

Université de Montréal

**Surexpression neuronale de l'EPN
et génération/caractérisation de souris invalidées NL1/EPN**

Par

Valérie Sabourin

Département de biochimie

Faculté de Médecine



Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
en Biochimie

Août, 2004

©Valérie Sabourin, 2004



W

4

U58

2005

v.054

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Surexpression neuronale de l'EPN
et génération/caractérisation de souris invalidées NL1/EPN

Présenté par :
Valérie Sabourin

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

| | |
|--------------------------|----------------------|
| Président-rapporteur | Mounib Elchebly |
| Directeur de recherche | Guy Boileau |
| Codirecteur de recherche | Luc DesGroseillers |
| Membre du jury | Puttaswamy Manjunath |

Mémoire accepté le

RÉSUMÉ

L'EPN est le prototype d'une famille de métallopeptidases à zinc comprenant sept membres. L'EPN est une protéine transmembranaire possédant le site actif du côté extracellulaire, ce qui la place en bonne position pour cliver les peptides du milieu extracellulaire. Depuis quelques années, le peptide amyloïde β s'est ajouté à la longue liste des peptides potentiellement clivés par l'EPN. Ce peptide est la composante majeure des plaques séniles caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Au cours des dernières années, il a été démontré que l'EPN peut cliver le peptide amyloïde et serait en fait la peptidase responsable de la dégradation de ce peptide. L'EPN devient une cible thérapeutique potentielle intéressante. Pour vérifier ce potentiel, il convenait de déterminer si un effet protecteur contre l'accumulation de plaques amyloïdes résultait d'une surexpression de l'EPN. Des souris surexprimant l'EPN dans les neurones répondraient à cette question.

Pour ce faire, j'ai construit des vecteurs de surexpression neuronale de l'EPN en utilisant le promoteur de l'énolase spécifique aux neurones (pNSE). La spécificité et la force d'expression des transgènes ont par la suite été vérifiées. L'expression de l'EPN a été confirmée par buvardage Western, alors que les tests enzymatiques ont confirmés une activité neuronale EPN forte.

L'EPN et NL1 ont des patrons d'expression qui se recoupent et les souris invalidées pour chacune des peptidases n'ont pas de phénotype très apparent. J'ai généré des souris invalidées NL1/EPN afin de déterminer si la perte de l'une était compensée par l'autre. Ces souris ont été caractérisées sur leurs paramètres de distribution des génotypes, de fertilité et de croissance.

Mot-clés : métallopeptidase à zinc, endopeptidase neutre, Alzheimer, expression, activité enzymatique, NL1, souris, fertilité.

SUMMARY

NEP (neutral endopeptidase) is the prototype of a zinc metallopeptidases family which contains seven members. NEP is a transmembrane protein with the active site on the extracellular side, which positions it for cleavage of extracellular peptides. In the past few years, the amyloid β peptide was added to the long list of NEP potential substrates. This peptide is the major component of the senile plaques characteristic of the Alzheimer disease. In the last years, it has been shown that NEP can degrade the amyloid peptide and is the peptidase responsible for its cleavage. Therefore, NEP becomes a potentially interesting therapeutic target. To test this potential, we decided to determine whether NEP confers a protective effect against the amyloid plaques accumulation following its overexpression. Transgenic mice overexpressing NEP in neurons would answer this question.

With this in mind, I have constructed overexpressing neuronal NEP vectors while using the neuron specific enolase promoter (pNSE). The specificity and strength of expression of the transgene have been verified afterwards. NEP expression has been confirmed by Western blotting, while enzymatic assays have confirmed a strong neuronal NEP activity.

NEP and NL1 have similar expression patterns and their knock-out mice have little significant phenotype. I have generated double knock-out mice NL1/NEP to determine if those two peptidases can compensate for one another. Those mice have been characterized for their genotype distribution, fertility and growth.

Key words : zinc metallopeptidase, neutral endopeptidase, Alzheimer, expression, enzymatic activity, NL1, mouse, fertility.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|------|
| RÉSUMÉ..... | iii |
| SUMMARY | iv |
| LISTE DES TABLEAUX..... | viii |
| LISTE DES FIGURES..... | ix |
| ABBREVIATIONS..... | xi |
| DÉDICACE..... | xiii |
| REMERCIEMENTS | xiv |
| CHAPITRE 1 : INTRODUCTION | 1 |
| 1.1 Système peptidergique | 1 |
| 1.1.1 Maturation des peptides..... | 1 |
| 1.1.2 Dégradation des peptides..... | 2 |
| 1.2 Métalloprotéase à zinc..... | 2 |
| 1.2.1 Les Zincines | 3 |
| 1.2.2 Les Gluzincines | 3 |
| 1.2.3 Mécanisme d'action | 5 |
| 1.3 Famille de l'Endopeptidase neutre | 5 |
| 1.3.1 Endopeptidase neutre | 8 |
| 1.3.1.1 Caractéristiques structurales..... | 9 |
| 1.3.1.2 Activité enzymatique..... | 11 |
| 1.3.1.2.1 Acides aminés importants pour l'activité enzymatique | 12 |
| 1.3.1.2.2 Acides aminés importants pour la liaison du zinc..... | 12 |
| 1.3.1.2.3 Acides aminés impliqués dans la liaison du substrat | 12 |
| 1.3.1.3 Substrats | 13 |
| 1.3.1.4 Distribution tissulaire | 13 |
| 1.3.1.4.1 Modulation du signal nociceptif..... | 19 |
| 1.3.1.4.2 Équilibre eau /électrolytes..... | 20 |
| 1.3.1.4.3 Réaction inflammatoire | 21 |
| 1.3.1.4.4 Digestion et régulation du transit gastro-intestinal..... | 22 |

| | | |
|---|--|----|
| 1.3.1.4.5 | Différenciation et prolifération cellulaire..... | 23 |
| 1.3.1.4.6 | L'EPN dans la maladie d'Alzheimer..... | 24 |
| 1.3.1.4.7 | Rôle physiologique de l'EPN dans le testicule | 26 |
| 1.3.2 | NL1..... | 27 |
| 1.3.2.1 | Activité enzymatique de NL1..... | 28 |
| 1.3.2.2 | Distribution tissulaire de NL1 et rôles physiologiques | 28 |
| 1.4 | Description du projet de recherche..... | 29 |
| CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES | | 31 |
| 2.1 | Surexpression spécifique de l'EPN dans les cellules neuronales..... | 31 |
| 2.1.1 | Amplification des éléments du vecteur par PCR..... | 31 |
| 2.1.2 | Construction des plasmides de surexpression | 32 |
| 2.1.3 | Transfection..... | 32 |
| 2.1.4 | Cytofluorométrie de flux | 33 |
| 2.1.5 | Immunobuvardage de type Western..... | 34 |
| 2.1.6 | Fluorescence – préparation des pétris à la microscopie | 34 |
| 2.1.7 | Essais enzymatiques | 35 |
| 2.2 | Génération et caractérisation de souris invalidées en NL1/EPN..... | 35 |
| 2.2.1 | Buvardage de type Southern..... | 35 |
| 2.2.2 | PCR de géotypage | 36 |
| 2.2.3 | Étude de fertilité | 37 |
| 2.2.4 | Pesées des souris et courbes de croissance..... | 37 |
| CHAPITRE 3 : RÉSULTATS..... | | 38 |
| 3.1 | Surexpression spécifique de l'EPN dans les cellules neuronales..... | 38 |
| 3.1.1 | Construction des vecteurs surexprimant l'EPN..... | 38 |
| 3.1.1.1 | Stratégie de clonage..... | 43 |
| 3.1.1.2 | Analyse de l'expression de la GFP..... | 43 |
| 3.1.1.2.1 | Par microscopie à fluorescence | 43 |
| 3.1.1.2.2 | Par cytofluorométrie de flux..... | 43 |
| 3.1.1.3 | Expression de l'EPN | 46 |
| 3.1.1.3.1 | Évaluation de l'expression de l'EPN par immunobuvardage Western | 46 |

| | | |
|------------------------------|--|----|
| 3.1.1.3.2 | Tests enzymatiques..... | 48 |
| 3.2 | Génération et caractérisation de souris invalidées en NL1/EPN..... | 51 |
| 3.2.1 | Génération des souris doublement invalidées | 51 |
| 3.2.2 | Génotypage des souris générées..... | 51 |
| 3.2.3 | Études de fertilité des souris invalidées NL1/EPN | 58 |
| 3.2.4 | Autres caractérisations des souris doublement invalidées | 59 |
| CHAPITRE 4 : DISCUSSION..... | | 61 |
| 4.1 | Rôle de l'EPN dans la maladie d'Alzheimer..... | 61 |
| 4.2 | Souris invalidées NL1/EPN..... | 67 |
| 4.3 | Conclusion et perspectives | 69 |
| BIBLIOGRAPHIE | | 71 |

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 :

| | |
|--|-------|
| Tableau 1.1 – Identité entre les divers membres de la famille de l'endopeptidase neutre | 8 |
| Tableau 1.2 – Substrats de l'EPN | 14-18 |

CHAPITRE 3 :

| | |
|---|----|
| Tableau 3.1 – Distribution des gamètes et génotypes possibles suite au croisement de souris NL1+/- EPN+/- entre elles | 52 |
| Tableau 3.2 – Distribution mendélienne des génotypes de souris résultantes de croisements entre souris double hétérozygote | 52 |
| Tableau 3.3 – Moyenne du nombre de souriceaux par portée selon le génotype des croisements | 58 |

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 :

| | |
|---|----|
| Figure 1.1 – Classement des métallopeptidases à zinc | 4 |
| Figure 1.2 – Mécanisme enzymatique de la Thermolysine. | 6 |
| Figure 1.3 – Représentation des 7 membres de la famille de l'EPN. | 7 |
| Figure 1.4 – EPN complexée au phosphoramidon. | 10 |
| Figure 1.5 – Production du peptide amyloïde à partir de l'APP. | 26 |

CHAPITRE 3 :

| | |
|---|----|
| Figure 3.1 – Représentation de la stratégie utilisée pour la génération des vecteurs de surexpression de l'EPN. | 39 |
| Figure 3.2a – Représentation schématique des vecteurs intermédiaires aux constructions finales. | 40 |
| Figure 3.2 b– Représentation schématique des vecteurs intermédiaires aux constructions finales. | 41 |
| Figure 3.3 – Représentation des vecteurs finaux de surexpression de l'EPN. | 42 |
| Figure 3.4 – Contrôle de transfection / expression de l'EPN via le IRES-eGFP contenu dans BPEGA. | 44 |
| Figure 3.5 – Cytofluorométrie de flux sur des cellules N2A ou HEK transfectées transitoirement avec un vecteur vide, une métallopeptidase de la famille PHEX, BPEA et BPEGA. | 45 |
| Figure 3.6 – Gel de type SDS-PAGE 7,5% transféré sur membrane de nitrocellulose et révélé par immunobuvardage de type Western en utilisant l'anticorps de souris anti-EPN 18B5. | 47 |
| Figure 3.7 – Intensité de la fluorescence émise par le clivage d'un substrat fluorescent pour l'EPN, Abz-rRL-EDDnp. | 50 |
| Figure 3.8a – Stratégie de géotypage par buvardage Southern de l'allèle NL1. Détection par l'extrémité 3'. | 53 |
| Figure 3.8b – Stratégie de géotypage par PCR des souris invalidées NL1. | 54 |
| Figure 3.8c – Stratégie de géotypage par PCR des souris invalidées EPN. | 55 |

| | |
|--|----|
| Figure 3.9 – Exemple de buvardage de type Southern. | 56 |
| Figure 3.10 – Exemples de gels de géotypage par PCR. | 57 |
| Figure 3.11 – Courbes de croissance selon le géotype et le sexe. | 60 |
| CHAPITRE 4: | |
| Figure 4.1 – Sites de clivage de l'APP par les diverses sécrétases. | 62 |
| Figure 4.1 –Hypothèses expliquant les effets observés chez les souris invalidées NL1, EPN et NL1/EPN. | 69 |

ABBREVIATIONS

| | |
|-----------|---|
| A β | amyloïde beta |
| ADAM | <i>proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain</i> |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADNc | ADN complémentaire |
| Akt | <i>serine/threonine proteine kinase</i> |
| ANF | <i>Atrial natriuretic factor</i> |
| APP | <i>Amyloidβ Protein Precursor</i> |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ARNm | ARN messenger |
| BACE | <i>beta-site APP-cleaving enzyme</i> |
| BLP | <i>Bombesin-like peptide</i> |
| CALLA | <i>Common acute leukemia lymphoblastic antigen</i> |
| CaMKII | <i>Calcium-calmodulin-dependant kinase II</i> |
| CGRP | <i>Calcitonin gene-related peptide</i> |
| ECA | Enzyme de conversion de l'angiotensine |
| ECE | Enzyme de conversion de l'endothéline |
| EPN | Endopeptidase neutre |
| ET | Endothéline |
| FAK | <i>Focal adhesion kinase</i> |
| FGF | <i>Fibroblast growth factor</i> |
| IDE | <i>Insulin-degrading enzyme</i> |
| kDa | kiloDalton |
| MA | maladie d'Alzheimer |
| MSH | <i>Melanocyte stimulating hormone</i> |
| NL1 | <i>Neprilysin-like 1</i> |
| OGP | <i>Osteogenic growth peptide</i> |
| pb | paire de bases |
| PC | Pro-hormone convertase |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |

| | |
|-------|---|
| PDGF | <i>Platelet-derived growth factors</i> |
| PFA | Paraformaldéhyde |
| PHEX | <i>Phosphate regulating gene with homology to endopeptidase on the X chromosome</i> |
| PI3K | <i>phosphatidylinositol 3-monophosphate</i> |
| PTEN | <i>phosphatase and tensin homologue</i> |
| PTHrP | <i>Parathyroid hormone-related protein</i> |
| RE | Réticulum endoplasmique |
| XLH | <i>X-linked hypophosphataemia</i> |

À mes parents,
Luc Sabourin
et Michèle Lemieux,
pour leur soutien constant

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Guy Boileau pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, ainsi que le Dr. Luc DesGroseillers pour sa supervision lors de mes études graduées.

Un grand merci à toutes les personnes du laboratoire pour l'accueil et l'ambiance plaisante. Un merci particulier à Mélanie Carpentier-Primi qui a grandement facilité mon intégration dans le laboratoire par ses connaissances et ses conseils avisés. Merci à Mathieu St-Louis et Alexandre Benoit pour leur assistance technique et leur présence toute particulière qui ont rendu les années de ma maîtrise si intéressante.

Je tiens également à souligner l'assistance très appréciée de Louise Cournoyer dont les conseils avisés ont été des plus précieux.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 Système peptidergique

Les cellules eucaryotes communiquent entre elles par le biais de mécanismes élaborés de propagation d'information utilisant un grand nombre de molécules différentes. Les peptides sont l'un des médias de communication intercellulaire utilisés. Ces peptides faisant office de molécules messagères sont généralement en deçà de 100 résidus d'acides aminés et sont de nature hydrophile.

Le cheminement effectué par ces peptides, depuis leur synthèse jusqu'à l'obtention de l'effet physiologique, est divisé en trois étapes majeures [revue par Snyder (1985)]. Tout d'abord, il y a synthèse du peptide, sa maturation et sa sécrétion par les cellules émettrices. Ensuite le peptide agit sur la cellule cible en liant son récepteur à la surface membranaire, déclenchant de ce fait une cascade d'évènements menant à l'effet physiologique recherché. Finalement, il doit y avoir dégradation du peptide pour endiguer l'action de celui-ci et éviter une stimulation excessive de la cellule cible.

Plusieurs protéases sont impliquées dans le contrôle de l'activation ou de la dégradation des peptides.

1.1.1 Maturation des peptides

Peu de peptides de communication sont bioactifs dès leur synthèse. Ils nécessitent des modifications avant d'atteindre leur état fonctionnel final [revue par : Seidah et al. (1998), Khan & James (1998), et Mizuno & Matsuo (1994)]. Un bon nombre de peptides sont synthétisés sous forme de précurseurs, qui cheminent au travers du réticulum endoplasmique pour se diriger par la suite vers l'appareil de Golgi. Dans le Golgi, en particulier au niveau *trans*-Golgi, se retrouvent des protéases de la famille de la subtilisine, soit les pro-hormones convertases (PC), qui

effectueront les étapes de maturation protéolytique avant que les peptides actifs soient dirigés vers les vésicules de sécrétion, pour la voie régulée de sécrétion, ou à la membrane plasmique, pour la voie de sécrétion constitutive.

Au niveau de la membrane cellulaire, les métalloprotéases à zinc se retrouvent impliquées dans des processus de maturation supplémentaires à ceux déjà accomplis dans la cellule [revue par Turner & Tanzawa (1997)]. L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), clivant l'angiotensine I en angiotensine II (Corvol et Williams 1997), et l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE, Voir section 1.3.2) qui hydrolyse les isoformes précurseurs de l'endothéline en endothéline fonctionnelle (Turner 1997), en sont deux exemples bien connus.

1.1.2 Dégradation des peptides

Une fois le signal peptidique propagé, celui-ci doit être enrayé. L'arrêt du signal se fait le plus souvent par dégradation protéolytique des peptides. Les métalloprotéases à zinc font partie des enzymes impliquées dans la dégradation des peptides actifs, et donc responsables d'arrêter la stimulation physiologique [revue par Turner & Tanzawa (1997)]. L'endopeptidase neutre (EPN), qui sera discuté dans la section 1.3.1 de ce mémoire, en constitue un des exemples les mieux caractérisés.

1.2 Métalloprotéase à zinc

Les métallopeptidases à zinc constituent une très grande classe d'enzymes, très diversifiées, caractérisées par la présence d'un atome de zinc au niveau de leur site actif. L'ion de zinc de ces protéases joue un rôle essentiel dans la réaction catalytique. La comparaison des séquences des différentes métallopeptidases à zinc connues a permis le classement de celles-ci en groupes selon leur organisation au

niveau du site actif. Les métallopeptidases à zinc possèdent toutes le motif nommé 'signature du zinc' dans leur séquence consensus, qui comprend les acides aminés requis pour lier le zinc et ceux nécessaires à la catalyse enzymatique.

Les métalloprotéases à zinc sont classées en famille selon leur nature et l'organisation des acides aminés 'signature'(Joneneel et al. 1989). Il y a quatre super-familles, soit les zincines (motif HEXXH), les inverzincines (HXXEH), les carboxypeptidases (HXXE) et les DD-carboxypeptidases (HXH) (Voir Figure 1.1).

Dans le cadre de ce mémoire, il sera uniquement question des zincines.

1.2.1 Les Zincines

Les zincines sont caractérisées par le motif HEXXH où les deux histidines font office de ligands pour le zinc et l'acide glutamique est le résidu catalytique. Les X peuvent être n'importe quel acide aminé mais sont généralement des résidus non-chargés.

1.2.2 Les Gluzincines

Les Gluzincines sont une sous-classe de la grande famille des zincines. Ces enzymes se caractérisent par la présence d'un acide glutamique comme 3^e ligand du zinc, en plus des deux histidines de la séquence 'signature'. Le motif est HEXXH...E où l'espacement entre le deuxième résidu histidine et l'acide glutamique peut varier entre 24 et 64 résidus d'acides aminés.

Il y a quatre sous-classes de gluzincines, soit la famille de la Thermolysine, la famille de l'EPN, la famille de l'ECA et celle des aminopeptidases.

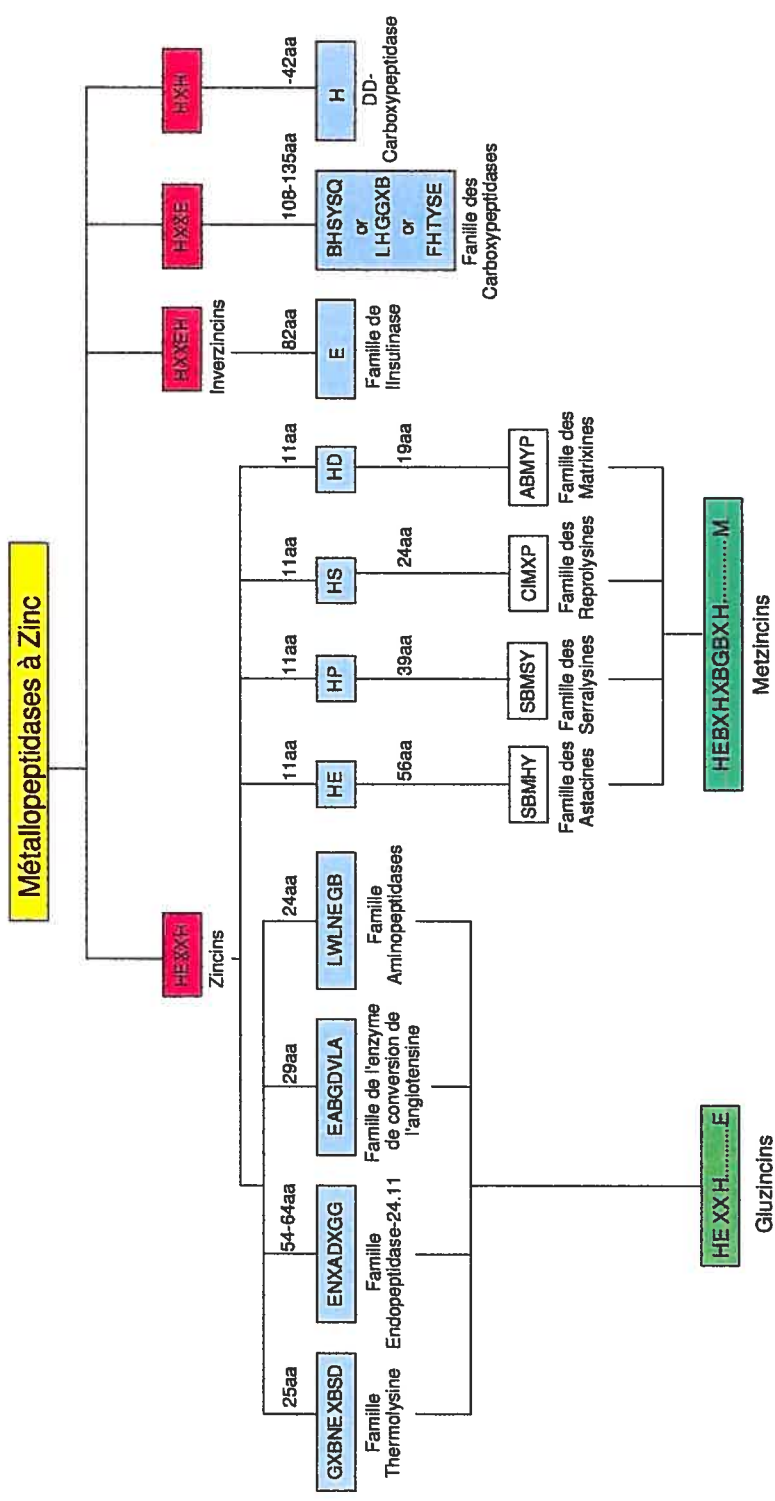


Figure 1.1 – Classement des métallopeptidases à zinc

1.2.3 Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action des quatre sous-classes de gluzincines est similaire. La Thermolysine, une enzyme bactérienne de *Bacillus thermoproteoliticus*, a été la première gluzincine à être identifiée. Celle-ci a donc été largement étudiée et nos connaissances du mécanisme d'action des gluzincines sont largement inspirées du mécanisme de la Thermolysine (Matthews 1988).

Le mécanisme enzymatique des gluzincines requiert la présence au site actif d'une molécule d'eau associée à l'acide aminé catalytique. La première étape du mécanisme est la formation d'une liaison de coordination entre l'atome de zinc du site actif et l'oxygène du groupement carboxyle du lien peptidique à cliver. Une fois cette liaison effectuée, le zinc passe d'un état de tétracoordination à un état de pentacoordination. Cela induit une polarité de la molécule d'eau associée à l'acide glutamique catalytique. La molécule d'eau devient un puissant nucléophile et attaque le carbone du lien peptidique à hydrolyser. Il y a alors protonation de l'atome azote de ce lien, ce qui entraîne la scission et la génération de deux sous-produits (Voir Figure 1.2).

1.3 Famille de l'Endopeptidase neutre

La famille de l'EPN comprend jusqu'à maintenant sept membres répertoriés, soit l'EPN qui est le prototype de la famille, ECE-1, ECE-2, PHEX, ECEL1, KELL et NL1 (Voir Figure 1.3 et Tableau 1.1). Toutes ces peptidases sont exclusivement des glycoprotéines transmembranaires de type II, exception faite de NL1 qui existe aussi sous forme soluble (Voir section 1.3.2). Elles possèdent une courte queue cytoplasmique en N-terminal, un domaine transmembranaire et un large domaine extracellulaire en C-terminal où se situe le site actif. En plus du motif consensus HEXXH...E, ces peptidases possèdent toutes dix cystéines conservées dans leur

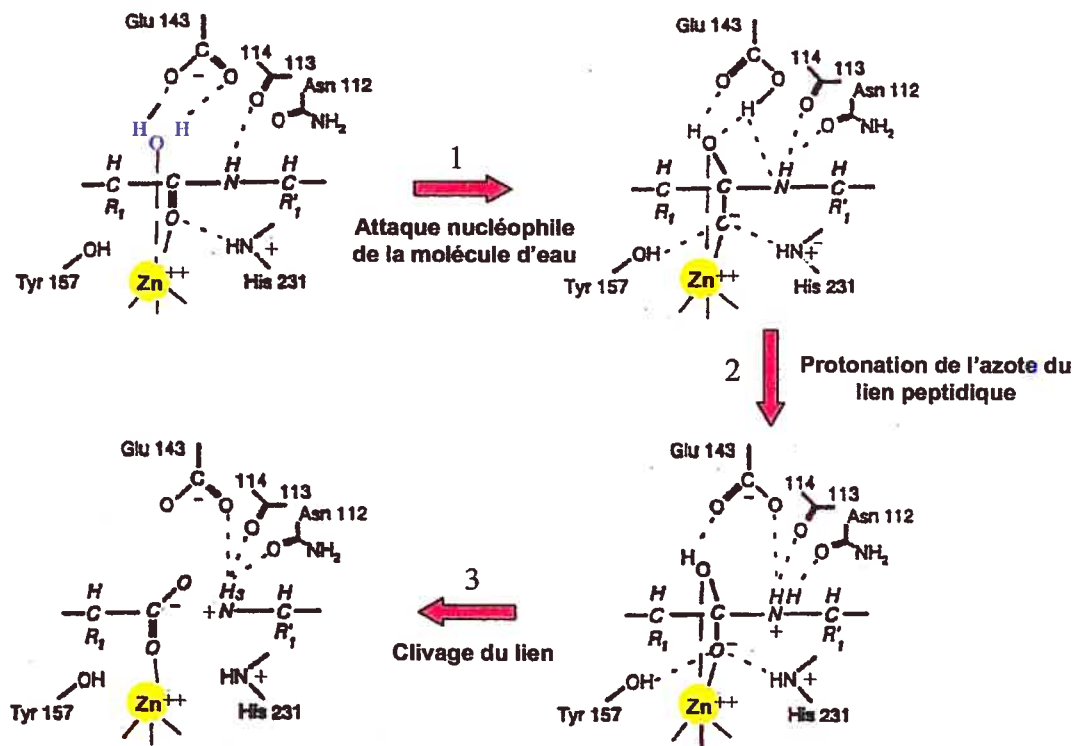


Figure 1.2 Mécanisme enzymatique de la Thermolysine.

domaine extracellulaire, ce qui suggère un repliement tridimensionnel similaire entre elles.

Malgré des différences dans leurs substrats de préférence, la plupart des acides aminés identifiés comme importants pour la catalyse dans l'EPN sont conservés et trouvent leur correspondance chez les peptidases de la famille, ce qui laisse supposer que leur mécanisme enzymatique serait semblable. Dans le cadre de ce mémoire seules l'EPN et NL1 seront discutées.

Tableau 1.1 – Identité entre les divers membres de la famille de l'endopeptidase neutre.

| | EPN | ECE-1 | ECE-2 | PHEX | KELL | ECEL1 | NL1 |
|-------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| EPN | - | 39,1% | 33,3% | 34,9% | 23,1% | 30,9% | 55% |
| ECE-1 | - | - | 60,2% | 37,9% | 30,4% | 37,1% | 39% |
| ECE-2 | - | - | - | 33,6% | 29,0% | 36,5% | 38% |
| PHEX | - | - | - | - | 24,4% | 31,8% | 39% |
| KELL | - | - | - | - | - | 23,3% | 26% |
| ECEL1 | - | - | - | - | - | - | 36% |
| NL1 | - | - | - | - | - | - | - |

Note: Les séquences humaines ont été utilisées pour la comparaison à l'exception de ECE-2 (bovin) et NL1 (souris).

1.3.1 Endopeptidase neutre

L'endopeptidase neutre fût identifiée pour la première fois en 1974 par Kerr et Kenny, suite à la purification de bordure en brosse de tube proximal de rein de lapin, comme une glycoprotéine de 90-100 kDa exerçant son activité à pH neutre. Elle fut découverte une seconde fois, quatre ans plus tard, comme l'enképhalinase responsable de la dégradation spécifique des enképhalines dans le cerveau. Enfin, elle fut découverte une troisième fois lors du clonage de l'ADNc de CALLA

(Commun acute lymphoblastic leukemia antigen/CD10), un antigène de surface des lymphocytes B immatures qui est un marqueur du développement de la leucémie lymphoblastique aiguë de type B. Du fait d'avoir été découverte dans plusieurs contextes différents et par des groupes divers, l'endopeptidase neutre s'est vue attribuée plusieurs noms tels endopeptidase neutre, enképhalinase, CALLA et néprilysine. Pour éviter les confusions, le seul nom d'endopeptidase neutre (EPN) sera utilisé ici.

1.3.1.1 Caractéristiques structurales

La structure primaire de l'EPN a été obtenue par le clonage et séquençage de son ADNc obtenu à partir d'ARNm de rat, de lapin, d'humain et de souris (Letarte et al. 1998, Devault et al. 1987, Malfroy et al. 1988, Chen et al. 1992). Une comparaison des séquences en acides aminés de l'EPN dans ces diverses espèces révèle plus de 90% d'identité, ce qui dénote une excellente conservation au cours de l'évolution.

L'EPN est composée de 749 acides aminés qui se répartissent en 27 acides aminés pour la queue cytosolique, 23 acides aminés pour le domaine transmembranaire et 699 acides aminés pour la portion extracellulaire. La partie extracellulaire de l'EPN a une forme globulaire, compacte et localisée près de la membrane (Kenny et al. 1983). Six asparagines dans le contexte de la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr pour la N-glycosylation (où X est n'importe quel acide aminé sauf proline), sont retrouvées chez le rat, la souris et l'humain contre cinq chez le lapin. La masse moléculaire apparente de l'EPN varie de 87 à 110 kDa selon le tissu dans lequel elle est exprimée (Roques et al. 1993). Ces variations proviennent de niveaux de glycosylation variables. Il semblerait que la glycosylation favorise un bon repliement ainsi qu'un transport efficace à la

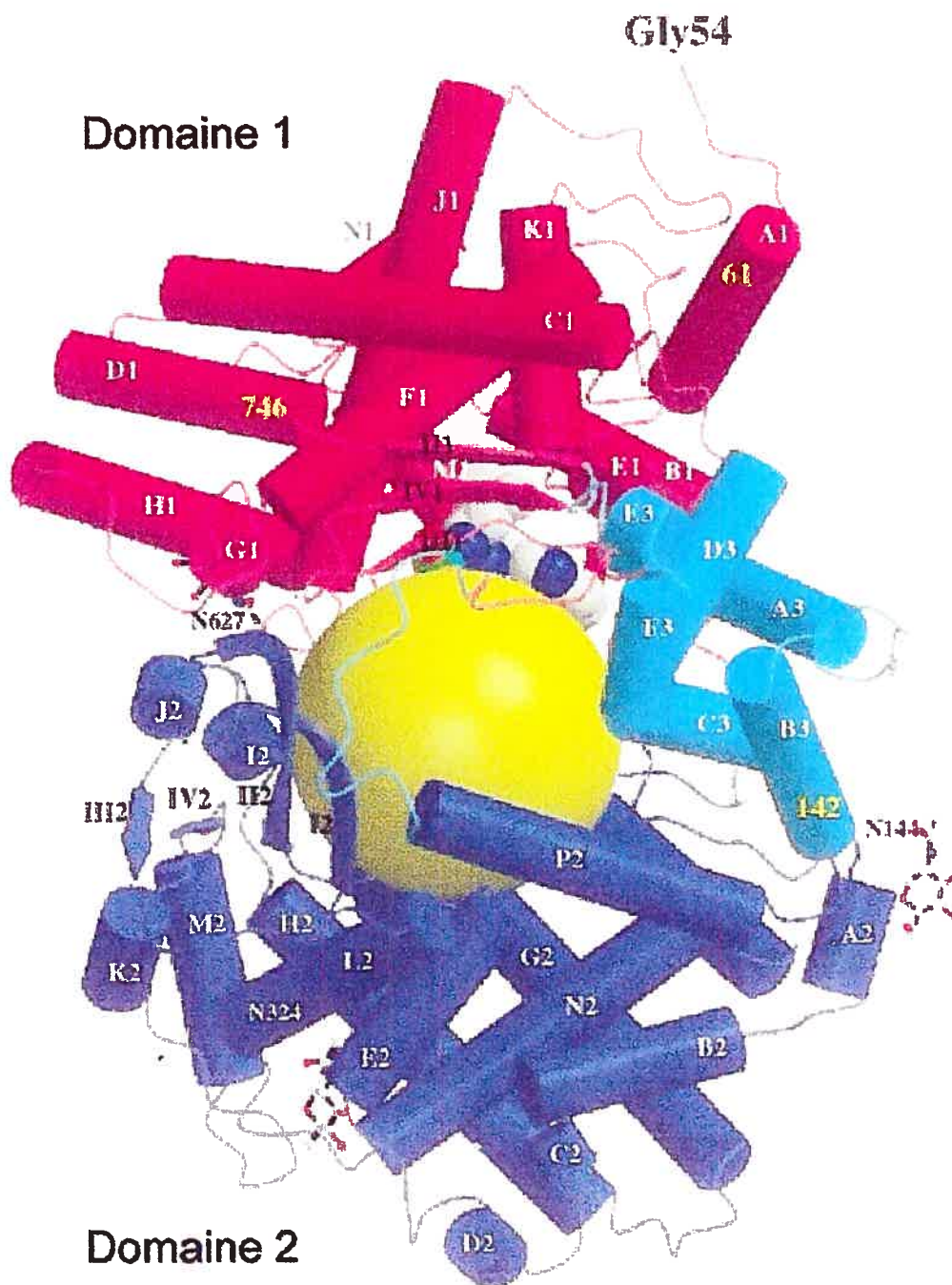


Figure 1.4 – EPN complexée au phosphoramidon.

Source : Oefner C.; D'Arcy A.; Hennig M.; Winkler F.K. and Dale G.E. (2000) Structure of human neutral endopeptidase (Neprilysin) complexed with phosphoramidon. *J.Mol.Biol.* 296, 341-349.

membrane (Lafrance et al. 1994). Une glycosylation aux sites Asparagine 145 et Asparagine 629 procurerait une activité enzymatique maximale. L'EPN possède également douze cystéines impliquées dans la formation de ponts disulfures, ce qui permettrait la stabilisation de la conformation de l'enzyme.

Des études de cristallographie à précision de 2,1Å réalisées sur l'ectodomaine montrent que celui-ci est composé de deux domaines en hélice α : le domaine 1 de 286 acides aminés formé de deux polypeptides non-consécutifs, et le domaine 2 de 326 acides aminés contenant trois segments polypeptidiques non-consécutifs où se situent les résidus importants pour la coordination du zinc et la catalyse. Ensemble, ces deux domaines donnent lieu à la cavité centrale, presque sphérique, qui est le site actif (Voir Figure 1.4).

1.3.1.2 Activité enzymatique

La spécificité de l'EPN a d'abord été étudiée en utilisant la chaîne β de l'insuline (Kerr et Kenny 1974). Son spectre d'action est assez étendu, mais son activité est toutefois restreinte à des peptides de moins de 3,5 kDa soit environ 40 acides aminés. L'EPN hydrolyse généralement la liaison peptidique du côté aminoterminal d'un acide aminé hydrophobe.

Le degré d'identité entre l'EPN et la Thermolysine est assez modeste, mais il n'en demeure pas moins qu'il existe de grandes similitudes entre les sites actifs de ces deux enzymes. Tous deux ont une préférence pour un résidu hydrophobe au niveau du site S_1' . Le site S_2' , quant à lui, semble pouvoir accommoder tout acide aminé sauf la proline qui diminue la force d'interaction entre le peptide et l'enzyme (Voir Figure 1.5).

1.3.1.2.1 Acides aminés importants pour l'activité enzymatique

Trois résidus se démarquent comme ayant une importance cruciale dans la réaction catalytique. Ceux-ci sont l'acide glutamique 584, l'acide aspartique 650 et l'histidine 711. L'acide glutamique 584, aussi appelé acide glutamique catalytique, favorise la polarisation de la molécule d'eau (Voir section 1.2.3). L'acide aspartique 650 agit indirectement sur le positionnement de l'atome de zinc via son interaction avec l'histidine 584 (Le Moual et al. 1994). L'histidine 711 permet une stabilisation de l'intermédiaire tétrahédrique de l'état de transition en interagissant avec plusieurs autres résidus et l'oxanion pour former un réseau complexe de ponts hydrogène.

Une seconde triade existerait au sein du site catalytique, celle-ci ayant pour mission la stabilisation du site actif (Oefner et al. 2000). Cette triade agirait sur l'histidine 587 par le biais de l'asparagine 590.

1.3.1.2.2 Acides aminés importants pour la liaison du zinc

Comme toutes les peptidases à zinc, l'atome de métal est absolument indispensable à l'activité enzymatique de l'EPN puisqu'il fait partie intégrante du mécanisme catalytique. Il est donc très important de bien lier et positionner celui-ci au niveau du site actif. Trois résidus, histidine 583, histidine 587 et acide glutamique 646 sont les ligands responsables du bon positionnement du zinc pour l'EPN (Devault et al. 1988, Le Moual et al. 1991).

1.3.1.2.3 Acides aminés impliqués dans la liaison du substrat

Diverses études utilisant des inhibiteurs chimiques et la technique de mutagenèse dirigée ont démontré une implication de l'arginine 102 dans la liaison au substrat. L'hypothèse soutenue étant que l'arginine 102 interagirait avec le

groupement carboxyle libre du résidu P₂' et serait, de par ce fait, responsable de l'activité dipeptidyl-carboxypeptidase occasionnelle de l'EPN (Llorens et al. 1980, Malfroy & Schwartz 1982b, Beaumont et al. 1991, Jackson & Hersh 1986, Pozsgay et al. 1986).

L'analyse cristallographique du complexe phosphoramidon/EPN a réfuté l'implication de l'arginine 102 à ce niveau (Oefner et al. 2000). Il a été démontré depuis que ce serait possiblement l'arginine 717 qui remplirait ce rôle (Marie-Claire et al. 1997). Une contribution de l'asparagine 542, située dans un feuillet β qui retiendrait le substrat au site actif, a également été proposée (Dion et al. 1995). Il a été suggéré que ces deux acides aminés, asparagine 542 et arginine 717, soient toutes deux composantes du site S₂'.

1.3.1.3 Substrats

L'EPN peut hydrolyser une multitude de substrats *in vitro* et *in vivo*. Sa distribution physiologique l'amène à cliver des peptides bioactifs tels la substance P, le peptide natriurétique auriculaire (ANF), les enképhalines et la bradykinine, ce qui implique l'EPN dans de nombreux processus physiologiques. Le Tableau 1.2 présente une liste des substrats connus de l'EPN.

1.3.1.4 Distribution tissulaire

L'EPN est exprimée dans une grande variété de tissus sans pour autant être uniformément distribuée. Elle est retrouvée dans le système nerveux central, les reins, les intestins, les nœuds lymphatiques, le placenta, les poumons, les testicules, la prostate, les fibroblastes du cœur, les chondrocytes du cartilage articulaire, la moelle osseuse, les os du crâne et de la mandibule, les vertèbres, les glandes salivaires, les glandes exocrines et dans une variété de tissus épithéliaux et

Tableau 1.2 – Substrats de l'EPN.

| Substrats | Sites de clivage et séquence | K _m (μ M) | Références |
|-------------------------------------|--------------------------------|---------------------------|---|
| Leu-enképhaline | YGG†FL | 86;73 | (Matsas et al. 1984, Ghaddar et al. 2000) |
| Met-enképhaline | YGG†FM | 62;17 | (Matsas et al. 1984, Hersh 1984) |
| D-Ala ₂ -leu-enképhaline | YdAG†FL | 88 | (Matsas et al. 1984) |
| Dynorphine ₁₋₉ | YGG†F†LRRIR | 219 | (Matsas et al. 1984) |
| Dynorphine ₁₋₁₃ | YGG†FLRR†IRPK†LK | n.d. | (Hersh 1984) |
| γ -Endorphine | YGG†FMTSEKSQTP†LVTL | 42;4 | (Matsas et al. 1984, Hersh 1984) |
| α -néo-endorphine | YGG†FLRKYPK | K _i \geq 500 | (Hersh 1984) |
| β -néo-endorphine | YGG†FLRKYP | K _i \geq 500 | (Hersh 1984) |
| MCH | DFDMLRC†MLGR†VYRP-C†WQV | 12 | (Checler et al. 1992) |
| LHRH (luliberin) | pEH†WS†YG†LRPGMNH ₂ | 755 | (Matsas et al. 1984) |
| Bradykinine | RPPG†FSP†FR | 92 | (Matsas et al. 1984) |
| Substance P | RPKPQQ†F†FG†LMNH ₂ | 32; 37,8 | (Matsas et al. 1983, Matsas et al. 1984) |
| Physalaemin | EADPNK†F†YG†LMNH ₂ | 105 | (Matsas et al. 1984) |

† identifie les sites de coupures

| Substrats | Sites de clivage et séquence | K _m (μ M) | Références |
|---------------------------|--|---------------------------|--|
| DimeC7 | EQ(MeF)(MeG)†LMNH ₂ | 2567 | (Matsas et al. 1984) |
| Angiotensine I | DR†VY†IHP†FHL | n.d. | (Stephenson & Kenny 1987) |
| Angiotensine II | DRVY†IHPF | n.d. | (Stephenson & Kenny 1987) |
| Neurotensin | pELYENKPRRP†Y†IL | 78 | (Matsas et al. 1984, Skidgel et al. 1984) |
| CCK-8 | DYMG†WMD†FNEH ₂ | 67,4 | (Matsas et al. 1984, Kenny et al. 1985) |
| CCK-8 (SO ₃ H) | DY(SO ₃ H)MG†W†MD†FNEH ₂ | 296 | (Matsas et al. 1984, Kenny et al. 1985, Durieux et al. 1985) |
| Neurokinine A | HKTDS†FVG†LMNH ₂ | 113 | (Hooper et al. 1985) |
| Endothéline-1 | CSCSS†LMDKECVYFCH†LD†IIW | 2,3 | (Vijayaraghavan et al. 1990) |
| Big endothéline-1 | CSCSSLMDKECVYFCHLDII- WV†NTPEHVVPYGLGSPRS | n.d. | (Abassi et al. 1993) |
| α -MSH | AcS†YS†ME†HFR†WGKP†VCONH ₂ | n.d. | (Deschodt-Lanckman et al. 1990) |
| α -hANP | SLRRSSC†FGGRMDRIG- AQSGLCNSFRY | 26;34;121 | (Kenny et al. 1993) |

† identifie les sites de coupures

| Substrats | Sites de clivage et séquence | Km(μ M) | Références |
|------------------------------|--|--------------------------|---|
| pBNP ₃₂ | SPKTMRDSCFGR- R†LDRIGS†LSGLGCNVLRRY | 111;151 | (Kenny et al. 1993, Norman et al. 1991) |
| hCNP-22 | GLSKGCFGLKLDRIGSMG- LGC-amide | 2,5;13 | (Kenny et al. 1993) |
| hBNP ₃₂ | SP†KM†VQSGCFGRKM- DR†IGSLSGLCNVLRRY | K _i = 172;151 | (Kenny et al. 1993, Norman et al. 1991) |
| Urodilatine | APRLSLRRSSCFGGRRMDRIG- AQSGLCNSFRY | 31;62 | (Kenny et al. 1993) |
| A β _{1-40/42} | DAE†FRHDSG†YEVHHQKLV- F†FAEDVGSNKGA†IIG†LMV- G†GVV | 2,8(1-42) | (Howell et al. 1995, Takaki et al. 2000, Shirohani et al. 2001) |
| OGP | ALKRQ†GRT†LYGFGG | n.d. | (Ruchon, Marcinkiewicz, Ellefsen, Basak, Aubin, Crine & Boileau 2000) |
| PTHrP ₁₋₃₄ | AVSEHQLLHDKGKSIQDLRR- RFF†LHH†L†LAEIHTA | n.d. | (Ruchon, Marcinkiewicz, Ellefsen, Basak, Aubin, Crine & Boileau 2000) |
| Osteostatin | TRSAQLDSGVTGSGLEGDHL- SDTSTTS†LELDSR | n.d. | (Ruchon, Marcinkiewicz, Ellefsen, Basak, Aubin, Crine & Boileau 2000) |
| Calcitonine | CGNLSTCMLGTYTQDFNK†FH- TFPQTAIGVGAP | n.d. | (Howell et al. 1993) |

† identifie les sites de coupures

| Substrats | Sites de clivage et séquence | Km(μ M) | Références |
|---------------------------------------|---|----------------|---|
| α -CGRP | SCNTATC†VTHR†L- AG†LLSRSGG†VVK- DN†FVPTN†VGSE†AFNH ₂ | 105 | (Katayama et al. 1991, Davies et al. 1992) |
| β -Endorphine | YGGFMTSEKSQTPLVTLFK- NAHKNAVKKGE | $K_i \geq 500$ | (Hersh 1984) |
| β -Lipotropine ₆₁₋₆₉ | YGGFMTSEK | $K_i = 19$ | (Hersh 1984) |
| NPY | YPSKPDNPGEDAPAEDMA- RYYSALRHINLITRQRYNH ₂ | n.d. | (Baraniuk et al. 1990, Fu- jiwara et al. 1993) |
| PYY | YPIKPEAPGEDASPEEL- N†RYYASLRHYLNLVTRQRY- NH ₂ | n.d. | (Medeiros & Turner 1994) |
| VIP | HSDAVFTDNYTRLRKQMAV- KKY†LNS†ILNNH ₂ | 15 | (Gourlet et al. 1997) |
| PACAP(1-27) | HSDGIFTDSYSRYRKQMAV- KKY†LAA†VLNH ₂ | 100-200 | (Gourlet et al. 1997) |
| Gastrin | pEGPW†LEEEEA†YG†WM- D†FNH ₂ | 33;57 | (Deschodt-Lanckman et al. 1988, Pauwels et al. 1989) et al., 1989 |

† identifie les sites de coupures

| Substrats | Sites de clivage et séquence | Km(μ M) | Références |
|----------------------------------|---|--------------|--|
| Gastrin-releasing-peptide(GRP10) | GNHWAVGHLMN ₂ | n.d. | (Bunnett, Turner, Hryszko, Kobayashi & Walsh 1988, Bunnett, Debas, Turner, Kobayashi & Walsh 1988) |
| Oxytocine | CYIQNCP†LGG ₂ | n.d. | (Almenoff et al. 1981, Johnson et al. 1984, Ottelecz et al. 1991) |
| Proadrenomedullin (PAMP) | AR†LDVASE†FRKK†WN- K†W†A†LSRCONH ₂ | 6,1 | (Nagatomo et al. 1996) |
| GLP-1(7-36) | HAEGTFTSD†VSS†Y†LEGQA- AKE†F†IAW†LVKGR-NH ₂ | n.d. | (Hupe-Sodmann et al. 1995) |
| Glucagon | HSQGTFTSDYSKYLDSRRA- QDFVQWLMNT | n.d. | (Hupe-Sodmann et al. 1995) |
| Secretin | HSDGTFTSELSRLREGARL- QRLQGLV | n.d. | (Hupe-Sodmann et al. 1995) |

† identifie les sites de coupures

endocriniens (Li et al. 1995). Le rôle spécifique de l'EPN n'a pas été élucidé en toutes ces différentes localisations, néanmoins un certain nombre de rôles joués par l'EPN dans l'organisme sont connus. Parmi ceux-ci, l'on retrouve la modulation du signal nociceptif, soit le contrôle de la douleur, la régulation de l'équilibre eau/électrolyte, la réaction inflammatoire, la régulation du transit gastro-intestinal et la prolifération cellulaire. De plus, des évidences récentes démontrent une diminution de l'expression de l'EPN dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Ces divers rôles de l'EPN seront abordés dans les sections qui suivent.

1.3.1.4.1 Modulation du signal nociceptif

L'EPN et son transcrit se retrouvent dans plusieurs régions du cerveau : plexus choroïde, noyau caudé, la substance noire, le putamen, le noyau accumbens, le tubercule olfactif, la couche glomérulaire du bulbe olfactif, le gyrus dentelé et la substance gélatineuse de l'épine dorsale (Waksman et al. 1984, Waksman et al. 1986, Gaudoux et al. 1993, Matsas et al. 1986, Pollard et al. 1989, Back & Gorenstein 1989a, Back & Gorenstein 1989b, Back & Gorenstein 1990, Back & Gorenstein 1994). Au niveau cellulaire, l'EPN est présente principalement à la membrane synaptique des neurones et en plus faible proportion au niveau des oligodendrocytes, des astrocytes et des cellules de Schwann (Kioussi & Matsas 1991, Kioussi et al. 1992, Marcel et al. 1990, Matsas et al. 1986, Waksman et al. 1986). L'EPN est exprimée dans les mêmes régions que les enképhalines ainsi que leurs récepteurs, ce qui en fait une peptidase de choix pour intervenir dans le contrôle de la douleur. En effet, lorsque liées à leurs récepteurs, les enképhalines engendrent un effet anti-nociceptif semblable à celui de la morphine. La dégradation des enképhalines par l'EPN ou l'aminopeptidase N permet de limiter la durée de l'effet anti-douleur. Les expériences réalisées avec les souris, donnent des résultats pour le moins contradictoires. L'administration de thiorphan, un inhibiteur spécifique de l'EPN, entraîne une analgésie modérée (Roques et al. 1980) alors que l'inactivation du gène de l'EPN entraîne une hyperalgésie impliquant la bradykinine (Fischer et al. 2002).

La substance P est une autre cible possible de l'EPN dans le contrôle de l'effet anti-nociceptif. Il a été démontré que la substance P et l'EPN étaient colocalisées dans certaines synapses de la substance noire (Barnes et al. 1993a, Barnes et al. 1993b). Dans des coupes histologiques de cerveaux de rats, l'inhibition de l'EPN protège partiellement la substance P endogène de la dégradation (Mauborgne et al. 1987).

1.3.1.4.2 Équilibre eau /électrolytes

De tous les tissus où l'EPN est exprimée, le rein est celui où elle est la plus abondante (Kerr & Kenny 1974). L'EPN est exprimée plus spécifiquement au niveau des bordures en brosse des cellules épithéliales, des tubules proximaux droits et contournés. L'EPN affecte l'équilibre eau/électrolytes, et par conséquent la pression artérielle, par le biais de son activité peptidasique vis-à-vis de peptides vasoactifs importants dans l'homéostasie de la pression artérielle, tels l'ANP, les kinines, la substance P, l'endothéline-1(ET-1) et l'angiotensine II (Wilkins et al. 1993, Vlahovic & Stefanovic 1998, Corti et al. 2001, Wilkins 1993, Sonnenberg et al. 1988). Bien que le rein soit un organe majeur du contrôle de la pression sanguine, l'EPN effectue également son activité régulatrice en d'autres lieux tels les vaisseaux sanguins, les poumons et le cerveau (Gros et al. 1990, Llorens-Cortes et al. 1992, Bourne & Kenny 1990, Soleilhac et al. 1992).

Les sites de synthèse et relâche de ces divers peptides diffèrent entre eux. Par exemple, l'ANF est synthétisé au niveau des oreillettes du cœur, alors que les kinines sont synthétisés au niveau du tube distal du rein. Tous deux favorisent une réduction de pression par le biais d'une augmentation de la diurèse et natriurèse (Carretero & Scicli 1991, Erdos 1990). La substance P, quant à elle, est relâchée par les neurones sensoriels des vaisseaux sanguins et cause une vasodilatation. Une inhibition de l'EPN entraîne une augmentation des excrétions d'eau et d'électrolytes (Gros et al. 1989, Richards et al. 1993), ce qui cause l'hypotension et une augmentation marquée des taux plasmatiques et urinaires d'ANP. Les cellules épithéliales des vaisseaux sanguins produisent pour leur part l'ET, un puissant vasoconstricteur (Kohan 1991). Les cellules médullaires du rein sécrètent également l'ET, ce qui a pour effet de diminuer le flot sanguin local et donc le taux de filtration glomérulaire. La réduction du volume urinaire produit a pour conséquence une augmentation de la pression sanguine. L'angiotensine II est également un hypertenseur qui agit en favorisant la rétention de sel par le rein et donc, par voie d'osmose, l'augmentation du volume sanguin.

Il apparaît donc que l'EPN joue deux rôles opposés dans le cas de la dégradation de peptides impliqués dans le contrôle de la pression artérielle. Toutefois, l'effet hypertenseur de l'EPN semble être légèrement prédominant puisqu'une inhibition sélective de l'EPN chez l'humain conduit à une légère diminution de la pression artérielle chez des patients normotensifs ou hypertensifs [Revue par Roques (1998)]. De plus, les souris invalidées EPN homozygotes ont une pression artérielle diminuée d'environ 20% comparativement aux souris de type sauvage (Lu et al. 1997).

1.3.1.4.3 Réaction inflammatoire

Plusieurs travaux ont mis en évidence le rôle de l'EPN dans la réaction inflammatoire. L'EPN contrôle l'inflammation des voies respiratoires, de l'intestin ainsi que la modulation du choc septique (Koehne et al. 1998, Nadel 1992, Nadel 1990, Nadel 1991, Kirkwood et al. 2001). Lorsque stimulés par des éléments chimiques ou électriques, les neurones sensoriels de certains tissus peuvent initier une importante réaction inflammatoire locale en relâchant des tachykinines telles la substance P (Borson 1991, Nadel 1992). L'EPN intervient dans le processus de la réaction inflammatoire en dégradant ces tachykinines.

Diverses maladies, telles l'asthme, les infections virales, les bronchites ou la fibrose kystique se caractérisent, entre autres, par une inflammation des voies respiratoires [revue par Borson (1991)]. L'EPN, qui est exprimée dans plusieurs types cellulaires des voies respiratoires, pourrait donc avoir un effet bénéfique dans de tels cas lorsque pris de façon exogène ou par stimulation de l'expression endogène.

L'inflammation des voies respiratoires peut également être causée par des bactéries. Les bactéries produisent et relâchent des peptides qui se lient à des récepteurs à la surface des neutrophiles, ceci entraînant la libération de molécules chimioattractives qui provoquent l'inflammation. Ces peptides, comme le N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine, peuvent être clivés par l'EPN (Connelly et

al. 1995, Painter et al. 1988). Une fois encore, un rôle thérapeutique se profile pour l'EPN dans le cas d'inflammation des voies respiratoires.

L'EPN contrôle également le choc septique, ou choc aux endotoxines. Ce type de choc peut être provoqué chez les souris par l'injection de liposaccharides de *Salmonella entericlitis*. Les souris invalidées EPN homozygotes sont dix fois plus sensibles aux endotoxines et cent fois plus susceptibles de mourir d'un tel choc comparativement aux souris de type sauvage (Lu et al. 1996, Lu et al. 1995).

1.3.1.4.4 Digestion et régulation du transit gastro-intestinal

L'EPN présente dans les bordures en brosse des cellules épithéliales de l'intestin hydrolyse les peptides du bol alimentaire, favorisant ainsi la digestion et l'absorption au niveau du tractus gastro-intestinal. L'EPN présente, dans les cellules musculaires lisses et les neurones régule le transit gastro-intestinal en modulant la concentration de certains neuropeptides comme la substance P (Nau et al. 1985, Marcais-Collado et al. 1987). En contrôlant la substance P, l'EPN permet le contrôle du péristaltisme intestinal, puisque la substance P favorise la contraction du muscle lisse (Matsas et al. 1983, Bunnett et al. 1985, Bunnett, Turner, Hryszko, Kobayashi & Walsh 1988, Bunnett, Debas, Turner, Kobayashi & Walsh 1998). L'EPN permet également la dégradation des enképhalines au niveau des neurones myentériques et entériques de la sous-muqueuse. Cela a pour effet une action opposée à celle observée dans la couche musculaire, soit une diminution du mouvement gastro-intestinal. Cette action se fait par le biais du transport de fluides et ions suite à une dégradation des enképhalines (Schang et al. 1986, Coupar 1987). L'action dominante résultante de ces deux potentiels contradictoires serait une diminution du péristaltisme, puisque la prise de thiorphan ou d'acétorphan, inhibiteurs spécifiques de l'EPN, induisent un effet antidiarrhéique.

1.3.1.4.5 Différenciation et prolifération cellulaire

L'EPN module la réponse proliférative cellulaire aux facteurs mitogènes comme la bombésine et les peptides apparentés. Par exemple, on sait que la croissance de l'épithélium pulmonaire foetal est stimulé, en partie, par les BLP (*Bombesin-like peptide*) qui peuvent être clivés par l'EPN. L'expression de l'EPN est réduite dans l'épithélium pulmonaire en développement, ainsi que dans certains carcinomes pulmonaires. L'EPN protégerait normalement les tissus d'une stimulation trop importante qui résulterait en une prolifération exagérée. Les cas connus les plus flagrants sont ceux de cancers de la prostate hormono-sensibles où l'EPN est diminuée précocement (Freedland et al. 2003, Papandreou et al. 1998). Dans de tels cas, il y a prolifération cellulaire et migration, ce qui requiert une phosphorylation de la FAK (*Focal adhesion kinase*) pour que celle-ci soit active. Sumitomo et al. (2000) ont démontré que le niveau de FAK phosphorylée était inversement proportionnel au niveau de l'EPN. L'expression de l'EPN a donc un effet négatif sur l'activité de FAK. Il y a également augmentation de la phosphorylation de FAK suite à une inhibition de l'EPN. Plus encore, l'expression de l'EPN entraîne une déphosphorylation de FAK qui est indépendante de son activité, puisqu'un mutant de l'EPN ne possédant pas d'activité enzymatique provoque les mêmes effets. Il a été cru pendant un temps que ces effets soient imputables à un substrat de l'EPN. Toutefois, Sumitomo et al. (2004) ont démontré récemment que l'EPN était impliqué directement dans cet effet, puisque l'interaction de la queue cytosolique de l'EPN avec le site majeur de phosphorylation de la queue de PTEN (*phosphatase and tensin homologue*) permettrait le recrutement de PTEN à la membrane. Il en résulterait une augmentation de la stabilité de la phosphatase PTEN qui pourrait alors exercer son activité phosphatase sur PI3K (*phosphatidylinositol 3-monophosphate*). Cela résulterait en un complexe PI3K/Akt (*serine/threonine protein kinase*) constitutivement inactif d'où l'inhibition de cette voie oncogénique.

L'EPN est présente en abondance à la surface des lymphoblastes dans les cas de leucémie lymphoblastique aiguë de type pré-B (Greaves 1975, Greaves et al.

1983). Normalement, l'EPN est fortement exprimée dans les cellules pré-B et faiblement au niveau des cellules B et T matures (Beaumont et al. 1989, Mari et al. 1994, Guerin et al. 1997). Certaines études suggèrent que l'EPN régule l'activité de différenciation et maturation des lymphocytes via un signal peptidique important encore non-identifié [revue par LeBien (1989)].

1.3.1.4.6 L'EPN dans la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie dégénérative qui provoque des lésions au cerveau. Plusieurs changements se produisent dans le cerveau des personnes atteintes de la MA. Les cellules du cerveau rétrécissent ou disparaissent, et sont remplacées par des taches denses de forme irrégulière qu'on appelle des plaques séniles. Un autre indicateur de la maladie est la présence d'écheveaux dans les cellules du cerveau. Ces écheveaux étouffent éventuellement les cellules saines du cerveau. Au fur et à mesure que la MA affecte chaque région du cerveau, elle peut entraîner la perte de certaines fonctions ou habiletés. Cela résulte en des symptômes ou des changements spécifiques dans le comportement de la personne qui se listent comme suit : pertes de mémoire qui nuisent aux activités quotidiennes, difficultés à exécuter les tâches familiales, problèmes de langage, désorientation dans l'espace et dans le temps, jugement amoindri, difficultés face aux notions abstraites, objets égarés, changements d'humeur ou de comportement, changements dans la personnalité et perte d'intérêt.

Le peptide amyloïde β ($A\beta$) est un petit peptide constamment produit et métabolisé normalement dans l'organisme, quoique sa fonction biologique demeure encore mal connue. Le taux du peptide est contrôlé par la balance de sa dégradation/production. L'accumulation de ce peptide mène à la formation de plaques amyloïdes appelées plaques séniles, qui sont l'une des caractéristiques du développement de la MA [revue par Octave (1995), Price & Sisodia (1998), Janus et al. (2000), Steiner et al. (1999), Hartmann (1999), et Gandy & Petanceska (2001)].

Les premières études consacrées à ce peptide en relation avec la MA ont été concentrées sur le phénomène de formation du peptide et des dépôts. Il a été observé qu'une synthèse et/ou maturation anormale ou excessive de l'APP (Amyloid Beta Protein Precurseur)(Voir Figure 1.5) mène à une accumulation du peptide A β et au développement de la MA (Thinakaran 1999, Octave 1995, Yankner 1996, Janus et al. 2000). Plus récemment, des études se sont intéressées à la dégradation du peptide A β . Plusieurs protéases ont été proposées pour ce rôle : ACE (Angiotensine Converting Enzyme), ECE (Endotheline Converting Enzyme), IDE (Insuline Degrading Enzyme) et EPN. Il a été démontré en 2000 (Vekrellis et al.) que IDE pouvait dégrader le peptide amyloïde dans des cultures de cellules PC12 et en culture primaire de neurones corticaux. Ces résultats ont été appuyés par les souris invalidées en IDE chez qui il y a une diminution de la dégradation du peptide A β d'au moins 50% (Farris et al. 2003). Les souris invalidées en ECE-1 et ECE-2 souffrent quant-à-elles toutes deux d'une augmentation des niveaux de peptides A β _{1-40/42} (Eckman et al. 2002). En ce qui concerne ACE, il a été démontré que l'aggrégation du peptide A β ainsi que la toxicité reliée au peptide A β sont réduites lors de l'expression de l'ACE (Hu et al. 2001).

Malgré tout, diverses observations suggèrent un rôle majoritaire de l'EPN. La première étude d'importance à avoir été effectuée dans ce sens a démontré clairement que soit l'EPN, ou une enzyme apparentée ayant une activité comparable et un profil d'inhibition semblable, était responsable du clivage d'un peptide A β ₁₋₄₂ radiomarqué injecté dans l'hippocampe de cerveau de rat (Iwata et al. 2000). Suite à cette étude, les groupes intéressés au sujet se sont multipliés, ce qui nous a fourni une littérature abondante au cours des dernières années. Des études d'immunodéplétion utilisant des membranes de cerveaux de rat ont démontré que la très grande majorité de l'activité de clivage du peptide amyloïde était perdue suite à une immunodéplétion de l'EPN (Takaki et al. 2000). Les souris invalidées en EPN dégradent moins le peptide A β et forment davantage de plaques avec l'âge, comparativement aux souris sauvages, dans les zones du cerveau sensibles au développement de la MA (Iwata et al. 2002). Une corrélation négative entre

l'expression de l'EPN et la formation de plaques séniles a également été observée chez l'humain (Carpentier et al. 2002).

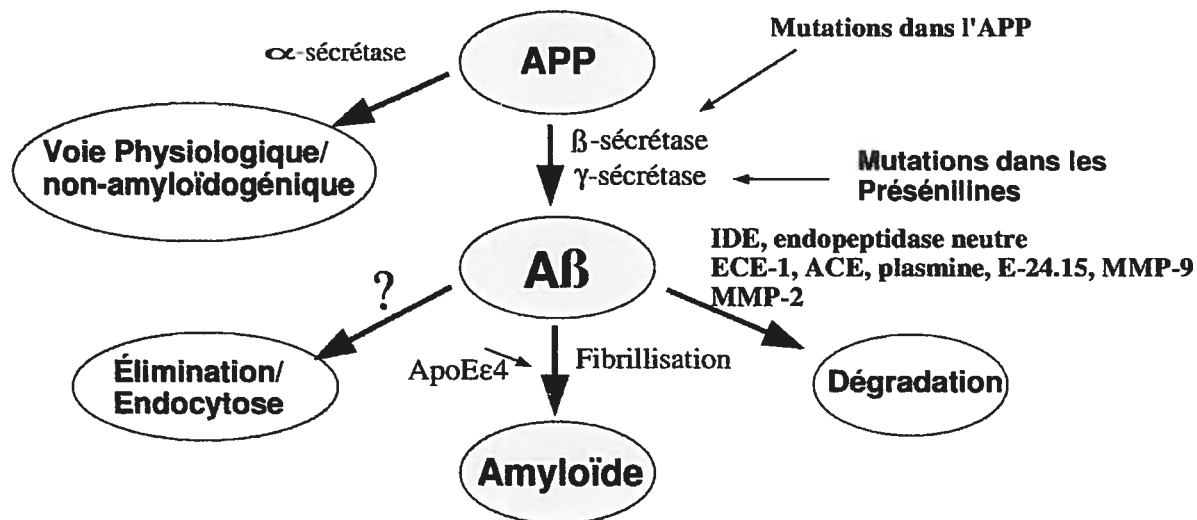


Figure 1.5 - Production du peptide amyloïde à partir de l'APP.

1.3.1.4.7 Rôle physiologique de l'EPN dans le testicule

Dans le testicule, l'EPN est présente, plus précisément dans les membranes des cellules de Sertoli. Les cellules de Sertoli sont retrouvées au niveau des tubules séminifères des testicules et jouent un rôle-clé dans la spermatogenèse. Les expériences de Monsees et al. (1996) ont démontré qu'une peptidase sensible au thiorphan et au phosphoramidon, mais insensible au captopril et à l'énalapril, était responsable de la dégradation de la bradykinine dans le milieu de culture de cellules de Sertoli, caractéristiques correspondant à l'EPN. La bradykinine, ainsi que d'autres composantes du système kallikréine-kinines, est connue pour avoir des effets sur la motilité du sperme et des effets indirects sur la fertilité. Siems et al. (2003) ont démontré que la motilité du sperme était augmentée lorsque la dégradation de la bradykinine était inhibée. Cela même si aucun récepteur à la bradykinine n'a été détecté sur les spermatozoïdes. Monsees et al. (1999) ont

rapporté la présence de récepteur à la bradykinine au niveau des cellules de Sertoli, ce qui suppose un effet plus en avant dans la cascade des événements. Le mécanisme précis par lequel la bradykinine affecte les paramètres des spermatozoïdes reste à découvrir, mais déjà on peut apercevoir un rôle potentiel de l'EPN dans la baisse de la fertilité masculine. Néanmoins considérant que la caractérisation des souris invalidées en EPN, dans le fond génétique C57BL/6, n'a pas révélée de réduction de fertilité pour celles-ci, on peut supposer que le rôle joué par l'EPN doit être compensé dans les souris invalidées par une autre peptidase ou être imputable au fond génétique utilisé.

1.3.2 NL1

NL1 est le plus récent membre de la famille des métallopeptidases à zinc, découvert simultanément par deux groupes en 1999 et 2000 chez la souris (Ghaddar et al. 2000, Ideka et al. 1999). C'est le membre de la famille ayant la plus haute identité avec l'EPN, soit 55% entre NL1 de souris et l'EPN de souris ou humain. Elle possède les dix cystéines conservées caractéristiques de la famille et neuf sites potentiels de N-glycosylation. Cette protéase est, de par sa séquence, une glycoprotéine de type II de 765 résidus. Cependant, fait surprenant, la protéase n'est pas liée à la membrane, mais sécrétée dans le milieu extracellulaire. Entre le domaine transmembranaire et la première cystéine, l'on retrouve un site de clivage protéolytique de type furine, Arg₅₈-thr-val-val-lys-arg₆₃, qui permet le clivage de la protéine à 22 acides aminés du domaine transmembranaire. Il a été déterminé par la suite que NL1 existait sous deux formes: une forme sécrétée et une forme membranaire, ne possédant pas le site furine, dû à un épissage alternatif (Raharjo et al. 2001).

1.3.2.1 Activité enzymatique de NL1

Du fait de sa similitude avec l'EPN, les substrats utilisés pour caractériser NL1 ont été essentiellement des substrats de l'EPN. Ainsi, il a pu être déterminé que NL1 pouvait hydrolyser big ET-1, ET-1, la substance P, la bradykinine, l'ANP, l'angiotensine I, la leu-enkephaline, l'orexin B et la α -MSH. Par opposition, la β -endorphine et l'ACTH sont très mal clivées par NL1 (Carpentier et al. 2003, Ikeda et al. 1999).

1.3.2.2 Distribution tissulaire de NL1 et rôles physiologiques

Le principal tissu où est exprimé NL1 est le testicule chez la souris adulte. La forme sécrétée de NL1 y est présente dans les spermatides ronds et allongés au niveau de la lumière des tubules séminifères. Dans tous les autres tissus exprimant NL1 il est question de la forme membranaire, qui est retenue au niveau du RE par sa queue cytosolique. NL1 est présente dans le cœur, le cerveau, le poumon, le foie, le pancréas, le muscle squelettique, les reins, les intestins et un peu dans les ovaires (Ghaddar et al. 2000, Ideka et al. 1999).

Tenant compte que l'expression de NL1 est vraiment plus abondante dans les cellules des testicules que partout ailleurs dans l'organisme, il n'est pas tellement surprenant d'observer une diminution de fertilité pour les souris invalidées en NL1 homozygotes (Carpentier et al. 2004). Le problème semble se situer essentiellement au niveau du mâle, puisque des femelles invalidées en NL1 homozygotes fertilisées par des mâles de type sauvage ont un nombre de souriceaux par portée normale, contrairement aux femelles de types sauvages fertilisées par un mâle invalidé homozygote. Les mâles invalidés homozygotes produisent de plus petites portées. De plus, les embryons de souris générés à partir d'un mâle invalidé homozygote accuseraient un retard dans la division cellulaire et des problèmes de développement de l'œuf. Pris ensemble, ces problèmes entraînent une baisse de la fertilité d'environ

30% chez les souris invalidées en NL1. Les souris invalidées en PC4 homozygotes (Majambu et al. 1997) souffrent également de problèmes de fertilité tels qu'observés avec NL1. NL1, sous sa forme sécrétée, se doit d'être clivée en son site furine par un membre des pro-hormone convertases. PC4 est la seule pro-hormones convertase exprimée dans le testicule, au niveau des spermatides ronds (Torii et al. 1993), soit comme NL1. Il n'est donc pas insensé de croire que PC4 est la convertase responsable de ce clivage. Les mécanismes et conditions physiologiques menant à cela reste à déterminer, mais d'ores et déjà des pistes intéressantes pour comprendre l'infertilité mâle s'offrent à nous.

1.4 Description du projet de recherche

À mon arrivée dans le laboratoire, il avait déjà été déterminé que l'EPN pouvait dégrader le peptide A β *in vitro* (Howell et al. 1995). Suite à la parution de l'article par Iwata et al. (2000), l'intérêt porté au rôle joué par l'EPN dans le développement de la MA s'est considérablement accru. Plusieurs résultats ont été publiés dans les deux ans entre le moment de parution de l'article par Iwata et al. et le moment où j'ai débuté ma maîtrise. Les évidences en culture cellulaire et par modèles animaux, génétiques ou induits par des traitements, étaient nombreuses et convaincantes quant à un rôle potentiel protecteur de l'EPN contre la MA. Aussi, lorsque nous avons amorcé ce projet, l'évidence expérimentale manquante, et nécessaire à nos yeux pour bien prouver le rôle de l'EPN, était le croisement de souris transgéniques surexprimant l'EPN spécifiquement au niveau des neurones, soit l'endroit où se développe la MA, et des souris transgéniques modèles pour la MA.

Des souris surexprimant l'EPN spécifiquement dans les neurones n'existaient pas alors, aussi m'a-t-il fallu construire des vecteurs permettant cette surexpression spécifique. J'ai dû évaluer la spécificité d'expression neuronale des vecteurs construits. Cela dans le but de générer ultérieurement des souris transgéniques à partir desdits vecteurs. À long terme, les souris surexprimant l'EPN ainsi générées

seraient croisées avec des souris transgéniques modèles pour la MA. Plusieurs souris transgéniques modèles pour la MA existant déjà, il était superflu d'envisager d'en générer (Holcomb et al. 1998, Frautschy et al. 1998).

En parallèle à ce projet, le laboratoire avait en sa possession des souris invalidées en EPN et NL1 respectivement. NL1 et l'EPN ont sensiblement les mêmes substrats (voir sections 1.3.1.2 et 1.3.2.1). De plus, NL1 est exprimée dans les spermatides ronds et allongés, au niveau du testicule, alors que l'EPN est plutôt exprimée dans les cellules de Sertoli (Monsees et al. 1996). Il nous est donc apparu intéressant de générer des souris doublement invalidées qui pourraient nous donner des indications sur des rôles de chacune de ces enzymes qui pourraient être palliées l'une par l'une dans leur modèle invalidé respectif. J'ai donc généré ces souris doublement invalidées à partir des deux colonies pré-existantes, et commencé leur caractérisation.

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Surexpression spécifique de l'EPN dans les cellules neuronales

2.1.1 Amplification des éléments du vecteur par PCR

Les 4 éléments nécessaires à la construction du vecteur soit : pNSE (Neuron Specific Enolase promoter), l'ADN de l'EPN, l'ADN de l'IRES-EGFP et intron-polyA, ont été amplifiés par PCR (PTC-200 de Peltier Thermal Cycler, MJ Research) en 42 cycles grâce à l'enzyme Vent (New England Biolabs). Le programme de PCR comprenait une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une d'appariement des amorces à 45°C (pNSE, EPN et IRES-EGFP) ou à 43°C (intron-polyA) pendant 90 secondes et une étape de polymérisation à 72°C pendant 6 minutes. Chaque amorce utilisée, obtenue de BioCorp Inc., insérait un site de restriction choisi en aval ou en amont de l'élément. Le fragment de 1800 pb du côté 5' du promoteur pNSE a été obtenu du vecteur pNSElacZ (Forss-Petter et al. 1990), (gracieuseté de J. Gregor Sutcliffe), à partir des amorces 5'pNSE EcoRI (5' – TGCATGAATTCGAGCTCCTCCTCTGCTCGC – 3') et 3'pNSE BamHI (5' – TAATCAGGATCCCTCGAGGACTGCAGACTCAGC – 3'). L'ADN de l'EPN (endopeptidase neutre) a été amplifié à partir du vecteur pSVCalla (Tran-Paterson et al. 1990), et des amorces 5'EPN BamHI (5' – TAATTAGGATCCTAGGTGATGGGCAAGTCAG – 3') et 3'EPN SpeI (5' - TCCAGAACTAGTTCACCAAACCCGGCACTTC – 3'). L'ADN pour l'IRES-EGFP (internal ribosome entry site – enhanced green fluorescent protein) a été amplifié à partir du vecteur pIRES2-EGFP (Clontech) à partir des amorces 5'IRES-EGFP SpeI (5' - AATTTTACTAGTGCCCCTCTCCCTCCCC – 3') et 3'IRES-EGFP XbaI (5' - ACCGCTCTAGATTACTTGTACAGCTCGTCC – 3'). L'intron de SV40 ainsi que le signal de polyadénylation ont été obtenus à partir du vecteur pGL2-Basic (Promega) et des amorces 5'Intron-polyA XbaI (5' –

TGGCGTCTAGATAATAAGCGGATGAATGGC – 3') et 3'Intron-polyA NotI (5' – AACTTATAGCGGCCGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTC – 3')

2.1.2 Construction des plasmides de surexpression

Les vecteurs ont été construits par digestions enzymatiques des fragments d'intérêt, selon les indications fournies par Pharmacia. Les fragments purifiés sur gel d'agarose 1% par QIAEXII gel extraction kit (QIAGEN) ont été liés par la T4 DNA ligase (Roche).

Le fragment pNSE a été sous-cloné EcoRI-BamHI dans le vecteur Bluescript pBC-KS+ (Stratagène). Le fragment d'ADN de l'EPN a été sous-cloné BamHI-SpeI dans la construction Bluescript-pNSE. Le fragment contenant l'intron et le signal de polyadénylation a été sous-cloné XbaI-NotI dans Bluescript pBC-KS+. Le fragment d'ADN d'IRES-EGFP a été sous-cloné SpeI-XbaI dans Bluescript-intron-polyA, avec vérification de l'orientation du fragment IRES-EGFP (SpeI et XbaI donnent lieu à des extrémités cohésives compatibles). Pour la construction contenant IRES-EGFP (BPEGA), le fragment IRES-EGFP-intron-polyA a été excisé SpeI-NotI et sous-cloné dans Bluescript-pNSE-EPN par SpeI-NotI. Pour la construction sans IRES-EGFP (BPEA), l'intron-polyA a été directement sous-cloné XbaI-NotI dans Bluescript-pNSE-EPN par SpeI-NotI.

2.1.3 Transfection

Les transfections ont toutes été effectuées dans des pétris de 10 cm de diamètre. Les transfections des cellules Neuro2A ont été effectuées à l'aide de Lipofectamine2000 (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. Les transfections des cellules HEK ont été effectuées par la technique de Calcium Phosphate (Jordan & Wurm 2004). Les deux types cellulaires ont été transfectés à

50% de confluence, à raison de 10 µg d'ADN par pétris. Dans le cas des cellules transfectées pour le test enzymatique, les cellules ont été co-transfectées avec un vecteur encodant la CFP permettant de déterminer l'efficacité de transfection par microscopie en plus d'être transfectées par le vecteur BPEA, BPEGA ou pcDNA₃-RSV-Phex, vecteur encodant la métallopeptidase Phex.

Dans tous les cas, le milieu des cellules, DMEM (Gibco) 10 % FBS, étaient changés pour du milieu frais douze heures suivant la transfection. Les cellules ont été stimul es pendant vingt-quatre heures avec 25 mM butyrate de sodium, vingt-quatre heures suivant la transfection, soit douze heures suite au changement de milieu.

Les cellules ont été r colt es après avoir été lav es 1 fois dans PBS (140 mM NaCl; 19 mM Na₂HPO₄; 0,3 mM KCl; 0,2 mM KH₂PO₄ pH 7.4), centrifug es à 200 g et resuspendues dans 1% n-octyl-d-glucopyrannoside. Les cellules utilis es pour les essais enzymatiques ont été lav es avec TBSm (50 mM Tris; 150 mM NaCl pH 7.5), plutôt que PBS, et resuspendues dans 1% n-octyl-d-glucopyrannoside/TBS.

2.1.4 Cytofluorométrie de flux

Les cellules ont été lav es 2 fois dans PBS, r colt es et centrifug es à 200 g. Le culot de cellules a été resuspendu pour atteindre la concentration de 10⁶ cellules/mL dans 2% PFA. La fluorescence de la GFP a été observ e en utilisant l'appareil FACSCalibur (BD Biosciences). L'acquisition et l'analyse sont effectu es avec Cellquest. La lecture est faite avec le filtre 530/30.

2.1.5 Immunobuvardage de type Western

Les extraits cellulaires solubilisés dans 1% n-octyl-d-glucopyranoside/PBS suite aux transfections ont été séparés par SDS-PAGE sur un gel de 7,5% (10^5 cellules transfectées par puits). L'immunobuvardage de type Western s'est ensuite effectué tel que décrit par Mayer et al. (2004). En bref, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 1 heure. Les membranes de nitrocellulose ont été bloquées par une incubation dans une solution 5% lait/PBS-tween 0,05%, pendant 1 heure. Les membranes ont été incubées pendant 16 heures à 4°C en présence d'un anticorps monoclonal de souris anti-EPN, 18B5 (Ruchon et al. 2000), dilué 1/13000 dans 5% lait/PBS-tween 0,05%. Les membranes ont ensuite été rincées au PBS 1 fois 15 minutes et 4 fois 5 minutes. Un anticorps de cheval anti-souris-HRP (Dako), couplé à la peroxydase HR, dilué 1/10 000 dans 5% lait/PBS-tween 0,05%, a ensuite été incubé avec les membranes pendant 1 heure à température ambiante avec agitation. Les membranes ont de nouveau été lavées au PBS. La révélation a été faite avec Western blot Chemiluminescence Reagent Plus (NEN) selon les indications du manufacturier. Un contrôle positif utilisant 120 ng de l'EPN purifiée a été utilisé.

2.1.6 Fluorescence – préparation des pétris à la microscopie

Les pétris de cellules transfectées ont été rincés 3 fois avec PBS $MgCl_2$ 1 mM/ $CaCl_2$ 0,1 mM, puis fixées dans 4% PFA pendant 25 minutes à température ambiante. Les pétris ont ensuite été rincés 1 fois avec Glycine 10 mM/PBS $MgCl_2$ 1 mM/ $CaCl_2$ 0,1 mM et rincés 1 fois PBS $MgCl_2$ 1 mM/ $CaCl_2$ 0,1 mM. La fluorescence a été observée sur un microscope à fluorescence inversée TE2000U (Nikon) avec le filtre approprié.

2.1.7 Essais enzymatiques

La quantité de cellules utilisées a été normalisée par visualisation de la CFP au microscope à fluorescence. Un même nombre de cellules transfectées a été utilisé dans chaque cas. Les extraits cellulaires ont été incubés à 37°C pendant 1 heure avec 10 µM de substrat fluorescent (Abz-rRL-EDDnp), 10⁻⁵ M Bestatin, 10⁻⁶ M Captopril dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 7.4 pour un volume final de 100 µL. L'expérience a été produite en triplicata. Un contrôle négatif, en duplicata, contenant tous les éléments sauf les extraits cellulaires, a été effectué ainsi qu'un contrôle positif, en duplicata, avec 120 ng de l'EPN purifiée. Les valeurs de fluorescence ont été mesurées par Cary Eclipse de Varian en utilisant le programme Kinetics à une longueur d'onde d'émission de 420 nm, une longueur d'excitation de 320 nm et des fenêtres de longueur d'ondes, pour l'émission et l'excitation, de 10 nm.

2.2 Génération et caractérisation de souris invalidées en NL1/EPN

2.2.1 Buvardage de type Southern

L'extraction de l'ADN génomique pour les buvardages de type Southern a été faite selon le protocole décrit par Hogan B. et al. (1986). L'ADN est excisé par les enzymes BglII et BamHI, puis séparé sur gel d'agarose 0,7%. Le gel est ensuite mis en présence d'une solution de bromure d'éthidium à 2 µg/mL pendant 10 minutes et l'ADN est ensuite brisé par exposition aux UV pendant 8 minutes. L'ADN est dénaturé par agitation du gel dans 0,5 M NaOH/0,6 M NaCl pendant 1 heure. Puis, l'ADN est transféré sur membrane de nylon par capillarité dans SSC 10X (175,3 g NaCl et 88,2 g citrate de sodium*2H₂O dans 1 L eau à pH 7,0 pour SSC 20X), lavé avec SSC 2X et fixé sur la membrane aux UV pendant 10 minutes. La membrane doit être pré-hybridée un minimum d'une heure à 65°C. L'hybridation avec la sonde radio-marquée (ProbeQuant™ de Amersham),

préalablement digérée par XhoI et purifiée, se fait toute la nuit à 65°C. Il faut par la suite effectuer deux lavages de la membrane avec SSC 1X 0,1% SDS sur bain agitateur à 65°C, un de 15 minutes et un de 30 minutes. La membrane est ensuite exposée deux semaines avec un film photo-sensible.

2.2.2 PCR de géotypage

Pour la détection de l'allèle sauvage ou mutée de NL1, le programme de PCR de 35 cycles comprenait une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une d'appariement des amorces à 55°C pendant 30 secondes et une étape de polymérisation à 72°C pendant 2 minutes. L'enzyme, ainsi que les tampons et nucléotides, provenait du *Taq PCR Core kit* (QIAGEN) et ont été utilisés selon les recommandations du fabricant. Un μL d'ADN, d'un bout de queue de souris d'environ 0,5 cm purifié par QIAamp (QIAGEN), était utilisé. Les amorces 93 (5'-AACTGGAGACGCATCTGG-3'), 94 (5'-TCCTGTCATCTCACCTGGCTCC-3') et 95 (5'-TAGCTCCATCAGGTCCATTCG-3') ont été utilisées à une concentration de 0,5 μM .

Pour la détection de l'allèle sauvage ou mutée de l'EPN, deux programmes de PCR étaient requis. Le programme de détection de l'allèle sauvage de 40 cycles comprenait une étape de dénaturation à 94°C pendant 15 secondes, une d'appariement des amorces à 60°C pendant 1 minute et une étape de polymérisation à 72°C pendant 1 minute. L'ensemble *Taq PCR Core kit* (QIAGEN) a été utilisé selon les recommandations du fabricant. Du MgCl_2 a été ajouté au tampon pour une concentration finale de 1 mM. Trois μL d'ADN, d'un bout de queue de souris d'environ 0,5 cm purifié par QIAamp (QIAGEN), était utilisé. Les amorces Nepex1314S (5'-CTTGTAAGCAGCCTCAGCCGAA-3') et Nepex1314AS (5'-GTTAGCACACCGTCTCCATGTT-3') ont été utilisées à une concentration de 0,24 μM . Le programme de détection de l'allèle mutée, de 30 cycles, comprenait une étape de dénaturation à 94°C pendant 15 secondes, une d'appariement des

amorces à 60°C pendant 30 secondes et une étape de polymérisation à 72°C pendant 1 minute. L'ensemble *Taq PCR Core kit* (QIAGEN) a été utilisé selon les recommandations du fabricant. Trois µL d'ADN, d'un bout de queue de souris d'environ 0,5 cm purifié par QIAamp (QIAGEN), était utilisé. Les amorces NéoS (5'- CAAGATGGATTGCACGCAGGTTCT -3') et NéoAS (5'- GAGCAAGGTGAGATGACAGGAGAT-3') ont été utilisées à une concentration de 0,24 µM.

2.2.3 Étude de fertilité

Des croisements de type bigame (2 femelles pour 1 mâle) entre mâle NL1+/+ EPN-/-, NL1+/+ EPN+/-, NL1-/- EPN-/- et femelles NL1+/+ EPN+/- ont été effectués. Des croisements bigames ont également été effectués entre mâle NL1+/+ EPN+/- et femelles NL1+/+ EPN-/- ou NL1-/- EPN-/- . Les cages étaient vérifiées tous les jours à la même heure pour les naissances et les souriceaux comptés le cas échéant.

2.2.4 Pesées des souris et courbes de croissance

Les souriceaux issus de croisements de parents hétérozygotes NL1/EPN (NL1+/-, EPN+/-) ont été pesés chaque jour, à la même heure, sur une balance analytique Sartorius pendant les vingt-et-un premiers jours, et à tous les trois jours jusqu'au 90^e jour.

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

3.1 Surexpression spécifique de l'EPN dans les cellules neuronales

3.1.1 Construction des vecteurs surexprimant l'EPN

Deux vecteurs comprenant, dans l'ordre, le promoteur de l'énolase spécifique aux neurones (pNSE), l'ADNc humain de l'EPN, l'intron de SV40 et le signal de polyadénylation ont été construits. Pour l'un des deux vecteurs, un IRES-EGFP a été inséré entre l'ADNc et l'intron, alors que l'autre n'en possède pas. La EGFP a été ajoutée pour pouvoir suivre facilement l'expression de l'EPN de manière indirecte. Un vecteur sans la EGFP a également été construit, car dans certains cas la GFP exprimée trop fortement entraîne une toxicité cellulaire (Liu et al. 1999). Si cela s'était avéré exact dans ce cas, le vecteur sans IRES-EGFP aurait été utilisé pour la génération de souris transgéniques préférentiellement au vecteur exprimant la GFP.

Le promoteur choisi est le fragment de 1800 pb en 5' de pNSE, qui est la région minimale suffisante pour une bonne expression (Forss-Petter S. et al. 1990). Ce promoteur permet une expression relativement élevée, considérant que NSE peut constituer jusqu'à 4% des protéines totales d'un neurone, et variée, considérant qu'il permet une expression dans plusieurs régions du cerveau (Hilton et al. 1997). De plus, l'insertion aléatoire du transgène dans le génome permettrait la génération de plusieurs lignées de souris transgéniques surexprimant l'EPN dans diverses régions du cerveau, et à différents niveaux d'expression, le tout à partir d'une seule construction. Le promoteur pNSE a déjà été utilisé avec succès pour générer des souris transgéniques surexprimant la β -galactosidase dans les neurones (Martinou et al. 1994). Un intron a été utilisé dans ces constructions, car il a été démontré que l'expression de transgène est augmenté en présence d'intron (Buchman A.R & Berg 1998, Petitclerc et al. 1995).

3.1.1.1 Stratégie de clonage

La méthode utilisée pour la construction de ces vecteurs a été l'insertion de sites de restriction par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) aux extrémités 3' et 5' des différents fragments voulus (Voir Figure 3.1). Les vecteurs ont été construits dans le plasmide procaryote Bluescript-KS+. La Figure 3.2 illustre les différents vecteurs intermédiaires et la Figure 3.3 les vecteurs finaux. Le bon appariement des divers fragments composant les vecteurs finaux a été vérifié par séquençage automatique.

3.1.1.2 Analyse de l'expression de la GFP

3.1.1.2.1 Par microscopie à fluorescence

L'expression du vecteur BPEGA a été vérifiée par transfection de cellules N₂A (*Mouse neuroblastoma*) et HEK (*Human embryonic kidney*). Ces deux types cellulaires ont été choisis en raison de leur facilité de manipulation et selon l'expression, ou pas, de l'énolase spécifique aux neurones dans ces types cellulaires (Twyman & Jones 1997). Via l'expression de la GFP, il a été possible de s'assurer de l'efficacité du promoteur de la construction BPEGA. Comme on peut le voir dans la Figure 3.4, il y a clairement expression de la protéine GFP dans certaines cellules neuronales, N₂A, et non dans les HEK.

3.1.1.2.2 Par cytofluorométrie de flux

L'expression de GFP, a été quantifiée par la suite en utilisant la technique de cytofluorométrie de flux. Trois contrôles ont été utilisés, soient un vecteur pcDNA₃ vide Contrôle (courbe mauve), l'ADNc d'une forme mutée de Phex dans pcDNA₃ (courbe verte) et BPEA (courbe rose).

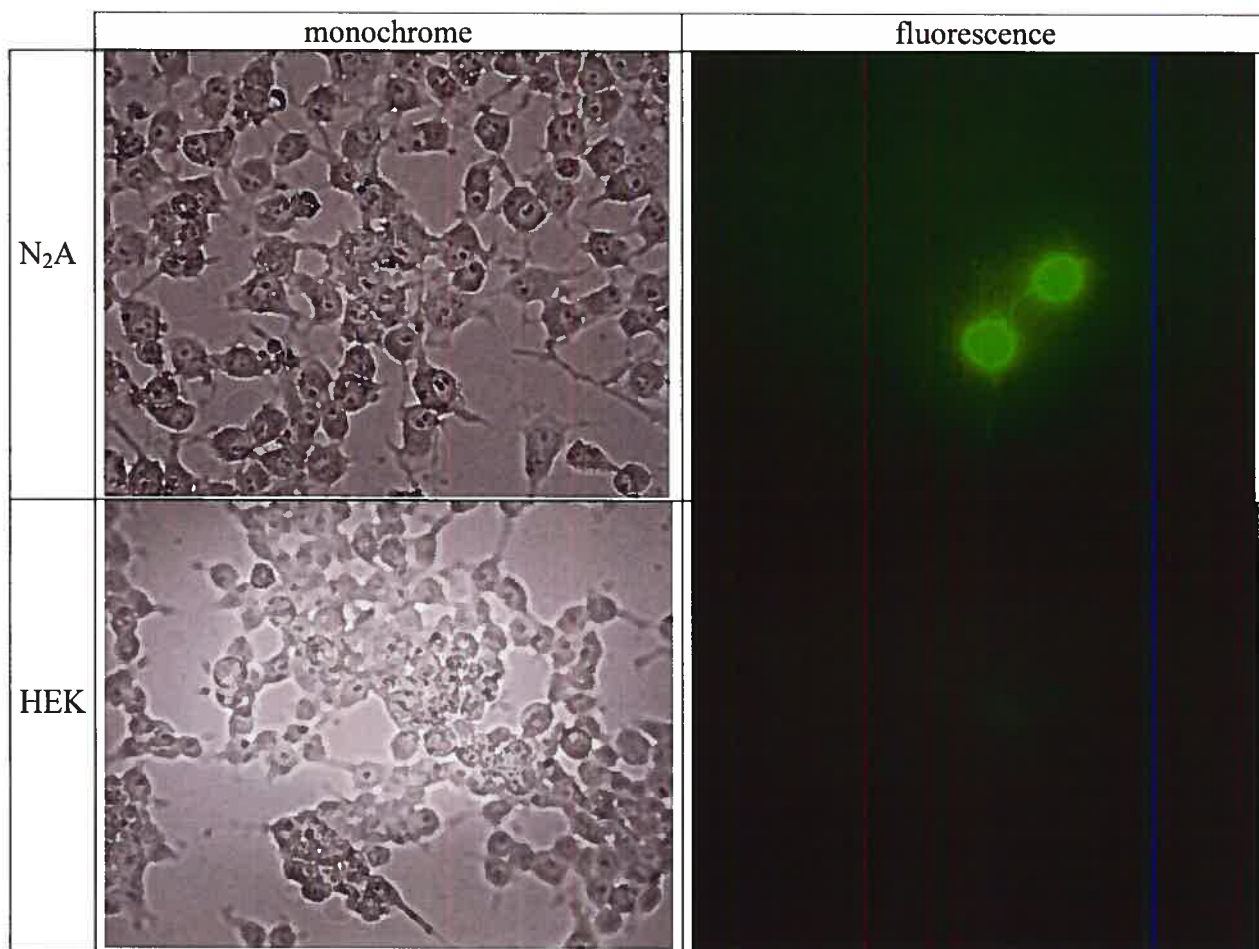


Figure 3.4 – Contrôle de transfection / expression de l'EPN via le IRES-eGFP contenu dans BPEGA.

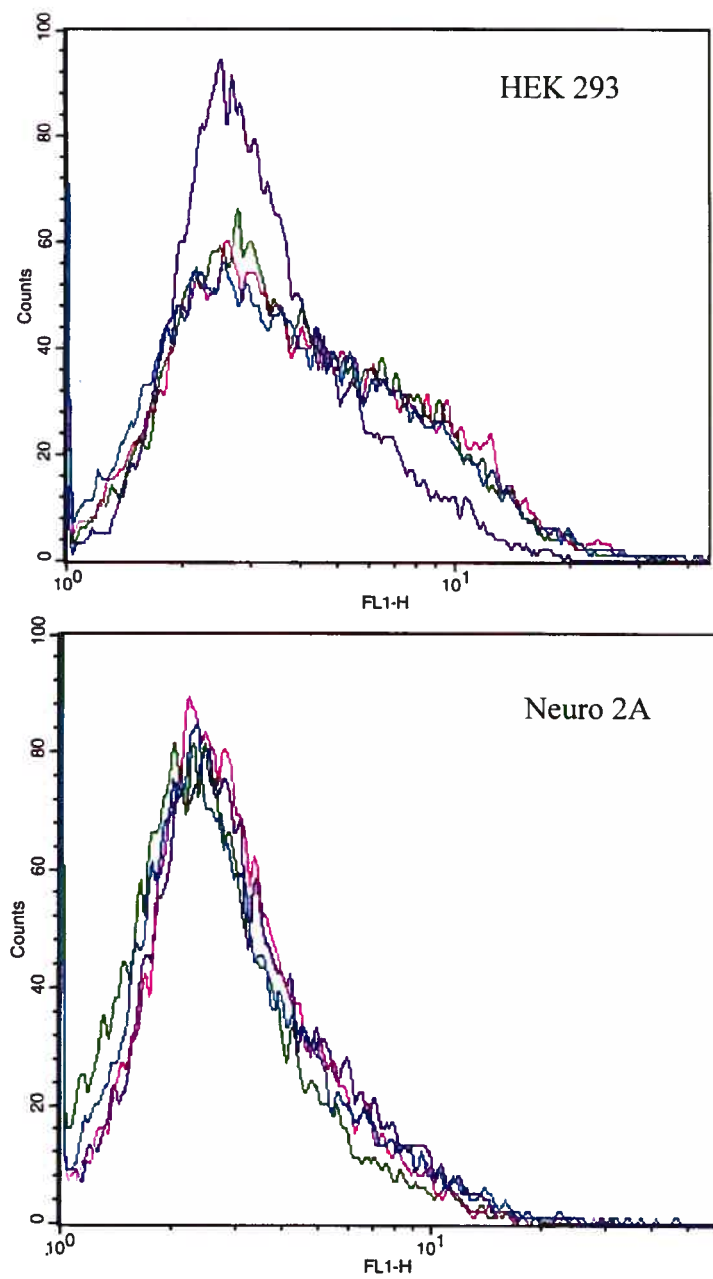


Figure 3.5 – Cytofluorométrie de flux sur des cellules N₂A ou HEK transfectées transitoirement avec un vecteur vide (mauve), Phex (vert), BPEA (rose) et BPEGA (bleu).

En théorie seule la construction BPEGA dans les cellules N₂A devraient donner un signal en cytofluorométrie de flux. Malheureusement, comme on peut l'observer sur la Figure 3.5, aucun déplacement vers la droite de la courbe pour les cellules transfectées avec BPEGA (courbe bleue) n'a été observé, ce qui aurait signifié une augmentation de la fluorescence digne de mention pour ces cellules. Cette absence de signal peut être due à un taux de transfection trop faible. Cela voudrait dire que le niveau de fluorescence spécifique est si bas que les cellules fluorescentes se confondent dans la marge d'erreur de la technique. Cela pourrait aussi s'expliquer par une expression de la GFP trop basse pour être perçue par l'appareil, ce qui voudrait dire que les limite de la technique m'empêche d'observer la fluorescence spécifique. Il y a une troisième possibilité voulant que je n'ai aucun signal du tout, ce qui signifierait qu'il n'y a pas d'expression de la GFP et donc de l'EPN. Cette troisième possibilité est peu probable, car j'ai observé des cellules exprimant la GFP par microscopie à fluorescence.

3.1.1.3 Expression de l'EPN

3.1.1.3.1 Évaluation de l'expression de l'EPN par immunobuvardage Western

L'expression de l'EPN induite par BPEGA a d'abord été analysée par la technique d'immunobuvardage de type Western.

Comme on peut l'observer à la Figure 3.6, un immunobuvardage de type Western utilisant l'anticorps de souris anti-EPN 18B5, révèle une bande dans le puits correspondant aux cellules N₂A transfectées transitoirement par la construction BPEGA. Le puits équivalent pour les cellules HEK ne révèle aucune bande quant-à lui, ce qui suggère qu'il y a bien une expression spécifiquement neuronale de l'EPN par BPEGA. Le puits de droite est le contrôle positif utilisant la sEPN purifiée

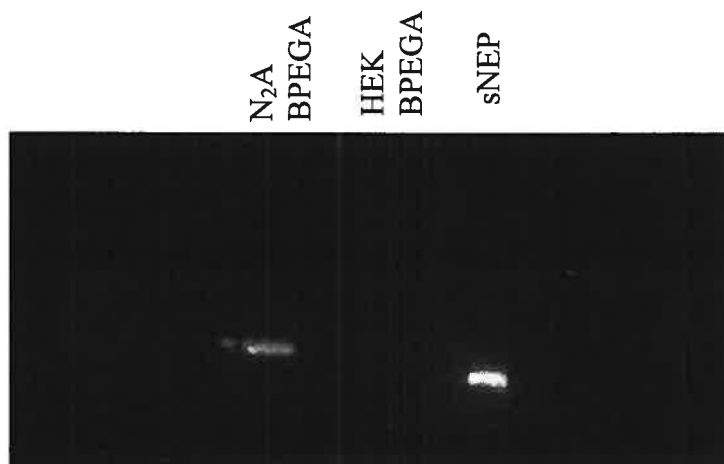


Figure 3.6 – Gel de type SDS-PAGE 7,5% transféré sur membrane de nitrocellulose et révélé par immunobuvardage de type Western en utilisant l'anticorps de souris anti-EPN 18B5. Fait sur des préparations membranaires de cellules neuronales, N₂A, et de rein, HEK, transfectées transitoirement avec BPEGA. La sEPN purifiée, forme sécrétée de l'EPN, a été utilisée ici comme contrôle positif.

(120 ng de la forme sécrétée de l'EPN), qui migre plus bas puisque cette forme de la protéine est plus courte. L'immunobuvardage étant positif mais toutefois pas très clair quant aux niveaux relatifs d'expression de l'EPN que je pouvais espérer obtenir à partir de ces constructions, je me suis dirigée vers une technique encore plus sensible, soit le test enzymatique.

3.1.1.3.2 Tests enzymatiques

Le test enzymatique utilise le substrat de l'EPN, Abz-rRL-EDDnp, qui une fois clivé libère un fluorophore. J'ai effectuée des transfections transitoires des constructions BPEGA (bleu) et BPEA (rose), ainsi que l'ADNc de la forme mutée de Phex (vert) dans les N₂A et les HEK. L'efficacité de transfection a été normalisée de sorte qu'un même nombre de cellules transfectées soit utilisé dans les tests enzymatiques.

Comme on peut l'observer dans la Figure 3.7, la technique émet en elle-même un certain niveau basal de fluorescence si on regarde le contrôle négatif effectué avec de l'eau (rouge). Toute intensité de fluorescence plus importante que cela indique donc une activité enzymatique de l'EPN, comme on peut le voir pour le test contrôle positif à l'extrême droite (gris). Les cellules N₂A transfectées avec BPEA ou BPEGA montrent une forte activité qui est perdue en présence de thiorphan, un inhibiteur de l'EPN. Une faible activité est également observée dans les cellules HEK pour la construction BPEA, activité qui est également perdue par l'ajout de l'inhibiteur thiorphan. Il n'y a pas d'augmentation de la fluorescence dans le cas des cellules transfectées avec l'ADNc de Phex muté, que l'échantillon soit traité ou pas au thiorphan, ce qui démontre que la fluorescence émise par les cellules transfectées par les deux constructions n'est pas due à des protéases non spécifiques présentes dans les préparations de membranes utilisées. Ces résultats indiquent que les cellules neuronales transfectées avec ces constructions possèdent une activité de dégradation d'un peptide fluorescent pour l'EPN. Il est également clair que cette activité est perdue en présence d'un inhibiteur spécifique à l'EPN. Il est donc

raisonnable d'imputer cette activité à l'EPN produite à partir de des constructions transfectées. L'activité observée dans les préparations membranaires de cellules HEK transfectées avec BPEA n'est pas complètement inattendue, puisque Twyman & Jones (1997) rapporte également une activité faible du promoteur pNSE dans certaines cellules non-neuronales en culture, mais une spécificité neuronale stricte de ce promoteur dans des souris transgéniques.

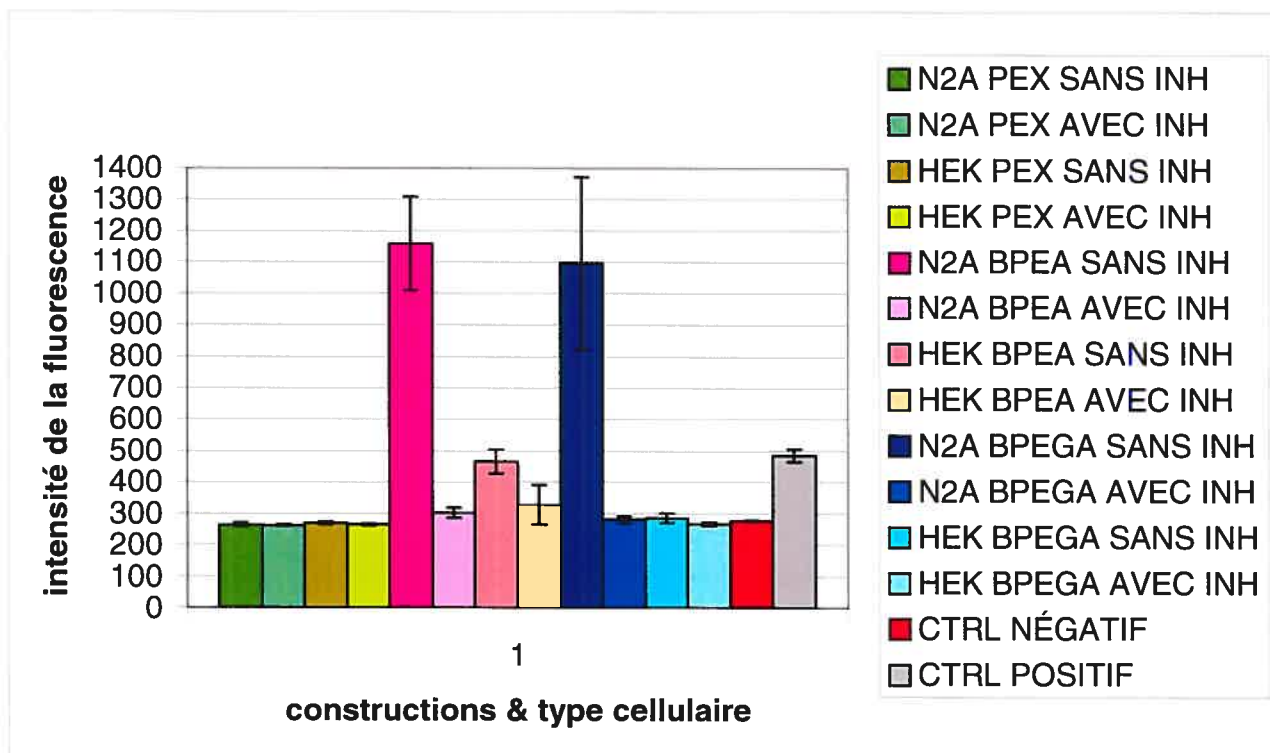


Figure 3.7 - Intensité de la fluorescence émise par le clivage d'un substrat fluorescent pour l'EPN, Abz-rRL-EDDnp, en utilisant un même nombre de cellules transfectées pour chaque cas. 'INH' signifie inhibiteur thiorphan. 120 ng de sEPN ont été utilisés comme contrôle positif. Le contrôle négatif était de l'eau.

3.2 Génération et caractérisation de souris invalidées en NL1/EPN

3.2.1 Génération des souris doublement invalidées

À partir de souris invalidées en NL1, dans un fond génétique 129/Outbreed, et de souris invalidées en EPN, dans un fond génétique C57BL/6, des souris doublement invalidées NL1/EPN ont été générées. Des souris invalidées homozygotes EPN ont été croisées avec des souris invalidées homozygotes NL1, ce qui nous a donné des portées de souriceaux tous NL1+/- EPN+/- . De ces souris croisées entre elles, 1/16 seulement sont en théorie des souris doublement invalidées homozygotes (Voir Tableau 3.1).

3.2.2 Génotypage des souris générées

La détermination des génotypes des souris issues de ces divers croisements a d'abord été effectuée par buvardage de type Southern en ce qui concerne l'allèle NL1. L'insertion de la cassette Néomycine dans l'allèle invalidé introduisait un site de restriction BamHI supplémentaire dont nous avons pris avantage pour la détection des génotypes. La stratégie de détection utilisait une sonde s'hybridant en 3' de l'allèle ciblé permettant l'obtention d'une bande de 9,6 kbp dans le cas de l'allèle sauvage, contre une bande de 8,1 kbp pour l'allèle invalidé (Voir Figure 3.8a pour la stratégie, Figure 3.9 pour un exemple de buvardage de type Southern). Des stratégies de génotypage par PCR ont ensuite été développées pour la détection des allèles NL1 et EPN (Voir Figure 3.9b & c pour les stratégies, Figure 3.10 pour des exemples de gel de PCR).

La distribution mendélienne des génotypes à partir de croisements de souris doubles hétérozygotes a été vérifiée et confirmée (Voir Tableau 3.2).

| | | | | |
|------------|----|----|----|----|
| NL1 | + | + | = | = |
| EPN | + | - | + | = |
| + | ++ | ++ | +- | +- |
| + | ++ | +- | ++ | +- |
| = | ++ | ++ | +- | +- |
| = | +- | -- | +- | -- |
| - | +- | +- | -- | -- |
| - | ++ | +- | ++ | +- |
| - | +- | +- | -- | -- |
| - | +- | -- | +- | -- |

Tableau 3.1 – Distribution des gamètes et génotypes possibles suite au croisement de souris NL1+/- EPN+/- entre elles. En haut du tableau sont les combinaisons de gamètes possibles pour l'un des parents, à gauche les combinaisons de l'autre parent. Au centre du tableau sont représentés les résultats possibles quant aux génotypes des rejetons suite au croisement. Les gamètes représentées en rouge sont celles concernant NL1, en bleues celles de l'EPN.

| | EPN+/+ | EPN+/- | EPN-/- |
|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| NL1+/+ | 5% 6,25% | 12% 12,5% | 10% 12,5% |
| NL1+/- | 13% 12,5% | 23% 25% | 13% 12,5% |
| NL1-/- | 10% 12,5% | 6% 6,25% | 8% 6,25% |

Tableau 3.2 – Distribution mendélienne des génotypes de souris résultantes de croisements entre souris double hétérozygote. Les chiffres du haut en noir sont les pourcentages obtenus, ceux en bas en gris ceux attendus pour de tels croisements selon Mendel.

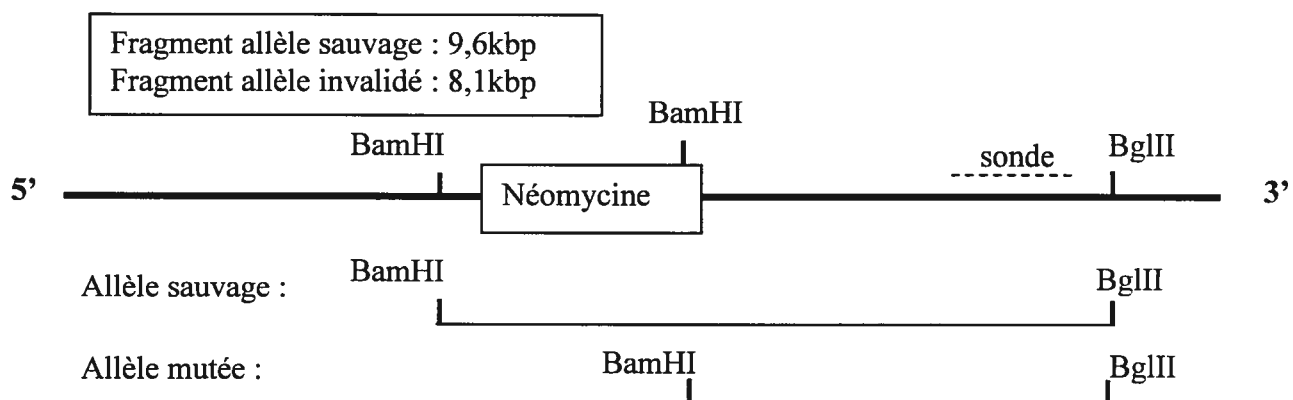


Figure 3.8a – Stratégie de génotypage par buvardage Southern pour l'allèle NL1. Détection par l'extrémité 3'.

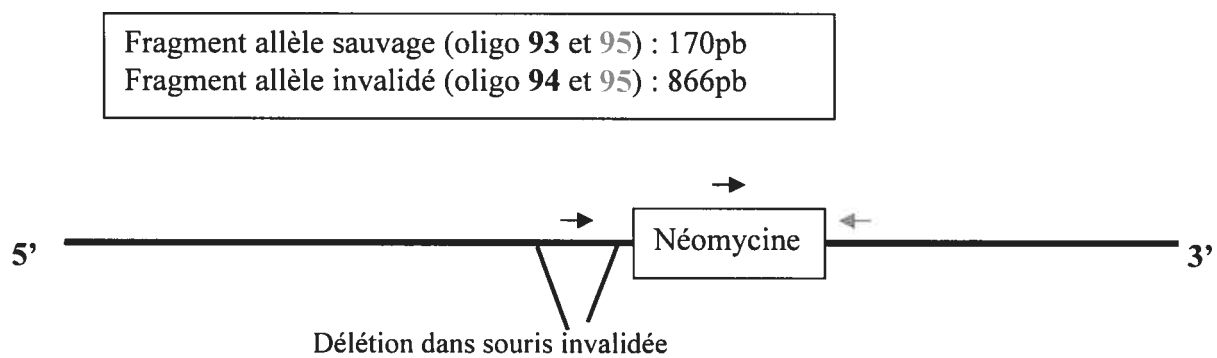


Figure 3.8b – Stratégie de génotypage par PCR des souris invalidées NL1.

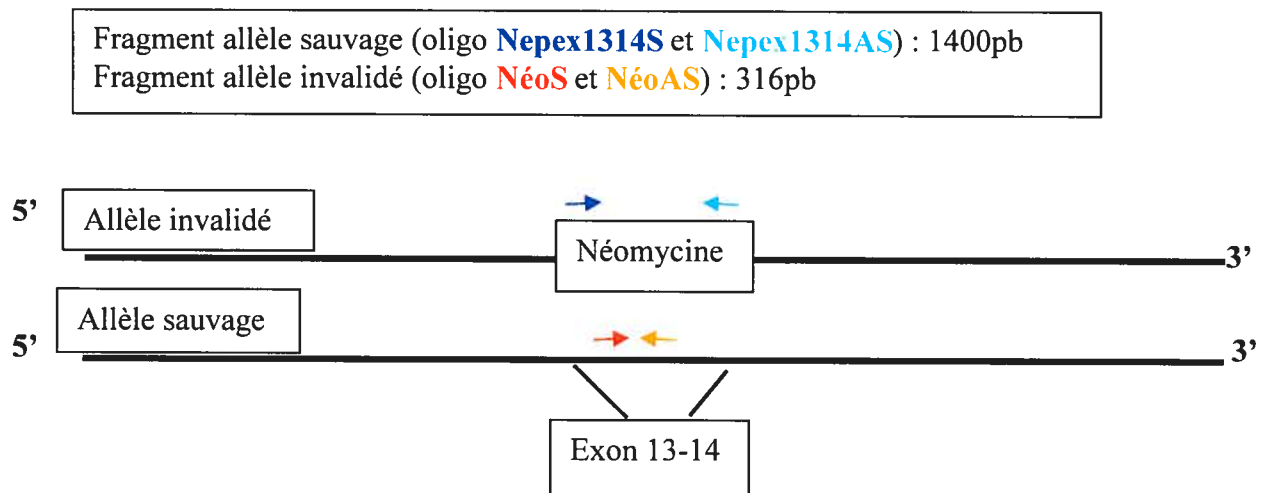


Figure 3.8c – Stratégie de génotypage par PCR des souris invalidées EPN.

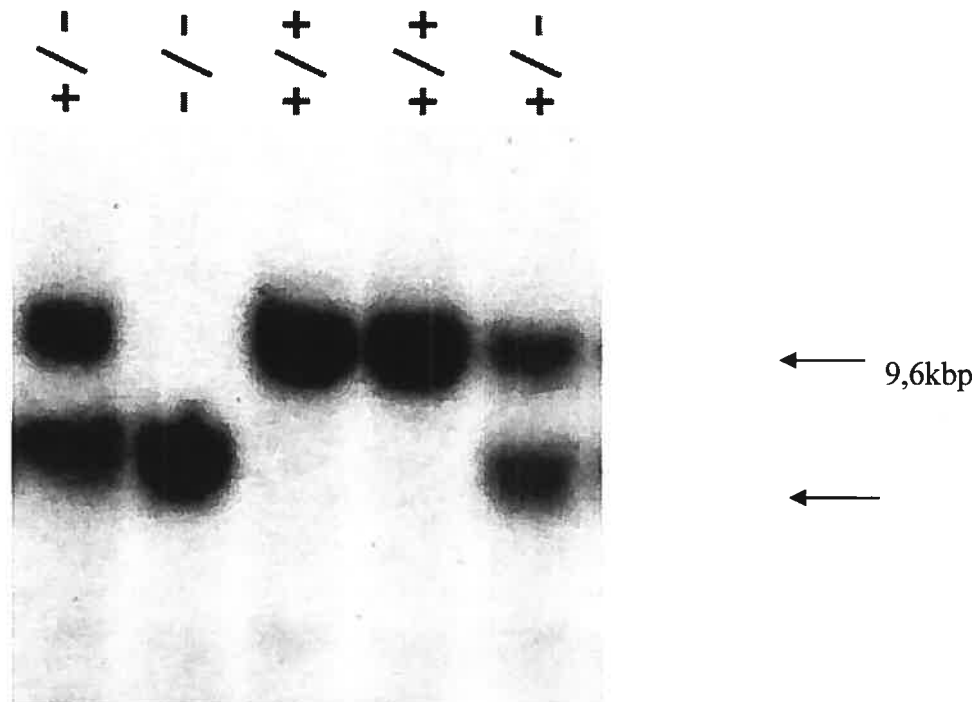


Figure 3.9 – Exemple de buvardage de type Southern. L'ADN gène 8,1kbp digéré par les enzymes BamHI / BglII et transféré sur membrane de nylon. Ces membranes étaient hybridées avec une sonde radiomarquée s'hybridant en 3' de la séquence ciblée. Des fragments de 9,6 kb (+/+) ou 8,1 kb(-/-) étaient détectés selon le génotype.

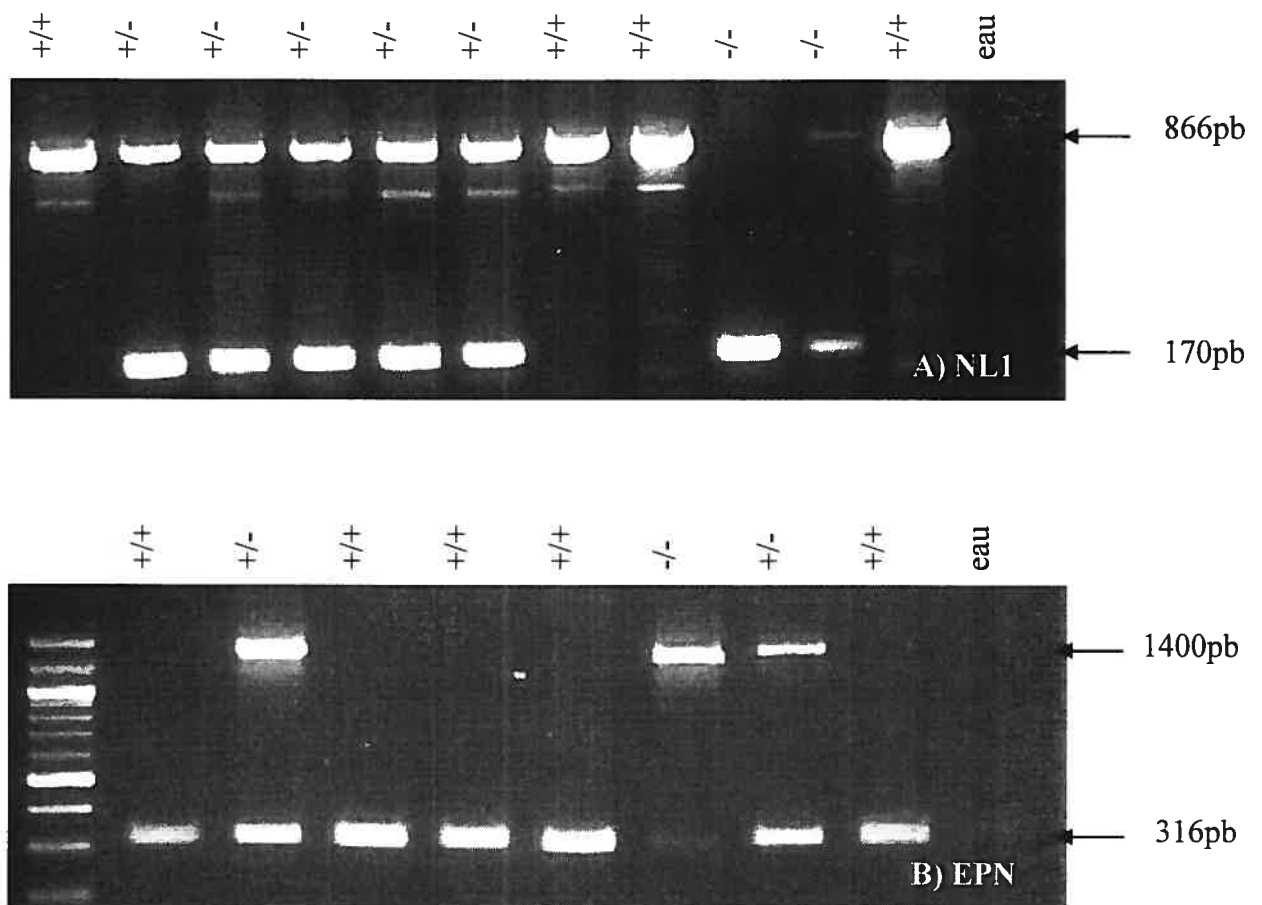


Figure 3.10 – Exemples de gels de génotypage par PCR. A) Gel de génotypage pour l'allèle NL1. Présence d'une bande à 866 pb pour l'allèle sauvage et d'une bande à 170 pb pour l'allèle invalidé. B) Gel de génotypage pour l'allèle EPN. Présence d'une bande à 1400 pb pour l'allèle invalidé et d'une bande à 316 pb pour l'allèle sauvage.

3.2.3 Études de fertilité des souris invalidées NL1/EPN

Considérant que les souris invalidées NL1 montrent une baisse de fertilité, et que l'EPN est exprimée au niveau du testicule, il a semblé logique de déterminer si les souris doublement invalidées souffraient du même problème. Pour ce faire, les croisements du Tableau 3.3 ont été effectués.

| | | femelles | | |
|-------|------------------|-----------------|------------------|------------------|
| | | NL-/- EPN-/- | NL1+/+ EPN-/- | NL1+/+ EPN+/+ |
| mâles | NL-/- EPN-/- | 6.3 ± 0.8 | X | 6.6 ± 0.8 |
| | NL1+/+ EPN-/- | X | X | 7.6 ± 1.5 |
| | NL1+/+ EPN+/+ | 2 | 7.5 ± 0.7 | 5.5 ± 1.5 |

Tableau 3.3 – Moyenne du nombre de souriceaux par portée selon le génotype des croisements bigames effectués dans le cadre des tests de fertilité. X représente les croisements non-effectués. Une moyenne de 4 portées/type de croisement à été obtenue.

En tenant compte des écarts-types de l'expérience, aucune différence dans le nombre de petits par portée n'a été observée. En moyenne, les croisements entre souris doublement invalidées ont donné 6.3 ± 0.8 souriceaux/portée, alors que les croisements entre souris de type sauvage ont donné 5.5 ± 1.5 souriceaux/portée. Les femelles de type sauvage croisées avec des mâles doublement invalidés ont donné 6.6 ± 0.8 souriceaux/portés en moyenne, contre 7.6 ± 1.5 souriceaux/portée pour

celles croisées avec des mâles invalidés seulement en EPN. Les croisements entre mâles de type sauvage et femelles invalidées en EPN seulement ont donné une moyenne de 7.5 ± 0.7 souriceaux/portée. Seulement 2 souriceaux/portée ont été observés en ce qui concerne le croisement entre femelles doublement invalidées et mâles de type sauvage, mais considérant que ce croisement n'a produit qu'une seule portée, il est difficile d'en conclure quoique ce soit. Les écarts-types sur les valeurs présentées au Tableau 3.3 ne nous permettent pas de déterminer de différence significative quant au nombre de souriceaux/portée obtenu dans cette expérience.

3.2.4 Autres caractérisations des souris doublement invalidées

Peu après la naissance des premières portées issues de croisements doubles hétérozygotes, il semblait, à première vue, que certains souriceaux étaient plus petits que les autres. J'ai donc mesuré les courbes de croissance des souriceaux en tenant compte du génotype afin de déterminer si, effectivement, il y avait une différence notable de poids pour les souris doublement invalidées. La Figure 3.11 présente les courbes résultantes de ces expériences. Il apparaît ne pas y avoir de différence notable de poids entre des divers génotypes générés.

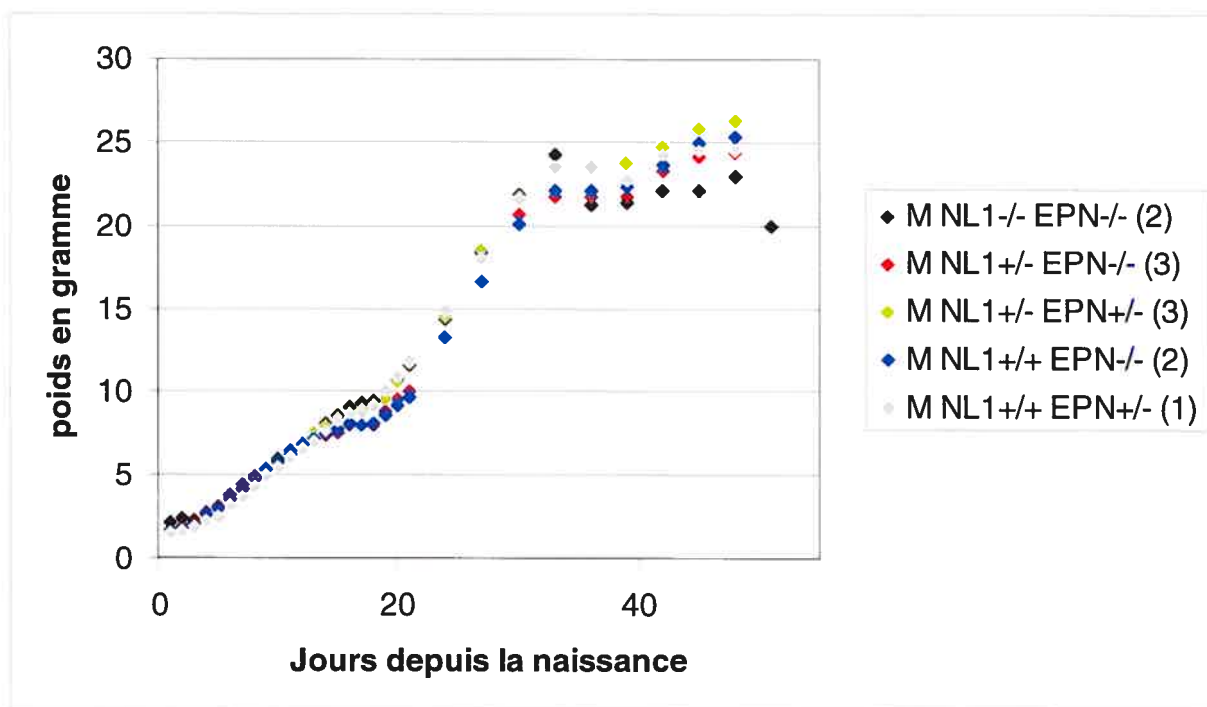
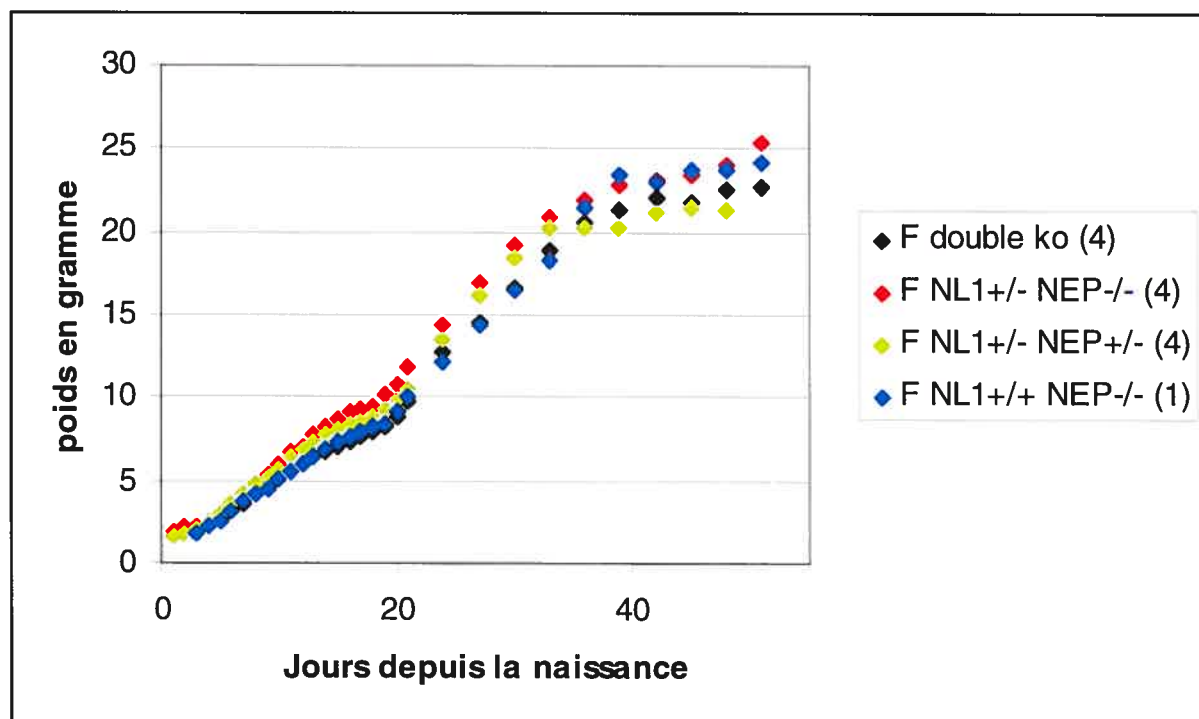


Figure 3.11 – Courbes de croissance selon le génotype. Haut : Femelles, bas : mâles. Les chiffres entre parenthèses indique le nombre de souris utilisées.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

4.1 Rôle de l'EPN dans la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative atteignant plus de 5% de la population âgée de plus de 60 ans et jusqu'à 20% chez les plus de 80 ans. Cette maladie est caractérisée par une dégénérescence neurofibrillaire, soit une hyperphosphorylation intraneuronale de la protéine tau menant à l'accumulation pathologique de celle-ci, et une amyloïdogénèse, soit l'accumulation extracellulaire du peptide amyloïde β ($A\beta$).

Le peptide $A\beta$ est généré à partir du clivage de la protéine APP. Cette protéine est fortement exprimée dans le cerveau ainsi que dans les cellules gliales satellites de l'épine dorsale, les ganglions entériques, la glande surrénale et les mégacaryocytes. Cette protéine transmembranaire peut être clivée par diverses sécrétases, ce qui donne lieu à deux voies de maturation de l'APP : la voie non-amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique. La voie non-amyloïdogénique implique un clivage de l'APP par la α -sécrétase, ce qui empêche la formation de peptides $A\beta$ puisque cela clive l'APP au centre de la portion donnant naissance au peptide $A\beta$. La voie amyloïdogénique, voie de génération du peptide $A\beta$ et donc celle qui conduit à la MA, se caractérise par un clivage par la β -sécrétase suivi d'un clivage à l'un des sites γ -sécrétase (Voir Figure 4.1).

Ces sécrétases étant des cibles thérapeutiques de choix dans le développement d'un traitement contre la MA, des efforts considérables ont été faits aux cours des dernières années pour en découvrir leurs natures précises. L'identité de la α -sécrétase demeure toujours inconnue, bien qu'un ou plusieurs membres de la famille de métalloprotéases ADAMs semblent impliqués. Les peptidases ADAM9, ADAM10 et ADAM17 ont été proposées comme étant la sécrétase recherchée (Asai

et al. 2003). Du côté des γ -sécrétases, on a cru pendant un certain temps que les présénilines étaient les γ -sécrétases elles-mêmes, mais cette hypothèse semble avoir

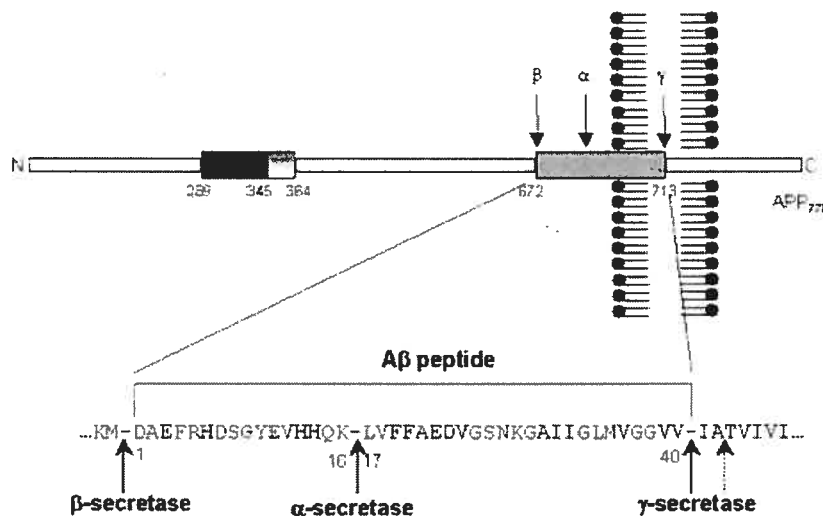


Figure 4.1 – Sites de clivage de l'APP par les diverses sécrétases

été rejetée depuis. Il est néanmoins clair que les présénilines jouent un rôle dans la modulation de l'activité γ -sécrétase, dont l'identité de l'enzyme effectrice demeure inconnue. Les souris invalidées en préséniline-1 (PS-1) souffrent de mortalité pré-natale, alors que les souris invalidées en PS-2 sont viables, sans phénotype notable. Les souris invalidées PS-1/PS-2 souffrent d'une mortalité pré-natale encore plus précoce que les souris invalidées PS-1 (Donoviel et al. 1999). Les souris invalidées temporellement PS1-/PS-2 ont démontré que les présénilines étaient essentielles pour la maintenance de la structure et des fonctions du cortex, en plus d'être nécessaires au bon développement de l'embryon (Feng et al. 2004). Les présénilines en tant que cibles thérapeutiques pour la MA sont donc à proscrire. La β -sécrétase est la seule sécrétase à avoir été identifiée clairement, il s'agit de l'aspartyl-protéase BACE-1. Les souris invalidées en BACE sont viables et n'affichent aucun phénotype particulier à l'exception d'une réduction en peptides A β (Roberds et al. 2001). Il a été démontré que l'utilisation de courts fragments d'ARN inhibiteurs (siRNA) contre BACE-1 diminue les niveaux de peptides A β (Nawrot 2004). La β -sécrétase BACE est donc une cible thérapeutique intéressante. L'idée d'utiliser des inhibiteurs contre BACE-1, dans un but de prévention de la MA, semble donc avoir

un réel potentiel en pratique. Néanmoins, de tels inhibiteurs ne sont pas disponibles pour le moment et bien que nombre de laboratoires tentent de trouver l'inhibiteur parfait pour BACE-1. Il n'en demeure pas moins que cet inhibiteur serait utilisé dans des mesures de prévention de la MA ou dans des cas précoces de la MA, mais rien n'indique que cet inhibiteur hypothétique puisse renverser les dommages déjà présents dans un patient atteint de la MA.

La recherche effectuée sur les sécrétases jusqu'à présent, a beaucoup aidée à la compréhension du phénomène de génération et d'accumulation de peptides A β dans la MA. Toutefois, comme mentionné-ci haut, jouer avec ces facteurs ne permet pas d'enrayer la MA une fois en place. Dans cette optique, un autre axe de recherche s'est considérablement développé au cours des dernières années, soit la recherche d'enzymes capables de dégrader le peptide A β . Parmi les diverses candidates proposées, une retient particulièrement l'attention : il s'agit de l'EPN. De nombreuses études ont été publiées dans les 5 dernières années démontrant que l'EPN possédait toutes les caractéristiques requises pour une peptidase de A β (Iwata et al. 2000, Shirotani et al. 2000). Il a également été démontré que l'expression de la peptidase EPN était diminuée dans les régions du cerveau atteintes par la MA (Apelt et al. 2003). Il semblerait donc que cette peptidase soit celle responsable de la dégradation du peptide A β normalement. La diminution de l'expression de celle-ci entraînerait l'accumulation de peptides A β et la formation de plaques séniles. Il n'est donc pas irréaliste de penser que si l'on trouve moyen de redresser l'expression de l'EPN à un niveau normal ou supérieur, l'on pourrait faire régresser l'accumulation du peptide A β . Restait néanmoins à démontrer, dans des modèles animaux, si cette hypothèse se vérifiait et si une surexpression de l'EPN pouvait réellement protéger contre la formation de plaques amyloïdes. Mes travaux visaient à répondre à cette question. Dans ce but les constructions présentées dans ce mémoire ont été générées et testées quand à leur potentiel d'utilisation pour la production d'animaux transgéniques surexprimant l'EPN spécifiquement dans les neurones. Mon immunobuvardage de type Western démontre clairement que l'EPN est bel et bien produite à partir des constructions et ce spécifiquement dans les cellules neuronales. Quant aux tests enzymatiques, on peut y voir une activité de

peptidase contre un substrat spécifique de l'EPN dans les cellules neuronales transfectées avec BPEGA et BPEA, mais non avec les vecteurs contrôles. Une activité faible était également perçue pour les cellules rénales transfectées avec le vecteur BPEA, mais cela n'était pas particulièrement étonnant. En effet, Hilton et al. (1997), groupe ayant caractérisé le fragment de promoteur utilisé, rapporte aussi une expression non-neuronale faible dans les cellules en culture pour leurs vecteurs d'expression, mais une expression strictement neuronale une fois transposés dans l'animal transgénique. L'activité peptidase pour l'EPN était perdue en présence de thiorphan, ce qui indiquait que la peptidase responsable de la dégradation du substrat fluorogénique y était sensible. Pris ensemble ces résultats permettent d'assumer que l'EPN active est bien exprimée spécifiquement dans les cellules neuronales à partir des vecteurs d'expression que j'ai construits. Ce projet s'est toutefois clos, en ce qui me concerne, suite à la vérification des vecteurs d'expression générés puisque Leissring et al. (2003) ont publié leurs études sur le même sujet entre-temps.

Dans l'élaboration d'un vecteur d'expression pour l'EPN au niveau neuronal, Leissring et al. ont plutôt utilisé le promoteur CaMKII (calcium-calmodulin-dependant kinase II), qui entraîne une expression neuronale retardée dans le développement, promoteur qui permet une augmentation de l'activité EPN par 700%, (souris 8xEPN). Les souris transgéniques surexprimant l'EPN ont été croisées avec des souris modèles pour la MA possédant la mutation KM670/671NL dans APP, la mutation familiale suédoise, et la mutation V717F, la mutation indienne, sous contrôle du promoteur PDGF (Platelet-derived growth factor) qui s'exprime aussi au niveau neuronal. Les souris résultantes de tels croisements affichent une diminution de 90% des niveaux de peptides $A\beta_{X-40/42}$ comparativement aux souris APP_{sué/ind} contrôles. Il semblerait donc que l'EPN possède bel et bien la faculté de diminuer considérablement l'accumulation de plaques amyloïdes lorsque surexprimée dans les cerveaux. Des tests de dégradation du peptide $A\beta$ ont également confirmé que le peptide $A\beta$ est préférentiellement dégradé par l'EPN dans sa forme monomérique. Une diminution des taux de mortalité précoce anormalement élevés chez les souris transgéniques modèles pour la MA, phénomène ayant été observé dans plusieurs lignées de souris modèles pour la MA et non

uniquement pour les souris APP_{sué/ind}, a été remarquée pour les souris 8xEPN/APP_{sué/ind}. Cette mort prématurée peut apparaître à un âge aussi jeune que 3 mois, âge où les plaques amyloïdes ne sont pas encore développées. Il est donc envisageable que les peptides A β exercent aussi leurs effets nocifs sous leurs formes solubles et non uniquement lorsque intégrés dans les plaques séniles. Cela suppose un potentiel toxique du peptide libre qui n'a pas été très bien caractérisé jusqu'à aujourd'hui. L'idée semble se tenir néanmoins, si on considère, comme il semble être de plus en plus suggéré, que le peptide A β serait en fait en équilibre dynamique dans le milieu extracellulaire entre sa forme soluble et sa forme de fibrille insoluble. Un tel équilibre expliquerait la dégradation des plaques amyloïdes alors même que l'EPN préfère dégrader les monomères A β . En plus de la diminution de la mortalité en bas âge, les souris 8xEPN/APP_{sué/ind} donnent également lieu à une diminution de pathologies secondaires associées à la MA, soit la présence d'astrocytes activés dans l'hippocampe et le cortex, ainsi qu'une dystrophie neuritique et la présence de macrophages activés dans l'hippocampe. Donc les travaux présentés prouvent bien que l'EPN peut réellement contribuer à endiguer la formation des plaques séniles caractéristiques de la MA. Cette démonstration claire de l'effet protecteur de l'EPN vis-à-vis le développement des plaques séniles dans les souris ne renseigne toutefois que peu quant au potentiel de régression des dépôts amyloïdes suite à une activité EPN stimulée tardivement, lorsque la maladie est déjà bien développée. Mais, si l'on tient compte de l'équilibre proposé entre le peptide amyloïde dans sa forme soluble monomérique et sa forme insoluble impliquée dans la formation de plaques séniles, alors l'on peut supposer qu'une activation, même tardive, de l'EPN pourrait permettre la régression des plaques de par le déplacement continu de l'équilibre vers le peptide soluble. Cette hypothèse est supportée par les expériences de Marr et al. (2003), où des lentivirus-EPN injectés dans les cerveaux de souris modèles pour la MA âgées entre 11 et 14 mois réduisent de moitié les dépôts amyloïdes. La stimulation de l'expression de l'EPN pour les patients atteints de la MA devient très prometteur même pour les patients dont la maladie est à un stade avancé. Les expériences de Leissring et al. ont aussi démontré qu'il n'était pas absolument nécessaire d'utiliser l'EPN, enzyme dont l'expression fait défaut avec l'âge dans la

MA, pour permettre la dégradation des plaques amyloïdes. Toute peptidase possédant le potentiel de dégrader le peptide A β et exprimée dans les régions du cerveau atteintes par la MA peut enrayer les plaques séniles comme l'ont démontré les souris 2xIDE/APP_{sué/ind} qui permettent aussi la diminution de l'accumulation de plaques amyloïdes. Donc, dans l'élaboration de médicaments ciblant une stimulation de l'expression de peptidases pour le peptide A β , les possibilités offertes s'en trouvent augmentées. Néanmoins, il serait peut-être préférable de s'en tenir à élever l'expression de l'EPN, si possible, considérant qu'elle est la peptidase normalement présente responsable de l'action de dégradation du peptide amyloïde. Une surexpression d'une autre peptidase, tout en ayant un effet similaire quant à la diminution des plaques séniles, pourrait entraîner des effets secondaires encore inconnus.

Les avancées effectuées dans la recherche de peptidases capable d'enrayer les plaques amyloïdes sont d'autant plus importantes que l'un des espoirs de guérison des dernières années, l'immunisation contre le peptide A β , ne semble pas tenir ses promesses. En effet, Chauhan et Siegel (2003) avaient démontré que l'injection d'anticorps contre le peptide A β dans le troisième ventricule de cerveaux de souris Tsg2576, modèle pour l'Alzheimer, âgées de 10 mois entraînait une diminution des plaques amyloïdes. Toutefois, il semblerait que certains résultats prometteurs préalablement publiés sur le sujet aient pu être mal interprétés et suggérer un effet positif de l'immunisation contre le peptide A β alors qu'il n'en était rien. En effet, lorsque observés de manière plus globale, les cerveaux traités avec des anticorps contre le peptide A β démontrent des encéphalites et une infiltration de macrophages activés (Akiyama H. and McGeer P.L 2004). Une réponse inflammatoire sévère pourrait être responsable et suffisante pour entraîner un balayage des plaques amyloïdes. La phagocytose de matériel composant les plaques amyloïdes par les macrophages dans des centres nécrotiques à d'ailleurs déjà été rapportée (Wisniewski et al. 1991). Néanmoins, il serait plutôt ardu de conseiller des séquelles traumatiques au cerveau en tant que traitement préventif contre la MA. Les différents groupes travaillant sur le sujet ne s'accordent d'ailleurs pas sur le rôle de ces chocs graves. Certains prétendent qu'ils peuvent avoir un effet protecteur

contre la MA et d'autres croient que le choc subit est le déclencheur de la MA. Quoiqu'il en soit, l'avenue autrefois prometteuse de l'immunisation contre le peptide A β en tant que traitement contre la MA n'est plus. Peut-être l'élaboration d'anticorps encore plus spécifiques que ne le sont ceux disponibles actuellement pourrait faire la différence et enrayer les pathologies secondaires développées suite à un traitement d'immunisation avec les anticorps disponibles en ce moment. Mais peut-être n'est-ce là que chimère, si l'on considère que le peptide A β est en fait un fragment peptidique de la protéine APP. Cette protéine est également présente dans le cerveau et donc sujet à l'immunisation contre A β . Bien peu est encore connu quant aux rôles que jouent cette protéine et nombre des effets secondaires à l'immunisation sont peut-être imputables à une interférence dans des processus normalement régulés par l'APP.

4.2 Souris invalidées NL1/EPN

Considérant que l'EPN et NL1 ont des patrons d'expression qui se recoupent par endroit, et que leurs souris invalidées font montre, respectivement, de peu de singularité, il semblait intéressant de déterminer si leurs expressions à toutes deux contrôlaient des phénomènes particuliers. Autrement dit : est-ce que la perte d'une des deux peptidases peut être compensée par l'autre ? Le laboratoire étant en possession de souris invalidées en chacune de ces peptidases, la génération de souris doublement invalidées représentait un excellent moyen de déterminer si effectivement ces deux peptidases régulent certains phénomènes physiologiques de manière non exclusive.

Les souris doublement invalidées obtenues ne présentaient aucun phénotype particulier visible. La caractérisation effectuée sur les paramètres de tests de fertilité et courbes de croissance n'a révélée aucun élément notable pour ces souris, si ce n'est que les souris utilisées pour le croisement entre mâle sauvage et femelles doublement invalidées n'a produit que deux souriceaux. Toutefois, ce croisement n'ayant produit qu'une seule portée, cela rend difficile d'en conclure quoique ce soit.

Si la prise de poids normale n'est pas si surprenante, puisque aucune indication préalable ne pointait en ce sens, les résultats relatifs à la fertilité des souris doublement invalidées étaient plus inattendus. Considérant que les souris invalidées NL1 souffrent d'une réduction de la fertilité reliée au mâle (Carpentier et al. 2003), il était attendu que le même phénotype soit présent chez les souris doublement invalidées NL1/EPN, ce qui n'est pas le cas. Les souris ont des taux de fertilité comparables à ceux des souris sauvages C57BL/6, alors que l'on pouvait s'attendre à une fertilité réduite d'au moins 30%, réduction observée chez les souris NL1, ou même davantage, si l'on considère un rôle potentiel de l'EPN dans cette situation.

Deux explications s'offrent à nous en ce cas : soit le fond génétique diversifié des souris doublement invalidées utilisées pour ces expériences est responsable des résultats obtenus, ou alors les effets opposés de NL1 et l'EPN via un ou des peptides indéterminés. Il a déjà été rapporté dans le passé que certaines lignées de souris transgéniques, telles les souris invalidées en *Sprm-1* ou *Smcp* (Pearse 1997, Nayernia 2002), expriment des phénotypes de réduction de la fertilité uniquement dans le fond génétique 129Sv/Ev. Peut-être est-ce ici le cas, peut-être que les souris doublement invalidées utilisées, dans un fond génétique à 50% C57BL/6, 25% 129Sv/Ev et 25% Outbreed, diffèrent quant à leur phénotype de fertilité des souris invalidées NL1, dans le fond génétique 129Sv/Ev, tout simplement du fait que le fond génétique n'est pas le même. Il faudrait conclure à une plus forte pénétrance de la mutation dans le fond génétique 129Sv/Ev comparativement à C57BL/6. L'autre possibilité expliquant une absence de baisse de la fertilité dans les souris doublement invalidées serait une action contradictoire des deux peptidases sur un peptide commun (Voir Figure 4.2a), ou via leur peptide respectif (Voir Figure 4.2b). Dès lors, il deviendrait plus juste de dire que l'effet réducteur de la fertilité observé chez les souris invalidées NL1 est imputable à une expression de l'EPN en absence de NL1, plutôt que d'être dû à NL1 elle-même.

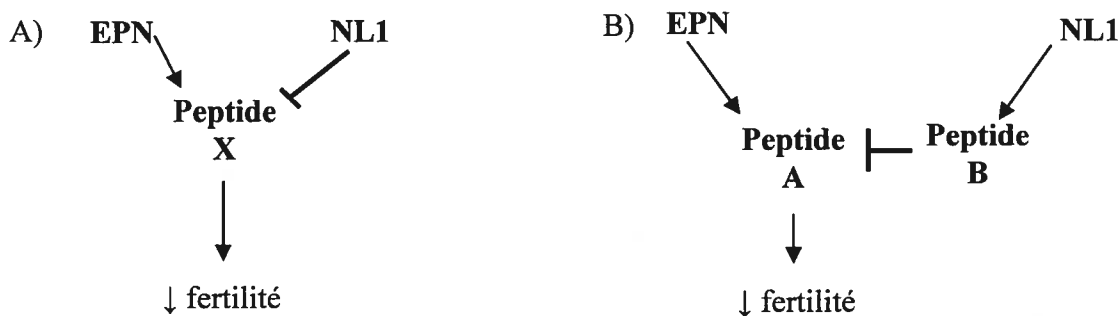


Figure 4.2 – Hypothèses expliquant les effets observés chez les souris invalidées NL1, EPN et NL1/EPN. A) Action stimulante sur le peptide commun X, responsable de la baisse de la fertilité par l’EPN, qui est normalement endiguée par une action inhibitrice forte de NL1. B) Action stimulante de l’EPN sur le peptide A, responsable de la réduction de la fertilité, alors que NL1 est responsable de l’action inhibitrice forte sur le peptide A via un autre peptide, B.

4.3 Conclusion et perspectives

Mes travaux sur les vecteurs de surexpression neuronale de l’EPN, utilisant le fragment de 1800 pb du côté 5’ du promoteur pNSE, ont permis de confirmer les résultats préalablement publiés par Forss-Petter S. et al. (1990) relatifs à la forte expression neuronale d’ADNc sous contrôle du promoteur de l’énolase spécifique aux neurones (pNSE). En ce qui concerne l’avancement des travaux quant à l’EPN en relation avec la MA, mes travaux ont permis de déterminer que l’EPN, exprimée dans ces conditions, dans des cellules neuronales, permet une activité EPN spécifique et forte.

Les études effectuées au cours des dernières années quant à la relation entre l’expression de l’EPN et le développement de la MA ont démontré *in vitro*, en culture cellulaire et par l’utilisation de divers modèles murins, le rôle protecteur de cette peptidase contre la maladie de manière exhaustive et convaincante. Les résultats obtenus sont suffisants pour penser que très prochainement des traitements inspirés de ces expériences pourraient être développés pour l’être humain. La

manière la plus directe serait fort probablement la thérapie génique insérant un certain nombre de copie d'ADNc pour l'EPN permettant de surexprimer celle-ci dans le cerveau des patients atteints. Cette technique n'est malheureusement pas sans inconvénients, tels l'insertion dans un autre gène causant ainsi d'autres problèmes aux patients en plus de la MA, ou tout simplement un transgène à efficacité variable selon le lieu d'insertion dans le génome. Des traitements plus précis et sécuritaires seraient préférables. Idéalement, il faudrait développer des molécules permettant de stimuler fortement et de façon spécifique le promoteur de l'EPN, en plus d'être capables de passer la barrière hémato-encéphalique.

En ce qui concerne mes expériences sur les souris invalidées NL1/EPN, mes résultats ont amorcé leur caractérisation. Beaucoup reste néanmoins à faire. En particulier les expériences de purification de la mutation dans les fonds génétiques C57B/L6 et 129Sv/Ev permettant de vérifier si le phénotype relatif à la réduction de la fertilité est due à une pénétrance préférentielle dans un fond génétique plutôt qu'un autre. Également, il conviendrait de déterminer les spectres de substrats de chacune des deux peptidases dans le testicule et de les superposer, ce qui n'est pas si facile, car si *in vitro* ces peptidases possèdent des listes de substrats assez impressionnantes, il est plus ardu de déterminer ce qu'il en est *in vivo*. Cela permettrait de donner des pistes quant aux peptides candidats pour l'hypothèse d'une action contradictoire de l'EPN et de NL1 pour expliquer mes résultats quant à la fertilité des souris doublement invalidées. Quant à déterminer quel rôle un tel système pourrait avoir dans l'organisme, il serait nécessaire de déterminer l'expression temporelle de NL1 dans le testicule. Les expériences subséquentes seraient déterminées par les résultats obtenus.

BIBLIOGRAPHIE

- Akiyama H. and McGeer P.L. (2004) Specificity of mechanisms for plaque removal after A beta immunotherapy for Alzheimer disease. *Nat.Med.* **10**, 117-118.
- Apelt J.; Ach K. and Schliebs R. (2003) Aging-related down-regulation of neprilysin, a putative beta-amyloid-degrading enzyme, in transgenic Tg2576 Alzheimer-like mouse brain is accompanied by an astroglial upregulation in the vicinity of beta-amyloid plaques. *Neurosci.Lett.* **339**, 183-186.
- Asai M.; Hattori C.; Szabo B.; Sasagawa N.; Maruyama K.; Tanuma S. and Ishiura S. (2003) Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **301**, 231-235.
- Back S.A. & Gorenstein C. (1989a) Fluorescent histochemical localization of neutral endopeptidase-24.11 (enkephalinase) in the rat spinal cord. *J.Comp.Neurol.* **280**, 436-450.
- Back, S.A. & Gorenstein C. (1989b) Histochemical visualization of neutral endopeptidase-24.11 (enkephalinase) activity in rat brain: cellular localization and codistribution with enkephalins in the globus pallidus. *J.Neurosci.* **9**, 4439-4455.
- Back, S.A. & Gorenstein C. (1990) Localization of neutral endopeptidase-21.11 (enkephalinase) to n-methyl-d-aspartate sensitive cell populations in the rat forebrain. *Prog.Clin.Biol.Res.* **328**, 199-202.
- Back, S.A. & Gorenstein, C. (1994) Differential response of neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase), and cholinergic and opioidergic markers to hypoglossal axotomy. *J.Comp.Neurol.* **340**, 149-160.
- Barnes K.; Turner A.J. and Kenny A.J. (1993a) Co-localisation of substance P and endopeptidase-24.11 in pig substantia nigra: an ultrastructural study. *Biochem.Soc.Trans.* **21** (Pt 3), 246S.
- Barnes K.; Turner A.J. and Kenny A.J. (1993b) An immunoelectron microscopic study of pig substantia nigra shows co-localization of endopeptidase-24.11 with substance P. *Neuroscience.* **53**, 1073-82.

- Beaumont A.; Brouet J.C. and Roques B.P. (1989) Neutral endopeptidase 24.11 and angiotensin converting enzyme like activity in CALLA positive and CALLA negative lymphoid cells. *Biochem.Biophys.Res. Commun.* **160**, 1323-1329.
- Beaumont A.; Le Moual H.; Boileau G.; Crine P. and Roques B.P. (1991) Evidence that both arginine 102 and arginine 747 are involved in substrate binding to neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11). *J.Biol.Chem.* **266**, 214-220.
- Biochem.J.* **373**(Pt 1):271-279.
- Borson , D.B. (1991) Roles of neutral endopeptidase in airways. *Am.J.Physiol.* **260**, L212-L225.
- Bourne A. & Kenny A.J. (1990) The hydrolysis of brain and atrial natriuretic peptides by porcine choroid plexus is attributable to endopeptidase-24.11. *Biochem.J.* **271**, 381-385.
- Buchman A.R. & Berg P. (1988) Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression. *Mol.Cell.Biol.* **8**, 4395-4405.
- Bunnett N.W.; Debas H.T.; Turner A.J.; Kobayashi R. and Walsh J.H. (1988) Metabolism of gastrin and cholecystokinin by endopeptidase 24.11 from the pig stomach. *Am.J.Physiol.* **255**(5 Pt 1), G676-684.
- Bunnett N.W.; Orloff M.S. and Turner A.J. (1985) Catabolism of substance P in the stomach wall of the rat. *Life Sci.* **37**, 599-606.
- Bunnett N.W.; Turner A.J.; Hryszko J.; Kobayashi R. and Walsh J.H. (1988) Isolation of endopeptidase-24.11 (EC 3.4.24.11, "enkephalinase") from the pig stomach. Hydrolysis of substance P, gastrin-releasing peptide 10, [Leu5] enkephalin, and [Met5] enkephalin. *Gastroenterology.* **95**, 952-957.
- Carpentier M.; Marcinkiewicz M.; Boileau G. and DesGroseillers L. (2003) The neuropeptide-degrading enzyme NL1 is expressed in specific neurons of mouse brain. *Peptides.* **24**, 1083-1091.
- Carpentier M.; Robitaille Y.; DesGroseillers L.; Boileau G. and Marcinkiewicz M. (2002) Declining expression of neprilysin in Alzheimer disease vasculature: possible

- involvement in cerebral amyloid angiopathy. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* **61**, 849-856.
- Carretero O.A. & Scicli A.G. (1991) Local hormonal factors (intracrine, autocrine, and paracrine) in hypertension. *Hypertension.* **18**,(3 Suppl):I58-69.
- Chauhan N.B. and Siegel G.J. (2003) Intracerebroventricular passive immunization with anti-Abeta antibody in Tg2576. *J.Neurosci.Res.* **74**, 142-147.
- Chen C.Y.; Salles G.; Seldin M.F.; Kister A.E.; Reinherz E.L. and Shipp M.A. (1992) Murine common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10 neutral endopeptidase 24.11). Molecular characterization, chromosomal localization, and modeling of the active site. *J.Immunol.* **148**, 2817-2825.
- Connelly, J.C.; Skidgel, R.A.; Schulz, W.W.; Johnson, A.R. and Erdos, E.G. (1985) Neutral endopeptidase 24.11 in human neutrophils: cleavage of chemotactic peptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **82**, 8737-8741.
- Corvol, P. and Williams, T.A. (1997) Biochemical and molecular aspects of angiotensin I-converting enzyme. *Cell-surface peptidases in health and disease* (Kenny, A.J. and Boustread, C.M. eds) pp.99-117, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK.
- Coupar I.M. (1987) Opioid action of the intestine: the importance of the intestinal mucosa. *Life Sci.* **41**, 917-925.
- Devault A.; Lazure C.; Nault C.; Le Moual H.; Seidah N.G.; Chretien M.; Kahn P.; Powell J.; Mallet J.; Beaumont A. et al. (1987) Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) deduced from a complementary DNA. *EMBO J.* **6**, 1317-1322.
- Devault A.; Sales V.; Nault C.; Beaumont A.; Roques B.; Crine P. and Boileau G. (1988) Exploration of the catalytic site of endopeptidase 24.11 by site-directed mutagenesis. Histidine residues 583 and 587 are essential for catalysis. *FEBS Lett.* **231**, 54-58.
- Dion N.; Le Moual H.; Fournie-Zaluski M.C.; Roques B.P.; Crine P. and Boileau G. (1995) Evidence that Asn542 of neprilysin (EC 3.4.24.11) is involved in binding of the P2' residue of substrates and inhibitors. *Biochem.J.* **311** (Pt 2), 623-627.

- Donoviel D.B.; Hadjantonakis A.K.; Ikeda M.; Zheng H.; Hyslop P.S. and Bernstein A. (1999) Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. *Genes Dev.* **13**, 2801-2810.
- Eckman E.A.; Watson M.; Marlow L.; Sambamurti K. and Eckman C.B. (2003) Alzheimer's disease beta-amyloid peptide is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme. *J.Biol.Chem.* **278**, 2081-2084.
- Erdos E.G. (1990) Some old and some new ideas on kinin metabolism. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **15** Suppl 6, S20-24.
- Farris W.; Mansourian S.; Chang Y.; Lindsley L.; Eckman E.A.; Frosch M.P.; Eckman C.B.; Tanzi R.E.; Selkoe D.J. and Guenette S. (2003) Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **100**, 4162-4167.
- Feng R.; Wang H.; Wang J.; Shrom D.; Zeng X. and Tsien J.Z. (2004) Forebrain degeneration and ventricle enlargement caused by double knockout of Alzheimer's presenilin-1 and presenilin-2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **101**, 8162-8167.
- Fischer H.S.; Zernig G.; Hauser K.F.; Gerard C.; Hersh L.B. and Saria A. (2002) Neutral endopeptidase knockout induces hyperalgesia in a model of visceral pain, an effect related to bradykinin and nitric oxide. *J.Mol.Neurosci.* **18**, 129-134.
- Forss-Petter S.; Danielson P.E.; Catsicas S.; Battenberg E.; Price J.; Nerenberg M. and Sutcliffe J.G. (1990) Transgenic mice expressing beta-galactosidase in mature neurons under neuron-specific enolase promoter control. *Neuron.* **5**, 187-197.
- Frautschy S.A.; Yang F.; Irizarry M.; Hyman B.; Saido T.C. Hsiao K. and Cole G.M. (1998) Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am.J.Pathol.* **152**, 307-317.
- Freedland S.J.; Seligson D.B.; Liu A.Y.; Pantuck A.J.; Paik S.H.; Horvath S.; Wieder J.A.; Zisman A.; Nguyen D.; Tso C.L.; Palotie A.V. and Belldegrun A.S. (2003) Loss of CD10 (neutral endopeptidase) is a frequent and early event in human prostate cancer. *Prostate.* **55**, 71-80.

- Gandy S. & Petanceska S. (2001) Regulation of alzheimer beta-amyloid precursor trafficking and metabolism. *Adv.Exp.Med.Biol.* **487**, 85-100.
- Gaudoux F, Boileau G, Crine P. (1993) Localization of neprilysin (EC 3.4.24.11) mRNA in rat brain by in situ hybridization. *J.Neurosci.Res* **34**, 426-433.
- Ghaddar G.; Ruchon A.F.; Carpentier M.; Marcinkiewicz M.; Seidah N.G.; Crine P.; Desgroseillers L. and Boileau G. (2000) Molecular cloning and biochemical characterization of a new mouse testis soluble-zinc-metallopeptidase of the neprilysin family. *Biochem.J.* **347**, 419-429.
- Greaves M.F. (1975) Proceedings: Surface antigens of leukaemic cells. *Br.J.Cancer.* **32**, 280-281.
- Greaves M.F.; Hariri G.; Newman R.A.; Sutherland D.R.; Ritter M.A. and Ritz J. (1983) Selective expression of the common acute lymphoblastic leukemia (gp 100) antigen on immature lymphoid cells and their malignant counterparts. *Blood.* **61**, 628-639.
- Gros C.; Souque A. and Schwartz J.C. (1990) Degradation of atrial natriuretic factor in mouse blood in vitro and in vivo: role of enkephalinase (EC 3.4.24.11). *Neuropeptides.* **17**, 1-5.
- Gros, C.; Souque, A.; Schwartz, J.C.; Duchier, J.; Cornot, A.; Baumer, P. and Lecomte, J.M. (1989) Protection of atrial natriuretic factor against degradation : diuretic and natriuretic responses after in vivo inhibition of enkephalinase (EC 3.4.24.22) by acetorphan. *Prot.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 7580-7584.
- Guerin S.; Mari B.; Fernandez E.; Belhacene N.; Toribio M.L. and Auberger P. (1997) CD10 is expressed on human thymic epithelial cell lines and modulates thymopentin-induced cell proliferation. *FASEB J.* **11**, 1003-1011.
- Hartmann T. (1999) Intracellular biology of Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Eur.Arch.Psychiatry.Clin.Neurosci.* **249**, 291-298.
- Hilton M.; Middleton G. and Davies A.M. (1997) Bcl-2 influences axonal growth rate in embryonic sensory neurons. *Curr.Biol.* **7**, 798-800.

- Hogan B.; Costantini F. and Lacy E. (1986) Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, p296.
- Holcomb L.; Gordon M.N.; McGowan E.; Yu X.; Benkovic S.; Jantzen P.; Wright K.; Saad I.; Mueller R.; Morgan D.; Sanders S.; Zehr C.; O'Campo K.; Hardy J.; Prada C.M.; Eckman C.; Younkin S.; Hsiao K. and Duff K. (1998) Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med.* **4**, 97-100.
- Howell S.; Nalbantoglu J. and Crine P. (1995) Neutral Endopeptidase Can Hydrolyze β -Amyloid(1-40) But Shows No Effect on β -Amyloid Precursor Protein Metabolism. *Peptides* **16**, 647-652 .
- Hu J.; Igarashi A.; Kamata M. and Nakagawa H. (2001) Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity. *J.Biol.Chem.* **276**, 47863-47868.
- Inoue A.; Yanagisawa M.; Kimura S.; Kasuya Y.; Miyauchi T.; Goto K. and Masaki T. (1989) The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **86**, 2863-2867.
- Iwata N.; Takaki Y.; Fukami S.; Tsubuki S. and Saido TC. (2002) Region-specific reduction of A beta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging. *J.Neurosci.Res.* **70**, 493-500.
- Iwata N.; Tsubuki S.; Takaki Y.; Watanabe K.; Sekiguchi M.; Hosoki E.; Kawashima-Morishima M.; Lee H.J.; Hama E.; Sekine-Aizawa Y. and Saido T.C. (2000) Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat.Med.* **6**, 143-150.
- Jackson D.G. & Hersh L.B. (1986) Reaction of neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) with arginine reagents. *J.Biol.Chem.* **261**, 8649-8654.

- Janus C.; Chishti M.A. and Westaway D. (2000) Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Biochim.Biophys.Acta.* **1502**, 63-75.
- Jongeneel C.V.; Bouvier J.; Bairoch A. (1989) A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases. *FEBS Lett* **242**, 211-214.
- Jordan M. & Wurm F. (2004) Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. *Methods.* **33**, 136-143.
- Kenny A.J.; Fulcher I.S.; McGill K.A. and Kershaw D. (1983) Proteins of the kidney microvillar membrane. Reconstitution of endopeptidase in liposomes shows that it is a short-stalked protein. *Biochem.J.* **211**, 755-762.
- Kerr M.A. & Kenny A.J. (1974a) The molecular weight and properties of a neutral metallo-endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem.J.* **137**, 489-495.
- Kerr MA, Kenny AJ. (1974b) The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem.J.* **137**, 477-488.
- Khan A.R. & James M.N. (1998) Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein.Sci.* **7**, 815-836.
- Kioussi C. & Matsas R. (1991) Endopeptidase-24.11, a cell-surface peptidase of central nervous system neurons, is expressed by Schwann cells in the pig peripheral nervous system. *J.Neurochem.* **57**, 431-440.
- Kioussi C.; Crine P. and Matsas R. (1992) Endopeptidase-24.11 is suppressed in myelin-forming but not in non-myelin-forming Schwann cells during development of the rat sciatic nerve. *Neuroscience.* **50**, 69-83.
- Kirkwood K.S.; Bunnett N.W.; Maa J.; Castagliolo I.; Liu B.; Gerard N.; Zacks J.; Pothoulakis C. & Grady E.F. (2001) Deletion of neutral endopeptidase exacerbates intestinal inflammation induced by *Clostridium difficile* toxin A. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver.Physiol.* **281**, G544-551.
- Koehne P.; Schaper C.; Graf K. and Kunkel G. (1998) Neutral endopeptidase 24.11: its physiologic and possibly pathophysiologic role in inflammation with special effect on respiratory inflammation. *Allergy.* **53**, 1023-1042.

- Kohan D.E. (1991) Endothelin synthesis by rabbit renal tubule cells. *Am.J.Physiol.* **261**, F221-226.
- Kurihara Y.; Kurihara H.; Oda H.; Maemura K.; Nagai R.; Ishikawa T. and Yazaki Y. (1995) Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1. *J.Clin.Invest.* **96**, 293-300.
- Lafrance M.H.; Vezina C.; Wang Q.; Boileau G.; Crine P. and Lemay G. (1994) Role of glycosylation in transport and enzymic activity of neutral endopeptidase-24.11. *Biochem.J.* **302**,(Pt 2) 451-454.
- Le Moual H.; Devault A.; Roques B.P.; Crine P. and Boileau G. (1991) Identification of glutamic acid 646 as a zinc-coordinating residue in endopeptidase-24.11. *J.Biol.Chem.* **266**, 15670-15674.
- Le Moual H.; Dion N.; Roques B.P.; Crine P. and Boileau G. (1994) Asp650 is crucial for catalytic activity of neutral endopeptidase 24-11. *Eur.J.Biochem.* **221**, 475-480.
- LeBien TW. (1989) Growing human B-cell precursors in vitro: the continuing challenge. *Immunol.Today.* **10**, 296-298.
- Leissring M.A.; Farris W. Chang A.Y.; Walsh D.M.; Wu X.; Sun X.; Frosch M.P. and Selkoe D.J. (2003) Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron.* **40**, 1087-1093.
- Li C.; Booze R.M. and Hersh L.B. (1995) Tissue-specific expression of rat neutral endopeptidase (neprilysin) mRNAs. *J.Biol.Chem.* **270**, 5723-5728.
- Lipman M.L.; Panda D.; Bennett H.P.; Henderson J.E.; Shane E.; Shen Y.; Goltzman D. and Karaplis A.C. (1998) Cloning of human PEX cDNA. Expression, subcellular localization, and endopeptidase activity. *J.Biol.Chem.* **273**, 13729-13737.

- Liu H.S.; Jan M.S.; Chou C.K.; Chen P.H.; Ke N.J. (1999) Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **260**, 712-717.
- Llorens C.; Gacel G.; Swerts J.P.; Perdrisot R.; Fournie-Zaluski M.C.; Schwartz J.C. and Roques B.P. (1980) Rational design of enkephalinase inhibitors: substrate specificity of enkephalinase studied from inhibitory potency of various dipeptides. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **96**, 1710-1716.
- Llorens-Cortes C, Huang H, Vicart P, Gasc JM, Paulin D, Corvol P. (1992) Identification and characterization of neutral endopeptidase in endothelial cells from venous or arterial origins. *J.Biol.Chem.* **267**, 14012-14018.
- Lu B.; Figini M.; Emanuelli C.; Geppetti P.; Grady E.F.; Gerard N.P.; Ansell J.; Payan D.G.; Gerard C. and Bunnett N. (1997) The control of microvascular permeability and blood pressure by neutral endopeptidase. *Nat.Med.* **3**, 904-907.
- Lu B.; Gerard N.P.; Kolakowski L.F. Jr.; Bozza M.; Zurakowski D.; Finco O.; Carroll M.C. and Gerard C. (1995) Neutral endopeptidase modulation of septic shock. *J.Exp.Med.* **181**, 2271-2275.
- Malfroy B, Schofield PR, Kuang WJ, Seeburg PH, Mason AJ, Henzel WJ. (1987) Molecular cloning and amino acid sequence of rat enkephalinase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1987 Apr 14;144(1):59-66.
- Malfroy B, Schwartz JC. (1982) Purification and substrate specificity of rat kidney "enkephalinase". *Life Sci.* **31**, 1745-1748.
- Malfroy B.; Kuang W.J.; Seeburg P.H.; Mason A.J. and Schofield P.R. (1988) Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). *FEBS Lett.* **229**, 206-210.
- Marcais-Collado H.; Uchida G.; Costentin J.; Schwartz J.C. and Lecomte J.M. (1987) Naloxone-reversible antidiarrheal effects of enkephalinase inhibitors. *Eur.J.Pharmacol.* **144**, 125-132.
- Marcel D.; Pollard H.; Verroust P.; Schwartz J.C. and Beaudet A. (1990) Electron microscopic localization of immunoreactive enkephalinase (EC 3.4.24.11) in the neostriatum of the rat. *J.Neurosci.* **10**, 2804-2817.

- Mari B.; Breittmayer J.P.; Guerin S.; Belhacene N.; Peyron J.F.; Deckert M.; Rossi B. and Auberger P. (1994) High levels of functional endopeptidase 24.11 (CD10) activity on human thymocytes: preferential expression on immature subsets. *Immunology*. **82**, 433-438.
- Mari B.; Checler F.; Ponzio G.; Peyron J.F.; Manie S.; Farahifar D.; Rossi B. and Auberger P. (1992) Jurkat T cells express a functional neutral endopeptidase activity (CALLA) involved in T cell activation. *EMBO J.* **11**, 3875-3885.
- Marie-Claire C, Ruffet E, Antonczak S, Beaumont A, O'Donohue M, Roques BP, Fournie-Zaluski MC. (1997) Evidence by site-directed mutagenesis that arginine 203 of thermolysin and arginine 717 of neprilysin (neutral endopeptidase) play equivalent critical roles in substrate hydrolysis and inhibitor binding. *Biochemistry*. **36**, 13938-13945.
- Marr R.A.; Rockenstein E.; Mukherjee A.; Kindy M.S.; Hersh L.B.; Gage F.H.; Verma I.M. and Masliah E. (2003) Neprilysin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice. *J.Neurosci.* **23**, 1992-1996.
- Martinou J.C.; Dubois-Dauphin M.; Staple J.K.; Rodriguez I.; Frankowski H.; Missotten M.; Albertini P.; Talabot D.; Catsicas S.; Pietra C.; et al. (1994) Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron*. **13**, 1017-1030.
- Matsas R.; Fulcher I.S.; Kenny A.J. and Turner A.J. (1983) Substance P and [Leu]enkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **80**, 3111-3115.
- Matsas R.; Kenny A.J. and Turner A.J. (1986) An immunohistochemical study of endopeptidase-24.11 ("enkephalinase") in the pig nervous system. *Neuroscience*. **18**, 991-1012.
- Matthews B.W. (1998) Structural basis of the action of thermolysin and related zinc metallopeptidases. *Acc.Chem.Res.* **21**, 333-340.

- Mauborgne A.; Bourgoin S.; Benoliel J.J.; Hirsch M.; Berthier J.L.; Hamon M. and Cesselin F. (1987) Enkephalinase is involved in the degradation of endogenous substance P released from slices of rat substantia nigra. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **243**, 674-680.
- Mayer G, Boileau G, Bendayan M. (2004) Sorting of furin in polarized epithelial and endothelial cells: expression beyond the Golgi apparatus. *J.Histochem.Cytochem.* **52**, 567-579.
- Mbikay M.; Tadros H.; Ishida N.; Lerner C.P.; De Lamirande E.; Chen A.; El-Alfy M.; Clermont Y.; Seidah N.G.; Chretien M.; Gagnon C. and Simpson E.M. (1997) Impaired fertility in mice deficient for the testicular germ-cell protease PC4. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 6842-6846.
- Mizuno K.; & Marsuo H. (1994) Processing of peptide hormone precursors, in The Pituitary Gland, 2nd edition edn, Raven Press, Ltd, book chapter 7, pp153-178.
- Monsees T.K.; Miska W. and Schill W.B. (1996) Characterization of kininases in testicular cells. *Immunopharmacology.* **32**, 169-171.
- Monsees T.K.; Miska W.; Blocher S.; Schill W.B.; Winkler A. and Siems W.E. (1999) Elements of the kallikrein-kinin system are present in rat seminiferous epithelium. *Immunopharmacology.* **45**, 107-114.
- Nadel J.A. (1990) Decreased neutral endopeptidases: possible role in inflammatory diseases of airways. *Lung.* **168**, Suppl:123-127.
- Nadel J.A. (1991) Neutral endopeptidase modulates neurogenic inflammation. *Eur.Respir.J.* **4**, 745-754.
- Nadel J.A. (1992) Regulation of neurogenic inflammation by neutral endopeptidase. *Am.Rev.Respir.Dis.* **145**(2 Pt 2),S48-52.
- Nau R.; Schafer G. and Conlon J.M. (1985) Proteolytic inactivation of substance P in the epithelial layer of the intestine. *Biochem.Pharmacol.* **34**, 4019-4023.
- Nawrot B. (2004) Targeting BACE with small inhibitory nucleic acids - a future for Alzheimer's disease therapy? *Acta.Biochim.Pol.* **51**, 431-444.

- Nayernia K.; Adham I.M.; Burkhardt-Gottges E.; Neesen J.; Rieche M.; Wolf S.; Sancken U.; Kleene K. and Engel W. (2002) Asthenozoospermia in mice with targeted deletion of the sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein (Smcp) gene. *Mol.Cell.Biol.* **22**, 3046-3052.
- Octave J.N. (1995) The amyloid peptide precursor in Alzheimer's disease. *Acta.Neurol.Belg.* **95**, 197-209.
- Oefner C.; D'Arcy A.; Hennig M.; Winkler F.K. and Dale G.E. (2000) Structure of human neutral endopeptidase (Neprilysin) complexed with phosphoramidon. *J.Mol.Biol.* **296**,341-349.
- Painter R.G.; Dukes R.; Sullivan J.; Carter R.; Erdos E.G. and Johnson A.R. (1988) Function of neutral endopeptidase on the cell membrane of human neutrophils. *J.Biol.Chem.* **263**, 9456-9461.
- Papandreou C.N.; Usmani B.; Geng Y.; Bogenrieder T.; Freeman R.; Wilk S.; Finstad C.L.; Reuter V.E.; Powell C.T.; Scheinberg D.; Magill C.; Scher H.I.; Albino A.P. and Nanus D.M. (1998) Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nat.Med.* **4**, 50-57.
- Pearse R.V. 2nd; Drolet D.W.; Kalla K.A.; Hooshmand F.; Bermingham J.R. Jr. and Rosenfeld M.G. (1997) Reduced fertility in mice deficient for the POU protein sperm-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 7555-7560.
- Petitclerc D.; Attal J.; Theron M.C.; Bearzotti M.; Bolifraud P.; Kann G.; Stinnakre M.G.; Pointu H.; Puissant C. and Houdebine L.M. (1995) The effect of various introns and transcription terminators on the efficiency of expression vectors in various cultured cell lines and in the mammary gland of transgenic mice.. *J.Biotechnol.* **40**, 169-178.
- Pollard H.; Bouthenet M.L.; Moreau J.; Souil E.; Verroust P.; Ronco P. and Schwartz J.C. (1989) Detailed immunautoradiographic mapping of enkephalinase (EC 3.4.24.11) in rat central nervous system: comparison with enkephalins and substance P. *Neuroscience.* **30**,339-376.

- Pozsgay M.; Michaud C.; Liebman M. and Orłowski M. (1986) Substrate and inhibitor studies of thermolysin-like neutral metalloendopeptidase from kidney membrane fractions. Comparison with bacterial thermolysin. *Biochemistry*. **25**, 1292-1299.
- Price D.L. & Sisodia S.S. (1998) Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu.Rev.Neurosci.* **21**, 479-505.
- Raharjo S.B.; Emoto N.; Ikeda K.; Sato R.; Yokoyama M. and Matsuo M. (2001) Alternative splicing regulates the endoplasmic reticulum localization or secretion of soluble secreted endopeptidase. *J.Biol.Chem.* **276**, 25612-25620.
- Richards A.M.; Crozier I.G.; Kosoglou T.; Rallings M.; Espiner E.A.; Nicholls M.G.; Yandle T.G.; Ikram H. and Frampton C. (1993) Endopeptidase 24.11 inhibition by SCH 42495 in essential hypertension. *Hypertension*. **22**, 119-126.
- Roques B.P. (1998) Cell surface metallopeptidases involved in blood pressure regulation: structure, inhibition and clinical perspectives. *Pathol.Biol.(Paris)* **46**, 191-200.
- Roques B.P.; Noble F.; Dauge V.; Fournie-Zaluski M.C. and Beaumont A. (1993) Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol.Rev.* **45**, 87-146.
- Schang J.C.; Hemond M.; Hebert M. and Pilote M. (1986) How does morphine work on colonic motility? An electromyographic study in the human left and sigmoid colon. *Life Sci.* **38**, 671-676.
- Seidah N.G.; Day R.; Marcinkiewicz M. and Chretien M. (1998) Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **839**, 9-24.
- Shirotani K.; Tsubuki S.; Iwata N.; Takaki Y.; Harigaya W.; Maruyama K.; Kiryu-Seo S.; Kiyama H.; Iwata H.; Tomita T.; Iwatsubo T. and Saido T.C. (2001) Neprilysin degrades both amyloid beta peptides 1-40 and 1-42 most rapidly and efficiently among thiorphan- and phosphoramidon-sensitive endopeptidases. *J.Biol.Chem.* **276**, 21895-21901.

- Siems W.E.; Maul B.; Wiesner B.; Becker M.; Walther T.; Rothe L. and Winkler A. (2003) Effects of kinins on mammalian spermatozoa and the impact of peptidolytic enzymes. *Andrologia*. **35**, 44-54.
- Snyder S.H. (1985) The molecular basis of communication between cells. *Sci.Am.* **253**, 132-141.
- Soleilhac J.M.; Lucas E.; Beaumont A.; Turcaud S.; Michel J.B.; Ficheux D.; Fournie-Zaluski M.C. and Roques B.P. (1992) A 94-kDa protein, identified as neutral endopeptidase-24.11, can inactivate atrial natriuretic peptide in the vascular endothelium. *Mol.Pharmacol.* **41**, 609-614.
- Sonnenberg J.L.; Sakane Y.; Jeng A.Y.; Koehn J.A.; Ansell J.A.; Wennogle L.P. and Ghai R.D. (1988) Identification of protease 3.4.24.11 as the major atrial natriuretic factor degrading enzyme in the rat kidney. *Peptides*. **9**, 173-180.
- Steiner H.; Capell A.; Leimer U. and Haass C. (1999) Genes and mechanisms involved in beta-amyloid generation and Alzheimer's disease. *Eur.Arch.Psychiatry.Clin.Neurosci.* **249**, 266-270.
- Sumitomo M.; Iwase A.; Zheng R.; Navarro D.; Kaminetzky D.; Shen R.; Georgescu M.M. and Nanus D.M. (2004) Synergy in tumor suppression by direct interaction of neutral endopeptidase with PTEN. *Cancer.Cell.* **5**, 67-78.
- Sumitomo M.; Shen R.; Walburg M.; Dai J.; Geng Y.; Navarro D.; Boileau G.; Papandreou C.N.; Giancotti F.G.; Knudsen B. and Nanus D.M. (2000) Neutral endopeptidase inhibits prostate cancer cell migration by blocking focal adhesion kinase signaling. *J.Clin.Invest.* **106**, 1399-1407.
- Takaki Y.; Iwata N.; Tsubuki S.; Taniguchi S.; Toyoshima S.; Lu B.; Gerard N.P.; Gerard C.; Lee H.J.; Shirotani K. and Saido T.C. (2000) Biochemical identification of the neutral endopeptidase family member responsible for the catabolism of amyloid beta peptide in the brain. *J.Biochem.* **128**, 897-902.
- Tam L.T.; Engelbrecht S.; Talent J.M.; Gracy R.W. and Erdos E.G. (1985) The importance of disulfide bridges in human endopeptidase (enkephalinase) after proteolytic cleavage. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **133**, 1187-1192.

- Thinakaran G. (1999) The role of presenilins in Alzheimer's disease. *J.Clin.Invest.* **104**, 1321-1327.
- Torii S.; Yamagishi T.; Murakami K. and Nakayama K. (1993) Localization of Kex2-like processing endoproteases, furin and PC4, within mouse testis by in situ hybridization. *FEBS.Lett.* **316**, 12-16.
- Tran-Paterson R.; Boileau G.; Giguere V. and Letarte M. (1990) Comparative levels of CALLA/neutral endopeptidase on normal granulocytes, leukemic cells, and transfected COS-1 cells. *Blood* **76**, 775-782.
- Turner A.J. & Tanzawa K. (1997) Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J.* **11**, 355-364.
- Twyman R.M & Jones E.A. (1997) Sequences in the proximal 5' flanking region of the rat neuron-specific enolase (NSE) gene are sufficient for cell type-specific reporter gene expression. *J.Mol.Neurosc.* **8**, 63-73.
- Vekrellis K.; Ye Z.; Qiu W.Q.; Walsh D.; Hartley D.; Chesneau V.; Rosner M.R. and Selkoe D.J. (2000) Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *J.Neurosci.* **20**, 1657-1665.
- Vlahovic P. & Stefanovic V. (1998) Kidney ectopeptidases. Structure, functions and clinical significance. *Pathol.Biol.(Paris)* **46**, 779-786.
- Waksman G.; Hamel E.; Bouboutou R.; Besselievre R.; Fournie-Zaluski M.C. and Roques B.P. (1984) [Regional distribution of enkephalinase in the rat brain by autoradiography]. *C.R.Acad.Sci.III.* **299**, 613-615.
- Waksman G.; Hamel E.; Delay-Goyet P. and Roques B.P. (1986) Neuronal localization of the neutral endopeptidase 'enkephalinase' in rat brain revealed by lesions and autoradiography. *EMBO J.* **5**, 3163-3166.
- Wilkins M.R. (1993) Clinical potential of endopeptidase-24.11 inhibitors in cardiovascular disease. *Biochem.Soc.Trans.* **21**(Pt 3), 673-678.

- Wilkins M.R.; Unwin R.J. and Kenny A.J. (1993) Endopeptidase-24.11 and its inhibitors: potential therapeutic agents for edematous disorders and hypertension. *Kidney.Int.* **43**, 273-285.
- Wisniewski H.M.; Barcikowska M. and Kida E. (1991) Phagocytosis of beta/A4 amyloid fibrils of the neuritic neocortical plaques. *Acta.Neuropathol.* **81**, 588-590.
- Yanagisawa H.; Yanagisawa M.; Kapur R.P.; Richardson J.A.; Williams S.C.; Clouthier D.E.; de Wit D.; Emoto N. and Hammer R.E. (1998) Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development.* **125**, 825-836.
- Yankner B.A. (1996) Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron.* **16**, 921-932.