 nous fait également douter de l'homologie entre ces deux protéines. En effet, la protéine MMEL2 se retrouve à l'intérieur des cellules transfectées, plus précisément dans le RER alors que MMEL1 est présente dans le milieu de culture et agit sous forme soluble. Pourtant, MMEL2 possède, tout comme MMEL1, un site potentiel de clivage à la furine situé immédiatement après le domaine transmembranaire. Le site de clivage de MMEL2 est probablement moins idéal que celui de MMEL1 et donc moins bien reconnu par les enzymes de la famille des prohormones convertases, d'où sa différence de localisation cellulaire. Le site consensus de clivage à la furine consiste en la séquence R-Xaa-R/K-R (P4-P1) (Hosaka et al., 1991; Watanabe et al., 1993; Takahashi et al., 1994). De plus, la séquence doit contenir un acide aminé basique sur deux des sites P2, P4, P6 (Molloy et al., 1992; Jean et al., 1995). Dans le cas de MMEL2, la séquence potentielle de clivage correspond à celle du site consensus. L'analyse de substrats clivés par la furine a permis de constater que le site P1' est souvent, mais pas toujours, occupé par une sérine (Denault and Leduc, 1996). De plus, le site doit contenir un acide aminé hydrophobe aliphatique en position P2'. Des mutations de type K pour V en position P2' de certains substrats inhibent le clivage par la furine (Lazure et al., 1998). Par conséquent, la présence d'une proline, un acide aminé cyclique et plus rigide, en position

P2' du site de clivage chez MMEL2 peut influencer la capacité de clivage de l'enzyme par la furine. Il est à noter également que certains substrats mutés et non reconnus par la furine peuvent être clivés par d'autres prohormones convertases (Lazure et al., 1998). Ainsi, si ces dernières convertases ne sont pas présentes dans la souche cellulaire utilisée, nous ne pourrions détecter une forme sécrétée de la protéine MMEL2.

Le séquençage du génome humain et murin nous permettra également de vérifier si MMEL1 est l'homologue souris de MMEL2. En effet, si aucun autre membre de la famille de l'EPN n'est découvert, cela ajoutera une preuve que les protéines MMEL1 et MMEL2 sont homologues. On doit cependant garder à l'esprit la possibilité de l'élimination de certaines peptidases au cours de l'évolution. Les résultats du séquençage du génome humain pourront également démontrer l'existence d'autres membres de la famille de l'EPN. Un clone partiel identique à 100% à MMEL2 et situé sur le chromosome 1 humain est actuellement disponible sur GenBank. Cette séquence correspond à la partie 3' non-traduite de MMEL2 et à l'extrémité C-terminale de la protéine. Elle contient des introns dont la position est identique à celle de l'EPN (D'Adamio et al., 1989) et de MMEL1 (M. Carpentier, G. Boileau, L. DesGroseillers en préparation).

4.5) Fonction physiologique de MMEL2

Afin de déterminer la fonction physiologique de MMEL2, nous devons identifier les tissus dans lesquels la protéine est présente. Les études de buvardage de type Northern de même que les analyses de RT-PCR ont montré que l'ARNm de MMEL2 est très fortement exprimé dans les testicules. On détecte également le transcrit, mais à un plus faible niveau

d'expression, dans trois autres tissus soit le rein, le cœur et le cerveau. Tel que mentionné précédemment, la protéine de MMEL2 n'a cependant pas encore été recherchée dans les tissus. Les études de localisation que nous avons effectuées devront donc être complétées par des immunobuvardages de type Western afin de détecter la protéine dans les tissus humains. Pour ce faire, nous devons cependant nous assurer de posséder un anticorps spécifique à la protéine MMEL2. Les résultats obtenus permettront de diriger les analyses subséquentes d'activité enzymatique et de fonction physiologique pour la protéine MMEL2. En effet, l'identification d'un substrat co-localisant avec la protéine MMEL2 pourra suggérer une implication de la peptidase dans le mécanisme cellulaire et physiologique engendré par le substrat. De plus, la comparaison entre l'expression du transcrit et de la protéine indiquera à quel niveau s'effectue le contrôle de la production de la protéine MMEL2.

MMEL1 se retrouve également en grande partie au niveau du testicule de souris adultes, plus précisément dans les spermatides ronds et allongés (Ghaddar et al., 2000). Bien que le rôle physiologique de MMEL1 soit encore inconnu, les études de localisation tissulaire et d'activité enzymatique suggèrent qu'elle puisse réguler la spermatogenèse. Une autre hypothèse propose que MMEL1 s'accumule dans l'acrosome des spermatozoïdes dans lequel on retrouve également de la pro-enképhaline (Kilpatrick and Millette, 1986; Kew et al., 1990). MMEL1 pourrait être relâchée de l'acrosome lors de la réaction acrosomale durant le processus de fécondation en même temps que la pro-enképhaline (Kew et al., 1990). Il serait intéressant d'identifier les endroits spécifiques d'expression de MMEL2 dans les testicules humains par hybridation *in situ* et de les comparer avec ceux de MMEL1. Il faudrait également vérifier si l'apparition de MMEL2 coïncide avec un stade

précis de développement chez l'homme, comme par exemple à la puberté. La régulation de l'expression de la protéine MMEL2 pourrait aussi s'effectuer durant le développement du spermatozoïde. Tous ces résultats, permettront de juger l'implication de MMEL2 dans la spermatogenèse, la capacitation des spermatozoïdes, ou la fécondation.

Récemment, une activité EPN ou MME-like a été détectée dans la maladie d'Alzheimer (Iwata et al., 2000). Elle aurait pour effet de dégrader le peptide amyloïde- β dont l'accumulation est responsable des plaques que l'on retrouve dans le cerveau des patients atteints de la maladie. Comme le transcrit de MMEL2 a pu être détecté dans le cerveau humain, cette protéine peut représenter un candidat important pour la dégradation du peptide amyloïde- β . Des analyses d'activité enzymatique permettront de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. De plus, la localisation précise de la protéine MMEL2 dans les cerveaux humains normaux et atteints, ainsi que les différences d'expression dans ces deux cas pourraient apporter des indices sur l'implication de la protéine dans la maladie.

La localisation chromosomique du gène *MMEL2* permet d'identifier des maladies connues associées au locus de MMEL2. Pour ce qui est du locus 1p36, nous avons identifié quelques maladies qui sont reliées au système nerveux central et dans lesquelles MMEL2 pourrait jouer un rôle majeur (voir chapitre 2). L'investigation de l'implication de MMEL2 dans ces maladies pourrait donc être envisagée.

Une des façons d'éclaircir le rôle d'une protéine est de produire des lignées d'organismes déficients pour le gène d'intérêt. Si MMEL1 s'avère l'homologue souris de MMEL2, nous pourrions créer des souris déficientes en MMEL1 et vérifier l'impact physiologique de cette

délétion. Si aucun changement physiologique n'est décelé, nous pourrions alors conclure à une redondance de fonction par exemple avec l'EPN. Des doubles mutants dans lesquels ni MMEL1, ni l'EPN ne sont exprimées permettraient alors de donner de bons indices sur les implications physiologiques de l'enzyme.

4.6) Conclusion

L'identification d'un nouveau membre de la famille de l'EPN amène évidemment beaucoup de nouvelles pistes d'investigation et de remises en question. En effet, la caractérisation biochimique et physiologique de l'enzyme MMEL2 constitue les prochaines étapes découlant de l'identification d'un nouveau gène. Ceci procurera des informations très pertinentes sur cette peptidase et sur les voies de signalisation qu'elle régule. Il sera intéressant de vérifier la co-localisation de MMEL2 avec d'autres métallo-endopeptidases de membrane. Les résultats du séquençage du génome humain pourront démontrer s'il existe vraiment d'autres membres encore inconnus de la famille. L'analyse actuelle des séquences humaines disponibles ne permet cependant pas de détecter d'autres membres de la famille de l'EPN. Nous devons donc attendre la publication de l'intégralité de la séquence des divers chromosomes humains pour en avoir le cœur net.

Du point de vue pharmacologique, l'identification d'une nouvelle protéine peut entraîner des conséquences importantes. Plusieurs produits pharmacologiques ont été mis sur pied au cours des dernières années afin de réguler l'action des peptidases de la famille de l'EPN. Les inhibiteurs pharmacologiques jugés spécifiques à certains membres de la famille et utilisés actuellement en clinique et dans les laboratoires de recherche pourraient également

affecter MMEL2. Ceci aurait donc pour effet d'ébranler les théories découlant de l'utilisation de ces agents et permettrait peut-être de comprendre certains effets secondaires découlant de l'utilisation de ces produits pharmacologiques dits spécifiques. De plus, il sera très stimulant et enrichissant de comprendre le rôle physiologique de MMEL2 et son implication dans certaines maladies. Toutes ces informations permettront d'approfondir nos connaissances sur la famille de l'endopeptidase neutre et sur l'importance physiologique de cette famille dans les divers organismes vivants.

BIBLIOGRAPHIE

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. (1994) *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, Inc. New York.
- Almenoff, J., Teirstein, A.S., Thornton, J.C. and Orłowski, M. (1984) Identification of a thermolysin-like metalloendopeptidase in serum: activity in normal subjects and in patients with sarcoidosis. *J Lab Clin Med* **103**, 420-31.
- Appelboom, T., de Maertelaer, V., de Prez, E., Hauzeur, J.P. and Deschodt-Lanckman, M. (1991) Enkephalinase: a physiologic neuroimmunomodulator detected in the synovial fluid. *Arthritis Rheum* **34**, 1048-51.
- Azarani, A., Boileau, G. and Crine, P. (1998) Recombinant human endothelin-converting enzyme ECE-1b is located in an intracellular compartment when expressed in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Biochem J* **333**, 439-48.
- Back, S.A. and Gorenstein, C. (1989) Fluorescent histochemical localization of neutral endopeptidase-24.11 (enkephalinase) in the rat spinal cord. *J Comp Neurol* **280**, 436-50.
- Barnes, K., Kenny, A.J. and Turner, A.J. (1994) Localization of aminopeptidase N and dipeptidyl peptidase IV in pig striatum and in neuronal and glial cell cultures. *Eur J Neurosci* **6**, 531-7.
- Barnes, K., Turner, A.J. and Kenny, A.J. (1993) Co-localisation of substance P and endopeptidase-24.11 in pig substantia nigra: an ultrastructural study. *Biochem Soc Trans* **21**, 246S.

- Barrett, A.J. and Rawlings, N.D. (1991) Types and families of endopeptidases. *Biochem Soc Trans* **19**, 707-15.
- Bateman, R.C., Jr., Jackson, D., Slaughter, C.A., Unnithan, S., Chai, Y.G., Moomaw, C. and Hersh, L.B. (1989) Identification of the active-site arginine in rat neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) as arginine 102 and analysis of a glutamine 102 mutant. *J Biol Chem* **264**, 6151-7.
- Bateman, R.C., Jr., Kim, Y.A., Slaughter, C. and Hersh, L.B. (1990) N-bromoacetyl-D-leucylglycine. An affinity label for neutral endopeptidase 24.11. *J Biol Chem* **265**, 8365-8.
- Beaumont, A., Brouet, J.C. and Roques, B.P. (1989) Neutral endopeptidase 24.11 and angiotensin converting enzyme like activity in CALLA positive and CALLA negative lymphoid cells. *Biochem Biophys Res Commun* **160**, 1323-9.
- Beaumont, A., Le Moual, H., Boileau, G., Crine, P. and 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**, 214-20.
- Beck, L., Soumounou, Y., Martel, J., Krishnamurthy, G., Gauthier, C., Goodyer, C.G. and Tenenhouse, H.S. (1997) Pex/PEX tissue distribution and evidence for a deletion in the 3' region of the Pex gene in X-linked hypophosphatemic mice. *J Clin Invest* **99**, 1200-9.
- Bode, W., Gomis-Ruth, F.X. and Stockler, W. (1993) Astacins, serralyins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett* **331**, 134-40.

- Booth, A.G. and Kenny, A.J. (1980) Proteins of the kidney microvillar membrane. Asymmetric labelling of the membrane by lactoperoxidase-catalysed radioiodination and by photolysis of 3,5-di[125I]iodo-4-azidobenzenesulphonate. *Biochem J* **187**, 31-44.
- Borson, D.B. (1991) Roles of neutral endopeptidase in airways. *Am J Physiol* **260**, L212-25.
- Borson, D.B., Brokaw, J.J., Sekizawa, K., McDonald, D.M. and Nadel, J.A. (1989) Neutral endopeptidase and neurogenic inflammation in rats with respiratory infections. *J Appl Physiol* **66**, 2653-8.
- Brown, C.R., Hong-Brown, L.Q., Biwersi, J., Verkman, A.S. and Welch, W.J. (1996) Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress Chaperones* **1**, 117-25.
- Bunnett, N.W., Debas, H.T., Turner, A.J., Kobayashi, R. and Walsh, J.H. (1988a) Metabolism of gastrin and cholecystokinin by endopeptidase 24.11 from the pig stomach. *Am J Physiol* **255**, G676-84.
- Bunnett, N.W., Orloff, M.S. and Turner, A.J. (1985) Catabolism of substance P in the stomach wall of the rat. *Life Sci* **37**, 599-606.
- Bunnett, N.W., Turner, A.J., Hryszko, J., Kobayashi, R. and Walsh, J.H. (1988b) Isolation of endopeptidase-24.11 (EC 3.4.24.11, "enkephalinase") from the pig stomach. Hydrolysis of substance P, gastrin-releasing peptide 10, [Leu5] enkephalin, and [Met5] enkephalin. *Gastroenterology* **95**, 952-7.
- Burns, D.M., Walker, B., Gray, J. and Nelson, J. (1999) Breast cancer cell-associated endopeptidase EC 24.11 modulates proliferative response to bombesin. *Br J Cancer* **79**, 214-20.

- Carretero, O.A. and Scicli, A.G. (1991) Local hormonal factors (intracrine, autocrine, and paracrine) in hypertension. *Hypertension* **18**, 158-69.
- Catasus, L., Villegas, V., Pascual, R., Aviles, F.X., Wicker-Planquart, C. and Puigserver, A. (1992) cDNA cloning and sequence analysis of human pancreatic procarboxypeptidase A1. *Biochem J* **287**, 299-303.
- Caveney, S. (1985) The role of gap junctions in development. *Annu Rev Physiol* **47**, 319-35.
- Chen, C. and Okayama, H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* **7**, 2745-52.
- Chen, C.Y., Salles, G., Seldin, M.F., Kister, A.E., Reinherz, E.L. and Shipp, M.A. (1992) Murine common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10 neutral endopeptidase 24.11). Molecular characterization, chromosomal localization, and modeling of the active site. *J Immunol* **148**, 2817-25.
- Chretien, M. and Seidah, N.G. (1981) Chemistry and biosynthesis of pro-opiomelanocortin. ACTH, MSH's, endorphins and their related peptides. *Mol Cell Biochem* **34**, 101-27.
- Cohen, A.J., Bunn, P.A., Franklin, W., Magill-Solc, C., Hartmann, C., Helfrich, B., Gilman, L., Folkvord, J., Helm, K. and Miller, Y.E. (1996) Neutral endopeptidase: variable expression in human lung, inactivation in lung cancer, and modulation of peptide-induced calcium flux. *Cancer Res* **56**, 831-9.
- Colman, P.M., Jansonius, J.N. and Matthews, B.W. (1972) The structure of thermolysin: an electron density map at 2-3 Å resolution. *J Mol Biol* **70**, 701-24.
- Connelly, J.C., Skidgel, R.A., Schulz, W.W., Johnson, A.R. and Erdos, E.G. (1985) Neutral endopeptidase 24.11 in human neutrophils: cleavage of chemotactic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 8737-41.

- Coupar, I.M. (1987) Opioid action of the intestine: the importance of the intestinal mucosa. *Life Sci* **41**, 917-25.
- Crine, P., Dion, N. and Boileau, G. (1997) Endopeptidase-24.11. *Cell-surface peptidases in health and disease* (Kenny, A.J. and Boustead, C.M., eds) BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK.
- D'Adamio, L., Shipp, M.A., Masteller, E.L. and Reinherz, E.L. (1989) Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple minixons and separate 5' untranslated regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7103-7.
- Dale, G.E., D'Arcy, B., Yuvaniyama, C., Wipf, B., Oefner, C. and D'Arcy, A. (2000) Purification and crystallization of the extracellular domain of human neutral endopeptidase (neprilysin) expressed in *Pichia pastoris*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**, 894-7.
- de la Baume, S., Yi, C.C., Schwartz, J.C., Chaillet, P., Marcais-Collado, H. and Costentin, J. (1983) Participation of both 'enkephalinase' and aminopeptidase activities in the metabolism of endogenous enkephalins. *Neuroscience* **8**, 143-51.
- Denault, J.B. and Leduc, R. (1996) Furin/PACE/SPC1: a convertase involved in exocytic and endocytic processing of precursor proteins. *FEBS Lett* **379**, 113-6.
- Denning, G.M., Anderson, M.P., Amara, J.F., Marshall, J., Smith, A.E. and Welsh, M.J. (1992) Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* **358**, 761-4.
- Deschodt-Lanckman, M., Michaux, F., De Prez, E., Abramowicz, D., Vanherweghem, J.L. and Goldman, M. (1989) Increased serum levels of endopeptidase 24.11 ('enkephalinase') in patients with end-stage renal failure. *Life Sci* **45**, 133-41.

- Devault, A., Lazure, C., Nault, C., Le Moual, H., Seidah, N.G., Chretien, M., Kahn, P., Powell, J., Mallet, J., Beaumont, A. and *et al.* (1987) Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) deduced from a complementary DNA. *Embo J* **6**, 1317-22.
- Devault, A., Nault, C., Zollinger, M., Fournie-Zaluski, M.C., Roques, B.P., Crine, P. and Boileau, G. (1988a) Expression of neutral endopeptidase (enkephalinase) in heterologous COS- 1 cells. Characterization of the recombinant enzyme and evidence for a glutamic acid residue at the active site. *J Biol Chem* **263**, 4033-40.
- Devault, A., Sales, V., Nault, C., Beaumont, A., Roques, B., Crine, P. and Boileau, G. (1988b) Exploration of the catalytic site of endopeptidase 24.11 by site- directed mutagenesis. Histidine residues 583 and 587 are essential for catalysis. *FEBS Lett* **231**, 54-8.
- Di Marco, G.S., Quinto, B.M., Juliano, M., Carmona, A.K., Stella, R.C., Plavnik, F.L. and Casarini, D.E. (1998) Purification and characterization of a neutral endopeptidase-like enzyme from human urine. *J Hypertens* **16**, 1971-8.
- Dion, N., Le Moual, H., Crine, P. and Boileau, G. (1993) Kinetic evidence that His-711 of neutral endopeptidase 24.11 is involved in stabilization of the transition state. *FEBS Lett* **318**, 301-4.
- Dion, N., Le Moual, H., Fournie-Zaluski, M.C., Roques, B.P., Crine, P. and 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**, 623-7.
- Du, L., Desbarats, M., Viel, J., Glorieux, F.H., Cawthorn, C. and Ecarot, B. (1996) cDNA cloning of the murine Pex gene implicated in X-linked hypophosphatemia and evidence for expression in bone. *Genomics* **36**, 22-8.

- Eaton, D.L., Malloy, B.E., Tsai, S.P., Henzel, W. and Drayna, D. (1991) Isolation, molecular cloning, and partial characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasma. *J Biol Chem* **266**, 21833-8.
- Econs, M.J. and Francis, F. (1997) Positional cloning of the PEX gene: new insights into the pathophysiology of X-linked hypophosphatemic rickets. *Am J Physiol* **273**, F489-98.
- Econs, M.J., Samsa, G.P., Monger, M., Drezner, M.K. and Feussner, J.R. (1994) X-Linked hypophosphatemic rickets: a disease often unknown to affected patients. *Bone Miner* **24**, 17-24.
- Emoto, N. and Yanagisawa, M. (1995) Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon- sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem* **270**, 15262-8.
- Erdo, E.G. (1990) Some old and some new ideas on kinin metabolism. *J Cardiovasc Pharmacol* **15**, S20-4.
- Evan, G.I. (1984) A simple and rapid solid phase enzyme-linked immunosorbent assay for screening monoclonal antibodies to poorly soluble proteins. *J Immunol Methods* **73**, 427-35.
- Fulcher, I.S., Pappin, D.J. and Kenny, A.J. (1986) The N-terminal amino acid sequence of pig kidney endopeptidase-24.11 shows homology with pro-sucrase-isomaltase. *Biochem J* **240**, 305-8.
- Ganju, R.K., Sunday, M., Tsarvas, D.G., Card, A. and Shipp, M.A. (1994) CD10/NEP in non-small cell lung carcinomas. Relationship to cellular proliferation. *J Clin Invest* **94**, 1784-91.

- Gaudoux, F., Boileau, G. and Crine, P. (1993) Localization of neprilysin (EC 3.4.24.11) mRNA in rat brain by in situ hybridization. *J Neurosci Res* **34**, 426-33.
- Ghaddar, G., Ruchon, A.F., Carpentier, M., Marcinkiewicz, M., Seidah, N.G., Crine, P., Desgroseillers, L. and Boileau, G. (2000) Molecular cloning and biochemical characterization of a new mouse testis soluble-zinc-metallopeptidase of the neprilysin family. *Biochem J* **347**, 419-29.
- Greaves, M.F. (1975) Proceedings: Surface antigens of leukaemic cells. *Br J Cancer* **32**, 280-1.
- Greaves, M.F., Hariri, G., Newman, R.A., Sutherland, D.R., Ritter, M.A. and Ritz, J. (1983) Selective expression of the common acute lymphoblastic leukemia (gp 100) antigen on immature lymphoid cells and their malignant counterparts. *Blood* **61**, 628-39.
- Grieff, M., Mumm, S., Waeltz, P., Mazzarella, R., Whyte, M.P., Thakker, R.V. and Schlessinger, D. (1997) Expression and cloning of the human X-linked hypophosphatemia gene cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* **231**, 635-9.
- Gros, C., Souque, A. and Schwartz, J.C. (1990) Degradation of atrial natriuretic factor in mouse blood in vitro and in vivo: role of enkephalinase (EC 3.4.24.11). *Neuropeptides* **17**, 1-5.
- Gros, C., Souque, A., Schwartz, J.C., Duchier, J., Cournot, A., Baumer, P. and Lecomte, J.M. (1989) Protection of atrial natriuretic factor against degradation: diuretic and natriuretic responses after in vivo inhibition of enkephalinase (EC 3.4.24.11) by acetorphan. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7580-4.

- Guerin, S., Mari, B., Fernandez, E., Belhacene, N., Toribio, M.L. and Auburger, P. (1997) CD10 is expressed on human thymic epithelial cell lines and modulates thymopentin-induced cell proliferation. *Faseb J* **11**, 1003-11.
- Hambrook, J.M., Morgan, B.A., Rance, M.J. and Smith, C.F. (1976) Mode of deactivation of the enkephalins by rat and human plasma and rat brain homogenates. *Nature* **262**, 782-3.
- Hasegawa, H., Hiki, K., Sawamura, T., Aoyama, T., Okamoto, Y., Miwa, S., Shimohama, S., Kimura, J. and Masaki, T. (1998) Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett* **428**, 304-8.
- Hoang, M.V. and Turner, A.J. (1997) Novel activity of endothelin-converting enzyme: hydrolysis of bradykinin. *Biochem J* **327**, 23-6.
- Holmes, M.A. and Matthews, B.W. (1982) Structure of thermolysin refined at 1.6 Å resolution. *J Mol Biol* **160**, 623-39.
- Hooper, N.M. (1994) Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett* **354**, 1-6.
- Hosaka, M., Nagahama, M., Kim, W.S., Watanabe, T., Hatsuzawa, K., Ikemizu, J., Murakami, K. and Nakayama, K. (1991) Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem* **266**, 12127-30.
- Howell, S., Nalbantoglu, J. and Crine, P. (1995) Neutral endopeptidase can hydrolyze beta-amyloid(1-40) but shows no effect on beta-amyloid precursor protein metabolism. *Peptides* **16**, 647-52.
- The HYP Consortium (1995) A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Nat. Genet.* **11**, 130-136.

- Ikeda, K., Emoto, N., Raharjo, S.B., Nurhantari, Y., Saiki, K., Yokoyama, M. and Matsuo, M. (1999) Molecular identification and characterization of novel membrane-bound metalloprotease, the soluble secreted form of which hydrolyzes a variety of vasoactive peptides. *J Biol Chem* **274**, 32469-77.
- Ishida, M., Ogawa, M., Kosaki, G., Mega, T. and Ikenaka, T. (1983) Purification and characterization of the neutral endopeptidase from human kidney. *J Biochem (Tokyo)* **94**, 17-24.
- Ishimaru, F. and Shipp, M.A. (1995) Analysis of the human CD10/neutral endopeptidase 24.11 promoter region: two separate regulatory elements. *Blood* **85**, 3199-207.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H.J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y. and Saido, T.C. (2000) Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med* **6**, 143-50.
- Jackson, D.G. and Hersh, L.B. (1986) Reaction of neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) with arginine reagents. *J Biol Chem* **261**, 8649-54.
- Jean, F., Boudreault, A., Basak, A., Seidah, N.G. and Lazure, C. (1995) Fluorescent peptidyl substrates as an aid in studying the substrate specificity of human prohormone convertase PC1 and human furin and designing a potent irreversible inhibitor. *J Biol Chem* **270**, 19225-31.
- Johnson, G.D., Stevenson, T. and Ahn, K. (1999) Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1. A comparison with neprilysin. *J Biol Chem* **274**, 4053-8.

- Jongeneel, C.V., Bouvier, J. and Bairoch, A. (1989) A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases. *FEBS Lett* **242**, 211-4.
- Kahn, C.R. (1976) Membrane receptors for hormones and neurotransmitters. *J Cell Biol* **70**, 261-86.
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K. and Muller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**, 733-6.
- Kawamoto, T., Shishikura, T., Ohira, M., Takayasu, H., Morohashi, A., Takada, N., Takahashi, M., Suzuki, Y., Sugano, S., Hori, T. and Nakagawara, A. (2000) Association between favorable neuroblastoma and high expression of the novel metalloproteinase gene, nbla3145/XCE, cloned by differential screening of the full-length-enriched oligo-capping neuroblastoma cDNA libraries. *Med Pediatr Oncol* **35**, 628-31.
- Kenny, A.J., Fulcher, I.S., McGill, K.A. and Kershaw, D. (1983) Proteins of the kidney microvillar membrane. Reconstitution of endopeptidase in liposomes shows that it is a short-stalked protein. *Biochem J* **211**, 755-62.
- Kerr, M.A. and Kenny, A.J. (1974a) The molecular weight and properties of a neutral metallo-endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem J* **137**, 489-95.
- Kerr, M.A. and Kenny, A.J. (1974b) The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem J* **137**, 477-88.
- Kew, D., Muffly, K.E. and Kilpatrick, D.L. (1990) Proenkephalin products are stored in the sperm acrosome and may function in fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9143-7.

- Khachaturian, H., Lewis, M.E., Alessi, N.E. and Watson, S.J. (1985) Time of origin of opioid peptide-containing neurons in the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* **236**, 538-46.
- Khan, A.R. and James, M.N. (1998) Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci* **7**, 815-36.
- Kilpatrick, D.L. and Millette, C.F. (1986) Expression of proenkephalin messenger RNA by mouse spermatogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 5015-8.
- King, K.A., Hua, J., Torday, J.S., Drazen, J.M., Graham, S.A., Shipp, M.A. and Sunday, M.E. (1993) CD10/neutral endopeptidase 24.11 regulates fetal lung growth and maturation in utero by potentiating endogenous bombesin-like peptides. *J Clin Invest* **91**, 1969-73.
- Kiryu-Seo, S., Sasaki, M., Yokohama, H., Nakagomi, S., Hirayama, T., Aoki, S., Wada, K. and Kiyama, H. (2000) Damage-induced neuronal endopeptidase (DINE) is a unique metallopeptidase expressed in response to neuronal damage and activates superoxide scavengers. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 4345-50.
- Kohan, D.E. (1991) Endothelin synthesis by rabbit renal tubule cells. *Am J Physiol* **261**, F221-6.
- Korth, P., Bohle, R.M., Corvol, P. and Pinet, F. (1999) Cellular distribution of endothelin-converting enzyme-1 in human tissues. *J Histochem Cytochem* **47**, 447-62.
- Kunz, J., Krause, D., Kremer, M. and Dermietzel, R. (1994) The 140-kDa protein of blood-brain barrier-associated pericytes is identical to aminopeptidase N. *J Neurochem* **62**, 2375-86.

- Lafrance, M.H., Vezina, C., Wang, Q., Boileau, G., Crine, P. and Lemay, G. (1994) Role of glycosylation in transport and enzymic activity of neutral endopeptidase-24.11. *Biochem J* **302**, 451-4.
- Landry, C., Santagata, P., Bawab, W., Fournie-Zaluski, M.C., Roques, B.P., Vinay, P. and Crine, P. (1993) Characterization of neutral endopeptidase 24.11 in dog glomeruli. *Biochem J* **291**, 773-9.
- Lazure, C., Gauthier, D., Jean, F., Boudreault, A., Seidah, N.G., Bennett, H.P. and Hendy, G.N. (1998) In vitro cleavage of internally quenched fluorogenic human parathyroid hormone and parathyroid-related peptide substrates by furin. Generation of a potent inhibitor. *J Biol Chem* **273**, 8572-80.
- Le Moual, H., Devault, A., Roques, B.P., Crine, P. and Boileau, G. (1991) Identification of glutamic acid 646 as a zinc-coordinating residue in endopeptidase-24.11. *J Biol Chem* **266**, 15670-4.
- Le Moual, H., Dion, N., Roques, B.P., Crine, P. and Boileau, G. (1994) Asp650 is crucial for catalytic activity of neutral endopeptidase 24-11. *Eur J Biochem* **221**, 475-80.
- LeBien, T.W. (1989) Growing human B-cell precursors in vitro: the continuing challenge. *Immunol Today* **10**, 296-8.
- Lee, S., Zambas, E.D., Marsh, W.L. and Redman, C.M. (1991) Molecular cloning and primary structure of Kell blood group protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6353-7.
- Lee, S., Lin, M., Mele, A., Cao, Y., Farmar, J., Russo, D. and Redman, C. (1999) Proteolytic processing of big endothelin-3 by the kell blood group protein. *Blood* **94**, 1440-50.

- Lemay, G., Zollinger, M., Waksman, G., Roques, B.P., Crine, P. and Boileau, G. (1990) Recombinant neutral endopeptidase-24.11 expressed in mouse neuroblastoma cells is associated with neurite membranes. *Biochem J* **267**, 447-52.
- Letarte, M., Vera, S., Tran, R., Addis, J.B., Onizuka, R.J., Quackenbush, E.J., Jongeneel, C.V. and McInnes, R.R. (1988) Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J Exp Med* **168**, 1247-53.
- Lilly, C.M., Drazen, J.M. and Shore, S.A. (1993) Peptidase modulation of airway effects of neuropeptides. *Proc Soc Exp Biol Med* **203**, 388-404.
- Lipman, M.L., Panda, D., Bennett, H.P., Henderson, J.E., Shane, E., Shen, Y., Goltzman, D. and Karaplis, A.C. (1998) Cloning of human PEX cDNA. Expression, subcellular localization, and endopeptidase activity. *J Biol Chem* **273**, 13729-37.
- Llorens, C., Gacel, G., Swerts, J.P., Perdrisot, R., Fournie-Zaluski, M.C., Schwartz, J.C. and Roques, B.P. (1980) Rational design of enkephalinase inhibitors: substrate specificity of enkephalinase studied from inhibitory potency of various dipeptides. *Biochem Biophys Res Commun* **96**, 1710-6.
- Lu, B., Gerard, N.P., Kolakowski, L.F., Bozza, M., Zurakowski, D., Finco, O., Carroll, M.C. and Gerard, C. (1995) Neutral endopeptidase modulation of septic shock. *J Exp Med* **181**, 2271-5.
- Malfroy, B., Kuang, W.J., Seeburg, P.H., Mason, A.J. and Schofield, P.R. (1988) Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). *FEBS Lett* **229**, 206-10.
- Malfroy, B., Schofield, P.R., Kuang, W.J., Seeburg, P.H., Mason, A.J. and Henzel, W.J. (1987) Molecular cloning and amino acid sequence of rat enkephalinase. *Biochem Biophys Res Commun* **144**, 59-66.

- Malfroy, B. and Schwartz, J.C. (1982) Properties of "enkephalinase" from rat kidney: comparison of dipeptidyl- carboxypeptidase and endopeptidase activities. *Biochem Biophys Res Commun* **106**, 276-85.
- Malfroy, B., Swerts, J.P., Guyon, A., Roques, B.P. and Schwartz, J.C. (1978) High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature* **276**, 523-6.
- Marcais-Collado, H., Uchida, G., Costentin, J., Schwartz, J.C. and Lecomte, J.M. (1987) Naloxone-reversible antidiarrheal effects of enkephalinase inhibitors. *Eur J Pharmacol* **144**, 125-32.
- Mari, B., Breitmayer, J.P., Guerin, S., Belhacene, N., Peyron, J.F., Deckert, M., Rossi, B. and Auberger, P. (1994) High levels of functional endopeptidase 24.11 (CD10) activity on human thymocytes: preferential expression on immature subsets. *Immunology* **82**, 433-8.
- Mari, B., Checler, F., Ponzio, G., Peyron, J.F., Manie, S., Farahifar, D., Rossi, B. and Auberger, P. (1992) Jurkat T cells express a functional neutral endopeptidase activity (CALLA) involved in T cell activation. *Embo J* **11**, 3875-85.
- Marie-Claire, C., Ruffet, E., Antonczak, S., Beaumont, A., O'Donohue, M., Roques, B.P. and Fournie-Zaluski, M.C. (1997) Evidence by site-directed mutagenesis that arginine 203 of thermolysin and arginine 717 of neprilysin (neutral endopeptidase) play equivalent critical roles in substrate hydrolysis and inhibitor binding. *Biochemistry* **36**, 13938-45.
- Marsh, J.J. and Lebherz, H.G. (1992) Fructose-bisphosphate aldolases: an evolutionary history. *Trends Biochem Sci* **17**, 110-3.

- Marsh, W.L. (1992) Molecular biology of blood groups: cloning the Kell gene. *Transfusion* **32**, 98-101.
- Masters, C.L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R.N. and Beyreuther, K. (1985) Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *Embo J* **4**, 2757-63.
- Matsas, R., Fulcher, I.S., Kenny, A.J. and Turner, A.J. (1983) Substance P and [Leu]enkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3111-5.
- Matsas, R., Kenny, A.J. and Turner, A.J. (1984) The metabolism of neuropeptides. The hydrolysis of peptides, including enkephalins, tachykinins and their analogues, by endopeptidase-24.11. *Biochem J* **223**, 433-40.
- Matsas, R., Kenny, A.J. and Turner, A.J. (1986) An immunohistochemical study of endopeptidase-24.11 ("enkephalinase") in the pig nervous system. *Neuroscience* **18**, 991-1012.
- Matthews, B.W. (1988) Structural basis of the action of thermolysin and related zinc peptidases. *acc chem res* **21**, 991-1012.
- Mizuno, K. and Matsuo, H. (1994) Processing of peptide hormone precursors. *The Pituitary Gland*, Raven Press, Ltd., New York.
- Molloy, S.S., Bresnahan, P.A., Leppla, S.H., Klimpel, K.R. and Thomas, G. (1992) Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J Biol Chem* **267**, 16396-402.

- Mutoh, N. and Hayashi, Y. (1994) Molecular cloning and nucleotide sequencing of Schizosaccharomyces pombe homologue of the class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene. *Biochim Biophys Acta* **1183**, 550-2.
- Nadel, J.A. (1991) Neutral endopeptidase modulates neurogenic inflammation. *Eur Respir J* **4**, 745-54.
- Nadel, J.A. (1992) Regulation of neurogenic inflammation by neutral endopeptidase. *Am Rev Respir Dis* **145**, S48-52.
- Nakayama, K. (1997) Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J* **327**, 625-35.
- Nau, R., Schafer, G. and Conlon, J.M. (1985) Proteolytic inactivation of substance P in the epithelial layer of the intestine. *Biochem Pharmacol* **34**, 4019-23.
- Noble, F., Fournie-Zaluski, M.C. and Roques, B.P. (1993) Unlike morphine the endogenous enkephalins protected by RB101 are unable to establish a conditioned place preference in mice. *Eur J Pharmacol* **230**, 139-49.
- Noble, F., Soleilhac, J.M., Soroca-Lucas, E., Turcaud, S., Fournie-Zaluski, M.C. and Roques, B.P. (1992) Inhibition of the enkephalin-metabolizing enzymes by the first systemically active mixed inhibitor prodrug RB 101 induces potent analgesic responses in mice and rats. *J Pharmacol Exp Ther* **261**, 181-90.
- Nortier, J., Pauwels, S., De Prez, E. and Deschodt-Lanckman, M. (1995) Human neutrophil and plasma endopeptidase 24.11: quantification and respective roles in atrial natriuretic peptide hydrolysis. *Eur J Clin Invest* **25**, 206-12.
- Oblin, A., Danse, M.J. and Zivkovic, B. (1989) Metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11) but not angiotensin converting enzyme is involved in the inactivation of substance P by synaptic membranes of the rat substantia nigra. *Life Sci* **44**, 1467-74.

- Oefner, C., D'Arcy, A., Hennig, M., Winkler, F.K. and Dale, G.E. (2000) Structure of human neutral endopeptidase (Nepriylisin) complexed with phosphoramidon. *J Mol Biol* **296**, 341-9.
- Olsen, J., Kokholm, K., Noren, O. and Sjostrom, H. (1997) Structure and expression of aminopeptidase N. *Adv Exp Med Biol* **421**, 47-57.
- Painter, R.G., Dukes, R., Sullivan, J., Carter, R., Erdos, E.G. and Johnson, A.R. (1988) Function of neutral endopeptidase on the cell membrane of human neutrophils. *J Biol Chem* **263**, 9456-61.
- Papandreou, C.N., Usmani, B., Geng, Y., Bogenrieder, T., Freeman, R., Wilk, S., Finstad, C.L., Reuter, V.E., Powell, C.T., Scheinberg, D., Magill, C., Scher, H.I., Albino, A.P. and Nanus, D.M. (1998) Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nat Med* **4**, 50-7.
- Pascual, R., Burgos, F.J., Salva, M., Soriano, F., Mendez, E. and Aviles, F.X. (1989) Purification and properties of five different forms of human procarboxypeptidases. *Eur J Biochem* **179**, 609-16.
- Pollard, H., Bouthenet, M.L., Moreau, J., Souil, E., Verroust, P., Ronco, P. and Schwartz, J.C. (1989) Detailed immunautoradiographic mapping of enkephalinase (EC 3.4.24.11) in rat central nervous system: comparison with enkephalins and substance P. *Neuroscience* **30**, 339-76.
- Pozsgay, M., Michaud, C., Liebman, M. and Orłowski, M. (1986) Substrate and inhibitor studies of thermolysin-like neutral metalloendopeptidase from kidney membrane fractions. Comparison with bacterial thermolysin. *Biochemistry* **25**, 1292-9.
- Rawlings, N.D. and Barrett, A.J. (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* **290**, 205-18.

- Redman, C.M. and Lee, S. (1995) The Kell blood group system. *Transfus Clin Biol* **2**, 243-9.
- Relton, J.M., Gee, N.S., Matsas, R., Turner, A.J. and Kenny, A.J. (1983) Purification of endopeptidase-24.11 ('enkephalinase') from pig brain by immunoadsorbent chromatography. *Biochem J* **215**, 519-23.
- Richards, A.M., Crozier, I.G., Kosoglou, T., Rallings, M., Espiner, E.A., Nicholls, M.G., Yandle, T.G., Ikram, H. and Frampton, C. (1993) Endopeptidase 24.11 inhibition by SCH 42495 in essential hypertension. *Hypertension* **22**, 119-26.
- Richards, A.M., Wittert, G., Espiner, E.A., Yandle, T.G., Frampton, C. and Ikram, H. (1991) EC 24.11 inhibition in man alters clearance of atrial natriuretic peptide. *J Clin Endocrinol Metab* **72**, 1317-22.
- Roques, B.P., Noble, F., Dauge, V., Fournie-Zaluski, M.C. and Beaumont, A. (1993) Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* **45**, 87-146.
- Rowe, P.S. (1998) The role of the PHEX gene (PEX) in families with X-linked hypophosphataemic rickets. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **7**, 367-76.
- Ruchon, A.F., Marcinkiewicz, M., Siegfried, G., Tenenhouse, H.S., DesGroseillers, L., Crine, P. and Boileau, G. (1998) Pex mRNA is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts. *J Histochem Cytochem* **46**, 459-68.
- Russo, D., Redman, C. and Lee, S. (1998) Association of XK and Kell blood group proteins. *J Biol Chem* **273**, 13950-6.
- Schang, J.C., Hemond, M., Hebert, M. and Pilote, M. (1986) How does morphine work on colonic motility? An electromyographic study in the human left and sigmoid colon. *Life Sci* **38**, 671-6.

- Schmidt, M., Kroger, B., Jacob, E., Seulberger, H., Subkowski, T., Otter, R., Meyer, T., Schmalzing, G. and Hillen, H. (1994) Molecular characterization of human and bovine endothelin converting enzyme (ECE-1). *FEBS Lett* **356**, 238-43.
- Seidah, N.G. and Chretien, M. (1994) Pro-protein convertases of subtilisin/kexin family. *Methods Enzymol* **244**, 175-88.
- Seidah, NG, Day, R, Marcinkiewicz, M and Chretien, M. (1998) Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Ann NY Acad Sci* **839**,9-24.
- Selkoe, D.J. (1991) Amyloid protein and Alzheimer's disease. *Sci Am* **265**, 68-71, 74-6, 78.
- Selkoe, D.J. (1993) Physiological production of the beta-amyloid protein and the mechanism of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* **16**, 403-9.
- Shimada, K., Takahashi, M., Turner, A.J. and Tanzawa, K. (1996) Rat endothelin-converting enzyme-1 forms a dimer through Cys412 with a similar catalytic mechanism and a distinct substrate binding mechanism compared with neutral endopeptidase-24.11. *Biochem J* **315**, 863-7.
- Shipp, M.A., Richardson, N.E., Sayre, P.H., Brown, N.R., Masteller, E.L., Clayton, L.K., Ritz, J. and Reinherz, E.L. (1988) Molecular cloning of the common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) identifies a type II integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 4819-23.
- Shipp, M.A., Tarr, G.E., Chen, C.Y., Switzer, S.N., Hersh, L.B., Stein, H., Sunday, M.E. and Reinherz, E.L. (1991) CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 10662-6.

- Singer, D.R., Markandu, N.D., Buckley, M.G., Miller, M.A., Sagnella, G.A. and MacGregor, G.A. (1991) Dietary sodium and inhibition of neutral endopeptidase 24.11 in essential hypertension. *Hypertension* **18**, 798-804.
- Snyder, S.H. (1985) The molecular basis of communication between cells. *Sci Am* **253**, 132-41.
- Sonnenberg, J.L., Sakane, Y., Jeng, A.Y., Koehn, J.A., Ansell, J.A., Wennogle, L.P. and Ghai, R.D. (1988) Identification of protease 3.4.24.11 as the major atrial natriuretic factor degrading enzyme in the rat kidney. *Peptides* **9**, 173-80.
- Spillantini, M.G., Sicuteri, F., Salmon, S. and Malfroy, B. (1990) Characterization of endopeptidase 3.4.24.11 ("enkephalinase") activity in human plasma and cerebrospinal fluid. *Biochem Pharmacol* **39**, 1353-6.
- Steiner, D.F. and James, D.E. (1992) Cellular and molecular biology of the beta cell. *Diabetologia* **35 Suppl 2**, S41-8.
- Sunday, M.E., Hua, J., Torday, J.S., Reyes, B. and Shipp, M.A. (1992) CD10/neutral endopeptidase 24.11 in developing human fetal lung. Patterns of expression and modulation of peptide-mediated proliferation. *J Clin Invest* **90**, 2517-25.
- Takahashi, M., Matsushita, Y., Iijima, Y. and Tanzawa, K. (1993) Purification and characterization of endothelin-converting enzyme from rat lung. *J Biol Chem* **268**, 21394-8.
- Takahashi, S., Hatsuzawa, K., Watanabe, T., Murakami, K. and Nakayama, K. (1994) Sequence requirements for endoproteolytic processing of precursor proteins by furin: transfection and in vitro experiments. *J Biochem (Tokyo)* **116**, 47-52.

- Tam, L.T., Engelbrecht, S., Talent, J.M., Gracy, R.W. and Erdos, E.G. (1985) The importance of disulfide bridges in human endopeptidase (enkephalinase) after proteolytic cleavage. *Biochem Biophys Res Commun* **133**, 1187-92.
- Tanja, O., Facchinetti, P., Rose, C., Bonhomme, M.C., Gros, C. and Schwartz, J.C. (2000) Neprilysin II: A putative novel metalloprotease and its isoforms in CNS and testis. *Biochem Biophys Res Commun* **271**, 565-70.
- Tenenhouse, H.S. (1999) X-linked hypophosphataemia: a homologous disorder in humans and mice. *Nephrol Dial Transplant* **14**, 333-41.
- Turner, A.J., Barnes, K., Schweizer, A. and Valdenaire, O. (1998) Isoforms of endothelin-converting enzyme: why and where? *Trends Pharmacol Sci* **19**, 483-6.
- Turner, A.J., Isaac, R.E. and Coates, D. (2001) The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: Genomics and function. *Bioessays* **23**, 261-9.
- Turner, A.J., Matsas, R. and Kenny, A.J. (1985) Are there neuropeptide-specific peptidases? *Biochem Pharmacol* **34**, 1347-56.
- Turner, A.J. and Tanzawa, K. (1997) Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *Faseb J* **11**, 355-64.
- Valdenaire, O., Richards, J.G., Faull, R.L. and Schweizer, A. (1999) XCE, a new member of the endothelin-converting enzyme and neutral endopeptidase family, is preferentially expressed in the CNS. *Brain Res Mol Brain Res* **64**, 211-21.
- Valdenaire, O., Rohrbacher, E. and Mattei, M.G. (1995) Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1). *J Biol Chem* **270**, 29794-8.
- Valdenaire, O. and Schweizer, A. (2000) Endothelin-converting enzyme-like 1 (ECEL1; 'XCE'): a putative metallopeptidase crucially involved in the nervous control of respiration. *Biochem Soc Trans* **28**, 426-30.

- Vallee, B.L. and Auld, D.S. (1990) Active-site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 220-4.
- Vendrell, J., Guasch, A., Coll, M., Villegas, V., Billeter, M., Wider, G., Huber, R., Wuthrich, K. and Aviles, F.X. (1992) Pancreatic procarboxypeptidases: their activation processes related to the structural features of the zymogens and activation segments. *Biol Chem Hoppe Seyler* **373**, 387-92.
- Vogel, Z. and Altstein, M. (1979) The effect of puromycin on the biological activity of Leu-enkephalin. *FEBS Lett* **98**, 44-8.
- Waksman, G., Hamel, E., Bouboutou, R., Besselievre, R., Fournie-Zaluski, M.C. and Roques, B.P. (1984) [Regional distribution of enkephalinase in the rat brain by autoradiography]. *C R Acad Sci III* **299**, 613-5.
- Waksman, G., Hamel, E., Delay-Goyet, P. and Roques, B.P. (1986) Neuronal localization of the neutral endopeptidase 'enkephalinase' in rat brain revealed by lesions and autoradiography. *Embo J* **5**, 3163-6.
- Warner, A.E. (1985) The role of gap junctions in amphibian development. *J Embryol Exp Morphol* **89 Suppl**, 365-80.
- Watanabe, T., Murakami, K. and Nakayama, K. (1993) Positional and additive effects of basic amino acids on processing of precursor proteins within the constitutive secretory pathway. *FEBS Lett* **320**, 215-8.
- Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I.R. and DesGroseillers, L. (1999) Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* **19**, 2220-30.

- Wilkins, M.R., Unwin, R.J. and Kenny, A.J. (1993) Endopeptidase-24.11 and its inhibitors: potential therapeutic agents for edematous disorders and hypertension. *Kidney Int* **43**, 273-85.
- Xu, D., Emoto, N., Giaid, A., Slaughter, C., Kaw, S., deWit, D. and Yanagisawa, M. (1994) ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* **78**, 473-85.
- 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) Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development* **125**, 825-36.
- Yasojima, K., Akiyama, H., McGeer, E.G. and McGeer, P.L. (2001) Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neurosci Lett* **297**, 97-100.