

2M11.2707.3

Université de Montréal

**ÉTUDE DES CONVERTASES DE PRO-PROTÉINES FURINE ET PC7,  
AU NIVEAU DU PANCRÉAS DE RAT**

par

Martine Quintal

Département de pathologie et biologie cellulaire

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 biologie cellulaire

DÉCEMBRE 1998

©MARTINE QUINTAL, 1998



w  
4  
U58  
1999  
v.070

## IDENTIFICATION DU JURY

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

### ÉTUDE DES CONVERTASES DE PRO-PROTÉINES FURINE ET PC7, AU NIVEAU DU PANCRÉAS DE RAT

présenté par:

Martine Quintal

a été évalué un jury composé des personnes suivantes:

Docteur Jacques Paiement..... président-rapporteur

Docteur Moïse Bendayan.....directeur de recherche

Docteur Michel Desjardins.....membre du jury

Mémoire accepté le: 99-04-27

## SOMMAIRE

Les convertases sont des endoprotéases nécessaires à la maturation et à l'acquisition de l'activité d'une grande diversité de protéines, transcrites sous la forme d'un précurseur de haut poids moléculaire. Ce précurseur est une longue chaîne peptidique constituée d'une séquence en N-terminal qu'on appelle pro-peptide, et d'une protéine ou de plusieurs peptides et protéines. À l'intérieur de cette chaîne, les peptides et protéines sont délimités par des séquences constituées d'acides aminés basiques. Les convertases vont reconnaître ces séquences spécifiques et effectuer des coupures protéolytiques qui permettent le détachement de la ou des protéines matures du pro-peptide. Les convertases permettent ainsi de générer à partir d'un précurseur unique, différentes protéines.

Les convertases furine et PC7 sont exprimées dans tous les tissus. La littérature les considère principalement liées à la membrane de l'appareil de Golgi et impliquées dans la maturation de protéines associées à la voie de sécrétion constitutive. Le présent travail a consisté à révéler les convertases furine et PC7 au niveau du pancréas de rat, et à comparer leur distribution cellulaire et intracellulaire. Pour ce faire, nous avons utilisé les techniques d'hybridation *in situ* en microscopie optique, d'immunofluorescence en microscopie optique et d'immunocytochimie à l'or colloïdal en microscopie électronique. Les formes moléculaires de furine et de PC7, présentes au niveau du pancréas, ont également été déterminées par la technique d'immunobuvardage (transfert à la Western).

Nous avons d'abord établi par hybridation *in situ*, la présence endogène de l'ARN messager de la furine dans le pancréas exocrine et endocrine de rat. La localisation de la furine a ensuite été révélée par immunocytochimie à l'or colloïdal. Nous avons retrouvé la furine associée aux éléments de la voie de sécrétion régulée au niveau des cellules endocrines à insuline et à glucagon et au niveau des cellules acineuses exocrines. La présence de cette convertase dans la voie régulée représente un fait nouveau et important. PC7, qui possède des caractéristiques communes avec la furine, a été ensuite investiguée. Nous avons établi sa présence tout comme pour la furine, au niveau de la voie de sécrétion régulée des cellules à insuline et acineuses. Une analyse morphométrique du nombre de particules d'or obtenu en immunocytochimie, nous a permis de déterminer la densité de marquage dans différents organites cellulaires. Nous avons ainsi trouvé, une augmentation de la concentration des convertases au fur et à mesure du cheminement à travers les éléments de la voie de sécrétion régulée. Afin de déterminer les formes de furine et de PC7 présentes dans le tissu pancréatique, nous avons utilisé la technique d'immunobuvardage (transfert à la Western). Des formes courtes solubles de 76kDa et de 80kDa de furine, ont été identifiées. Il semble donc qu'il existe au niveau du pancréas, des formes solubles de furine. Pour ce qu'est de PC7, la pro-forme de 102KDa et la forme mature de 89 Kda, ont été détectées.

Cette combinaison de méthodes morphologiques et biochimiques a permis d'apporter un fait nouveau et important sur la biologie cellulaire des convertases furine et PC7, qui apparaissent maintenant associées à la voie cellulaire de la sécrétion régulée.

# TABLE DES MATIÈRES

	page
<b>PAGE TITRE</b> .....	I
<b>IDENTIFICATION DU JURY</b> .....	II
<b>SOMMAIRE</b> .....	III
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	V
<b>Liste des Tableaux</b> .....	VIII
<b>Liste des Figures</b> .....	IX
<b>Liste des Sigles et des Abréviations</b> .....	XI
<b>DÉDICACE</b> .....	XIV
<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>DE LA TRANSCRIPTION À LA SÉCRÉTION</b> .....	2
<b>LES CONVERTASES</b> .....	6
<i>Introduction et bref historique</i> .....	6
<i>Caractéristiques générales des convertases</i> .....	8
<i>PC1 et PC2</i> .....	9
<i>PC4</i> .....	10
<i>PC5</i> .....	10
<i>PACE4</i> .....	11
<i>Furine</i> .....	11
<i>PC7</i> .....	18

<b>LE PANCRÉAS</b> .....	23
<i>Le pancréas exocrine</i> .....	24
<i>Le pancréas endocrine</i> .....	26
<i>Insuline</i> .....	28
<i>Glucagon</i> .....	29
<i>Somatostatine</i> .....	30
<i>Polypeptide pancréatique</i> .....	30
<b>OBJET DU PRÉSENT TRAVAIL</b> .....	31
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	33
<b>HYBRIDATION <i>IN SITU</i></b> .....	33
<b>ANTICORPS</b> .....	35
<b>IMMUNOFLUORESCENCE</b> .....	36
<b>IMMUNOCYTOCHIMIE À L'OR COLLOÏDAL</b> .....	37
<b>IMMUNOBUVARDAGE DE LA FURINE</b> .....	40
<b>IMMUNOBUVARDAGE DE LA PC7</b> .....	42
<b>RÉSULTATS</b> .....	43
<b>FURINE</b> .....	43
<i>Hybridation in situ</i> .....	43
<i>Immunofluorescence</i> .....	44
<i>Microscopie électronique</i> .....	44
<i>Pancréas exocrine</i> .....	44
<i>Pancréas endocrine</i> .....	45
<i>Évaluation quantitative</i> .....	46
<i>Immunobuvardage</i> .....	48
<b>PC7</b> .....	49

<i>Microscopie électronique</i> .....	49
<i>Pancréas exocrine</i> .....	49
<i>Pancréas endocrine</i> .....	50
<i>Évaluation quantitative</i> .....	51
<i>Immunobuvardage</i> .....	52
<b>DISCUSSION</b> .....	53
<b>FURINE</b> .....	54
<i>Pancréas exocrine</i> .....	54
<i>Pancréas endocrine</i> .....	60
<b>PC7</b> .....	64
<i>Pancréas exocrine</i> .....	64
<i>Pancréas endocrine</i> .....	67
<b>CONCLUSION</b> .....	71
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	73
<b>ANNEXES</b> .....	91
<b>TABLEAUX</b> .....	92
<b>LÉGENDES DES FIGURES ET FIGURES</b> .....	98
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	123

## LISTE DES TABLEAUX

	page
<b>TABLEAU 1.</b> Évaluation quantitative de la densité de marquage à l'or colloïdal pour la furine .....	92
<b>A.</b> Cellules acineuses du pancréas exocrine .....	92
<b>B.</b> Cellules sécrétrices d'insuline .....	93
<b>C.</b> Granules de sécrétion matures des cellules sécrétrices de glucagon .....	94
<b>D.</b> Granules de sécrétion matures des cellules acineuses du pancréas exocrine de rat dont la sécrétion pancréatique a été stimulée .....	94
<b>TABLEAU 2.</b> Évaluation quantitative de la densité de marquage à l'or colloïdal pour PC7. ....	95
<b>A.</b> Cellules acineuses du pancréas exocrine .....	95
<b>B.</b> Cellules sécrétrices d'insuline .....	96
<b>TABLEAU 3.</b> Évaluation quantitative de la densité de marquage à l'or colloïdal associée à la membrane des granules de sécrétion matures .....	97

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Représentation schématique des convertases furine et PC7 (pro-forme) .....	20
<b>Figure 2:</b> Hybridation <i>in situ</i> avec des sondes d'ARN couplées à des molécules de digoxigénine et révélées par une réaction à la phosphatase alcaline .....	99
<b>Figure 3:</b> Mise en évidence de la furine par Immunofluorescence en microscopie optique dans le pancréas .....	101
<b>Figure 4:</b> Immunocytochimie à l'or colloïdal de la furine, dans les cellules acineuses du pancréas exocrine .....	103
<b>Figure 5:</b> Immunocytochimie à l'or colloïdal de la furine, dans les cellules sécrétrices d'insuline .....	109
<b>Figure 6:</b> Immunocytochimie à l'or colloïdal de la furine, dans les cellules sécrétrices de somatostatine .....	111
<b>Figure 7:</b> Immunocytochimie à l'or colloïdal de la furine, dans les cellules sécrétrices de glucagon .....	111
<b>Figure 8:</b> Immunobuvardage de la furine .....	113
<b>Figure 9:</b> Immunocytochimie à l'or colloïdal de PC7, dans les cellules acineuses du pancréas exocrine .....	115
<b>Figure 10:</b> Immunocytochimie à l'or colloïdal de PC7, dans les cellules sécrétrices d'insuline .....	117

<b>Figure 11:</b> Immunocytochimie à l'or colloïdal de PC7, dans les cellules sécrétrices de somatostatine .....	119
<b>Figure 12:</b> Immunocytochimie à l'or colloïdal de PC7, dans les cellules sécrétrices de glucagon .....	119
<b>Figure 13:</b> Immunobuvardage pour la détection de PC7 .....	121

## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

aa	acides aminés
ac	anticorps
ACTH	adrénocorticotropine, (hormone corticotrope)
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AP-1	<i>adaptin-protein-1</i> adaptine-1
AP-2	<i>adaptin-protein-2</i> adaptine-2
A-PMSF	amidino phényl-méthyl-sulfonyl-fluoride
ARF	<i>ADP ribosylation factor</i> facteur de ribosylation adénosine
ARN	acide ribonucléique
ARNase	acide ribonucléase
Att20	lignée cellulaire corticotrope de souris
bêtaTC3	lignée d'insulinome de souris
BSC-40	<i>african green monkey kidney cells</i> lignée de cellules rénales de singe vert d'Afrique
CD	ADN copie
QUIA	chromogranine A
°C	degrés celcius

DABCO	diozabicyclo octane
DEPC	diethyl pyrocarbonate
DIG	digoxigénine
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
FITC	fluorescéine
g	grammes
GH-III	<i>growth hormone-inhibiting hormone</i> hormone de croissance-hormone inhibitrice ou somatostatine
GP-2	glycoprotéine-2
GRPP	<i>glicentin related pancreatic peptide</i> glicentine
GTPase	guanosine-triphosphatase
hfurine	furine humaine
IgG	immunoglobuline de type G
kDa	kilo-Dalton
LPC	<i>lymphoma proprotein convertase</i> convertase de pro-protéine de lymphome
M	molaire
MAP	<i>multiple antigenic peptide</i> peptides antigéniques multiples
Min6	lignée de cellules à insuline différenciées
ml	milli-litres
mM	milli-molaire

NGF	<i>neural growth factor</i> facteur de croissance neural
PACE4	<i>paired basic amino-4</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> Tampon phosphate salin
PC1 à 8	<i>proprotein convertase 1 à 8</i> convertases de pro-protéines 1 à 8
PC12	lignée de cellules tumorales de la médulla surrénale de rat
pH	concentration en ions hydrogènes
POMC	pro-opiomélanocortine
PVDF	difluorure de polyvinylidene
S-14	somatostatine de 14 acides aminés
S-28	somatostatine de 28 acides aminés
SPC1-7	<i>subtilisin-like proprotein convertase 1 à 7</i> Convertases de pro-protein de type subtilisine
SSC	<i>standard sodium citrate</i>
TBS	<i>Tris buffer saline</i> tampon salin de Tris
µg	micro-grammes
µl	micro-litres
µm	micro-mètres
VIH	Virus d'immunodéficience acquise

## DÉDICACE

À mes parents, Louise et Fernand qui sont ma source d'inspiration; je suis fière d'être votre fille.

À mon frère Marc-André qui je sais, accomplira de grandes choses.

# INTRODUCTION

Les protéines sont les héritières de l'information génétique contenue dans l'ADN. Elles sont à la base de toutes les activités biologiques de la cellule et par le fait même du fonctionnement de l'organisme. Améliorer les connaissances sur les éléments qui régissent la synthèse et le devenir des protéines, peut avoir des répercussions sur toutes les disciplines qui s'intéressent à l'organisme vivant, de la biologie moléculaire, en passant par la physiologie et la pathologie, jusqu'à la médecine clinique.

Bien comprendre le sort des protéines, de leur synthèse à leur dégradation, est donc primordial. Une grande majorité des protéines sont l'oeuvre des mécanismes de synthèse et de maturation du réticulum endoplasmique rugueux et de l'appareil de Golgi. Ce sont principalement des protéines de sécrétion, enzymes lysosomiales ou glycoprotéines destinées aux membranes cellulaires. Parmi ces protéines, plusieurs sont traduites sous la forme d'un précurseur de haut poids moléculaire, qui peut être soumis à une ou plusieurs protéolyses spécifiques, pour générer différents peptides et protéines matures ayant des fonctions biologiques différentes et bien précises. Les enzymes qui effectuent ces clivages font l'objet de nombreux travaux récents, et forment une famille d'enzymes nommée les convertases de pro-protéines.

## DE LA TRANSCRIPTION À LA SÉCRÉTION

Les cellules peuvent produire une grande diversité de protéines. L'épissage des ARN messagers d'abord, puis l'action des convertases, permettent d'obtenir différentes protéines à partir d'un même gène. La synthèse protéique se fait soit dans le cytoplasme, ou soit au niveau du réticulum endoplasmique rugueux. Les complexes ribosome-ARN-peptide sont recrutés à la membrane du réticulum endoplasmique rugueux grâce à une séquence consensus de 16 à 20 acides aminés localisée en N-terminal de la protéine en traduction. Cette séquence signal est reconnue par un récepteur de la membrane du réticulum endoplasmique et sera coupée par une peptidase dans la lumière du réticulum, puis dégradée (Ng et coll., 1996). Pendant leur synthèse, les protéines vont entrer dans le réticulum endoplasmique rugueux sous une forme dépliée par un tunnel de transport formé de plusieurs protéines (Gilmore, 1995). Les protéines membranaires vont s'insérer dans la membrane (Do et coll., 1996) et les autres vont entrer à l'intérieur de la lumière (Simons et Blobel, 1993).

Leur synthèse achevée, les protéines vont cheminer dans le réticulum endoplasmique et peuvent y subir plusieurs types de transformations postraductionnelles. Parmi celles-ci, il y a le repliement des protéines par la formation des ponts disulfures entre les résidus de cystéine de la chaîne peptidique (Gilbert et coll., 1997). L'association aux chaperones moléculaires (chaperonines) permet également l'acquisition de la structure tertiaire (Gething et Sambrook, 1992). Les protéines peuvent ensuite être glycosylées. Cet ajout de sucres pour certaines protéines, va s'effectuer entièrement dans le réticulum, tandis que

pour d'autres, va se poursuivre dans l'appareil de Golgi. Les résidus glucidiques sont soit N-liés à l'asparagine ou O-liés à des résidus sérines et thréonines (Hirschberg et Snider, 1987). L'oligomérisation se fait également dans le réticulum endoplasmique.

La sortie des protéines du réticulum endoplasmique pour se rendre à l'appareil de Golgi par le compartiment intermédiaire, est considérée comme une étape de contrôle (Hauri et Schweizer, 1992). Seulement les protéines bien repliées et prêtes à poursuivre leur cheminement dans l'appareil de Golgi, vont effectivement s'y rendre (Hauri et Schweizer, 1993). Les protéines chemineront à travers l'appareil de Golgi du compartiment cis jusqu'au dernier compartiment, le réseau trans golgien (TGN) (Bergmann et Singer, 1983). Des vésicules de transfert effectuent le transport entre les compartiments. Ces vésicules de transport possèdent différentes protéines membranaires, qui permettent d'abord le bourgeonnement de la membrane du compartiment donneur, le cheminement dans la cellule, puis la reconnaissance et la fusion avec la membrane du compartiment cible (Rothman, 1994; Rothman et Wieland, 1996)

Jusqu'à maintenant, deux principaux types de vésicules de transport ont été identifiés (Farquhar et Hauri, 1997). Elles sont différenciées par le type de protéines qui y sont associées et qui forment leur complexe d'enrobage; soit les vésicules recouvertes de clathrine et celles recouvertes des coatomères. La formation des complexes d'enrobage semble généralement dépendre des petites GTPases de la famille des ARF ("*ADP-ribosylation factor*") (Boman et Kahn, 1995). Les molécules de clathrine et le complexe protéique qui les accompagne, sont impliqués dans la formation des vésicules qui bourgeonnent du

réseau trans golgien et de la membrane plasmique (Brodsky, 1997; Schmid, 1997). Le transport du réticulum endoplasmique au réseau cis de l'appareil de Golgi et entre les saccules de l'appareil de Golgi, s'effectue grâce aux vésicules recouvertes de coatomères. Ces dernières sont classées en 2 familles, soit COP I et COP II. Alpha-COP, membre de la famille des COP I, joue un rôle apparenté à celui de la clathrine (Salama et Schekman, 1995).

Les membranes des citernes du réseau trans golgien sont riches en pompes à protons qui assurent l'environnement acide d'environ pH 6 (Demaurex et coll., 1998) nécessaire aux fonctions de ce compartiment. C'est dans le réseau trans golgien que les protéines destinées aux voies de sécrétion régulée (ou provoquée) ou constitutive (ou continue) et à la voie lysosomiale, vont être ségréguées. Nous allons nous attarder sur les voies de sécrétion constitutive et régulée (Burgess et Kelly, 1987). La voie de sécrétion constitutive est présente dans toutes les cellules et ses vésicules sont produites puis évacuées continuellement. C'est par exemple, à travers cette voie que les glycoprotéines destinées à la membrane plasmique vont être véhiculées. La voie de sécrétion régulée est pour sa part sous le contrôle de sécrétagogues. Les vésicules de la voie de sécrétion régulée matures sont accumulées par la cellule et seront prêtes à être larguées au moment où la cellule recevra le signal physiologique approprié. Ces deux voies de sécrétion sont différentes par leurs cinétiques de sécrétion, les produits sécrétés et également par leurs aspects morphologiques. Les vésicules de sécrétion de la voie constitutive seraient rapidement sécrétées par exocytose. Elles sont petites, dépourvues de molécules de

clathrine et difficiles à discerner en microscopie électronique. Tandis que les granules de la voie de sécrétion régulée sont plus gros et s'accumulent dans les cellules.

Les protéines destinées à la voie de sécrétion régulée seront condensées ou agrégées de façon sélective au site où se formeront les vésicules de sécrétion immatures recouvertes de clathrine. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer ce processus (Halban et Irminger, 1994). L'accumulation locale puis l'entrée des protéines dans les vésicules pourraient se faire par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques associés aux molécules de clathrine. Les adaptines formant le complexe AP-1, en plus d'être impliquées dans le bourgeonnement, sont un exemple de récepteur pouvant jouer ce rôle pour les protéines associées à la membrane (Schmid, 1997). Les membres de la famille des granines (Simon et Aunis, 1989; Ozawa et Takata, 1995) dont font partie la chromogranine A et la chromogranine B (ou sécrétogranine I), semblent avoir au niveau du réseau trans golgien, la caractéristique de s'agréger entre elles et aux autres protéines de la voie de sécrétion régulée, ce qui faciliterait l'entrée de ces dernières dans les vésicules de transport. Pour leurs parts, les protéines destinées à la voie constitutive n'ont pas de mécanismes de routage définis et suivraient ce chemin par défaut (Burgess et Kelly, 1987). Les protéines résidentes du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi vont y être ségréguées par l'action de divers mécanismes. Certaines protéines membranaires qui possèdent un domaine cytosolique, peuvent y avoir des séquences signales pour le routage cellulaire.

Les premières vésicules de sécrétion à se former sont dites immatures, c'est à dire que les produits de sécrétion vont y subir diverses modifications. C'est au niveau trans de

l'appareil de Golgi (Natori et Huttner, 1996), puis dans les vésicules immatures (Orci et coll., 1994) que va commencer à se manifester l'action des convertases sur les protéines traduites sous la forme d'un précurseur. Les convertases sont des endoprotéases qui vont agir sur les pro-protéines au niveau de séquences consensus d'acides aminés basiques, pour libérer les protéines ou peptides matures. La carboxypeptidase E suite à la coupure spécifique des convertases, délègue les acides aminés basiques (Davidson et coll., 1987; Fricker et coll., 1989; Steiner et coll., 1996). Certaines protéines requièrent la formation d'un acide alpha-amide à l'extrémité carboxyle, ce qui est effectué par l'enzyme peptidyl-glycine alpha-amidante monooxygénase (PAM) (Eiper et coll., 1987). Les produits de sécrétion vont se concentrer tout au long du cheminement des granules, jusqu'à l'exocytose à la membrane plasmique. La membrane des vésicules ont à leur face cytosolique, des protéines permettant des interactions aux éléments du cytosquelette sur lesquels elles vont se déplacer (Mays et coll., 1994). Il y a accolement, puis fusion de la membrane de la vésicule et de la membrane plasmique, ce qui permet une ouverture vers l'extérieur de la cellule. Le contenu des vésicules de sécrétion est ainsi déversé dans l'espace extracellulaire par exocytose (Palade, 1975).

## **LES CONVERTASES**

### ***Introduction et bref historique***

La théorie de maturation des protéines a été proposée à la fin des années soixante par Michel Chrétien (Chrétien et Li, 1967) pour expliquer la conversion du pro-

opiomélanocortine (POMC) en ses divers fragments, dont l'hormone corticotrope, ACTH et la lipotropine. Steiner (Steiner et coll., 1967) a, à la même époque, également proposé cette théorie suite à l'observation du processus de maturation de la pro-insuline en insuline (Chrétien et Li, 1967; Steiner et coll., 1967; Lazure et coll., 1983). L'acquisition de l'activité biologique d'un grand nombre de protéines dépend de ce phénomène, dont des hormones protéiques, neuro-peptides, facteurs de croissance, récepteurs, molécules d'adhésion, protéines plasmatiques, métalloprotéinases, glycoprotéines virales et des toxines bactériennes. Les enzymes impliquées dans ce processus de maturation, n'ont été clairement identifiées que récemment.

La découverte chez la levure *saccharomyces cerevisiae* d'une endoprotéase d'eucaryote ressemblant aux subtilisines bactériennes, KEX2, a permis d'ouvrir la porte à l'identification des autres convertases (Julius et coll., 1984; Van de van et coll., 1993; Halban et Irminger 1994). KEX2 encodée par le gène *ykexin*, est définie comme un membre de la famille des protéases à sérines du type subtilisine. Cette enzyme agit du côté carboxyle aux sites spécifiques de deux acides aminés basiques Arginine-Arginine, Lysine-Arginine, Arginine-Lysine et Lysine-Lysine. KEX2 est liée à la membrane de l'appareil de Golgi par une région transmembranaire, son activité est dépendante de la présence d'une concentration élevée en calcium et est maximale en milieu à pH neutre. Une forme soluble obtenue par la perte de la partie transmembranaire, est sécrétée par la levure. C'est en supposant une ressemblance entre KEX2 et d'autres enzymes de mammifères, que la méthode d'amplification génique par polymérisation en chaîne (PCR), a rendu possible la découverte des convertases de pro-protéines de mammifères.

Aujourd'hui sept convertases ont été identifiées soit la furine, PC1(PC3), PC2, PACE4, PC4, PC5 (PC6), et la PC7 (LPC,PC8) (ou respectivement SPC1 à SPC7) (pour revue voir: Marcinkiewicz et coll., 1993-b; Van de Ven et coll., 1993; Halban et Irminger, 1994; Rouillé et coll., 1995; Seidah et Chrétien, 1997; Perone et coll., 1997).

### *Caractéristiques générales des convertases*

Les convertases de pro-protéines, tout comme la KEX2, sont classées parmi les protéases à sérine du type subtilisine (Siezen et coll., 1997). Les convertases clivent les précurseurs du côté carboxyle à des sites spécifiques constitués généralement de deux, ou plus rarement d'un ou même de plusieurs acides aminés basiques. Certains précurseurs sont constitués de plusieurs séquences pouvant potentiellement être reconnues et coupées, mais seulement les sites nécessaires seront effectivement soumis à l'action des convertases. L'activité des convertases est dépendante de la concentration en calcium (Benjannet et coll., 1992). La structure protéique de ces enzymes peut être divisée en divers domaines. Le domaine catalytique est composé des trois acides aminés caractérisant les subtilisines: acide aspartique, histidine, sérine (Siezen et coll., 1997). Les convertases possèdent également un domaine qu'on nomme le domaine P, dont le rôle exact est encore inconnu. Ces enzymes sont glycolisées et sont composées d'une séquence RRGLD à l'intérieur du domaine P. La séquence RGD (Arginine-Glycine-Asparagine), est un signal consensus pouvant être reconnu par des membres de la famille des intégrines (D'Souza et coll., 1991; Van de Ven et coll., 1993; Lusson et coll., 1997). La furine, PC5B et PC7 possèdent une région transmembranaire, tandis que les autres peuvent avoir

en N-terminal une région hydrophobe qui semble servir à l'encrage (Rouillé et coll., 1995). Les convertases sont elles-mêmes traduites sous forme de pro-enzyme. Le clivage de la pro-région se fait de façon autocatalytique (Vey et coll., 1994) dans le réticulum endoplasmique rugueux (Creemens et coll., 1995; Vey et coll., 1994). Il a été déterminé que la dissociation du pro-segment est dépendante du calcium et ne serait pas suffisante pour avoir une activité complète des enzymes (Molloy et coll., 1994). Le pro-segment aurait un rôle qu'on qualifie de compétiteur, de chaperone ou d'inhibiteur intramoléculaire. Ce peptide une fois coupé, resterait lié au reste de la molécule et devrait être dissocié pour permettre l'acquisition de la structure tertiaire et l'activité de la convertase (Nakayama, 1997; Molloy et coll., 1994; Seidah et Chrétien, 1997). La pro-région de la majorité des convertases, comporte deux sites de coupure dibasique. Une première coupure permettrait la sortie du réticulum endoplasmique, des convertases associées à leur pro-région, puis une deuxième coupure au site d'activation, séparerait le pro-segment en deux, permettant ainsi la dissociation du complexe et l'action de l'enzyme de conversion (Anderson et coll., 1997).

### ***PC1 et PC2***

Les convertases PC1 (ou PC3) et PC2 sont des enzymes encodées par les gènes NEC1 et NEC2, et ont entre elles 50% d'homologie (Seidah et coll., 1991; Smeekens et coll. 1991; Marcinkiewicz et coll., 1993-b). Elles sont exprimées par des cellules endocrines et neuroendocrines et sont impliquées dans la maturation de précurseurs dont les protéines ou peptides qui vont entrer dans la voie de sécrétion régulée (Seidah et coll., 1995; Smeekens et coll., 1991). PC1 et PC2 clivent spécifiquement aux paires d'acides aminés

basiques suivantes: arginine-arginine, lysine-arginine, et moins fréquemment à arginine-lysine ou lysine-lysine (Benjannet et coll., 1993). Elles sont conjointement impliquées dans la maturation de certaines hormones comme l'insuline (Baillyes et coll., 1992; Bennett et coll., 1992; Malide et coll., 1995) et l'ACTH (Marcinkiewicz et coll., 1993-a; Chrétien et coll., 1991). L'activité de PC2 serait dépendante de 7B2, une protéine qu'on dit chaperone moléculaire (Seidah et coll., 1983; Benjannet et coll., 1995; Seidah et coll., 1994; van Horssen et coll., 1995). Une première pathologie s'est révélée directement reliée aux convertases. En effet, une forme d'obésité chez l'humain a été démontrée être le résultat d'une mutation du gène de PC1 (Jackson et coll., 1997).

#### ***PC4***

PC4 possède un patron d'expression restreint. Elle a été retrouvée exprimée de façon exclusive dans les cellules germinales mâles et sa séquence spécifique de clivage est différente de celles des autres convertases (Nakayama et coll., 1992; Seidah et coll., 1992).

#### ***PC5***

PC5 (Lusson et coll., 1993; Nakagawa et coll., 1993-a, 1993-b) est pour sa part exprimée dans la majorité des tissus, mais retrouvée de façon plus abondante dans le cerveau et dans les cellules épithéliales de l'intestin. La pro-rénine serait convertie en rénine par cette convertase (Mercure et coll., 1996). Deux formes ont été identifiées, une première PC5-A (PC6A) (Nakagawa et coll., 1993-a), jouerait un rôle semblable à celui de PC1 et PC2. La seconde PC5-B (PC6B), possède une longue région riche en cystéine et une région transmembranaire. Elle se retrouve surtout dans l'intestin (Nakagawa et coll.,

1993-b). PC5-A est soluble. Elle entre dans les granules de sécrétion de la voie régulée (De Bie et coll., 1996). Une séquence de 38 acides aminés unique à PC5A, contrôlerait son cheminement dans la sécrétion régulée. PC5-B est localisée à l'appareil de Golgi et agirait dans la voie constitutive. L'épissage de l'ARN messenger donne deux molécules qui vont suivre deux voies de sécrétion différentes et ainsi agir sur des substrats différents.

#### ***PACE4***

PACE4 est décelée dans la majorité des tissus, mais plus particulièrement dans le coeur, l'hypophyse, les poumons, le foie, les muscles squelettiques, les reins et le pancréas (Nagamune et coll., 1995). Nous possédons peu d'informations sur sa localisation intracellulaire, mais il semble qu'elle soit associée à la voie constitutive (Seidah et Chrétien, 1997; Mains et coll., 1997). Cinq isoformes avec des activités différentes, ont été identifiées dans différentes cellules (Tsuji et coll., 1997).

#### ***Furine***

La furine (pour revue récente voir: Nakayama, 1997) est encodée par le gène *fur* (*fes upstream région*) situé chez le rat et l'humain sur le chromosome 15 (Roebroek et coll., 1986). Le gène *fur* est sous la direction de trois promoteurs, P1, P1a et P1b. Le premier est de type régulé et les deux autres sont constitutifs ("*housekeeping*"). Le promoteur P1 serait prédominant, et pourrait être activé par le facteur de transcription C/EBPbêta (Ayoubi et coll., 1994). La furine peut être traduite à partir de trois formes d'ARN messagers qui diffèrent dans leur région 5' non-traduite (Ayoubi et coll., 1994; Blanchette

et coll., 1997). Les rôles particuliers de chaque promoteurs et des différentes formes d'ARN, restent à établir.

Chez le rat, la furine est constituée d'une séquence de 793 acides aminés. Elle est similaire à 94% avec la forme humaine. Structurellement et fonctionnellement, la furine peut être divisée en domaines: il y a une pro-région en N-terminal de 81 acides aminés, un domaine catalytique semblable à celui des subtilisines, un domaine P, une région riche en cystéine, une autre transmembranaire hydrophobe de 21 acides aminés et une région cytoplasmique de 56 acides aminés (voir représentation schématique à la figure 1). La molécule mature possède trois résidus glucidiques qui subiront une sialylation au trans Golgi (Vey et coll., 1994).

Cette convertase est présente chez la majorité des organismes eucaryotes où son expression semble ubiquitaire (Van de Ven et coll., 1990; Seidah et coll., 1994). L'activité enzymatique *in vitro* de la furine est maximale dans un milieu à pH entre 6,0 et 8,5 (Molloy et coll., 1992), elle est donc moins active à pH acide. L'hypothèse que la furine agit sur les protéines empruntant la voie de sécrétion constitutive est soutenue par les faits suivants: la furine semble être présente dans toutes les cellules de l'organisme, elle est associée à la membrane de l'appareil de Golgi et le pH le long de la voie constitutive reste neutre (Halban et Irminger, 1994; Hosaka et coll., 1991). La furine agit par clivage protéolytique du côté carboxyle aux sites consensus arginine-x-lysine et arginine-arginine. Une séquence minimale de arginine-x-x-arginine est requise (Hosaka et coll., 1991; Molloy et coll., 1992; Watanabe et coll., 1993). Les séquences que peut reconnaître la

furine sont présentes chez plusieurs types de protéines. Une trentaine se sont avérées être des substrats potentiels, dont des facteurs de croissance (bêta-NGF (Bresnahan et coll., 1990; Seidah et coll., 1996-b), TGFbêta1 (Dubois et coll., 1995; Blanchette et coll., 1997), neutrophine (Seidah et coll., 1996-c), BNP (Sawada et coll., 1997.)), des récepteurs (récepteur de l'insuline (Bravo et coll., 1994), intégrines alpha-6 (Lehmann et coll., 1996)), metalloprotéinases de matrice (stromelysin-3 (Pei et Weiss, 1995)), des protéines plasmatiques (albumine (Misumi et coll., 1991), protéine C3 (Misumi et coll., 1991), facteur von Willebrand (Wise et coll., 1990)), des glycoprotéines virales (glycoprotéine 160 du VIH (Stein et coll., 1990; Decroly et coll., 1994), glycoprotéine B du cytomegalovirus (Vey et coll., 1995)) des protéines bactériennes (antigène de protection d'anthrax (Molloy et coll., 1992; Klimpel et coll., 1993).

La furine a été décelée dans tous les tissus et dans presque toutes les lignées cellulaires étudiées (Van de ven et coll., 1990; Seidah et coll., 1994). Il a été démontré que la furine aurait une importance primordiale dans le développement et serait exprimée tôt chez l'embryon, principalement au niveau du coeur et du foie (Zheng et coll., 1994). Les souris mutantes qui ne possèdent pas le gène de la furine, ne survivent pas au delà du 12<sup>e</sup> jour du développement embryonnaire, et des défauts de croissance apparaissent dès le 8<sup>e</sup> jour (Nakayama, 1997). L'expression de cette convertase diminuerait suite à l'acquisition des caractères de différenciation (Kayo et coll., 1996-a). Son expression physiologique chez l'animal adulte est assez faible, cependant un plus haut degré est mesuré dans le foie et les reins (Van de Ven et coll., 1990).

La furine semble donc être associée aux phénomènes de différenciation et de croissance cellulaire. Des études utilisant les cellules de la lignée MIN6 (Kayo et coll., 1996-b), dérivant des cellules bêta de l'îlot de Langherans, ont mis en évidence cette caractéristique de la furine. En effet, une augmentation de la furine dans les cellules MIN6, entraîne une diminution des caractéristiques de différenciation cellulaire, c'est à dire une diminution de l'expression des messagers des convertases PC1 et PC2 et de la chromogranine A. Les cellules GSM06 dérivant des cellules à mucus de la paroi gastrique, ont montré une diminution de leur croissance et de leurs caractéristiques de différenciation avec une suppression de l'expression de furine (Konda et coll., 1997). La perte des caractéristiques de différenciation des cellules quand l'expression de furine y est augmentée et la diminution de la croissance avec une absence de furine, supposent un rôle de la furine dans la conversion de certains facteurs de croissance. Une présence élevée de la furine a également été détectée dans des carcinomes pulmonaires humains avancés, adénocarcinomes et cellules squameuses de carcinomes (Van de Ven et coll., 1993).

La pro-furine a un poids moléculaire d'environ 100 à 104kDa et la furine de 94-98kDa, variant selon les études et les espèces. La pro-région est clivée du coté carboxyle au site arginine<sup>104</sup>-thréonine-lysine-arginine<sup>107</sup> au niveau du le réticulum endoplasmique rugueux par un processus autocatalytique (Nakayama, 1997; Creemers et coll., 1995). La maturation de la pro-furine en furine est essentielle à l'acquisition de son activité (Leduc et coll., 1992). Il existe également une forme soluble d'un poids moléculaire de 80kDa qui peut être sécrétée (Wise et coll., 1990; Vidricaire et coll., 1993). Cette forme est le résultat

d'une transformation post-traductionnelle supplémentaire qui consiste en la perte de la région transmembranaire (Wise et coll., 1990; Vidricaire et coll., 1993). Des précisions sur ce clivage restent à déterminer, mais il ne serait pas causé par une activité autoprotéolytique (Molloy et coll., 1994). Il a également été déterminé que ce clivage est dépendant de la présence en calcium et s'effectuerait dans un environnement acide (Vey et coll., 1994).

Les premières études concernant la furine, ont été faites en utilisant les cellules des lignées COS, BCS-40, et NRK (Bresnahan et coll., 1990; Molloy et coll., 1992; Molloy et coll., 1994; Halban et Irminger, 1994), qui n'expriment que la voie cellulaire constitutive. La furine a été montrée par immunofluorescence dans la région du réseau trans golgien de ces cellules (Bresnahan et coll., 1990; Molloy et coll., 1994; Halban et Irminger, 1994,). La furine est apparue colocalisée avec un marqueur du réseau trans golgien; la protéines TGN38 (Bosshart et coll., 1994; Schäfer et coll., 1995). Deux études par immunocytochimie à l'or colloïdal en microscopie électronique dans les cellules NRK, ont aussi localisé la furine dans la section du réseau trans de l'appareil Golgi (Molloy et coll., 1994; Voorhees et coll., 1995). La furine a également été détectée par microscopie électronique dans de petites vésicules adjacentes à l'appareil de Golgi semblant être recouvertes d'un manteau, que l'on croit être associées au réseau trans golgien (Bosshart et coll., 1994; Voorhees et coll., 1995). La furine voyagerait dans les vésicules de la voie de sécrétion constitutive et semble ainsi pouvoir se retrouver à la membrane plasmique. La furine pourrait ensuite être dirigée dans la voie des endosomes pour y être dégradée

(Molloy et coll., 1994; Bosshart et coll., 1994) ou être retournée à l'appareil de Golgi (Molloy et coll., 1994; Schäfer et coll., 1995).

Les méthodes d'immunofluorescence n'ont pas permis de détecter la furine à la surface cellulaire des cellules, mais des études *in vivo* semblent démontrer qu'une petite quantité y est tout de même exposée (Molloy et coll., 1992; Klimpel et coll., 1992; Molloy et coll., 1994). Lorsque exposée à la membrane plasmique et dans les compartiments d'endocytose, la furine pourrait effectuer une protéolyse sur des substrats d'origine extracellulaire. C'est ainsi qu'elle pourrait activer des protéines virales et bactériennes (Molloy et coll., 1992; Klimpel et coll., 1992). L'action de la convertase furine est une condition au pouvoir infectieux et joue ainsi un rôle dans la pathogénicité de certains virus et bactéries.

L'association exclusive de la furine à la voie de sécrétion constitutive, semble être à la lueur de données récentes, une vision simpliste de la situation. En effet, en plus de sa présence dans la voie constitutive et d'endocytose, la furine est présente dans les éléments de la voie de sécrétion régulée. Hill et ses collaborateurs (Hill et coll., 1995) ont détecté la furine dans des vésicules de sécrétion neuroendocrines isolées, provenant des lobes antérieur, intermédiaire, et neural de l'hypophyse de bovin et de la médulla de la glande surrénale de bovin. La furine a été détectée associée à la fois à la membrane, et au contenu des vésicules isolées (Hill et coll., 1995). Cette convertase a également été montrée être

présente dans les granules immatures des cellules AtT-20 (Dittié et coll., 1997), lignée dérivant des cellules corticotropes. Au niveau du pancréas, une étude menée par immunofluorescence chez des rats au 18<sup>e</sup> jour de gestation, a démontré la présence de la furine dans la partie endocrine et exocrine (Kayo et coll., 1996-a). De plus, la furine a été retrouvée dans le tissu exocrine de la glande sous-maxillaire (Farhadi et coll., 1997). La furine peut donc être présente dans les cellules possédant presque exclusivement la voie de sécrétion régulée.

La localisation et le cheminement cellulaire de la furine sont soumis à des mécanismes de contrôle. Il a été démontré par l'utilisation de formes mutantes de furine, que la région cytoplasmique contient des informations pour la localisation cellulaire. En effet, des études ont montré que lorsque sa région cytoplasmique est absente, la furine ne se concentre plus à l'appareil de Golgi (Molloy et coll., 1994; Schäfer et coll., 1995). Cette région cytoplasmique contient deux séquences signales, la première est une séquence tyrosine composée des acides aminés YKGL<sub>762</sub> (tyrosine-lysine-glycine-leucine) qui serait le signal permettant l'internalisation de la furine présente à la membrane plasmique, par l'intermédiaire des endosomes et son retour à l'appareil de Golgi (Molloy et coll., 1994; Schäfer et coll., 1995). Le deuxième signal est la séquence acide SDSEEDG<sub>783</sub> (sérine-acide aspartique-sérine-acide glutamique-acide glutamique-acide aspartique-acide glutamique-glycine), qui semble être responsable de la localisation à l'appareil de Golgi (Voorhees et coll., 1995). Une phosphorylation réversible des résidus sérine de cette région acide de la queue cytoplasmique, par la caséine kinase II (Jones et coll., 1995;

Schäfer et coll., 1995; Voorhees et coll., 1995) a été montrée. La phosphorylation des résidus sérine favoriserait la présence de la furine à la membrane plasmique (Jones et coll., 1995). L'acidification de l'environnement pourrait également jouer un rôle dans le routage cellulaire (Chapman et Munro, 1994). La séquence YKGL est similaire au signal que possèdent les protéines reconnues par les adaptines AP-1 et AP-2 ("*1-2 type adaptor complexe*") impliquées dans la formation des vésicules recouvertes de chlatrine qui bourgeonnent de la membrane plasmique ou du réseau trans golgien. Il est possible que AP-1 (Schäfer et coll., 1995) et AP-2 puissent reconnaître la furine et avoir un rôle dans son routage cellulaire. En effet, le complexe AP-1 est associé au domaine cytoplasmique de la furine dans les vésicules immatures isolées des cellules AtT-20 (Dittié et coll., 1997). Le routage de la furine semble aussi impliquer des éléments du cytosquelette. La protéine ABP-280 qui se lie à l'actine, pourrait interagir avec la convertase furine (Liu et coll., 1997). Une agrégation entre la partie luminale des molécules de furine a été rapportée comme induisant le routage de la furine aux lysosomes (Wolins et coll., 1997). La distribution cellulaire de la furine est donc très dynamique et semble dépendre de plusieurs facteurs.

### ***PC7***

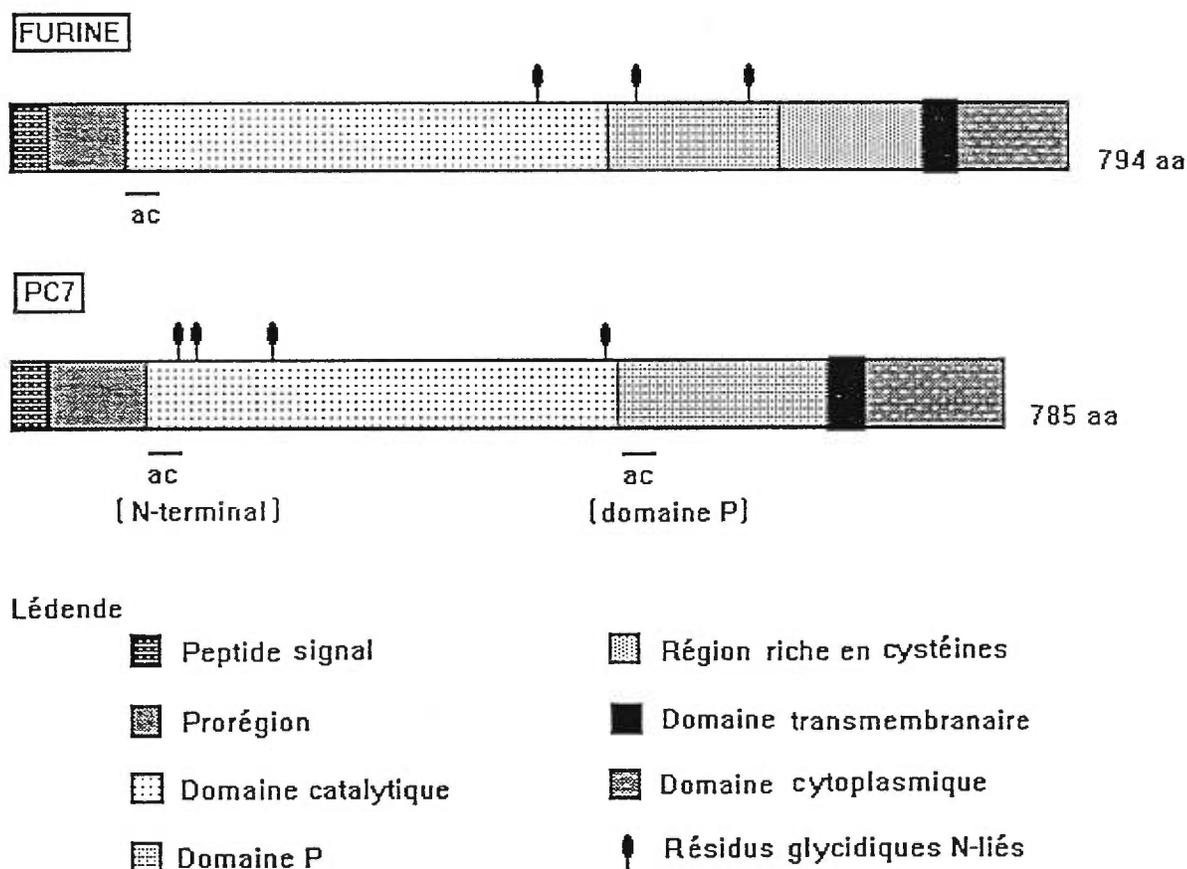
Il s'agit (de la convertase la plus récemment identifiée et caractérisée (Bruzzaniti et coll., 1996; Meerabux et coll., 1996; Seidah et coll., 1996-a). PC7 est la convertase la plus près phylogéniquement des Kexin de levure (Seidah et coll., 1996-a). Nous pouvons également la retrouver dans la littérature sous les noms de PC8 (Bruzzaniti et coll., 1996), SPC7 (Constam et Coll., 1996) et "*lymphoma proproteïn convertase*" ou LPC (Meerabux

et coll., 1996). PC7 est le produit du gène PcsK7, situé chez le rat sur le chromosome 11 (Seidah et coll., 1996-a). Deux formes d'ARN messagers ont été retrouvées, 3,5kb et 4,5kb (Bruzzaniti et coll., 1996; Meerabux et coll., 1996), qui pourraient être le résultat d'un épissage alternatif (Bruzzaniti et coll., 1996). PC7 est synthétisée sous une pro-forme de 785 acides aminés d'un poids moléculaire de 101-102kDa et clivée de façon autoprotéolytique (Constam et coll., 1996), au site Arg-Ala-Lys-Arg-Ser-Ile au niveau le réticulum endoplasmique (Seidah et coll., 1996-a; Munzer et coll., 1997). Cette coupure semble essentielle à sa sortie du réticulum endoplasmique (van de Loo et coll., 1997). La forme mature active est de 89-90kDa (Munzer et coll., 1997; van de Loo et coll., 1997). Une forme intermédiaire non glycosylée de 92kDa, a également été identifiée (van de Loo et coll., 1997).

PC7 est constituée en N-terminal d'une séquence signale, d'un segment pro-peptide de 104 acides aminés, d'un domaine catalytique avec les acides aminés asparagine-histidine-asparagine-sérine, d'un domaine P, d'un segment transmembranaire de 17 acides aminés, et d'une région cytoplasmique de 101 acides aminés (voir figure 1). Contrairement à la furine, PC7 ne possède pas de domaine riche en cystéine entre le domaine P et le segment transmembranaire (Seidah et coll., 1996-a; Munzer et coll., 1997; van de Loo et coll., 1997). PC7 ne contient pas la séquence RDG (arginine-acide aspartique-glycine) de reconnaissance des intégrines, mais plutôt une séquence RGS (arginine-glycine-sérine) à la même position (van de Loo et coll., 1997).

PC7, à l'instar de la furine, semble être ubiquitaire (Bruzzaniti et coll., 1996) donc constitutive (Seidah coll., 1996-a) et localisée préférentiellement dans les saccules du réseau trans golgien (van de Loo et coll., 1997). Son activité est dépendante de la présence de calcium et semble maximale en milieu à pH 6-7 (Munzer et coll., 1997). Les conditions permettant une activité optimale semblent être relativement semblables à celles de la furine. Les séquences de reconnaissance spécifiques de coupure pour la furine et PC7, sont similaires (Munzer et coll., 1997; Bruzzaniti et coll., 1996; van de Loo et coll.,

FIGURE 1



Représentation schématique des convertases furine et PC7.

1997), soit arginine-x-lysine et arginine-arginine. Les sites de clivage qu'elles peuvent reconnaître doivent commencer par une arginine, qu'on dira être en position 1 (Watenabe et coll., 1993; van de Loo et coll., 1997). Cependant, PC7 reconnaîtra une séquence composée d'acide aminés acides entre l'arginine et la lysine (comme l'acide glutamique ou l'asparagine), tandis que la furine ne la clivera que très peu (Watenabe et coll., 1993; Bruzzaniti et coll., 1996). Leurs domaines catalytiques sont différents, mais semblent pouvoir être inhibés par les mêmes molécules (Basak et coll., 1997).

PC7 apparaît tôt au cours du développement de l'embryon (Constam et coll., 1997) et son expression se poursuit de façon stable chez l'adulte (Seidah et coll., 1996-a). Son expression semble ubiquitaire (Bruzzaniti et coll., 1996), mais elle est préférentiellement associée aux cellules et tissus lymphoïdes comme les lymphocytes, le thymus, la rate et les ganglions (Meerabux et coll., 1996; Seidah et coll., 1996-a). Le gène de PC7 semble avoir un pouvoir oncogénique et serait impliqué dans une translocation entre les chromosomes 11 et 14, ce que favoriserait la maladie de Hodgkin et d'autres leucémies (Meerabux et coll., 1996). Les translocations chromosomiques sont généralement associées à des gènes présentant un rôle de facteurs de croissance (Rabbitts et coll., 1994), ce qui suggère que PC7 dont les substrats possibles ne sont pas encore bien identifiés, pourrait être impliquée dans la conversion de facteurs de croissance (Meerabux et coll., 1996).

Des études par immunofluorescence montrent une localisation périnucléaire de PC7, donc PC7 serait associée au réseau trans golgien (Munzer et coll., 1996; van de Loo et coll., 1997). Par immunocytochimie à l'or colloïdal, PC7 a été détectée dans des vésicules recouvertes de clathrine et dans des tubules semblant associés au réseau trans golgien dans les cellules de la lignée CHO (van de Loo et coll., 1997). Une colocalisation de PC7 avec la gamma-adaptine a été montrée dans ces mêmes vésicules, ceci pourrait signifier que PC7 a la possibilité de sortir de l'appareil de Golgi par des vésicules recouvertes de clathrine (van de Loo et coll., 1997).

Il ne semble pas exister de forme endogène tronquée et soluble de cette convertase (van de Loo et coll., 1997). Cependant, il a été montré qu'en supprimant le segment transmembranaire, une forme soluble, active et sécrétée peut être obtenue (Munzer et coll., 1996; van de Loo et coll., 1997). L'absence de l'association à la membrane entraînant la sécrétion, les régions transmembranaire et cytoplasmique contiendraient l'élément contrôlant la localisation de PC7 au réseau trans de l'appareil de Golgi (Munzer et coll., 1996; van de Loo et coll., 1997). Le motif de phosphorylation impliqué dans le contrôle de la localisation à l'appareil de Golgi de la furine et de PC5 n'est pas présent chez PC7 (Seidah et coll., 1996-a; van de Loo et coll., 1997). Un mécanisme impliquant une palmitoylation de la queue cytoplasmique, serait impliqué dans le contrôle du routage cellulaire de cette convertase (van de Loo et coll., 1997).

Les convertases PC7 et furine étant exprimées par les mêmes cellules et tissus, étant considérées appartenir aux mécanismes de la synthèse des protéines constitutives et étant toutes les deux localisées au réseau trans golgien, leur étude comparative peut nous aider à mieux comprendre leurs rôles respectifs.

## LE PANCRÉAS

Les cellules acineuses du pancréas exocrine ont servi de modèle à Palade, Jamieson (Jamieson et Palade 1967-a; Jamieson et Palade 1967-b) et Rothman (Rothman, 1975) dans l'étude des mécanismes de synthèse et de sécrétion cellulaire des protéines. Le pancréas a l'avantage de produire, puis d'emmagasiner une très grande quantité de protéines dans ses granules de la voie de sécrétion régulée. Cette caractéristique a facilité les premières études faites par autoradiographie, concernant le cheminement des protéines nouvellement synthétisées.

Le pancréas est formé chez l'embryon à partir de deux bourgeons de l'endoderme. Une excroissance du toit du duodénum amène à la formation de la partie dorsale et une évagination du plancher du duodénum ou du futur canal pancréatique, donne naissance à la partie ventrale du pancréas. Ces deux parties vont se rejoindre pour former un organe unique. Sa localisation est rétropéritonéale, derrière l'estomac. Chez l'humain, le pancréas est un organe allongé dont la tête se situe dans la concavité du duodénum et dont la queue

se termine près du hile de la rate. Chez le rat, il est accolé au duodénum. Recouvert d'une capsule de tissu conjonctif et de collagène, le pancréas est organisé en lobules; divisions formées par des septums de tissu conjonctif, en continu avec la capsule (Bockman, 1993).

Il y a deux catégories de glandes qui sont différenciées selon la destination de leurs produits de sécrétion. Il y a les glandes exocrines dont les produits de sécrétion sont déversés dans un canal et atteignent le milieu extérieur, et les glandes endocrines dont la sécrétion parvient à la circulation sanguine. Il y a trois types de sécrétion exocrine: la sécrétion mérocrine par exocytose, la sécrétion apocrine par perte d'une partie de la cellule et de son contenu, et la sécrétion holocrine dans laquelle la cellule constitue elle-même la sécrétion. Le pancréas est à la fois composé d'une glande endocrine; les îlots de Langerhans et d'une glande exocrine toutes deux à sécrétion mérocrine.

### ***Le pancréas exocrine***

Autant le pancréas endocrine est essentiel à l'homéostasie du glucose, autant le pancréas exocrine est essentiel pour la digestion des aliments. La partie exocrine du pancréas est composée de lobules formés par des acini, c'est à dire des grappes de cellules sécrétrices de forme pyramidale délimitant à l'apex un canal acinaire (lumière de l'acinus). Il s'agit d'une glande acineuse composée.

Le jus pancréatique est véhiculé vers le duodénum par le canal pancréatique qui débouche au niveau du sphincter d'Oddi. Le jus pancréatique contient les enzymes digestives et une solution d'ions bicarbonates sécrétée par les cellules pancréatiques ductales. Les sécrétions pancréatiques contiennent les enzymes pour la digestion des protéines, des acides nucléiques, des lipides et des glucides. Les ions bicarbonates servent à neutraliser l'acidité du chyme alimentaire sortant tout juste de l'estomac et donnent un environnement permettant l'action optimale des enzymes pancréatiques et intestinales.

La sécrétion d'enzymes est stimulée par la cholécytokinine et l'acétylcholine du système nerveux parasympathique (nerf vague) et le système nerveux entérique. La cholécytokinine est une hormone sécrétée par les cellules de la paroi intestinale. Cette hormone libérée par la présence de protéines et lipides dans l'intestin, est un stimulant important de l'activité synthétique des cellules acineuses. La sécrétine libérée par la présence d'acide chlorhydrique stimule pour sa part la libération par les cellules pancréatiques ductales, d'ions bicarbonates.

Les enzymes digestives pancréatiques sont produites sous leur forme inactive. Elles vont être activées par l'entérokinase sécrétée par la muqueuse duodénale et liée au plateau strié de cette muqueuse. L'entérokinase active le trypsinogène en sa forme active, la trypsine. La trypsine active ensuite les autres enzymes digestives pancréatiques. La trypsine convertit par exemple, le chymotrypsinogène, en chymotrypsine. La présence

au duodénum de l'entérokinase qui enclenche la cascade d'activation fait partie d'un mécanisme complexe d'inhibition pour éviter l'activation des enzymes de digestion pancréatique avant qu'elles ne soient rendues au système digestif.

### *Le pancréas endocrine*

Les îlots de Langerhans sont des amas de cellules qui sont dispersés dans le parenchyme exocrine. Ils forment au plus deux pour-cent du pancréas total, mais leurs rôles sont des plus importants. Dans une coupe de lame histologique, il est assez facile de les distinguer, car les cellules formant les îlots sont plus petites, nous apparaissent plus translucides et sont organisées de façon plus compacte que le reste du tissu exocrine. Quatre types cellulaires principaux composent ces mini-organes. Il s'agit des cellules bêta qui synthétisent l'insuline, des cellules alpha qui synthétisent le glucagon, des cellules delta pour la somatostatine et des cellules pp qui produisent le polypeptide pancréatique. Les cellules à glucagon sont plus nombreuses au niveau de la queue et les cellules pp au niveau de la tête de l'organe. Il y a également d'autres types cellulaires très peu représentés et qui ne sont présents que chez l'embryon. Les cellules à insuline sont majoritaires et situées davantage au centre, tandis que les autres types forment une couronne autour de l'îlot (Orci et coll., 1988). Les types cellulaires sont différenciables par leur morphologie ultrastructurale, par des méthodes de coloration spécifique et par immunocytochimie (Baskin et coll., 1984; Beaulieu et Kelly, 1990).

Les cellules de l'îlot sont innervées par le système nerveux autonome (sympathique et parasympathique) (Couplan, 1958). Des fibres nerveuses viennent directement en contact avec environ 10 % des cellules. Des jonctions communicantes "*Gap*" entre les cellules permettent une transmission du signal entre celles-ci (Meda, 1996). La stimulation parasympathique augmente la sécrétion d'insuline et de glucagon, et la stimulation sympathique diminue celle d'insuline (Beaulieu et Kelly, 1990).

Les sécrétions des glandes endocrines comme l'îlot de Langerhans, se retrouvent dans le sang sans passer par un canal. Chaque îlot est vascularisé par des artérioles qui se ramifient en un réseau hautement anastomosé de capillaires fenêtrés. Les capillaires qui drainent l'îlot vont à sa sortie, passer entre les acini exocrines, puis se déverser dans les veines interlobulaires. Il s'agit d'un système porte qui permet aux hormones endocrines d'agir sur la partie exocrine de l'organe (Williams et Goldfine, 1993) et à l'insuline d'avoir une action paracrine sur les cellules à somatostatine et à glucagon en périphérie de l'îlot (Orci et coll., 1988). Les hormones pancréatiques endocrines sont très importantes. Elles ont en plus de leurs rôles dans l'homéostasie du glucose, un effet sur le métabolisme énergétique général.

### *L'insuline*

Isolée en 1922, l'insuline est produite sous la forme d'un précurseur possédant deux liaisons disulfure. La pro-insuline est convertie en insuline par les convertases PC1 et PC2 (Baillyes et coll., 1992; Bennett et coll., 1992; Malide et coll., 1995). Les convertases agissent aux sites arginine-arginine et lysine-arginine, afin de libérer le c-peptide et donner la forme active d'insuline de 51 acides aminés (Steiner et coll., 1967; Malide et coll., 1995). Une fois ce clivage effectué au niveau des granules immatures (Orci et coll., 1986; Orci et coll., 1987), la carboxypeptidase E vient enlever les deux acides aminés basiques (Steiner et coll., 1996) qui ont servi de site de reconnaissance. Il y a ensuite concentration puis cristallisation de l'insuline et formation au niveau du granule de ce qu'on appelle le corps dense d'insuline (Beaulieu et Kelly, 1990).

L'insuline est l'hormone hypoglycémisante. Ses principaux rôles sont: d'augmenter l'entrée du glucose dans les cellules musculaires et les adipocytes, d'augmenter la synthèse des lipides dans les adipocytes et les cellules hépatiques, d'augmenter la synthèse du glycogène au niveau des cellules musculaires et hépatiques, de diminuer la glycolyse et de diminuer la synthèse et la dégradation des protéines. Le stimulus principal qui entraînera la décharge de l'insuline emmagasinée par la cellule bêta, est l'augmentation de la glycémie, mais également l'augmentation des acides aminés et des acides gras circulants. Ces conditions sont rencontrées suite à l'ingestion d'aliments. D'autres hormones peuvent influencer la libération d'insuline, surtout les hormones

hyperglycémiantes comme le glucagon, l'adrénaline, et les glucocorticoïdes (Beaulieu et Kelly, 1990).

### *Le glucagon*

Le rôle du glucagon est généralement antagoniste à celui de l'insuline, mais tout aussi important. Le pré-pro-glucagon est constitué de 179 acides aminés et le pro-glucagon de 159 acides aminés. Le pro-glucagon sous l'action des convertases, va générer plusieurs peptides. Dans le pancréas les cellules alpha produisent le GRPP ("*glucagon related pancreatic peptide*"), l'axapeptide et le glucagon de 29 acides aminés (Bataille, 1990). PC2 est la convertase la plus apte à effectuer ce clivage (Rouillé et coll., 1994 et 1997).

Le glucagon, est un hyperglycémiant puissant et sa cible principale est le foie où il provoque la glycogénolyse. Il induit aussi la néoglucogénèse à partir du glycérol provenant des tryglycérides et des acides aminées provenant de la dégradation des protéines. Le principal stimulus entraînant la libération de glucagon est la diminution du glucose sanguin. L'élévation de la glycémie, l'insuline et la somatostatine diminuent la sécrétion de glucagon (Bataille, 1990).

### *La somatostatine*

La somatostatine (ou GH-IH ("*growth hormone-inhibiting hormone*") est l'hormone inhibitrice impliquée dans presque tous les axes hormonaux. Il y a des cellules somatotropes dans l'adénohypophyse (ou le lobe antérieur de l'hypophyse), dans la muqueuse gastrique et duodénale, ainsi que dans le pancréas endocrine (Reichlin, 1987). La somatostatine est traduite en un précurseur de 92 acides aminés. Elle peut être ensuite produite sous deux formes actives; la somatostatine de 14 acides aminés (S-14) ou la somatostatine de 28 acides aminés (S-28). La S-14 est produite dans le pancréas (Patel et coll., 1981) et l'hypophyse suite à un clivage qu'on croit être fait principalement par la convertase PC2 de la voie de sécrétion régulée (Brakch et coll., 1995). Pour ce qui est de la forme constitutive S-28, produite par les cellules neuroendocrines entériques, elle semble pouvoir être générée autant par PACE4 que par la furine (Brakch et coll., 1995; Galanopoulou et coll., 1995).

### *Polypeptide pancréatique*

Le polypeptide pancréatique ou PP est sécrété suite à l'ingestion de nourriture. Il diminue les sécrétions gastriques et pancréatiques, et la motilité intestinale. Cette hormone est synthétisée sous la forme d'un précurseur contenant un site dibasique, qui doit être soumis à l'action d'une convertase (Wulff et coll., 1993), mais celle-ci n'a pas été encore identifiée.

## **OBJET DU PRÉSENT TRAVAIL**

Les processus de synthèse et de maturation auxquels sont soumis les protéines au cours de leur passage dans le réticulum endoplasmique rugueux puis de l'appareil de Golgi, sont le sujet de beaucoup d'études. Le pancréas est un modèle pour ce domaine d'étude. Il a permis des découvertes importantes dans le domaine de la physiologie, de la biologie cellulaire et de la biologie moléculaire de la synthèse des protéines et de leur sécrétion. Il en résulte un avancement majeur de nos connaissances, mais ces événements impliquent beaucoup d'éléments et une cascade d'étapes qui demandent encore à être investigués.

La maturation des pro-protéines en leurs formes biologiques actives, semble être déterminée par une multitude de facteurs dont l'action des convertases. Les convertases semblent être à leur tour, influencées par plusieurs conditions dont la spécificité du substrat, l'environnement intracellulaire (Benjannet et coll., 1992) et peut-être aussi le milieu extracellulaire. Il apparaît alors important de tracer la route intracellulaire de ces enzymes afin d'établir leurs rôles dans la synthèse des protéines destinées aux voies de sécrétion régulées et constitutives.

La compréhension en profondeur du rôle d'une protéine n'est possible que si les cellules qui la synthétisent sont identifiées et que la localisation intracellulaire est bien

connue et comprise. Les convertases furine et PC7 semblent être toutes les deux ubiquitaires, liées à la membrane de l'appareil de Golgi, impliquées dans la maturation de protéines associées à la voie de sécrétion constitutive, et reconnaissent des sites de protéolyse relativement semblables. La présente étude a pour but d'étudier la localisation de la furine et de PC7 dans le pancréas de rat. Nous avons d'abord examiné l'expression de l'ARN messager puis la localisation de la furine. La présence du messager de la furine a été identifiée par la méthode d'hybridation *In situ* en microscopie optique. La localisation de la protéine a ensuite été étudiée par immunofluorescence en optique et par immunocytochimie à l'or colloïdal par microscopie électronique ce qui rend possible la visualisation précise d'une molécule endogène au niveau intracellulaire. Afin de déterminer les formes de furine présentes dans le tissu pancréatique, nous avons effectué un immunobuvardage (transfert à la Western). Ensuite, nous avons investigué la localisation de l'autre convertase possédant un segment transmembraire et considérée associée au Golgi, soit la convertase PC7 (PC8,LPC). L'expression de PC7 au niveau du pancréas a été précédemment démontré par Seidah et ses collaborateurs (Seidah et coll., 1996-a). La méthode d'immunocytochimie à l'or colloïdal pour révéler PC7 nous permet de comparer la localisation au niveau intracellulaire de ces deux convertases. Une détection par immunobuvardage permet de déterminer le poids moléculaire de PC7 dans les cellules pancréatiques. Cette combinaison de méthodes morphologique et biochimique permet d'apporter des faits nouveaux sur la biologie cellulaire des convertases furine et PC7, et sur la physiologie de la sécrétion. Nous retrouvons la furine et PC7 associées aux éléments de la voie régulée autant dans le pancréas exocrine qu'endocrine. Ceci est un élément nouveau qui détient sûrement une signification physiologique importante.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### HYBRIDATION *IN SITU*

#### *Sondes*

L'hybridation a été effectuée avec des sondes d'ARN dirigée contre le messenger de la furine et de la chromogranine A (CGA), hapténisées avec la digoxygénine (DIG). La sonde contre le messenger de la furine correspond aux nucléotides 691-1935 de l'ADNc de rat (Misumi et coll., 1990; Schäfer et coll., 1993). La sonde a été hydrolysée en séquences d'environ 100 nucléotides (Seidah et coll., 1992). La sonde pour la détection de l'ARN messenger de la chromogranine A, a été utilisée comme contrôle interne positif dans nos études d'hybridation. Les sondes et le tampon de pré-hybridation, ont été fournis par le Dr Robert Day.

#### *Tissus utilisés*

Des tissus pancréatiques provenant de rats Sprague-Dawley ont été fixés par immersion dans du Bouin pendant 24 à 48 heures, lavés dans de l'eau, déshydratés dans des solutions d'éthanol de concentration croissante et enrobés dans de la paraffine. Des coupes de 5  $\mu$ m d'épaisseur ont été montées sur lame en employant de l'eau sans ARNase (traitée au diéthyl pyrocarbonate ou DEPC) puis gardées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

### ***Hybridation***

Les coupes de tissus ont été successivement traitées selon le protocole suivant: 1) déparaffinage dans du xylène deux fois pendant 5 minutes, réhydratation dans l'éthanol 99% et 95% deux fois pendant une minute, et rinçage dans l'eau traitée au DEPC pendant 5 minutes à la température de la pièce, 2) lavage dans du 2x citrate de sodium standard (SSC) pendant 10 minutes à 60°C puis rinçage dans l'eau traitée au DEPC à la température de la pièce, 3) les coupes de tissus sont ensuite mises dans du tampon Tris 0,05 M (pH 7,6) pendant 5 minutes à la température de la pièce, puis incubées dans la protéinase K (15 µg/ml dans du tampon Tris pH 7,6) une heure à 37°C dans une chambre humide et rincées dans du PBS pendant une minute à la température de la pièce, 4) fixation dans la paraformaldéhyde 0,4% pendant 20 minutes à 4°C et rinçage à l'eau traitée au DEPC, 5) incubation dans le tampon de pré-hybridation à 75% formamide pendant une heure à 37°C puis hybridation des sondes diluées dans le tampon de pré-hybridation pour la nuit à 37°C dans une chambre humide, 6) les coupes sont ensuite lavées dans du 2x SSC/30% formamide pendant 30 minutes à 37°C puis traitées à la RNase A (40 µg/ml dans 2x SSC et 10 mM MgCl<sub>2</sub>) une heure à 37°C, 7) lavages successifs de deux fois 5 minutes dans du 2x SSC/30% formamide et 1x SSC/30% formamide à 37°C puis deux fois 10 minutes dans 0,1x SSC/30% formamide à 60°C, 8) pour préparer la détection; incubation dans un tampon Tris 0,05 M (pH 7,6), NaCl 0,15 M et MgCl<sub>2</sub> 2 mM (TBS) à 0,1% Triton X-100 pendant 15 minutes à la température de la pièce, puis détection avec des anticorps anti-DIG couplés à la phosphatase alcaline diluée 1/500 dans du TBS/0,1% Triton pendant une heure à la température de la pièce et lavage dans le TBS deux fois pendant 5 minutes à la

température de la pièce, 9) rinçage dans l'eau traitée au DEPC pendant une minute puis incubation pour la nuit avec le milieu de révélation préparé avec les solutions du "*Nucleic Acid Detection kit*" (Boehringer Mannheim) selon la recette suivante: 10 ml de Tris 0,1 M, NaCl 0,1 M et 0,05 M MgCl<sub>2</sub> (pH 9,5), 35 µl de X-phosphate et 45 µl de 4-nitro blue tetrazolium chloride (NBT).

## ANTICORPS

Nous avons utilisé des anticorps polyclonaux levés chez le lapin. Les antigènes employés pour l'obtention des anticorps ont été fabriqués par la méthode des peptides antigéniques multiples (MAP) (Basak et coll., 1995). Cette méthode utilise un noyau de polylysine à 8 branches sur lesquelles sont greffées plusieurs copies d'une séquence linéaire. Une séquence de 13 acides aminés; Arg<sup>108</sup>-Val-Tyr-Gln-Glu-Pro-Thr-Asp-Pro-Lys-Phe-Pro-Gln<sup>120</sup> qui correspond à la partie N-terminale de la furine humaine a été utilisée (*hfurine*(108-120)-MAP). La similarité de la molécule humaine et celle de rat étant de plus de 90%, il semble approprié d'utiliser ces anticorps sur des tissus de ce dernier. Dans le cas de PC7, deux anticorps ont été utilisés, le premier dirigé contre la séquence Ala<sup>449</sup>-Ser-Tyr-Val-Ser-Pro-Met-Leu-Lys-Glu-Asn-Lys-Ala-Val-Pro-Arg-Ser<sup>465</sup>, située dans le domaine P, soit dans le domaine luminal près de la membrane plasmique (Munzer et coll., 1997). Ce peptide purifié a été utilisé pour faire un contrôle de spécificité. Le deuxième anticorps a été développé à partir de la séquence Ser<sup>105</sup>-Ile-His-Phe-Asn-Asp-Pro-Lys-Tyr-Pro-Gln-Gln-Trp-His-Leu-Asn-Asn-Arg<sup>122</sup>, correspondant au

18 premiers acides aminés en N-terminal de la forme mature de PC7. Ces anticorps ont été préparés et fournis par l'équipe du Dr. Nabil G. Seidah de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal.

## **IMMUNOFLUORESCENCE**

### *Tissus utilisés*

Le tissu pancréatique provenant de rats Sprague-Dawley a été fixé par immersion dans du Bouin pendant 24 à 48 heures, lavé dans de l'eau, déshydraté dans des solutions d'éthanol de concentrations croissantes et enrobé dans de la paraffine. Des coupes de 5  $\mu$ m d'épaisseur ont été montées sur lames.

### *Immunodétection*

Les coupes de tissu sont d'abord déparaffinées dans du xylène deux fois pendant 5 minutes, et réhydratées selon la séquence suivante: l'éthanol 100% deux fois cinq minutes, puis éthanol 95%, 70%, 30% pendant 5 minutes et eau puis PBS 5 minutes. Incubation dans l'anticorps reconnaissant la furine à une dilution de 1:50 pendant 2 heures à la température pièce, puis lavage du surplus d'anticorps dans des bains de PBS deux fois 6 minutes. L'anticorps secondaire, un anti-IgG de lapin couplé à la fluoroscéine (FITC) est ensuite utilisé à une dilution de 1:10 pendant une heure à la température pièce dans une

chambre humide à l'abri de la lumière. Ensuite, les lames sont lavées deux fois 6 minutes dans du PBS, trempées 5 minutes dans une solution de bleue d'Evans à 0,01% dans le PBS à 4°C et montées dans un milieu de PBS à 50%, Gycérol à 50% et DABCO (Diozabicyclo-octane) à 5% et conservées à l'abri de la lumière.

## IMMUNOCYTOCHIMIE À L'OR COLLOÏDAL

### *Tissus utilisés*

Les tissus pancréatiques proviennent de rats Sprague-Dawley normaux et de rats dont la sécrétion pancréatique a été stimulée. Le Carbamyl bêta-méthylcholine qui mime la stimulation cholinergique a été utilisé comme stimulant. L'injection (12 mg/kg) est intrapéritonéale. Les rats sont sacrifiés 3 heures après l'injection. Les tissus ont été fixés par immersion dans un tampon phosphate à 0,1 M (pH 7,4), à 1% glutaraldéhyde, pendant deux heures à 4°C. Ensuite, les tissus sont déshydratés dans du méthanol et enrobés soit dans du Lowicryl K4M (Bendayan, 1984-b), ou dans l'Unicryl (British Biocell; Cardiff, UK) à -20°C (Scala et coll., 1992). Des coupes de tissus de 80 nm furent déposées sur grille de nickel avec film de Parlodion et carbone, puis ensuite traitées pour l'immunocytochimie à l'or colloïdal.

### *Immunomarquage*

L'immunomarquage, des coupes de tissus a été effectué selon le protocole suivant (Bendayan, 1989): 1) vingt minutes sur une goutte de glycine 0,15 M dans du tampon phosphate 0,01 M à pH 7,4 (PBS), 2) dix minutes sur du PBS contenant 1% d'ovalbumine, 3) incubation sur une goutte d'anticorps contre la furine à une dilution de 1:10 ou contre le domaine P de PC7 à 7:100 ou contre le N-terminal de PC7 à 1:10 (ou solution d'anticorps adsorbée sur l'antigène) à la bonne dilution, dans une chambre humide durant toute la nuit à 4°C, 4) le surplus d'anticorps est ensuite lavé, puis les grilles sont incubées pendant 30 minutes sur une goutte de PBS contenant 1% d'ovalbumine, 5) incubation 30 minutes à la température de la pièce sur une goutte de protéine A préparée selon la méthode de Bendayan 1984 (Bendayan, 1984-b) ou d'anticorps secondaires anti-IgG de lapin conjugués à de l'or colloïdal de 10 nm, 6) les sections de tissus sont ensuite lavées et contrastées à l'acétate d'uranyle.

L'utilisation en étape préparatoire au protocole de base, d'un oxydant qui accroît l'accès aux sites antigéniques (solution aqueuse de sodium métapériodate saturée), a permis d'augmenter l'intensité du marquage au niveau des granules de sécrétion à insuline de la cellule bêta de l'îlot de Langerhans pour l'anticorps contre la furine.

Deux milieux d'enrobage ont été utilisés, soit du Lowicryl ou de l'Unicryl. L'Unicryl permet une meilleure préservation de la morphologie, principalement pour le réticulum endoplasmique rugueux. Le choix de l'un ou de l'autre de ces milieux d'enrobage dans le cas de la furine, ne donnait aucun changement dans la localisation du marquage, les deux milieux généraient la même détection antigénique.

### *Évaluation quantitative*

Une évaluation quantitative du marquage de régions d'intérêts des cellules sécrétrices du pancréas exocrine, a été faite de façon directe par planimétrie en employant le système Videoplan-2 (Carl Zeiss; Don Mills, Ontario, Canada). Plus de 30 micrographies représentant un total d'environ 20 cellules choisies de façon aléatoire ont été évaluées pour la furine et pour PC7. La densité de marquage des régions d'intérêts a été évaluée en nombre de particules par micromètre carré. Lors d'une première étape, la surface occupée par les compartiments cellulaires a été évaluée directement par planimétrie et ensuite, le nombre de particules d'or présent sur ces mêmes compartiments a été compté. Le rapport de ces valeurs nous a fourni la densité de marquage pour chacun des compartiments. Une évaluation statistique a été faite grâce à l'analyse du t-de Student. L'évaluation du pourcentage de particules d'or associé à la membrane limitante a été faite pour les grains de sécrétion à insuline et de zymogène. Une centaine de grains ont été choisie au hasard sur les mêmes micrographies utilisées pour l'évaluation de la densité de marquage. Le nombre de particules d'or situées à 10nm ou moins de chaque coté la membrane limitante

des granules de sécrétion a été évalué et divisé par le nombre total de particules d'or associées à la surface des granules.

## **IMMUNOBUVARDAGE DE LA FURINE**

### ***Homogénats***

Les protéines totales de cellules exocrines isolées, de cellules PC12 dérivant de cellules tumorales de la médulla surrénale de rat (Tischler et Greene, 1978), des cellules bêtaTC3 dérivant des cellules d'un insulinome (Nagamatsu et coll., 1991), de rein et du milieu de culture de cellules BSC40 transfectées du gène de la furine, ont été extraites dans un tampon (Tris/Cl 50 mM (pH 7.4), EDTA 2.5 mM, NaCl 150 mM, et sodium azide 0.02 M) avec des inhibiteurs de protéases (leupeptine 2 µg/ml, laprotinine 2 µg/m, A-PMSF 100 Mg/ml, pepstatine 100 µm/µM). La concentration totale en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

### ***Isolation des cellules exocrines pancréatiques***

Les pancréas de 4 rats ont été homogénéisés aux ciseaux dans du HBSS (SIGMA H-2387), puis digérés dans une solution de EDTA 2 mM, de collagénase 2 mg/ml, et de dispase 0,48 U/ml pendant 20 minutes à 37°C. Ensuite, lavage deux fois 5 minutes dans du HBSS puis incubation sous agitation dans une solution de dissociation de EDTA 2 mM

dans du HBSS une heure à 37°. La préparation est ensuite centrifugée 5 minutes à 500 rpm, puis lavée et ressuspendue dans du HBSS. Ensuite, la préparation est filtrée deux fois, une première fois à travers un filtre de 500 µm puis à travers un filtre de 100 µm. Une centrifugation de 5 minutes à 500 rpm est faite entre et après les filtrations. Ensuite, pour la séparation des cellules exocrines, la préparation est mise sur un gradient de HBSS et de sérum de veau (Gibco 200-6170AJ) pendant 15 minutes à température pièce. Le surnageant est rejeté et les cellules isolées sont lavées dans du HBSS, puis congelées avant leur utilisation.

### ***Migration et immunobuvardage***

Migration des protéines (40 µg) dans un gel dénaturant à 7.5% de polyacrylamide et transfert par électrotransfert sur membrane de PVDF (difluorure de polyvinylidène). La membrane a été incubée pendant une heure à température de la pièce dans une solution de TBS à 5% de lait en poudre. Les anticorps contre la furine ont été dilués à 1:500 dans la solution de blocage et incubés toute la nuit. Après, la membrane est lavée deux fois 15 minutes dans du TBS à 1% tween 20 puis incubée dans la solution de lait, deux fois 15 minutes. La détection est faite avec un anticorps secondaire conjugué à l'iode<sup>125</sup> qu'on incube pendant 3 heures à température de la pièce. La membrane est lavée dans du TBS avec 1% tween 20 quatre fois pendant 15 minutes. La membrane est exposée pour une période appropriée à -80°C et le signal est révélé sur film (Kodak, X-OMAT-AR).

## **IMMUNOBUVARDAGE DE PC7**

### ***Homogenats***

Du tissu pancréatique total a été extrait dans un tampon (Tris/Cl 50mM (pH 7.4), EDTA 2.5mM, NaCl 150 mM, et sodium azide 0.02M) avec des inhibiteurs de protéases (leupeptine 2 µg/ml, laprotinine 2 µg/m, A-PMSF 100 Mg/ml, pepstatine 100 µm/µM). La concentration totale en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford.

### ***Migration et immunobuvardage***

Migration des protéines (80 µg) dans un gel dénaturant à 7.5% de polyacrylamide et transfert par électrotransfert sur membrane de nitrocellulose. Le kit de detection de chemiluminescence de Boehringer Mannheim a été utilisé. La membrane a été incubée dans la solution de blocage à 1% pendant une heure à température pièce. Les anticorps contre le domaine P de PC7, ont été dilués 1:1000 dans la solution de blocage à 0,5% et incubés avec la membrane, toute la nuit. Après, la membrane est lavée deux fois 15 minutes dans du TBS avec 1% tween 20 puis incubée dans la solution de blocage deux fois 15 minutes. La détection est faite avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (POD,HRP) qu'on incube pendant une heure à la température de la pièce. La membrane est lavée dans du TBS avec 1% tween 20 quatre fois pendant 15 minutes. La membrane est mise à la noirceur dans la solution de révélation pendant 60 secondes à la température de la pièce, puis la réaction est révélée sur film Kodak X-OMAT-A.

# RÉSULTATS

## FURINE

### *Hybridation in situ*

L'hybridation *in situ* montre la présence de l'ARN messenger de la furine, exprimé par les cellules pancréatiques de rat. La figure 2a illustre clairement le signal de couleur rose-mauve représentant les ARNm de la furine au niveau du réticulum endoplasmique, du côté basal des cellules du pancréas exocrine et de de l'îlot de Langerhans. En guise de contrôle positif du protocole, l'hybridation *in situ* de la chromogranine A (CGA) a été faite en parallèle avec celle de la furine. Nous retrouvons l'ARN messenger de la CGA exprimée dans les cellules des îlots de Langerhans et non dans les cellules exocrines (figure 2b), ce qui est en accord avec la littérature (Eskeland et coll., 1996). Notons que les granules de sécrétion des cellules exocrines nous apparaissent de couleur mauve-noir. Nous avons observé le phénomène avec différentes sondes (insuline, amylase, furine, chromogranine A). Cet artéfact semble être causé par un dépôt non spécifique du chromogène lorsque l'incubation dans la solution de révélation est faite durant toute la nuit.

### ***Immunofluorescence***

Les résultats en immunocytochimie, montrent que le messenger de la furine détecté par hybridation *in situ*, est transcrit en protéines. Nous détectons par immunofluorescence, la présence d'un signal apparaissant en blanc du côté apical des cellules acineuses du parenchyme exocrine (figure 3a et 3b) et également au niveau de l'îlot de Langherans (figure 3b).

### ***Microscopie électronique***

#### ***Pancréas exocrine***

En utilisant l'immunocytochimie par microscopie électronique, la furine a été mise en évidence par des particules d'or colloïdal au niveau des cellules sécrétrices du pancréas exocrine. Le réticulum endoplasmique rugueux (figure 4a, 4b et 4c) et les régions golgiennes (figures 4a et 4b) présentent un marquage. La figure 4a montre une région golgienne avec des saccules apparaissant clairement marqués de la face cis à la face trans. Un marquage a été observé dans les vacuoles de condensation, dont la figure 4b montre un exemple particulièrement représentatif. Les grains de sécrétion de la voie régulée qui apparaissent aux figures 4a à 4d, arborent également un marquage. Le signal des granules de sécrétion et des vacuoles de condensation est réparti dans l'ensemble du granule, mais une partie du marquage est localisée plus spécialement près de la membrane limitante. Ce marquage représente une molécule associée davantage à la membrane plutôt que soluble

dans le contenu. Des exemples de cette observation sont mis en évidence aux figures 4a, 4b et 4c. Le contenu des lumières des acini contenant du suc pancréatique présente également un marquage, ce que nous pouvons voir à la figure 4d. Remarquons aussi à la figure 4d, que les microvillosités sont peu marquées et que les particules d'or colloïdal semblent bien démontrer la localisation d'une molécule soluble présente dans le canal acinaire. Le contrôle de spécificité, illustré à la figure 4e, a permis de faire substantiellement diminuer le nombre de particules d'or.

Des tissus de rat dont la sécrétion pancréatique a été stimulée de façon pharmacologique, ont également été étudiés (figure 4f). La densité de marquage (tableau 1D) obtenue au niveau des grains de sécrétion est semblable à ce que l'on obtient pour des rats normaux. Cependant, les microvillosités des lumières des acini chez les rats stimulés, semblent davantage marquées (figure 4f).

### *Pancréas endocrine*

Au niveau des cellules endocrines des îlots de Langerhans, le marquage a varié selon la nature de la cellule. Les cellules à insuline contiennent de la furine. Les figures 5a et 5b montrent des granules de sécrétion d'insuline arborant un marquage très évident. Les particules d'or sont retrouvés au niveau même de l'insuline, autour dans le halo blanc et davantage en périphérie près de la membrane du granule. Ces observations sont faites à

la fois au niveau des grains matures et immatures. La figure 5a, montre une région golgienne qui présente un marquage. Signalons que, selon les données disponibles dans la littérature concernant l'action et la localisation possible de la furine, nous avons porté une attention particulière aux membranes cellulaires des cellules de l'îlot, mais aucun marquage révélateur n'y a été retrouvé. La figure 5c montre les résultats du contrôle de spécificité d'une section de cellule à insuline.

Au niveau des granules de sécrétion des cellules à somatostatine, dont un exemple est montré à la figure 6, aucun marquage précis ou significatif n'a été obtenu. Les cellules sécrétrices de glucagon (figure 7) démontrent pour leur part un signal assez élevé. Des particules d'or sont retrouvées sur tout le contenu du contenu des grains de sécrétion. Notons, qu'une partie du signal se retrouve également en bordure du granule, c'est à dire qu'il pourrait représenter une molécule associée à la membrane.

### *Évaluation quantitative*

Les tableaux 1A à 1C rapportent les densités de marquage obtenues dans divers compartiments cellulaires et organites des cellules acineuses et à insuline du pancréas. Ces chiffres permettent de confirmer dans un plus grand échantillon, les résultats montrés dans le nombre restreint de figures présenté ici. Remarquons que la densité de marquage augmente le long des compartiments de la voie de sécrétion. Ceci reflèterait la

condensation de la protéine tout au long de son parcours à travers les éléments de la voie de sécrétion régulée. C'est à dire que les plus faibles densités de marquage ont été obtenues pour le réticulum endoplasmique rugueux, ce marquage double au niveau de la région golgienne et continu d'augmenter dans les vacuoles de condensation ou granules immatures. La densité est de 33,02 particules d'or/ $\mu\text{m}^2$  dans les granules de zymogène et 26,27 particules d'or/ $\mu\text{m}^2$  au niveau des granules matures d'insuline. La deuxième colonne des tableaux contient les densités de marquage obtenues lors du contrôle de spécificité des anticorps. La densité de particules d'or obtenue a été évaluée à 135,55 particules d'or/ $\mu\text{m}^2$  pour les cellules à glucagon (tableau 1C). Une densité de marquage subtotale a été obtenue dans les mitochondries, malgré que celles-ci ne devraient pas contenir de convertases. Mentionnons que les noyaux et les mitochondries avaient un signal plus élevé que le bruit de fond observé de façon générale sur le reste des éléments non susceptibles d'être marqués, comme les régions riches en actine ou dans le tissu conjonctif. Il peut s'agir d'une réaction croisée avec des protéines mitochondriales ayant des sites antigéniques pouvant être reconnus par nos anticorps.

Nous avons évalué le pourcentage de particules d'or pouvant être associé à la membrane des grains de sécrétion matures par rapport à celui associé davantage au contenu (tableau 3). Nous obtenons une valeur de 21% de particules d'or associées à la membranaire contre 79% associées à la surface des granules de zymogène et de 24% membranaire contre 76% associées au contenu pour les grains matures d'insuline. Cette évaluation a également été faite pour les tissus de rats stimulés, nous obtenons une valeur

de 24% de particules associées à la membrane des membranes des granules de zymogène contre 76% dans le contenu.

### *Immunobuvardage*

L'immunobuvardage nous permet également de détecter la présence de la furine au niveau des cellules pancréatiques. Nous obtenons deux bandes, une de 80kDa et une autre de 76kDa (figure 8). Nous avons également fait la détection biochimique de la furine dans les cellules PC12 dérivant de cellules tumorales de la médulla surrénale de rat, dans les cellules bêtaTC3 dérivant des cellules d'un insulinome, dans les cellules rénales de rat et dans le milieu de culture de cellules BSC40 transfectées du gène de la furine. Nous avons détecté des bandes de mêmes poids moléculaires soit de 76kDa et de 80kDa au niveau du pancréas, dans les deux lignées cellulaires et dans les cellules rénales. Les cellules BSC40 secrètent pour leur part une forme soluble de 82kDa. Nous obtenons de fortes bandes de poids moléculaire faibles. Ces bandes seraient des produits de dégradation puisque leur intensité augmente alors que celle des bandes de 76kDa et 80kDa diminue, lorsque l'extrait de protéines est utilisé à plusieurs reprises, c'est à dire congelé et dégelé plusieurs fois. Le fait que les migrations obtenues avec le tissu pancréatique et les autres cellules et tissus connus pour exprimer la furine donnent les mêmes résultats, nous confirme la présence de la furine au niveau des cellules pancréatiques. Malheureusement, il semblerait que la furine soit une protéine instable et rapidement dégradable puisque aussi bien le

pancréas que les autres cellules et tissus, présentent plusieurs bandes de produits de dégradation.

## **PC7**

### *Microscopie électronique*

#### *Pancréas exocrine*

Les cellules sécrétrices du pancréas exocrine contiennent la convertase PC7, tel que détectée par immunocytochimie à l'or colloïdal utilisant l'anticorps dirigé contre la région N-terminal. Ceci est illustré aux figures 9a et 9b. Nous obtenons un signal au niveau du réticulum endoplasmique rugueux, des saccules golgiens de la face cis à la face trans, et au niveau des vacuoles de condensation (figures 9a). Les grains de sécrétion de la voie régulée apparaissant aux figures 9a et 9b, présentent également un marquage. Les granules de zymogène et les vacuoles de condensation ont un signal réparti sur l'ensemble de la surface du granule, cependant une partie du marquage semble se localiser plus spécialement sur le contour, c'est à dire pouvant représenter une molécule de PC7 associée à la membrane. Les figures 9a et 9b mettent en évidence ce marquage semblant davantage associé à la membrane limitante du granule. Les lumières acineuses sont marquées au niveau du jus pancréatique et également au niveau des microvillosités (figure 9b).

### *Pancréas endocrine*

Les résultats obtenus pour le pancréas endocrine avec deux anticorps, soit un dirigé contre le N-terminal et l'autre contre le domaine P de PC7, sont présentés aux figures 10a à 10c, 11 et 12. L'îlot de Langerans nous donne un marquage différent selon la nature de la cellule.

Nous obtenons un marquage important dans les cellules bêta productrices d'insuline (10a et 10c). Les régions golgiennes présentent un signal qui est significatif mais faible, et uniformément réparti dans tous les saccules de l'appareil de Golgi. L'anticorps reconnaissant le N-terminal de PC7 (figure 10c) donne un signal fort associé aux granules de sécrétion immatures qui bourgeonnent au niveau de réseau trans golgien. Les granules de sécrétion d'insuline matures arborent aussi un marquage très évident (figures 10 a et 10c). Les granules immatures présentent des particules d'or colloïdal sur tout leur contenu. Les granules matures ont un marquage se situant davantage au niveau du corps dense d'insuline. Un contrôle de spécificité est illustré à la figure 10b et démontre une diminution marquée du marquage. Comme nous avons mentionné dans le cas de la la furine, les membranes cytoplasmiques ont été observées avec attention, mais aucun marquage n'y a été trouvé de façon probante.

Les cellules à somatostatine ne présentent aucun marquage significatif au niveau de leurs granules de sécrétion (figure 11). Le même résultat est obtenu au niveau des cellules sécrétrices de glucagon (figure 12), dont les granules de sécrétion ne contiennent pas de signal significatif.

### *Évaluation quantitative*

Les densités de marquage obtenues dans les cellules pancréatiques exocrines et endocrines au niveau des divers compartiments cellulaires impliqués dans la synthèse et la sécrétion des protéines, sont rapportées dans les tableaux 2A et 2B. La densité du signal de PC7 augmente selon le compartiment, ce qui montre la condensation de la protéine tout au long de son parcours avant sa sécrétion. Il est cependant à noter, qu'une densité beaucoup plus élevée est obtenue (171,00 particules d'or/ $\mu\text{m}^2$ ) au niveau des granules immatures pour l'anticorps reconnaissant une séquence du N-terminal. Le tableau 2B présente également les densités obtenues pour le contrôle de spécificité de l'anticorps reconnaissant la séquence d'acides aminés situés au niveau du domaine P. Tout comme pour la furine, nous pouvons noter que la densité de particules d'or au niveau des mitochondries n'est pas négligeable. Cet artéfact semble être une caractéristique de nos anticorps contre les convertases.

Nous avons évalué le pourcentage de particules d'or semblant être associé à la membrane et celui associé davantage au contenu des granules de sécrétion matures. Nous obtenons une valeur de 39% membranaire contre 61% associé au contenu dans le cas des granules de zymogène et de 13% contre 87% pour les grains matures d'insuline (tableau 3).

### *Immunobuvardage*

La figure 13 montre la détection, par immunobuvardage utilisant l'anticorps contre le domaine P de PC7, d'une bande de 89kDa et d'une autre de 101kDa. Ces deux bandes correspondent selon la littérature (Munzer et coll., 1997; Van de Loo et coll., 1997), à la Pro-PC7 et à la PC7 mature. Tout comme dans le cas de la furine, nous obtenons des bandes de plus bas poids moléculaire, que nous croyons être des bandes non spécifiques ou de dégradation.

## DISCUSSION

Lorsque nous avons entrepris cette étude, les données disponibles dans la littérature concernant l'expression, la localisation et les rôles joués par la furine, provenaient d'études *in vitro* et *in vivo* utilisant des lignées cellulaires possédant majoritairement la voie de sécrétion constitutive. La furine avait donc été surtout étudiée dans des cellules transformées où son expression était induite ou augmentée. Depuis, une présence endogène a été démontrée dans des tissus de glandes exocrines, soit dans le pancréas exocrine au jour 18 de gestation (Kayo et coll., 1996-a) et dans la glande sous-maxillaire de rat (Farhadi et coll., 1997). Cette convertase a été également détectée dans les vésicules de sécrétion isolées de l'adénohypophyse et de la médullo-surrénale bovine (Hill et coll., 1995), ainsi que dans les cellules de la lignée corticotrope AtT-20 (Dittié et coll., 1997). Pour ce qui est de la convertase PC7, sa découverte est plus récente (Seidah et coll., 1996-a; Bruzzaniti et coll., 1996). Elle est considérée dans la littérature, tout comme l'était la furine au départ, comme étant uniquement associée aux éléments de la voie de sécrétion constitutive et localisée au réseau trans golgien (Munzer et coll., 1997; Van de Loo et coll., 1997). La présente étude est la première à montrer par microscopie électronique la présence des convertases furine et PC7 dans les compartiments de la voie de sécrétion régulée.

## FURINE

### *Pancréas exocrine*

La convertase furine nous apparaît être une composante endogène du pancréas de rat. Au niveau du pancréas exocrine, son ARN messenger semble être transcrit de façon uniforme dans toutes les cellules du parenchyme, tel que révélé par hybridation *in situ* (figure 2a). Les ARN messagers de la furine sont traduits en une protéine, car nous la détectons par immunofluorescence dans les cellules acineuses (figure 3a et 3b). L'utilisation de la microscopie électronique nous a permis d'approfondir notre étude et de révéler la localisation de la furine tout au long de la voie de sécrétion régulée. En évaluant de façon parallèle les données du tableau 2A et les figures 4a à 4f, nous pouvons voir que la furine est présente dans le réticulum endoplasmique rugueux, dans l'appareil de Golgi de la face cis à la face trans, dans les vacuoles de condensation, dans les granules de sécrétion, ainsi que dans les lumières des acini et des canaux pancréatiques. Nous avons également fait la détection par immunocytochimie de la furine au niveau de la glande salivaire sous-maxillaire de rat. Nous y avons tout comme au niveau de pancréas, retrouvé la furine au niveau des granules de la sécrétion régulée (résultats non montrés).

Les granules de sécrétion arborent un marquage semblant être associé à la furine membranaire à 21% et soluble dans le contenu du granule à 79%. Ceci suggère que la forme soluble de la furine, soit celle de 80kDa qui résulte de la perte de la région transmembranaire, est présente dans les granules de zymogène (Vidricaire et coll., 1993).

De retrouver la furine sous une forme soluble dès les vacuoles de condensation, peut représenter un indice du micro-environnement nécessaire et du lieu potentiel où peut s'effectuer cette transformation post-traductionnelle qu'est la perte de l'association à la membrane. La littérature donne peu d'information en ce qui concerne les conditions et les mécanismes qui entourent cette délétion d'une partie de la molécule, mais il a été démontré que ce clivage peut s'effectuer dans un environnement acide et requiert la présence de calcium (Vey et coll., 1994). Le réseau trans golgien et les vésicules de sécrétion sont donc propices à la perte de l'association à la membrane.

Nous détectons la furine dans les lumières des acini au niveau du suc pancréatique, elle est donc sécrétée par les cellules du pancréas exocrine sous sa forme soluble. La possibilité de la sécrétion de la forme soluble est admise dans la littérature (Vidricaire et coll., 1993; Paleyanda et coll., 1997), mais a déjà été considérée comme un événement artificiel causé par une surexpression dans les cellules transfectées par le gène de la furine. Jusqu'à maintenant, la furine n'a été détectée ni dans le sang, ni dans d'autres liquides physiologiques. Une forme courte de furine de 80kDa, a cependant été détectée, sécrétée dans le lait maternel de souris transgéniques pour la furine et la protéine C humaine (Paleyanda et coll., 1997). Le pancréas nous apparaît donc être un organe qui, en condition normale, secrète la furine dans un liquide physiologique de l'organisme, soit le suc pancréatique. La glande sous-maxillaire qui synthétise cette même convertase (Farhadi et coll., 1997), pourrait également la sécréter par les granules de sécrétion de la voie régulée. Nous apportons une évidence que ce phénomène survient dans des

conditions physiologiques. La possibilité de la perte du segment transmembranaire peut maintenant nous apparaître comme une caractéristique intrinsèque de la molécule pancréatique. Il a été démontré que les régions transmembranaire et cytoplasmique de la furine ne sont pas importantes dans l'activité de cette convertase (Hatsuzawa et coll., 1992), mais plutôt impliquées dans son accumulation à l'appareil de Golgi et dans le routage cellulaire (Schäfer et coll., 1995). Ce qui suggère la possibilité d'une activité physiologique extracellulaire de la furine sécrétée par les glandes exocrines.

La furine est une protéase à sérine similaire à d'autres enzymes sécrétées par le pancréas exocrine, mais il demeure qu'il est surprenant de retrouver une convertase dans les granules de zymogène. En effet, les enzymes digestives pancréatiques ne sont normalement activées qu'au niveau du duodénum. Le pouvoir protéolytique de la furine devrait être inhibé jusqu'à atteindre le système digestif, pour qu'on puisse envisager son rôle dans l'activation d'une enzyme pancréatique. L'association de la furine avec son pro-segment est proposée comme un processus intra-moléculaire d'inhibition (Nakayama, 1997; Molloy et coll., 1994; Seidah et Chrétien, 1997). Dans les cellules pancréatiques, cette association pourrait peut-être se poursuivre au delà de l'appareil de Golgi, et inhiber avant son arrivée au duodénum, l'action de la furine. La furine pourrait également être un produit de sécrétion des cellules acineuses et avoir un substrat d'origine non pancréatique au niveau du duodénum au même titre que les autres enzymes pancréatiques. Nous pouvons également évoquer la possibilité que la furine soit sécrétée pour être éliminée, après qu'elle ait agi plus tôt dans la voie de sécrétion.

Des protéines que l'on croit associées uniquement à la voie constitutive et qui se retrouvent également dans la voie régulée n'est pas un fait nouveau, le facteur de croissance NGF en est un exemple. En effet, ce facteur de croissance a été localisé au niveau des granules de sécrétion de la glande sous-maxillaire (Gresik et coll., 1994). De plus, une colocalisation de la furine avec le NGF, y a été montrée (Farhadi et coll., 1997). La capacité de la furine à effectuer la conversion du pro-NGF a été étudiée et établie (Bresnahan et coll., 1990; Seidah et coll., 1996-b). La maturation de facteurs de croissance par la furine est une hypothèse qui peut être proposée pour le rôle joué par cette convertase au niveau du pancréas exocrine.

Nous devons nous demander quels sont les mécanismes contrôlant le routage de la furine au niveau de la cellule acineuse. La perte de son association à la membrane peut être un élément important. Nous détectons par immunobuvardage à la Western deux formes de furine dans les cellules acineuses pancréatiques. Il s'agit de la forme de 80kDa et d'une autre plus courte de 76kDa. Hill et ses collaborateurs (Hill et coll., 1995) dans une étude mentionnée plus tôt, ont également identifié ces deux formes solubles dans des granules de sécrétion régulée. La perte d'un segment supplémentaire pourrait être un élément jouant un rôle dans l'entrée au niveau des vésicules de condensation (Hill et coll., 1995). Une agrégation des molécules de furine a été rapportée comme induisant le routage de la furine aux lysosomes. Cette agrégation se ferait par la partie luminale de la protéine et pourrait également être impliquée dans l'entrée de la furine dans les vésicules de condensation de la voie régulée (Wiling et coll., 1997). Hill et ses collaborateurs ont

déecté par immunobuvardage une bande de 141kDa associée aux granules isolés, il pourrait s'agir de molécules de furine agglomérées. Les protéines produites par les cellules exocrines vont emprunter à 90% la voie de sécrétion régulée. Nous pouvons imaginer que dans ce type de cellule, la furine suive le flot de protéines et emprunte cette voie en quelque sorte par défaut. Il semblerait alors que dans les cellules possédant principalement la voie régulée, l'élément permettant la rétention de la furine à l'appareil de Golgi manquerait.

Les formes de 80kDa et de 76kDa ont été détectées dans l'étude de Hill et ses collaborateurs, associées à la fois à la membrane des granules, et dans la fraction du contenu. Les grains de zymogène contiendraient donc ces deux formes de furine. Les formes courtes sont des molécules de furine ayant perdu le segment transmembranaire; l'association à la membrane nécessite alors une molécule intermédiaire. La membrane des granules de zymogène du pancréas exocrine, contient des protéines comme la GP-2, qui semblent jouer un rôle dans la formation des granules puis dans l'organisation spatiale de ses composants (Wagner et Williams, 1994). L'association de la furine avec ces éléments peut être suggérée pour expliquer son entrée dans la voie régulée puis son association avec la membrane des granules de sécrétion.

La queue cytoplasmique possède des séquences signales de rétention au réseau trans golgien (Schäfer et coll., 1995) et pour le retour de la furine de la membrane plasmique

à l'appareil de Golgi par la voie des endosomes (Shäfer et coll., 1995; Voohees et coll., 1995). La cellule semble donc orchestrer les mécanismes de sécrétion par des éléments du cytoplasme. Une association du domaine cytoplasmique de la furine avec le complexe d'adaptines AP-1, a été montrée dans les vésicules immatures de la lignée cellulaire AtT-20 (Dittié et coll., 1997). Cette lignée cellulaire dérive des cellules neuroendocrines de l'adénohypophyse qui synthétisent normalement l'hormone corticotrope. Des études ont montré que des acides aminés de la queue cytoplasmique pourraient subir une phosphorylation par l'enzyme CKII (Jones et coll., 1995). L'interaction de la furine avec le complexe AP-1 serait également dépendant de cette phosphorylation (Dittié et coll., 1997). Ce processus pourrait intervenir dans le routage de la furine dans la voie de sécrétion régulée au niveau du pancréas (Dittié et coll., 1997), mais la forme complète membranaire ne semble pas être présente dans les granules de zymogène. La phosphorylation ou un signal d'une autre origine, impliquant le domaine cytoplasmique, pourrait peut-être induire la perte de l'association à la membrane. Il y a donc plus d'une supposition pouvant être faite concernant les mécanismes expliquant la présence de la furine dans les granules de zymogène pancréatiques.

Les densités de marquage obtenues par morphométrie indiquent une augmentation de la concentration de la furine tout au long de la voie de sécrétion. Nous avons regardé si des changements dans la production de furine survenaient dans le pancréas de rat soumis à des conditions de stimulation. La densité au niveau des grains de zymogène ne change pas de façon significative. La furine semble réagir aux stimulations de façon parallèle aux

autres composants du granule (Bendayan et coll., 1995). Cependant, cette expérience nous a permis d'observer de façon plus significative la présence de furine associée aux microvillosités des acini. Il y aurait donc bel et bien au niveau des granules de zymogène, des molécules de furine solubles et d'autres associées à la membrane.

L'hypothèse suivante peut être émise: la forme de 80kDa pourrait être associée à des protéines de la membrane du granule de zymogène, puis dans des conditions particulières, la perte d'un segment supplémentaire entraînerait la dissociation de la membrane du complexe furine-protéines membranaires, et permettrait la sécrétion de la forme de 76kDa dans le suc pancréatique. La forme de 80kDa pourrait être pour sa part recyclée avec la membrane du granule et retourné à l'appareil de Golgi. Plusieurs facteurs pourraient agir conjointement dans l'aiguillage des compartiments que peut emprunter la furine dans la cellule.

### ***Pancréas endocrine***

Les cellules de l'îlot de Langerhans synthétisent la furine (Kayo et coll., 1996-a). Ce qui avait déjà été établi et que nous confirmons par hybridation *in situ* en microscopie optique et par immunodétection en microscopie optique et en électronique. La technique d'immunocytochimie en microscopie électronique nous a donné la possibilité d'étudier la

localisation de la furine en détail, soit dans chacun des compartiments de chaque type cellulaire de l'îlot.

La microscopie électronique nous fait voir que les cellules à somatostatine ne présentent pas de marquage significatif pour la furine au niveau des granules de sécrétion. La cellule à somatostatine du pancréas sécrète par la voie régulée de façon très majoritaire la forme S-14 de somatostatine (Patel et coll., 1981). La furine dans des études *in vivo* s'est montrée apte à effectuer le clivage de la pro-somatostatine pour former la S-14 à partir de la S-28, mais uniquement dans des conditions de surexpression de furine (Galanopoulou et coll., 1995). Ces informations sur la conversion de la pro-somatostatine ne semblent pas à date impliquer la furine. L'absence de détection d'un antigène ne signifie pas automatiquement qu'il n'est pas présent. La furine au niveau des granules de somatostatine n'est peut-être pas présente à un niveau assez élevé pour que nous puissions la détecter. Une conformation tridimensionnelle particulière de la furine ou l'association d'une autre protéine, peuvent également empêcher l'accès de notre anticorps au site antigénique.

Nous retrouvons la furine dans les cellules alpha productrices de glucagon. La furine se trouve dans la voie de sécrétion régulée, tout comme au niveau de la partie exocrine de la glande. Nous obtenons un marquage dans le contenu des granules de sécrétion, pouvant être associé aux formes solubles de furine dont la partie transmembranaire a été tronquée,

et un marquage bordant la membrane du granule pouvant correspondre à la furine membranaire ou associée à la membrane par l'intermédiaire d'un autre élément. Le pro-glucagon possède plusieurs séquences consensus pouvant potentiellement être reconnues par la furine. La PC2 est déjà considérée comme étant la convertase qui effectue le clivage générant la forme active pancréatique de glucagon (Rouillé et coll., 1994). La furine reconnaît un éventail plus grand de séquences consensus que la convertase PC2. Il se pourrait que les deux convertases effectuent des clivages protéolytiques aux mêmes endroits ou qu'il y ait des sites de clivage alternatifs. Nous savons déjà que les cellules alpha du pancréas et de l'intestin, productrices de glucagon, forment des peptides différents en n'utilisant pas les mêmes sites de clivage. La présence conjointe de ces deux convertases, amène à considérer des actions complémentaires. Il pourrait également y avoir redondance dans l'action de la furine et de PC2.

Le marquage obtenu dans les granules de sécrétion d'insuline dans les cellules bêta, semble correspondre à la présence d'une furine associée autant à la membrane qu'au contenu des grains matures et immatures. Nous pouvons ici remarquer que la furine soluble semble apparaître dès les granules immatures. L'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique sont très peu marqués dans ces cellules. Les sites Arg-Arg et Lys-Arg aux niveaux desquels s'effectue le clivage de la pro-insuline, peuvent être des sites propices à l'action de la furine (Vollenweider et coll., 1995). La furine pourrait donc avoir une action complémentaire ou identique à PC1 et/ou PC2, mais nous devons la supposer faible, car PC1 et PC2 semblent déjà jouer ce rôle. Nous ne pouvons confirmer si la furine est

également au niveau de la voie constitutive, car la méthode employée ne permet pas de discerner facilement les vésicules appartenant à cette voie qu'on pense être petite et voyageant rapidement. Le cheminement par la voie constitutive devrait entraîner la furine à la surface cellulaire de la cellule. Nous ne retrouvons pas de particules d'or de façon significative sur les membranes plasmiques des cellules bêta.

Il y a d'autres éléments dans les granules sur lesquels les convertases pourraient agir. Nous avons parlé du rôle possible de la pro-région de certaines convertases comme inhibiteur ou chaperone intramoléculaire. PC2 semble utiliser un mécanisme différent. L'activation de la PC2 serait dépendante de 7B2 une protéine qu'on dit chaperone moléculaire (Seidah et coll., 1994; Seidah et Chrétien, 1997). Il a été proposé que pro-7B2 serait clivée en 7B2 par la furine dans la section trans de l'appareil de Golgi (Seidah et coll., 1994). L'appareil de Golgi des cellules endocrines à insuline ne présente qu'un léger marquage dans ses saccules, donc si la furine y est présente, elle y est de façon assez faible. La maturation de pro-7B2 en 7B2 pourrait peut-être avoir lieu également au niveau du granule.

La chromogranine A est un membre de la famille des granines, qui serait impliquée dans l'agrégation des protéines pour permettre leur sortie du réseau trans golgien aux vésicules de sécrétion (Ozawa et Takata, 1995). La chromogranine A qui est présente au

niveau des granules de sécrétion d'insuline, est un substrat potentiel de la furine (Eskeland et coll., 1996).

Le rôle de la furine a été précédemment investigué (Kayo et coll., 1996-b; Kayo et coll., 1997) dans les cellules MIN6, une lignée dérivée des cellules bêta. Une diminution des caractéristiques de différenciation, c'est à dire une diminution de l'expression des messagers de PC1, de PC2 et de la chromogranine A, a été observée chez des cellules surexprimant la convertase furine (Kayo et coll., 1996-b; Kayo et coll., 1997). La diminution de l'expression de ces artisans de la maturation protéique, entraîne une diminution de la conversion de la pro-insuline en insuline et de la réponse au glucose. La furine semble être également associée à une situation de croissance cellulaire. L'expression accrue de furine entraînerait l'augmentation de la conversion de certains facteurs de croissance au niveau des cellules sécrétrice d'insuline (Kayo et coll., 1996-b; Kayo et coll., 1997). Les vrais substrats et le rôle que peut jouer la furine dans les cellules à insuline restent à déterminer.

## **PC7**

### ***Pancréas exocrine***

PC7 possède des caractéristiques qui sont semblables à celles de la furine, dont un segment transmembranaire. Des études précédentes montrent que la distribution cellulaire

et tissulaire de ces deux convertases semble se chevaucher. Nous avons voulu savoir si dans le pancréas, la convertase PC7 a le même patron de distribution cellulaire et intracellulaire que la furine. Les résultats en microscopie électronique démontrent que les cellules acineuses exocrines contiennent PC7. Il y a production de PC7 et de furine par la cellule exocrine et, toutes les deux, vont emprunter la voie de sécrétion régulée. Nous avons également détecté la présence de PC7 tout comme la furine, au niveau des granules exocrines de la glande salivaire sous-maxillaire (résultats non montrés).

Le tableau 2A et les figures 9a et 9b montrent bien une présence de la PC7 dans les compartiments pancréatiques de synthèse que sont le réticulum endoplasmique rugueux et l'appareil de Golgi, et également dans les granules de zymogène et les lumières des acini. Le marquage que nous obtenons au niveau de l'appareil de Golgi, ne montre pas qu'il y ait une présence de PC7 plus importante que dans les autres compartiments. La densité de marquage augmente plutôt au fur et à mesure de la progression à travers les éléments de la voie de sécrétion, comme le font les autres enzymes digestives pancréatiques (Bendayan, 1984-a).

La proportion de marquage semblant être associée à la membrane des granules de sécrétion a été évaluée à 39% (tableau 3). Le marquage de PC7 est donc légèrement plus prononcé en périphérie des granules que ce que nous obtenions pour la furine (21%). Au niveau des lumières des acini, nous obtenons des particules d'or associées aux

microvillosités. Il est à noter que nous arrivons à observer un marquage associé aux microvillosités sur des tissus de rats normaux, alors que la furine ne pouvait y être observée de façon significative qu'en utilisant des tissus de rats dont la sécrétion pancréatique était stimulée. La détection au niveau du pancréas exocrine des molécules de PC7 associées à la membrane semble plus facile que pour la furine. Les anticorps permettent une meilleure détection de la PC7 à la membrane où PC7 y est présente en plus grandes quantités.

PC7 semble donc être une composante de la membrane des granules de zymogène et se retrouve au niveau de la membrane des microvillosités suite à la sécrétion et au déversement du contenu de ces granules dans la lumière (Molloy et coll., 1994; Voorhees et coll., 1995). Ce qui nous amène à proposer que PC7 tout comme la furine, pourrait être recyclée en empruntant la voie des endosomes, avec la membrane des granules venant de déverser leur contenu. PC7 serait ainsi retourné à l'appareil de Golgi.

Les mécanismes de routage cellulaire de PC7 ne sont pas encore déterminés, mais ils semblent différents de ceux de la furine. Un processus de phosphorylation et de déphosphorylation de résidus sérine situés au niveau de la queue cytoplasmique de la furine, semble être impliqué dans le contrôle du cheminement cellulaire, alors que PC7 subirait une palmitoylation (van de Loo et coll., 1997). L'entrée de PC7 dans les granules de sécrétion pourrait être médiée par les adaptines. En effet, PC7 a été colocalisée avec

la gama-adaptine dans des vésicules recouvertes de clathrine. La furine semble également pouvoir interagir avec les adaptines (Dittié et coll., 1997), il pourrait s'agir d'un mécanisme commun pour l'entrée de la furine et de PC7 dans la voie de sécrétion régulée des cellules pancréatiques.

Le rôle de la convertase PC7 dans la maturation d'enzymes de digestion pancréatiques peut difficilement être considéré avec les connaissances acquises à date à cette effet. Aucune autre convertase n'a été retrouvée dans ces grains de zymogène avant la furine et PC7. Le fait qu'au moins deux convertases y soient présentes, signifie sûrement que certains composants de ces grains de zymogène demandent une forme de maturation effectuée par les convertases avant leur sécrétion.

### ***Pancréas endocrine***

Les cellules productrices de glucagon et de somatostatine ne présentent pas de marquage concluant, que nous utilisions l'un ou l'autre des anticorps. À la lueur des résultats présents dans la littérature, nous n'avons aucune indication que cette convertase puisse se trouver dans les granules de la voie régulée de ces deux types cellulaires. Cependant, que nous ne détectons pas PC7 dans les granules de sécrétion de ces cellules, n'exclut pas qu'elle pourrait y être, mais en quantité trop faible pour être détectée. PC7 pourrait également être présent dans ces cellules, au niveau des vésicules de la voie constitutive.

Les cellules à insuline pour leur part, montrent une présence de la convertase PC7 dans les éléments de la voie de sécrétion régulée. Les figures 10a et 10c et le tableau 2B rapportent la présence de la PC7 au niveau du réticulum endoplasmique rugueux, de l'appareil de Golgi et des grains de sécrétion immatures et matures. Les membranes cellulaires des cellules bêta, ont été attentivement examinées, mais aucun marquage significatif n'y a été trouvé. Au niveau des granules, le marquage semble plus intense au niveau même de l'insuline. Contrairement aux résultats de PC7 au niveau du pancréas exocrine, nous détectons peu d'association avec la membranes des granules d'insuline, soit un pourcentage de 13%. Tout comme dans le cas de la furine, une attention particulière a été portée sur un éventuel marquage de la région trans du Golgi, mais nous n'y observons pas une densité de marquage plus élevée. Cependant, au niveau des vésicules qui bourgeonnent de l'appareil de Golgi, l'anticorps dirigé contre la séquence située au niveau du N-terminal, détecte une présence plus élevée de PC7, ce que montre la figure 10c et l'analyse morphométrique présentée au tableau 2B. La convertase PC7 entre dans les vésicules de sécrétion de la voie régulée.

La détection de PC7 dans le pancréas total de rat par la méthode biochimique d'immunobuvardage, nous montre la présence de la pro-PC7 de 101kDa et la forme mature de 89kDa. À la différence de la furine, la littérature ne rapporte pas l'existence d'une forme courte et soluble de PC7. Par immunocytochimie à l'or colloïdal, nous détectons un signal représentant une PC7 soluble dans le contenu de granules autant dans le pancréas exocrine qu'endocrine. Il existe peut-être une forme tronquée de PC7, mais exprimée de

façon trop faible pour que nous la détections par immunobuvardage. Il ne faut pas oublier que les îlots de Langerhans ne représentent qu'environ 3% du tissu pancréatique, ce qui rend plus difficile la détection. PC7 serait donc davantage membranaire au niveau du pancréas. Des bandes que nous pensons être des produits de dégradation, ont été détectées par l'anticorps contre PC7 dans un homogénat de protéines fraîchement extraites. Il pourrait exister une forme plus courte de PC7, mais plus instable et que nous n'arrivons pas à détecter.

La présence par immunobuvardage de la furine a été révélée par un anticorps secondaire couplé à un isotope radioactif, une méthode connue pour être plus sensible que la détection par réaction de chemiluminescence utilisée pour PC7. Précisons que nous avons détecté les mêmes bandes de produits de dégradation avec les deux méthodes.

Nous avons obtenu des résultats comparables avec deux anticorps contre la PC7 différents, soit un dirigé contre une séquence dans le domaine P et une autre près de la pro-région. La conformation tridimensionnelle d'une protéine peut dépendre de l'environnement dans lequel elle baigne. Il est toujours possible que la conformation particulière d'un site antigénique empêche sa reconnaissance par un anticorps. Utiliser plus d'un anticorps reconnaissant des régions différentes de la même molécule, permet de dépasser cette limitation. Nous avons utilisé deux anticorps reconnaissant deux régions différentes de la molécule de PC7. Nous obtenons avec les deux anticorps des résultats

comparables, ce qui confirme que l'antigène que nous détectons est bien la même molécule. La spécificité de nos anticorps a été également vérifiée par l'expérience contrôle où les tissus ont été incubés avec une solution mélange d'antigènes et d'anticorps (figure 10b).

La convertase PC7 est la dernière de la famille à avoir été identifiée. Les études effectuées à son sujet sont encore peu nombreuses et le portrait qu'elles nous donnent est encore incomplet. La littérature donne peu d'indices nous permettant de spéculer sur le rôle que pourrait jouer PC7 dans les cellules à insuline. Les substrats pour PC7 peuvent être variés. Il a été suggéré que PC7 serait impliquée dans la conversion de facteur de croissance (Meerabux et coll., 1996). C'est pour l'instant le seul rôle que nous pouvons évoquer pour expliquer la présence de PC7 dans la voie de sécrétion régulée, autant au niveau du pancréas exocrine qu'endocrine.

## CONCLUSION

Élucider les rôles des différentes convertases des pro-protéines est un maillon indispensable à la compréhension des mécanismes complexes de la sécrétion cellulaire. L'expression par une même cellule, de deux ou plusieurs convertases avec chacune des sites de clivage potentiellement différents, peut être proposée comme moyen permettant d'augmenter la finesse de régulation du mécanisme de sécrétion.

À la lueur de ces résultats nous pouvons affirmer que les convertases furine et PC7, sont des éléments endogènes de la voie de sécrétion pancréatique régulée. L'expression tissulaire de la furine et de PC7 se chevauche, mais leurs distributions cellulaires semblent différentes, ce qui laisse présager des rôles et des substrats différents pour PC7 et furine.

Les substrats potentiels de la furine dans le pancréas exocrine, restent à déterminer. Les convertases PC7 et furine semblent avoir toutes deux un rôle dans la croissance cellulaire probablement via la conversion de facteurs de croissance comme le NGF.

Il semble donc que les cellules pancréatiques, spécialisées dans la sécrétion régulée, possèdent des mécanismes qui font que des protéines normalement associées à la voie constitutive se retrouvent dans la voie régulée. La présence dans une voie n'exclut donc pas la présence dans l'autre. Il semble cependant certain, que ni la furine, ni PC7 soient exclusivement présentes au réseau trans golgien dans les cellules endocrines et exocrines du pancréas de rat.

## RÉFÉRENCES

**Anderson, E.D., VanSlyke, J.K., Thulin, G.D., Jean, F., Thomas, G.** (1997) *Activation of the furin endoprotease is a multi-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage.* EMBO J. 16 : 1508-1518.

**Ayoubi, T.A.Y, Creemers, J.W.M., Roebroek, A.J.M. et Van de Ven, W.J.M.** (1994) *Expression of the dibasic proprotein processing enzyme furin is directed by multiple promoters.* J. Biol. Chem. 269 : 9298-9303.

**Baillyes, E.M., Shennan, K.I.J., Seal, A.J., Smeekens, S.P., Steiner, D.F., Hutton, J.C. et Docherty, K.** (1992) *A member of the eukaryotic subtilisin family (PC3) has the enzymatic properties of the type 1 proinsulin-converting endopeptidase.* Biochem. J. 285 : 391-394.

**Basak, A., Boudreault, A., Chen, A., Chrétien, M., Seidah, N.G. and Lazure, C.** (1995) *Application of the multiple antigenic peptides (MAP) strategy to the production of prohormone convertase antibodies : synthesis, characterization and use of 8-branched immunogenic peptides.* J. Pept. Sc. 1 : 385-395.

**Basak, A., Ernst, B., Brewer, D., Seidah, N.G., Munzer, J.S., Lazure, C. et Lajoie, G.A.** (1997) *Histidine-rich human salivary peptides are inhibitors of proprotein convertases furin and PC7 but act as substrates for PC1.* J. Peptide Res. 49 : 596-603.

**Baskin, D.G., Gorry, K.C. et Fujimoto, W.Y.** (1984) *Immunocytochemical identification of cells containing insulin, glucagon, somatostatin, and pancreatic polypeptide in the islets of Langerhans of the guinea pig pancreas with light and electron microscopy.* Anat. Rec. 208: 567-578.

**Bataille, D.** (1990) *Maturation post-traductionnelle des peptides de la famille du glucagon. Relation avec leur mode d'action.* Ann. Endocr. 51 : 101-107.

**Beaulieu, E.-E. et Kelly P.A.** (1990) *Hormones : from molecule to disease.* édition Hermann; Paris, Chapman and Hall, New York. : 697p.

**Bendayan, M.** (1984-a) *Concentration of amylase along its secretory pathway in the pancreatic acinar cell as revealed by high resolution immunocytochemistry.* Histochem. J. 16 : 85-108.

**Bendayan, M.** (1984-b) *Protein A-gold electron microscopic immunocytochemistry; methods, applications and limitations.* J. Electron. Microsc. Techn. 1 : 243-270.

**Bendayan, M., Bruneau, A. et Morisset, J.** (1985) *Morphological and immunocytochemical studies on rat pancreatic acinar cells under control and experimental conditions.* Biol. Cell 54 : 227-234.

**Bendayan, M.** (1989) *Protein A-gold and protein G-gold postembedding immunoelectron microscopy.* Colloidal gold: principes, methods and applications, Hayat, M.A. éditeur, San Diego, Academic Press. 1 : 33-94.

**Benjannet, S., Reudelhuber, T., Mercure, C., Rondeau, N., Chrétien, M. et Seidah, N.G.** (1992) *Proprotein conversion is determined by a multiplicity of factors including convertase processing, substrate specificity, and intracellular environment.* J. Biol. Chem. 267 : 11417-11423.

**Benjannet, S., Rondeau, N., Paquet, L., Boudreault, A., Lazure, C., Chrétien, M. et Seidah, N.G.** (1993) *Comparative biosynthesis, covalent post-translational modifications and efficiency of prosegment cleavage of the prohormone convertase PC1 and PC2: glycosylation, sulphation and identification of the intracellular site of prosegment cleavage of PC1 and PC2.* Biochem. J. 294 : 735-743.

**Benjannet, S., Savaria, D., Chrétien, M. et Seidah, N.G.** (1995) *7B2 is a specific intracellular binding protein of the prohormone convertase convertase PC2.* J. Neurochem. 64 : 2303-2311.

**Bennet, D.L., Bailyes, E.M., Nielson G., Guest P.C., Rutherford, N.G., Arden, S.D. et Hutton, J.C.** (1992) *Identification of the type 2 proinsulin processing endopeptidase as PC2, a member of the eukaryote subtilisin family.* J. Biol. Chem. 267 : 15229-15236.

**Bergmann, J.E. et Singer, S.** (1983) *Immunoelectron microscopic studies of the intracellular transport of the membrane glycoprotein (G) of the vesicular stomatitis virus in infected chinese hamster ovary cells.* J. Cell Biol. 97 : 1777-1787.

**Blanchette, F., Day, R., Dong, W., Laprise, M.-H. et Dubois, C.M.** (1997) *TGF $\beta$ 1 regulates gene expression of its own converting enzyme furin*. J. Clin. Invest. 99 : 1974-1983.

**Bockman D.E.** (1993) *The pancreas: Biology, pathology, and disease*. 2<sup>e</sup> édition, éditeur: Go, V.L.W., Dimagno, E.P, Gardner J.D., Lebenthal E., Reber, H.A., Scheele, G.A., Raven press, New York : 1-8.

**Bosshart, H., Humphrey, J., Deignan, E., Davidson, J., Drazba, J., Yuan, L., Oorschot, V., Peters, P.J. et Bonifacino, J.S.** (1994) *The cytoplasmic domain mediates localization of furin to the trans-Golgi network en route to the endosomal/Lysosomal system*. J. Cell. Biol. 126 : 1157-1172.

**Boman, A.L. et Kahn, R.A.** (1995) *Arf proteins: the membrane traffic police?* Trends Biochem. Sci. 20 : 147-150.

**Bradford, M.M.** (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem. 72: 248-254.

**Brakch, N, Galanoupoulou, A.S., Patel, Y.C., Boileau, G. et Seidah, N.G.** (1995) *Comparative proteolytic processing of rat prosomatostatin by the convertases PC1, PC2, Furin, PACe4 and PC5 in constitutive and regulated secretory pathways*. FEBS Letters 362 : 143-146.

**Bravo, D.A., Gleason, J.B., Sanchez, R.I., Roth, R.A. et Fuller, R.S.** (1994) *Accurate and efficient cleavage of the human insulin proreceptor by the human proprotein-processing protease furin*. J. Biol. Chem. 269 : 25830-25836.

**Bresnahan, P.A., Leduc, R., Thomas, L., Thorner, J., Gibson, H.L., Brake, A.J., Barr, P.J. et Thomas, G.** (1990) *Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro- $\beta$ -NGF in vivo*. J. Cell. Biol. 111 : 2851-2858.

**Brosky, M.B.** (1997) *New fashions in vesicle coats*. Trends Cell Biol. 7 : 175-179.

**Bruzzaniti, A., Goodge, K., Jay, P., Taviaux, S.A., Lam, M.H.C., Berta, P., Martin, T.J., Moseley, J.M. et Gillespie, M.T.** (1996) *PC8, a new member of the convertase family.* *Biochem J.* 314 : 727-731.

**Burgess, T.L. et Kelly, R.B.** (1987) *Constitutive and regulated secretion of proteins.* *Ann. Rev. Cell Biol.* 3 : 243-293.

**Chapman, R.E. et Munro, S.** (1994) *Retrieval of TGN proteins from the cell surface requires endosomal acidification.* *EMBO J.* 13 : 2305-2313.

**Constam, D.B., Calfon, M. et Robertson, E.J.** (1996) *SPC4, SPC6, and the novel protease SPC7 are coexpressed with bone morphogenetic proteins at distinct sites during embryogenesis.* *J. Cell. Biol.* 134 : 181-191.

**Chrétien, M. et Li, C.H.** (1967) *Isolation, purification, and characterization of gamma-lipotropic hormone from sheep pituitary glands.* *Can. J. Biochem.* 45 : 1163-1174.

**Chrétien, M., Gasper, L., Benjannet, S., Mbikay, M., Lazure, C. et Seidah, N.G.** (1991) *From POMC to functional diversity of neural peptides: the key importance of convertases.* *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc* 102 : 195-224.

**Creemers, J.W.M., Vey, M., Schäfer, W. Ayoubi, T.A.Y., Roebroek, A.J.M., Klenk, H.-D., Garten. W. et Van de Ven, W.J.M.** (1995) *Endoproteolytic cleavage of its propeptide is a prerequisite for efficient transport of furin out of the reticulum.* *J. Biol. Chem.* 270 : 2695-2702.

**Davidson, H.W. et Hutton, J.C.** (1987) *The insulin-secretory-granule carboxypeptidase H. Purification and demonstration of involvement in proinsulin processing.* *Biochem. J.* 245 : 575-582.

**De Bie, I., Marcinkiewicz, M., Malide, D., Lazure, C., Nakayama, K., Bendayan, M. et Seidah, N.G.** (1996) *The isoforms of proprotein convertase PC5 are sorted to different subcellular compartments.* *J. Cell. Biol.* 135 : 1261-1275.

**Decroly, E., Vandenbranden, M., Ruyschaert, J.-M., Cogniaux, J., Jacob, G.S., Howard, S.C., Marshall, G., Kompelli, A., Basak, A., Jean, F., Lazure, C., Benjannet,**

**S., Chrétien, M., Day, R. et Seidah, N.G.** (1994) *The convertases furin and PC1 can both cleave the human immunodeficiency virus (HIV)-1 envelope glycoprotein gp160 into gp120 (HIV-I SU) and gp41 (HIV-I TM)*. J. Biol. Chem. 269 : 12240-12247.

**Decroly, E., Benjannet, S., Savaria, D. et Seidah, N.G.** (1997) *Comparative functional role of PC7 and furin in the processing of the HIV envelope glycoprotein gp160*. FEBS Letters. 405 : 68-72.

**Demaurex, N., Furuya, W., D'souza, S., Bonifacino, J.S. et Grinstein, S.** (1998) *Mechanism of acidification of the trans-Golgi Network (TGN). In situ measurements of pH using retrieval of TGN38 and furin from the cell surface*. J Biol. Chem. 273 : 2044-2051.

**Denault, J.-B. et Leduc, R.** (1996) *Furin/PACE/SPC1: a convertase involved in exocytic and endocytic processing of precursor proteins*. FEBBS Letters 379 : 113-116.

**Dittié, A.S., Thomas, L., Thomas, G. et Tooze, S.A.** (1997) *Interaction of furin in immature secretory granules from neuroendocrine cells with the AP-1 adaptor complex is modulated by casein kinase II phosphorylation*. EMBO J. 16 : 4859-4870.

**Do, H., Falcone, D., Lin, J., Andrew, D.W. et Johnson, A.E.** (1996) *The cotranslational integration of membrane proteins into the phospholipid bilayer is a multistep process*. Cell 85 : 369-378.

**D'Souza, S.E., Ginsberg, M.H. et Plow, E.** (1991) *Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif*. Trends in Biochem. Sc. 16 : 246-250.

**Dubois, C. M., Laprise, M.-H., Blanchette, F., Gentry, L.E. et Leduc, R.** (1995) *Processing of transforming growth factor  $\beta$ 1 precursor by human furin convertase*. J. Biol. Chem. 270 : 10618-10624.

**Eiper, B.A., Park, L.P., Dickerson, I.M., Keutmann, H.T., Thiele, E.A., Rodriguez, H., Schofield, P.R. et Mains, R.E.** (1987) *Structure of the precursor to an enzyme mediating COOH-terminal amidation in peptide biosynthesis*. Mol. Endo. 1 : 777-790.

**Eskeland, N.L., Zhou, A., Dinh, T.Q., Wu, H., Parmer, R.J., Mains, R.E. et O'Connor D.T.** (1996) *Chromogranine A processing and secretion. Specific role of endogenous and exogenous prohormone convertases in the regulated secretory pathway.* J. Clin. Invest. 98 : 148-156.

**Farhadi, H., Pareek, S., Day, R., Dong, W., Chrétien, M., Bergeron, J.J.M., Seidah, N.G. et Murphy, R.A.** (1997) *Prohormone convertases in mouse submandibular gland: co-localization of furin and nerve growth factor.* J. Histochem. Cytochem. 45 : 795-804.

**Farquhar, M.G. et Hauri, H.-P.** (1997) *Protein sorting and vesicular traffic in the Golgi apparatus.* The Golgi apparatus. Berger, E.G. et Roth, J. éditeur, Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland : 63-129.

**Fricke, L.D., Adelman, J.P., Douglass, J., Thompson R.C., von Strandmann, R.P. et Hutton J.** (1989) *Isolation and sequence analysis of cDNA for rat carboxypeptidase E [EC 3.4.17.10], a neuropeptide processing enzyme.* Mol. Endo 3 :668-673.

**Galanopoulou, A.S., Seidah, N.G. et Patel, Y.C.** (1995) *Direct role of furin in mammalian prosomatostatin processing.* Biochem. J. 309 : 33-40.

**Gilbert, H.F.** (1997) *Protein disulfide isomerase and assisted protein folding.* J. Biol. Chem. 272 : 29399-29402.

**Gething, M.J. et Sambrook, J.** (1992) *Protein folding in the cell.* Nature 355 : 33-45.

**Gilmore, R.** (1993) *Protein translocation across the endoplasmic reticulum: a tunnel with toll booths a entry and exit.* Cell 75 : 589-592.

**Gresik, E.W.** (1994) *The granular convoluted tubule (GCT) cell of rodent submandibular glands.* Microscopy Res. Techn. 27 : 1-24.

**Griffiths, G., Pfeiffer, S., Simons, K. et Matlin, K.** (1983) *Exit of newly synthesized membrane proteins from the trans cisterna of the Golgi complex to the plasma membrane.* J. Cell Biol. 101 :189-200.

**Halban, P.A. et Irminger, J.-C.** (1994) *Review article, Sorting and processing of secretory proteins.* Biochem. J. 299 : 1-18.

**Hatsuzawa, K., Nagahama, M., Takahashi, S., Takada, K., Murakami, K. et Nakayama, K.** (1992) *Purification and characterization of furin, a Kex2-like processing endoprotease, produced in chinese hamster ovary cells.* J. Biol. Chem. 267 : 16094-16099.

**Hauri, H.-P. et Schweizer, A.** (1992) *The endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment.* Curr. Opin. Cell Biol. 4 : 600-608.

**Hill, R.M., Ledgerwood, E.C., Brennan, S.O., Pu, L.-P., Loh, Y.P., Christie, D.L. et Birch N.P.** (1995) *Comparison of the molecular forms of the Kex2/subtilisin-like serine protease SPC2, SPC3, and furin in neuroendocrine secretory vesicles reveals differences in carboxyl-terminus truncation and membrane association.* J. Neurochemistry 65 : 2318-2326.

**Hirschberg, C.B. et Snider, M.D.** (1987) *Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus.* Annu. Rev. Biochem. 56 : 63-87.

**Hosaka, M., Nagahama, M., Kim, W.-S., Watanabe, T., Hatsuzawa, K., Ikemizu, J., Murakami, K. et 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 : 12127-12130.

**Jackson, R.S., Creemers, J.W.M., Ohagi, S., Raffin-Sanson, M.-L., Sanders, L., Montague, C.T., Hutton, J.C. et O'Rahilly.** (1997) *Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene.* Nature Genetic 16 : 303-306.

**Jamieson, J.D. et Palade, G.E.** (1967) *Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. I. Role of the peripheral elements of the Golgi complex.* J. Cell Biol. 34 : 577-596.

**Jamieson, J.D. et Palade, G.E.** (1967) *Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. II. Transport to condensing vacuoles and zymogen granules.* J. Cell Biol. 34 : 597-615.

**Jones, B.G., Thomas, L., Molloy, S.S., Thulin, C.D., Fry, M.D., Walsh, K.A. et Thomas, G.** (1995) *Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation state of a casein kinase II site in its cytoplasmic tail.* EMBO J. 14 : 5869-5883.

**Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R. et Thorner, J.** (1984) *Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro- $\alpha$ -factor.* Cell. 37 :1075-1089.

**Kayo, T., Konda, Y., Tanaka, S., Tanaka, K., Koizumi, A. et Takeuchi, T.** (1996-a) *Developmental expression of proprotein-processing endoprotease furin in rat pancreatic islets.* Endocrinology 137 : 5126-5134.

**Kayo, T., Sawada, Y., Suzuki, Y., Suda, M., Tanaka, S., Konda, Y., Miyazaki, J.-I. et Takeuchi, T.** (1996-b) *Proprotein-processing endoprotease furin decreases regulated secretory pathway-specific proteins in the pancreatic  $\beta$  cell line MIN6.* J. Biol. Chem. 271 : 10731-10737.

**Kayo, T., Sawada, Y., Masayuki, S., Yoshitaka, K., Izumi, T., Tanaka, S., Shibata, H. et Takeuchi, T.** (1997) *Proprotein-processing endoprotease furin controls growth of pancreatic  $\beta$ -cells.* Diabetes 46 : 1296-1304.

**Konda, Y., Yokota, H., Kayo, T., Horiuchi, T., Sugiyama, N., Tanaka, S., Takata, K. and Takeuchi, T.** (1997) *Proprotein-processing endoprotease furin controls the growth and differentiation of gastric surface mucous cells.* J. Clin. Invest. 99 : 1842-1851.

**Klimpel, K.R., Molloy, S.S., Thomas, G. et Leppla, S.H.** (1992) *Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89 : 10277-10281.

**Lazure, C., Seidah, N.G., Pélapat, D. et Chrétien M.** (1983) *Proteases and posttranslational processing of prohormones: a review.* Can. J. Biochem. Cell Biol. 61: 501-515.

**Leduc, R., Molloy, S.S., Thorne, B.A. et thomas, G.** (1992) *Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage.* J. Biol. Chem. 267 : 14304-14311.

**Lehmann, M., Rigot, V., Seidah, N.G., Marvaldi, J. et Lissitzky, J.-C.** (1996) *Lack of integrin alpha-chain endoproteolytic cleavage in furin-deficient human colon adenocarcinoma cells LoVo*. *Biochem. J.* 317 : 803-809.

**Liu, G., Thomas, L., Warren, R.A., Enns, C.A., Cunningham, C., Hartwig, J.H. et Thomas, G.** (1997) *Cytoskeletal protein ABP-280 directs the intracellular trafficking of furin and modulates proprotein processing in the endocytotic pathway*. *J. Cell Biol.* 139: 1719-1733.

**Lusson, J., Vieau, D., Hamelin, J., Day, R., Chrétien, M. et Seidah, N.G.** (1993) *cDNA structure of the mouse and rat subtilisin/Kexin-like PC5: a candidate proprotein convertase expressed in endocrine and noendocrine cells*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 : 6691- 6695.

**Lusson, J., Benjannet, S., Hamelin, J., Savaria, D., Lazure, C., Chrétien, M., et Seidah, N.G.** (1997) *Implication of the RRGD sequence of the proprotein convertase PC1 in zymogen processing and cellular trafficking*. *Biochem. J.* 326 : 737-744.

**Mains, R.E., Berard, C.A, Denault, J.-B., Zhou, A., Johnson R.C. et Ledue, R.** (1997) *PACE4: a subtilisin-like endoprotease with unique properties*. *Biochem. J.* 321 : 587-593.

**Malide, D., Seidah, N.G., Chrétien, M. et Bendayan, M.** (1995) *Electron Microscopic immunocytochemical evidence for the involvement of the convertases PC1 and PC2 in the processing of proinsulin in pancreatic  $\beta$ -cell*. *J. Histochem. Cytochem.* 43 : 11-19.

**Marcinkiewicz, M, Day, D., Seidah, N.G. et Chrétien, M.** (1993-a) *Ontogeny of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the mouse hypophysis and their colocalization with corticotropin and alpha-melanotropin*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 4922-4926.

**Marcinkiewicz, M, Seidah, N.G. et Chrétien, M.** (1993-b) *Les convertases des prohormones et le système nerveux*. *Medecine/Sciences* 9 : 553-561.

**May, R.W., Beck, K.A. et Nelson, W.J.** (1994) *Organization and function of the cytoskeleton in polarized cells: a component of the protein sorting machinery*. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 6 :16-24.

**Meda, P.** (1996) *Gap junction involvement in secretion: the pancreas experience.* Clin. Exp. Pharm. Physiol. 23 : 1053-1057.

**Meerabux, J., Yaspo, M.L., Roebroek, A.J., Van de Ven, W.J.M., Lister, T.A. et Young, B.D.** (1996) *A new member of the proprotein convertase gene family (LPC) is located at a chromosome translocation breakpoint in lymphomas.* Cancer Research 56: 448-451.

**Mercure, C., Jutras, I., Day, R., Seidah, N.,G. et Reudelhuber T.L.** (1996) *Prohormone convertase PC5 is a candidate processing enzyme for prorenin in the human adrenal cortex.* Hypertension 28 : 840-846.

**Misumi, Y., Oda, K., Fujiqara, T., Takami, N., Tashiro, K. et Ikehara, Y.** (1991) *Functional expression of furin demonstrating its intracellular localization and endoprotease activity for processing of proalbumin and complement pro-C3.* J. Biol. Chem. 266 : 16954-16959.

**Molloy, S. S., Bresnahan, P.A., Leppla, S.H., Klimple, K.R. et 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: 16396-16402.

**Molloy, S.S., Thomas, L., VanSlyke, J.K., Stenberg, P.E. et Thomas, G.** (1994) *Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TNG and recycling from the cell surface.* Embo J. 13 : 18-33.

**Mori, K., Kii, S., Tsuji, A., Nagahama, M., Imamaki, A., Hayashi, K., Akamatsu T., Nagamune, H. et Matsuda, Y.** (1997) *A novel human PACE4 isoform, PACE4A is an active processing protease containing a hydrophobic cluster at the carboxy terminus.* J. Biochem. 121 : 941-948.

**Munzer, J. S., Basak, A., Zhong, M., Mamarbachi, A., Hamelin, J., Savaria, D., Lazure, C., Hendy, G.N., Benjannet, S., Chretien, M. et Seidah, N.G.** (1997) *In vitro characterization of the novel proprotein convertase PC7.* J. Biol. Chem. 272 : 19672-19681. Correction: (1997) J. Biol. Chem. 272 : 30589.

**Nagamatsu, S., Nishi, M. et Steiner, D.F.** (1991) *Biosynthesis of islet amyloid polypeptide. Elevated expression in mouse beta TC3 cells.* J. Biol. Chem. 266 :13737-13741.

**Nagamune, H., Muramatsu, K., Akamatsu, T., Tamai, Y., Izumi, K., Tsuji, A., et Matsuda, Y.** (1995) *Distribution of the Kexin family proteases in pancreatic islets: PACE4C is specifically expressed in  $\beta$  cells of pancreatic islets.* Endocrinology 136 :357-360.

**Nakagawa, T., Hosaka, M., Torii, S., Watanabe, T., Murakami, K. et Nakayama, K.** (1993-a) *Identification and functional expression of a new member of the mammalian Kex2-like processing endoprotease family : its striking structural similarity to PACE4.* J. Biochem. 113 : 132-135.

**Nakagawa, T., Murakami, K. et Nakayama K.** (1993-b) *Identification of an isoform with an extremely large Cys-rich region if PC6, a Kex2-like processing endoprotease.* FEBS Letters 327 : 165-171.

**Nakayama, K.** (1997) *Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins.* Biochem. J. 327 : 625-635.

**Nakayama, K., Kim, W.S., Torii, S., Hosaka, M., Nakagawa, T., Ikemizu, J., Baba, T. et Murakami, K.** (1992) *Identification of the fourth member of the mammalian endoprotease family homologous to the yeast KEX 2 protease.* J. Biol. Chem. 267: 5897-5900.

**Ng D.T., Brown, J.D. et Walter, P.** (1996) *Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane.* J. Cell Biol. 134 : 269-278.

**Natori, S. et Huttner, W.B.** (1996) *Chromogranin B (secretogranin I) promotes sorting to the regulated secretory pathway of processing intermediates derived from a peptide hormone precursor.* Proc. Natl. Acad. Sc. USA 93 : 4431-4436.

**Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Madsen, O., Perrelet, A., Vassalli, J.D., Anderson, R.G.W.** (1986) *Conversion of proinsulin to insulin occurs coordinately with acidification of maturing secretory vesicles.* J. Cell. Biol. 103 : 2273-2281.

**Orci, L., Ravazzola, M., Storch, M.J., Anderson, R.G.W., Vassalli, J.D. et Perrelet, A.** (1987) *Proteolytic maturation of insulin is a post-Golgi event which occurs in acidifying clathrin-coated secretory vesicles.* Cell 49 : 865-868.

**Orci, L., Vassalli, J.D., Perrelet A.** (1988) *The insulin factory.* Scient. Americ. 259 : 85-94.

**Orci, L., Halban, P., Perrelet, A., Amherdt, M., Ravazzola, M. et Anderson, R.G.W.** (1994) *pH-independent and -dependent cleavage of proinsulin in the same secretory vesicle.* J. Cell. Biol. 126 : 1149-1156.

**Ozawa, H. et Takata, K.** (1995) *The Granin family-Its role in sorting and secretory granule formation.* Cell Struct. Funct. 20 : 415-420.

**Palade, G.E.** (1975) *Intracellular aspects of the process of protein synthesis.* Science 189 : 347-358.

**Paleyanda, R.K., Drews, R., Lee, T.K. et Lubon, H.** (1997) *Secretion of human furin into mouse milk.* J. Biol. Chem. 272 : 15270-15274.

**Patel, Y.C, Wheatley, T. et Ning, C.** (1981) *Multiple forms of immunoreactive somatostatin: comparison of distribution in neural and nonneuronal tissues and portal plasma of the rat.* Endocrinology 109 : 1943-1948.

**Perone, M.J., Windeatt, S. et Castro, M.G.** (1997) *Intracellular trafficking of prohormones and proneuropeptides: cell type-specific sorting and targeting.* Exp Physiol 82 : 609-628.

**Pei, D. et Weiss, S.J.** (1995) *Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen.* Nature 375 : 244-247.

**Rabbitts, T.H.** (1994) *Chromosomal translocation in human cancer.* Nature 372 : 143-149.

**Reichlin, S.** (1987) *Secretion of somatostatin and its physiologic function.* J. Lab. Clin. Med. 109 : 320-326.

**Roebroek, A.J.M., Schalken, J.A., Leunissen, J.A.M., Onnekink, C., Bloemers, H.P.J. et Van de Ven, W.J.M.** (1986) *Evolutionary conserved close linkage of the c-fes/fps proto-oncogene and genetic sequences encoding a receptor-like protein.* EMBO J. 5 : 2197-2202.

**Rothman, J.E.** (1994) *Mechanisms of intracellular protein transport.* Nature 372 : 55-63.

**Rothman, J.E. et Eieland F.T.** (1996) *Protein sorting by transport vesicles.* Science 272 : 227-234.

**Rothman, S.S.** (1975) Protein transport by the pancreas. Science 190 (4216): 747-753.

**Rouillé, Y., Westermark, G., Martin, S.K. et Steiner, D.F.** (1994) *Proglucagon is processed to glucagon by prohormone convertase PC2 in  $\alpha$ TC1-6 cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 3242-3246.

**Rouillé, Y., Duguay, S.J., Lund, K., Furuta, M., Gong, Q.M., Lipkind, G., Oliva, A.A., Chan, S.J. et Steiner, D.F.** (1995) *Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides ; the subtilisin-like proprotein convertases.* Front. Neuroendocr. 16 : 322-261.

**Rouillé, Y., Bianchi, M., Irminger, J.-C. et Halban, P.A.** (1997) *Role of the prohormone convertase PC2 in the processing of proglucagon to glucagon.* FEBS Letters 413 : 119-123.

**Salama, N.R. et Schekman, R.W.** (1995) *The role of coat proteins in the biosynthesis of secretory proteins.* Curr. Opin. Cell Biol. 7 : 536-534.

**Sawada, Y., Inoue, M., Kanda, T., Sakamaki, T., Tanaka, S., Minamino, N., Nagai, R. et Takeichi T.** (1997) *Co-elevation ?? of brain natriuretic peptide and proprotein-processing endoprotease furin after myocardial infarction in rats.* FEBS Letters 400: 177-182.

**Scala, C., Cenacchi, G., Ferrari, C., Pasquinelli, G., Preda, P. et Manara, G.C.** (1992) *A new acrylic resin formulation: a useful tool for histological, ultrastructural, and immunocytochemical investigations.* J. Histochem. Cytochem. 40 : 1799-1804.

**Schäfer, M. K.-H., Day, R., Cullinan, W.E., Chrétien, M., Seidah, N.G. et Stanley, J.W.** (1993) *Gene expression of prohormone and proprotein convertases in the rat CNS: a comparative in situ hybridization analysis.* J. Neurosci. 13 : 1258-1279.

**Schäfer, W., Stroh, A., Berghöfer, S., Seiler, J., Vey, M., Kruse, M.-L., Kern, H.F., Klenk, H.-D. et Garten, W.** (1995) *Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin.* EMBO J. 14 : 2424-2435.

**Schmid, S.L.** (1997) *Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process.* Ann. Rev. Biochem. 66 : 511-548.

**Seidah, N.G., Hsi, K.L., De Serres, G., Rochement, J., Hamelin, J., Antakly, T., Cantin, M. et Chrétien, M.** (1983) *Isolation and NH<sub>2</sub>-terminal sequence of a highly conserved human and porcine pituitary protein belonging to a new superfamily: immunocytochemical localization in pars distalis and pars nervosa of the pituitary and in the supraoptic nucleus of the hypothalamus.* Arch. Biochem. Biophys. 225 : 525-534.

**Seidah, N.G., Chrétien, M. et Day, R.** (1994) *The family of subtilisin/Kexin like pro-protein and pro-hormone convertases : divergent or shared functions.* Biochimie. 76 : 197-209.

**Seidah, N.G., Marcinkiewicz, M., Benjannet, S., Gaspar, L., Beaubien, G., Mattei, M.G., Lazure, C., Mbikay, M. et Chrétien, M.** (1991) *Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, furin, and Kex2 : distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2.* Mol. Endocr. 5 : 111-122.

**Seidah, N.G., Marcinkiewicz, M., Benjannet, S., Gaspar, A., Collard, M.W.** (1992) *Testicular expression of PC4 in the rat: molecular diversity of a novel germ cell-specific KEX2/subtilisin-like pro-protein convertase.* Mol. Endocr. 6 : 1559-1569.

**Seidah, N.G., Hamelin, J., Mamarbachi, M., Dong, W., Tadros, H., Mbikay, M., Chrétien, M. et Day, R.** (1996-a) *cDna structure, tissues distribution, and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase close to yeast Kexin-like proteinases.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 : 3388-3393.

**Seidah, N.G., Benjannet, S., Pareek, S., Savaria, D., Hamelin, J., Goulet, B., Laliberte, J., Lazure, C., Chrétien, M. et Murphy, R.A.** (1996-b) *Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases.* Biochem. J. 314 : 951-960.

**Seidah, N.G., Benjannet, S., Pareek, S., Chrétien, M. et Murphy, R.A.** (1996-c) *Cellular processing of the neurotrophin precursors of the NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases.* FEBS Letters 379 : 247-250.

**Seidah, N.G. et Chrétien M.** (1997) *Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins.* Curr. Opin. Biotech. 8 : 602-607.

**Siezen, J.R. et Leunissen, J.A.M.** (1997) *Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases.* Protein Sci. 6 : 501-523.

**Simon, J.-P. et Aunis, D.** (1989) *Review article, Biochemistry of the chromogranin A protein family.* Biochem. J. 262 : 1-13.

**Simons, M. et Boble, G.** (1993) *Mechanisms of translocation of proteins across membranes.* Sub-cellular Biochem. 21 1-15.

**Smeekens, S.P., Avruch, A.S., LaMendola, J., Chan, S.J. et Steiner, D.F.** (1991) *Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 340-344.

**Stein, B.S., et Engleman, E.G.** (1990) *Intracellular processing of the gp160 HIV-1 envelope precursor.* J. Biol. Chem. 265 : 2640-2648.

**Steiner, D.F, Cunningham, D., Spiegelman, L. et Aten, B.** (1967) *Insulin biosynthesis: evidence for a precursor.* Science 157 : 697-700.

**Steiner, D.F., Rouille, Y., Gong, Q., Martin, S., Carroll, R. et Chan, S.J.** (1996) *The role of prohormone convertases in insulin biosynthesis: evidence for inherited defects in their action in man and experimental animals.* Diab. Metab. 22 : 94-104.

**Tischler, A.S., Greene, L.A.** (1978) *Morphologic and cytochemical properties of a clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor.* Lab. Invest. 39 : 77-89.

**Tsuji, A., Hine, C., Tamai, Y., Yonemoto, K., Mori, K., Yoshida, S., Bando, M., Sakai, E., Mori, K., Akamatsu, T. et Matsuda, Y.** (1997) *Genomic organization and alternative splicing of human PACE 4 (SPC4), Kexin-like processing endoprotease.* J. Biochem. 122 : 438-452.

**Van de Loo, J.-W.H.P., Creemers, J.W.M., Bright, N.A., Young, B.D., Roebroek, A.J.M. et Van de Ven, W.J.M.** (1997) *Biosynthesis, distinct post-translational modifications, and functional characterization of lymphoma proprotein convertase.* J. Biol. Chem. 272 : 27116-27123.

**Van de Ven, W.J.M., Roebroek, A.J.M. et Duijnhoven, H.L.P.** (1993) *Structure and fonction of eukaryotic proprotein processing enzymes of the subtilisin family serine proteases.* Crit. Rev. Onc. 4 : 115-136.

**Van de Ven, J.W.M., Voorberg, J., Fontijn, R., Pannekoek, H, Van den Ouweland, A.M.W., Van Duijnhoven, H.L.P., Roebroek, A.J.M. et Siezen, R.** (1990) *Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes.* Mol. Biol. Rep. 14 : 265-275.

**Van Horsen, A.M., van den Hurk, W.H., Bailyes, E.M., Hutton, J.C., Martens, G.J. et Lindberg, I.** (1995) *Identification of the region within the neuroendocrine polypeptide 7B2 responsible for the inhibition of prohormone convertase PC2.* J. Biol. Chem. 270: 14292-14296.

**Vey, M., Schäfer, W., Berghöfer, S., Klenk, H.-D. et Garten, W.** (1994) *Maturation of the trans-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation.* J. Cell Biol. 127 : 1829-1842.

**Vey, M., Schafer, W., Reis, B., Ohuchi, R., Britt, W., Garten, W., Klenk H.D. et Radsak K.** (1995) *Proteolytic processing of human cytomegalovirus glycoprotein B (GPUL55) is mediated by the human endoprotease furin.* *Virology* 206 : 746-749.

**Vidricaire, G., Denault, J.-B. et Leduc, R.** (1993) *Characterization of a secreted form of human furin endoprotease.* *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 195 : 1011-1018.

**Vollenweider, F., Kaufmann, J., Irminger, J.-C. and Halban P.A.** (1995) *Processing of proinsulin by Furin, PC2, and PC3 in (co) transfected COS (monkey kidney) cells.* *Diabetes* 44 : 1075-1080.

**Voorhees, P., Deignan, E., Van Donselaar, E. Humphrey, J., Marks, M.S., Petters, P.J. et Bonifacino J.S.** (1995) *An acidic sequence within the cytoplasmic domain of furin functions as a determinant of trans-Golgi network localization and internalization from the cell surface.* *EMBO J.* 14 : 4961-4975.

**Wagner, A.C.C. et Williams, J.A.** (1994) *Pancreatic zymogen granule membrane proteins: molecular details begin to emerge.* *Digestion* 55 : 191-199.

**Watanabe, T., Murakami, K. et Nakayama, K.** (1993) *Positional and additive effects of basic amino acids on processing of precursor proteins within the constitutive secretory pathway.* *FEBS Letters* 320 : 215-218.

**Williams, J.A. et Goldfine I.D.** (1993) *The pancreas: Biology, pathology, and disease.* 2<sup>e</sup> édition, éditeur: Go, V.L.W., Dimagno, E.P, Gardner J.D., Lebenthal E., Reber, H.A., Scheele, G.A., Raven press, New York : 789-802.

**Wise, R.J., Barr, P.J., Wong, P.A., Kiefer, M.C., Brake, A.J. et Kaufman, R.J.** (1990) *Expresion of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 9378-9382.

**Woling, N., Bosshart, H., Küster, H, et Bonifacio, J.S.** (1997) *Aggregation as a determinant of protein fate in post-golgi compartments: role of the luminal domain of furin in lysosomal targeting.* *J. Cell Biol.* 139 : 1735-1745.

**Wulff, B.S., Johansen, T.E., Dalboge, H., O'Hare, M.M.T. et Schwartz, T.W.** (1993) *Processing of two homologous precursors, pro-neuropeptide Y and pro-pancreatic polypeptide, in transfected cell lines expressing different precursor convertases.* J. Biol. Chem. 268 : 13327-13335.

**Zheng, M., Streck, R.D., Scott, R.E.M., Seidah, N.G. et Pintar, J.E.** (1994) *The developmental expression in rat of proteases furin, PC1, PC2 and carboxypeptidase E: implications for early maturation of proteolytic processing capacity.* J. Neurosci. 14: 4656-4673.

# **ANNEXES**

## Tableaux 1

### ÉVALUATION QUANTITATIVE DE LA DENSITÉ DE MARQUAGE À L'OR COLLOÏDAL POUR LA FURINE

#### A. Cellules acineuses du pancréas exocrine.

Compartiments cellulaires et données	Condition normale		Contrôle de spécificité	
	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum
<b>Réticulum endoplasmique</b>				
Particules d'or	8,00	80,00	2,00	24,00
Surface	1,22	11,07	0,51	15,99
Densité extrême	4,21	13,14	0,59	3,94
<b>Densité moyenne</b>	<b>6,98 ± 0,62</b>		<b>1,94 ± 0,31</b>	
<b>Région golgienne</b>				
Particules d'or	6,00	68,00	0,00	4,00
Surface	1,15	4,72	0,36	2,31
Densité extrême	5,09	19,73	0,00	3,44
<b>Densité moyenne</b>	<b>11,72 ± 1,11</b>		<b>1,33 ± 0,32</b>	
<b>Vacuoles de condensation</b>				
Particules d'or	7,00	23,00	0,00	3,00
Surface	0,28	0,48	0,24	0,95
Densité extrême	18,14	49,25	0,00	4,15
<b>Densité moyenne</b>	<b>26,94 ± 2,93</b>		<b>1,16 ± 0,30</b>	
<b>Granules de sécrétion</b>				
Particules d'or	27,00	207,00	0,00	4,00
Surface	0,73	5,31	0,22	1,20
Densité extrême	20,33	64,74	0,00	6,59
<b>Densité moyenne</b>	<b>33,02 ± 2,03</b>		<b>1,27 ± 0,30</b>	
<b>Lumière acineuse</b>				
Particules d'or	6,00	69,00	0,00	4,00
Surface	0,24	2,64	0,30	1,55
Densité extrême	11,92	26,12	0,00	5,35
<b>Densité moyenne</b>	<b>19,02 ± 1,77</b>		<b>2,12 ± 0,51</b>	
<b>Mitochondries</b>				
Particules d'or	1,00	18,00	0,00	2,00
Surface	0,28	2,30	0,30	0,98
Densité extrême	2,39	12,51	0,00	5,54
<b>Densité moyenne</b>	<b>7,62 ± 1,16</b>		<b>1,12 ± 0,31</b>	

Surface en  $\mu\text{m}^2$

Densité moyenne en particules d'or/ $\mu\text{m}^2 \pm \text{ESM}$

**B. Cellules sécrétrices d'insuline.**

Compartiments cellulaires et données	Condition normale		Contrôle de spécificité	
	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum
<b>Réticulum endoplasmique</b>				
Particules d'or	3,00	17,00	0,00	1,00
Surface	0,27	1,32	0,31	0,99
Densité extrême	5,59	14,62	0,00	10,03
<b>Densité moyenne</b>	<b>11,95 ± 1,33</b>		<b>2,03 ± 0,56</b>	
<b>Région golgienne</b>				
Particules d'or	2,00	17,00	0,00	1,00
Surface	0,34	1,38	0,37	0,73
Densité extrême	5,82	19,16	0,00	1,53
<b>Densité moyenne</b>	<b>11,16 ± 1,18</b>		<b>0,48 ± 0,31</b>	
<b>Granules de sécrétion immatures</b>				
Particules d'or	0,00	5,00	0,00	1,00
Surface	0,50	0,16	0,04	0,12
Densité extrême	0,00	67,16	0,00	12,90
<b>Densité moyenne</b>	<b>24,45 ± 2,93</b>		<b>2,79 ± 1,47</b>	
<b>Granules de sécrétion matures</b>				
Particules d'or	0,00	8,00	0,00	1,00
Surface	0,03	0,15	0,04	0,12
Densité extrême	0,00	97,39	0,00	24,13
<b>Densité moyenne</b>	<b>26,29 ± 2,78</b>		<b>2,77 ± 1,22</b>	
<b>Mitochondries</b>				
Particules d'or	0,00	7,00	0,00	1,00
Surface	0,07	0,33	0,09	0,25
Densité extrême	0,00	21,49	0,00	4,64
<b>Densité moyenne</b>	<b>6,79 ± 1,64</b>		<b>1,58 ± 0,60</b>	

Surface en  $\mu\text{m}^2$ Densité moyenne en particules d'or/ $\mu\text{m}^2 \pm \text{ESM}$

**C. Granules de sécrétion matures des cellules sécrétrices de glucagon.**

Compartiments cellulaires et données	Condition normale		Contrôle de spécificité	
	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum
<b>Granules de sécrétion matures</b>				
Particules d'or	1,00	13,00	0,00	1,00
Surface	0,02	0,07	0,02	0,06
Densité extrême	34,23	317,52	0,00	34,85
<b>Densité moyenne</b>	<b>135,55 ± 8,43</b>		<b>4,83 ± 2,45</b>	

Surface en  $\mu\text{m}^2$

Densité moyenne en particules d'or/ $\mu\text{m}^2 \pm \text{ESM}$

**D. Granules de sécrétion matures de cellules acineuses du pancréas exocrine de rat dont la sécrétion pancréatique a été stimulée.**

Compartiments cellulaires et données	Rat normal		Rat stimulé	
	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum
<b>Granules de sécrétion matures</b>				
Particules d'or	3,00	89,00	2,00	67,00
Surface	0,10	1,03	0,18	1,07
Densité extrême	17,52	128,77	8,53	90,12
<b>Densité moyenne</b>	<b>47,80 ± 3,32</b>		<b>55,48 ± 2,11</b>	

Surface en  $\mu\text{m}^2$

Densité moyenne en particules d'or/ $\mu\text{m}^2 \pm \text{ESM}$

Tableau 2

**ÉVALUATION QUANTITATIVE DE LA DENSITÉ DE  
MARQUAGE À L'OR COLLOÏDAL POUR PC7**

**A. Cellules acineuses du pancréas exocrine (anticorps contre le N-terminal).**

<b>Compartiments cellulaires et données</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
<b>Réticulum endoplasmique</b>		
Particules d'or	6,00	71,00
Surface	0,89	10,84
Densité extrême	3,00	7,54
<b>Densité moyenne</b>	<b>5,56 ± 1,38</b>	
<b>Région golgienne</b>		
Particules d'or	8,00	48,00
Surface	0,93	3,08
Densité extrême	8,46	20,21
<b>Densité moyenne</b>	<b>12,58 ± 3,38</b>	
<b>Vacuoles de condensation</b>		
Particules d'or	1,00	23,00
Surface	0,12	1,53
Densité extrême	5,77	22,01
<b>Densité moyenne</b>	<b>11,88 ± 2,32</b>	
<b>Granules de sécrétion</b>		
Particules d'or	3,00	53,00
Surface	0,28	1,22
Densité extrême	4,45	50,18
<b>Densité moyenne</b>	<b>18,58 ± 3,38</b>	
<b>Lumière acineuse</b>		
Particules d'or	0,00	17,00
Surface	0,14	1,15
Densité extrême	0,00	38,69
<b>Densité moyenne</b>	<b>13,19 ± 3,33</b>	
<b>Mitochondries</b>		
Particules d'or	0,00	4,00
Surface	0,04	1,43
Densité extrême	0,00	20,18
<b>Densité moyenne</b>	<b>4,96 ± 2,38</b>	

Surface en  $\mu\text{m}^2$

Densité moyenne en particules d'or/ $\mu\text{m}^2 \pm \text{ESM}$

### B. Cellules sécrétrice d'insuline.

Compartiments cellulaires et données	Anticorps contre le domaine P		Anticorps contre le N-terminal		Contrôle de spécificité (domaine P)	
	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.
<b>Réticulum endoplasmique</b>						
Particules d'or	2,00	23,00	8,00	31,00	2,00	14,00
Surface	0,22	3,21	1,11	4,52	0,97	11,24
Densité extrême	0,62	9,06	4,12	7,96	0,00	3,96
<b>Densité moyenne</b>	<b>5,98 ± 1,02</b>		<b>6,28 ± 1,10</b>		<b>1,67 ± 0,87</b>	
<b>Région golgienne</b>						
Particules d'or	1,00	15,00	5,00	32,00	0,00	1,00
Surface	0,17	2,32	0,35	2,59	0,21	2,47
Densité extrême	3,81	9,39	5,85	21,30	0,00	1,73
<b>Densité moyenne</b>	<b>6,27 ± 1,25</b>		<b>12,58 ± 2,16</b>		<b>0,56 ± 0,27</b>	
<b>Granules de sécrétion immatures</b>						
Particules d'or	0,00	3,00	7,00	93,00	0,00	1,00
Surface	0,05	0,15	0,03	0,44	0,05	0,37
Densité extrême	0,00	26,17	61,19	323,89	0,00	2,70
<b>Densité moyenne</b>	<b>9,09 ± 3,09</b>		<b>171,00 ± 8,09</b>		<b>0,38 ± 0,24</b>	
<b>Granules de sécrétion matures</b>						
Particules d'or	0,00	8,00	1,00	19,00	0,00	1,00
Surface	0,06	0,24	0,04	0,24	0,06	0,27
Densité extrême	0,00	76,09	10,49	272,37	0,00	4,99
<b>Densité moyenne</b>	<b>23,60 ± 4,30</b>		<b>68,80 ± 6,59</b>		<b>1,13 ± 0,51</b>	
<b>Mitochondries</b>						
Particules d'or	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	2,00
Surface	0,02	0,32	0,03	0,27	0,00	0,39
Densité extrême	0,00	29,26	0,00	21,49	0,00	10,01
<b>Densité moyenne</b>	<b>5,62 ± 2,78</b>		<b>6,81 ± 2,9</b>		<b>2,04 ± 1,09</b>	

Surface en  $\mu\text{m}^2$

Densité moyenne en particules d'or/ $\mu\text{m}^2 \pm \text{ESM}$

### Tableau 3

#### ÉVALUATION DU POURCENTAGE DE PARTICULES D'OR COLLOÏDAL ASSOCIÉE À LA MEMBRANE DES GRAINS DE SÉCRÉTION MATURES

Type cellulaire	Localisation	Furine	PC7 (anticorps contre le N-terminal)
Cellules acineuses exocrines	<i>membranaire</i>	21%	39%
	<i>contenu</i>	79%	61%
Cellules à insuline	<i>membranaire</i>	24%	13%
	<i>contenu</i>	76%	87%

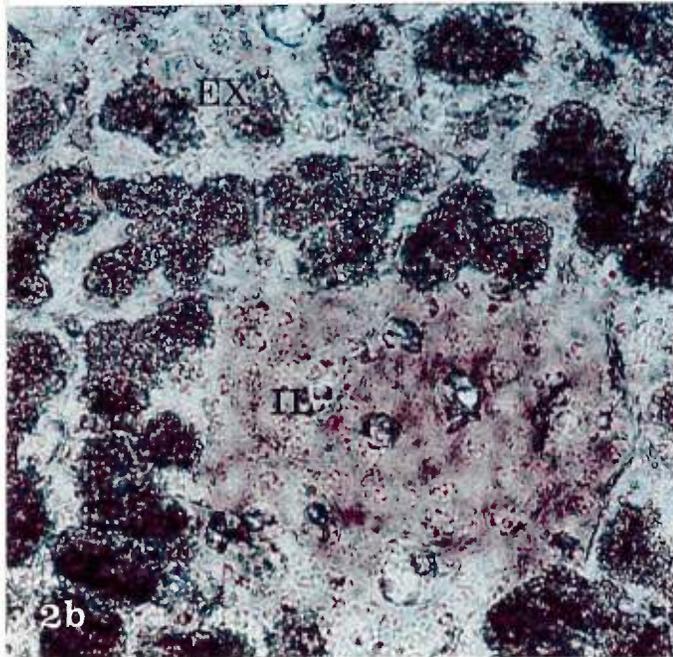
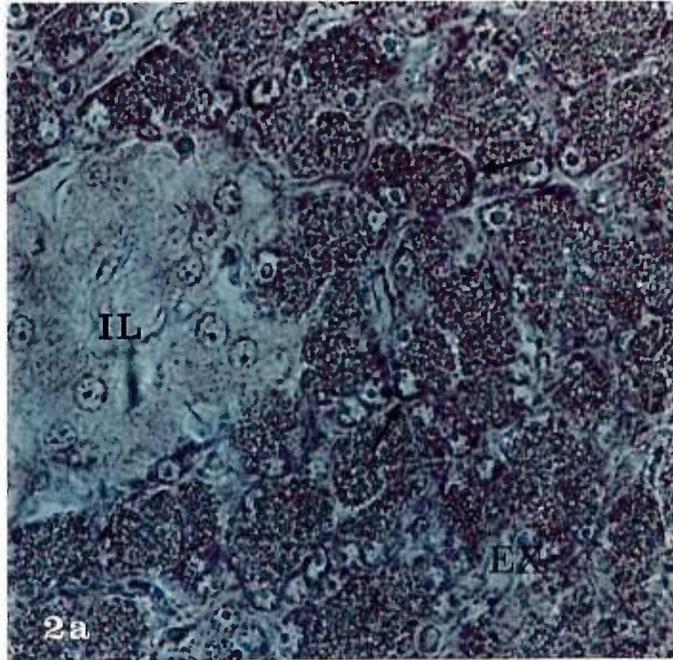
# **LÉGENDES DES FIGURES ET FIGURES**

**Figure 2:** Hybridation *in situ* avec des sondes d'ARN couplées à des molécules de digoxigénine et révélées par une réaction à la phosphatase alcaline.

La réaction donne un signal de couleur rose-mauve.

- (a) Cette image montre la détection de l'ARN messenger de la furine au niveau du parenchyme exocrine (EX) et de l'îlot de Langerhans (IL). Nous obtenons un signal du côté basal des cellules (↑).
- (b) La détection au niveau de l'îlot de Langerhans (IL) de l'ARN messenger de la chromogranine A valide la valeur de notre protocole.

Agrandissement: **a** X 4000; **b** X 4000.

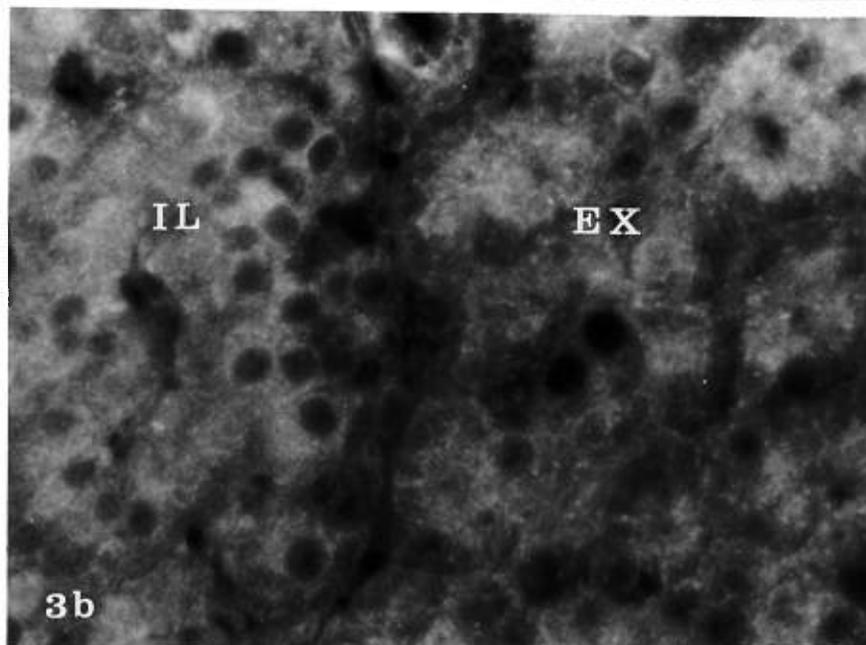
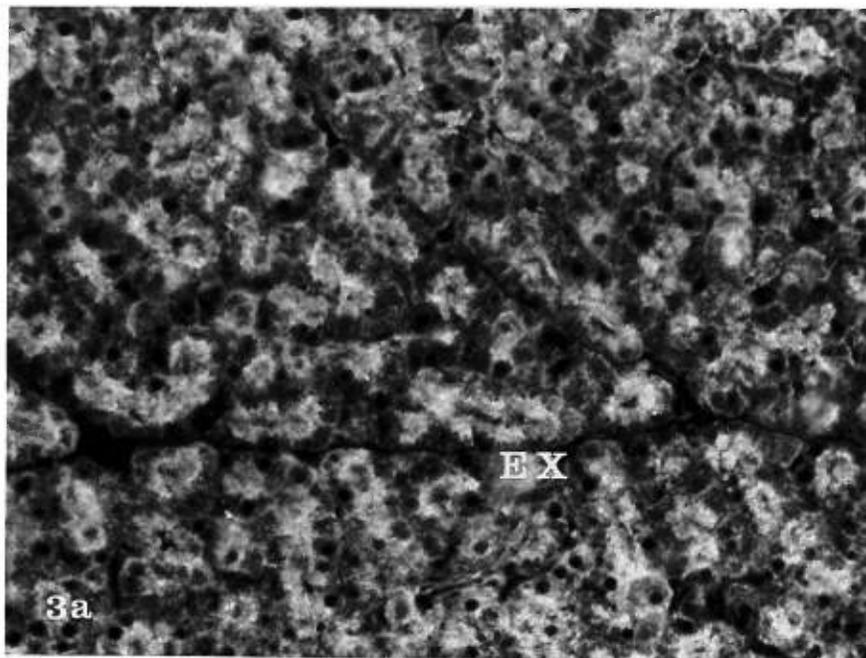


**Figure 3:** Mise en évidence de la furine dans le pancréas par Immunofluorescence en microscopie optique.

Le signal de détection apparaît en blanc.

- (a) Nous montrons ici, le parenchyme exocrine (EX) dont les cellules présentent de la fluorescence du côté apical des cellules.
- (b) Cette deuxième image montre une section d'îlot de Langerhans (IL) et de parenchyme exocrine (EX) arborant le signal de détection de la furine.

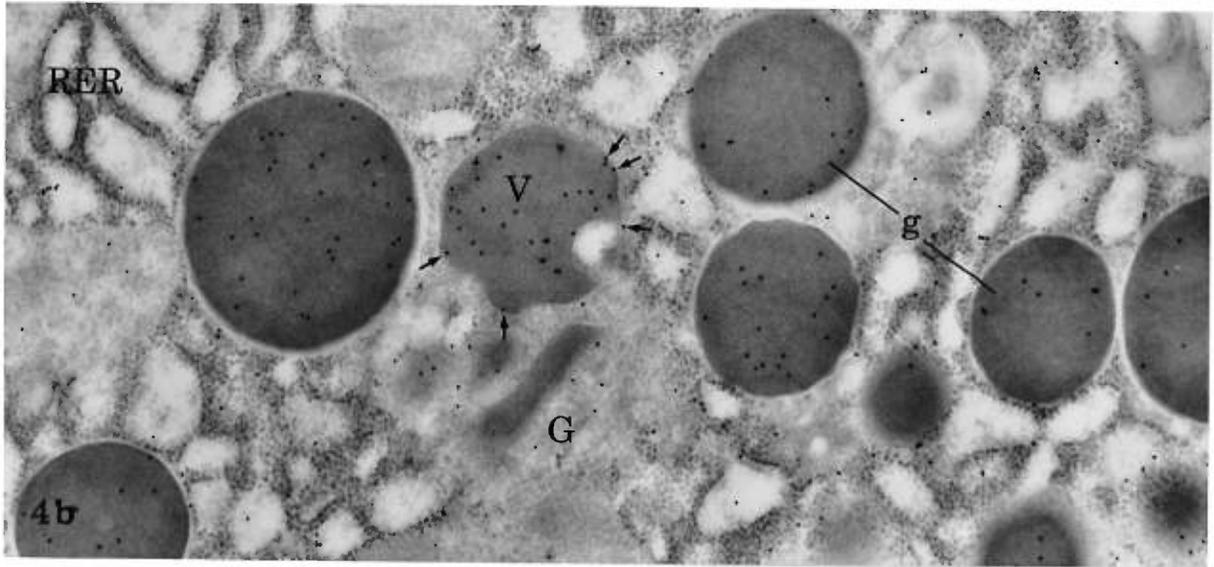
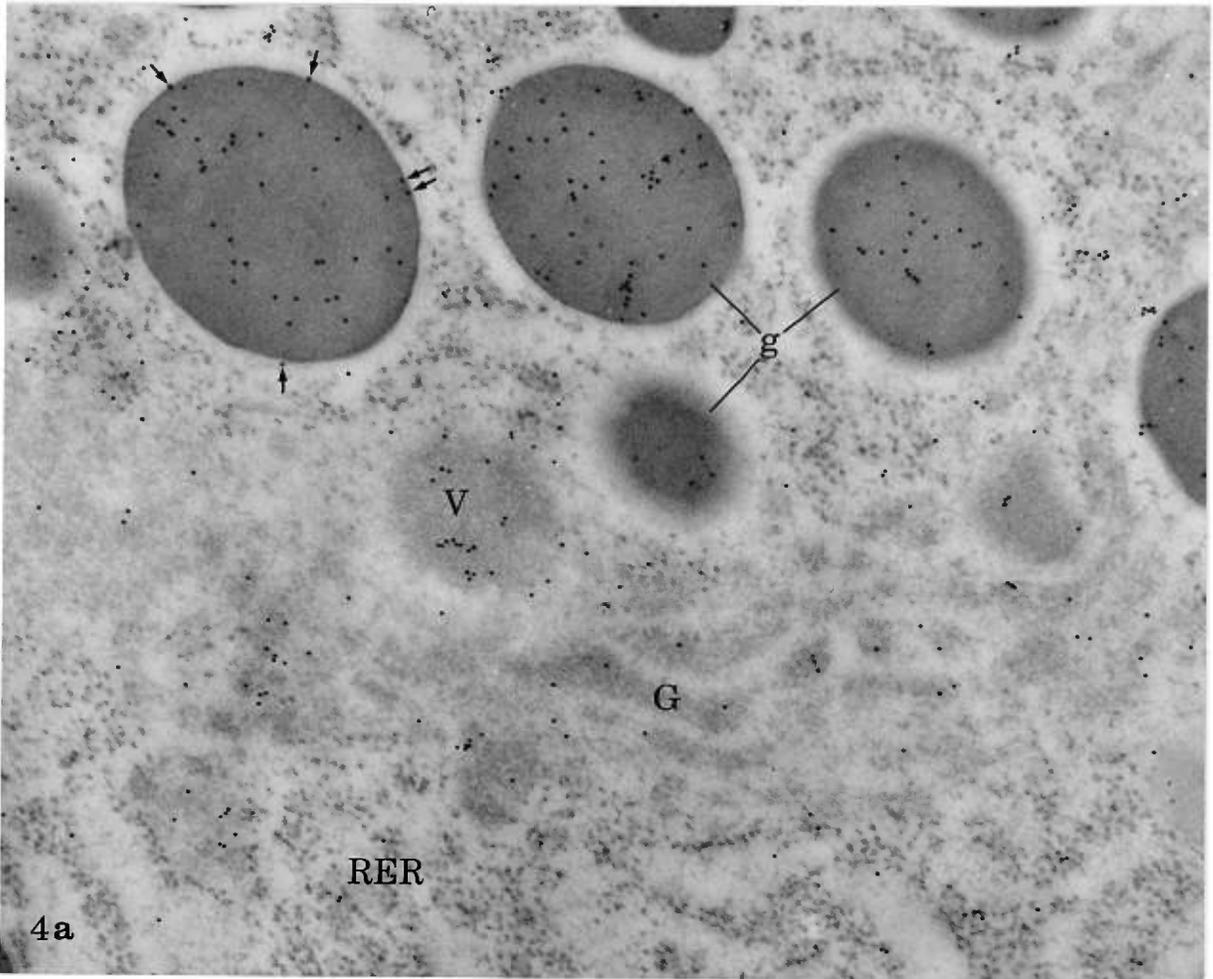
Agrandissement: **a** X 2000; **b** X 5000.



**Figure 4:** Immunocytochimie à l'or colloïdal de la furine, dans les cellules acineuses du pancréas exocrine.

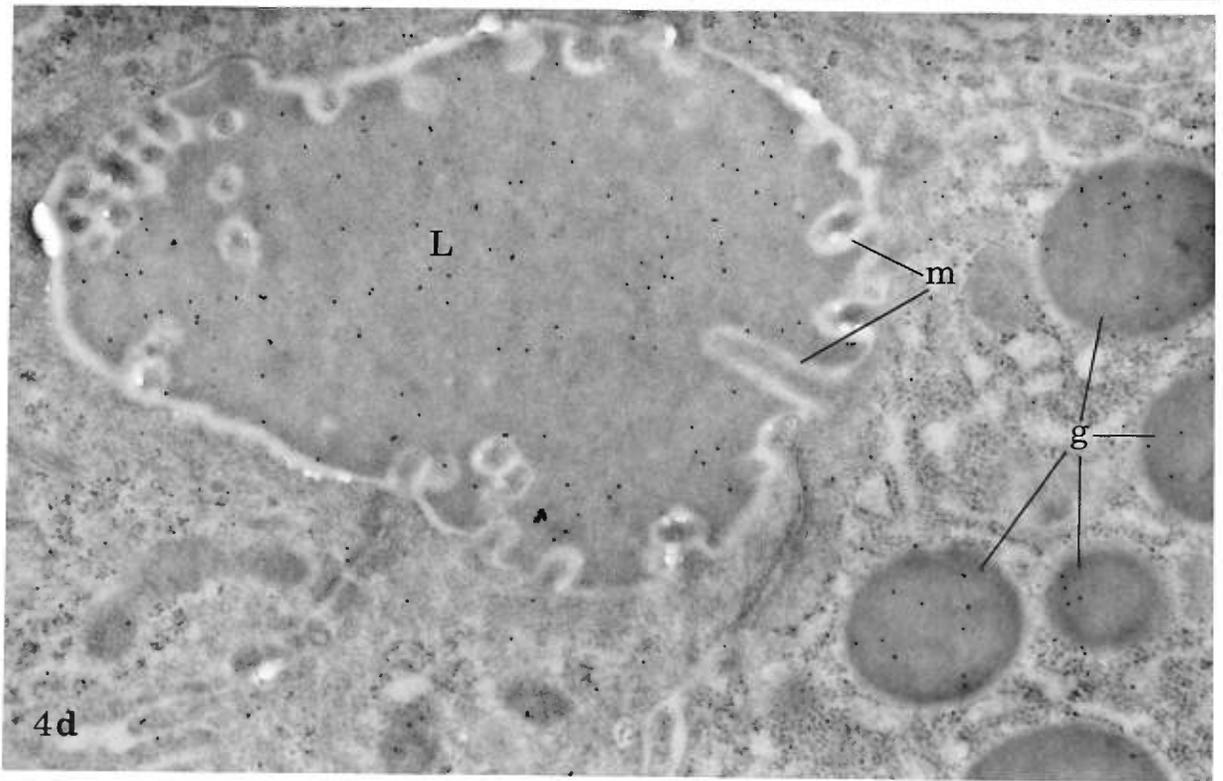
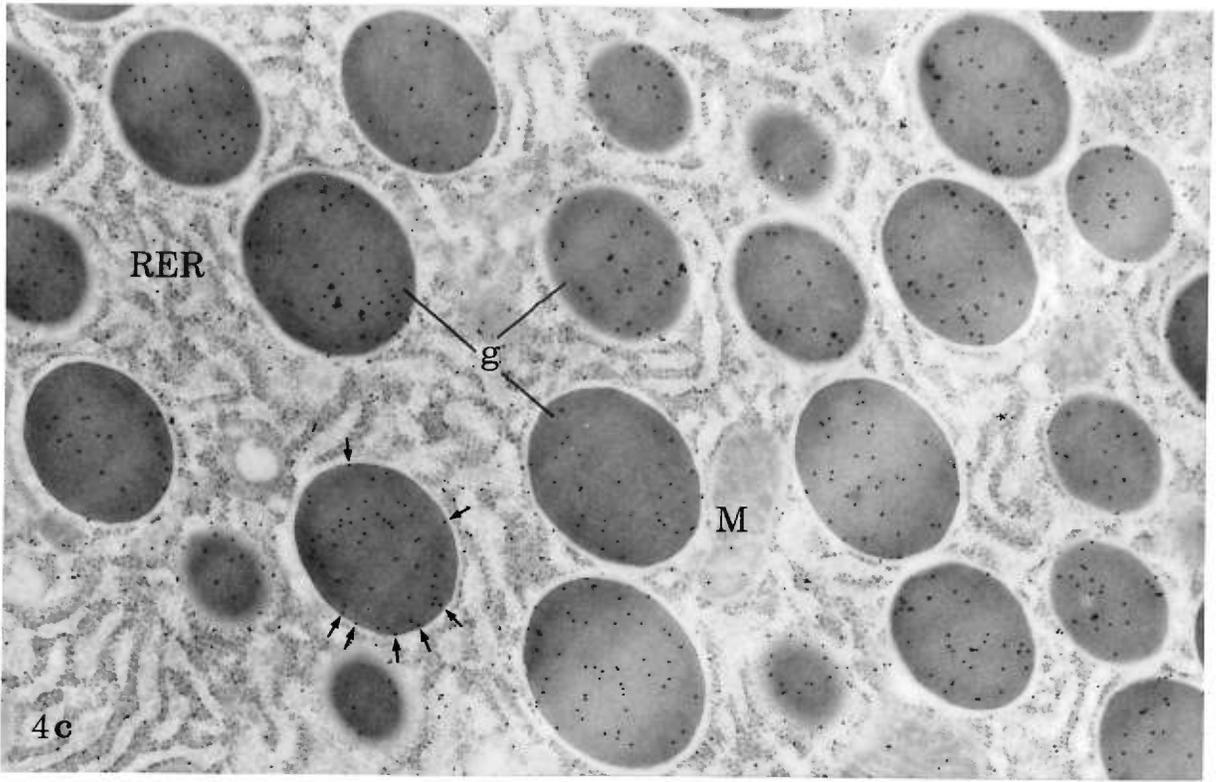
Dans cette série d'images, nous avons mis en évidence par des flèches (↑) des particules d'or semblant être associées à la membrane limitante des granules de zymogène.

- (a) Dans cette image nous pouvons voir des particules d'or colloïdal au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER), d'une région golgienne (G), d'une vacuole de condensation (V) et des granules de zymogène (g).
- (b) Cette image montre le marquage d'une section de réticulum endoplasmique (RER) et d'un appareil de Golgi (G) ainsi qu'une vacuole de condensation (V) et des granules de sécrétion (g).



**Figure 4 (suite):**

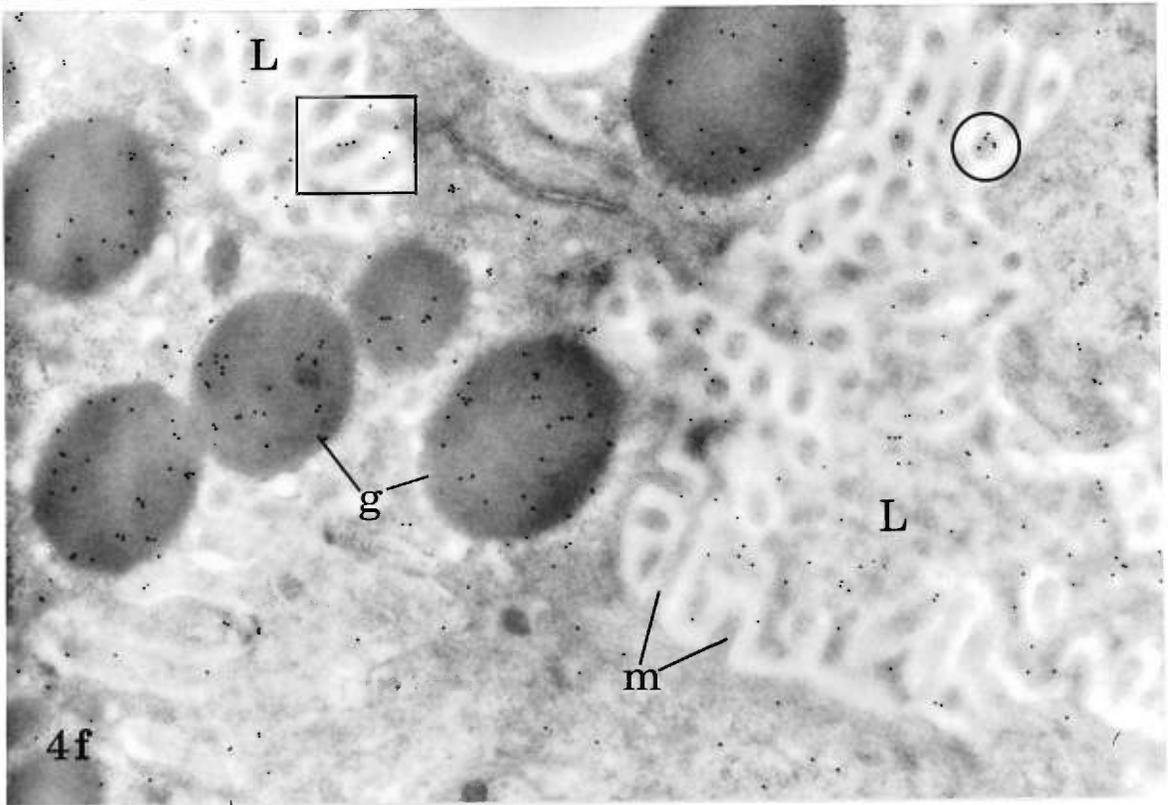
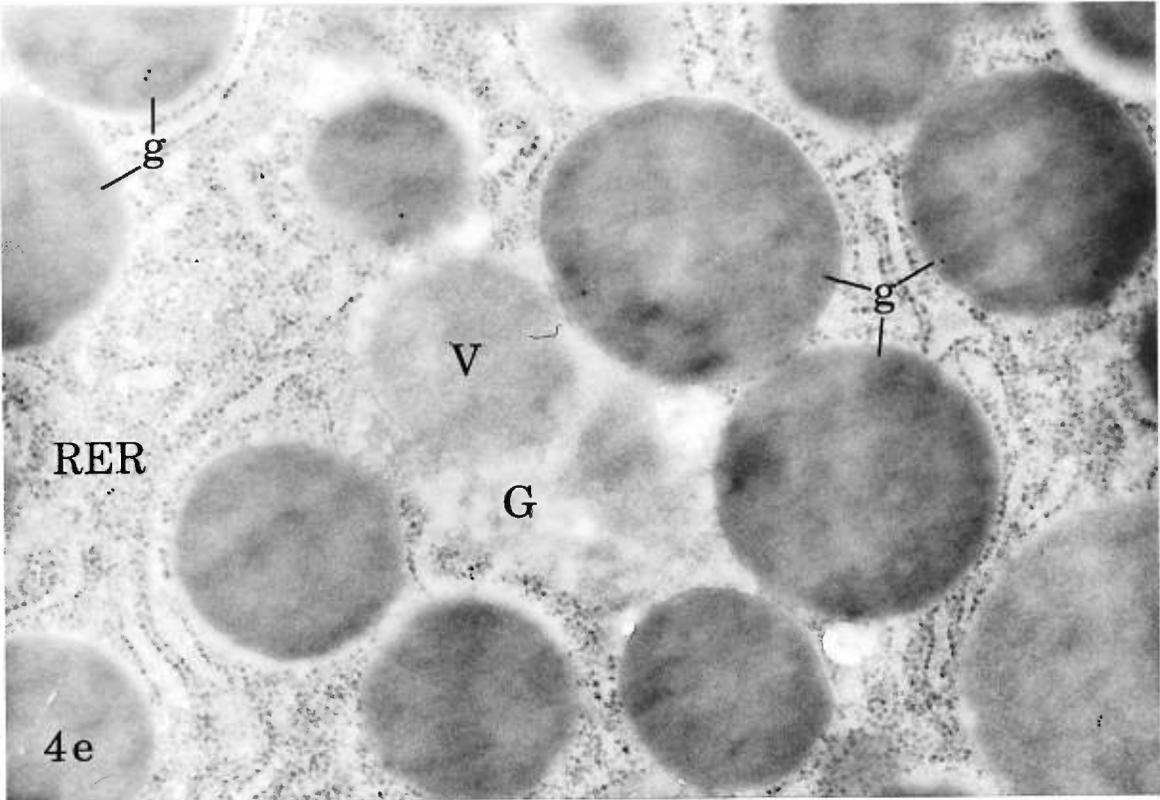
- (c) Des granules de zymogène (g), du réticulum endoplasmique rugueux (RER) et une mitochondrie (M), sont présentés ici.
  
- (d) Nous pouvons voir, une lumière acineuse avec sa lumière contenant du suc pancréatique (L). Le suc est marqué mais pas les microvillosités (m). À droite de l'image, il y a une cellule sécrétrice avec ses granules de sécrétion (g) contenant un marquage.



**Figure 4 (suite):**

- (e) Résultat du contrôle de spécificité de nos anticorps. Le réticulum endoplasmique (RER), l'appareil de Golgi (G), les vacuoles de condensation (V) et les granules de sécrétion (g) arborent un marquage nettement diminué.
- (f) Section de cellules acineuses de rat chez qui la sécrétion pancréatique a été stimulée, nous pouvons y voir des granules de zymogène (g), des lumières (L) avec les microvillosités (m) dont certaines présentent un marquage (voir l'encadré).

Agrandissement: **a** X 47 000; **b** X 34 000; **c** X 22 000; **d** X 32 000; **e** X 32 000; **f** X 23 000.

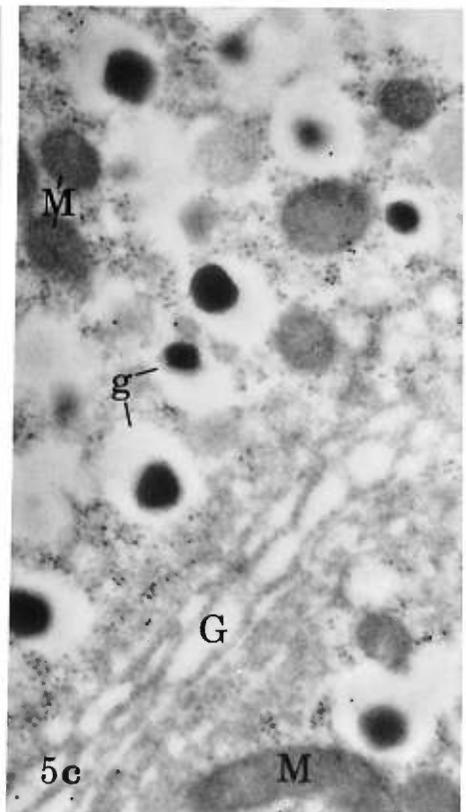
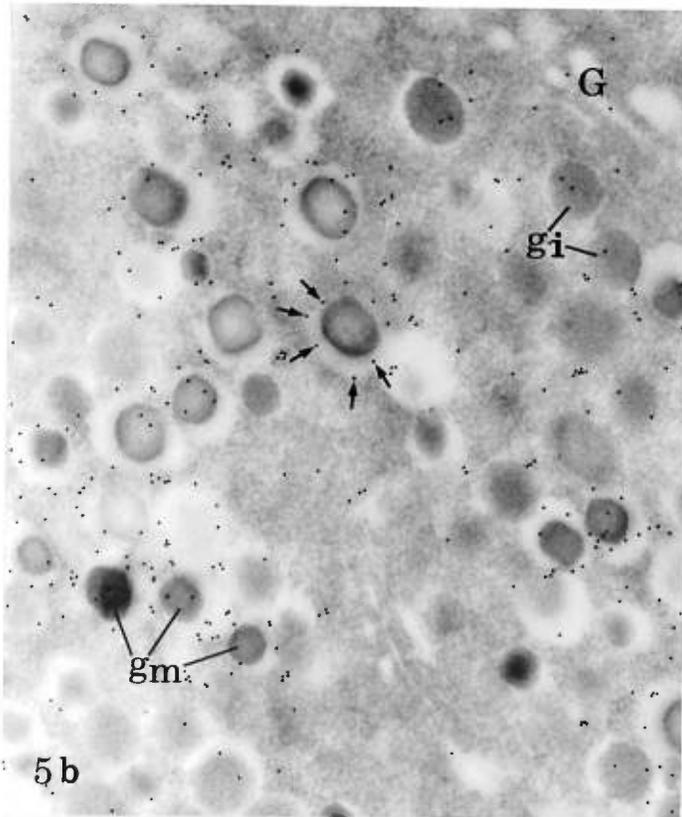
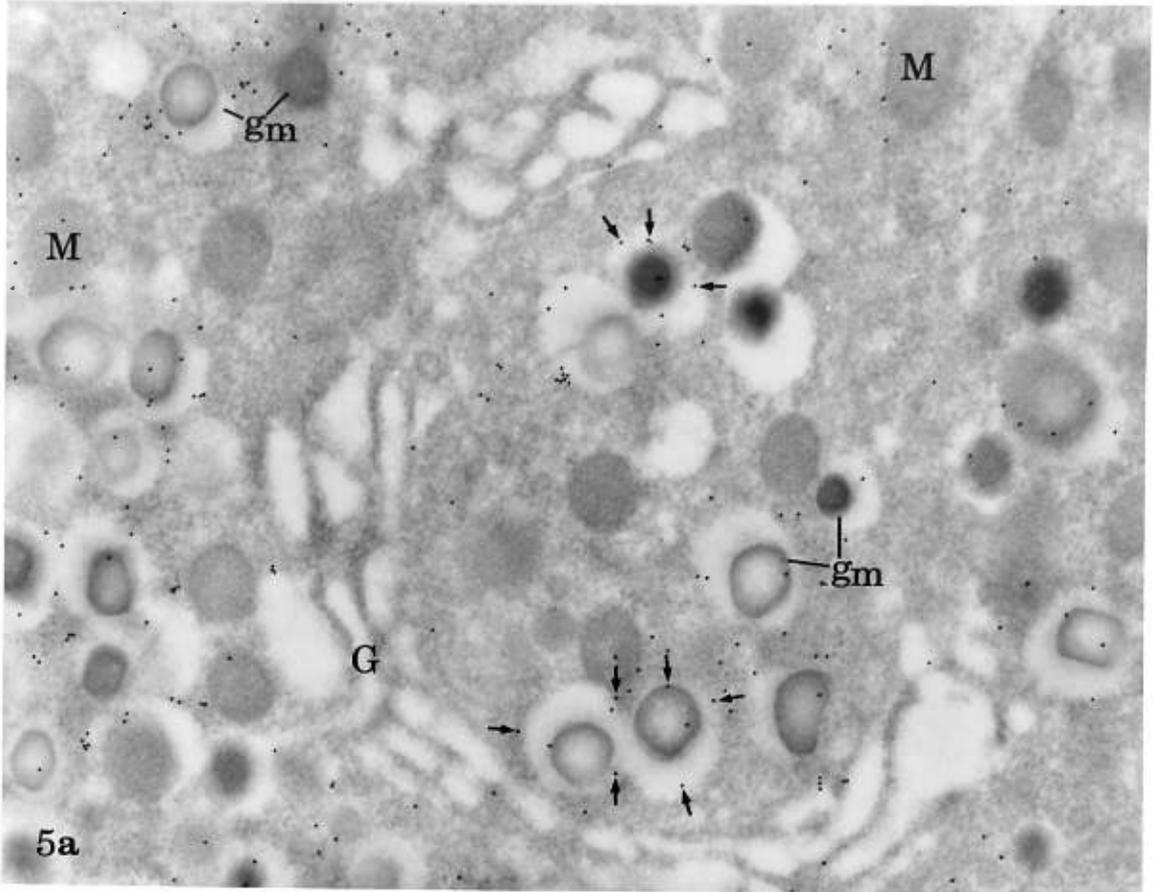


**Figure 5:** Immunocytochimie à l'or colloïdal de la furine, dans les cellules sécrétrices d'insuline.

Le marquage semblant être associé davantage à la membrane est mis en évidence à l'aide de flèches (↑).

- (a) Cette figure montre une partie d'une cellule à insuline avec une région golgienne (G), des granules de sécrétion matures (gm) qui arborent un marquage et des mitochondries (M) sans grain d'or.
- (b) Dans cette image, nous pouvons voir d'autres granules de sécrétion d'insuline (gm et gi) et une section d'appareil de Golgi (G).
- (c) Ici, nous pouvons voir qu'en contrôle de spécificité, il n'y a pas de marquage sur l'appareil de Golgi (G), et les grains de sécrétion (gm).

Agrandissement: **a** X 37 000; **b** X 32 000; **c** X 32 000.



**Figure 6:** Immunocytochimie à l'or colloïdal de la furine, dans les cellules sécrétrices de somatostatine.

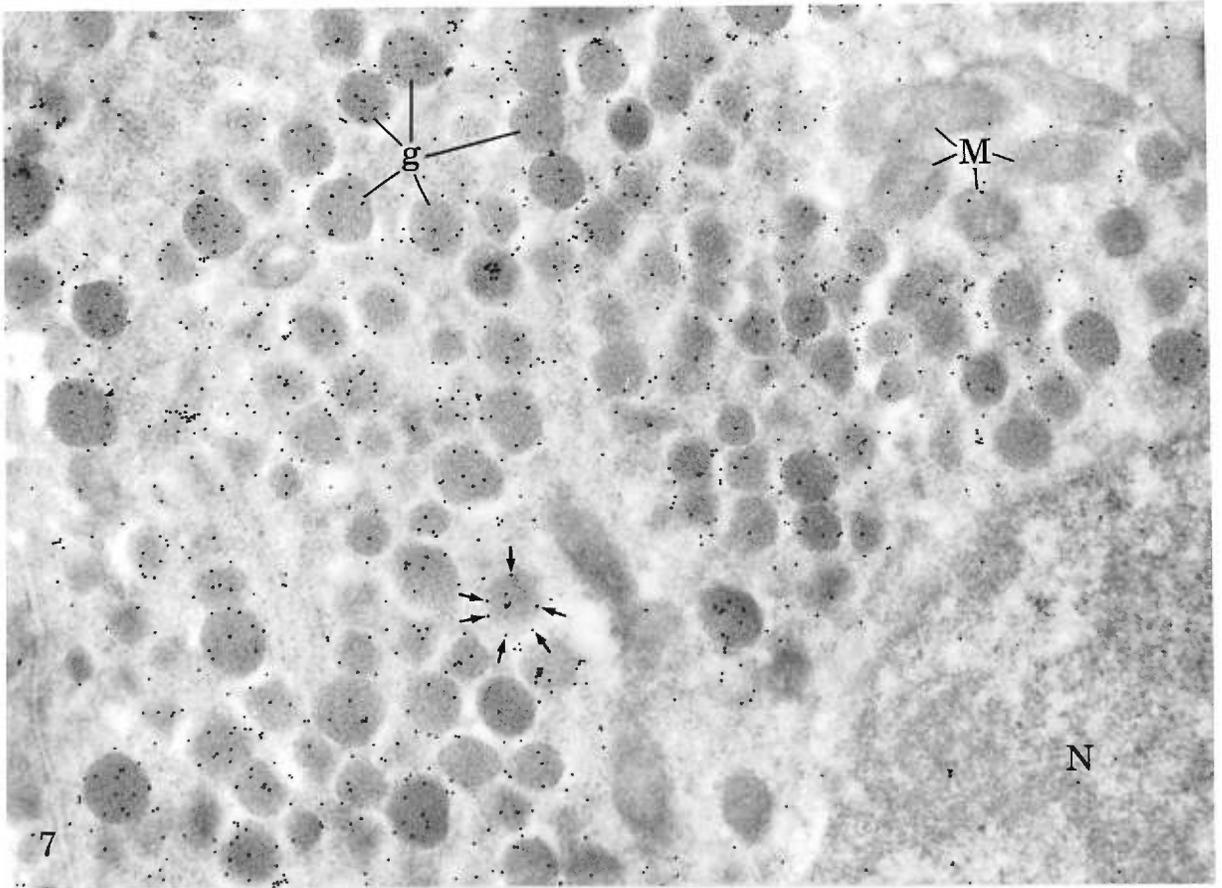
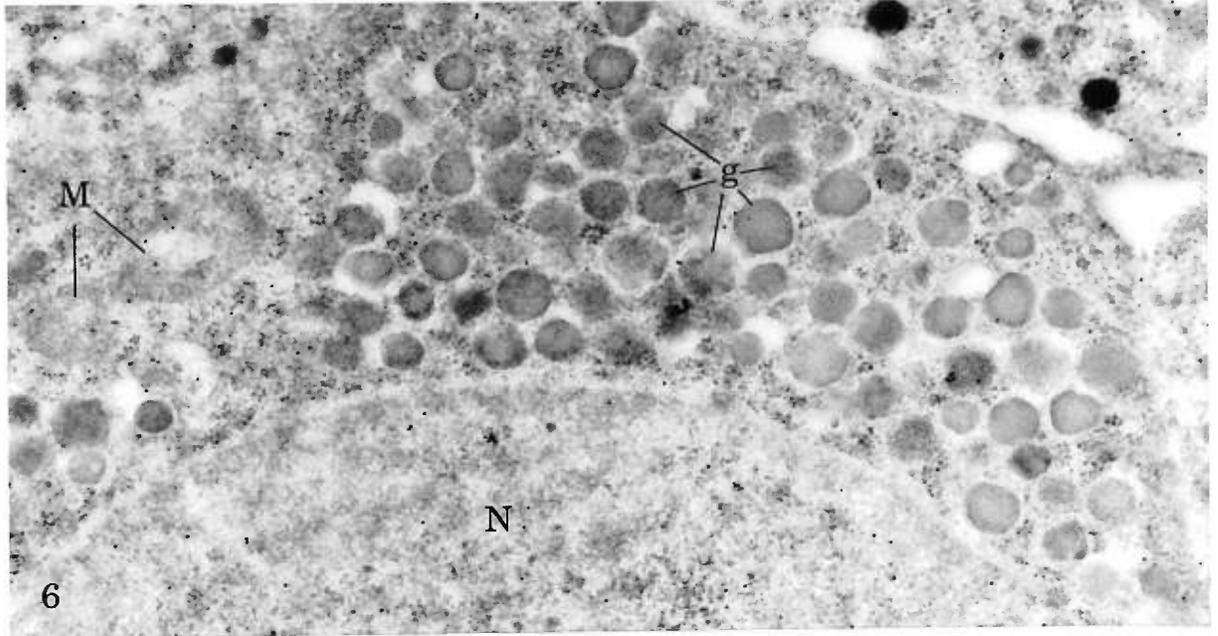
Ce type cellulaire n'arbore pas de marquage significatif. Nous voyons sur cette figure des granules de sécrétion de somatostatine (g), des mitochondries (M) et une section de noyau (N).

Agrandissement: X 30 000.

**Figure 7:** Immunocytochimie à l'or colloïdal de la furine, dans les cellules sécrétrices de glucagon.

Cette figure montre des granules de sécrétion (g). Un exemple de marquage associé à la membrane est montré par des flèches (!). Nous pouvons aussi voir des mitochondries (M) et une partie de noyau (N) ne contenant presque aucun marquage.

Agrandissement: X 34 000.

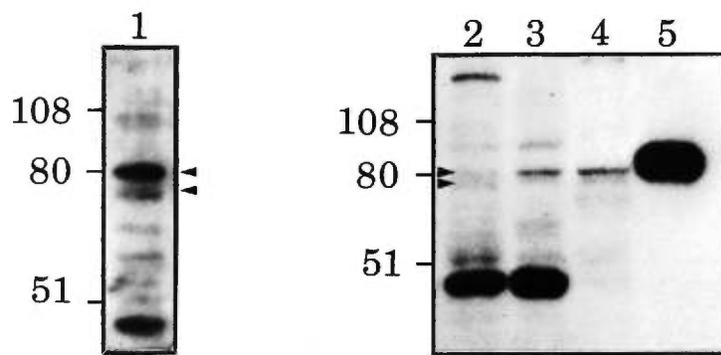


**Figure 8:** Immunobuvardage de la furine

**1:** Cellules exocrines pancréatiques solées. **2:** Cellules bétaTC3, **3:** Cellules Pc12, **4:** Tissus rénal, **5:** Milieu de culture de cellules BSC40 transfectées du gène de la furine. 40  $\mu$ g de protéines a été déposé.

Les protéines suivantes ont servi d'étalon pour établir l'échelle de poids moléculaire: 108kDa bêta-galactosidase, 80kDa albumine bovine, 51 kDa: oualbamine.

Les têtes de flèches représentent les bandes de 80kDa et de 76kDa.



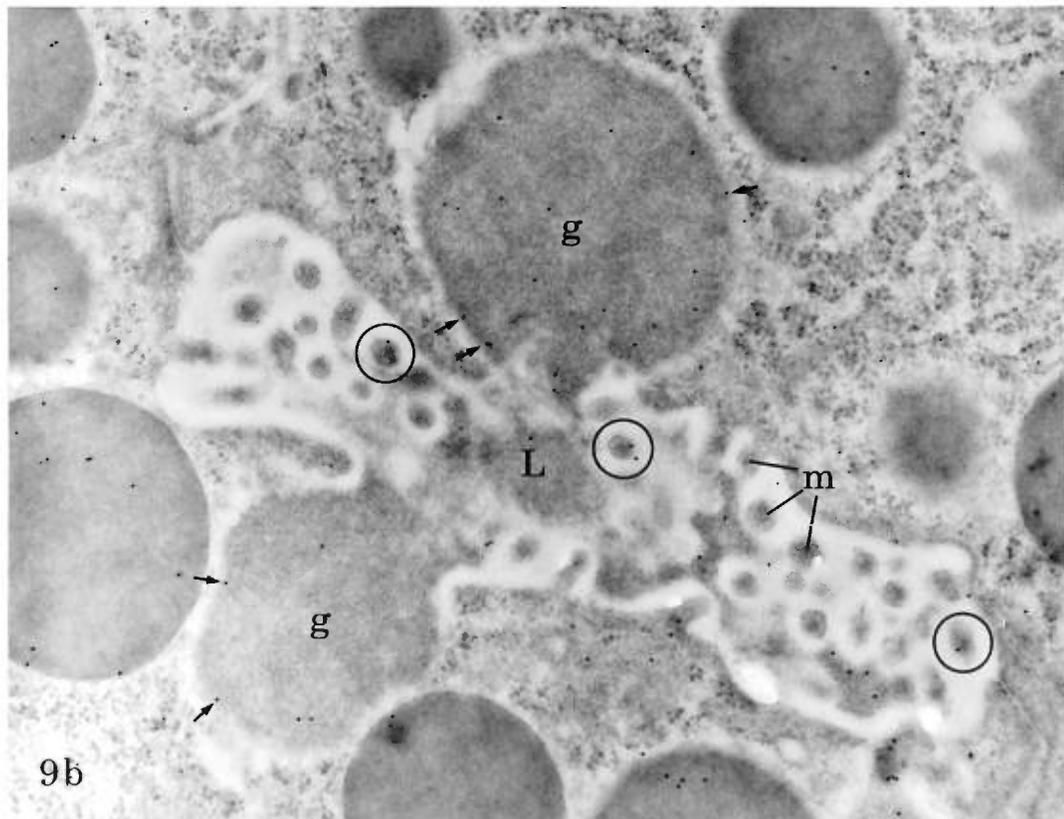
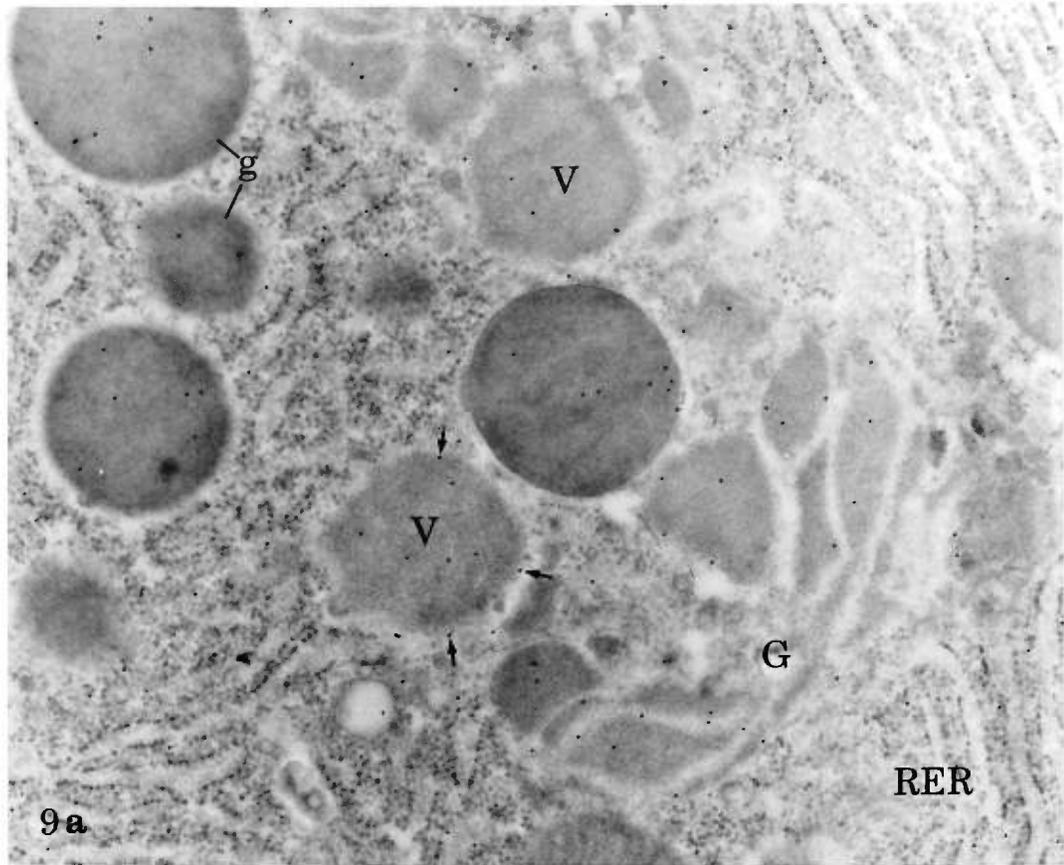
**Figure 9:** Immunocytochimie à l'or colloïdal de PC7, dans les cellules acineuses du pancréas exocrine.

Des flèches (†) signalent les particules d'or semblant être associées à la membrane limitante des granules de zymogène.

**(a)** Cette image montre le marquage du réticulum endoplasmique (RER) d'une section d'appareil de Golgi (G), des vacuoles de condensation (V) et des granules de zymogène (g).

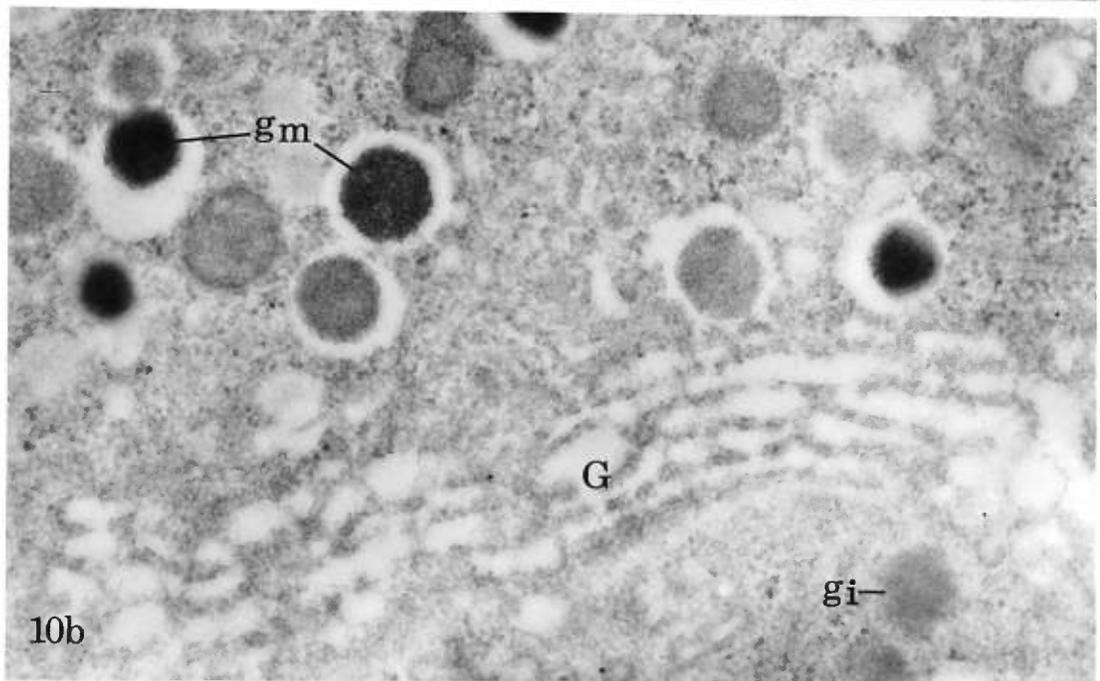
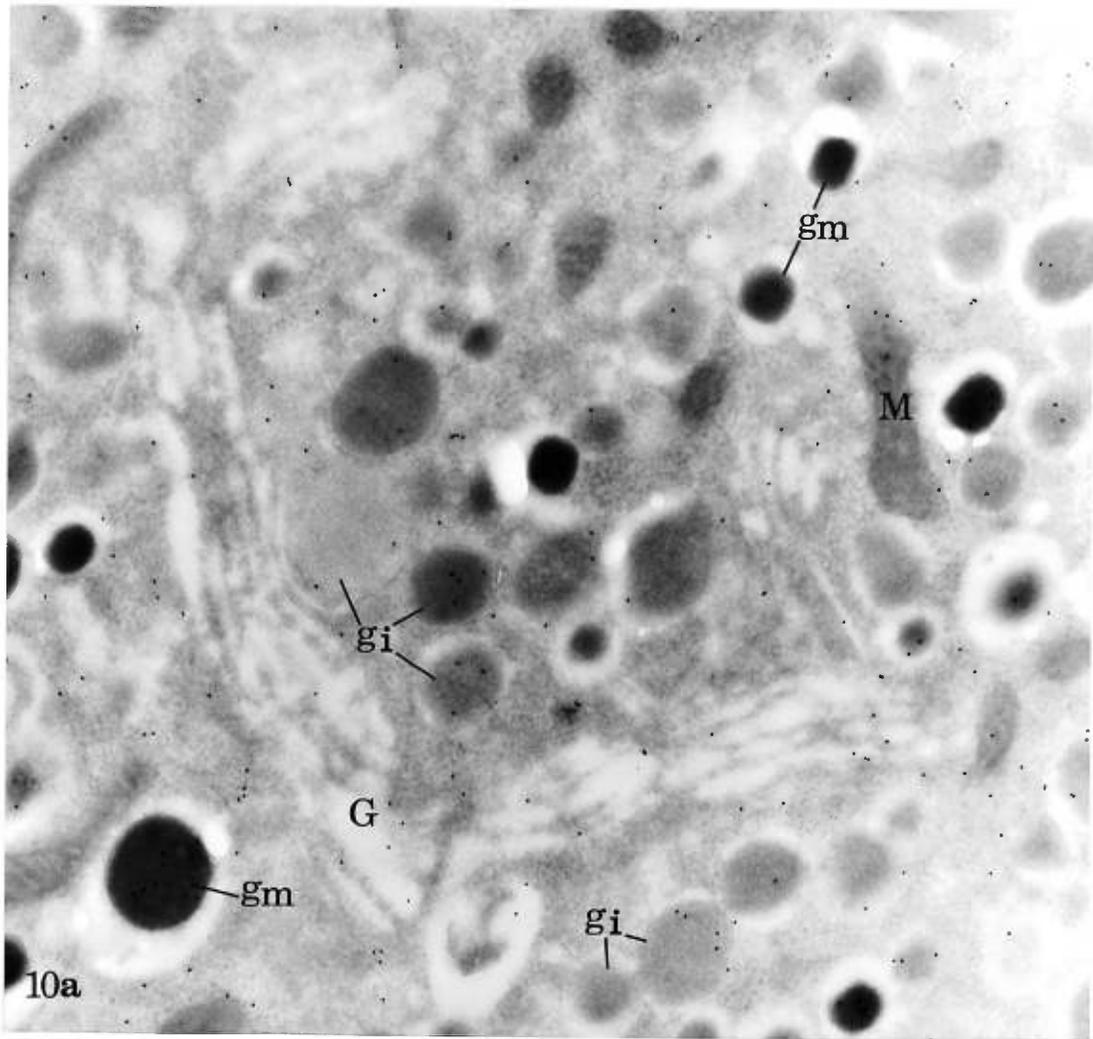
**(b)** Dans cette image nous pouvons voir des particules d'or colloïdal au niveau des granules de zymogène (g) dont deux déversent leur contenu dans la lumière (L). Des particules d'or se retrouvent sur le contenu de la lumière et sur les microvillosités (m).

Agrandissement: **a** X 30 000; **b** X 30 000;



**Figure 10:** Immunocytochimie à l'or colloïdal de PC7, dans les cellules sécrétrices d'insuline.

- (a) Cette image montre la détection de PC7 par l'anticorps dirigé contre le domaine P. Nous voyons ici, une section de cellule à insuline avec une région golgienne (G), des granules de sécrétion immatures (gi) et matures (gm) et des mitochondries (M).
  
- (b) Nous pouvons voir qu'en contrôle de spécificité (anticorps adsorbé à l'antigène), il n'y a pas de marquage sur l'appareil de Golgi (G), et les granules de sécrétion (gm).



**Figure 10 (suite):**

(c) Détection par l'anticorps dirigé contre une séquence située du côté du N-terminal. Ici, nous pouvons voir des granules de sécrétion immatures (gi), des granules de sécrétion matures (gm), des régions golgiennes (G) et des mitochondries (M).

Agrandissement: **a** X 32 000; **b** X 40 000; **c** X 27 000.

**Figure 11:** Immunocytochimie à l'or colloïdal de PC7, dans les cellules sécrétrices de somatostatine.

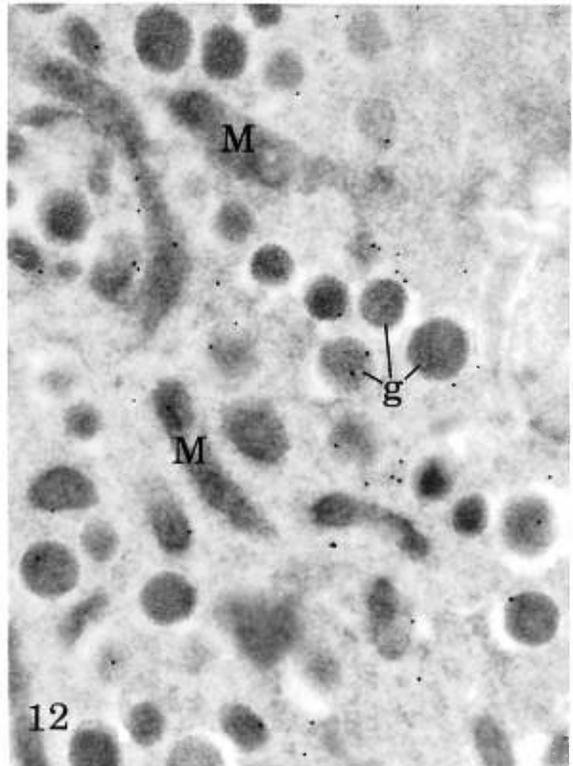
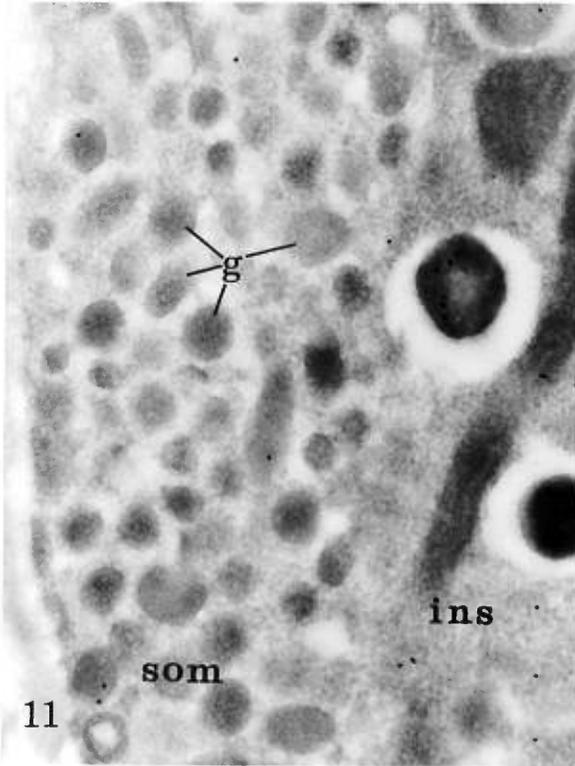
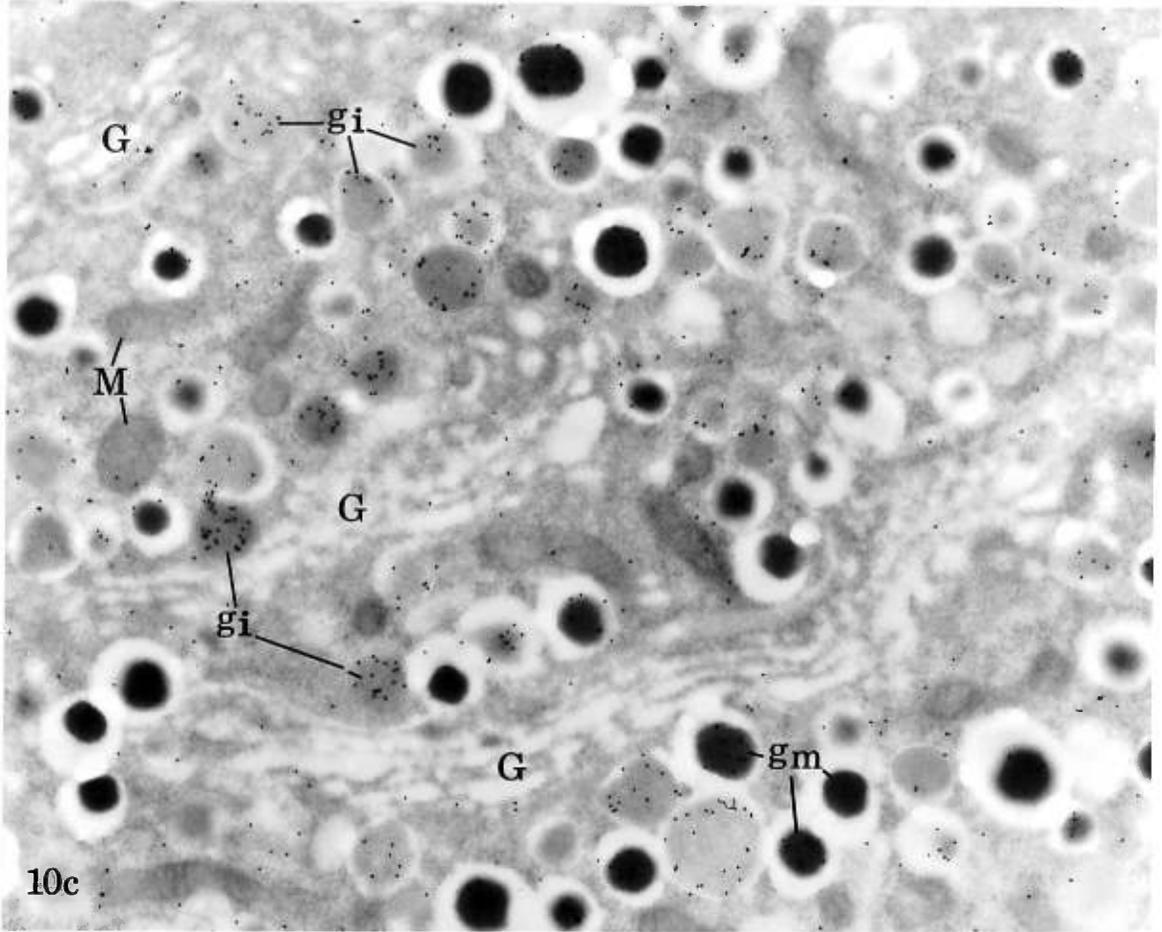
Cette figure montre des granules (g) de sécrétion de somatostatine (som) n'arborant pas de marquage significatif et une section de cellule à insuline (ins) avec des granules.

Agrandissement X 40 000.

**Figure 12:** Immunocytochimie à l'or colloïdal de PC7, dans les cellules sécrétrices de glucagon.

L'image montre des granules de sécrétion (g) et des mitochondries (M), sans marquage significatif.

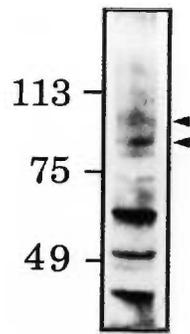
Agrandissement: X 32 000.



**Figure 13:** Immunobuvardage de PC7 (anticorps dirigé contre le domaine P).

Les protéines suivantes ont été utilisées pour établir l'échelle de poids moléculaire: 113kDa: bêta-galactosidase, 75kDa albumine bovine, 49kDa: ovalbumine.

Les têtes de flèches représentent les bandes de 101kDa et de 89kDa.



## REMERCIEMENTS

Je suis très fière de ce que j'ai accompli au cours de ma maîtrise. Il y a des étapes charnières dans une vie et je crois bien que la période où j'aurais été à la maîtrise, en aura été une.

Ce mémoire de maîtrise sera fort probablement la seule fois où je serais publiée, alors je compte bien en profiter... On ne sait jamais, si par hasard suite à une catastrophe quelconque, mon mémoire serait tout ce qu'il resterait de notre espèce et que des extraterrestres viennent, je ne voudrais surtout pas qu'ils prennent la farine pour notre seul intérêt en tant que terriens... Alors, je voudrais leurs dire que le plus important dans la vie ce sont les gens qui nous entourent et c'est ce qui rend la vie fabuleuse. Je tiens donc à remercier et saluer toutes les personnes que j'ai croisées au cours de cette période.

Dr. Bendayan, merci pour votre support, vous saviez me donner confiance en moi.

Merci Irène pour ton amitié, ta gentillesse et ton aide.

Diane, merci pour ton dynamisme, nos jasettes et ta patience à mes questions.

Gaétan, merci pour ton aide, ta présence et pour tout.

Merci Nadine pour ton aide en biochimie, et les planchers te répètent qu'ils étaient désolés de craquer...

"*Vive les Doucet*" grâce à Michèle, je me suis découverte des talents pour rassurer et encourager les autres, maintenant il me reste à savoir me rassurer moi-même.

Martin, je ne suis pas astineuse, j'ai juste toujours raison.

Maman, la meilleure cuisinière au monde, ta force, ton courage, ta grandeur sont de tes dons pour lesquels je t'admire et que j'espère un peu héréditaire (ou transmissible par la sauce à spaghetti). Tu m'as donné l'envie de me prévaloir de la chance que j'avais de pouvoir étudier. Je t'adore. Merci.

Papa, mon chauffeur du dimanche soir, pour le nombre de fois où tu es venu à l'université me reconduire, tu mérites un diplôme honorifique, merci énormément. C'est un peu de toi que me vient ma curiosité et mon goût pour la biologie, ce qui m'a poussé à m'intéresser à la recherche, en disant ça, je pense aux documentaires de Cousteau sur la vie marine ("*les affaires sur les poissons*") ou de Canard Canada ("*la vie nocturne de la*

*loutre d'Amérique*") que j'ai souvent regardés en ta compagnie pendant que tu dormais devant la télé.

J'ai la chance d'avoir un petit frère extraordinaire Marc-André, que j'aimais énormément avant qu'il soit rendu plus brillant que moi, et qu'il arrive à répondre à toutes les questions de Carmen Santiago.

Et je m'en voudrais d'oublier ma fidèle comparse sans qui j'aurais eu des A+ dans toutes les matières... Christine, mon incroyable amie incroyable: "*Mais que deviendrions-nous sans nos escapades au Commensal ou chez le Grec...?*".

Je remercie aussi Johanne Chaîne qui m'a aidé à imprimer mon mémoire et Jean Léveillé pour les photos.

Un énorme merci à tous les autres que j'ai côtoyés au département, je ne vous oublierai pas, vous êtes vraiment merveilleux.

Également, je tiens à remercier Robert Day, Nabil G. Seidah et leurs collaborateurs de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal pour les anticorps et le temps qu'ils m'ont accordés.

Je remercie, le Conseil de recherches médicales du Canada (CRM) (fonds Burroughs Wellcome) et l'association du diabète du Québec (ADQ) desquel j'ai reçu des bourses de stagiaire d'été.

Au revoir

(et à quand le prochain 5 pm à 3 am au Crocodile)