

Université de Montréal

**L'implication des convertases de pro-protéines dans la maturation de
nouveaux substrats membranaires aux motifs de clivage atypiques**

par
Éric Bergeron

Département de biochimie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph. D.)
en biochimie

Juillet, 2005

© Éric Bergeron, 2005



W
4
U58
2005
V.184

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**L'implication des convertases de pro-protéines dans la maturation de
nouveaux substrats membranaires aux motifs de clivage atypiques**

présentée par :
Éric Bergeron

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Guy Boileau, président-rapporteur
Nabil G. Seidah, directeur de recherche
Pierre Talbot, membre du jury
Jean-Claude Lissitzky, examinateur externe
Guy Boileau, représentant du doyen de la FES

Résumé

Les convertases de pro-protéines (PCs) sont des protéases à sérine homologues à la subtilisine bactérienne. Ces protéases génèrent une panoplie de protéines bioactives dans la voie sécrétoire à partir de précurseurs polypeptidiques comme des hormones, des récepteurs, des glycoprotéines virales et des molécules d'adhésion. Les PCs spécifiques aux acides aminés basiques (sous-famille Kexine) clivent des liens peptidiques en aval de résidus basiques. Les résidus basiques en amont du lien peptidique scissile sont des déterminants critiques de la spécificité des PCs. Par exemple, la furine, le membre de la famille le plus étudié, requiert une Arg en P1 (P1= résidu en amont du lien scissile) et typiquement une Arg en P4 (RXXR↓, où X= n'importe quel acide aminé excepté une cystéine). Donc, l'absence de résidu basique en P1 ou P4 rend habituellement les précurseurs résistants à l'activité de la furine.

Afin de mieux comprendre la spécificité des PCs pour les résidus en amont du P1, nous avons tenté d'identifier des glycoprotéines potentiellement clivées par les PCs de la voie sécrétoire constitutive sans Arg en P4 (substrats atypiques). Nous décrivons premièrement, la protéolyse spécifique de l'intégrine $\alpha 4$, une molécule d'adhésion, par deux PCs, PC5A et la furine, à un site de clivage atypique (HVISKR↓). Les intégrines sont des glycoprotéines hétérodimériques (sous unité α et β) impliquées dans l'adhésion, la migration et la signalisation cellulaire. Des expériences en culture cellulaire avec des inhibiteurs spécifiques des PCs et les transfections stables des ADNc codant pour PC5A et la furine suggèrent que ces PCs sont les convertases de l'intégrine $\alpha 4$. Les digestions *in vitro* de peptides fluorogéniques mimant le motif de clivage de cette intégrine avec PC5A et la furine à différents pH physiologiques démontrent que la furine clive préférentiellement le motif atypique de l'intégrine $\alpha 4$ en conditions acides. Par contre, le clivage par PC5A est plus efficace à pH neutre. La mutagenèse dirigée et l'analyse du marquage métabolique de l' $\alpha 4$ en présence du chlorure d'ammonium, une base faible augmentant le pH vésiculaire, confirme le rôle clé d'un résidu chargé positivement en P6 pour la maturation efficace de

l' α 4. Donc, nous proposons que l'état de protonation de l'His en P6 régule le clivage de l' α 4 selon le pH. La dépendance au pH de ce clivage limiterait la maturation de ce substrat par la furine aux lumières acides des vésicules du réseau *trans*-golgien et des endosomes mais pas à l'environnement neutre de la surface cellulaire. De plus, nous démontrons que ce clivage dépendant des PCs n'affecte pas l'adhésion *in vitro* de cette intégrine à son récepteur cellulaire, le *vascular cellular adhesion molecule-1* (VCAM-1).

Nous avons ensuite étendu nos recherches à d'autres substrats contenant des motifs de clivage potentiellement atypique. Suite au séquençage du génome du coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (CoV-SRAS), nous n'avons noté aucun motif de clivage RXXR↓ dans la région de la glycoprotéine S du SRAS (GPS-SRAS) s'alignant avec les autres GPS clivés comprenant cette signature typique. Les GPS sont des glycoprotéines transmembraires essentielles pour l'attachement virus-récepteur et la fusion avec les cellules cibles. Nous démontrons que le clivage de la GPS-SRAS recombinante et virale est augmenté par l'activité des PCs et que leur inhibition le réduit. Seulement PC5B, la furine et PC7 augmentent le clivage de la GPS-SRAS, la cytotoxicité et les titres viraux en culture cellulaire. Par contre, la mutagenèse dirigée n'a pas permis d'identifier un motif PC ou acide aminé strictement requis pour la maturation de la GPS-SRAS. Nous concluons que les PCs activent probablement une protéase non-identifiée qui par la suite clive la GPS-SRAS, ou qu'un autre facteur viral ou cellulaire inconnu clivé par les PCs favorise la propagation du CoV-SRAS en culture cellulaire.

En conclusion, nous avons identifié un nouveau motif PC présent dans plusieurs intégrines α clivées par la furine et PC5A : HXXXKR↓. L'His en P6 de ce nouveau motif rend le clivage de ce substrat par la furine optimal à pH acide. Notre second substrat atypique, la GPS-SRAS, est aussi clivé par les PCs mais probablement par une voie indirecte. Ces découvertes contribuent à une meilleure compréhension des PCs en fonction de leur spécificité, de leur relation avec leurs substrats et de leur biologie.

Mots-clés : convertases de pro-protéines, inhibiteur, spécificité, intégrine, syndrome respiratoire sévère aigu, coronavirus.

Abstract

Proprotein convertases (PCs) are mammalian serine proteinases homologous to the bacterial subtilisin. These proteases generate a large array of bioactive proteins from secretory pathway precursors such as hormones, receptors, viral glycoproteins and adhesion molecules. Basic specific PCs (Kexin subfamily) cleave peptide bonds downstream of basic residues. Upstream basic residues of the scissile peptide bond are critical determinants of the PCs specificity. For instance, furin, the prototypical member of the family, requires an Arg at P1 (P1 = N-terminal residue of the scissile bond) and typically a basic residue at P4 (RXXR↓, X = any amino acid except cysteine). Therefore, the absence of basic residues at P1 or P4 usually renders precursors resistant to furin activity.

In order to further understand the cleavage specificity of PCs for upstream residues of the P1, we attempted to identify glycoproteins potentially cleaved by the PCs in the constitutive secretory pathway, lacking an Arg residue at P4 (atypical substrates). We first describe the specific proteolysis of $\alpha 4$ integrin subunit, an adhesion molecule, by two members of the PCs, PC5A and furin, at an atypical cleavage site (HVISKR↓). Integrins are heterodimeric glycoproteins (α and β subunits) involved in cell adhesion, migration and signaling. Experiments in cell culture with specific PC inhibitors and PCs stable transfections in leukocytic cell lines suggest that PC5A and furin are $\alpha 4$ integrin convertases. *In vitro* digestions of fluorogenic peptides mimicking this integrin cleavage motif by furin and PC5A at different physiological pHs values demonstrate that furin preferentially cleaves this atypical $\alpha 4$ motif under mild acidic conditions. In contrast, PC5A cleavage is best achieved at neutral pH. Site-directed mutagenesis of $\alpha 4$ and pulse chase analysis in presence of ammonium chloride, a weak base increasing vesicular pH, confirm the key role of a positively charged residue at P6 in $\alpha 4$ processing. Therefore, we propose that the protonation state of the P6 His regulates $\alpha 4$ cleavage by furin in a pH dependent-manner. Accordingly, we propose that the protonation state of the P6 His limits this substrate processing by furin to the acidic lumen of the TGN/endosomes vesicles system

but not to the neutral environment of the cell surface. Furthermore, we demonstrate that this PC-dependent processing does not affect the *in vitro* adhesion properties of this integrin to its cellular receptor, the vascular cellular adhesion molecule-1 (VCAM-1).

We next extended our research to other substrates containing potential atypical PC-cleavage motifs. Following the genome sequencing of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV), we did not note any RXXR↓ cleavage motif in the region of the SARS S glycoprotein (SARS-GPS) aligning with cleaved coronavirus GPS containing this typical signature. The GPS are membrane-bound protein essential for host cell receptor-virus attachment and target cell fusion. We show that recombinant and virus derived SARS-CoV spike processing are PC-dependent and that their processing is significantly reduced upon cellular inhibition of the PCs. Only PC5B, furin and PC7 enhance spike processing, cytotoxicity and the titer. However, site directed mutagenesis failed to identify any PC motif or amino acid strictly required for the processing of SARS-GPS. We conclude that the PCs likely activate an unidentified protease, which in turn cleaves the SARS-GPS, or that other unidentified viral or cellular factor(s) cleaved by the PCs are necessary for SARS-CoV spread in cell culture.

In conclusion, we identified a new motif present in several integrins α subunits exclusively recognized *in vivo* by furin and PC5: HXXXKR↓. The His at P6 of this substrate rendered furin cleavage optimal at acidic pH. Our second atypical substrate, the SARS-CoV spike glycoprotein, was also processed in a PC-dependent manner likely through an indirect pathway. These findings contribute to a better understanding of the PCs relationships with their substrates and their biology.

Keywords : proprotein convertases, proteolysis, cleavage, inhibitors, specificity, integrin, severe acute respiratory syndrome, coronavirus.

Table des matières

Chapitre 1.	Introduction	17
1.1.	La synthèse protéique au réticulum endoplasmique	17
1.1.1.	Le peptide signal et la translocation protéique au réticulum endoplasmique 17	
1.1.2.	Les segments transmembranaires.....	20
1.2.	La voie sécrétoire	21
1.2.1	Les modifications post-traductionnelles	22
1.3.	L'endoprotéolyse limitée à ces sites comprenant des acides aminés basiques	27
1.3.1	Les types de précurseurs	29
1.4.	Les convertases de pro-protéines	37
1.4.1	La phylogénie des PCs de mammifères	38
1.4.2	Classification des subtilases de mammifères	40
1.4.3	La structure primaire des PCs	42
1.4.4	La spécificité des subtilases de mammifères et de la kexine	52
1.4.5	Les structures secondaires des régions comprenant les sites de clivage.....	64
1.4.6	Les inhibiteurs de PCs.....	65
1.4.7	Le gradient de pH et de calcium de la voie sécrétoire	67
1.5.	Des nouveaux substrats potentiels des PCs aux motifs de clivages atypiques	73
1.6.	Les intégrines	74
1.6.1.	La structure générale des intégrines.....	74
1.6.2.	L'endoprotéolyse limitée des intégrines à des sites typiques (type I) et atypiques (type II).	76
1.6.3.	Les caractéristiques atypiques de l'intégrine α_4	80
1.6.4.	L'expression de l' α_4	81
1.6.5.	La fonction de l'intégrine α_4	82
1.6.6.	L'endoprotéolyse de l' α_4	83

1.6.7.	La fonction du clivage des intégrines α	84
1.7.	Les glycoprotéines des enveloppes virales clivées	86
1.7.1	Le mode d'entrée et l'activation des glycoprotéines virales	86
1.7.2	La classification des glycoprotéines virales	88
1.7.3	Le coronavirus du SRAS.....	92
1.7.3.2	Les motifs de clivage associés aux GPS.	95
1.7.3.3	Le rôle du clivage des GPS	99
Chapitre 2.	Présentation et objectifs du projet	101
2.1.	Problématique article 1	102
2.2.	Problématique article 2	103
Chapitre 3.	Article 1.....	104
Chapitre 4.	Article 2.....	145
Chapitre 5.	Discussion et perspectives futures	178
5.1	PC5A et la furine, les convertases des intégrines	178
5.1.1.	Le clivage régulé de l'intégrine α_4	180
5.1.2.	L'histidine en P6 de l' α_4	181
5.1.3.	Le rôle biologique du clivage de l'intégrine α_4	184
5.2	La protéolyse de la glycoprotéine du CoV-SRAS	187
5.2.1	La convertase de la GPS-SRAS	189
5.2.2	La fonction du clivage de la GPS-SRAS	190
5.2.3	Les inhibiteurs des PCs et les infections à coronavirus	193
Chapitre 6.	Conclusions	195

Liste des tableaux

Tableau 1	Classification des substrats clivés après des arginines selon Seidah et coll. (1998).....	31
Tableau 2	Les substrats de SKI-1.....	59
Tableau 3	Résidus critiques à la reconnaissance des substrats des PCs (S8-S2')	62
Tableau 4	Alignement de séquences des intégrines α clivées à des sites de type I et II	78
Tableau 5	Alignement de séquence des sites de clivage des coronavirus du groupe II.....	97
Tableau 6	Alignement des séquences des GPS de différentes souches de MHV	99

Liste des figures

Figure 1	Modèle d'entrée des protéines dans la voie sécrétoire par le réticulum endoplasmique.....	19
Figure 2	Topogenèse des domaines transmembranaires.....	21
Figure 3	Biosynthèses des protéines avec des oligosaccharides N-liés.....	24
Figure 4	Représentation schématique de la pochette catalytique de la furine selon la nomenclature de Schechter et Berger (1967).....	27
Figure 5	Représentation schématique de l'endoprotéolyse limitée de la pro-insuline.....	29
Figure 6	Arbre phylogénétique des familles de subtilases basé sur l'homologie des domaines catalytiques.....	39
Figure 7	Distribution cellulaire des PCs.....	41
Figure 8	Schéma des domaines des PCs de la famille Kexine.....	43
Figure 9	Mécanisme de la catalyse du lien peptidique par les protéases à sérine.....	45
Figure 10	Modèle de l'activation de la furine.....	47
Figure 11	Le gradient de pH de la voie sécrétoire.....	68
Figure 12	Les dimères d'intégrine mammifères.....	75
Figure 13	Arbre phylogénétique des intégrines α clivées avec leurs ligands.....	80
Figure 14	Paradigme révisé de la migration leucocytaire aux sites d'inflammation.....	83
Figure 15	Structure de l'hémagglutinine d'influenza.....	91

*À mes parents, Stéphanie, Coralie et
Sandrine pour leur soutien inconditionnel*

Remerciements

Je tiens à remercier Nabil Seidah pour sa confiance et son enthousiasme contagieux pour la science. Merci également à Annik Prat qui m'a grandement aidé pour la rédaction de mon premier article et pour son support.

Je transmets mes remerciements aux membres du jury qui me font l'honneur d'évaluer cette thèse.

Je dois également souligner l'aide et le soutien de mes confrères de laboratoire au fil des ans. Premièrement, je remercie Nadia Nour, Dan(i/y) Gauthier qui préfère l'isoleucine à la tyrosine, Daniel Gauthier, Barry Touré, Nadia Rabah et Ahmed Zaid pour votre écoute et votre amitié. Mes plus sincères remerciements à Étienne Decroly, Gilles Croissandeau et Carole Rovère dont l'aide à mes débuts au laboratoire m'a grandement aidé.

Je tiens à remercier Claude Lazure et Danni Gauthier pour l'apprentissage du spectrofluorimètre, Ajoy Basak pour la synthèse de peptides, Martin Vincent pour les infections avec le coronavirus du SRAS, Louise Wickham et Josée Hamelin pour l'assemblage complet de la construction de la glycoprotéine S du SRAS et les conseils de biologie moléculaire, et Suzanne Benjannet pour l'apprentissage des techniques de biosynthèse. Finalement, je remercie Marie-Claude Asselin et Annie Lemieux pour l'aide en culture cellulaire et à tous les gens qui ont contribué à ce projet.

Pour terminer, merci à mes collègues de travail qui ont corrigé cette thèse : Marie-Claude Asselin, David Rhains, Gaétan Mayer, Steve Poirier, et Chady Sakr.

- α_1 -AT** α_1 -antitrypsine
- β -LPH** β -lipotropin hormone
- ACE2** *angiotensin converting enzyme-2*
- AP** protéines adaptatrices
- ASLV** *avian sarcoma leukosis virus*
- BiP** *immunoglobulin heavy chain binding protein*
- BMP-4** *Bone Morphogenetic Protein-4*
- CNS** système nerveux central
- CKII** caséine kinase II
- COP** *Coat protein complex*
- CoV** coronavirus
- CVML** cellules vasculaires des muscles lisses
- ERp57/PDI** isomérase des ponts disulfures
- FAK** *focal adhesion kinase*
- GFP** *green fluorescent protein*
- GGA** *Golgi-localized, gamma-ear-containing, ARF-binding proteins*
- Glc** glucoses
- GlcNAc** N-acétylglucosamine
- GP** glycoprotéines des enveloppes virales
- GPS** glycoprotéine S
- HA** hémagglutinine d'influenza
- HE** hémagglutinine estérase
- HR** *heptad repeat*
- Hsc70** *heat shock complex 70*
- HMVEC** *Human Dermal Microvascular Endothelial Cells*
- HUVEC** *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*
- IGF** *Insulin like growth factor*
- Ki** constantes d'inhibition

LFA-1 *Lymphocyte function associated antigen-1*
LDL *low density lipoprotein*
Man mannose
MHV virus murin de l'hépatite
NARC-1 *neural apoptosis-regulated convertase 1*
PC convertase de pro-protéines
PACS-1 *phosphofurin acidic cluster sorting protein-1*
POMC pro-opiomélanocortine
PMA phorbol 12-myristate 13-acétate
pro-BDNF *pro-Brain Derived Neurotropic Factor*
pro-EGF *pro-epithelial growth factor*
pro-IGF-IA *pro-insuline-like growth factor*
pro-MIS *pro-Mullerian Inhibiting Substance*
pro-MT1-MMP *pro-membrane type-1 matrix metalloprotease*
pro-PTH précurseur de l'hormone parathyroïde humaine
prM précurseur M
RE réticulum endoplasmique
RTV réseau tubulo-vésiculaire
SKI-1 Subtilisin Kexin Isoform-1
SRAS syndrome respiratoire aigu sévère
SRP *signal recognition particle*
SP *signal peptidase*
SPP *signal peptide peptidase*
SR *signal recognition particle receptor*
SREBP *sterol regulatory element-binding proteins*
SV40 *simian virus-40*
TBE *tick-borne encephalitis*
TGN réseau golgien *trans*

TRAMP *translocating chain-associated membrane*

TRAP *translocon-associated protein*

VCAM-1 *vascular cellular adhesion molecule-1*

VEGF-C *vascular endothelial growth factor-C*

VLA *Very late antigen*

VSV *vesicular stomatitis virus*

Chapitre 1. Introduction

Les protéines nouvellement synthétisées doivent exercer leur fonction biologique à un moment et un lieu bien précis d'un organisme vivant. Peu importe le compartiment, des mécanismes bien ordonnés de ciblage permettent le transport des protéines à leurs destinations. La voie sécrétoire est probablement le système de triage des protéines le mieux étudié chez les mammifères. L'avancement rapide de la biologie cellulaire au cours des vingt dernières années a permis de mieux comprendre comment les protéines synthétisées au réticulum endoplasmique (RE) voyagent d'une vésicule à l'autre pour atteindre les diverses organelles de la voie sécrétoire.

1.1. La synthèse protéique au réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique est le principal lieu de synthèse des stérols, des lipides, de protéines membranaires et sécrétées, et des glycoprotéines. Environ 30 % des protéines totales de la cellule sont synthétisées au RE. Dans certaines cellules spécialisées, comme les hépatocytes, les cellules pancréatiques et les plasmocytes, ce niveau peut atteindre plus de 90 %. Le peptide signal, un élément agissant en *cis* dirige les protéines destinées à la voie sécrétoire en les adressant au RE. Ce signal est généralement composé de 8 à 12 acides aminés hydrophobes suivis d'une région polaire située à l'extrémité amino-terminale (N-terminale) de la protéine néo-synthétisée.

1.1.1. Le peptide signal et la translocation protéique au réticulum endoplasmique

Les protéines destinées à la voie sécrétoire possèdent un peptide signal à leur extrémité N-terminale, cette structure est essentielle à l'insertion des protéines aux pores du RE. Dans la plupart des cas, ces protéines sont intégrées au RE de façon co-translationnelle, c'est-à-dire en même temps que le ribosome la synthétise (Ruiz-Arguello et coll., 2004). Lors de la synthèse du peptide signal, le complexe ribo-protéique SRP (*signal recognition particle*), composé d'au moins cinq protéines différentes (SRP54, SRP14, SRP19, SRP68 et

SRP72) et d'une molécule d'ARN (l'ARN 7SL), s'associe au peptide signal par des interactions hydrophobes et au ribosome uni à la protéine naissante (Figure 1) (Nagai et coll., 2003). L'association de la SRP est accompagnée par une réduction marquée du niveau de traduction de l'ARNm (acide ribonucléique messenger). La SRP guide ensuite la protéine nouvellement synthétisée et le ribosome associé à la membrane du RE, au SR (*signal recognition particle receptor*), le récepteur du SRP. Ce récepteur est composé de 2 sous unités nommées SR α et SR β . Une fois associé au SR ce complexe est acheminé à un des pores aqueux du RE, nommés translocons, formant en quelque sorte des pores sélectifs aux protéines munies d'un peptide signal. Chaque translocon est composé d'un hétéro-trimère de protéines Sec61 : Sec61 α , Sec61 β et Sec61 γ . Une fois le SRP ancré au translocon, sa sous unité SR α préalablement chargée d'un GTP hydrolyse ce dernier ce qui permet le transfert de la chaîne polypeptidique naissante au translocon. Le transfert de la protéine au translocon libère la SRP. La traduction reprend alors son cours normal et les modifications post-traductionnelles qui ont lieu dans la lumière du RE débutent de façon co-traductionnelle. Des cofacteurs associés au translocon comme TRAMP (*translocating chain-associated membrane*) et TRAP (*translocon-associated protein*) facilitent la translocation des protéines néo-synthétisées, et ce, selon la nature du peptide signal (Fons et coll., 2003).

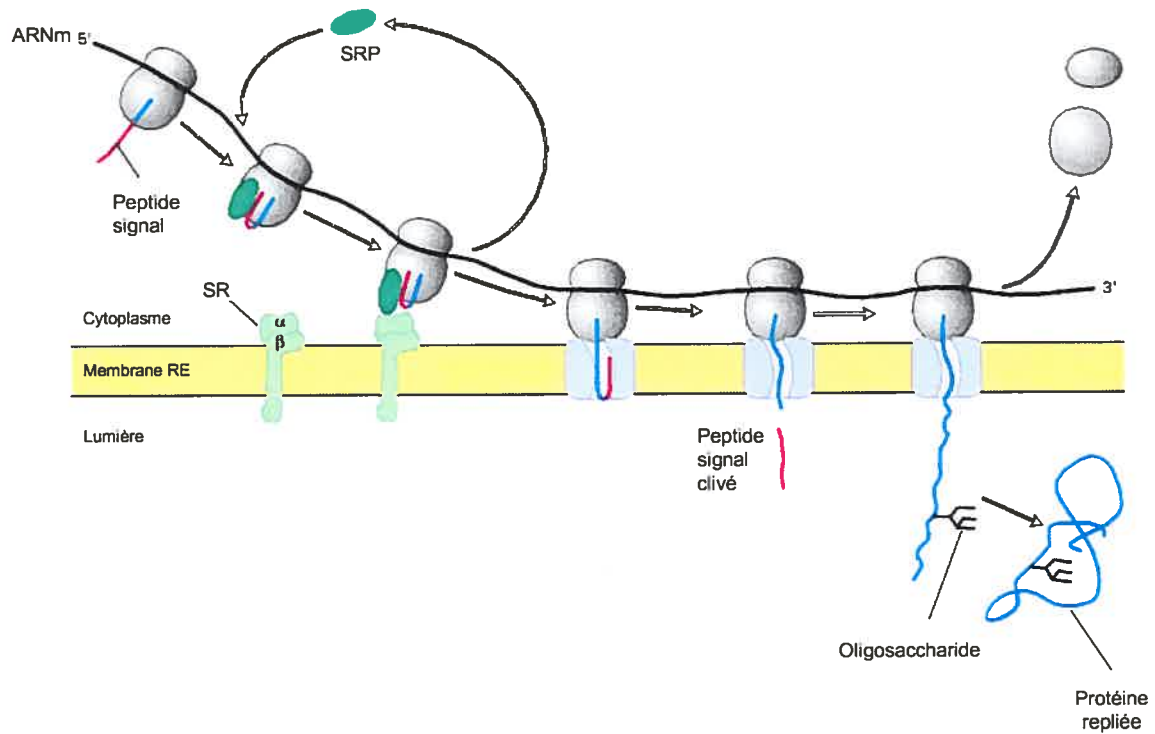


Figure 1 Modèle d'entrée des protéines dans la voie sécrétoire par le réticulum endoplasmique

(Adapté de Lodish et coll. 2000)

Le peptide signal est généralement excisé par la *signal peptidase* (SP), cette coupure est habituellement co-traductionnelle (Dalbey et Von Heijne, 1992). Ces peptides signaux ou les fragments de ces derniers peuvent même avoir une activité physiologique autre que celle qui lui est normalement attribuée. Par exemple, les peptides signaux clivés de certaines glycoprotéines d'arénavirus sont nécessaires à leur maturation (Eichler et coll., 2003) et dans le cas de la gp160 du VIH-1, des fragments de peptides signaux produits par

la *signal peptide peptidase* (SPP) (Martoglio, 2003) sont libérés dans le cytoplasme et modulent l'activité de la calmoduline (Martoglio et coll., 1997; Martoglio et Dobberstein, 1998).

1.1.2. Les segments transmembranaires

Les segments transmembranaires sont en réalité des peptides signaux internes qui ne sont pas clivés par la SP. L'intégration de ces hélices α hydrophobes à la membrane du RE a lieu au translocon (Figure 2). On qualifie les domaines transmembranaires de topologie de types I lorsque la partie N-terminale du segment est orientée du côté lumière (N_{lum}) et que la portion carboxy-terminale (C-terminale) est cytoplasmique (C_{cyt}). Par opposition, le segment transmembranaire est qualifié de type II lorsque l'extrémité N-terminale est cytoplasmique (N_{cyt}) et que la C-terminale est orientée côté lumière (C_{lum}). La topologie des segments transmembranaires à travers la bicouche lipidique peut être difficile à prédire, elle l'est encore plus lorsque cette dernière possède plusieurs segments transmembranaires. Certaines propriétés comme la présence de charges positives adjacentes au segment transmembranaire influencent la topologie parce que les résidus basiques ont tendance à se retrouver plus fréquemment du côté cytoplasmique. De plus, la nature du coeur hydrophobe du domaine transmembranaire influence également la topologie de ces domaines puisque l'hydrophobicité totale et la longueur de la région non polaire du segment promeuvent une orientation $N_{exoplasmique}/C_{cytoplasmique}$ (Higy et coll., 2004).

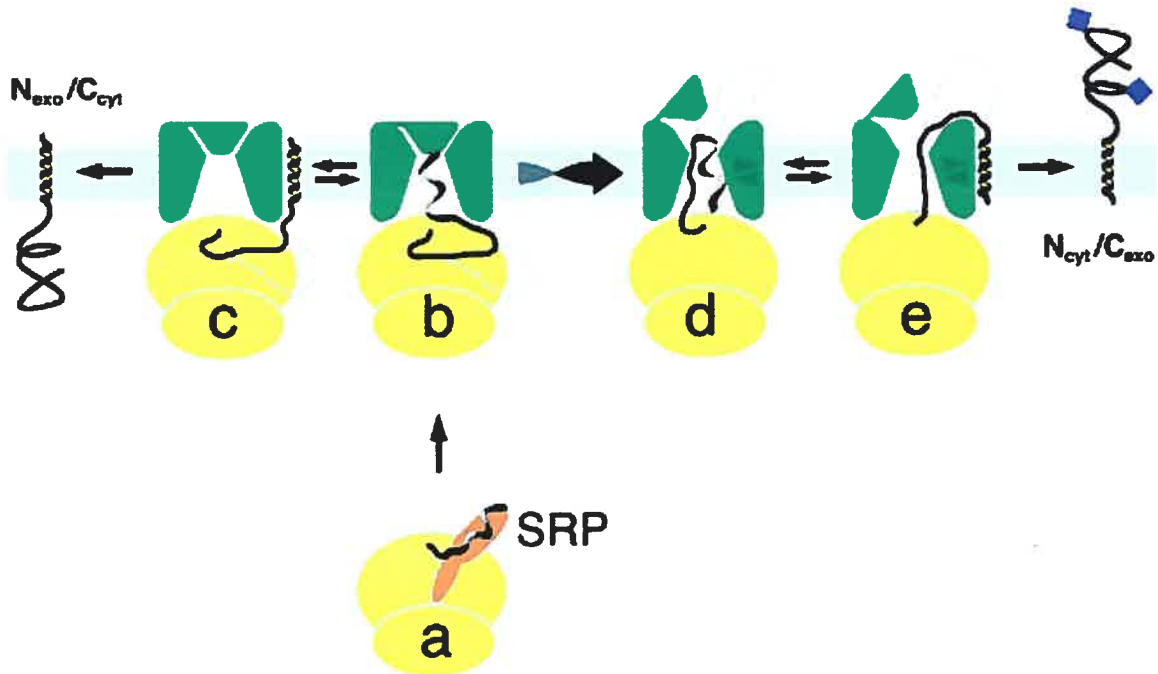


Figure 2 Topogenèse des domaines transmembranaires

Lors de leur synthèse, les segments transmembranaires peuvent adopter dans le translocon une orientation *N_{exo}/C_{cyt}* (type I) ou *N_{cyt}/C_{exo}* (Type II). Sont illustrés le ribosome (jaune), le translocon (vert), la SRP (brun), les oligosaccharides (violet) et la protéine néo-synthétisée (noir). (Adapté de Higy et coll. 2004)

1.2. La voie sécrétoire

Les protéines synthétisées au RE font partie de la voie sécrétoire à un moment ou un autre de leur vie. Les membranes du système de la voie sécrétoire approvisionnent, entre autres, la surface cellulaire en protéines nouvellement synthétisées, en hydrates de carbone et en lipides, nécessaires à l'homéostasie cellulaire. Ce système est constitué de diverses organelles qui incluent le RE, le réseau tubulo-vésiculaire (RTV), l'appareil de Golgi et le réseau golgien *trans* (TGN). Le mouvement des vésicules de la voie sécrétoire et leurs contenus, les cargaisons, est ordonné par plusieurs types de protéines associées spécifiquement à divers stades du transport.

Les cargaisons sécrétoires sont synthétisées et assemblées au RE pour être transportées aux saccules du *cis*-Golgi (transport antérograde) dans des vésicules recouvertes de COPII (*Coat protein complex II*). Par opposition, le transport rétrograde permet le mouvement vésiculaire inverse, par exemple, les protéines résidentes du RE sont retournées au RE dans des vésicules recouvertes de COPI. Le transport antérograde fait progresser les protéines vers la surface cellulaire à travers les diverses saccules du Golgi (Golgi *cis*, *median*, *trans*) au TGN ou les cargaisons sont triées soit vers la membrane plasmique, le système des endosomes-lysosomes ou les granules de sécrétion (Allan et Balch, 1999). Le flux constitutif de membranes du TGN vers la membrane plasmique est contrebalancé par un flux inverse initié par la pinocytose et l'endocytose.

1.2.1 Les modifications post-traductionnelles

Au fur et à mesure de la progression des cargaisons vers la membrane plasmique, elles subissent des modifications post-traductionnelles spécifiques aux différents compartiments. Les modifications post-traductionnelles associées à la voie sécrétoire sont variées et nombreuses. Par exemple, dès leur entrée au RE, les protéines naissantes subissent la plupart du temps des modifications co-traductionnelles comme : l'excision du peptide signal et l'addition de sucres liés à certains résidus asparagine par un lien N-glycosidique. Les sections suivantes résument brièvement quelques modifications post-traductionnelles associées à la lumière des compartiments de la voie sécrétoire.

1.2.1.1 La N-glycosylation et le contrôle de qualité

La plupart des domaines luminaux des protéines présentes à la surface cellulaire possèdent des chaînes glycosidiques, en effet, l'addition et la modification subséquente de ces sucres constituent la principale modification biochimique de ces protéines. L'ajout et les modifications de ces hydrates de carbone a lieu au RE, dans l'appareil de Golgi et les

vésicules du TGN. La glycosylation peut être essentielle au repliement, au contrôle de qualité, au transport, à la stabilité et aux interactions protéine-protéine.

La biosynthèse des protéines conjuguées à des sucres liés par des liens N-glycosidiques commence au RE par l'addition d'un grand oligosaccharide précurseur préformé. Cet oligosaccharide est lié par un résidu pyrophosphoryle au dolicol, un long lipide (75-95 atomes de carbone) fermement enfoui dans membrane du RE qui agit comme transporteur de l'oligosaccharide. L'oligosaccharide précurseur est partiellement synthétisé sur la face cytoplasmique du RE par une panoplie d'enzymes du cytoplasme. Lorsque la synthèse de l'oligosaccharide précurseur est terminée, il bascule de l'autre côté de sorte que l'oligosaccharide est dorénavant du côté de la lumière du RE.

L'oligosaccharide précurseur est composé de trois glucoses (Glc), neuf mannoses (Man), et deux molécules de N-acétylglucosamine (GlcNAc) ($\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$). L'oligosaccharide $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ est transféré en bloc du dolichol à un résidu asparagine d'une chaîne polypeptidique naissante. Cette réaction est catalysée par la protéine transférase d'oligosaccharides. Seuls les résidus asparagines de la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (ou X est n'importe quel acide aminé sauf la proline ou la cystéine) peuvent accepter l'oligosaccharide de la protéine transférase d'oligosaccharides. Ce ne sont pas tous les motifs Asn-X-Ser/Thr qui sont pour autant glycosylés, par exemple, le repliement rapide d'un segment d'une protéine peut prévenir le transfert de l'oligosaccharide au motif de N-glycosylation si ce dernier n'est plus exposé à la lumière du RE.

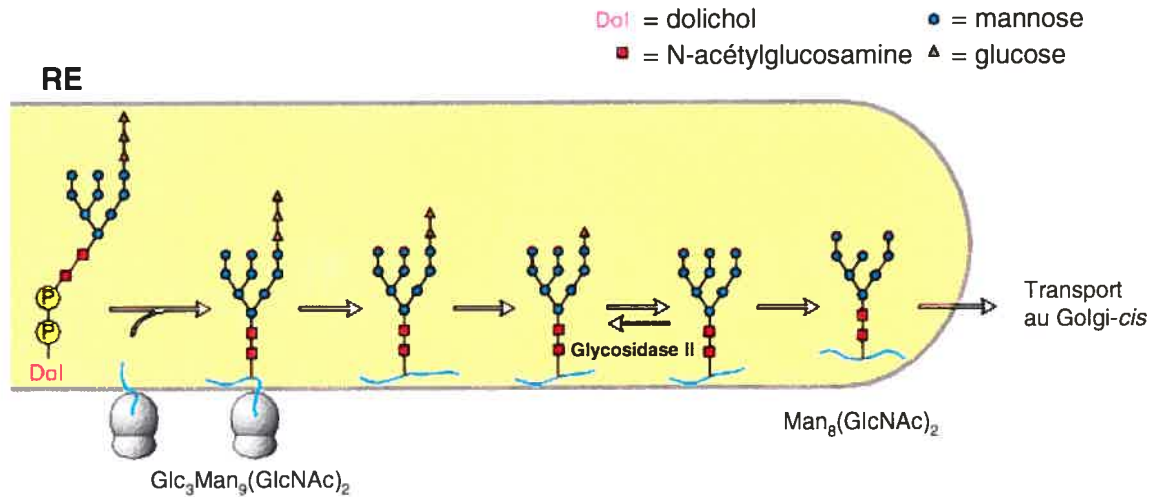


Figure 3 Biosynthèses des protéines avec des oligosaccharides N-liés

(Adapté de Lodish et coll. 2002)

Suite au transfert du $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ à la chaîne polypeptidique naissante, les trois résidus glucose et un mannose sont enlevés par différentes glycosidases du RE. La lumière du RE contient une glucosyltransférase qui rajoute un glucose aux protéines conjuguées à un oligosaccharide du type $\text{Man}_{7-9}(\text{GlcNAc})_2$. Cette enzyme glycosyle seulement les protéines mal repliées ou non-repliées présentant au moins un oligosaccharide $\text{Man}_{7-9}(\text{GlcNAc})_2$. Le RE contient aussi deux protéines ayant des propriétés de lectine, la calnexine ancrée à la membrane du RE, et la calréticuline soluble. Ces

chaperons moléculaires lient les oligosaccharides sélectivement reglucosylés ($\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}(\text{GlcNAc})_2$), ce qui prévient le repliement des régions adjacentes. Occasionnellement, les protéines se dissocient spontanément de la calnexine et de la calréticuline pour être immédiatement déglucosylées par la glycosidase II ; si elles sont bien repliées, elles ne seront pas reglucosylées et ne lieront pas ces chaperons moléculaires. Donc, la calnexine et la calréticuline aident à prévenir le repliement précoce de certains segments de glycoprotéines néo-synthétisées et retiennent les glycoprotéines mal repliées au RE. Ces deux lectines permettraient également le recrutement de l'ERp57/PDI (l'isomérase des ponts disulfures) qui favorise la formation des ponts disulfures natifs (Ellgaard et Frickel, 2003). La formation de ces ponts covalents est souvent essentielle au repliement des protéines synthétisées au RE.

La machinerie du contrôle de qualité du RE ne nécessite pas forcément la présence d'oligosaccharides N-liés. Par exemple, la BiP (*immunoglobulin heavy chain binding protein*), une protéine chaperonne du RE de la famille Hsc70 (*heat shock complex 70*), assiste aussi le repliement des protéines en s'associant transitoirement avec les protéines naissantes et ce indépendamment des oligosaccharides. BiP permet aussi le transport rétrograde des protéines mal repliées au cytoplasme où l'ubiquitination des ces protéines défectueuses entraîne leur dégradation par le protéasome (Ahner et Brodsky, 2004).

1.2.1.2 La protéolyse

Mis à part le clivage du peptide signal au RE, les protéines transitant par la voie sécrétoire peuvent subir une protéolyse ciblée ou être dégradées. Plusieurs classes de protéases, habituellement actives tardivement dans la voie sécrétoire (TGN, granules de sécrétion, surface cellulaire, endosomes et lysosomes), dégradent ou modulent leur activité par la protéolyse.

Il existe deux grands types de protéolyse : l'endoprotéolyse (endoprotéases) et l'exoprotéolyse (exoprotéases). La première consiste en la coupure d'un lien peptidique entre deux acides aminés qui n'ont pas de groupement α -carboxyle ou α -aminé libre, alors que l'exoprotéolyse consiste en la coupure d'un lien peptidique d'un acide aminé ayant une extrémité N-terminale (aminopeptidase) ou C-terminale (carboxypeptidase) libre.

La nomenclature des sites de reconnaissance des endoprotéases

Il fut noté à plusieurs reprises que les endoprotéases clivent des substrats préférentiellement à certains sites. Par exemple, la trypsine coupe des précurseurs en C-terminal de certains résidus Arg ou Lys et la chymotrypsine le fait préférentiellement après des résidus aromatiques. Des études sur la spécificité de la papaïne par Schechter et Berger ont mené à la proposition (Schechter et Berger, 1967) que les protéases reconnaissent les séquences autour du lien scissile en accommodant les chaînes latérales du substrat aux sites de reconnaissance correspondants de l'enzyme (sous-site). C'est ainsi qu'une nomenclature fut établie pour nommer ces résidus du substrat et les sites de reconnaissance correspondant de l'enzyme, cette terminologie reste encore très répandue de nos jours. Selon cette nomenclature, les résidus sont désignés comme P1, P2, P3, etc., en prenant comme point de départ le lien scissile et en comptant vers l'extrémité N-terminale. Ces résidus sont reconnus par des sous-sites correspondants de l'enzyme désignées S1, S2, S3, etc. (ex. le P1 du substrat est reconnu par le S1 de la protéase) (Figure 4). Les résidus C-terminaux au lien scissile sont désignés comme positions prime (P1', P2', etc.). De même, ces positions prime sont reconnues par les sous-sites correspondant S1', S2' et ainsi de suite.

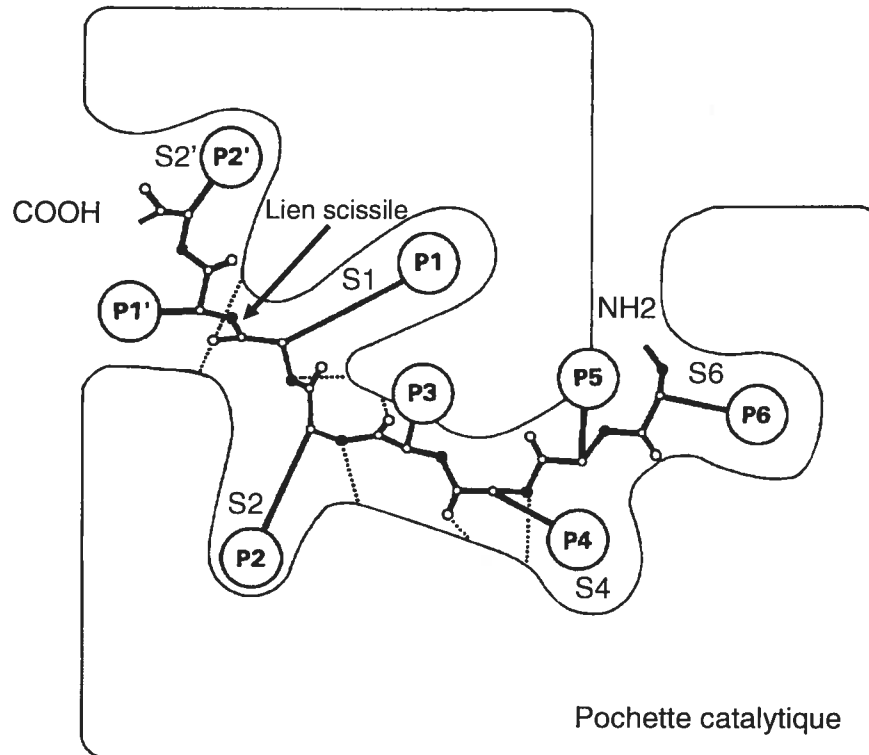


Figure 4 Représentation schématique de la pochette catalytique de la furine selon la nomenclature de Schechter et Berger (1967)

Les sous-sites sont indiqués en bleu et les résidus (P1-P6) du substrat en noir. (Adapté de Siezen et coll. 1994).

1.3. L'endoprotéolyse limitée à ces sites comprenant des acides aminés basiques

Une multitude de protéines sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs afin d'être activés par endoprotéolyse à des sites précis. La protéolyse limitée régule donc l'activité spatio-temporelle des précurseurs protéiques dans les compartiments cellulaires

où l'activité de la protéase est séquestrée. Ce procédé ancestral a été rapporté chez tous les organismes vivants, les virus et les prions.

À la fin des années soixante, deux groupes de recherches indépendants ont proposé l'hypothèse que les peptides hormonaux étaient synthétisés sous forme de précurseurs de haut poids moléculaire et que ces peptides étaient convertis de façon post-traductionnelle en formes biologiquement actives (Steiner et coll., 1967; Chretien et Li, 1967). Steiner et al. (1967) démontrèrent, par des expériences de marquage métabolique, que les deux chaînes matures de l'insuline étaient produites par le clivage d'un précurseur de haut poids moléculaire : la pro-insuline. Le séquençage des acides aminés a permis d'identifier les sites de coupure de la pro-insuline comme étant des doublets basiques (Lys-Arg et Arg-Arg). Indépendamment, Chretien et Li (1967) ont démontré qu'un mécanisme similaire régissait la maturation d'un autre précurseur hormonal, la β -LPH (*β -lipotropin hormone*) à un site comprenant des doublets d'acides aminés basiques. Par la suite ce schéma se répéta pour plusieurs autres hormones peptidiques et d'autres types de protéines transitant par la voie sécrétoire comme : les facteurs de croissance, neurotrophines, récepteurs, molécules d'adhésion, pro-protéases, des glycoprotéines virales et des toxines bactériennes (Thomas, 2002; Seidah et Chretien, 1999). Finalement, l'avancement des techniques de biologie moléculaire qui suivit ces découvertes permit de mettre en évidence l'importance des motifs basiques adjacents aux sites de maturation de plusieurs de ces précurseurs.

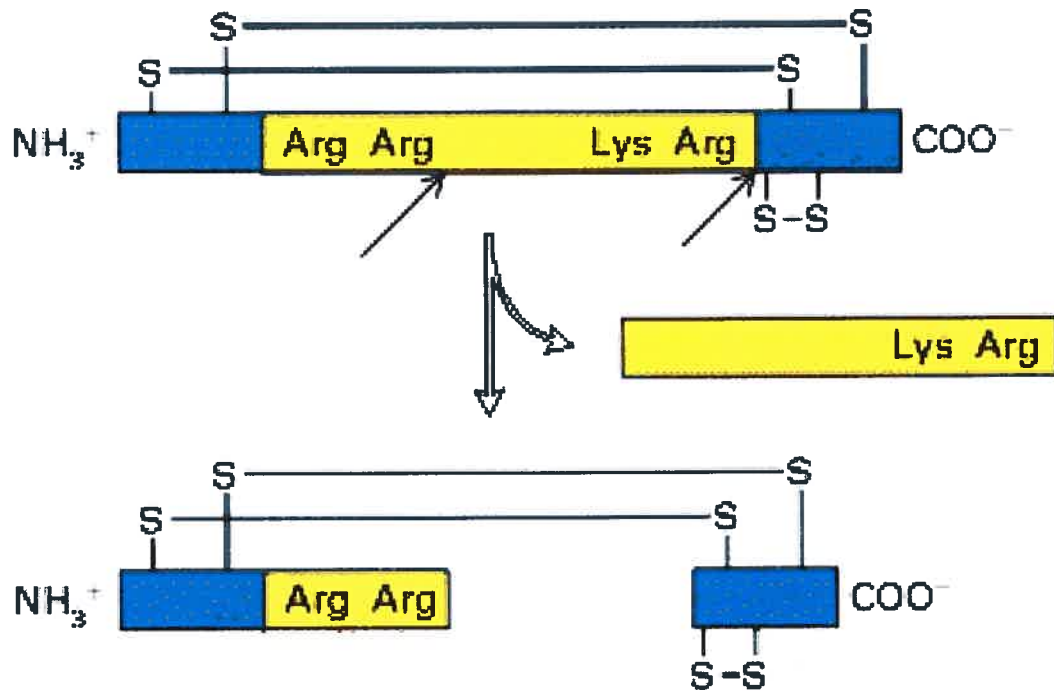


Figure 5 Représentation schématique de l'endoprotéolyse limitée de la pro-insuline

Les flèches noires indiquent la position des deux coupures de la pro-insuline. (Adapté de Loeb et coll. 2000)

1.3.1 Les types de précurseurs

L'accumulation de données aux cours des nombreuses années d'études des précurseurs protéiques et peptidiques ont permis d'identifier différents motifs de clivage. Seidah et collaborateurs (1998) proposent une classification des précurseurs clivés en aval des résidus Arg en quatre types :

a) Type I : motif $RX(K/R)R\downarrow$

Ce type de motif est défini par la présence d'acides aminés basiques en P1, P2 et P4. On retrouve habituellement une chaîne aliphatique comme la Val, Leu, Ile en P2'. Ce type de précurseurs est généralement synthétisé dans une grande variété de types cellulaires. On retrouve plusieurs substrats correspondants à ce motif de clivage : les glycoprotéines de surface virales, des facteurs de croissance, des pro-métalloprotéases, des toxines bactériennes, des molécules d'adhésion et plusieurs autres.

b) Type II : motif dibasique (K/R)(K/R)↓

Ce type est caractérisé par une coupure du lien peptidique en aval d'un doublet basique, on retrouve habituellement en P4 ou P6 des résidus chargés positivement comme Arg et Lys. La majorité des pro-hormones se retrouvent dans cette catégorie, comme la pro-opiomélanocortine (POMC) et la pro-insuline.

c) Type III : motif R(X)_{2n}R↓ (n=2,3,4)

Ces protéines sont coupées en C-terminal d'une simple arginine. La présence d'un résidu basique en P4, P6 ou P8 serait essentielle à la protéolyse de ce type de précurseur. Ce type comprend des peptides hormonaux comme la pro-dynorphine, la pro-somatostatine, et des facteurs de croissance comme la pro-EGF (*epithelial growth factor*), l'IGF I et II (*insulin growth factor I-II*).

d) Type IV

Le type IV inclut les protéines coupées après un motif monobasique ou dibasique. Ces précurseurs diffèrent du type I et III par la présence en P2' d'un acide aminé basique (P2' R ou K). Ce groupe contient des précurseurs hormonaux comme le pro-*Mullerian Inhibiting Substance* (pro-MIS), le pro-glucagon ainsi que le pro-récepteur PTP-μ (Campan et coll., 1996).

Tableau 1 Classification des substrats clivés après des arginines selon Seidah et coll. (1998)

Séquences du site de clivage TYPE I

	P6- P5- P4- P3- P2- P1 P1' -P2'
	X - X - R - X -K/R- R ↓ X - X
Pro-protéases	
Pro-PC1	Lys-Glu-Arg-Ser-Lys-Arg↓Ser-Ala
Pro-PC2	Phe-Asp-Arg-Lys-Lys-Arg↓Gly-Tyr
Pro-la furine	Lys-Arg-Arg-Thr-Lys-Arg↓Asp-Val
Pro-PC4	Arg-Arg-Arg-Val-Lys-Arg↓Ser-Leu
Pro-PACE4	Lys-Arg-Arg-Val-Lys-Arg↓Gln-Val
Pro-PC5	Lys-Lys-Arg-Thr-Lys-Arg↓Asp-Tyr
Pro-PC7	Lys-Arg-Arg-Ala-Lys-Arg↓Ser-Val
Pro-ADAM-10	Leu-Leu-Arg-Lys-Lys-Arg↓Thr-Thr
Pro-ADAM-17	Val-His-Arg-Val-Lys-Arg↓Arg-Ala
Pro-stromélysine-3	Arg-Asn-Arg-Gln-Lys-Arg↓Phe-Val
Facteurs de croissance	
Pro-NGF	Thr-His-Arg-Ser-Lys-Arg↓Ser-Ser
Pro-BDNF	Ser-Met-Arg-Val-Arg-Arg↓His-Ser
Pro-NT3	Thr-Ser-Arg-Arg-Lys-Arg↓Tyr-Ala
Pro-NT4/5	Ala-Asn-Arg-Ser-Arg-Arg↓Gly-Val
Pro-PDGF-A	Pro-Ile-Arg-Arg-Lys-Arg↓Ser-Ile
Pro-PDGF-B	Leu-Ala-Arg-Gly-Arg-Arg↓Ser-Leu
Pro-TGFP	Ser-Ser-Arg-His-Arg-Arg↓Ala-Leu
Pro-lefty gene factor	Arg-ser-Arg-Gly-Lys-Arg↓Phe-Ser
Pro-récepteurs	
Pro-récepteur de l'insuline	Pro-Ser-Arg-Lys-Arg-Arg↓Ser-Leu
Pro-récepteur de l'IGF-1	Pro-Glu-Arg-Lys-Arg-Arg↓Asp-Val
Intégrine α3	Pro-Gln-Arg-Arg-Arg-Arg↓Gln-Leu
Intégrine α6	Asn-Ser-Arg-Lys-Lys-Arg↓Glu-Ile
Intégrine α7	Arg-Asp-Arg-Arg-Arg-Arg↓Glu-Leu
Intégrine αIIb	His-Lys-Arg-Asp-Arg-Arg↓Gln-Ile
Pro-récepteur de la leptine	Gln-Val-Arg-Glu-Lys-Arg↓Leu-Asp
Pro-LRP	Ser-Asn-Arg-His-Arg-Arg↓Gln-Ile
Toxines bactériennes	
PA de <i>B. Anthracis</i>	Asn-Ser-Arg-Lys-Lys-Arg↓Ser-Thr
Toxine diphtérique	Gly-Asn-Arg-Val-Arg-Arg↓Ser-Val
Toxine R de <i>C. septicum</i>	Lys-Arg-Arg-Gly-Lys-Arg↓Ser-Val
Pro-aérollysine	Lys-Val-Arg-Arg-Ala-Arg↓Ser-Val

Glycoprotéines virales

HIV-1 (gp160)	Val-Gln-Arg-Glu-Lys-Arg↓Ala-Val
Virus de l'influenza aviaire (HA)	Lys-Lys-Arg-Glu-Lys-Arg↓Gly-Leu
Virus de la maladie de Borna (gp)	Leu-Lys-Arg-Arg-Arg-Arg↓Asp-Thr
Virus de la rubéole (F0)	Ser-Arg-Arg-His-Lys-Arg↓Phe-Ala
Virus de la maladie de Newcastle	Gly-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg↓Phe-Ile
Virus respiratoire syncytial (F0)	Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-Arg↓Phe-Leu
	Asn-Asn-Arg-Ala-Arg-Arg↓Glu-Leu
Cytomégalovirus humain (gB)	His-Asn-Arg-Thr-Lys-Arg↓Ser-Thr
Virus de la varicelle-zoster (gB)	Asn-Thr-Arg-Ser-Arg-Arg↓Ser-Val
Virus de la rubéole (F0)	Ser-Arg-Arg-His-Lys-Arg↓Phe-Ala
Virus Ebola (GP, souche Zaïre)	Gly-Arg-Arg-Thr-Arg-Arg↓Glu-Ala
Virus de la fièvre jaune (prM)	Ser-Arg-Arg-Ser-Arg-Arg↓Ala-Ile
Virus TBE (prM)	Gly-Ser-Arg-Thr-Lys-Arg↓Ser-Val
Virus du Nile occidental (prM)	Ser-Arg-Arg-Ser-Arg-Arg↓Ser-Leu
Virus de la forêt de Semliki (E2)	Gly-Thr-Arg-His-Arg-Arg↓Ser-Val
Virus Sindbis (E2)	Ser-Gly-Arg-Ser-Lys-Arg↓Ser-Val

Pro-facteurs de transcription

Récepteur de Notch Gly-Gly-Arg-Ser-Arg-Arg↓Glu-Leu

Pro-hormones

Pro-Fertiline β Gln-Ser-Arg-Met-Arg-Arg↓Ala-Ala

Pro-neuropeptides

Pro-7B2 Glu-Arg-Arg-Lys-Arg-Arg↓Ser-Val
 Prosomatostatine (S 14) Ala-Pro-Arg-Glu-Lys-Arg↓Ala-Gly

Autres précurseurs de protéines

Profacteur de von Willebrand	Ser-His-Arg-Ser-Lys-Arg↓Ser-Leu
Profacteur IX	Leu-Asn-Arg-Pro-Lys-Arg↓Tyr-Asn
Profacteur X	Lys-Glu-Arg-Arg-Lys-Arg↓Ser-Val
Protéine-2	His-Leu-Arg-Leu-Lys-Arg↓His-Asp
Ng-CAM	Gly-Glu-Arg-Ser-Arg-Arg↓Gln-Ala
Pro-sortiline	Gly-Gly-Arg-Thr-Arg-Arg↓Ser-Ala
Pro-cadhérine-E	Leu-Ser-Arg-Val-Arg-Arg↓Ala-Trp
Pro-collagènes humain $\alpha 1$ (V)	Ala-Ser-Arg-Thr-Arg-Arg↓Asn-Ile

Séquences du site de clivage TYPE II

P6- P5- P4- P3- P2- P1 P1'-P2'
 X - X - X - X - K/R- R ↓ X - X

Pro-protéases

Pro-Rénine Ser-Gln-Pro-Met-Lys-Arg↓Leu-Thr
 Pro-la furine site secondaire Arg-Gly-Val-Thr-Lys-Arg↓Ser-Leu

Molécules d'adhésion

Intégrine α4 His-Val-Ile-Ser-Lys-Arg↓Ser-Thr
 Intégrine α5 His-His-Gln-Gln-Lys-Arg↓Glu-Ala
 Intégrine αv His-Leu-Ile-Thr-Lys-Arg↓Asp-Leu
 Intégrine α8 His-Tyr-Ile-Arg-Arg-Arg↓Glu-Val
 NCAM-L1 Arg-Lys-His-Ser-Lys-Arg↓His-Ile

Glycoprotéines virales

GP du virus Ebola (Reston) Thr-Arg-Lys-Gln-Lys-Arg↓Ser-Val

Pro-Hormones

POMC
 (JP/ACTH) Pro-Arg-Glu-Gly-Lys-Arg↓Ser-Tyr
 (ACTH/βLPH) Pro-Leu-Glu-Phe-Lys-Arg↓Glu-Leu
 (αMSH/CLIP) Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg↓Arg-Pro-
 insuline
 (chaîne B/C) Thr-Pro-Lys-Thr-Arg-Arg↓Glu-Ala
 (chaîne C/A) Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg↓Gly-Ile
 Pro-PTH Lys-Ser-Val-Lys-Lys-Arg↓Ser-Val
 Pro-polypeptide pancréatique Pro-Ala-Tyr-Gly-Lys-Arg↓His-Lys
 Pro-gastrine Ala-Ser-His-His-Arg-Arg↓Gln-Leu
 Met-Asp-Phe-Gly-Arg-Arg↓Ser-Ala
 Pro-glucagon Met-Asn-Glu-Asp-Lys-Arg↓His-Ser
 Pro-GLP-1 Asn-Asn-Ile-Asp-Lys-Arg↓Ser-Thr

Pro-Neuropeptides

POMC (βLPH/Fin) Pro-Pro-Lys-Asp-Lys-Arg↓Tyr-Gly
 Pro-enképhaline Gly-Gly-Phe-Met-Lys-Arg↓Asp-Ala
 Met-Asp-Tyr-Gln-Lys-Arg↓Tyr-Gly
 Gly-Gly-Phe-Leu-Lys-Arg↓Phe-Ala
 Pro-dynorphine Arg-Lys-Gln-Ala-Lys-Arg↓Tyr-Gly
 Glu-Asp-Leu-Tyr-Lys-Arg↓Tyr-Gly
 Pro-nociceptine/orphanine Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys-Arg↓Ser-Ser
 Lys-Gln-Leu-Gln-Lys-Arg↓Met-Pro

Pro-LHRH
 PRL-RP
 Pro-peptide Y
 Pro-peptide YY
 Pro-galanine

Pro-MCH

PACAP

Autres précurseurs

Pro-collagènes

Humain $\alpha 1$ (XI)

Humain $\alpha 2$ (XI)

Pro-albumine

Pro-protéine C

PACAP RP

Hypocrétine

Pmel-17

Leu-Ala-Asn-Gln-Lys-Arg↓Phe-Ser
 Arg-Pro-Gly-Gly-Lys-Arg↓Asp-Ala
 Arg-Phe-Gly-Arg-Arg-Arg↓Ala-Thr
 Gln-Arg-Tyr-Gly-Lys-Arg↓Ser-Ser
 Gln-Arg-Tyr-Gly-Lys-Arg↓Glu-Val
 Pro-Ala-Lys-Glu-Lys-Arg↓Gly-Tyr
 Gly-Leu-Thr-Ser-Lys-Arg↓Glu-Leu
 Ser-Thr-Gln-Glu-Lys-Arg↓Glu-Ile
 Phe-Pro-Ile-Gly-Arg-Arg↓Asp-Phe
 Arg-Pro-Ala-Gly-Arg-Arg↓Asp-Val
 Glu-Pro-Leu-Ser-Lys-Arg↓His-Ser
 Lys-Asn-Lys-Gly-Arg-Arg↓Ile-Ala

Ser-Lys-Lys-Thr-Arg-Arg↓His-Thr
 Pro-Lys-Lys-Thr-Arg-Arg↓Ser-Val
 Arg-Gly-Val-Phe-Arg-Arg↓Asp-Ala
 Arg-Ser-His-Leu-Lys-Arg↓Asp-Thr
 Ala-Pro-Leu-Thr-Lys-Arg↓His-Ser
 Thr-Leu-gly-Lys-Arg-Arg↓Pro-Gly
 Leu-Arg-Leu-Val-Lys-Arg↓Gln-Val

Séquences du site de clivage TYPE III

P6- P5- P4- P3- P2- P1 P1'-P2'
 X - X - X - X - X - R ↓ X - X

Pro-Protéase

BACE-1
 MMP-2
 MMP-9

Gly-Leu-Arg-Leu-Pro-Arg↓Glu-Thr
 Thr-Met-Arg-Lys-Pro-Arg↓Cys-Gly
 Ala-Met-Arg-Thr-Pro-Arg↓Cys-Gly

Facteurs de croissance

Pro-IGF-1
 Pro-IGF-II
 Pro-EGF (N-ter.)
 Pro-EGF (C-ter.)

Pro-Thr-Lys-Ala-Ala-Arg↓Ser-Ile
 Pro-Ala-Lys-Ser-Glu-Arg↓Asp-Val
 Gly-His-His-Leu-Asp-Arg↓Asn-Ser
 Arg-Trp-Trp-Glu-Leu-Arg↓His-Ala

Glycoprotéines virales

Gp160 VIH-1 (boucle V3)
 Virus de Nipah (F0)
 Influenza pandémie 1918 (HA)

Ser-Ile-Arg-Ile-Gln-Arg↓Gly-Pro
 Leu-Val-Gly-Asp-Val-Arg↓Leu-Ala
 Pro-Ser-Ile-Gln-Ser-Arg↓Gly-Leu

Toxines bactériennes

exotoxine A de *P. aeruginosa*
 toxine de Shiga

Arg-His-Arg-Gln-Pro-Arg↓Gly-Trp
 Ala-Ser-Arg-Val-Ala-Arg↓Met-Ala

Pro-Hormones

Pro-ANF

Arg-Gly-Arg-Ala-Gly-Arg↓Ser-Lys

Pro-neuropeptides

Pro-TRH (178-199)
 Pro-somatostatine (S28)

Arg-Ser-Trp-Glu-Glu-Lys↓Glu-Gly
 Arg-Leu-Glu-Leu-Gln-Arg↓Ser-Ala

Autres précurseur de protéine

Pro-SMR1

Gly-Val-Arg-Gly-Pro-Arg↓Arg-Gln
 Arg-Gln-His-Asn-Pro-Arg↓Arg-Gln

Séquences du site de clivage TYPE IV

P6- P5- P4- P3- P2- P1 P1'-P2'
 X - X - X - X -K/R- R ↓ X -K/R

Facteurs de croissance

Pro-IGF-II

Phe-Arg-Glu-Ala-Lys-Arg↓His-Arg

Pro-récepteurs

Pro-récepteur PTP μ

Glu-Glu-Arg-Pro-Arg-Arg↓Thr-Lys

Pro-hormones

Pro-gastrine-1

Ala-Asp-leu-Ser-Lys-Lys↓Gln-Arg

Pro-glucagon

Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg↓Asn-Arg

Pro-neuropeptides

Pro-substance K

Gln-Leu-Ser-His-Lys-Arg↓His-Lys

1.4. Les convertases de pro-protéines

Les travaux de pionnier avec la levure de boulanger, *Saccharomyces cerevisiae*, ont initié l'identification de plusieurs endoprotéases responsables de la maturation de précurseurs à des sites basiques à travers le règne animal, fongique et végétal. Une souche mutante du gène KEX2 de cette levure est à l'origine de la découverte de cette famille de protéases de la voie sécrétoire. Une souche mutante *kex2* qui ne produit pas de toxine tueuse (*killer toxin*) et de *mating factor- α* (MAT α) actifs, fut isolée. La complémentation de cette souche avec le gène sauvage (KEX2) démontra son rôle critique dans le clivage spécifique de ces deux précurseurs (Julius et coll., 1984). L'analyse de la séquence du gène codant pour la *kex2p* (la *kexine*) révèle que le domaine catalytique de l'enzyme était similaire à ceux des protéases bactériennes à sérine de la famille des subtilisines, suggérant fortement que la *kex2p*, une endoprotéase, et que des homologues de mammifère cliveraient plusieurs peptides hormonaux (Mizuno et coll., 1989). Suivant cet ordre d'idée, on démontra l'activité de la *kexine* envers des précurseurs hormonaux de mammifère (Thomas et coll., 1988). Finalement, sa caractérisation *in vitro* permit la confirmation de son activité enzymatique et de sa spécificité pour des doublets basiques Lys-Arg ou Arg-Arg (Fuller et coll., 1989a).

La séquence de la *kexine* permit la recherche dans les banques de données d'un homologue de mammifère. Le gène *fur* fut identifié puisqu'une forte homologie de séquence existe entre leurs domaines catalytiques (Fuller et coll., 1989b). Le gène *fur* découvert précédemment par Roebroek et al. (1986) tient son nom d'une étude génétique du proto-oncogène *c-fes/fps* (*fur* signifiant *c-fes/fps upstream region*). Rapidement, on démontra que le produit de ce gène, *furin*, (Roebroek et coll., 1986) transformait correctement des précurseurs de facteurs neurotrophiques, des protéines du sérum et des facteurs de pathogènes (Bresnahan et coll., 1990; Wise et coll., 1990; Molloy et coll., 1992).

Par la suite, six autres homologues de mammifères à la kexine, communément appelés convertases de pro-protéines (PC) ont été clonés par des stratégies de PCR (*polymerase chain reaction*) en utilisant des oligonucléotides dégénérés ciblant l'homologie de séquences existant entre les domaines catalytiques de la kexine et de la furine. Ces PCs aux acronymes diverses : furin/PACE/SPC1 (Roebroek et coll., 1986), PC1/PC3/SPC3 (Seidah et coll., 1991; Smeekens et coll., 1991), PC2/SPC2 (Seidah et coll., 1990; Smeekens et Steiner, 1990), PACE4/SPC4 (Kiefer et coll., 1991), PC4/SPC5 (Seidah et coll., 1992; Nakayama et coll., 1992), PC5/PC6/SPC6 (Lusson et coll., 1993; Nakagawa et coll., 1993), PC7/LPC/PC8/SPC7 (Bruzzaniti et coll., 1996; Meerabux et coll., 1996; Seidah et coll., 1996b) représentent les membres classiques de la famille des PCs de mammifères.

Plus récemment, deux autres subtilases de mammifère ont été identifiées : SKI-1/S1P (*subtilisin Kexin isoform 1/site-1 protease*) (Sakai et coll., 1998; Seidah et coll., 1999) et NARC-1/PCSK9 (*neural apoptosis-regulated convertase 1/proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) (Seidah et coll., 2003). La SKI-1 et NARC-1 sont entre autre impliquées dans l'homéostasie du cholestérol intracellulaire puisque SKI-1 régule la translocation au noyau des facteurs de transcription SREBP-1 et -2 (*sterol regulatory element-binding proteins*) (Sakai et coll., 1998), tandis que des mutations du gène PCSK9 sont liées à un type d'hypercholestérolémie autosomique dominante (Leren, 2004; Shioji et coll., 2004; Timms et coll., 2004; Abifadel et coll., 2003) parce qu'il régule négativement l'expression du récepteur des LDL (*low density lipoprotein*) (Rashid et coll., 2005; Maxwell et coll., 2005; Benjannet et coll., 2004; Maxwell et Breslow, 2004).

1.4.1 La phylogénie des PCs de mammifères

Les PCs font partie de la super-famille des subtilisines (subtilases). Ce type de protéases est présent dans une multitude d'organismes dont : les archéobactéries, les eubactéries et les eucaryotes (Siezen et Leunissen, 1997). Siezen et Leunissen (1997) ont

établi une nouvelle classification de la superfamille des subtilases, qui est fondée sur l'homologie de séquence des domaines catalytiques. Les membres de cette superfamille possèdent des peptides signaux à leurs extrémités N-terminales, un domaine pro et un domaine catalytique contenant une triade Asp₁₃₇-His₁₆₈-Ser₂₂₅ (cette numérotation correspond au membre fondateur de la superfamille, la subtilisine BPN') essentielle à la catalyse du lien peptidique.

Cette superfamille est subdivisée en six familles : Subtilisine, Thermitase, Kexine, Pyrolysine, Protéinase K et Lantibiotique peptidases (Figure 6). À ce jour, les seules subtilases identifiées chez les mammifères sont les PCs, SKI-1 et NARC-1. Les PCs faisant parties de la famille Kexine, SKI-1 de la famille Pyrolysine et NARC-1 de la famille Protéinase K (Siezen et Leunissen, 1997; Seidah et coll., 2003).

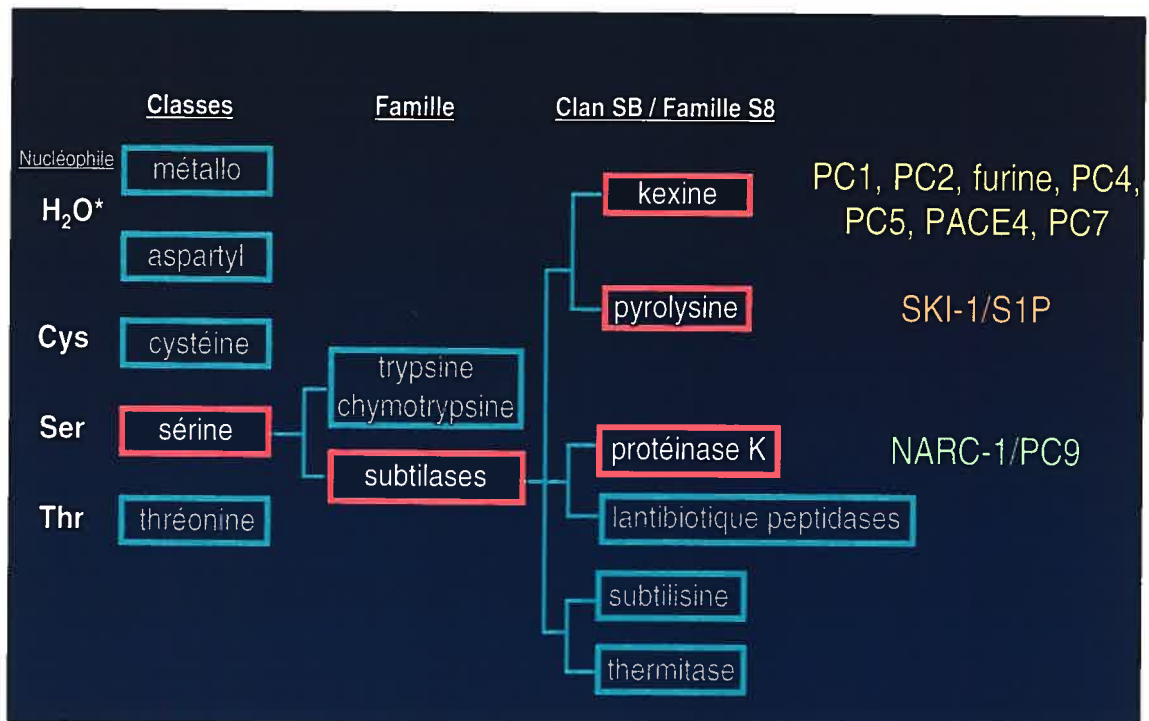


Figure 6 Arbre phylogénétique des familles de subtilases basé sur l'homologie des domaines catalytiques

(Adapté de Siezen et Leunissen, 1997)

1.4.2 Classification des subtilases de mammifères

De façon générale, la distribution tissulaire et cellulaire des PCs a été exhaustivement étudiée par des techniques d'immunocytochimie et d'hybridation *in situ*. Ces travaux permirent de classer les PCs selon leur distribution tissulaire et leur localisation cellulaire. Seidah et collaborateurs (1998), ont proposé une classification des PCs en quatre classes.

La première classe regroupe la furine, PC7 et PC5B (isoforme de PC5 ancré par un domaine transmembranaire) qui se localisent dans la voie sécrétoire constitutive, plus particulièrement aux vésicules dérivées du TGN (Molloy et coll., 1994; De Bie et coll., 1996; Wouters et coll., 1998). Ces convertases sont associées au clivage de plusieurs précurseurs transitant dans la voie sécrétoire constitutive et elles sont exprimées dans plusieurs tissus. On retrouve en abondance la furine dans le foie et la rate, PC7 dans le thymus et PC5B dans le colon, au cortex rénal et au système digestif (Seidah et coll., 1998; Seidah et coll., 1996b). Ces PCs sont d'ailleurs toutes liées aux membranes lipidiques par un domaine transmembranaire de type I et elles possèdent aussi des queues cytoplasmiques intimement associées à leur trafic cellulaire (Thomas, 2002; Xiang et coll., 2000).

La deuxième classe comprend PC1 et PC2, ces convertases sont restreintes aux cellules neurales et endocriniennes (Marcinkiewicz et coll., 1994; Marcinkiewicz et coll., 1993). De plus, leurs formes actives se retrouvent dans les granules de sécrétion matures (Zhou et Lindberg, 1993). Les PCs associées à ces granules spécialisés sont considérées comme PCs de la voie sécrétoire régulée.

La troisième classe comprend PC5 et PACE4, ces enzymes sont aussi bien associées aux cellules endocrines et neurales qu'aux cellules dépourvues de granules de sécrétion (Seidah et Chretien, 1997). L'isoforme soluble de PC5, PC5A peut cependant être ciblé aux granules de sécrétion (De Bie et coll., 1996) ou à un compartiment précoce de la voie

sécrétoire régulée (Villeneuve et coll., 2000; Barbero et coll., 1998) tout comme PACE4A (Mains et coll., 1997). L'activité de ces deux PCs n'en est pas pour le moins restreinte aux cellules du système neuroendocrinien, puisque qu'elles clivent des substrats dans des lignées cellulaires dépourvues de granules de sécrétion (Decroly et coll., 1996; Horimoto et coll., 1994; Seidah et coll., 1996a).

La quatrième classe ne comprend que PC4 dont l'expression est restreinte aux spermatoocytes et à certains macrophages associés aux ovaires (Mbikay et coll., 1997; Tadros et coll., 2001).

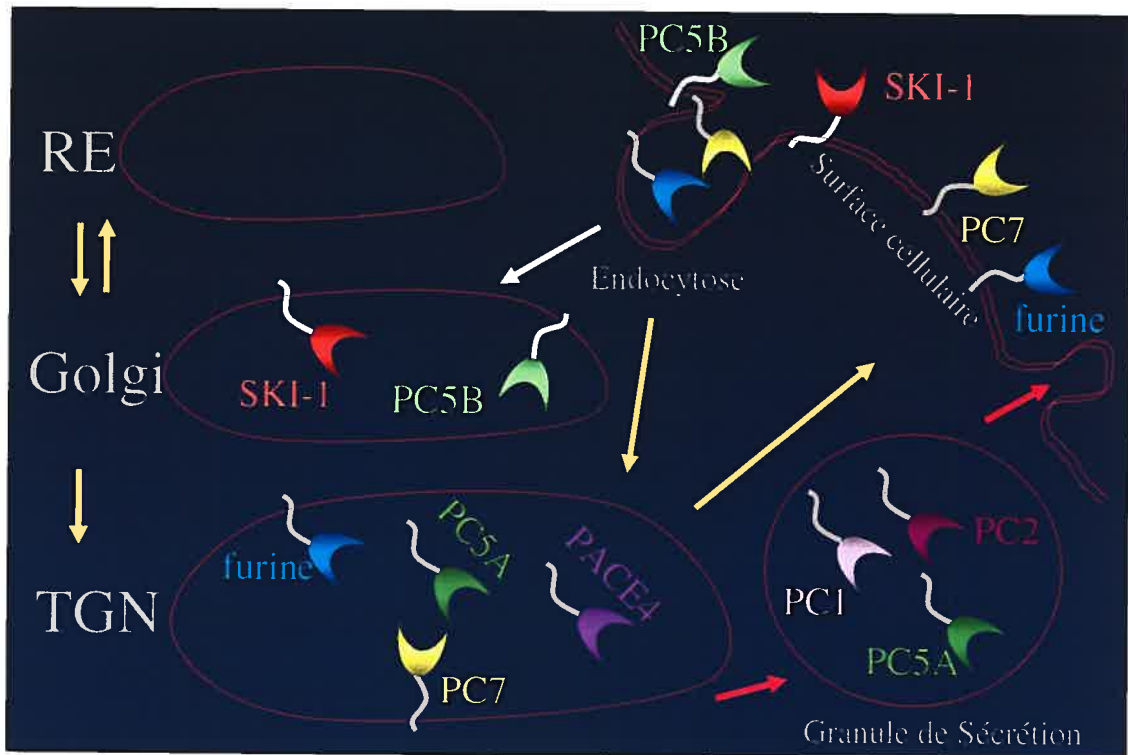


Figure 7 Distribution cellulaire des PCs

1.4.3 La structure primaire des PCs

L'identification des PCs a rapidement mis en évidence leur grande spécificité envers les motifs de clivage basiques. La structure des PCs n'est naturellement pas étrangère à son ancêtre bactérien. Tout comme la subtilisine, elles sont composées en N-terminal d'un peptide signal, d'un domaine pro et d'une unité catalytique. Par contre, des domaines additionnels absents chez son homologue procaryote s'ajoutent en C-terminal du domaine catalytique. Le domaine P ou homo-B est présent chez toutes les PCs de la famille Kexine mais en aval de celui-ci on remarque une grande variabilité. L'épissage alternatif des gènes PC4, PC5 et PACE4 engendre une diversité encore plus grande des régions C-terminales non conservées (domaines C-terminaux).

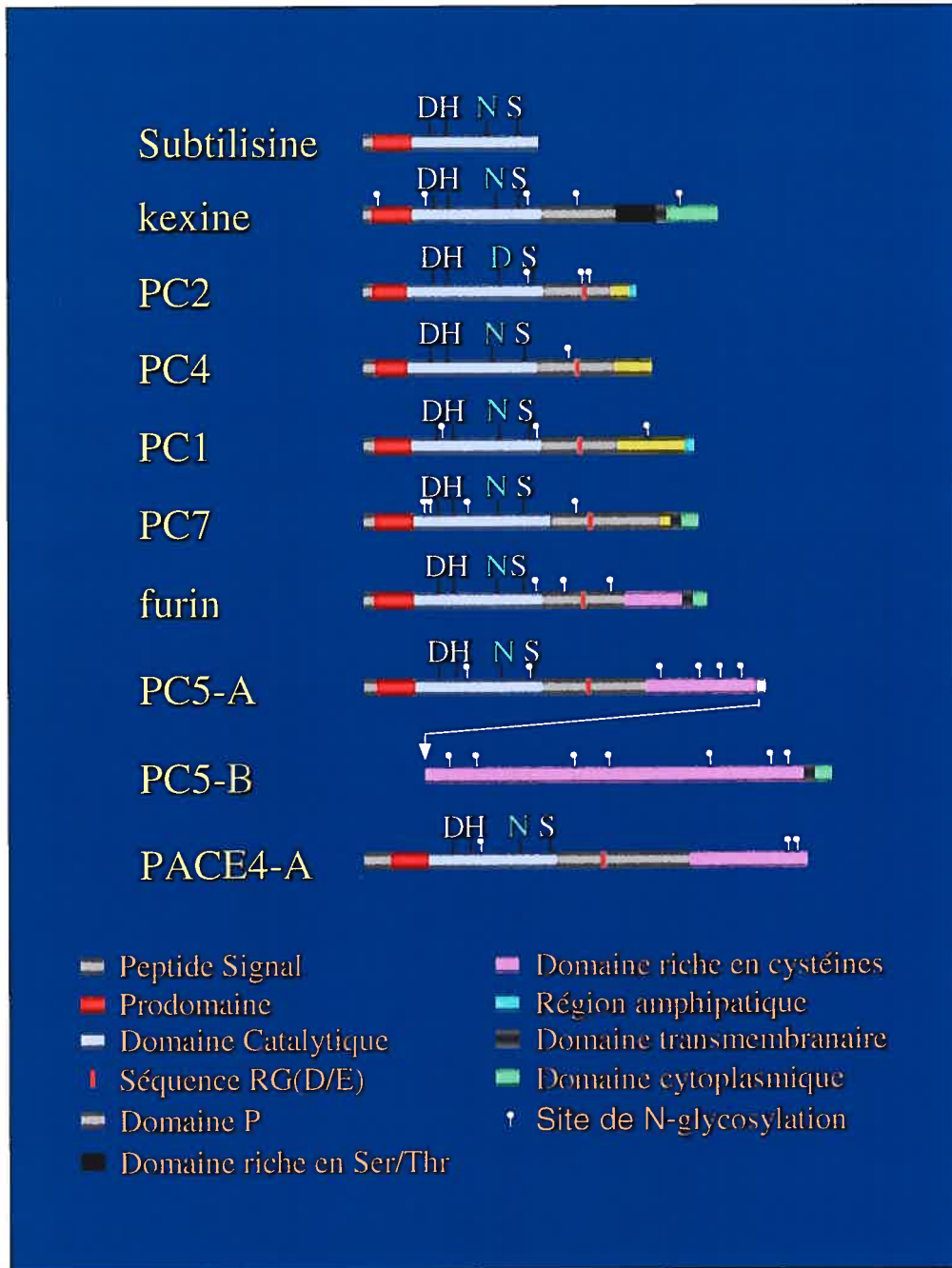


Figure 8 Schéma des domaines des PCs de la famille Kexine

La triade catalytique (DHS) en blanc et l'Asn ou l'Asp de l'oxyanion hole, en turquoise, sont illustrés.

1.4.3.1 Le domaine catalytique

Comme son nom l'indique, ce domaine est directement impliqué dans l'hydrolyse du lien peptidique. Le domaine catalytique des convertases s'étend sur environ 240 acides aminés et il est le plus conservé des PCs. Presque toutes les subtilases sont des protéases à sérine qui clivent des liens amides ou esters par un mécanisme classique dépendant de la triade catalytique Ser (qui fournit l'hydroxyle nucléophile pour l'attaque du lien scissile), His (qui sert de base catalytique pour la déprotonisation de la Ser nucléophile) et Asp (qui stabilise la charge positive de l'His protonné). Lors de l'attaque du lien scissile, la formation d'une charge négative sur l'oxygène du carbonyle est stabilisée par l'*oxyanion hole* qui fournit une paire de liens hydrogènes donateurs à l'atome d'oxygène du carbonyle. Chez la subtilisine et les PCs un des donateurs de ces ponts hydrogène est l'amide du squelette peptidique et l'autre est l'amide de la chaîne latérale d'un résidu Asn conservé de l'*oxyanion hole*.

Suite à la liaison initiale du substrat à la sérine protéase, la première réaction chimique à survenir est l'acylation qui a lieu lors de l'attaque du lien scissile par la sérine catalytique. Par la suite, le produit de la réaction C-terminale au lien scissile est relâché et la Ser nucléophile reste liée par un lien ester au reste du polypeptide (la portion N-terminale). Cet intermédiaire d'enzyme acylée est hydrolysé par une molécule d'eau (déacylation), générant ainsi un produit de clivage N-terminal qui est libéré du complexe enzyme substrat. Contrairement à la subtilisine où l'acylation du substrat est l'étape limite, chez les PCs la déacylation de l'intermédiaire d'enzyme acylée est très lente et elle représente l'étape limite du cycle catalytique (Rockwell et Fuller, 2001). Par contre, les ions potassium favoriseraient la déacylation de la furine et de la kexine par un mécanisme inconnu (Rockwell et Fuller, 2002).

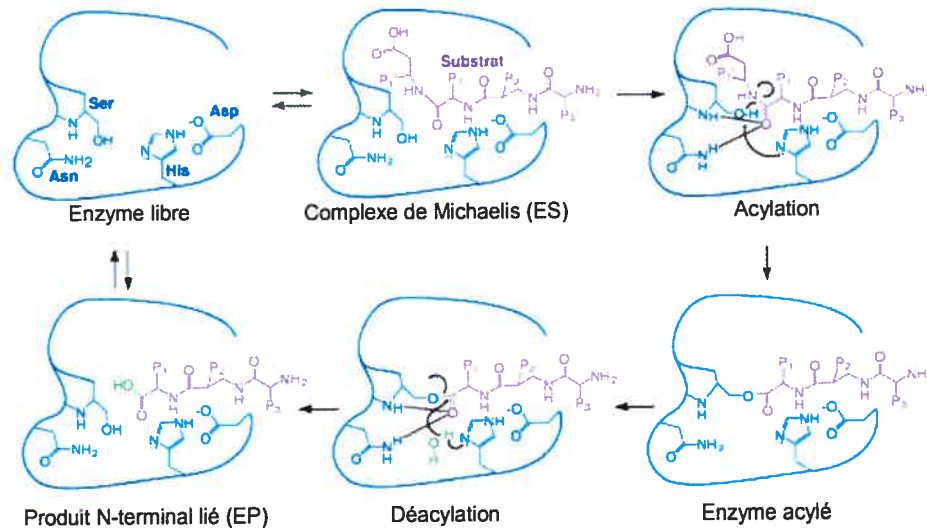


Figure 9 Mécanisme de la catalyse du lien peptidique par les protéases à sérine

Le domaine catalytique est riche en résidus acides au niveau des sites de reconnaissance des substrats, cette particularité expliquerait la spécificité des PCs pour les substrats présentant des motifs riches en résidus basiques (Siezen et coll., 1994; Henrich et coll., 2003; Holyoak et coll., 2003).

1.4.3.2 Le domaine pro

En général, les protéases à sérine sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs (zymogènes) dont la région N-terminale (domaine pro) interagit étroitement en *cis* avec le domaine catalytique. Le domaine pro de la subtilisine BPN' agit à la fois comme chaperon intramoléculaire et d'inhibiteur de l'activité enzymatique (Eder et coll., 1993a;

Eder et coll., 1993b; Matthews et coll., 1975). Le domaine pro de la BPN' permet la transition d'un intermédiaire de repliement en une conformation active (Eder et coll., 1993a). Une fois le repliement de l'enzyme induit, le domaine pro n'est plus nécessaire à la stabilité et à l'activité de l'enzyme mature (Ikemura et coll., 1987); il agit alors comme inhibiteur. L'étape finale de l'activation est l'autolyse du domaine pro qui libère la poche catalytique et permet subséquemment le clivage de substrats en *trans*.

Dans l'ensemble, le mécanisme d'activation des PCs est semblable à la subtilisine. Des résultats expérimentaux mettent en valeur la dualité d'action des domaines pros des PCs comme chaperons intramoléculaires et inhibiteurs réversibles (Boudreault et coll., 1998; Anderson et coll., 1997; Nour et coll., 2003; Lesage et coll., 2000; Lesage et coll., 2001; Fugere et coll., 2002). L'extrémité C-terminale de tous les domaines pros des PCs est délimitée par un motif RXKR, le site de clivage autocatalytique primaire (Tableau 2). Ce motif correspond à la spécificité générale des PCs.

Le domaine pro assiste le repliement de l'unité catalytique en sa forme active, permettant ainsi au zymogène de le couper au site canonique (RXKR). À l'exception de PC2, la coupure du domaine pro au site primaire serait une condition sine qua non à la sortie de l'enzyme du RE (Creemers et coll., 1995). Bien que ce domaine soit clivé au RE, cette seule coupure n'induit pas la dissociation de l'enzyme de son domaine pro (Anderson et coll., 1997). Les travaux d'Anderson et collaborateurs (1997) ont permis d'établir que la coupure à un second site, en amont du site primaire (le site secondaire), s'avère essentielle à l'activité de l'enzyme. Contrairement au site primaire, la coupure du site secondaire est lente et requiert un pH légèrement acide (6.0) et ainsi qu'une forte concentration en calcium (Anderson et coll., 1997). Ces conditions prévalent seulement tardivement dans la voie sécrétoire. À l'instar du site primaire, le clivage au site secondaire est autocatalytique et intramoléculaire mais il peut être aussi intermoléculaire (Anderson et coll., 2002).

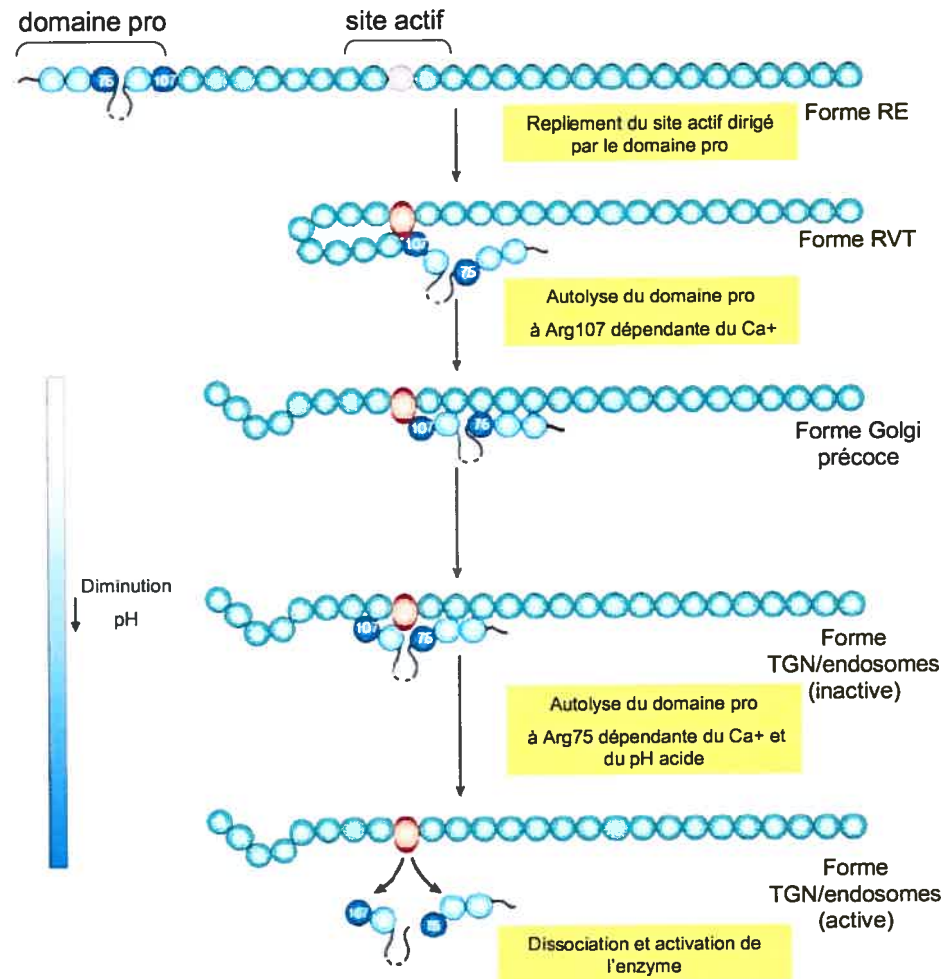


Figure 10 Modèle de l'activation de la furine

Arg107 et 75 correspondent respectivement au P1 du site primaire et secondaire du domaine pro de la furine. (Adapté de Thomas et coll. 2002)

Les domaines pros de SKI-1 et NARC-1 sont également clivés à leurs extrémités C-terminales respectives, RRL↓ pour SKI-1 (Espenshade et coll., 1999; Toure et coll., 2000) et VFAQ↓ pour NARC-1 (Naureckiene et coll., 2003; Benjannet et coll., 2004). Contrairement aux PCs de la famille Kexine, ces coupures ne suivent pas un résidu Arg, mais tout comme les PCs spécifiques aux motifs basiques, les études de différents substrats de SKI-1 permettent de confirmer que le motif de clivage RRL↓ présent en C-terminal de son domaine pro est strictement ou partiellement conservé aux sites de clivage de ses substrats (Toure et coll., 2000; Lenz et coll., 2001; Vincent et coll., 2003; Beyer et coll., 2003; Ye et coll., 2000).

1.4.3.3 Le domaine P

En aval du domaine catalytique se trouve un domaine d'environ 150 acides aminés: le domaine P ou domaine homo B (Wilcox et Fuller, 1991). Absent chez les subtilisines bactériennes, ce domaine serait crucial au bon repliement et au maintien de la structure du domaine catalytique (Ueda et coll., 2003; Henrich et coll., 2003; Holyoak et coll., 2003). De plus, il influencerait le pH optimum et régulerait aussi la dépendance de l'activité au calcium (Zhou et coll., 1998). Le domaine P est essentiel à l'activité intracellulaire des PCs puisqu'une courte délétion et même une mutation ponctuelle de ce domaine peuvent rendre les PCs inactives (Hatsuzawa et coll., 1992; Takahashi et coll., 1993; Gluschankof et Fuller, 1994).

On retrouve dans ces domaines un motif RGD (RGE pour PC7). Le motif RGD est également présent dans certaines protéines de la matrice extracellulaire comme : la fibronectine, le fibrinogène et la vitronectine. Ce tripeptide représente un arrangement d'acides aminés minimal reconnu par certaines intégrines qui adhèrent à ces composantes de la matrice extracellulaire. La fonction du RGD sur l'activité des PCs reste encore nébuleuse. Il fut suggéré que ce motif conservé permet l'interaction spécifique des PCs avec certaines intégrines. Pourtant, aucune interaction intracellulaire ne semble prévaloir entre l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ et PC1 (Rovere et coll., 1999). Par contre, ce motif semble important

pour son trafic puisqu'une mutation du RGD en RGE empêche l'entrée de PC1 aux granules de sécrétion, ce phénomène pourrait être expliqué par une réduction marquée de la stabilité de PC1 (Lusson et coll., 1997).

1.4.3.4 Le domaine C-terminal

Les régions en aval du domaine catalytique sont très variables entre les PCs. Elles peuvent contenir des régions riches en cystéines, des domaines riches en sérine/thréonine, des régions amphipatiques ou des segments transmembranaires de type I suivis de domaines cytoplasmiques (Figure 7). En général, ces domaines régulent la localisation cellulaires des PCs (Seidah et coll., 1998).

Par exemple, les domaines C-terminaux de PC1 et PC2 semblent avoir le potentiel de former des hélices amphipatiques qui les ciblent aux granules de sécrétion (Jutras et coll., 2000; Assadi et coll., 2004). De plus, l'épissage alternatif de la région C-terminale de PC5 contrôle aussi l'adressage de cette convertase aux granules de sécrétion (PC5-A, 915 aa.) ou au TGN (PC5-B, 1877 aa.) (De Bie et coll., 1996; Xiang et coll., 2000). De Bie et coll. (1996) ont noté que PC5A est adressée aux granules de sécrétion tandis que la forme longue se localise majoritairement au TGN des cellules AtT-20. À l'instar de PC1, un court segment (Ala₈₇₂-Gln₉₁₅) de l'extrémité C-terminal contient l'information nécessaire à son entrée dans la voie sécrétoire régulée (De Bie et coll., 1996).

Les PCs peuvent être tronquées de leurs domaines C-terminaux par protéolyse, cette protéolyse peut être autocatalytique, dans le cas de PC1 (Zhou et Lindberg, 1993) ou par d'autres protéases pour PC5A (Nour et coll., résultats non publiés) et la furine (Denault et coll., 2002; Plaimauer et coll., 2001). PC5B et la furine peuvent être aussi clivées à même leurs domaines riches en cystéines, ces coupures les rendent solubles (De Bie et coll., 1996; Xiang et coll., 2000; Plaimauer et coll., 2001). Le rôle précis de cette maturation demeure toutefois inconnu. Finalement, la troncation systématique des domaines C-terminaux n'influence pas l'activité intrinsèque des PCs. (Ueda et coll., 2003; Zhou et coll., 1998; Zhou et coll., 1995).

Les queues cytoplasmiques

Les queues cytoplasmiques des PCs membranaires contiennent des signaux qui les localisent au TGN (Molloy et coll., 1994; Thomas, 2002). Les études sur le trafic cellulaire de la furine réalisées par l'équipe du laboratoire du Dr. Gary Thomas ont grandement contribué à la compréhension du mouvement cellulaire dynamique de la furine entre le TGN, la surface cellulaire, les granules de sécrétion immatures et les endosomes. L'itinéraire parcouru par la furine à travers ces nombreux compartiments explique en partie sa capacité à cliver une grande collection de substrats *in vivo*.

La localisation au TGN

La majorité du pool de furine se retrouve au TGN, cette localisation dépend du motif biparti composé d'un amas local de résidus acides comprenant deux sérines phosphorylables (EECS DSEEDE) par la caséine kinase II (CKII) (Voorhees et coll., 1995) et d'un segment proximal à la membrane comprenant deux motifs hydrophobiques (YKGL et LI) (Teuchert et coll., 1999). Ce signal biparti contrôle les deux étapes d'une boucle cyclique locale du trafic de la furine entre TGN et les endosomes. Le signal proximal à la membrane permet son bourgeonnement du TGN aux endosomes dans des vésicules recouvertes de clathrine, alors que le motif acide phosphorylé permet son retrait des endosomes vers le TGN. Cette concentration locale de la furine expliquerait son activité au TGN sur plusieurs substrats.

Le bourgeonnement du TGN

On connaît peu le mécanisme par lequel la furine bourgeonne du TGN. Cependant, la furine est associée à des régions du TGN enrobées de clathrine grâce aux motifs hydrophobiques qui recrutent des protéines adaptatrices comme l'AP-1, qui en collaboration avec des GGAs (Costaguta et coll., 2001) (*Golgi-localized, gamma-ear-containing, ARF-binding proteins*) permettent probablement le transport de la furine aux endosomes à partir des vésicules recouvertes de clathrine.

Le retrait des endosomes vers le TGN

Le trafic de la furine des endosomes au TGN est beaucoup mieux compris. Le domaine acide phosphorylé par la CKII interagit avec un connecteur de triage, le PACS-1 (*phosphofurin acidic cluster sorting protein-1*). Le complexe la furine-PACS-1 recrute l'AP-1 qui permet le transport de ce complexe ternaire dans des vésicules recouvertes de clathrine. Ces vésicules bourgeonnent des endosomes et fusionnent au TGN. Ce transport des endosomes au TGN nécessite aussi l'ABP-280, une filamine non-musculaire impliquée dans la liaison des filaments d'actine.

PACS-1 est aussi nécessaire au transport des endosomes vers le TGN de plusieurs autres protéines ayant des domaines acides cytoplasmiques comme : PC5B, la glycoprotéine gB du cytomegalovirus humain, la gE du virus de la varicelle zoster, le récepteur du mannose-6-phosphate, la protéine Nef du VIH et VAMP-4 (Thomas, 2002).

L'endocytose

Une proportion significative de la furine endogène se retrouve également à la surface cellulaire (Mayer et coll., 2003) à proximité de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et de la pro-MT1-MMP (*pro-membrane type-1 matrix metalloprotease*), deux substrats de la furine généralement associés à la surface cellulaire (Lissitzky et coll., 2000; Yana et Weiss, 2000). L'ancrage de la furine au filament d'actine par l'ABP-280 diminue son internalisation et par conséquent devrait favoriser sa résidence à la surface cellulaire. Par opposition, le motif YKGL (YXX(L/I)) recrute sélectivement l'AP-2 et permet l'endocytose de la furine dans des puits recouverts de clathrine. Une fois présente dans les endosomes précoces, la furine peut être retournée à la surface cellulaire ou au TGN. La phosphorylation par la CKII du motif acide permet le transport des endosomes précoces à la membrane plasmique tandis que la forme déphosphorylée par la protéine phosphatase 2A (PP2A) est acheminée probablement à des endosomes tardifs intermédiaires où la phosphorylation par CKII permet son transport au TGN. Donc, la furine cyclerait entre le TGN et les endosomes ou

entre les endosomes précoces et la surface cellulaire. Ce transport serait régulé par la phosphorylation du domaine acide.

En conclusion, la localisation cellulaire de la furine active dans le TGN, la surface cellulaire et dans la voie endocytaire influence la compartimentalisation du clivage de ses substrats. Ces travaux nous permettent d'apprécier le trafic cellulaire de la furine et son incidence sur la maturation de ses substrats.

1.4.4 La spécificité des subtilases de mammifères et de la kexine

La localisation cellulaire des formes actives des PCs a naturellement une incidence directe sur la maturation de ces substrats (Thomas, 2002). Une fois co-localisée avec un substrat potentiel, la PC doit reconnaître sa cible et hydrolyser le lien scissile afin d'exposer l'activité du substrat mature. Contrairement à son homologue bactérien, les subtilases de mammifère ne sont pas dites dégradantes ou non-spécifique (Gron et coll., 1992). En d'autres termes, elles possèdent une très forte spécificité envers des substrats arborant des motifs de clivage basiques. L'origine de cette grande spécificité restait théorique (Siezen et coll., 1994) jusqu'à l'obtention récente des structures cristallographiques de la furine (Henrich et coll., 2003) et de la kexine (Holyoak et coll., 2003).

Différentes approches expérimentales ont pu déterminer la spécificité générale des PCs. Ces approches se résument à deux volets, l'approche *in vivo* et *in vitro*. L'approche *in vivo* consiste à muter certains résidus du site de clivage du substrat et d'évaluer l'impact de la mutation sur la protéolyse du substrat dans un type cellulaire donné. De telles études de mutagenèse dirigée permirent la définition des résidus importants au clivage et les préférences des PCs pour des acides aminés particuliers à des positions précises.

L'approche *in vitro* consiste à digérer un précurseur avec la PC isolée où les paramètres expérimentaux sont plus facilement contrôlés. Par contre, certains désavantages sont associés à cette approche car il est souvent difficile d'obtenir une quantité suffisante de

substrat et les conditions nécessaires à l'activité *in vitro* sont empiriques et parfois difficiles à définir. La production de peptides synthétiques reproduisant le site de clivage des certains substrats ou de protéines recombinantes permettent l'obtention des grandes quantités de substrats nécessaires à l'exécution d'études de cinétique enzymatique. Plusieurs peptides modifiés ont été développés pour suivre l'activité enzymatique (génération du produit) des PCs avec un spectrophotomètre ou un spectrofluorimètre (Fuller et coll., 1989a; Jean et coll., 1995). Les résultats obtenus suite à l'utilisation de tels substrats doivent être interprétés avec précaution puisqu'ils peuvent s'éloigner sensiblement du contexte physiologique. Cependant, l'utilisation de tels substrats modifiés permet, avec une grande efficacité et sensibilité, la caractérisation de plusieurs séquences rapidement ainsi que la modification des chaînes latérales.

1.4.4.1 La spécificité des PCs de la famille Kexine

La majorité des travaux qui traitent de la spécificité des PCs furent réalisés avec la furine et la kexine. Ces prototypes des PCs possèdent cependant une spécificité distincte avec certains points en commun, l'importance des résidus de P1, P2 et P4 étant les positions les mieux appréciées. La présence d'une arginine en P1 représente un déterminant pour la furine (Nakayama, 1997; Thomas, 2002). Quant à la kexine, elle préfère également une arginine en cette position mais elle peut aussi s'accommoder d'une lysine (Rockwell et Fuller, 1998). A partir de ces études, la spécificité générale de la kexine a été définie comme étant (Ali/Arg)-X-(Lys/Arg)-Arg↓ (où Ali indique un acide aminé aliphatique), avec comme déterminants principaux la présence d'un résidu basique en P2 et d'une arginine en P1 (Brenner et Fuller, 1992; Fuller et coll., 1989a; Rockwell et coll., 1997). La kexine est moins sélective en P4 que la furine parce qu'elle accepte aussi bien une arginine qu'un résidu aliphatique (Rockwell et Fuller, 1998). Il semble que les substrats de la kexine ne favorisent pas la présence d'aucun acide aminé particulier en P6. Cependant, il a été démontré par la digestion de peptides *in vitro* qu'une arginine en P6 favorise modestement l'activité de la kexine (Krysan et coll., 1999).

La spécificité de la furine a été investiguée par plusieurs groupes et par diverses méthodes. Les méthodes *in vivo* en général consistent en la coexpression d'un substrat donné dans une ligné cellulaire déficiente en activité la furine (ex. LoVo, RPE.40 et FD11) (Takahashi et coll., 1993; Watson et coll., 1991; Gordon et coll., 1997a) avec ou sans complémentation par la furine. La forme précurseur du substrat candidat dans ces cellules devrait disparaître au profit de la forme mature par l'activité de la furine.

La furine possède une distribution cellulaire large et clive une grande variété de précurseurs. Cette grande diversité de substrats ne cesse de croître au fil des ans. Ceci a permis de définir le site de reconnaissance préférentiel de la furine comme étant Arg-X-(Lys/Arg)Arg↓ (Watanabe et coll., 1992) tandis que Molloy et collaborateurs ont défini le motif minimal nécessaire au clivage de la toxine de l'anthrax par la furine comme étant : Arg-X-X-Arg↓. Dans un article de revue, Nakayama (1997) a raffiné le consensus et développé des règles générales sur la spécificité de la furine :

- (i) Une Arg en P1 est essentiel.
- (ii) En plus de l'Arg en P1, au moins deux sur trois résidus en P2, P4, P6 doivent être basiques pour un clivage efficace.
- (iii) En P1', un acide aminé avec une chaîne latérale hydrophobe n'est pas approprié.

Dans les sections suivantes, je discuterai des expériences qui ont permis l'élaboration de la spécificité des PCs, ainsi que de leurs structures cristallographiques.

La spécificité en P1

Jusqu'à présent tous les substrats physiologiques de la furine arborent une arginine en P1. La mutagenèse de l'arginine en P1 entraîne une réduction importante rendant habituellement les produits matures indétectables.

La spécificité en P2

Contrairement à la kexine et PC2, les études biochimiques de la furine ne semblent pas attribuer un rôle primordial aux contacts en P2. Comme indiqué précédemment, le motif minimal postulé par Molloy et collaborateurs, Arg-X-X-Arg↓, ne contient pas de résidus basiques en P2. La nature du résidu en P2 n'en est pas moins importante puisque la majorité des précurseurs clivés par la furine possèdent une arginine ou une lysine en cette position (Tableau 1). La furine ne semble pas préférer l'arginine à la lysine à cette position (Krysan et coll., 1999). De plus, une étude combinatoire a défini un biais favorable envers la proline en P2 (Matthews et coll., 1994). Bien que souvent inessentiel, le rôle d'un résidu basique en P2 augmente significativement l'activité de la furine, et ce plus particulièrement en l'absence d'arginine en P4 (Bravo et coll., 1994; Krysan et coll., 1999).

La spécificité en P4

Tout comme la substitution de l'arginine en P1, les mutations de cette position en d'autres résidus résultent habituellement en une baisse importante des niveaux de clivage des substrats de la furine. Même une mutation d'un arginine en lysine d'un hexapeptide (RARYKR ↓) réduit de 30 fois son efficacité de clivage (k_{cat}/k_m) (Krysan et coll., 1999). De même, des études de mutagenèse de la *pro-insuline-like growth factor* (pro-IGF-IA) démontrent bien la préférence d'une arginine versus une lysine en P4 (Duguay et coll., 1997). Par contre, étonnamment, les travaux de Lazure et collaborateurs (1998) suggèrent que la contribution d'une valine en P4 peut être égale à celle d'une arginine dans le contexte d'un peptide fluorogénique mimant la région du site de coupure du précurseur de l'hormone parathyroïde humaine (pro-PTH, KSVKKR↓SVSEYS). Il faut cependant noter que la lysine en P6 de la pro-PTH est critique à l'efficacité de clivage par la furine (Lazure et coll., 1998). À l'instar de la pro-PTH, deux autres substrats de la furine, le site secondaire de son domaine pro et la pro-albumine sont clivés à la suite d'un doublet basique en présence d'une Val en P4 et d'un résidu basique en P6 (Tableau 1). Par contre,

la mutation de la Val^{P4} du site secondaire du domaine pro de la furine en Arg, la rend environ de 20 à 30 fois plus sensible à la furine (Anderson et coll., 2002), ce qui démontre bien que le contexte global du site de clivage doit être considéré.

La spécificité en P6

Une caractéristique particulière de la furine comparativement à d'autres PCs tient à sa capacité de reconnaître des résidus basiques en P6. L'ajout d'une arginine à cette position de la pro-rénine augmente de 30% la maturation de ce précurseur qui possède seulement un doublet Lys-Arg en P2 et P1 respectivement (Watanabe et coll., 1992). Une étude *in vitro* avec des hexapeptides fluorescents démontra que la furine préfère de 10 fois une Arg à une Ala indépendamment de la nature du résidu en P4, mais qu'elle ne discriminerait pas entre une Arg ou une Lys à cette position (Krysan et coll., 1999). Le fait qu'un résidu basique augmente le rapport k_{cat}/k_m indépendamment de la nature de l'acide aminé en P4 souligne bien l'indépendance du S6 de la furine, un précédant chez les subtilases. En accord avec ces observations, la maturation de la pro-albumine est augmenté par la présence d'une Arg en P6 (Brennan et Nakayama, 1994a).

La spécificité en P'

Les résidus C-terminaux du lien scissile sont souvent négligés des études des PCs. Il reste néanmoins quelques études soulignant la préférence de la furine pour certains résidus en P1'. Par exemple, plusieurs substrats arborent une sérine ou un acide aminé acide à cette position. Par contre, on note une absence en P1' d'acides aminés aliphatiques corpulents comme la valine et la leucine et de résidus basiques en P1' et P2', de tous les substrats de la furine. L'histidine en P1' est par contre parfois présente à cette position dans certains substrats comme le *pro-Brain Derived Neurotropic Factor* (pro-BDNF), la protéine-2 et le procollagène (XI). Un bon exemple de l'intolérance de la furine envers la lysine en P1' vient de l'absence de maturation de la pro-albumine (Brennan et Nakayama, 1994a) et de la

pro-PTH (Lazure et coll., 1998) suite à la substitution de l'acide aspartique (pro-albumine) ou de la sérine (pro-PTH) en lysine. Les résidus acides sont également bien représentés en P1' (Tableau I). Bien que non essentiel au clivage certains résidus en P' favorisent la protéolyse dépendante de la furine (Constam et Robertson, 1999).

La spécificité des autres PCs actives dans la voie sécrétoire constitutive

Les autres PCs de la voie sécrétoire constitutive des mammifères ont été relativement peu étudiées. La présente section présente des spécificités biochimique des autres PCs actives dans la voie sécrétoire constitutive. PC4 a une activité optimale à pH neutre. Elle a la capacité de cliver des substrats avec différents résidus en P4 (Arg, Lys ou Leu) et P2 (Arg, Lys ou Glu) (Basak et coll., 1999; Basak et coll., 2004). La PC4 ne peut pas couper des tripeptides elle nécessite donc un acide aminé aliphatique ou basique en P4 ou un contact étendu avec la chaîne peptidique.

Munzer et collaborateurs (1997) ont déterminés que certaines propriétés enzymatiques de PC7 et démontrent que la spécificité de cette enzyme serait similaire à la furine (P1=Arg, P2=Arg/Lys et P4=Arg/Lys). Dans cet ordre d'idée, PC7 préfère une Arg en P4 à une Lys, et tout comme la furine elle peut cliver des substrats contenant des sites minimaux de la furine (RXXR↓). Il semble qu'un résidu basique en P6 favorise également l'activité de cette PC envers ses substrats mais une investigation plus approfondie serait cependant nécessaire afin de confirmer cette conclusion.

Pour ce qui est de la PACE4, aucune étude détaillée avec une source d'enzyme purifiée n'a été rapportée. Par contre, elle peut cliver des peptides et des zymogènes également clivés par la furine comme : la gp160 d'HIV-1 (Decroly et coll., 1996), la pro-ADAM-17 (Srour et coll., 2003) et la pro-BACE-1 (Benjannet et coll., 2001).

Finalement, une étude préliminaire sur la caractérisation de la spécificité de PC5 a conclut qu'elle pouvait cliver des liens scissiles en aval de résidu Arg et Lys et ce même à

des sites non clivés par la furine (i.e. C-terminal à une Lys) (Cain et coll., 2002). Il faut cependant noter que la préparation utilisée n'était pas enzymatiquement pure puisqu'une activité aminopeptidase fut décelée.

1.4.4.2 La spécificité de SKI-1 et NARC-1

Jusqu'à l'identification de SKI-1 et NARC-1, on présumait que les subtilases de mammifères scindaient seulement des substrats en C-terminal de résidus basiques. La découverte de ces deux nouveaux homologues ont changé ces perceptions (Seidah et coll., 1999; Sakai et coll., 1998; Seidah et coll., 2003).

SKI-1 reconnaît préférentiellement la séquence consensus (RX(V/L)(L/K/R/F/H/T/A)↓ et elle aurait une nette préférence pour une arginine en P4 et un résidu aliphatique en P2 (Tableau 3). Par contre, deux substrats ne présentent pas de résidu aliphatique en P2 ou d'Arg en P4, la pro-somatostatine (Mouchantaf et coll., 2004) et le site de *shedding* de SKI-1 (Elagoz et coll., 2002). Pour la pro-somatostatine un résidu Arg en P6 compenserait probablement l'absence d'une leucine ou d'une valine en P2 (Mouchantaf et coll., 2004). Il semble également qu'à l'instar de la furine, la reconnaissance du substrat s'étende du P7 au P1 puisque la nature de ces acides aminés influencent significativement le clivage des substrats de SKI-1 (Duncan et coll., 1997; Elagoz et coll., 2002; Beyer et coll., 2003). Pour ce qui est de NARC-1, il reste pour le moment difficile d'établir un motif de reconnaissance. Par contre, des études de mutagenèse suggèrent un rôle spécifique à la valine en P4 (Benjannet et coll., 2004).

Tableau 2 Les substrats de SKI-1

Substrat	Site de clivage												
	P8	P6	P4	P2	P2'	P4'							
(h) Pro-SKI-1 site B	R	K	V	F	R	S	L	K	↓	Y	A	E	S
site B'	V	T	P	Q	R	K	V	F	↓	R	S	L	K
site C	R	H	S	S	R	R	L	L	↓	R	A	I	P
(h) SREBP-2	S	G	S	G	R	S	V	L	↓	S	F	E	S
(h) SREBP-1	H	S	P	G	R	N	V	L	↓	G	T	E	S
(h) ATF6	A	N	Q	R	R	H	L	L	↓	G	F	S	A
(h) Luman	G	V	L	S	R	Q	L	R	↓	A	L	P	S
(h) BBF2H7 (CREB3L2)	V	V	R	S	R	N	L	L	↓	I	Y	E	E
(m) OASIS (CREB3L1)	Q	M	P	S	R	S	L	L	↓	F	Y	D	D
(h) CREB-H	R	V	F	S	R	T	L	H	↓	N	D	A	A
(h) proBDNF	K	A	G	S	R	G	L	T	↓	S	L	A	D
(r) Somatostatine	D	P	R	L	R	Q	F	L	↓	Q	K	S	L
Lassa (LAV)	I	Y	I	S	R	R	L	L	↓	G	T	F	T
CCHFV	S	S	G	S	R	R	L	L	↓	S	E	E	S
LCMV	K	F	L	T	R	R	L	A	↓	G	T	F	T

1.4.4.3 Les modèles tridimensionnels expérimentaux et théoriques des PCs

Jusqu'à tout récemment, aucun modèle expérimental de la structure tridimensionnelle d'une PC n'avait été rapporté. En 2003, les structures cristallographiques de la kexine et de la furine complexées avec des inhibiteurs peptidiques furent résolues (Holyoak et coll., 2003; Henrich et coll., 2003). Ces travaux ont enfin permis la rationalisation de plusieurs résultats biochimiques obtenus au cours des vingt dernières

années. Les deux enzymes furent cristallisées sous forme soluble tronquées de leurs domaines transmembranaires et C-terminaux. Il n'existe pas de différence majeure entre les deux structures générales obtenues, à part quelques différences au niveau de la surface des enzymes. De plus, la structure et la topologie des domaines catalytiques sont très similaires à celles de la subtilisine BPN' et de la protéinase K (Rockwell et Thorner, 2004).

Ces deux modèles ont permis d'imager pour la première fois le domaine-P d'une PC, un domaine absent des subtilases dites 'dégradantes'. Les domaines-P de ces PCs sont composés principalement de feuillets β et représentent un nouveau type de structure semblable au *jelly-roll* (Holyoak et coll., 2003; Henrich et coll., 2003). Le domaine catalytique interagit étroitement avec le domaine-P via plusieurs boucles de surface, dont certaines sont impliquées dans la reconnaissance du substrat. La surface d'interaction entre les deux domaines est extensive et implique des interactions hydrophobes et électrostatiques. Henrich et collaborateurs (2003) ont suggéré que ces interactions intimes entre le domaine-P et le domaine catalytique stabilisent ce dernier en protégeant du solvant des régions très hydrophobes.

L'élaboration de ces cristaux a également permis d'établir trois sites de liaisons au calcium pour la kexine (Holyoak et coll., 2003) dont deux sont conservés chez la subtilisine et la protéinase K. Ces mêmes sites seraient également présents chez la furine mais un des sites n'était pas bien résolu suggérant une occupation partielle d'un ion calcium (Henrich et coll., 2003). Le site non-conservé avec ces subtilases bactériennes expliquerait vraisemblablement la grande spécificité des PCs envers une Arg en P1. Ce site de liaison se situe à la base de la pochette du S1 et il est coordonné par deux acides aspartiques conservés chez toutes les PCs spécifiques aux acides aminés basiques, d'un acide glutamique ainsi que de plusieurs molécules d'eau. Cet ion Ca^{2+} joue probablement un rôle clé dans la reconnaissance du substrat puisqu'il maintient vraisemblablement la forme du S1.

Puisque ces PCs furent cristallisées en présence d'inhibiteurs peptidiques d'importantes informations sur la nature des résidus et des interactions régissant la reconnaissance du substrat ont été obtenues (Holyoak et coll., 2003; Henrich et coll., 2003). La pochette de reconnaissance du résidu P1 (le S1) met en valeur la grande coercition avec laquelle ces enzymes clivent sélectivement des substrats avec des arginines à cette position puisque les S1 de la kexine et la furine sont étroits comparativement à la subtilisine (Rockwell et Thorner, 2004). De plus une petite insertion dans les domaines catalytiques des PCs comparativement à la subtilisine agit comme une sorte de couvercle qui se ferme sur la chaîne latérale de l'Arg en P1. Plusieurs résidus de cette pochette font des contacts multiples avec la portion guanidinium de la chaîne latérale de l'Arg. Ces interactions complexes et multiples entre le P1 et le S1 démontrent bien pourquoi les subtilases du groupe de la famille Kexine sont si sélectives envers l'Arg en P1 et pourquoi la Lys ne peut la substituer efficacement.

Contrairement à l'Arg en P1, la reconnaissance des résidus basiques en P2 dépend d'interactions beaucoup plus simples. Le P2 est lié dans un sillon peu profond (S2) via plusieurs ponts hydrogènes et salins (i.e., Asp₁₅₄, Asp₁₉₁, Asn₁₉₂ de la furine) avec la portion chargée de la chaîne latérale de la lysine ainsi qu'avec la chaîne principale. La furine et la kexine ne semblent pas avoir de pochette de liaison pour la chaîne latérale du P3. De plus, ce résidu pointe vers l'extérieur de la surface de l'enzyme, ce qui vraisemblablement influence peu la reconnaissance du substrat (Holyoak et coll., 2003; Holyoak et coll., 2004; Henrich et coll., 2003). Ces données sont en accord avec la contribution limitée de la nature de l'acide aminé en P3 (Krysan et coll., 1999; Lazure et coll., 1998; Rockwell et coll., 1997). Par contre, le résidu basique en P3 pourrait engendrer des contacts favorables avec le groupement carboxylé de l'Asp₂₅₇ de la furine (Henrich et coll., 2003). Des contacts favorables pourraient également être engendré par PC4, PC5 et PACE4 en P3 puisqu'elles possèdent également un acide aspartique conservée à cette position (Henrich et coll., 2005).

Tableau 3 Résidus critiques à la reconnaissance des substrats des PCs (S8-S2')

	S8	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1	S1'	S2'
	R A D	D	E D	E D	E E	E	D N D	D D	R H	W R
	2 2 2	2	2 2	2 2	2 2	2	1 1 1	3 2	1 3	3 2
	6 6 3	6	3 3	5 5	3 6	5	5 9 9	0 5	9 6	2 9
	8 7 3	4	3 0	7 9	6 4	7	4 2 1	6 8	3 4	8 8
Furine	R A D	D	D E	E D	E D	E	D N D	D D	R H	W R
PACE4	R G D	D	D D	D D	E D	D	D N E	D D	K H	W R
PC5	P A D	D	D D	D D	E D	D	D N E	D D	K H	W R
PC4	L G D	D	D A	E D	E D	E	D N E	D D	R H	W L
PC1	R G D	E	D I	N D	E E	N	D N E	D D	K H	W R
PC2	Q H D	D	D P	D D	E D	D	D N G	D D	H H	F Q
PC7	E R D	D	D P	T N	E D	T	D N F	D D	S H	L S
Kexine	D S T	E	T D	A D	E Q	A	D D D	D D	Y H	P T

La numérotation des résidus correspond à la furine. (Adapté de Henrich et coll. 2005)

L'arrangement des résidus du S4 de la furine serait très sélectif envers une Arg en P4 (Henrich et coll., 2003). Contrairement au S1, le S4 de la kexine diffère significativement de celui de la furine (Holyoak et coll., 2004). La déviation de la boucle correspondant à Asp₂₃₀-Ile-Thr-Thr chez la furine rationaliserait cette différence. De plus, selon la structure de la furine le groupement guanidyl du substrat en P4 forme des ponts hydrogènes avec la Glu₂₃₆ et l'Asp₂₆₄, mais la kexine possède seulement la Glu₂₃₆

correspondante, cette différence géométrique de la pochette S4 de la kexine empêcherait des interactions aussi forte avec une Arg en P4. Ces différences sont en accord avec la bi-spécificité de la kexine envers les chaînes latérales aliphatiques et basiques (Rockwell et Fuller, 1998). Les modèles théoriques des autres PCs élaborés à partir de la structure cristallographique de la furine (Henrich et coll., 2005) suggèrent une conformation similaire de leur S4 en comparaison avec la furine, à cet égard, PC1 se rapprocherait davantage de la kexine. Par contre, il existerait des différences subtiles entre les différents S4. Par exemple, l'étroitesse de la pochette S4 de la PC2 favoriserait moins la longue chaîne latérale de l'arginine, ceci diminuerait alors l'importance d'un résidu basique en P4 pour cette enzyme.

L'interaction entre les PCs et leurs substrats s'étende vraisemblablement au delà du S4-P4 et du S1-P1 comme le démontre la structure d'une autre subtilase, la pro-kumamolysine, complexée à son domaine pro (Comellas-Bigler et coll., 2004). La furine en particulier démontre une grande dépendance aux résidus basiques en P6 (Lazure et coll., 1998; Krysan et coll., 1999). Les interactions potentielles en P5 et P6 ont été modélisées pour les PCs (Henrich et coll., 2005). La furine engendrerait des interactions favorables avec le groupement guanidyl en P5 par l'intermédiaire de son Glu₂₅₇ et son Asp₂₅₉ adjacentes. PC4, PC5, PC7 et PACE4 contiennent des résidus similaires à ces mêmes positions ce qui favoriserait la reconnaissance des acides aminés basiques en P5 pour ces PCs (Henrich et coll., 2005). Par contre, PC1 conserve seulement l'Asp₂₅₉ correspondante tandis que PC2 arbore une Thr et une Asn respectivement à ces positions, ceci ne favoriserait pas nécessairement la présence de résidus basiques en particulier pour ces PCs. Le groupement distal de la chaîne latérale du P6 devrait s'intercaler entre la surface de la Glu₂₃₀ et l'Asp₂₃₃ plus éloignée (Henrich et coll., 2003) et en présence d'un résidu court en P4, le résidu en P6 pourrait se replier vers l'arrière, dans la pochette S4. L'Asp₂₃₃ est commune à toutes les PCs sauf pour la kexine (Thr à cette position). Fait intéressant, la mutation de cette Thr chez la kexine en Asp lui permet de reconnaître une Arg en P6 (Rozan et coll., 2004). La Glu²³⁰ est unique à la furine, alors que PC5, PACE4 et la kexine

possèdent une Asp à cette position. Les PCs (PC1, PC2, PC4 et PC7) qui ne semblent pas avoir de préférence pour les résidus basiques en P6 n'exhibent pas de résidus acides en S6 (Tableau 3).

Selon les modèles structuraux des PCs, les S1' et les S2' des PCs accommodent préférentiellement des chaînes latérales acides ou polaires en P1' et les résidus hydrophobes de taille moyenne en P2', ce qui concorde avec les données biochimiques disponibles (Nakayama, 1997; Lazure et coll., 1998). Par conséquent, les mutations non conservatives du P1' entraînent des réductions marquées de l'efficacité de clivage de la furine (Brennan et Nakayama, 1994a; Jean et coll., 1995) et la kexine (Ledgerwood et coll., 1995). Cette préférence pour les acides aminés acides en P1' serait conférée par l'Arg₁₉₃ et l'His₃₆₄ en S1' de la furine, cette histidine étant strictement conservée (Tableau 3). La PC2 ferait exception car elle peut accommoder une Phe ou une Tyr en P1' (Lamango et coll., 1996), il faut noter que contrairement aux autres PCs, la PC2 possède une sérine au lieu d'un acide aminé basique à la position correspondant à l'Arg₁₉₃ de la furine (Tableau 3).

1.4.5 Les structures secondaires des régions comprenant les sites de clivage

Bien que les PCs aient une préférence marquée pour certains motifs basiques, on ne peut extrapoler que la présence d'une tel signature soit suffisante à l'activité des PCs. La complexité des structures secondaires et tertiaires préviendrait le clivage de certaines protéines qui transitent par la voie sécrétoire, même si leur séquence primaire renferme un motif optimal (RX(K/R)R↓) pour la furine. Premièrement, afin d'être clivé, les motifs de clivage doivent être accessibles à la PC, c'est-à-dire, exposés au solvant. Deuxièmement, des travaux de RMN et de cristallographie à rayons-X ont permis de déterminer la structure des sites de clivage de la toxine diphtérique et d'anthrax (Choe et coll., 1992; Petosa et coll., 1997), de l'HA0 d'influenza H5 (mutation R329A) (Chen et coll., 1998) et des

peptides englobants les sites de clivage de la gp160 du VIH (Moulard et coll., 1998) et de la pro-ocytocine (Brakch et coll., 2000). Tous ces sites de coupure se retrouvent dans des tours β ou des boucles Ω qui sont flexibles, mobiles et absentes de structure secondaire comme des hélices α ou des brins β . Le peu de modèles expérimentaux illustrant la structure des sites de clivage est probablement liée à la problématique de la production de précurseurs recombinants parce que l'activité endogène des PCs est présente dans les cellules d'insecte ou de mammifère. Nonobstant, selon ces résultats, il semblerait que l'accessibilité au solvant, la structure secondaire et la flexibilité de la région de clivage représentent des déterminants significatifs à la protéolyse des substrats des PCs.

1.4.6 Les inhibiteurs de PCs

L'intérêt généré par la découverte de plusieurs substrats des PCs impliqués dans diverses pathologies humaines comme la maladie d'Alzheimer, le sida, l'anthrax et le cancer ont incité le développement d'inhibiteurs spécifiques aux PCs. Diverses classes d'inhibiteurs peptidiques et protéiques mimant la spécificité des PCs furent élaborées, dont les plus utilisés sont l' α_1 -PDX et le décanoyl-RVKR-chlorométhylcétone (dec-RVKR-cmk).

Ce dernier est composé en N-terminal d'un acide gras de 12 carbones qui permet sa diffusion à travers les membranes lipidiques, d'un site PC canonique (RVKR) et d'un groupe réactif CMK formant un lien covalent avec le site actif de la PC inhibée. Ce composé de synthèse est un inhibiteur général des PCs puisqu'il n'est pas sélectif envers les différents membres des PCs (Jean et coll., 1998); toutefois la maturation de la glycoprotéine du virus de la fièvre de Lassa clivée par SKI-1 et de la glycoprotéine du virus de Nipah clivée par une convertase inconnue ne sont pas inhibées par ce composé (Lenz et coll., 2001; Moll et coll., 2004). Ces résultats suggèrent que ce composé est sélectif envers les PCs du type Kexine puisqu'il n'inhibe pas la protéolyse effectuée par d'autres subtilases préférant le motif RRLL ou par une enzyme inconnue vraisemblablement d'une autre famille.

L'autre approche consiste à modifier un inhibiteur naturel de l'élastase, la serpine α_1 -antitrypsine (*serine protease inhibitor α_1 -AT*) en un inhibiteur spécifique des PCs. L'idée de modifier cette serpine afin de la rendre spécifique aux PCs vient de l'observation qu'une mutation naturelle dans la boucle réactive de l' α_1 -AT (AIPM en AIPR), la variante Pittsburgh, rend ce mutant actif envers la thrombine (Owen et coll., 1983). Puisqu'il est possible de modifier la spécificité des serpines en mutant leur boucle active, le motif de reconnaissance minimale de la furine (RXXR) a été introduit à l' α_1 -AT Pittsburgh (AIPR) afin d'obtenir une variante très efficace envers la furine soit, l' α_1 -AT Portland (α_1 -PDX) (Anderson et coll., 1993). Bien que l' α_1 -PDX inhibe toutes les PCs de la voie sécrétoire constitutive *in vivo* (Benjannet et coll., 1997), elle est assez sélective envers la furine et PC5 (Jean et coll., 1998; Tsuji et coll., 2002). Dans un même ordre d'idées, les boucles actives de l'églisine C, un inhibiteur de la subtilisine, ou de l' α_2 -macroglobuline, un inhibiteur de protéases du sérum, ont été modifiées en variantes actives envers la furine (Komiya et Fuller, 2000; Van Rompaey et coll., 1997).

Le potentiel inhibiteur des domaines pros des PCs fut également exploité, surtout dans le but d'obtenir des inhibiteurs plus sélectifs. L'étude combinée des domaines pros ou de peptides dérivés de ces derniers ont permis de démontrer leur efficacité (Boudreault et coll., 1998; Zhong et coll., 1999; Fugere et coll., 2002; Nour et coll., 2003; Basak et Lazure, 2003). La majorité du potentiel de ces inhibiteurs se retrouve à leurs extrémités C-terminales (résidus basiques) puisque que la troncation de ce motif basique diminue significativement leurs constantes d'inhibition (K_i) (Zhong et coll., 1999; Muller et coll., 2000; Fugere et coll., 2002; Basak et Lazure, 2003). Malgré ces efforts, les domaines pros sauvages demeurent peu sélectifs envers leur enzyme apparentée (Zhong et coll., 1999; Fugere et coll., 2002; Brakch et coll., 2000). Des tentatives d'optimisation des domaines pros pour les rendre plus sélectifs ont permis d'augmenter modestement leur sélectivité (Nour et coll., 2003). Par contre, la modification du lien scissile d'un peptide inhibitant à la fois PC1 et la furine en un lien aminométhylène non-hydrolysable a permis de le rendre

absolument sélectif à la furine (Villemure et coll., 2003). Cependant on ne connaît pas la sélectivité de ce peptide envers les autres PCs et son efficacité *in vivo*.

1.4.7 Le gradient de pH et de calcium de la voie sécrétoire

Les valeurs de pH prévalant dans la plupart des compartiments de la voie sécrétoire sont significativement inférieures au pH du cytoplasme. Le ciblage de sondes fluorescentes ou de variantes de la GFP (*green fluorescent protein*) sensibles au pH, couplé à des techniques modernes de spectrométrie, a déterminé le pH associé aux organites de la voie sécrétoire (Paroutis et coll., 2004). La figure 10 illustre les valeurs de pH déterminées par ces expériences. Le pH du RE (pH 7,2) est sensiblement le même que celui du cytoplasme. Par contre, les compartiments en aval sont de plus en plus acides. Par exemple, l'organite suivant le RE, le Golgi-*cis*, est déjà plus acide d'environ $\frac{1}{2}$ unité de pH (pH=6,7). Le pH devient de plus en plus bas, au fur et à mesure que l'on s'approche de la surface cellulaire, donc il existe un gradient négatif de pH le long de la voie sécrétoire dont le niveau minimal peut atteindre environ 5,2 aux granules de sécrétion. Ce gradient de pH est également associé à un gradient de calcium positif (Thomas, 2002).

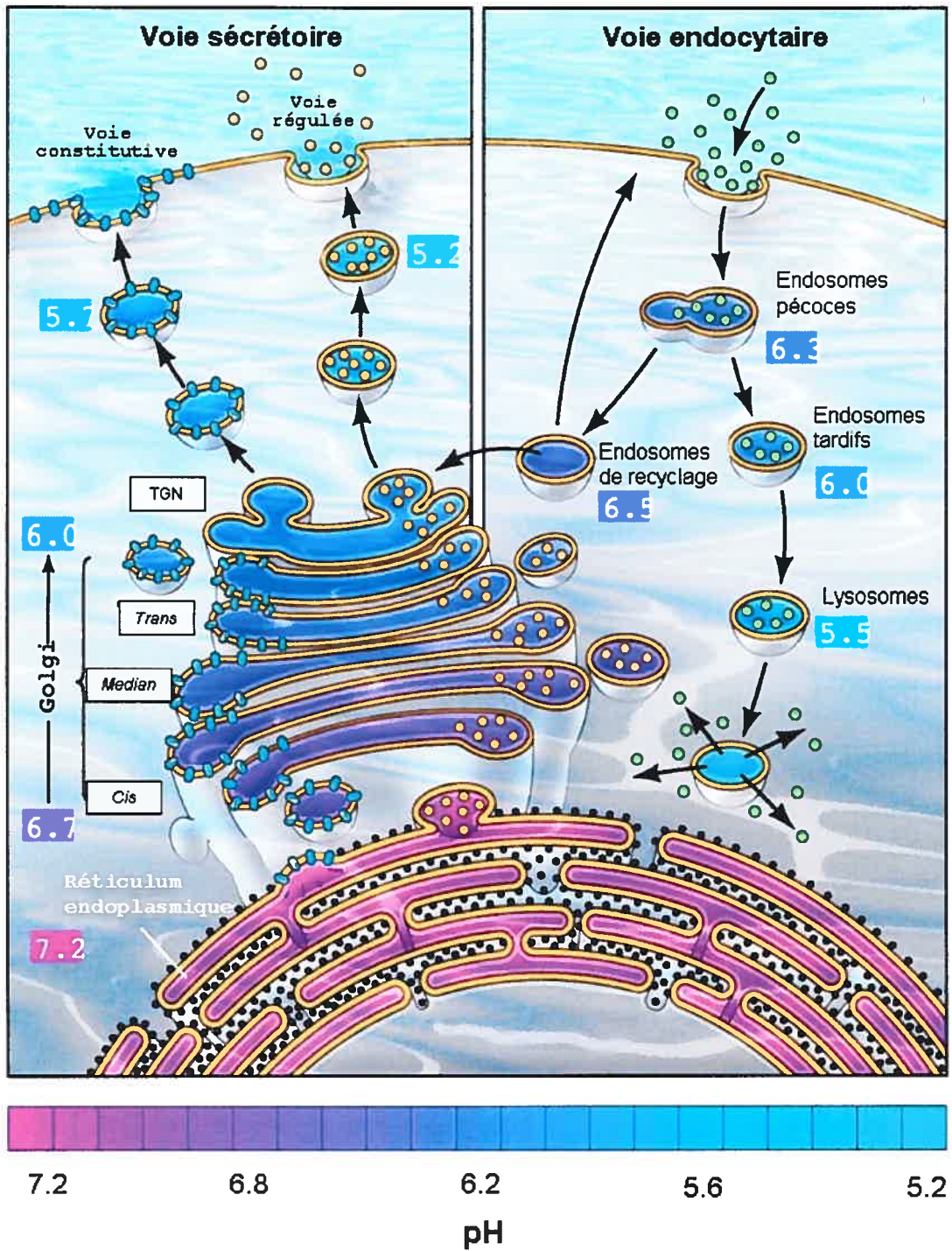


Figure 11 Le gradient de pH de la voie sécrétoire

Le gradient de pH de la voie sécrétoire joue un rôle prédominant dans le trafic cellulaire et la maturation des certaines de protéines de la voie sécrétoire. Lorsque ce gradient de pH est perturbé par l'addition de bases faibles ou d'ionophores, certaines modifications post-traductionnelles sont affectées (Carnell et Moore, 1994), des cargaisons sont mal adressées (Chanat et Huttner, 1991), et l'intégrité de la voie sécrétoire compromise (Kokkonen et coll., 2004; Bachert et coll., 2001). De plus, l'alcalinisation de la voie sécrétoire entraîne la relocalisation aux endosomes de protéines normalement associées au TGN (la furine et TGN38). Étonnamment, ce processus dépend de la queue cytoplasmique de la furine et non de son domaine luminal. Finalement, l'endoprotéolyse de certains substrats des PCs dépend de ce gradient. Par exemple, le clivage de la POMC aux granules de sécrétion est sensible aux agents acidotropes (Schmidt et Moore, 1995).

L'acidité des vésicules de la voie sécrétoire est maintenue essentiellement par l'action des pompes à proton vacuolaires (V-ATPase) (Kawasaki-Nishi et coll., 2003). Le rôle premier de ce complexe d'au moins cinq différentes sous-unités est de transférer les protons du cytoplasme au lumen des compartiments de la voie sécrétoire. L'action de ces pompes peut être inhibée par certains antibiotiques qui bloquent spécifiquement l'hydrolyse de l'ATP nécessaire à l'activité de ces pompes à protons (ex. bafilomycine A1) (Umata et coll., 1990). Le gradient de pH serait maintenu par une augmentation de l'activité des pompes V-ATPases et surtout par la diminution progressive de la perméabilité aux protons des membranes des compartiments distaux (Machen et coll., 2001; Moore et coll., 2002).

1.4.7.1 Le modèle d'activation de la furine

Les gradients de pH et de calcium de la voie sécrétoire sont intimement liés au mécanisme d'activation des PCs. Premièrement, le calcium est essentiel à l'activité des PCs (Fuller et coll., 1989a) et la première coupure du domaine pro des PCs a lieu en présence d'une faible concentration de calcium au RE dans un milieu neutre (Creemers et coll.,

1995). La seconde, plus tardive, requiert un milieu acide et des concentrations de calcium plus élevées, des conditions typiquement associées aux compartiments tardifs de la voie sécrétoire (Anderson et coll., 1997; Muller et coll., 2000). Cette seconde coupure corrèle avec le largage du domaine pro de la furine et avec son activité *in vitro* (Anderson et coll., 1997). Lors du repliement de la furine dans le RE, le domaine catalytique interagirait en premier lieu avec le site primaire de son domaine pro et par la suite, avec l'autre site PC basique en amont (site secondaire) (Figure 8)(Anderson et coll., 2002). Le changement de conformation associés à la coupure du site secondaire n'est pas documenté en détails, mais l'acidité influence le dépliement du domaine pro de la furine (Bhattacharjya et coll., 2001). L'affinité des motifs PC du domaine pro pour le domaine catalytique régit l'ordre par lequel ils sont clivés (site primaire suivi du secondaire) parce que le K_m du site primaire (**Lys-Arg-Arg-Thr-Lys-Arg**↓Asp-Val) est inférieur à celui du site secondaire (**Arg-Gly-Val-Thr-Lys-Arg**↓Ser-Leu) (Anderson et coll., 2002). Anderson et collaborateurs (2002) ont démontré que la mutagenèse du site secondaire en un motif la furine optimal (Val en P4 en Arg) entraîne une diminution marquée de l'autoactivation et de l'activité enzymatique. En accord avec ces résultats, la mutation du P4 (T181R) réduit son activité *in vivo* (Nour et coll., 2003). Anderson et collaborateurs (2002) proposent que l'ordre normal (site primaire suivi du site secondaire) avec lequel le domaine pro assiste le repliement de la furine soit compromis par cette mutation, car le site secondaire muté en un motif de la furine plus favorable, interagirait préférentiellement avec le domaine catalytique au profit du site primaire devenu moins favorable. Ce changement entraînerait la majorité des molécules de la furine vers une voie de repliement non productive. Donc, la présence d'un site optimal au site primaire et d'un motif moins favorable au site secondaire (sans Arg en P4) maintient l'ordre par lequel ils sont clivés ce qui permettrait le bon repliement de la furine. De plus, la seconde coupure serait favorisée par le pH acide qui prévaut plus tardivement dans la voie sécrétoire, ce qui est en accord avec l'ordre normal de coupure du domaine pro selon le compartiment (RE=primaire et Golgi tardif=secondaire) (Anderson et coll., 1997).

1.4.7.2 Les substrats de la voie sécrétoire constitutive clivés à pH acide

L'efficacité de la protéolyse à des sites de coupure comprenant des acides aminés basiques peut être influencée par le pH. Les pH optimaux des PCs furent déterminés avec de courts peptides fluorogéniques (Decroly et coll., 1996; Munzer et coll., 1997; Brenner et Fuller, 1992) sans structure secondaire précise. La conformation de ces peptides ne serait donc pas significativement influencée par le pH. L'activité optimale des PCs de la voie sécrétoire régulée (PC1, PC2) à pH acide (Zhou et Lindberg, 1993; Lamango et coll., 1996) reflète bien l'environnement qui prévaut dans les granules de sécrétion où elles résident. Il fut même démontré que l'acidité des compartiments où transite la POMC régule sa maturation et corrèle avec le niveau d'activation de la PC1 (Schmidt et Moore, 1995). Cependant les PCs de la voie constitutive démontrent des pH optimaux se rapprochant de la neutralité (ex. pH optimal de la furine est d'environ 7,5). Cependant, le pH optimal acide de la furine pour certains substrats suggérerait que dans certains cas la structure du substrat ne permet le clivage qu'à pH acide. Cette contribution du substrat explique probablement la compartimentalisation du clivage de certaines toxines au milieu acide des endosomes plutôt qu'à l'environnement neutre associé à la surface cellulaire.

L'exemple des toxines bactériennes illustre bien la dualité d'action de la furine à la surface cellulaire (anthrax, diphtérique, aérolysine, *Bordetella dermonecrotic toxin*, la toxine- α de *Clostridium septicum*) et aux endosomes (Pseudomonas exotoxine A, toxine SLT-1 de Shiga). L'incubation *in vitro* de ces précurseurs à différents pH a démontré la dépendance du clivage des toxines de Pseudomonas (Inocencio et coll., 1994), et Shiga (Garred et coll., 1995) à pH acide (pH opt=5.5). Par opposition, les autres toxines clivées à la surface cellulaire sont coupées à pH neutre *in vitro* et sont insensibles aux bases faibles acidotropes (Klimpel et coll., 1992; Tsuneoka et coll., 1993; Abrami et coll., 1998; Matsuzawa et coll., 2004; Gordon et coll., 1997b).

Tous les modèles structuraux des toxines clivées à pH neutre par la furine montrent des sites de coupure à l'intérieur de boucles flexibles, peu ordonnées et accessibles à la protéolyse (Petosa et coll., 1997; Choe et coll., 1992). Par contre, la structure de la boucle clivable par la furine de l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* à pH 8.0 est accessible, rigide, et ordonnée (Wedekind et coll., 2001; Allured et coll., 1986). La mutation W281A (P2') de l'exotoxine A engendre une augmentation de sa susceptibilité à la protéolyse (Zdanovsky et coll., 1993) qui pourrait s'expliquer par une flexibilité accrue de la boucle de clivage mutante (Wedekind et coll., 2001) ou par la présence d'un résidu aliphatique favorable à la furine en P2'. La dépendance du clivage au pH ne serait cependant probablement pas liée à cette flexibilité accrue puisque l'introduction d'un motif de clivage plus flexible de la toxine diphtérique (P6-P2') à l'exotoxine A n'affecte pas le pH optimum du clivage par la furine (Chiron et coll., 1997).

D'autres substrats de la furine clivés nécessitent un pH acide. Afin de confirmer cette condition des digestions *in vitro* où le pH est contrôlé sont souvent nécessaires. Seuls trois substrats caractérisés de la furine jusqu'à présent requièrent un environnement acide soit : la pro-albumine (pH 5.0-5.5) (Brennan et Nakayama, 1994b), le site secondaire du domaine pro de la furine (pH 6.0) (Anderson et coll., 1997; Anderson et coll., 2002), et le précurseur M (prM, pH 5.0-6.0) du virus TBE (*tick borne encephalitis*) (Stadler et coll., 1997). L'inhibition des clivages par des bases faibles acidotropes de la pro-albumine et de la prM du virus TBE (Oda et Ikehara, 1985; Heinz et coll., 1994) sont en accord avec les pH optimaux déterminés *in vitro*. Par contre, des concentrations similaires de ces agents n'inhibent pas le clivage de la glycoprotéine F₀ du virus SV5 (Pager et coll., 2004) et du pro-facteur de von Willebrand (Wagner et coll., 1986), d'autres substrats de la furine. Malgré les nombreux substrats de la furine les exemples de substrats acido-dépendants sont rares. La liste pourrait être plus longue, mais peu de travaux se sont intéressés aux pH optimaux auxquels les substrats des PCs sont clivés

1.5. Des nouveaux substrats potentiels des PCs aux motifs de clivages atypiques

À partir des nombreuses études biochimiques sur les PCs, il apparaît évident que la nature des résidus en P1, P2, P4 et P6 influent sur l'activité de la furine. Selon Watanabe et collaborateurs (1992), les substrats de la furine clivés efficacement doivent répondre à quatre règles.

- i) Une arginine en P1 doit être présente.
- ii) Au moins deux résidus basiques (Arg ou Lys) doivent être présents en P2, P4 ou P6.
- iii) Un résidu aliphatique doit être absent en P1'.

Les travaux de mutagenèse du site d'activation de la pro-rénine (Watanabe et coll., 1992) et ceux *in vitro* de Krysan et coll. (1999) confirment l'importance des résidus basiques en P2 et en P6, et la prépondérance de l'Arg en P4 (Molloy et coll., 1992). D'ailleurs, un algorithme prédisant les sites de clivages reconnus par la furine a récemment été développé à partir des séquences de trente-huit substrats identifiés dans la littérature (Duckert et coll., 2004). Cette compilation démontre une incidence élevée de résidus basiques en P1, P2 et P4, par contre en P6 aucun résidu ne se démarque. La faiblesse de cette algorithme est mise en évidence par son incapacité à prédire le clivage de deux substrats atypiques sur trois, sans Arg en P4 (Duckert et coll., 2004). Pour ce qui est des autres PCs il reste difficile de prédire avec précision leur spécificité, mais une Arg en P1 est habituellement importante et les résidus basiques en P2 et P4 favorisent généralement leur activité. Malgré le vaste répertoire de substrats reconnus par la furine, il reste incontestable qu'on ne peut exclure l'éventuelle implication de la furine ou d'autres PCs par la simple absence d'une arginine en P4 du motif de clivage.

1.6. Les intégrines

Les cellules des organismes pluricellulaires adhèrent les unes aux autres et avec la matrice extracellulaire afin de maintenir l'intégrité des organes et des organismes. Différentes familles de molécules d'adhésion participent activement à l'adhésion cellulaire et régulent des processus biologiques et pathologiques, tels l'embryogenèse, la coagulation sanguine, la signalisation cellulaire, la tumorigenèse, la migration cellulaire et la réponse immunitaire. La famille des intégrines participe dynamiquement à l'adhésion des cellules aux composantes de la matrice extracellulaire et à des récepteurs cellulaires. L'engagement des intégrines avec ses ligands entraîne des agrégations locales d'intégrines (points d'adhésion focaux) dans lesquels plusieurs molécules importantes à la signalisation intracellulaire sont recrutées (Martin et coll., 2002). Les intégrines servent donc de liens entre le milieu extracellulaire et cytosquelette d'actine, cette position privilégiée les met au centre des processus d'adhésion et de migration cellulaires.

1.6.1. La structure générale des intégrines

Toutes les intégrines forment des dimères protéiques, contenant une sous-unité α et une β . Jusqu'à présent, 18 chaînes α et 8 chaînes β ont été identifiées chez les mammifères. Il existerait 24 hétérodimères $\alpha\beta$ maintenus ensemble par des interactions non-covalentes (Figure 12). Le poids moléculaire des sous-unités α et β varient de 90 à 180 kDa, elles sont fortement glycosylées et possèdent des segments transmembranaires de type I. Le domaine extracellulaire (ectodomaine) des intégrines permet l'adhésion aux ligands et leurs courts domaines cytoplasmiques relient indirectement le milieu extracellulaire au cytosquelette par différentes protéines cytoplasmiques.

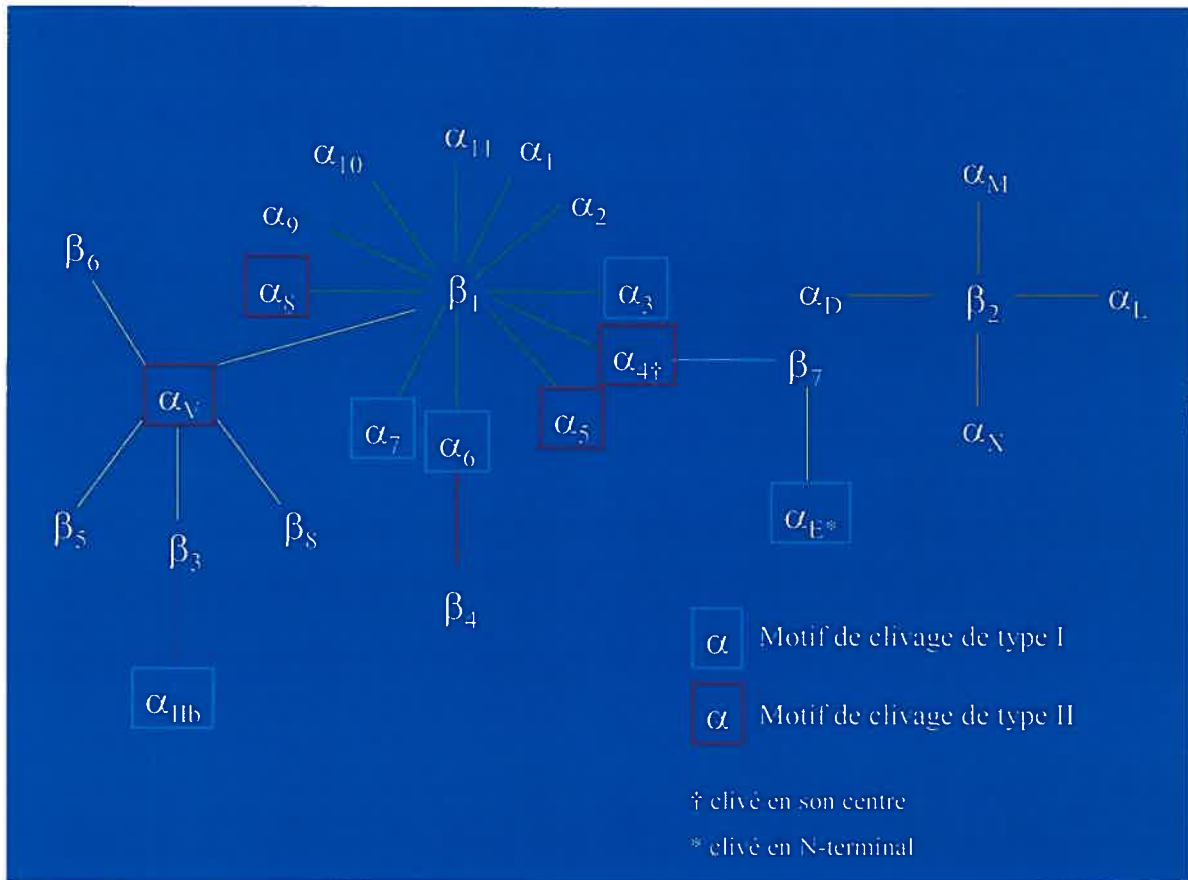


Figure 12 Les dimères d'intégrine mammifères

Les premières analyses des domaines extracellulaires des chaînes α ont révélé la présence de 7 répétitions homologues d'environ 60 acides aminés. Selon les sous-unités α , trois ou quatre répétitions N-terminales présentent des séquences riches en acides aminés acides ressemblant au motif *EF-hand cation binding motif* liant les cations bivalents initialement caractérisé chez la calmoduline et la pro-albumine. De plus, une classe de sous-unités α contient un module polypeptidique additionnel d'environ 200 acides aminés, entre les motifs répétés II et III. Cette insertion, le domaine-I, est homologue au domaine-A du facteur von Willebrand. Le domaine-I contient un motif MIDAS (*Metal Ion Dependiant Adhesion Site*) impliqué dans la coordination de cations divalents et dans la liaison aux

ligands. Du côté cytoplasmique adjacent au segment transmembranaire des chaînes α , on retrouve le motif conservé GFF(K/R)R. La fonction précise de ce motif n'est pas connue mais il influence l'oligomérisation des dimères $\alpha\beta$ (De Melker et coll., 1997).

1.6.2. L'endoprotéolyse limitée des intégrines à des sites typiques (type I) et atypiques (type II).

Comme la majorité des protéines localisées à la surface cellulaire, les intégrines sont synthétisées au RE et transitent par la voie sécrétoire. Les dimères d'intégrines subissent plusieurs modifications post-traductionnelles dont : la glycosylation, la sulfatation, la phosphorylation et l'endoprotéolyse limitée.

Seulement neuf des dix-huit sous-unités α des intégrines sont clivées (α_E , α_V , α_{IIB} , α_3 , α_4 , α_5 , α_6 , α_7 et α_8). Les séquences N-terminales des fragments identifiés de ces intégrines α indiquent un clivage à la suite de doublets d'acides aminés basiques Lys-Arg ou Arg-Arg (Tableau 4). Dans le cas d' α_V , α_{IIB} , α_3 , α_5 , α_6 , et α_8 , leur coupure produit une chaîne lourde, comprenant la majorité des domaines extracellulaires, et une chaîne légère ancrée à la membrane plasmique par une hélice α suivie d'un court domaine cytoplasmique. Les chaînes lourdes et légères sont maintenues ensemble par un pont disulfure. L' α_E est aussi clivée en chaînes lourde et légère mais elle l'est près de son extrémité N-terminale, tandis que l' α_4 se distingue par son endoprotéolyse en deux fragments de taille similaire (80 et 70 kDa) qui sont maintenus ensemble par des interactions non covalentes seulement.

L'importance des résidus basiques en amont des liens scissiles des intégrines fut démontrée par mutagenèse ce qui suggéra une implication possible des PCs dans la maturation des intégrines α . Les motifs de clivage observés chez les intégrines α sont sensiblement différents. Le motif consensuel de la furine (**RX(K/R)R↓**) est présent chez

α_3 , α_6 , α_7 , α_E , α_{11b} et un motif atypique (**HXXX(K/R)R↓**) se retrouve chez les sous-unités α_4 , α_5 , α_V , α_{11b} et α_8 . Ces motifs de clivages sont strictement conservés à travers différentes espèces de mammifères. L' α_{11b} est particulière puisqu'elle possède à la fois une Arg en P4 et une His en P6.

Tableau 4 Alignement de séquences des intégrines α clivées à des sites de type I et II

Type I	P8	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'
α_3	Ser-Ser-Pro-Gln-Arg-Arg-Arg-Arg	↓	Gln-Leu							
α_6	Ser-His-Asn-Ser-Arg-Lys-Lys-Arg	↓	Glu-Ile							
α_7	Asp-Ser-Arg-Asp-Arg-Arg-Arg-Arg	↓	Glu-Ile							
α_{E^*}	Val-Asn-Thr-Ala-Arg-Gln-Arg-Arg	↓	Ala-Leu							
α_{IIb}	Ala-His-His-Lys-Arg-Asp-Arg-Arg	↓	Gln-Ile							

Type II	P8	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'
$\alpha_4 \dagger$	Gly-Pro-His-Val-Ile-Ser-Lys-Arg	↓	Ser-Thr							
α_5	Ser-Leu-His-His-Gln-Gln-Lys-Arg	↓	Glu-Ala							
α_V	Arg-Asp-His-Leu-Ile-Thr-Lys-Arg	↓	Asp-Leu							
α_8	Ile-Ser-His-Tyr-Ile-Arg-Arg-Arg	↓	Glu-Val							

† clivé en son centre
* clivé en N-terminal

Le rôle potentiel de la furine dans la maturation d' α_3 et α_6 (type I) a pu être confirmé par la digestion *in vitro* de précurseurs isolés de cellules LoVo déficientes en la furine (Lehmann et coll., 1996). De plus, Lehmann et collaborateurs (1996) ont démontré que l' α_V (type II) endogène des cellules LoVo était exprimée seulement sous sa forme précurseur. Contrairement aux cellules LoVo, les cellules HT-29-D4 présentent seulement des sous-unités complètement clivées, ce qui suggère que la furine cliverait les intégrine de type I et II. La co-expression de vaccines recombinantes α_V et la furine confirme l'activité de cette PC pour ce motif atypique de protéolyse (Lissitzky et coll., 2000). De plus, ils démontrent avec le même système expérimental que α_5 et α_6 sont aussi clivables par la furine que par

PC5A et PACE4. Il semble donc que les deux types de motifs de clivage des intégrines α clivables soient reconnus par les mêmes PCs. Le contexte des motifs de clivage seraient également critiques pour la protéolyse des intégrines α , puisque la mutagenèse du motif de type I de l' α_6 en motif de type II (HXXXKR↓) bloque sa protéolyse (Delwel et coll., 1997).

Les intégrines α peuvent être divisées en trois sous-familles selon leurs séquences, structures, et fonctions : la première sous-famille comprend des intégrines clivées en C-terminal près de leurs domaines transmembranaires, la seconde, les sous-unités α possédant un domaine-I, et la troisième, les intégrines α ne possédant pas de domaine-I et ne subissant pas de protéolyse limitée en C-terminal. Les intégrines α clivées peuvent lier soit : la fibronectine, la vitronectine, le fibrinogène, la laminine ou le facteur von Willebrand, de façon RGD dépendante (Bosman, 1993). La seconde sous-famille peut être subdivisée en deux : 1) les intégrines qui lient le collagène (α_1 , α_2 , α_{10} , α_{11}) et 2) celles ayant des récepteurs cellulaires de la superfamille des immunoglobulines, soit les intégrines β_2 (α_L , α_M , α_X , α_D). La dernière ne comprend que deux membres : α_4 et α_9 . Bien qu'il existe seulement 39% d'homologie entre ces deux membres, ils adhèrent tous les deux au VCAM-1 (*vascular cellular adhesion molecule-1*) (Miyakawa et coll., 1996; Taooka et coll., 1999). Par contre, seulement l' α_4 peut être clivée.

Les motifs de clivage de la première sous-famille peuvent être corrélés avec la phylogénie des intégrines et leur spécificité (Figure 13). Par exemple, les intégrines qui possèdent un site de protéolyse de type I (typique) peuvent toutes lier la laminine, sauf α_{Ib} et α_E . Cependant, à l'instar des intégrines clivées de type II, l' α_{Ib} possède une histidine conservée en P6 et elle est représentée plus près des intégrines clivées de type II (atypique) dans l'arbre phylogénique des intégrines clivées (Figure 13). L' α_E représente une intégrine particulière parce qu'elle est clivée en N-terminal de son domaine unique, le domaine X (*eXtra domain*) (Kajiji et coll., 1989). Les intégrines α clivées en amont d'un motif de clivage de type II peuvent toutes lier la fibronectine de façon RGD dépendante, les

α clivées de type I, la laminine, et l' α_4 , le VCAM-1. Il apparaît donc plausible que les motifs de clivage des précurseurs ont évolué parallèlement avec la spécificité des intégrines.

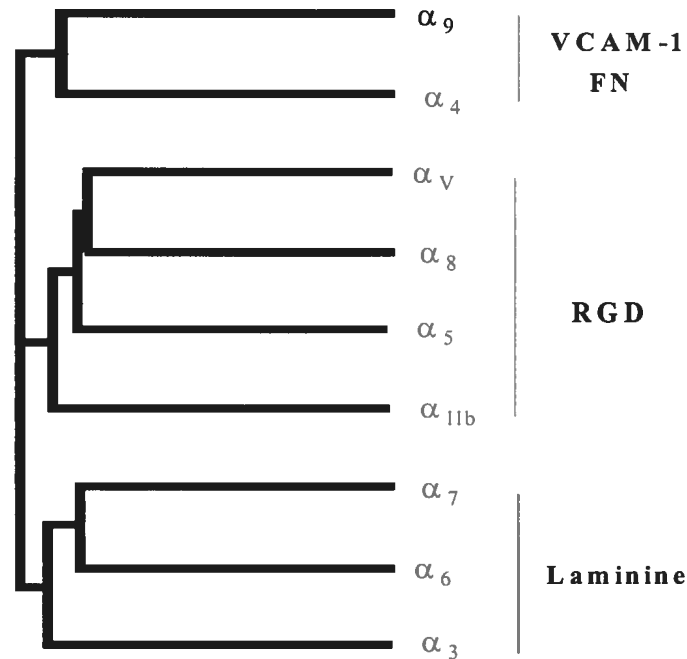


Figure 13 Arbre phylogénétique des intégrines α clivées avec leurs ligands

L'arbre fut généré par l'alignement des séquences des intégrines α humaines clivées avec les programmes PILEUP et GROWTREE de GCG software[©]. N.B. α_9 n'est pas une intégrine clivée, elle a été ajoutée parce qu'elle est apparentée à l' α_4 . Les intégrines colorées en orange possèdent un motif de clivage de type I et celles en pourpre de type II.

1.6.3. Les caractéristiques atypiques de l'intégrine α_4

L'intégrine α_4 est une sous-unité unique à bien des égards, par exemple :

- i) Elle est très peu homologue aux autres intégrines clivées.
- ii) Elle est clivée en son centre plutôt qu'en C-terminal.
- iii) Son niveau de clivage est variable et régulé par la différenciation.
- iv) Elle peut adhérer à la fois à des récepteurs cellulaires et à la matrice extracellulaire.
- v) Elle permet à la fois l'attachement, le roulement et l'adhésion ferme lors de la migration des lymphocytes à travers les vaisseaux activés par des cytokines inflammatoires (Figure 14).

L'intégrine évolutivement la plus la proche de l' α_4 est l' α_9 . Par contre cette dernière n'est pas clivée. Toutefois l' $\alpha_9\beta_1$, tout comme l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ adhère au VCAM-1 (Taooka et coll., 1999). Le motif de clivage de l' α_4 est semblable à celui des autres intégrines de type II à l'exception des résidus P1' et P2' qui sont polaires (\downarrow Ser-Thr) tandis que les autres intégrines clivées de type II arborent un motif (Glu/Asp)-Ali en P1' et P2' (Tableau 4). En plus de former un hétérodimère avec β_1 , l' α_4 s'associe également avec β_7 .

1.6.4. L'expression de l' α_4

L'antigène VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$, *Very late antigen-4*) fut décrit initialement comme un marqueur des cellules lymphoïdes et myéloïdes. La sous-unité α_4 est exprimée également dans d'autres cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques comme : les éosinophiles, les basophiles et dans des cellules tumorales (particulièrement les mélanomes et les rhabdomyosarcomes) (Lobb et Hemler, 1994; Hemler et coll., 1990), sur des cellules adhérentes comme les cellules HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) et HMVEC (*Human Dermal Microvascular Endothelial cells*) (Koch et coll., 1995), et dans des cellules précurseurs de muscles striées (Rosen et coll., 1992).

L'expression de cette sous-unité α est très dynamique. Par exemple, la différenciation des muscles striées, des muscles lisses et des monocytes est accompagnée d'une baisse dramatique de son expression (Rosen et coll., 1992; Duplaa et coll., 1997; Ferreira et coll., 1991). Par contre, l'activation de lymphocytes T CD4+ entraînent une

expression accrue du VLA-4 à la surface cellulaire (Shimizu et coll., 1990), et de l' $\alpha_4\beta_7$ sur une sous-population de lymphocytes CD4+ mémoires migrant préférentiellement aux intestins (Schweighoffer et coll., 1993). De plus, l'expression de l' α_4 sur les lymphocytes activés est réprimée par leur migration au système nerveux central (CNS) (Yednock et coll., 1992; Weller et coll., 1996).

1.6.5. La fonction de l'intégrine α_4

La majorité des études consacrées à l'intégrine α_4 sont de nature immunologique, même si l' α_4 est exprimée dans d'autres tissus et que son expression est essentielle à l'embryogenèse (Yang et coll., 1995). A l'instar des embryons de souris nulles en α_4 (Yang et coll., 1995), ceux déficient en VCAM-1 (Kwee et coll., 1995), le récepteur cellulaire du VLA-4, sont incapables de fusionner les trophoblastes du chorion au mésoderme allantoïque. L' α_4 est aussi au centre de la migration des cellules mononuclées aux sites d'inflammation et à la résidence des lymphocytes activés et mémoires à la plaque de Peyer et à la *lamina propria* des intestins (Lobb et Hemler, 1994).

La migration des leucocytes aux sites d'inflammation survient suite à l'initiation d'interactions spécifiques entre l'endothélium vasculaire et le leucocyte. Le paradigme de la migration leucocytaire nécessiterait une série d'étapes distinctes et séquentielles réalisée par différentes familles de molécules d'adhésion. Selon le modèle initial, l'attachement et le roulement des leucocytes est accompli par des molécules d'adhésion de la famille des sélectines, tandis que l'adhésion ferme et la migration transendothéliale est effectuée par des intégrines (Hynes, 1992). Cependant, ce paradigme a dû être révisé puisque les intégrines $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$ et CD44 (molécule d'adhésion) peuvent aussi permettre l'attachement initial et le roulement des lymphocytes (Alon et coll., 1995; Grabovsky et coll., 2000; DeGrendele et coll., 1996). De plus l'adhésion ferme et la migration *in vivo* des lymphocytes aux sites d'inflammation nécessitent la formation d'un complexe VLA-4-CD44 (Nandi et coll., 2004). L'engagement du VLA-4 à VCAM-1 peut stimuler l'activité

migratrice d'une autre intégrine (*integrin cross-talk*), le LFA-1 ($\alpha\text{L}\beta\text{2}$, *Lymphocyte function associated antigen-1*), qui est un joueur important de la migration transendothéliale. Inversement, la liaison du LFA-1 à ICAM-1 (exprimé sur l'endothélium) réduit l'adhérence du VLA-4 à VCAM-1 (Chan et coll., 2000). Donc, dans le paradigme révisé, le complexe CD44- α4 permettrait l'attachement initial, le roulement et l'adhésion ferme à l'endothélium activé, tandis que le LFA-1 agirait plus tardivement lors de l'adhésion ferme et de la migration transendothéliale (Figure 14).

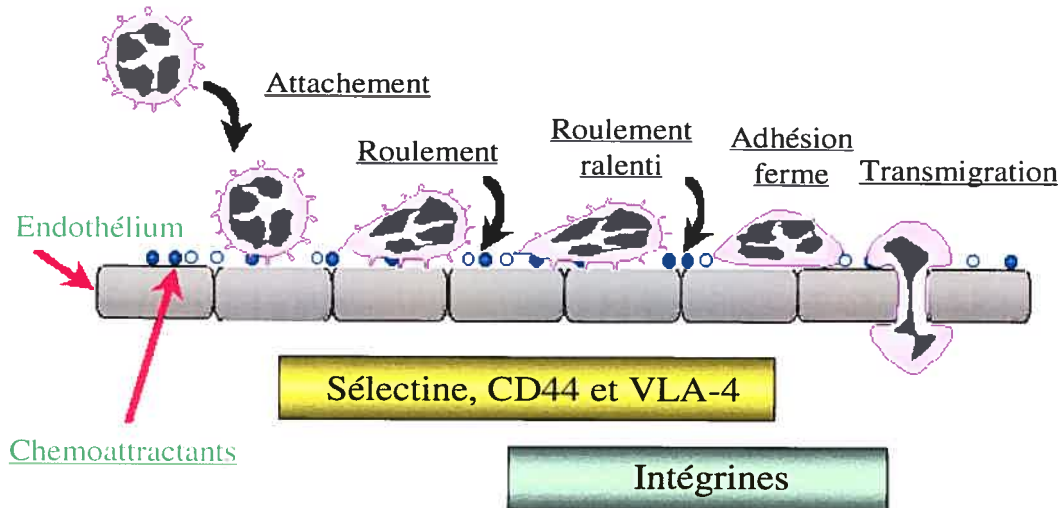


Figure 14 Paradigme révisé de la migration leucocytaire aux sites d'inflammation
(Adapté de Hynes 1992 et Nandi et coll. 2004)

1.6.6. L'endoprotéolyse de l' α4

Contrairement aux autres intégrines clivées, les niveaux de protéolyse observés de cette intégrine sont variables et dépendent du type cellulaire (Teixido et coll., 1992). La

caractérisation biochimique de l'antigène VLA-4 a permis de mettre en évidence l'augmentation de la maturation de la sous-unité α_4 , suite à l'activation *ex vivo* de lymphocytes T CD4+ (Hemler et coll., 1987; Blue et coll., 1993). D'ailleurs, la majorité des lignées cellulaires qui expriment l' α_4 montrent une faible proportion d' α_4 clivée à la membrane plasmique et seules les lignées cellulaires dépendantes de l'interleukine-2 (IL-2) ne montrent pas de précurseurs (pro- α_4) à leur surface. Le poids moléculaire apparent du précurseur sur un gel SDS-PAGE varie entre 150 kDa et 180 kDa selon que cette intégrine est résolue en conditions réductrices (150 kDa) ou non (150 et 180 kDa) (Blue et coll., 1993; Pujades et coll., 1996) et ses fragments de protéolyse sont de 80 kDa (N-terminal) et de 70 kDa (C-terminal). L'endoprotéolyse de l' α_4 aurait lieu au TGN ou aval du TGN parce que la brefeldine A, un métabolite de champignon bloquant le transport du Golgi précoce au Golgi tardif, et la monensine, un composé qui empêche le transport du Golgi médian au TGN, préviennent son endoprotéolyse. De plus, la protéolyse ne semble pas augmenter une fois que l'intégrine a atteint la surface cellulaire (Bednarczyk et coll., 1992). Ces résultats suggèrent que le compartiment associé à la protéolyse de l' α_4 est intracellulaire, au TGN ou à un compartiment post-TGN, ce qui est en accord avec la localisation de la furine, PC5B et PC7.

1.6.7. La fonction du clivage des intégrines α

La caractérisation de la fonction biologique du clivage des sous-unités α des intégrines s'est avérée une tâche ardue, et encore aujourd'hui, elle demeure mal comprise et peu étudiée. Deux approches ont été exploitées avec plus ou moins de succès soit : la mutagenèse des sites de clivage et l'inhibition des PCs avec l' α_1 -PDX ou le dec-RVKR-cmk.

La mutagenèse de l'intégrine α_{IIb} révèle que le blocage de son endoprotéolyse n'affecte pas son adhésion au fibrinogène (Kolodziej et coll., 1991). Des expériences similaires avec l'intégrine α_4 exprimée dans des cellules K562 arrivent à la même

conclusion, soit que le clivage n'affecte pas l'adhésion statique aux ligands du VLA-4 (fibronectine ou VCAM-1) (Teixido et coll., 1992). De plus, l'agrégation homotypique du VLA-4 n'est pas influencée par le clivage de l'intégrine (Teixido et coll., 1992). En accord avec ces résultats, l'adhésion constitutive de l' α_6 à la laminine n'est pas affectée. Cependant l'augmentation de l'adhésion par le phorbole ester (PMA) est beaucoup plus forte lorsque l'intégrine est clivée (Delwel et coll., 1996; Delwel et coll., 1997) mais le mécanisme qui régule l'adhésion stimulée par les intégrines clivées demeure inconnu.

L'inhibition des PCs par l' α_1 -PDX diminue significativement l'adhésion des cellules HT29-D4 dépendantes de l' α_v à la vitronectine (Berthet et coll., 2000). En accord avec ces résultats, l'inhibition du clivage de l' α_v par des oligonucléotides antisens spécifiques à PC5 et par le dec-RVKR-cmk réduisent l'adhésion des cellules vasculaires des muscles lisses (CVML) à la vitronectine (Stawowy et coll., 2004). Par contre, l'adhésion au collagène de type I (Berthet et coll., 2000; Stawowy et coll., 2004) et à la laminine-1 (Berthet et coll., 2000) ne sont pas affectés. L'adhésion des cellules HT29-D4 au collagène interpelle des intégrines α non clivées (ex. α_1 , α_2) et α_6 (clivée) à la laminine. L'effet du PMA (phorbole 12-myristate 13-acétate) dans ce modèle expérimental (HT29-D4-PDX) sur l'adhésion à la laminine n'a cependant pas été publié, limitant grandement les comparaisons avec les études de Delwel et collaborateurs (1996, 1997).

En conclusion, deux groupes ont observé indépendamment que l'inhibition des PCs empêche la phosphorylation de la FAK (*focal adhesion kinase*) induite par la liaison à la vitronectine. Le blocage de la signalisation intracellulaire de l'intégrine non clivée serait à l'origine de l'adhésion réduite de ces cellules à la vitronectine par un mécanisme encore irrésolu. Cependant, la réduction de l'expression de PC5 dans les CVML ou l'inhibition des PCs avec dec-RVKR-cmk réduisent la migration de ces cellules sur la vitronectine (Stawowy et coll., 2004). Par contre, l'inhibition du clivage de l' α_v avec le modèle de cellules HT29-D4-PDX augmente la migration et la formation de métastases α_v -dépendantes (Berthet et coll., 2004; Nejjari et coll., 2004). Selon ces expériences, il semble

que le rôle de la maturation protéolytique des intégrines est variable selon la nature de la sous-unité et les modèles expérimentaux, et reste peu défini.

1.7. Les glycoprotéines des enveloppes virales clivées

Les cibles des PCs ne se limitent pas seulement à des protéines endogènes. En effet, plusieurs glycoprotéines virales sont des substrats des PCs. Les glycoprotéines des enveloppes virales (GP) permettent l'attachement à leurs récepteurs cellulaires et la fusion de l'enveloppe virale avec les membranes plasmiques et/ou internes. Cette fusion lipidique permet l'envahissement de la cellule hôte puisqu'elle libère le génome viral dans le cytoplasme afin que ce dernier se réplique. Plusieurs glycoprotéines virales subissent une endoprotéolyse limitée à des sites comprenant des acides aminés basiques. Cette protéolyse est souvent associée aux PCs, mais d'autres protéases à sérine, comme la tryptase Clara et la plasmine pourraient cliver des glycoprotéines d'influenza sans motif PC apparent (Kido et coll., 1999; Goto et Kawaoka, 1998). En plus des PCs, la subtilase de mammifère SKI-1 clive aussi des glycoprotéines virales appartenant aux genres Arénavirus (Lenz et coll., 2001; Beyer et coll., 2003) et Nairovirus (Vincent et coll., 2003). L'endoprotéolyse des PCs est habituellement nécessaire à la fusion (Klenk et Garten, 1994) et la susceptibilité au clivage est parfois même directement responsable de la virulence de certaines souches d'influenza aviaires (Subbarao et coll., 1998; Chen et coll., 1998; Puthavathana et coll., 2005).

1.7.1 Le mode d'entrée et l'activation des glycoprotéines virales

La première étape de la pénétration du virus dans la cellule hôte est la liaison à un ou plusieurs récepteurs à la surface cellulaire. Ces récepteurs peuvent être des protéines, des hydrates de carbone ou des lipides. Il existe deux voies principales d'entrée dans la cellule hôte : la voie endocytaire et non-endocytaire. La voie endocytaire passe

habituellement par le transport de vésicules ou de puits enrobés de clathrine (Dimitrov, 2004). Certains virus comme le *simian virus-40* (SV40) induisent même une endocytose stimulée au site d'entrée en induisant une polymérisation d'actine locale et le recrutement de dynamine (Pelkmans et coll., 2002). La voie d'entrée non-endocytaire implique la traversée directe de la membrane plasmique suite à la liaison de récepteurs. Les virus qui utilisent la voie non-endocytaire peuvent également entrer par la voie endocytaire (ex. VIH-1) (Sieczkarski et Whittaker, 2002).

Toutes les glycoprotéines fusogènes existeraient à la surface des virus sous une forme métastable dans laquelle, le peptide de fusion, une séquence hydrophobe critique, est caché ou protégé à l'intérieur d'un oligomère de glycoprotéines (Earp et coll., 2005). Suite à l'activation de la glycoprotéine, le peptide de fusion devient accessible et interagit avec la membrane cible. Il existe deux conditions majeures qui permettent l'activation : (1) l'exposition à un pH acide et (2) l'interaction avec des récepteurs cellulaires à pH neutre. Un autre mécanisme en deux étapes fut également rapporté récemment pour l'*avian sarcoma leukosis virus* (ASLV), un alpharétrovirus. La première étape de ce dernier mécanisme consiste en l'amorçage de la fusion avec la liaison du récepteur à pH neutre et d'une étape finale à pH acide (Mothes et coll., 2000; Barnard et coll., 2004; Matsuyama et coll., 2004).

1.7.1.1 L'activation de la fusion à pH acide

Le pH acide des endosomes activeraient la fusion de plusieurs types de virus puisqu'il permet le passage de l'état métastable à une conformation capable d'induire la fusion. La liaison à des récepteurs ne serait pas essentielle, mais elle peut faciliter la fusion des glycoprotéines qui nécessitent un environnement acide. Ce type de fusion nécessite une température typique de 37°C ou supérieure à 22°C. Différentes techniques sont utilisées pour définir si la fusion cellulaire nécessite une activation par acidification. Les agents acidotropes et certains inhibiteurs chimiques sont communément utilisés à ces fins. Par

exemple, un composé d'origine bactérienne, la bafilomycine (un inhibiteur des V-ATPases) bloque le transport actif de protons nécessaires à l'acidification des compartiments acides, et certaines bases faibles comme la chloroquine et le chlorure d'ammonium se concentrent dans les organelles acides. Ces agents entraînent par conséquent la disruption du gradient de pH de la voie sécrétoire et la fusion virale acido-dépendante. L'activation de la fusion d'un virus est généralement considérée comme acido-dépendante lorsque l'entrée de ce dernier est réduite par ces agents.

1.7.1.2 L'activation de la fusion à pH neutre

La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique a lieu à pH neutre. Les glycoprotéines des virus utilisant cette stratégie d'entrée nécessitent l'engendrement d'interactions avec des récepteurs et corécepteurs spécifiques. Ces virus fusionneraient directement avec la membrane plasmique de l'hôte, mais certains virus endocytés fusionnent dans des compartiments neutres (ex. cavéosomes) (Sieczkarski et Whittaker, 2002). Les virus qui fusionnent à pH neutre peuvent également fusionner à pH acide (Earp et coll., 2005).

1.7.2 La classification des glycoprotéines virales

Les mécanismes de fusion des virus enveloppés de familles diverses seraient régis par des règles communes. Il existe deux classes définies de glycoprotéines de fusion, les classes I et II. Les mécanismes et les structures des glycoprotéines diffèrent sensiblement selon la classe à laquelle elles appartiennent. Il y a certaines glycoprotéines qui ne peuvent être catégorisées dans ces classes puisque leur structure et le mécanisme de fusion sont trop divergents (ex. la GP du *vesicular stomatitis virus* (VSV)).

Les glycoprotéines de classe I sont typiquement incorporées aux membranes de l'hôte par un segment transmembranaire de type I et sont subséquemment transférées aux virions par bourgeonnement. Ces glycoprotéines comprennent (a) un peptide signal en N-

terminal qui les dirigent au RE (b) un ectodomaine proéminent (c) une séquence de transfert formant une hélice- α qui les ancrent aux membranes virales ou cellulaires, et (d) une queue cytoplasmique. Ces glycoprotéines sont habituellement scindées par des protéases hôtes en deux sous-unités étroitement associées. Ces protéines forment des homotrimères fortement glycosylés. Une courte région très hydrophobe, riche en résidus glycine et adjacente au site de clivage, le peptide de fusion, est critique à l'initiation de la fusion. Les éléments HR1 et HR2 (*heptad repeat*) sont également conservés et sont directement impliqués dans les changements de conformations nécessaires à la fusion. L'HR1 se retrouve habituellement à proximité en C-terminal du peptide de fusion, et le HR2 près du domaine transmembranaire. Dans le trimère de glycoprotéines, les HRs forment un faisceau de six hélices dans lequel les HR1 s'arrangent en un trimère interne sur lesquels les HR2 s'empilent dans une orientation antiparallèle (Eckert et Kim, 2001). Cette conformation en faisceau représente une structure énergiquement très stable qui ne serait observée qu'après la fusion membranaire.

Par opposition aux glycoprotéines de classe I, celles de classe II forment des hétérodimères. Par exemple, le virus TBE (*tick-borne encephalitis*), un membre de la famille *Flaviviridae*, synthétise deux glycoprotéines, la E contenant les éléments structuraux liés à la fusion, et le précurseur M (prM). La protéine E et le prM dimérisent lors de leur synthèse au RE et la sécrétion dans l'espace extracellulaire des virions recouvertes de ces glycoprotéines coïncide avec le clivage du prM par la furine (Stadler et coll., 1997). Tout comme pour les GP de classe I, cette coupure résulte en la réorganisation des glycoprotéines de surface en une forme métastable essentielle à la fusion (Elshuber et coll., 2003).

Plusieurs études structurales et biochimiques réalisées surtout avec l'hémagglutinine d'influenza (HA) et la glycoprotéine du VIH-1 ont permis d'élaborer un mécanisme par lequel les glycoprotéines de classe I permettent la fusion. Selon ces modèles, ces glycoprotéines sont synthétisées au RE sous forme d'homotrimères non-clivés et non-

fusogéniques. Par la suite, le précurseur est clivé, bloquant ce dernier dans un état métastable. La structure cristallographique de l'HA0 (HA précurseur non-clivé) et HA1-HA2 (hémagglutinine clivée en ses sous-unités N-terminale (HA1) et C-terminale (HA2)) (Figure 15) montre bien le réarrangement local des 18 acide aminés entourant le site de clivage (Chen et coll., 1998). Sous sa forme HA0, ces résidus sont exposés au solvant, repliés en une boucle prolongée et flexible. Suite au clivage, la nouvelle extrémité N-terminale de HA2 se sépare et le peptide de fusion s'enfouit profondément dans une région interne à la base de l'HA (conformation métastable).

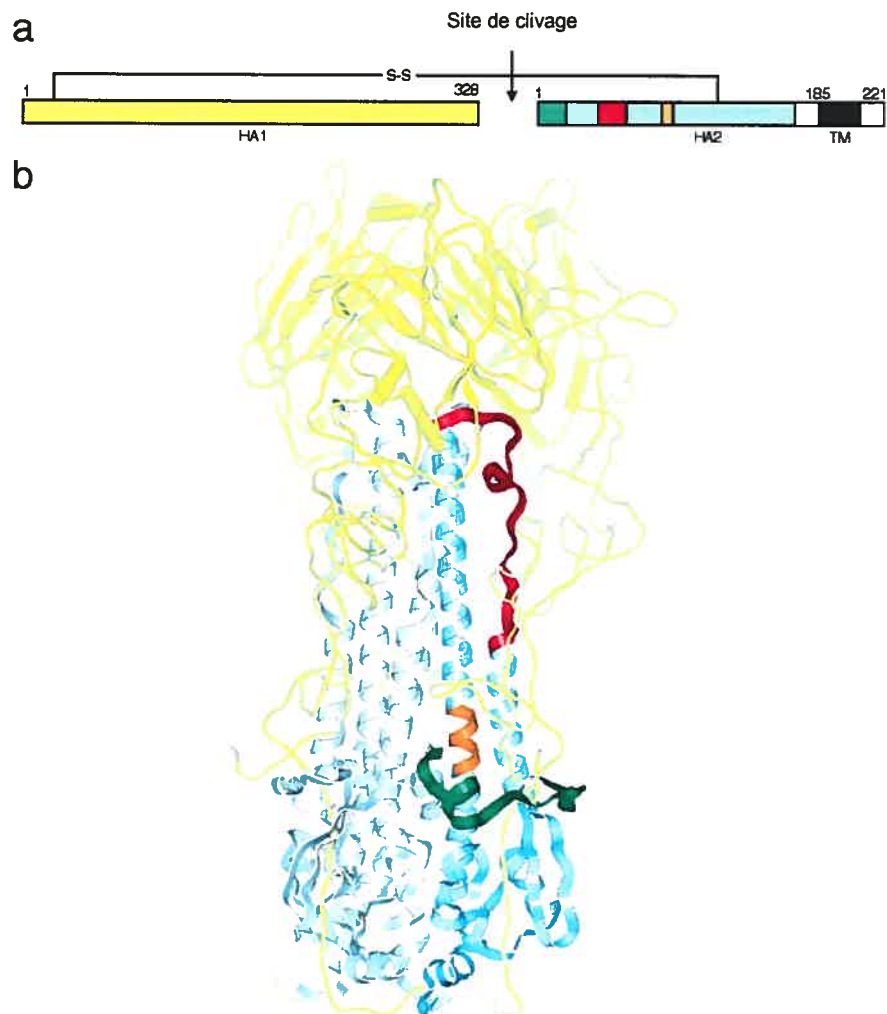


Figure 15 Structure de l'hémagglutinine d'influenza

(a) Représentation schématique de l'hémagglutinine d'influenza. Sont colorés : l'HA1 (jaune), l'HA2 (bleu), le peptide de fusion (vert), le HR1 (rouge) et le HR2 (orange). (b) Structure cristallographique du trimère de HA coloré comme indiqué en (a).

Lorsque ce trimère clivé est exposé à une condition activant la fusion, un changement de conformation radical s'opère. Dans le cas de l'HA, le pH acide des endosomes induit ce changement. Pour ce qui est la gp160 du VIH-1, la liaison à un ou des récepteur(s) peut également induire le passage à une conformation thermodynamiquement plus favorable engendrant la fusion. Cette transition entraîne la libération et même la propulsion du peptide de fusion, de sa position enfouie, vers l'extrémité N-terminale du faisceau formé par les HRs. Le peptide de fusion, maintenant exposé, peut s'insérer dans la membrane lipidique de la cellule de l'hôte. La glycoprotéine virale est à ce moment ancrée à la membrane de l'hôte par le peptide de fusion et à son enveloppe par son segment transmembranaire. Cette conformation représente un intermédiaire de fusion. Ultiment, la fusion des membranes débutera avec la juxtaposition des segments transmembranaires et des peptides de fusion.

1.7.3 Le coronavirus du SRAS

Au début de l'année 2003, le monde a dû faire face à une épidémie de pneumonie sévère dont l'étiologie était inconnue. La province chinoise de Guangdong serait à l'origine de cette épidémie de pneumonie. Cette maladie, le syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS), se propagea rapidement dans 29 pays. La majorité des cas furent cependant rapportés en Asie et dans la région de Toronto (<http://www.who.int/fr>). Les efforts concertés de la communauté scientifique internationale ont permis l'identification rapide de l'agent infectieux du SRAS comme étant un nouveau virus de la famille des Coronaviridæ, le coronavirus du SRAS (CoV-SRAS)(Ksiazek et coll., 2003).

Les coronavirus (CoV) sont des virus enveloppés arborant de grandes projections en forme de massue à leur surface. Lorsque qu'examiné par microscopie électronique l'ensemble de ces projections donnent l'aspect d'une couronne (latin *corona*). Ce genre de virus infecte un large spectre d'hôtes qui s'étend de l'homme à la dinde et est associé typiquement à des infections respiratoires, entériques, hépatiques et du système nerveux

central. Chez l'homme, ils causent principalement des infections respiratoires et sont responsables d'une bonne proportion de tous les rhumes. Les coronavirus sont divisés en trois groupes phylogénétiques. Les seuls coronavirus humains répertoriés font partie du groupe I (229E et NL63) ou II (OC43, HKU1, SRAS). Le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (CoV-SRAS) pourrait former un nouveau groupe (IV) (Ksiazek et coll., 2003), par contre de récentes études phylogénétiques suggèrent la classification de ce nouveau virus au groupe II ou à un sous-groupe du groupe II (Magiorkinis et coll., 2004; Eickmann et coll., 2003; Snijder et coll., 2003).

Le génome du CoV-SRAS est un très long ARN monocaténaire positif de 29.7 kb dont l'organisation ressemble étroitement aux autres coronavirus (Marra et coll., 2003; Rota et coll., 2003). Ce génome contient de longs cadres de lecture qui encodent, entre autre, la polymérase à ARN essentielle à sa réplication et quatre gènes structuraux (S, E, M, N) participant à la formation du virion et huit cadres de lecture qui produiraient des protéines aux fonctions inconnues. Le gène S code pour la glycoprotéine S (aussi appelé *spike* ou glycoprotéine E2), la E pour la protéine de l'enveloppe (*small E*), la M pour la protéine de membrane et le N pour la protéine de la nucléocapside. La co-expression des protéines M et E (Ho et coll., 2004; Mortola et Roy, 2004) ou de M et N (Huang et coll., 2004) permettrait, entre autre, le bourgeonnement viral et l'incorporation de la glycoprotéine S (GPS) dans l'enveloppe virale (Vennema et coll., 1996). La protéine N agit également comme nucléocapside puisqu'elle forme des complexes avec l'ARN génomique. Les coronavirus du groupe II, à l'exception du CoV-SRAS, possèdent un gène structural additionnel, non essentiel, codant pour une hémagglutinine estérase (HE).

1.7.3.1 La glycoprotéine de classe I du CoV-SRAS

La glycoprotéine S du coronavirus du SRAS (GPS-SRAS) favoriserait l'entrée du génome viral dans la cellule par un mécanisme de fusion vraisemblablement similaire aux glycoprotéines virales de classe I décrites précédemment puisque toutes les glycoprotéines

S des coronavirus possèdent des HRs structurellement similaires aux autres familles de virus (Tripet et coll., 2004; Supekar et coll., 2004; Xu et coll., 2004b; Hsu et coll., 2004; Xu et coll., 2004a; Ingallinella et coll., 2004; Zhu et coll., 2004; Liu et coll., 2004). En plus de permettre la fusion virus-cellule, les GPS-SRAS permet également la fusion d'une cellule infectée avec une cellule adjacente. Ceci entraîne la formation de cellules géantes plurinucléées (syncytia) observées chez des patients atteints du SRAS (Nicholls et coll., 2003; Hwang et coll., 2005), les macaques expérimentalement infectés (Kuiken et coll., 2003) et suivant l'infection de cellules en culture (Ksiazek et coll., 2003; Hattermann et coll., 2005). La formation de syncytia est un phénomène commun associé aux infections virales, elle permettrait la propagation rapide du virus de cellule en cellule sans formation de virus matures, par des mécanismes encore nébuleux.

La GPS-SRAS est constituée d'un long ectodomaine séparé en deux sous-unités extracellulaires fonctionnelles (S1 et S2). Très peu d'identité de séquence existe entre les différents domaines S1 des coronavirus, ceci expliquerait l'utilisation de récepteurs cellulaires distincts puisque cette section des GPS permet la liaison aux récepteurs cellulaires (Gallagher, 2001). Dans le cas de la GPS-SRAS, les acides de la région située entre les acides aminés 318 à 510 représentent le domaine minimale de liaison à son récepteur, la métalloprotéase ACE2 (*angiotensin converting enzyme-2*) (Wong et coll., 2004). Un récepteur alternatif, le CD209L, permet également la pénétration cellulaire du CoV-SRAS (Jeffers et coll., 2004).

À l'instar des autres glycoprotéines de classe I, l'extrémité N-terminale de la GP-SRAS contient un peptide signal qui permet vraisemblablement la translocation au RE et la N-glycosylation extensive de la GPS-SRAS à plusieurs sites potentiels (Ying et coll., 2004; Krokhnin et coll., 2003). Les glycoprotéines de coronavirus possèdent toutes un seul segment transmembranaire de type I. Chez les coronavirus des groupes II et III, le clivage des glycoprotéines S délimite habituellement la jonction des domaines S1 et S2 maintenus ensemble par des liens non-covalents, mais l'avidité des interactions entre les sous-unités

peut varier selon la souche (Gallagher, 2001; Gallagher, 1997). Contrairement aux domaines S1, la portion S2 est amplement plus conservée parce qu'elle contient les éléments structuraux (HR) liés à l'activité fusogénique de cette protéine (Tripet et coll., 2004). Puisque la GPS-SRAS possède les motifs fonctionnels HR1 et HR2, on suppose que le mécanisme de fusion serait similaire aux glycoprotéines de classe I. Il faut cependant noter quelques caractéristiques distinctes des GPS comparativement aux autres glycoprotéines virales de classe I.

Premièrement, le clivage protéique de la GPS du virus murin de l'hépatite (MHV) n'est pas immédiatement N-terminal au peptide de fusion prédit (Chambers et coll., 1990; Bosch et coll., 2003). Donc tout comme les GPs du virus Ebola et Marburg (filovirus) et de l'ASLV (*avian sarcoma and leukosis virus*, un alpharétrovirus) (Earp et coll., 2005), les GPS de coronavirus possèderaient un peptide de fusion interne, c'est-à-dire, sans extrémité N-terminale hydrophobe libre capable de s'insérer dans les membranes cellulaires. Le mécanisme de fusion des GPS devrait donc être différent malgré qu'elles partagent certaines caractéristiques des glycoprotéines de classe I clivées près des peptides de fusion. De plus, le clivage des GPS n'a pas été observé chez les coronavirus appartenant au groupe I, ce qui suggère que contrairement aux rétrovirus, orthomyxovirus et paramyxovirus le clivage des GPS par les PCs ne soit pas essentiel à la fusion. Du côté cytosolique, le court endodomaine de la GPS-SRAS influencerait son trafic cellulaire (Lontok et coll., 2004) et son transport à la surface cellulaire (Giroglou et coll., 2004).

1.7.3.2 Les motifs de clivage associés aux GPS.

Plusieurs travaux traitant de la biosynthèse des GPS ont identifié que la plupart subissait une endoprotéolyse limitée à des sites comprenant des acides aminés basiques par une ou des protéases cellulaires inconnues. Le séquençage protéique des produits S2 des GPS des groupes II et III identifia seulement des sites de coupure C-terminal à des résidus arginine (Cavanagh et coll., 1986; Abraham et coll., 1990; Gombold et coll., 1993; Mounir

et coll., 1993; Morita et coll., 1998; Jackwood et coll., 2001). L'alignement des sites de coupure identifiés expérimentalement avec toutes les GPS du groupe II (Tableau 5) et III démontrent la présence de résidus basiques additionnels en amont des liens scissiles, soit : en P2 et P4 et même en P5 (CoV-bovin, CoV-respiratoire canin, CoV-humain HKU1) et P6 (CoV-bovin). Par contre, un tel motif basique n'est pas présent dans cette région de la GPS-SRAS.

Contrairement aux autres groupes, les GPS de coronavirus du groupe I ne semblent pas subir de maturation protéolytique lors de leur synthèse (Wesseling et coll., 1994), suggérant que le clivage n'est pas essentiel à la fusion de ces coronavirus.

Tableau 5 Alignement de séquence des sites de clivage des coronavirus du groupe II

Les séquences des GPS ont été alignées avec CLUSTALW et les flèches indiquent les positions des clivages confirmés expérimentalement.

CoV-SRAS	CASYHT-----VSLLRSTSQKSIVAYTMSLGAD
CoV-respiratoire canin	WGDYST-----QRRSRRTITTGYRFTNFEPFTVNPVND
CoV-bovin	CVDYST-----KRRSRRAITTGYRFTNFEPFTVNSVND
CoV-humain HKU1	CVDYNSPSSSSRRKRRSISASYRFVTFEPFNVSFVND
CoV-humain OC43	CVDYSK-----NRRSRGAITTGYRFTNFEPFTVNSVND
CoV de l'hépatite murine	CVDYVT-----ALRSRRSFTTGYRFTNFEPFAANLVND
CoV de la sialodacryoadénite du rat	CVNYSI-----AHRARRSVSTGYKLTTFEPFTVSIVND

La mutagenèse dirigée (Yamada et coll., 1997; Bos et coll., 1995; Bos et coll., 1997) et l'analyse génétique de mutants des sites de clivage (Yamada et coll., 1997; Gombold et coll., 1993) et de ses révertants (Gombold et coll., 1993) confirment le rôle critique des arginines en P1 et P4 pour le clivage des GPS. De plus, l'absence de résidus défavorables comme Asp en P2 (Gombold et coll., 1993) et la préférence pour une Lys en

P2 (Bos et coll., 1995) favorisent le clivage des GPS du MHV (Tableau 6). Ces résultats correspondent en tous points aux préférences de la furine pour ses substrats. Effectivement, une étude très récente a permis de démontrer que les clivages des GPS des variantes MHV-A59 bien (KSRR \downarrow AHR) ou peu (KSRR \downarrow ADR) clivées (Tableau 6), sont inhibés par le dec-RVKR-cmk (de Haan et coll., 2004). L'ensemble de ces résultats confirme vraisemblablement l'implication des PCs dans la maturation des coronavirus du groupe II.

La maturation des GPS varie aussi selon le type cellulaire et la souche utilisée (Hingley et coll., 1998; Frana et coll., 1985). L'abondance des PCs dans ces lignées cellulaires, et les différents motifs basiques des sites de clivage (Tableau 6) expliqueraient probablement ces observations.

Tableau 6 Alignement des séquences des GPS de différentes souches de MHV

Les niveaux de clivage relatifs observés pour les différentes souches de MHV selon la littérature. Niveaux de protéolyse observés : (ND) non déterminé, (-) non détectable, (+) moins de 20%, (++) entre 20 et 50%, (+++) plus de 50%.

(Souche, numéro d'accession)	Région de clivage	Niveau de clivage
(JHM, gi 465382)	758 CVDYSKSRRARRSVSTGYRLTTFE 781	+++
(2F, gi 6179903)	746 CVNFSLAHRARRSVSTGYKLTTFE 769	+++
(2, gi 1825483)	746 CVNYSTSHRARRSVSTGYKLTTFE 769	-
(A59, gi 7769355)	706 CVDYSKSRRAHRSVSTGYRLTTFE 729	+++
(A59, gi 40806057)	713 CVDYSKSRRAHRLGSTGYRLTTFE 726	ND
(A59, gi 2641129)	706 CVDYSKSRRADRSVSTGYRLTTFE 729	+

1.7.3.3 Le rôle du clivage des GPS

Jusqu'à présent, on ne peut pas confirmer que le clivage des GPS est essentiel à la fusion. Le débat scientifique entourant cette question demeure d'actualité puisque contrairement à la plupart des glycoprotéines de classe I, le clivage n'est probablement pas essentiel à l'infectivité des coronavirus (Taguchi et coll., 1993; Hingley et coll., 2002; de

Haan et coll., 2004). Les coronavirus ne représenteraient pas la seule exception à cette règle, puisque le blocage de la protéolyse des GPs du virus d'Ebola (famille Filoviridae) et du cytomégalovirus humain (famille Herpesviridae) n'empêche pas leur réplication en culture cellulaire (Wool-Lewis et Bates, 1999; Neumann et coll., 2002; Strive et coll., 2002). Il est intéressant de noter que tout comme les coronavirus, certaines glycoprotéines B d'autres virus herpes (ex. *Herpes simplex*) ne sont pas clivées. Néanmoins, la conservation de ces motifs reconnus par les PCs laisse présager une fonction biologique à ces clivages. De fait, la propagation cellule-cellule et la formation de syncytia seraient favorisées par le clivage des GPS (Yamada et coll., 1997; de Haan et coll., 2004; Hingley et coll., 2002).

Chapitre 2. Présentation et objectifs du projet

Il est généralement accepté par la communauté scientifique que l'endoprotéolyse des glycoprotéines dans la voie sécrétoire, en aval de résidus arginine, est une modification tardive réalisée par les PCs. Plusieurs glycoprotéines possédant des domaines transmembranaires de type I sont effectivement clivées par les PCs dans la voie sécrétoire constitutive. Au détriment des autres PCs, la plupart des études qui traitent de la maturation des glycoprotéines membranaires sont limitées à la furine ou à l'utilisation d'inhibiteurs peu sélectifs envers les différentes PCs. De plus, les travaux portant sur la maturation des glycoprotéines par la furine se limitent habituellement aux rôles des résidus P4 ou en aval du P1. Un nombre très limité de publications suggèrent cependant que la furine reconnaît positivement les résidus basiques, tels l'Arg et la Lys en P6 (Krysan et coll., 1999; Lazure et coll., 1998). La récente structure cristallographique de la furine confirme d'ailleurs ces travaux (Henrich et coll., 2003). L'incidence de la nature des résidus en P6 sur l'efficacité de la protéolyse exécutée par les autres PCs actives dans la voie sécrétoire constitutive demeure pratiquement inexistante. Le courant général de pensée actuel veut qu'une arginine en P4 et en P1 soit essentiel à reconnaissance des substrats par la furine, donc le motif RXXR↓ représenterait le consensus minimal.

De même, la subtilase de mammifère SKI-1 démontre une forte préférence pour une arginine en P4 et une leucine est majoritairement présente en P1 ou en P2 chez tous ses substrats (Tableau 2). Le site de *shedding* de SKI-1 (KHQKLL↓) représente un substrat atypique puisque contrairement à ses autres substrats (Tableau 2) ce motif ne présente pas d'arginine en P4. Par contre, le doublet de leucine serait critique (Elagoz et coll., 2002). Donc, nous voulions tester l'hypothèse qu'en absence d'une arginine en P4, d'autres résidus à d'autres positions permettent l'endoprotéolyse de l'intégrine $\alpha 4$ et de la GPS-SRAS à des sites atypiques reconnus par les PCs ou SKI-1.

Nos objectifs consistaient à : 1) identifier des nouveaux substrats des PCs ou de SKI-1 présentant des motifs de clivage atypiques 2) déterminer la ou les PCs reconnaissant les sites de clivage 3) déterminer les résidus qui compensent l'absence de l'arginine en P4 3) établir si la protonation de l'histidine en P6 limite l'endoprotéolyse de l'intégrine $\alpha 4$ 4) explorer le rôle de ces maturations atypiques dépendantes des PCs sur la fonction de l'intégrine $\alpha 4$ et de la GPS-SRAS.

2.1. Problématique article 1

Les intégrines sont synthétisées sous la forme d'hétérodimères $\alpha\beta$. Certaines chaînes α subissent une endoprotéolyse limitée à des sites comprenant des doublets d'acides aminés basiques. Deux types de motifs de clivage consensuels sont présents chez les intégrines clivées (Type I : RX(K/R)R↓ ou le Type II HXXX(K/R)R↓). Ces motifs de clivage se retrouvent habituellement dans la portion extracellulaire proximale au segment transmembranaire des intégrines α . Puisque certaines intégrines sont clivées en C-terminal par les PCs (Lissitzky et coll., 2000), il fallait définir si l'intégrine $\alpha 4$, une intégrine de type II clivée en son centre, était également clivée par les mêmes PCs que les autres intégrines clivées en C-terminal.

Des travaux sur la biosynthèse de l' $\alpha 4$ suggèrent que son clivage a lieu dans un compartiment tardif et acide de la voie sécrétoire. La furine et certaines PCs sont localisées au TGN, un organite tardif et acide de la voie sécrétoire. Afin d'être clivé, un substrat doit rencontrer une forme active de la PC et la structure du site de clivage doit être accessible et se conformer à la spécificité de la protéase. Le motif de type II de l' $\alpha 4$ représentait un motif atypique selon nos connaissances de la spécificité de la furine parce qu'aucune arginine ou lysine ne se retrouve en P4 ou P6. L'histidine conservée chez les intégrines α de type II pourrait être importante pour le clivage de ces intégrines par les PCs puisque la furine reconnaît des résidus basiques en P6. La chaîne latérale de l'histidine est particulière parce qu'elle peut gagner ou perdre une charge positive à des valeurs de pH ($pK_a = 5,6$)

physiologiques. Il est possible que la P6 des sites de clivage des intégrines de type II ne devienne chargée que tardivement dans la voie sécrétoire où le pH est acide. La variation de charge de cette histidine pourrait influencer l'efficacité de clivage de ce type d'intégrines.

2.2. Problématique article 2

Les GPS des coronavirus du groupe II et III sont clivées en deux sous-unités (S1 et S2) à des sites comprenant des acides aminés basiques typiquement reconnus par les PCs de la famille Kexine. Récemment, l'agent infectieux du SRAS, le CoV-SRAS, fut identifié et son génome séquencé. La GPS-SRAS serait apparentée au coronavirus du groupe II selon les plus récentes études phylogénétiques disponibles (Magiorkinis et coll., 2004; Eickmann et coll., 2003; Snijder et coll., 2003). Par contre, l'alignement de séquences des GPS du groupe II avec celles du CoV-SRAS suggère qu'elle n'est pas clivée ou qu'elle l'est par une protéase distincte. L'alignement de la GPS-SRAS (Tableau 5) suggère que la GPS de ce nouveau coronavirus pourrait être clivée par la subtilase SKI-1 à la suite du doublet leucine (HTVSSL⁶⁶⁶), un motif souvent présent chez ses substrats. Par contre, la présence d'une valine en P4 plutôt qu'une arginine suggère que d'autres résidus doivent compenser l'absence d'un résidu favorable en P4, si SKI-1 clive effectivement cette GPS. Alternativement, la GPS-SRAS pourrait être clivée en amont d'un site potentiellement reconnu par la furine (RNTR⁷⁶¹) ou ne pas être clivée du tout.

Chapitre 3. Article 1

(Article publié dans Biochemical Journal (2003), 371, 475-483)


Processing of $\alpha 4$ integrin by the proprotein convertases: histidine at position P6 regulates cleavage

Eric Bergeron, Ajoy Basak, Etienne Decroly et Nabil G. Seidah

Laboratoire de biochimie neuroendocrinienne, Institut de recherches cliniques de
Montréal

Abbreviations used: Abz, 2-aminobenzoic acid; AMC, 7-amino-4-methylcoumarin; BTMD, before transmembrane domain; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ECM, extracellular matrix; ER, endoplasmic reticulum; EGFP, enhanced green fluorescence protein; endoH, endoglycosidase-H; FBS, foetal bovine serum; HRP, horseradish peroxidase; mAb, monoclonal antibody; MCA, 4-methylcoumarin-7-amide; MALDI-TOF-MS: matrix-assisted laser-desorption ionization-time-of-flight MS; PACE, paired basic amino acid cleaving enzyme; PC, proprotein convertase; a1-PDX, a1-antitrypsin Portland; QFP, quenched fluorogenic peptide; RP-HPLC, reverse phase HPLC; RT, reverse transcriptase; TGN, trans-Golgi network; Tyx-A, 3-nitro-Tyr-Ala; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1; VV, vaccinia virus; WT, wild-type.

¹Present address: INSERM U372, Pathogénie des Infections à Lentivirus, Parc Scientifique et Technologique de Luminy, 163 Avenue de Luminy, 13276 Marseille, Cedex 9, France.

²To whom correspondence should be addressed 

Synopsis

The proprotein convertases participate in the limited proteolysis of integrin $\alpha 4$ subunit at the $\underline{\text{H}}^{592}\text{VISKR}^{597}\downarrow\text{ST}$ site, since this cleavage is inhibited by the serpin $\alpha 1\text{-PDX}$. Co-expression of $\alpha 4$ with each convertase in LoVo cells revealed that furin and PC5A are the best pro $\alpha 4$ convertases. In agreement, processing of endogenous pro $\alpha 4$ in CEM-T4 cells was greatly enhanced in stable transfectants overexpressing either enzyme. In many leucocyte cell lines, the expression of furin closely correlated with the endogenous processing efficacy, suggesting that furin is a candidate pro $\alpha 4$ convertase. Mutational analysis showed that replacement of P1 Arg⁵⁹⁷ by Ala (R597A) abrogated cleavage, whereas the P6 mutant H592R is even better processed by the endogenous convertases of CHO-K1 cells. *In vitro* kinetic studies using synthetic peptides confirmed the importance of a positively charged residue at P6 and showed that wild type $\alpha 4$ processing is best performed by furin and PC5A at acidic and neutral pHs, respectively. Biosynthetic analysis of pro $\alpha 4$ and its H592R and H592K mutants in the presence or absence of the weak base, NH_4Cl , revealed that the P6 His renders its processing by furin sensitive to cellular pH. This suggests that pro $\alpha 4$ cleavage preferentially occurs in acidic compartments. In conclusion, while the accepted furin processing motif is R-X-(K/R)-R \downarrow , our data further extends it to include a regulatory His at P6 in precursors lacking a basic residue at P4.

INTRODUCTION

Integrins form a family of cell surface heterodimeric $\alpha\beta$ adhesion receptors that regulate cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) protein interactions. They play a critical role in various homeostatic processes, including embryogenesis, tissue remodeling, thrombosis and leukocyte migration, and are involved in diseases such as cancer and inflammatory pathologies [1]. So far, 18 α and 8 β subunits are known and can form 24 distinct non-covalent $\alpha\beta$ heterodimers [2]. Of these, two $\alpha4$ -containing receptors have been described: $\alpha4\beta1$ and $\alpha4\beta7$. Expression of $\alpha4\beta1$ is restricted to leucocytes and some adherent cells [3]. Nevertheless, its expression is critical for mouse cardiac and placental development [4]. The other dimer, $\alpha4\beta7$, is only present in a specialized subset of lymphocytes that migrate to the gut mucosa [5]. *In vivo*, $\alpha4\beta1$ and $\alpha4\beta7$ bind the vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) [6] and the mucosa addressin cell adhesion molecule-1 (MadCAM-1) [5], respectively. In addition, they both bind the connective segment-1 of the alternatively spliced V region of fibronectin [7].

Nine out of the 18 α subunits ($\alpha3$, $\alpha4$, $\alpha5$, $\alpha6$, $\alpha7$, $\alpha8$, αv , αE and αIIb) undergo post-translational endoproteolytic cleavage at a site comprised of pairs of basic amino acids (Figure 1). This site is usually close to the C-terminal transmembrane domain, except for αE and $\alpha4$ where it is at the beginning and in the middle of their ectodomain, respectively. Unlike the other cleavable α integrins, pro $\alpha4$ (150 kDa) endoproteolysis generates N-terminal (80 kDa) and C-terminal (70 kDa) products that are held together non-covalently (Figure 1) [9, 10]. To our knowledge, only processed forms of cleavable α subunits are present at the cell surface, except for $\alpha4$ whose processing seems to be regulated. For example, quiescent T lymphocytes express $\alpha4$ mostly as an unprocessed chain at their cell surface, whereas upon their *ex vivo* activation with phytohemagglutinin and interleukin-2 only fully processed $\alpha4$ is detected at the cell surface [8, 10].

Recently, the crystal structure elucidation of the $\alpha v\beta3$ extracellular portion allowed the visualization of its overall 3D structure as an ovoid “head” with two highly flexible “tails”

which would extend to the plasma membrane in the native integrin [11]. The head is formed by the seven-bladed β -propeller of αv and the A-domain of $\beta 3$, and is directly responsible for ligand binding [11], while the tails are required for outside-in and/or inside-out signal transduction [12]. According to this crystal structure, the αv cleavage site (Arg⁸⁹⁰) would be close to the membrane [11]. In contrast, based on the $\alpha 4 / \alpha v$ alignment (*not shown*), the $\alpha 4$ processing site would be in a loop in the upper part of the tail, at the interface with the head, suggesting that $\alpha 4$ cleavage may affect head movement and/or flexibility.

Alignment of the cleavable α integrin sequences (using pileup and growtree GCG programs) suggested the existence of two phylogenetic groups that present distinct consensus cleavage sites: R-X-(K/R)R↓ for group I members ($\alpha 3$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ and αE) and H-X-X-X-(K/R)R↓ for group II members ($\alpha 4$, $\alpha 5$, αv , $\alpha 8$ and αIIb) (Figure 1). Thus, the presence of a P4 Arg or a P6 His are distinguishing features of each group, except for αIIb (group II) that exhibits both of them. Furthermore, group I members were shown to bind ECM proteins that do not exhibit RGD or LDV motifs, e.g., laminin [2]. Although it is presently unclear for $\alpha 4$, other group II α integrins can bind ligands in an RGD-dependent fashion [2].

A family of proprotein convertases (PCs), which are Ca²⁺-dependent serine proteinases related to the yeast subtilisin-like kexin, exhibit a cleavage specificity for the consensus sequence (R/K)-(X)_n-(K/R)↓, where n = 0, 2, 4, or 6, compatible with that of integrin cleavage sites. So far, seven basic aa-specific PCs are known: furin (PACE), PC1 (PC3), PC2, PC4, PACE4, PC5 (PC6) and PC7 (LPC, PC8) (*reviewed in* [13, 14]). They are responsible for the limited intracellular proteolysis of a large number of precursors. With the exception of PC1 and PC2, the other PCs are present in the constitutive secretory pathway and may be thus be candidate convertases for integrin processing. However, unlike other PCs, PC1 and PC2 are mostly found in the regulated secretory pathway of neural and endocrine cells. Indeed, *ex vivo* studies revealed that furin [15, 16] and PC5A [15] process

αv , $\alpha 5$ and $\alpha 6$, and possibly $\alpha 3$ integrins [16]. Biosynthetic analysis of $\alpha 4$ and other α subunits have established that the cleavage occurs in post-endoplasmic reticulum (ER) compartments [9, 16, 17] and that $\alpha 4$ processing is sensitive to organelle pH [9]. Similar to pro $\alpha 4$ cleavage, furin activation also occurs in post-ER compartments and requires mildly acidic pH [18]. These results suggested that pro $\alpha 4$ processing enzymes are active in acidic compartments and/or its cleavage requires low pH.

The physiological consequences of pro α subunit processing is still obscure, as unprocessed $\alpha 4\beta 1$ can reach the cell surface to bind VCAM-1 and fibronectin [8], and similarly pro $\alpha 6\beta 1$ can bind laminin-1 [19]. On the other hand, uncleaved $\alpha 6\beta 1$ does not exhibit inside-out signaling following PMA activation. This suggests that cleavage of pro $\alpha 6$ is required to generate a proper conformation that enables the affinity modulation of the $\alpha 6\beta 1$ receptor by PMA [19]. Recently, it was also shown that the inhibition of pro α processing in HT-29 cells stably expressing the PC inhibitor $\alpha 1$ -PDX [20-22] reduced adhesion on vitronectin *in vitro* but not on other ECM proteins such as laminin-1 and collagen type I [23]. This reduced adhesion to vitronectin was explained by the inability of unprocessed pro αv to stimulate phosphorylation of the focal adhesion kinase and the downstream mitogen activated protein kinases. Since $\alpha 1$ -PDX was used in these experiments, the authors could not rule out a probable pleiotropic effect of this serpin, as PCs are responsible for the activation of a variety of cellular protein precursors involved in cell signaling [13, 24] that may modulate integrin adhesion [25].

In the present study, we first determined that furin and PC5A are the main cellular convertases responsible for the processing of $\alpha 4\beta 1$ integrin. This observation was further confirmed by the analysis of endogenous pro $\alpha 4$ processing in CEM-T4 stably expressing either PC. *In vitro*, both furin and PC5A effectively processed synthetic peptides encompassing the cleavage site. Kinetic analysis revealed that at acidic pHs furin is best suited to cleave at the $\underline{H}^{592}\text{VISKR}^{597}\downarrow\text{ST}$ site, whereas PC5A prefers neutral pH conditions. In addition, in leucocyte-derived cell lines furin expression correlates with the extent of

pro α 4 processing. Site-directed mutagenesis demonstrated the critical importance of P1 Arg and P6 His for pro α 4 processing and established that P6 His restricts the site of cleavage of pro α 4 by furin to acidic compartments. Finally, we also found that in CHO-K1 cells an uncleavable P1 R597A α 4 mutant does not affect the *in vitro* adhesion of α 4 β 1 to VCAM-1.

EXPERIMENTAL

Recombinant plasmid construction and site-directed mutagenesis

Human α 4 cDNA (ATCC, Manassas, VA, USA) was transferred from pBluescriptKS⁻ (*SalI-XbaI*) to the vaccinia virus vector pMJ601 (*SalI-NheI*) [21]. Oligonucleotides were designed to substitute by PCR either His⁵⁹² to Arg, Lys, Glu, Ala and Leu, or Arg⁵⁹⁷ to Ala. Silent mutations were sometimes introduced to facilitate the screening with restriction endonucleases. Mutated nucleotides are underlined in the following H592R, H592K, H592E, H592A, H592L and R597A sense primers: 5'-CCTTGGTCCTCGAGTCATCAG-3', 5'-CCACCTTGGTCCTAAAGTCATCAG-3', 5'-CCACCTTGGTCCCGAGGTCATCAG-3', 5'-CCTTGGTCCTGCTGTGATCAG-3', 5'-CCACCTTGGTCCTCTTGTC-3', 5'-CCACCTTGGTCCTCATGTCATCAGTAAAGCTAGTACAG-3'. These, and the antisense primer 5'-ATGCATCATCTCCAGCATTAATAAA-3' were used for PCR amplifications from the PMJ601- α 4 vector template, and PCR products were cloned in the pCRII-TOPO vector (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). *StyI* and *NsiI* digestion of the recombinant vectors generated a 264 bp fragment that was then substituted by that of the original pBluescriptKS- α 4 vector or PMJ601- α 4 in the case of the H592R. Mutant cDNAs were finally transferred into the bicistronic mammalian expression vector pIRES2-EGFP (Clontech, Palo Alto, CA, USA) using *XhoI* and *SacII* sites or *SalI* and *SacII* sites for wild type (WT) α 4 and its H592R mutant. Human furin and mouse PC5A cDNAs [21] were also subcloned into the pIRES2-EGFP vector between *EcoR1* and *SalI* sites. The pECE- β 1 vector (a kind gift of E. Ruoslahti) was used as a template for PCR amplification of the

human $\beta 1$ cDNA that was then subcloned into pIRES2-EGFP vector between the *XhoI* and *EcoRI* sites.

Antibodies and Cell culture

Mouse monoclonal antibody (mAb) anti- $\alpha 4$ integrin (HP2/1) and Cy5 labeled goat anti-mouse IgG conjugate were purchased from Amersham Biosciences (Baie d'Urfé, QC, Canada). All cell culture media were purchased from Canadian Life Technologies (Burlington, ON, Canada). CEM (ATCC # CCL 119), CEM-T4 [21], SupT1 [21], Jurkat (ATCC # TIB 152), HL-60 (ATCC # CCL-240), U937 (ATCC # CRL-2367) cells were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Wisent, St-Bruno, QC, Canada). LoVo-C5 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 10% FBS. CHO-FD11/Furin cells and Jurkat stable transfectant of $\alpha 1$ -PDX were cultured as described before [26, 27]. Vector, $\alpha 4$ and R597A stably transfected CHO-K1 cells were grown in F12 Ham's medium supplemented with 10% FBS and 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Geneticin® (G418; Canadian Life Technologies). All media were supplemented with 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycin (Wisent) and cultured at 37°C in 5% CO₂.

Vaccinia Virus infections and transfections

About 80 % confluent LoVo-C5 cells were co-infected with wt, $\alpha 4$ and PCs recombinant vaccinia viruses (VV) [21] using 1 pfu (plaque forming unit) of each stock, and harvested 16 h later for cell surface biotinylation (*see below*). Wild type or recombinant pIRES2-EGFP vectors (7 μg) were transfected in CHO-K1 cells in 60 mm plates using Lipofectamine™ 2000 reagent (Invitrogen). Cells were either biotinylated 48 h later (*see below*) or selected with 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Geneticin®. Drug selected cells were submitted to two rounds of fluorescence activated cell sorting (FACS) with a MoFlo cell sorter (Cytomation, Fort Collins, CO, USA) to obtain stable pools of similar human $\alpha 4$ integrin immunoreactivity (HP2/1) using a Cy5-labeled secondary antibody. CEM-T4 cells (2.5×10^7) were electroporated with a single pulse of 320 V and 960 μF in 500 μL of RPMI-1640

medium containing 50 µg of furin or PC5A recombinant pIRES2-EGFP vector linearized by *AseI* (Gene Pulser apparatus; Biorad, Mississauga, ON, Canada). After 48 h, electroporated cells were seeded in complete RPMI-1640 medium supplemented with 800 µg/ml of Geneticin®. Ten days later, 10⁵ EGFP positive cells of each transfection were sorted by FACS to select pools of similar EGFP mean of fluorescence intensity.

Biotinylation assays, immunoprecipitations and FACS

Cells growing in suspension were labeled with biotin as described before [16]. Adherent cells were directly labeled in plates. In brief, 5 x 10⁷ cells were incubated with 0.5 mg/ml of sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce distributed by Biolynx, Brockville, ON, Canada) for 1 h at 4°C with agitation in phosphate buffer saline containing 2 mM MgCl₂. Cells were then lysed on ice for 30 min in lysis buffer (1% nonidet P40, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% SDS) containing a Complete™ protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Alternatively, cells were lysed in SDS and EDTA free buffer to maintain α4β1 association [8]. Clarified cell lysates were incubated with the HP2/1 mAb and precipitated with protein G Plus/Protein A agarose beads (Calbiochem, San Diego, CA, USA). The immunoprecipitated proteins were finally resolved by SDS/PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond ECL; Amersham Biosciences). Biotinylated proteins were revealed with streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) conjugate and enhanced chemiluminescence ECL Plus™ (both from Amersham Biosciences). ECL Plus™ chemiluminescence or fluorescence was detected by film exposure or Storm™ imaging (Amersham Biosciences), respectively. Fluorescence was quantified with the ImageQuant™ software (Amersham Biosciences). Taking into account the free N-terminus and the presence of 26 and 56 lysines in the 80 kDa fragment or in the 150 kDa precursor, respectively, the ratio of processed extracellular α4 was calculated as [80 kDa band intensity/27] to [150 kDa band intensity/57 + 80 kDa band intensity/27]. The absence of a bias in the biotinylation process in favor of cleaved or uncleaved α4 was evidenced by Coomassie Blue (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) quantification of the 150 and 80

kDa bands after $\alpha 4$ immunoprecipitation and SDS/PAGE separation. The percentage of cleavage obtained by both methods differed by only 2%. For radiolabeled $\alpha 4$, band intensities were detected by StormTM imaging after exposure to a phosphor screen (Amersham Biosciences) and normalized to the number of Cys and Met residues.

Northern blot and RT-PCR

Northern blot analysis of furin, using a 1.1 kb cRNA probe corresponding to the antisense of nucleotides 762-1839 of human furin, and RT-PCR of PC5, PACE4 and PC7 mRNAs were performed as described [28, 29].

Peptide synthesis and purification

The three 17 aa long peptides [LGPXVISKRSTEEFPLQ where X = His, Arg or Ala] were synthesized on a solid phase automated peptide synthesizer (Pioneer model, PE-PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA) and purified by reverse phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) [30]. To obtain an intramolecularly quenched fluorogenic peptide, a 2-aminobenzoic acid (Abz) donor and a 3-nitro-Tyr-Ala (Tyx-A) acceptor groups were attached, respectively, to the N- and C-termini of a peptide encompassing the $\alpha 4$ cleavage site ($\alpha 4$ -QFP: Abz-GPHVISKR⁵⁹⁷↓STE-Tyx-A) and its P6 His to Arg mutant ($\alpha 4$ -QFP-H592R: Abz-GPRVISKR⁵⁹⁷↓STE-Tyx-A) [26, 31].

Enzymatic assays, Michaelis-Menten constant determination

Secreted mouse PC5A and human furin-BTMD (before transmembrane domain) were collected from VV-infected BSC40 cells for enzymatic assays [21]. All peptide digestions were made in 96 well plates, in 100 μ L of 50 mM Mes (2-{N-morpholino}-ethanesulfonic acid) + 50 mM Hepes (4-{2-hydroxyethyl}-1-piperazineethanesulfonic acid) buffer, 2 mM CaCl₂, adjusted to pH 6.0 or 7.4. Initial rate determinations were obtained with increasing concentrations of either $\alpha 4$ -QFP or $\alpha 4$ -QFP-H592R (0.3-25.7 μ M) at room temperature with a quantity of enzyme releasing 0.5 nmol/h of 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) from

the pERTKR-4-methylcoumarin-7-amide (MCA) substrate [29]. The fluorescent C-terminal products of $\alpha 4$ -QFP and $\alpha 4$ -QFP-H592R cleavage were quantified on a Spectramax Gemini EM spectrofluorimeter (Molecular Devices; Sunnyvale, CA, USA) using 320 and 420 nm as excitation and emission wavelengths, respectively [31]. The initial rate (V_0) was determined using least square regression analysis of the spectrometer data recorded from 0 to 120 seconds after enzyme addition [31]. Kinetic parameters $K_m(\text{app})$ and $V_{\text{max}}(\text{app})$ were determined with Grafit4 software (Erithacus Software, Horley, UK). The data obtained were fitted to the hyperbolic Michaelis-Menten rate equation. Purified $\alpha 4$ and $\alpha 4$ mutant peptides (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were incubated with increasing amount of furin and PC5A, corresponding to an AMC release of 0.2 to 1.1 nmol/h. The extent of peptide cleavage was calculated by peak integration of RP-HPLC chromatograms and identification of the products further confirmed by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight mass spectrometry (MALDI-TOF) using a Voyager DE-Pro instrument (PE PerSeptive Biosystems; Framingham, Mass, USA) [30].

Metabolic radiolabeling

CHO-FD11/furin cells were co-transfected with 2 μg of the $\beta 1$ recombinant vector and 6 μg of the pIRES2-EGFP vector alone or expressing WT $\alpha 4$, H592R or H592K using Lipofectamine™ 2000 reagent (Invitrogen). The next day, cells were pulsed with 200 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ of EasyTag Express [^{35}S] methionine/cysteine labeling mix (NEN Life Science, distributed by Mandel Scientific, Guelph, ON, Canada) for 1 h and chased for 2.5 h in DMEM 10% FBS supplemented with 240 mg/l Cys and 150 mg/l Met (both from Sigma), in the presence or absence of 15 mM NH_4Cl (Sigma). Cells were lysed in presence of 10 mM EDTA and the lysates analyzed as described above.

Cell adhesion assay

CHO-K1 cells were stably transfected with either empty pIRES2-EGFP vector or that expressing $\alpha 4$ or its R597A mutant (*see above*). Selected pools were checked for equivalent

amount of surface $\alpha 4$ by flow cytometry (*see above*) with a FACScalibur™ cytometer (BD Biosciences). Adhesion assays [32] were performed in 96 well plates coated overnight with 1 $\mu\text{g/ml}$ of human recombinant VCAM-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and blocked with BSA. Stable pools were resuspended with Versene (Invitrogen), rinsed twice with 1% BSA RPMI-1640 medium to remove EDTA and 3×10^5 cells/well were incubated 30 min at 37°C in the same medium. Non-adherent cells were removed by 4 washes with 1% BSA RPMI-1640 and adherent cells were quantified by monitoring the endogenous phosphatase activity [32].

RESULTS

Processing of $\alpha 4$ is blocked by $\alpha 1$ -PDX

In order to verify whether PCs are involved in the processing of $\alpha 4$ integrin, we analyzed its cleavage in Jurkat cells, a lymphoid-derived CD4^+ cell line which expresses furin, PC7 and PC5 [21]. The fate of $\alpha 4$ was followed by cell surface biotinylation, immunoprecipitation of cell extracts with an anti- $\alpha 4$ mAb, SDS-PAGE under non-reducing conditions, blotting and revelation with streptavidin-HRP. As seen in Figure 2, the endogenous 150 and 180 kDa pro $\alpha 4$ is partially processed into N-terminal and C-terminal fragments of 80 and 70 kDa, respectively [10], while no detectable processing occurred in the presence of $\alpha 1$ -PDX. This result strongly suggests the implication of one or more PCs in pro $\alpha 4$ maturation in Jurkat cells. Furthermore, flow cytometry analysis demonstrated that the cell surface level of $\alpha 4$ was not affected by PC inhibition (*not shown*).

Processing of $\alpha 4$ is best performed by furin and PC5A

To define which PC(s) can process $\alpha 4$, we chose to co-infect the furin-deficient LoVo cells [33], in which $\alpha 4$ is barely processed (Figure 3, WT), with recombinant vaccinia viruses of $\alpha 4$ (VV: $\alpha 4$) with each PC [21]. Co-expression of PC5A (the most effective), PACE4 or furin and to a lesser extent PC1 and PC5B resulted in a substantial increase in $\alpha 4$

maturation, while full length or soluble (BTMD-) PC7 did not process this precursor. The soluble PC5A was more effective in processing pro α 4 than its membrane-bound isoform PC5B, as previously observed for other α integrins [15]. However, engineered soluble forms of furin and PC7 (BTMD) did not show an increased activity, suggesting that the lower efficiency of PC5B may rather result from the localization of PC5B in early compartments of the secretory pathway (brefeldin A dispersible) [34].

We next evaluated the extent of the endogenous α 4 maturation in six leucocytes-derived cell lines (Figure 4A) whose endogenous furin levels were estimated by Northern blot analyses (Figure 4B) and by RT-PCR for PC5, PACE4 and PC7. Although the efficiency of α 4 processing (U937, 89% > Jurkat, 52% > HL60, 32% \approx SupT1, 31% \approx CEM, 28% > CEM-T4, 22%) generally correlates with the furin mRNA levels (Figure 4B), the presence of the other PCs, especially PC5 may contribute to the overall processing profile of each cell line. Both vaccinia virus expression (Figure 3) and stable expression of PC7 in Jurkat cells (*not shown*) clearly demonstrated that PC7 does not process pro α 4 integrin. The contribution of PACE4 also seems minor since its presence in HL60 does not seem to enhance significantly processing as compared to all the other cell lines that do not express it. Thus, it seems that furin and PC5 are the main cognate convertases of pro α 4. Indeed, the correlation of processing to furin mRNA levels was not perfect since furin mRNAs were \approx 2 fold more abundant in HL60 than in SupT1 cells for a similar extent of pro α 4 maturation. This could be explained either by a specific cell type environment or by the contribution of PC5 in pro α 4 processing.

Since furin and PC5 are expressed in many cell types containing α 4 integrin and that neither PACE4 or PC1 were detected in tested T4-lymphocyte cell lines [21], we focused on these two enzymes. Their processing activity was assayed in CEM-T4 cells in which endogenous α 4 processing is low. We used the bicistronic vector pIRES2-EGFP to select for stable furin or PC5A transfected pools expressing similar levels of EGFP. As shown in Figure 5, furin (96%) and PC5A (88%) highly increase pro α 4 processing. We also

observed some co-immunoprecipitation of $\beta 1$ integrin since we omitted in this case EDTA and SDS in the lysis buffer [8]. The fact that PC5A is almost as potent as furin in CEM-T4 stable transfections compare to LoVo cells VV infections may be related to the different expression systems used or to cell-type specific properties. Expression of furin and PC5A could also increase $\alpha 4$ processing in Jurkat cells, whereas the membrane-bound PC5B and PC7 could not (*not shown*), confirming the ability of these two PCs to cleave $\alpha 4$ in more than one CD4⁺ cell line.

***In vitro* and *ex vivo* processing of $\alpha 4$ mutants**

Since PCs often need a P6 Arg/Lys in absence of a basic residue at P4 [35], we assessed the importance of the His residue at P6 (Figure 1) in $\alpha 4$ processing. Furin and PC5A were thus incubated with a high concentration (~130 μ M) of peptides mimicking the WT site (LGPHVISKR⁵⁹⁷ ↓ STEEFPLQ) or its P6 mutants H592R and H592A and the % cleavage was monitored by RP-HPLC. WT and H592R peptides were similarly cut by either enzyme at pH 7.0 (Figure 6). In contrast, the H592A peptide is not cleaved at all by furin and about only 2-fold less efficiently by PC5A. These data suggest a more stringent requirement for a P6 positively charged residue for furin than PC5A.

To test the hypothesis that a positive charge at P6 may regulate processing, we transiently expressed $\alpha 4$ integrin mutants (**P6**: H592 to R, K, E, A, or L; **P1**: R597A) in CHO-K1 cells and analyzed their cleavage (Figure 7). Similar signal intensities suggest that the $\alpha 4$ mutants were expressed and reached the cell surface as well as WT $\alpha 4$. The R597A mutation was the only one that abrogated $\alpha 4$ processing, and the H592E, H592A and H592L mutations reduced pro $\alpha 4$ processing by 39, 71 and 66%, respectively. Unexpectedly, the Glu substitution seemed to be preferred to Ala and Leu. While the mutant H592K maintained the $\alpha 4$ -processing rate, the H592R mutation increased it. Thus, in contrast to *in vitro* experiments in which the H592R peptide was as well cleaved as the WT one, *ex vivo* the H592R mutation led to a 25% increase in pro $\alpha 4$ processing (Figure 7).

***In vitro* analysis of the pH dependent processing of WT α 4- and its H592R mutant**

To correlate extent of positive charge of the P6 His and the pH dependence of the processing efficacy of pro α 4 by furin and PC5A, we synthesized two intramolecularly quenched fluorogenic peptides, α 4-QFP and α 4-QFP-H592R, encompassing the α 4 cleavage site: Abz-GPHHVISKR⁵⁹⁷↓STE-Tyx-A and its H592R mutant. Its cleavage at Arg⁵⁹⁷ was confirmed by RP-HPLC and MALDI-TOF identification of the products [30] (*not shown*). Digestion was performed using a fixed activity of either furin or PC5A, releasing 0.5 nmol of AMC from the substrate pERTKR-MCA in one hour at pH 7.4, and increasing amounts of α 4-QFP or α 4-QFP-H592R. The released Abz-GPHVISKR⁵⁹⁷ product at both pH 6.0 and 7.4 was followed by fluorimetry [30] and the apparent V_{\max} and K_m were determined using Michaelis-Menten plots. The pH dependence of the V_{\max} / K_m is depicted in Figure 8. While PC5A cleaves the H592R substrate ~3-fold more effectively at pH 7.4 vs 6.0, furin is similarly active at both pHs. This reveals that on favorable substrates that do not contain His, the activity of both convertases is optimal at neutral pH, a condition best favoring PC5A activity. In contrast, the WT peptide is best cleaved by furin at pH 6.0 and by PC5A at pH 7.4 (Figure 8). We surmise that since in the WT peptide His occupies the P6 position, its pH dependent charge neutralization may negatively regulate the extent of α 4 processing, such that when His is positively charged (pH 6.0), α 4 may be optimally cleaved by furin, but not by PC5A.

The P6 histidine limits α 4 processing to acidic secretory compartments

The above *in vitro* results demonstrate the necessity of a positively charged P6 residue for α 4 endoproteolysis by furin (Figures 5 and 8). Previous studies [31, 35] demonstrated that, in the absence of a P4 basic residue, furin activity is enhanced by P2 or P6 basic residue suggesting that P6 His contribution to α 4 processing could vary depending on its protonation state. Since the charge on His side chains ($pK_a \sim 6.5$) are highly susceptible to physiological shift of pH present along the secretory pathway [36], we hypothesized that

the P6 His becomes more positively charged as $\alpha 4$ traffics to the TGN (pH ~ 5.9 - 6.3) and less so upon reaching the cell surface. This suggested that pro $\alpha 4$ processing by furin could be pH dependent. To verify this hypothesis and since furin concentrates in the TGN, we examined the effect of 15 mM NH_4Cl that should neutralize the pH of the TGN from ~ 5.9 to ~ 6.8 [37]. Since furin-deficient CHO cells (FD11) do not process pro $\alpha 4$ (pulse-chase experiment; *not shown*) and to specifically assess the extent of NH_4Cl inhibition of the furin-processing of pro $\alpha 4$, we decided to transfect CHO-FD11 stably expressing furin [26]. As controls, we also analyzed the H592R and H592K mutants (pKa of Arg and Lys side chains ~ 12.5 and 10.5 , respectively) whose processing is expected not to be significantly inhibited by NH_4Cl . Short incubations and relatively low concentrations (15 mM) of NH_4Cl were selected to minimize undesired effects such as inhibition of furin activation [18], and/or modulation of its trafficking [38].

Transfected CHO-FD11/Furin cells were pulse-labeled for 1 h and chased for 150 min in the presence or absence of 15 mM NH_4Cl (Figure 9). To facilitate $\alpha 4$ analysis, immunoprecipitation of cell lysates was performed in the presence of EDTA to disrupt the $\alpha 4\beta 1$ dimers. The 130 kDa pro $\alpha 4$ corresponds to endoglycosidase-H (endoH) sensitive species still present in the ER (and hence not cleavable by furin), and the 150 kDa endoH resistant form of pro $\alpha 4$ is the precursor form that is processed [9]. The percent pro $\alpha 4$ processing was thus calculated as the ratio of the normalized 80 kDa product [21 Cys + Met] over that of the total normalized endoH resistant [80 kDa (21 Cys + Met) + 150 kDa (44 Cys + Met)] species. In stable pools of CHO-FD11/Furin and in absence of NH_4Cl , WT pro $\alpha 4$ and its mutants were equally processed (~ 93 - 94% , Figure 9). In presence of NH_4Cl , processing of WT pro $\alpha 4$ was inhibited by 36% (94% to 60%) while that of the H592K and H592R mutants was minimally inhibited (5% and 1%, respectively; Figure 9). This suggests that the P6 His enhances the sensitivity of pro $\alpha 4$ processing to pH modulation by NH_4Cl .

Cleavage of $\alpha 4$ does not modify adhesion *in vitro*

It was shown that overexpression in K562 cells of a non-cleavable R597L $\alpha 4$ mutant did not affect $\alpha 4\beta 1$ adhesion on fibronectin or VCAM-1 [8]. To verify if the extent of pro $\alpha 4$ cleavage modulates adhesion to VCAM-1 in CHO-K1 cells, we produced stable transfectants expressing the empty vector (CHO-CTL), WT $\alpha 4$ (CHO-WT) or its uncleavable R597A variant (CHO-R597A). Stably transfected cells were twice sorted by FACS to select pools that express equivalent amount of surface $\alpha 4$. As expected, no cleavage was observed for the R597A mutant while the rate of cleavage observed for WT (64%; Figure 10) was similar to that obtained in transiently transfected cells (62%; Figure 7). Finally, the generated cell pools were incubated on immobilized VCAM-1, an $\alpha 4$ ligand, for 30 min at 37°C. The bound cell fraction was quantified by densitometry. The $\alpha 4$ specificity of the binding was demonstrated by the absence of binding to BSA and low adhesion of CHO-CTL cells to VCAM-1 (Figure 10). However, under these conditions, $\alpha 4$ and its uncleavable pro $\alpha 4$ form shared the same adhesion properties. We thus conclude that pro $\alpha 4$ cleavage does not affect the adhesion of either CHO cells (*this work*) or K562 cells [8] to VCAM-1.

DISCUSSION

In the present study we investigated the processing of human integrin $\alpha 4$ subunit. Our results demonstrate that the cleavage of pro $\alpha 4$ (150 kDa) at the HVISKR⁵⁹⁷↓ST sequence in Jurkat cells was completely inhibited by the PC inhibitor $\alpha 1$ -PDX (Figure 2) and the R597A mutation (Figure 7). Co-expression in LoVo-C5 cells of $\alpha 4$ and PCs revealed that furin and PC5A efficiently processed pro $\alpha 4$ (Figure 3), suggesting their implication in this maturation event. The extent of the $\alpha 4$ endogenous cleavage in five hematopoietic cell lines (22 to 89%) generally correlated with their furin and PC5 mRNA expression (Figure 4). In the CEM-T4 cell line, which has the lowest levels of pro $\alpha 4$ processing and furin and PC5 mRNAs, stable expression of furin and PC5A increased the $\alpha 4$ maturation level from 22% to 96% and 88%, respectively (Figure 5).

VV:PC5A infection of LoVo cells led to a better rate of pro α 4 processing than VV:furin infection (Figure 3) and both enzymes cleaved *in vitro* the QFP- α 4 peptide encompassing the α 4 processing site (*see below*). Thus, our overall results are in favor of a predominant role of furin and/or PC5 in α 4 processing in a cell-type dependant fashion. This conclusion is reinforced by the following findings: (i) an extremely low pro α 4 cleavage levels in two furin-deficient cell lines, LoVo (Figure 3) and CHO-FD11, both of which expressing very low levels of PC5 (*not shown*) (ii) 100% processing of exogenous pro α 4 in the highest furin-expressing cell line K562 (*not shown* and [8]), whereas it was 89% cleaved in U937 cells expressing about 2-fold less furin mRNA, and (iii) following lymphocyte activation, the increase in pro α 4 processing [10] correlates with the upregulation of the mRNA levels of furin, but not with the invariant PC5 mRNA transcripts [29].

Generally, effective furin processing of precursors requires the presence of a P1 Arg and at least one and better two additional Arg or Lys residues at either P2 and P4, P2 and P6 or P4 and P6 positions [31, 35, 39]. The absence of a P4 or P6 Arg or Lys but the presence of a P6 His are distinguishing features of group II α integrins (Figure 1), as compared to the majority of known furin substrates [14]. We thus examined the role of the P6 His and its variants in pro α 4 processing by either *in vitro* digestions of peptides mimicking the pro α 4 cleavage site (Figures 6 and 8) or *ex vivo* processing of WT and mutant forms of pro α 4 (Figure 7).

In vitro, at high peptide concentrations (~130 μ M) while P6 His substitution to Ala completely abolished furin cleavage and significantly reduced PC5A processing (Figure 6), its substitution to Arg did not significantly affect the peptide cleavage by either enzyme at pH 7.0. Thus, under optimal substrate concentrations furin does not cleave α 4-peptides lacking a positively charged amino acid at the P6 position. Kinetic analysis using limiting peptide concentrations of quenched fluorogenic substrates, showed that at pH 7.4 both furin and PC5A prefer the H592R substrate (Figure 8). In contrast, the WT peptide is best

cleaved by furin at pH 6.0. We thus demonstrated for the first time that His at P6 and its protonation state may be as crucial as Arg in furin recognition motifs in which there is no basic amino acid at P4. PC5 was less stringent in its requirement for upstream basic residues, an observation supported by a recent *in vitro* PC5 study [40], and seems to prefer cleavage at neutral pHs, as previously reported for other substrates [15, 21, 35]. The impact of different P6 substitutions on pro α 4 processing was also assessed *ex vivo* (Figure 7). In agreement with the kinetics of the *in vitro* study at pH 7.4 using quenched fluorogenic substrates (Figure 8), Arg at P6 enhanced processing, indicating that the endogenous pro α 4 cleavage in CHO-K1 cells is dependent on the presence of a positively charged residue at P6, and possibly occurs at pHs closer to neutrality. Furthermore, while P6 Ala and Leu substitutions did not completely block α 4 cleavage, the P1 Arg substitution to Ala abolished it. Similarly, Teixido *et al.* observed either a partial (P2 Lys to Gln) or total (P1 Arg to Leu) blockade of pro α 4 processing with their mutants [8]. This suggests that, while P1 is the most critical position, the P2 and P6 ones are not essential for cleavage but greatly enhance the extent of processing.

In this study, we also examined the impact of the P6 His on the pH sensitivity of pro α 4 cleavage by PC5A and/or furin both *in vitro* (Figure 8) and *ex vivo* (Figure 9). The *in vitro* data clearly show that furin best cleaves the WT peptide at acidic pHs while the reverse is true for PC5A (Figure 8). In agreement, we showed that treatment of CHO-FD11 cells overexpressing furin with a low dose of 15 mM NH₄Cl, which increases the pH of organelles, led to a significant inhibition of WT pro α 4 maturation, while the Lys and especially Arg P6 mutants were much less affected (Figure 9). The fact that the Lys mutant is somewhat affected also, suggests that aside from the P6 His effect, pH could also affect the overall conformation of the heterodimeric integrin and possibly furin activity. Notice that in this work we have used 15 mM NH₄Cl rather than the 50 mM used for the furin work [38]. The high concentration of this agent may indeed affect endocytosis and/or furin trafficking. However, at the classical low dose < 20 mM, the effects on furin activation and/or recycling and endocytosis are not known. Nevertheless, the observed differential

effect of NH_4Cl was consistent in three separate experiments and the processing of the WT form was always the most affected one. Furin is mainly found in the TGN but also transits to the cell surface where it is endocytosed and recycled back to the TGN [14]. At the cell surface, furin processes the anthrax toxin protective antigen [14], thereby stimulating endocytosis of the toxin [41]. Furin was also reported to cleave a mutant insulin receptor in the neutral ER [42] and *Pseudomonas* exotoxin A within the acidic endosomes [14]. This suggests that furin is not only active in the TGN but also in more (early endosomes) or less (cell surface, ER) acidic environments. We thus propose that the presence of a P6 His in furin substrates restricts their cleavage to acidic compartments of the secretory pathway, where His would be fully charged. In agreement, no cell surface pro $\alpha 4$ processing could be detected [9]. It is not yet known if His may replace a basic residue in P2 or P4. However, a natural P2 Arg to His mutation blocks proalbumin cleavage [43]. This study could be extended to substrates that, like $\alpha 4$, harbor a conserved P6 His in the presence of a P1 Arg and either a P2 or P4 Arg or Lys, including other members of group II α integrins (Figure 1), VEGF-C [44] and BMP-4 [45].

Finally, the *in vitro* adhesion properties to VCAM-1 of an uncleavable form of pro $\alpha 4$ were similar to that of $\alpha 4$ (Figure 10), opening the question of the physiological function of pro $\alpha 4$ processing. It was reported that processing pro $\alpha 6$ is important for inside-out signaling [19]. However, our preliminary data with PMA activation of $\alpha 4$ -CHO transfectants did not reveal a significant difference in adhesion on VCAM-1 between processed wild type $\alpha 4$ and unprocessed R597A pro $\alpha 4$ (*not shown*). It may thus be necessary to find an *in vivo* model in order to gauge the importance of this processing, e.g., in knock-in transgenic mice expressing the R597A mutant. Noteworthy, knockout studies in mice revealed that during embryogenesis the $\alpha 4\beta 1$ integrin [46] and furin [47] are both required for chorioallantoic fusion and early cardiac development, suggesting that furin may be needed to process pro $\alpha 4$ during development. Processing may also be important for the differential migration of activated lymphocytes to inflamed peripheral tissues such as in the central nervous system [48].

In conclusion, the past [15, 16] and present data support the notion that furin and PC5A are the major candidate converting enzymes of all processed integrins α chains. Inhibition/silencing of one or both of these two convertases will probably lead to the complete abrogation of all pro α chains processing. Our data further point out the importance of the P6 His in favoring an acidic milieu for the pro α 4 processing event to take place, a conclusion that may be extended to other precursors presenting a His at the vicinity of a PC-processing site. Indeed, most PCs exhibit a His at the P7 position of their secondary prosegment processing site [49], whose autocatalytic cleavage requires acidic pHs and leads to enzyme activation [18]. Finally, P5 or P7 to P9 His residues may be responsible for the processing in endosomes, and not at the cell surface, of *Pseudomonas* exotoxin A at the RHRQPR↓ site and Shiga SLT-1 toxin at the HHHASRVAR↓ sequence [14]. Our conclusions on the importance of His in regulating the processing of specific PC-substrates may thus extend to residues other than P6.

REFERENCES

- 1 Lobb, R. R. and Hemler, M. E. (1994) The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. *J. Clin. Invest.* **94**, 1722-1728
- 2 Hynes, R. (2002) Integrins. Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673
- 3 Hemler, M. E., Elices, M. J., Parker, C. and Takada, Y. (1990) Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions. *Immunol. Rev.* **114**, 45-65
- 4 Sengbusch, J. K., He, W., Pinco, K. A. and Yang, J. T. (2002) Dual functions of [alpha]4[beta]1 integrin in epicardial development: initial migration and long-term attachment. *J. Cell Biol.* **157**, 873-882
- 5 Berlin, C., Berg, E. L., Briskin, M. J., Andrew, D. P., Kilshaw, P. J., Holzmann, B., Weissman, I. L., Hamann, A. and Butcher, E. C. (1993) Alpha 4 beta 7 integrin

- mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* **74**, 185-185
- 6 Laschinger, M. and Engelhardt, B. (2000) Interaction of alpha4-integrin with VCAM-1 is involved in adhesion of encephalitogenic T cell blasts to brain endothelium but not in their transendothelial migration in vitro. *J. Neuroimmunol.* **102**, 32-43
- 7 Wayner, E. A., Garcia-Pardo, A., Humphries, M. J., McDonald, J. A. and Carter, W. G. (1989) Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *J. Cell Biol.* **109**, 1321-1330
- 8 Teixido, J., Parker, C. M., Kassner, P. D. and Hemler, M. E. (1992) Functional and structural analysis of VLA-4 integrin alpha 4 subunit cleavage. *J. Biol. Chem.* **267**, 1786-1791
- 9 Bednarczyk, J. L., Szabo, M. C. and McIntyre, B. W. (1992) Post-translational processing of the leukocyte integrin alpha 4 beta 1. *J. Biol. Chem.* **267**, 25274-25281
- 10 Blue, M. L., Davis, G., Conrad, P. and Kelley, K. (1993) Specific cleavage of the alpha 4 integrin associated with activation of peripheral T lymphocytes. *Immunology* **78**, 80-85
- 11 Xiong, J. P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S. L. and Arnaout, M. A. (2002) Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* **296**, 151-155
- 12 Dedhar, S. (1999) Integrins and signal transduction *Curr Opin Hematol* **6**, 37-43
- 13 Seidah, N. G. and Chretien, M. (1999) Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.* **848**, 45-62
- 14 Thomas, G. (2002) Furin at the cutting edge: From protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 753-766

- 15 Lissitzky, J. C., Luis, J., Munzer, J. S., Benjannet, S., Parat, F., Chretien, M., Marvaldi, J. and Seidah, N. G. (2000) Endoproteolytic processing of integrin pro-alpha subunits involves the redundant function of furin and proprotein convertase (PC) 5A, but not paired basic amino acid converting enzyme (PACE) 4, PC5B or PC7. *Biochem. J.* **346**, 133-138
- 16 Lehmann, M., Rigot, V., Seidah, N. G., Marvaldi, J. and Lissitzky, J. C. (1996) Lack of integrin alpha-chain endoproteolytic cleavage in furin- deficient human colon adenocarcinoma cells LoVo. *Biochem. J.* **317**, 803-809
- 17 Rigot, V., Andre, F., Lehmann, M., Lissitzky, J. C., Marvaldi, J. and Luis, J. (1999) Biogenesis of alpha6beta4 integrin in a human colonic adenocarcinoma cell line involvement of calnexin. *Eur. J. Biochem.* **261**, 659-666
- 18 Anderson, E. D., VanSlyke, J. K., Thulin, C. D., Jean, F. and Thomas, G. (1997) Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage. *EMBO J.* **16**, 1508-1518
- 19 Delwel, G. O., Kuikman, I., van der Schors, R. C., de Melker, A. A. and Sonnenberg, A. (1997) Identification of the cleavage sites in the alpha6A integrin subunit: structural requirements for cleavage and functional analysis of the uncleaved alpha6Abeta1 integrin. *Biochem. J.* **324**, 263-272
- 20 Anderson, E. D., Thomas, L., Hayflick, J. S. and Thomas, G. (1993) Inhibition of HIV-1 gp160-dependent membrane fusion by a furin-directed alpha 1-antitrypsin variant. *J. Biol. Chem.* **268**, 24887-24891
- 21 Decroly, E., Wouters, S., Di Bello, C., Lazure, C., Ruyschaert, J. M. and Seidah, N. G. (1996) Identification of the paired basic convertases implicated in HIV gp160 processing based on in vitro assays and expression in CD4(+) cell lines. *J. Biol. Chem.* **271**, 30442-30450
- 22 Benjannet, S., Savaria, D., Laslop, A., Munzer, J. S., Chretien, M., Marcinkiewicz, M. and Seidah, N. G. (1997) Alpha1-antitrypsin Portland inhibits processing of

- precursors mediated by proprotein convertases primarily within the constitutive secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **272**, 26210-26218
- 23 Berthet, V., Rigot, V., Champion, S., Secchi, J., Fouchier, F., Marvaldi, J. and Luis, J. (2000) Role of endoproteolytic processing in the adhesive and signaling functions of alphavbeta5 integrin. *J. Biol. Chem.* **275**, 33308-33313
- 24 Khatib, A. M., Siegfried, G., Chretien, M., Metrakos, P. and Seidah, N. G. (2002) Proprotein convertases in tumor progression and malignancy : novel targets in cancer therapy. *Am. J. Pathol.* **160**, 1921-1935
- 25 Zamir, E. and Geiger, B. (2001) Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* **114**, 3583-3590
- 26 Gordon, V. M., Klimpel, K. R., Arora, N., Henderson, M. A. and Leppa, S. H. (1995) Proteolytic activation of bacterial toxins by eukaryotic cells is performed by furin and by additional cellular proteases. *Infect. Immun.* **63**, 82-87
- 27 Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G. and Israel, A. (1998) The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**, 8108-8112
- 28 Seidah, N. G., Chretien, M. and Day, R. (1994) The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions. *Biochimie* **76**, 197-209
- 29 Decroly, E., Benjannet, S., Savaria, D. and Seidah, N. G. (1997) Comparative functional role of PC7 and furin in the processing of the HIV envelope glycoprotein gp160. *FEBS Lett.* **405**, 68-72
- 30 Basak, A., Zhong, M., Munzer, J. S., Chretien, M. and Seidah, N. G. (2001) Implication of the proprotein convertases furin, PC5 and PC7 in the cleavage of surface glycoproteins of Hong Kong, Ebola and respiratory syncytial viruses: a comparative analysis with fluorogenic peptides. *Biochem. J.* **353**, 537-545
- 31 Lazure, C., Gauthier, D., Jean, F., Boudreault, A., Seidah, N. G., Bennett, H. P. and Hendy, G. N. (1998) In vitro cleavage of internally quenched fluorogenic human

- proparathyroid hormone and proparathyroid-related peptide substrates by furin. Generation of a potent inhibitor. *J. Biol. Chem.* **273**, 8572-8580
- 32 Akatsu, T., Ono, K., Murakami, T., Katayama, Y., Nishikawa, M., Wada, S., Yamamoto, M., Kugai, N., Matsuura, N., Takada, Y. and Nagata, N. (1998) *J Bone Miner Res* **13**, 1251-1259
- 33 Takahashi, S., Kasai, K., Hatsuzawa, K., Kitamura, N., Misumi, Y., Ikehara, Y., Murakami, K. and Nakayama, K. (1993) A mutation of furin causes the lack of precursor-processing activity in human colon carcinoma LoVo cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 1019-1026
- 34 Xiang, Y., Molloy, S. S., Thomas, L. and Thomas, G. (2000) The PC6B cytoplasmic domain contains two acidic clusters that direct sorting to distinct trans-Golgi network/endosomal compartments. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1257-1273
- 35 Krysan, D. J., Rockwell, N. C. and Fuller, R. S. (1999) Quantitative characterization of furin specificity. Energetics of substrate discrimination using an internally consistent set of hexapeptidyl methylcoumarinamides. *J. Biol. Chem.* **274**, 23229-23234
- 36 Wu, M. M., Grabe, M., Adams, S., Tsien, R. Y., Moore, H. P. and Machen, T. E. (2001) Mechanisms of pH regulation in the regulated secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 33027-33035
- 37 Demarex, N., Furuya, W., D'Souza, S., Bonifacino, J. S. and Grinstein, S. (1998) Mechanism of acidification of the trans-Golgi network (TGN). In situ measurements of pH using retrieval of TGN38 and furin from the cell surface. *J. Biol. Chem.* **273**, 2044-2051
- 38 Chapman, R.E. and Munro, S. (1994) Retrieval of TGN proteins from the cell surface requires endosomal acidification. *EMBO J.* **13**, 2305-2312
- 39 Watanabe, T., Murakami, K. and Nakayama, K. (1993) Positional and additive effects of basic amino acids on processing of precursor proteins within the constitutive secretory pathway. *FEBS Lett.* **320**, 215-218

- 40 Cain, B. M., Vishnuvardhan, D., Wang, W., Foulon, T., Cadel, S., Cohen, P. and Beinfeld, M. C. (2002) Production, purification, and characterization of recombinant prohormone convertase 5 from baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr. Purif.* **24**, 227-233
- 41 Beauregard, K. E., Collier, R. J. and Swanson, J. A. (2000) Proteolytic activation of receptor-bound anthrax protective antigen on macrophages promotes its internalization. *Cell Microbiol.* **2**, 251-258
- 42 Bass, J., Turck, C., Rouard, M. and Steiner, D. F. (2000) Furin-mediated processing in the early secretory pathway: sequential cleavage and degradation of misfolded insulin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97**, 11905-11909
- 43 Brennan, S. O. and Nakayama, K. (1994) Cleavage of proalbumin peptides by furin reveals unexpected restrictions at the P2 and P'1 sites *FEBS Lett.* **347**, 80-84
- 44 Nour, N., Basak, A., Chretien, M., Seidah, N.G. (2002) Structure function analysis of the proprotein convertase PC5A. *J. Biol. Chem.* PMID: 12414802, Oct 31; [epub ahead of print]
- 45 Cui, Y., Hackenmiller, R., Berg, L., Jean, F., Nakayama, T., Thomas, G. and Christian, J. L. (2001) The activity and signaling range of mature BMP-4 is regulated by sequential cleavage at two sites within the prodomain of the precursor. *Genes Dev.* **15**, 2797-2802
- 46 Yang, J. T., Rayburn, H. and Hynes, R. O. (1995) Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development* **121**, 549-560
- 47 Roebroek, A. J., Umans, L., Pauli, I. G., Robertson, E. J., van Leuven, F., Van de Ven, W. J. and Constam, D. B. (1998) Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development* **125**, 4863-4876
- 48 Graesser, D., Mahooti, S., Haas, T., Davis, S., Clark, R. B. and Madri, J. A. (1998) The interrelationship of alpha4 integrin and matrix metalloproteinase-2 in the

pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Lab. Invest.* **78**, 1445-1458

- 49 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
- 50 Zanghi, J. A., Mendoza, T. P., Knop, R. H. and Miller, W. M. (1998) Ammonia inhibits neural cell adhesion molecule polysialylation in Chinese hamster ovary and small cell lung cancer cells. *J. Cell Physiol.* **177**, 248-263

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Schematic of $\alpha 4$ and alignment of group II α integrins

The processing sites (*arrows*), transmembrane domains (*black box*) and cytosolic tails (*hatched box*) are emphasized. The basic and His residues present in the $\alpha 4$ cleavage site are underlined. Alignment of the sequences surrounding human α integrin cleavage sites containing a P6 His (group II). Note that α I**IIb**(*) is phylogenetically closer to group II members (*see text*).

Figure 2 Inhibition of $\alpha 4$ processing by $\alpha 1$ -PDX

Stably transfected Jurkat cells expressing the empty (CTL) or $\alpha 1$ -PDX recombinant pcDNA3 vector were cell surface biotinylated and lysed in the presence of SDS and EDTA. After $\alpha 4$ immunoprecipitation, SDS/PAGE (6% gel) under non-reducing conditions and blotting, biotinylated proteins were revealed with streptavidin-HRP. Open arrows indicate the positions of pro $\alpha 4$ and mature N- and C-terminal $\alpha 4$ fragments. A long exposure was shown to better visualize the $\alpha 4$ products.

Figure 3 Cleavage of $\alpha 4$ by proprotein convertases

LoVo cells were co-infected with 1 pfu of VV: $\alpha 4$ and 1 pfu of either WT, PC1, Furin, PACE4, PC5A, PC5B, PC7, BTMD-Furin or BTMD-PC7 recombinant VV. After 16 h, cells were biotinylated, lysed and the $\alpha 4$ immunoprecipitated products were separated by non-reducing SDS/PAGE (6% gel). Following blotting, immunoprecipitated proteins were revealed with streptavidin-HRP. Empty arrows point at pro $\alpha 4$ and mature $\alpha 4$ species.

Figure 4 Correlation between the extent of pro $\alpha 4$ processing and furin expression level in human leucocytic cell lines

(A) Following cell surface biotinylation and lysis, anti- $\alpha 4$ immunoprecipitated proteins were separated by SDS/PAGE (6% gel) under non-reducing conditions, blotted and revealed with streptavidin-HRP. Open arrows indicate the positions of pro $\alpha 4$ and $\alpha 4$ species while the black arrow points to that of the co-immunoprecipitated $\beta 1$ integrin (best visualized in U937 cells). The percent processing values were calculated (*see Experimental*) by scanning of films exposed for various times. (B) Northern blot analysis of human furin and RT-PCR of PC5, PACE4 and PC7 in human leucocytic cell lines. Furin mRNA level were derived from phosphor screen scanning of [32 P]-labeled cRNA hybridized membranes. Furin levels were normalized to the ribosomal 18S RNA probe signal. The points illustrate relative furin mRNA levels (right axis) and the histogram bars the pro $\alpha 4$ processing extent (left axis). The line between furin expression level points was traced to visualize the correlation between the two parameters. The results of RT-PCR emphasize the endogenous presence (+) or absence (-) of either PC5, PACE4 or PC7 mRNAs in these cells.

Figure 5 Stable expression of furin and PC5A increase pro $\alpha 4$ endoproteolysis in the CD4⁺ lymphocyte cell line CEM-T4

CEM-T4 cells were stably transfected with either empty vector (CTL), furin or PC5A. The pools of cell surface proteins were biotinylated, lysed and immunoprecipitated with an $\alpha 4$ mAb. Immunoprecipitated proteins were separated by SDS/PAGE (6% gel) under non-reducing conditions, followed by revelation with streptavidin-HRP. The migration positions of pro $\alpha 4$, $\alpha 4$ fragments (*clear arrows*) as well as the co-immunoprecipitated $\beta 1$ integrin (*black arrow*) are shown. Calculation of the percentage processing was realized with the densitometric data acquired from STORM imaging (*see Experimental*).

Figure 6 *In vitro* processing of wild type and mutant peptides encompassing the $\alpha 4$ processing site

Identical concentrations of 17 mer ($\sim 130 \mu\text{M}$) $\alpha 4$ and mutant peptides were incubated with increasing amounts of furin or PC5A activity (pERTKR-MCA fluorogenic PC substrate) for 15 min at room temperature in 100 μl Tris-Acetate buffer (pH 7.0) with 2 mM calcium chloride. Product appearance was measured by RP-HPLC by integration of the products and initial peptide peaks. $\alpha 4\text{wt}$ (O), H592R (\square) and H592A (\blacktriangle).

Figure 7 Cellular processing of pro $\alpha 4$ cleavage site mutants

CHO-K1 cells were transfected with WT $\alpha 4$, H592R, H592K, H592E, H592A, H592L recombinant vectors. Cell surface proteins were biotinylated, lysed and immunoprecipitated with an $\alpha 4$ mAb. Immunoprecipitated proteins were separated by SDS/PAGE (6% gel) under non-reducing conditions, followed by the revelation with streptavidin-HRP. The migration positions of pro $\alpha 4$, $\alpha 4$ fragments (*clear arrows*) as well as the co-immunoprecipitated $\beta 1$ integrin (*black arrow*) are indicated. Calculation of the percentage processing was calculated with the densitometric data acquired from STORMTM imaging (*see Experimental*).

Figure 8 pH dependence of the *in vitro* processing of WT and H592R quenched $\alpha 4$ -fluorogenic substrates

Apparent V_{max} and K_{m} were determined by the digestion by either furin or PC5A of increasing concentrations (0.3 μM to 25.7 μM) of the internally quenched fluorogenic peptides, $\alpha 4$ -QFP and $\alpha 4$ -QFP-H592R at pH 6.0 and 7.4. The released Abz-GPHVISKR⁵⁹⁷ product was followed by fluorimetry and derived initial rates were fitted to the Michaelis-Menten equation. The calculated standard error variations for the mean are depicted by the error bars.

Figure 9 NH₄Cl inhibition of furin-generated pro α 4 processing

(A) CHO-FD11/Furin cells were transfected with WT α 4, H592R, and H592K recombinant vectors. Cells were pulse-labeled for 60 min and chased for 150 min in absence (-) or presence (+) of NH₄Cl. Cells were lysed in presence of EDTA and immunoprecipitated with an α 4 mAb. Immunoprecipitated proteins were separated by SDS/PAGE (6% gel) under non-reducing conditions and quantified (*see Experimental*). EndoH resistant (150 kDa, *clear arrows*) and endoH sensitive (130 kDa, *gray arrow*) α 4 forms are indicated. The slightly faster migration of the 150 kDa and 80 kDa products observed in presence of NH₄Cl may be due to reduced sialylation {Zanghi, 1998 #829}. (B) Quantitation of the % processing inhibition in the presence of NH₄Cl over the untreated cells from the percentage cleavage data derived from STORM quantitation (A).

Figure 10 Adhesion of α 4 transfectants to VCAM-1

Cells were incubated in 96 well coated plates with BSA (*Open bars*) or VCAM-1 (*Black bars*, 1 μ g/ml). After 30 min adhesion, non-adherent cells were washed away and bound cell fractions (triplicates) were counted by monitoring the endogenous phosphatase activity {Akatsu, 1998 #34}. α 4 cell surface expression was measured by flow cytometry and surface cleavage extent was calculated as described in Experimental.

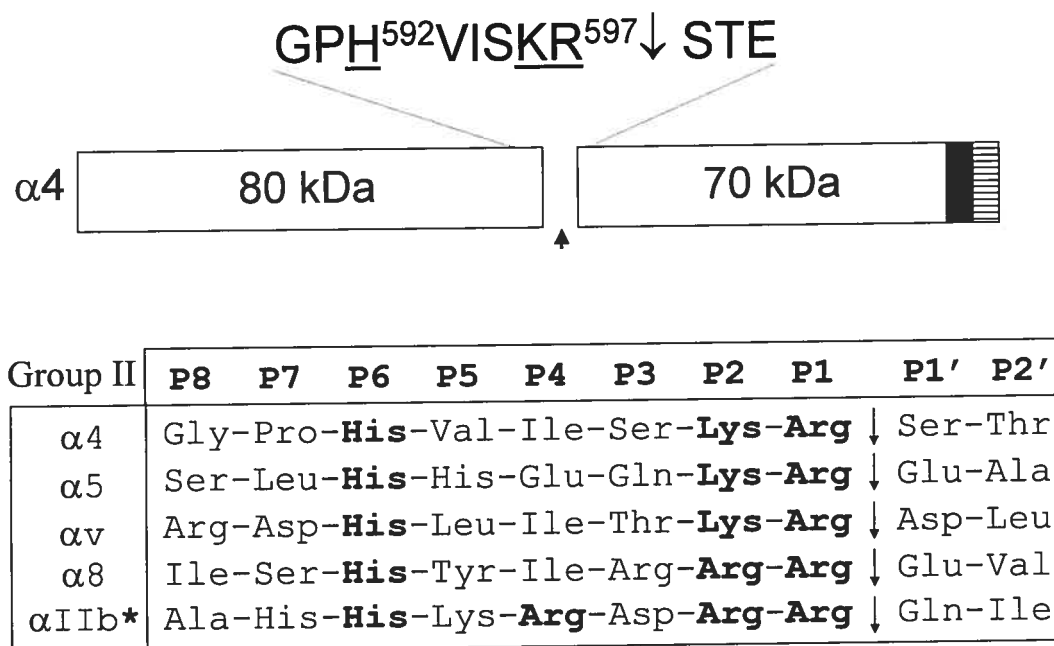


Figure 1

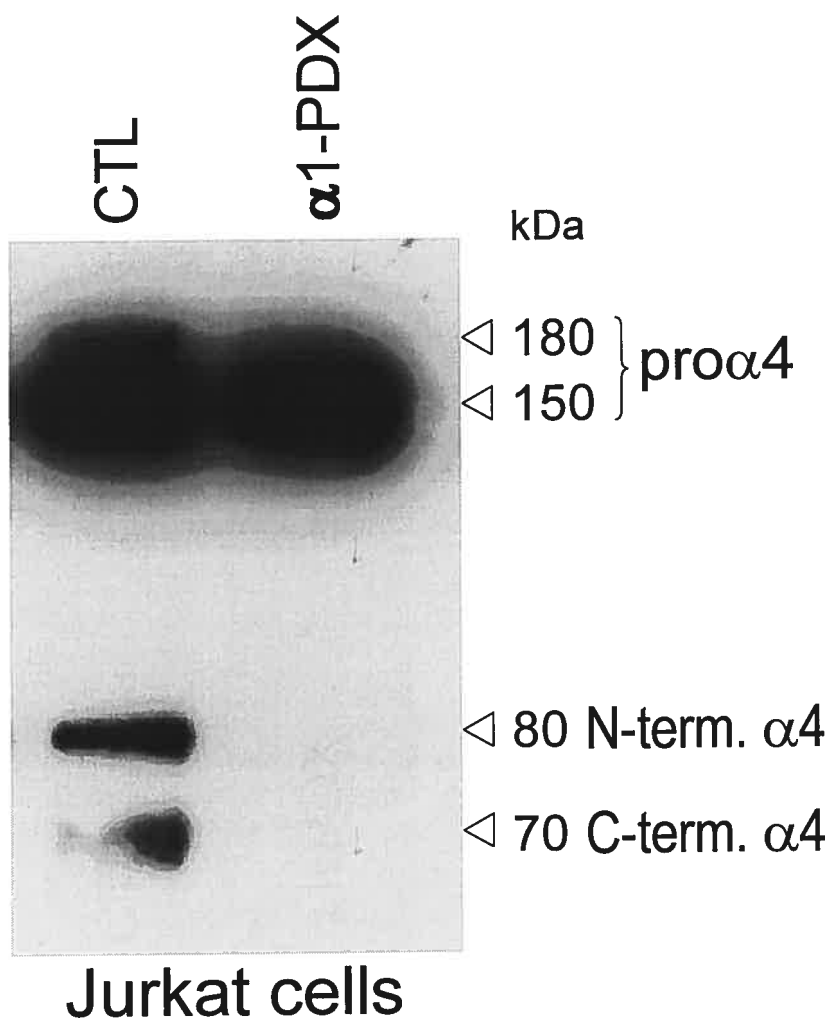
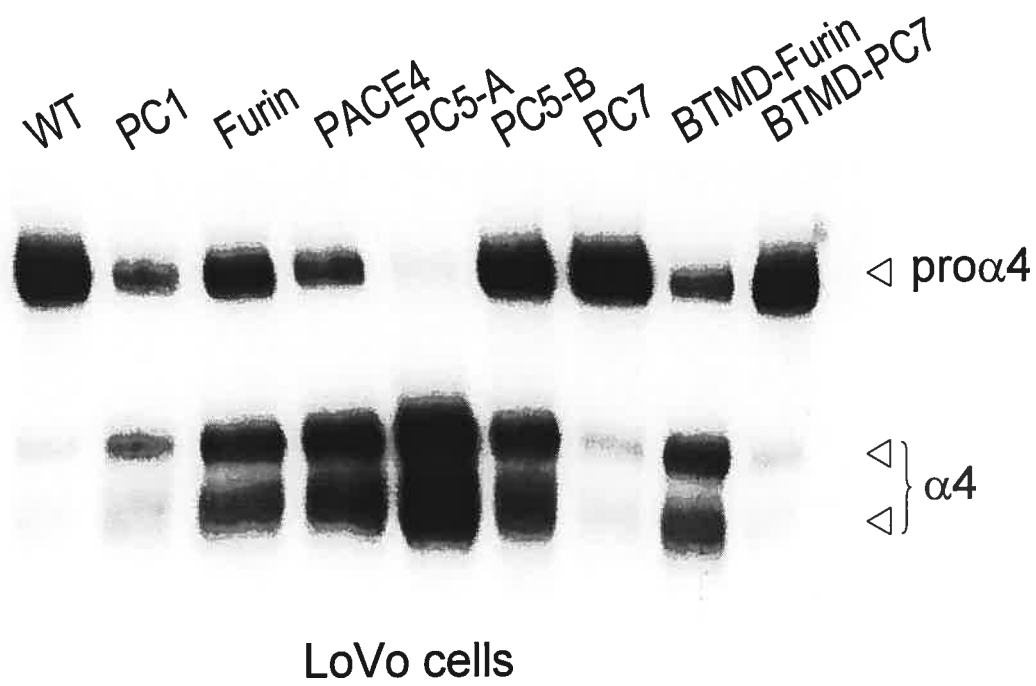


Figure 2

**Figure 3**

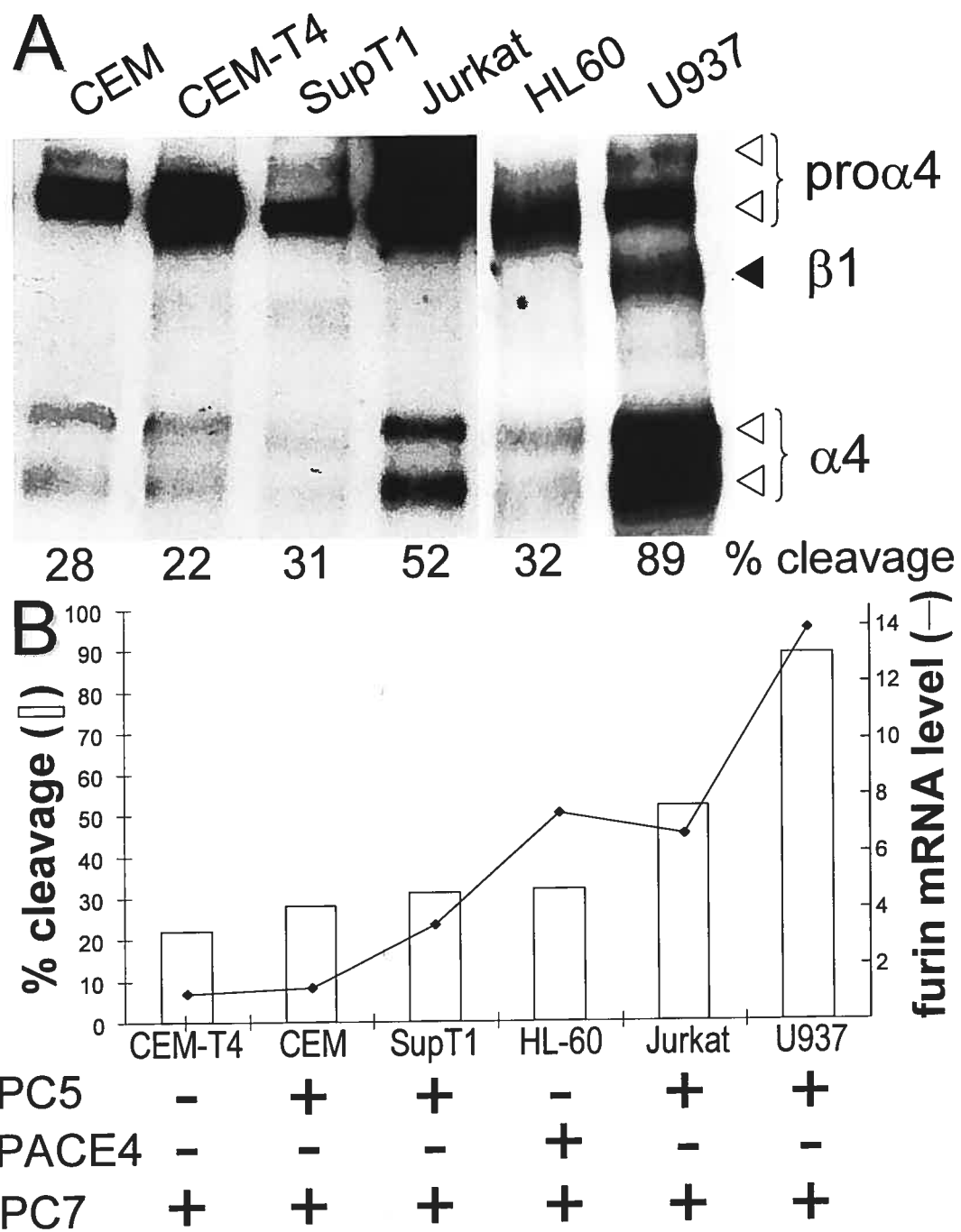


Figure 4

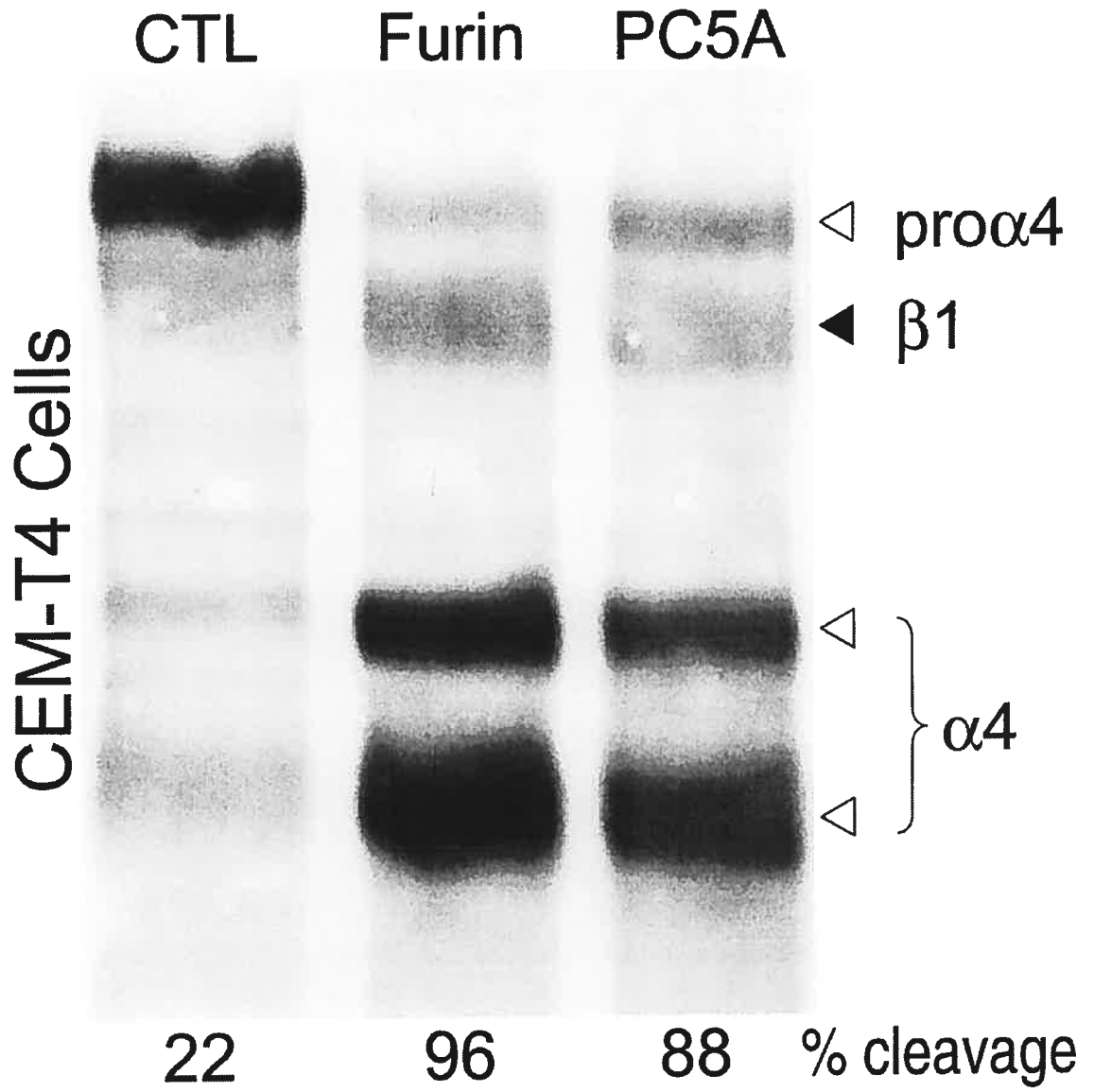


Figure 5

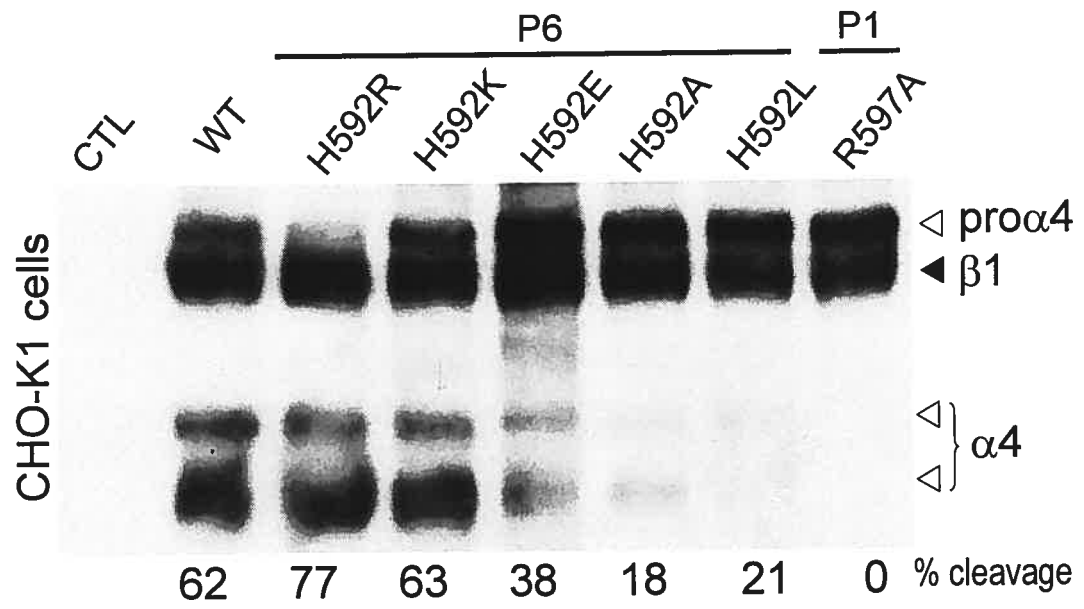


Figure 6

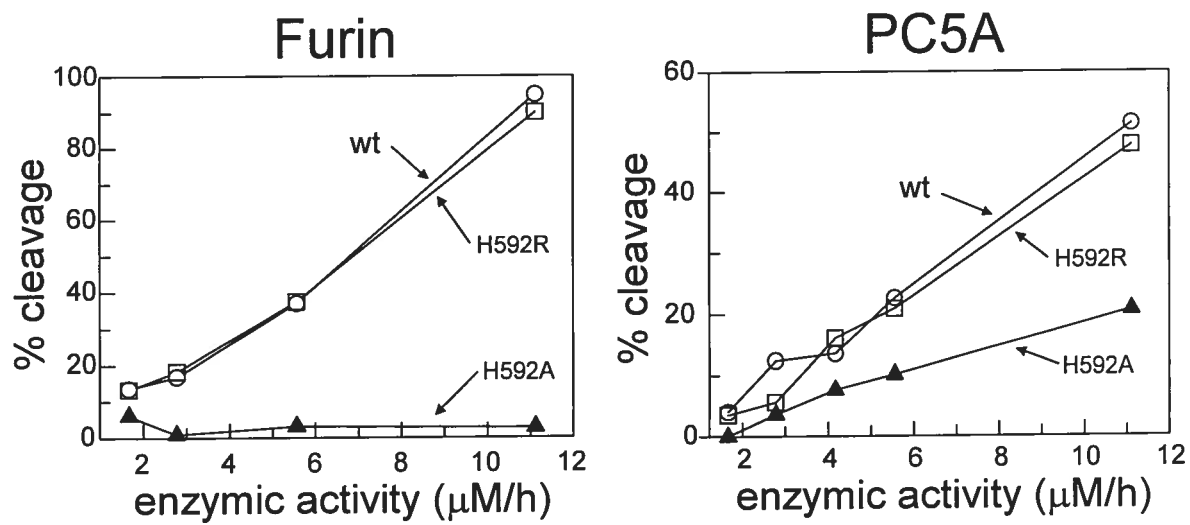
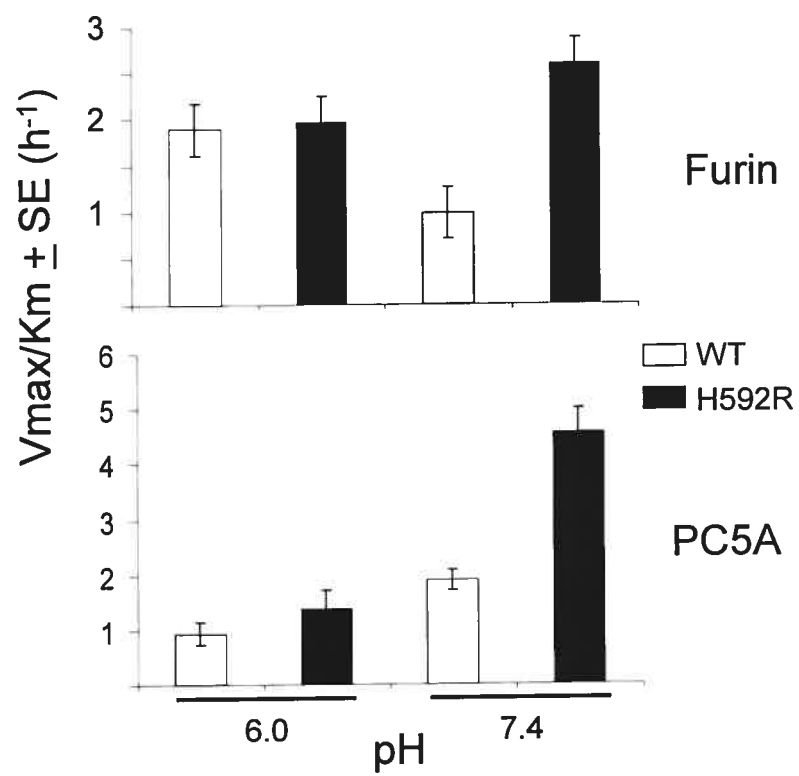
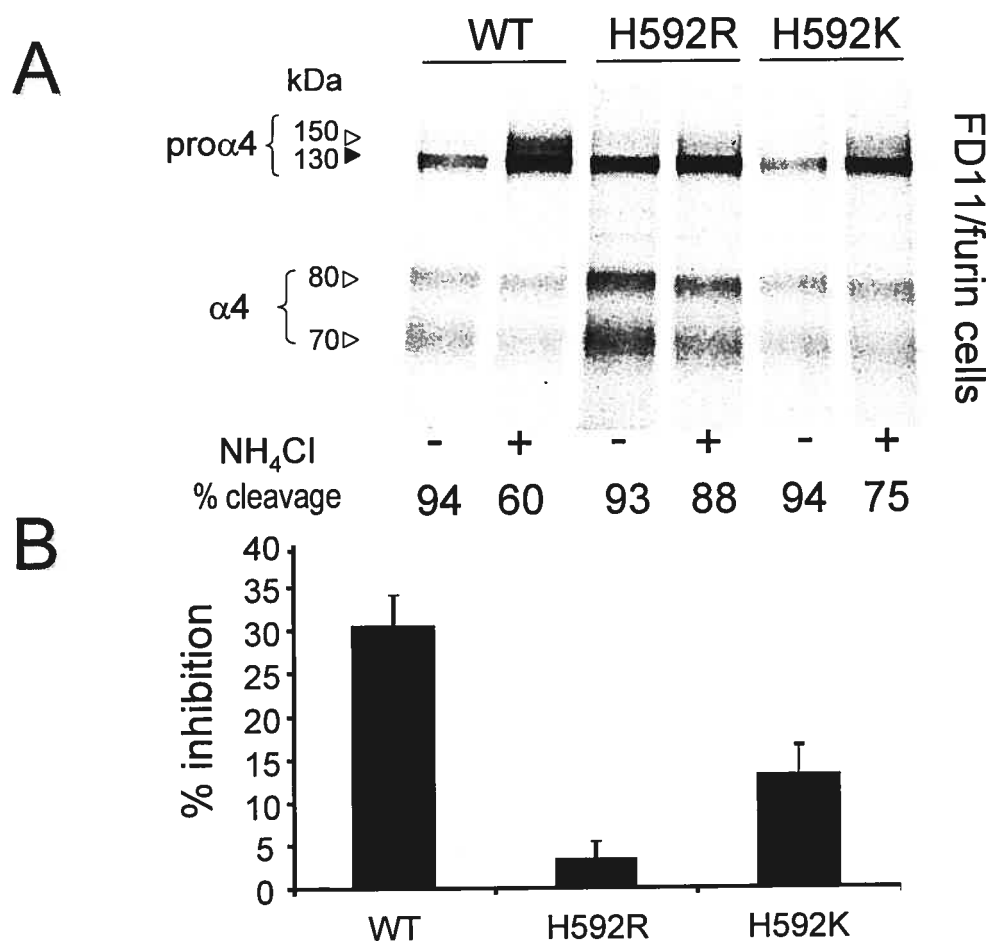
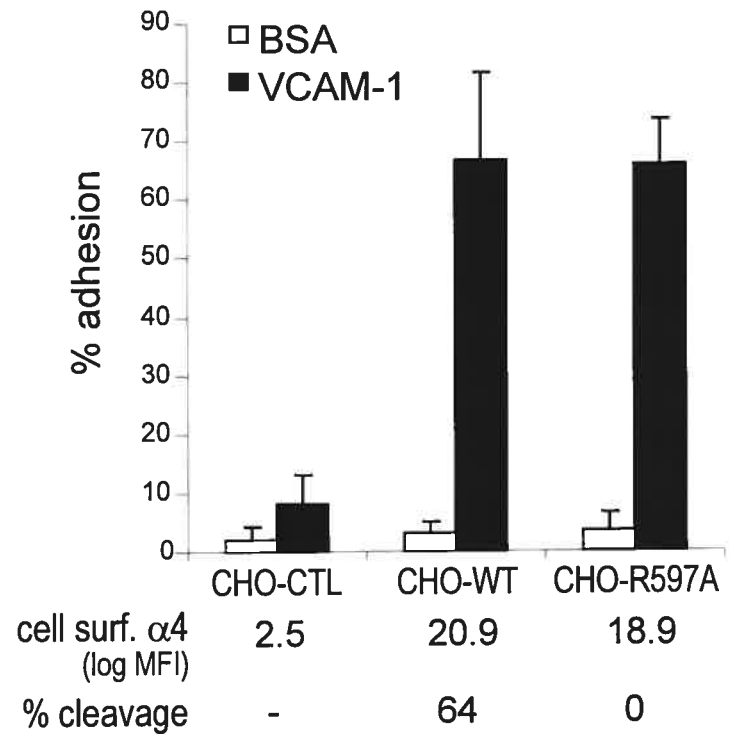


Figure 7

**Figure 8**

**Figure 9**

**Figure 10**

Chapitre 4. Article 2

(Article publié dans *Biochemical Biophysical Research Communications* (2005), 326, 554-563)

Implication of proprotein convertases in the processing and spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus

Eric Bergeron, Martin J. Vincent, Louise Wickham, Josée Hamelin, Ajoy Basak, Stuart T. Nichol, Michel Chrétien and Nabil G. Seidah

Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology, Clinical Research Institute of Montreal, Montreal, Que., Canada H2W 1R7

Special Pathogens Branch, Division of Viral and Rickettsial Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA 30333, USA

The Regional Protein Chemistry Center, Diseases of Aging Unit, Ottawa Health Research Institute, Ottawa, Ont., Canada K1Y 4E9

ABSTRACT

Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus (SARS-CoV) is the etiological agent of SARS. Analysis of SARS-CoV spike glycoprotein (S) using recombinant plasmid and virus infections demonstrated that the S-precursor (proS) exists as a ~190 kDa endoplasmic reticulum form and a ~210 kDa Golgi-modified form. ProS is subsequently processed into two C-terminal proteins of ~110 and ~80 kDa. The membrane-bound proprotein convertases (PCs) furin, PC7 or PC5B enhanced the production of the ~80 kDa protein. In agreement, proS-processing, cytopathic effects and viral titers were enhanced in recombinant Vero E6 cells overexpressing furin, PC7 or PC5B. The convertase inhibitor dec-RVKR-cmk significantly reduced proS cleavage and viral titers of SARS-CoV infected cells. In addition, inhibition of processing by dec-RVKR-cmk completely abrogated the virus-induced cellular cytopathicity. A fluorogenically quenched synthetic peptide encompassing Arg₇₆₁ of the spike glycoprotein was efficiently cleaved by furin and the cleavage was inhibited by EDTA and dec-RVKR-cmk. Taken together, our data indicate that furin or PC-mediated processing plays a critical role in SARS-CoV spread and cytopathicity and inhibitors of the PCs represent potential therapeutic anti-SARS-CoV agents.

Severe acute respiratory syndrome (SARS) is an emerging disease which was first reported in the Guangdong province of China in November 2002. Worldwide efforts led to the rapid isolation of the etiological agent as SARS-CoV, a novel member of the family Coronaviridae (1). Complete genome sequencing of the SARS-CoV (2;3) confirmed that this pathogen is not closely related to any previously known coronavirus serogroups and was therefore classified in a new group IV, although it shares similarity with group II. Budding of the SARS-CoV occurs in the Golgi (4), resulting in the viral incorporation of the envelope spike glycoprotein (S). The S-protein of SARS-CoV is a type I membrane-bound protein essential for host cell receptor-viral attachment and target cell fusion. Cell surface expression of S may lead to a receptor mediated cell-cell fusion resulting in multinucleated giant cells formation, as observed in the lungs of SARS patients (5). Angiotensin converting enzyme-2 (ACE2) was recently identified as a functional receptor of SARS-CoV S-glycoprotein (6).

The precursor proS of groups II and III coronaviruses, but not of group I, is cleaved at basic residues into S1 and S2 subunits (7). This cleavage occurs in the *trans* Golgi network (TGN) by specific protease(s) likely to be one or more of the basic amino acid (aa)-specific proprotein convertases (PCs) that recognize an **RXXR↓** motif (8;9). These convertases cleave secretory precursors at the general motif **(K/R)-(X)_n-(K/R)↓**, where n= 0, 2, 4 or 6, and are responsible for the tissue-specific limited proteolysis of multiple polypeptide precursors (9;10). Of the seven basic aa-specific PCs, only three are membrane-bound: furin, PC7 and the isoform PC5B, and two others are widely expressed as soluble proteins: PACE4, and PC5A (9).

Alignment of SARS-CoV S-sequence with representative group II coronavirus S-glycoproteins (Fig. 1A) suggested that basic aa-specific PCs are likely to be their convertases. Indeed, it was recently shown in cell culture that a specific PC inhibitor, the membrane-permeable peptide decanoyl-RVKR-chloromethylketone (dec-RVKR-cmk) (11) reduced the processing of the murine hepatitis coronavirus (MHV) and its cell-cell but not its virus-cell fusion (8). Despite the conservation of 19 out of 20 cysteines within the S1 subunit of group II with those of the S-protein of SARS-CoV (12), the latter seems to have

a distinct sequence lacking a PC-like motif (site A; Fig. 1A). In contrast, a candidate PC-like cleavage site (**RNTR**₇₆₁↓) is located C-terminal to site A (site B; Fig. 1A). We therefore hypothesized that SARS-CoV S-glycoprotein could be processed by PCs and that PC-specific inhibitors, like dec-RVKR-cmk, might inhibit the processing. Herein, we demonstrate that overexpression of membrane bound PC-like enzymes enhance the processing of an ~80 kDa protein and inhibition of processing leads to a dramatic decrease in SARS-CoV titer, cellular spread and abrogation of cytopathic effects (CPE).

MATERIALS AND METHODS

Plasmids and expression vector

Three Tor2 SARS-CoV cDNA clones (B21, H21, N08) were purchased from the British Columbia Cancer Agency (BC, Canada). These clones were assembled by polymerase chain reaction (PCR) to get the full length SARS-CoV proS cDNA fused to a C-terminal V5 epitope in the bicistronic mammalian expression vector pIRES2-EGFP (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) between NheI and BamHI sites (pIR-proS-V5). Recombinant proS-V5 DNA sequence was confirmed by DNA sequencing. The R667A, K672A, R758A, R797A and RRKR₆₆₇ mutations were introduced into the pIR-proS-V5 by PCR.

Cells and transfection

African green monkey Vero E6 kidney cells (ATCC) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum. Furin deficient FD11 Chinese Hamster Ovary (CHO) derived cells were generously given by Dr. Stephen Leppia (National Institutes of Health, MD, USA) and cultured as reported (13). The cDNAs of PCs (hFurin, mPC5A, mPC5B, rPC7 and hPACE4) were cloned into the pIRES2-EGFP vector. FD11 cells (Furin deficient) were transfected with individual PCs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) and stable cells selected for 14 days with 800 µg/mL of Geneticin[®] (Invitrogen), followed by a single round of FACS selection for EGFP using a method described before (14). Vero E6 cells overexpressing the above mentioned PCs were produced in similar manner and were selected after 48h post-transfection with 500 µg/mL of Geneticin[®] for 14 days. A 100 mm dish of each FD11 cell line stably overexpressing a PC was transfected with 24 µg of the pIR-proS-V5 DNA. FD11-furin cell line was also transfected by the same technique with pIR-proS-V5 mutant forms vectors (R667A, K672A, R761Q, R761K, R758A + R761K, R758A, R797A, RRKR₆₆₇).

Antibodies and Western Blot

Forty-eight hours (h) after transfections, cells were washed twice with PBS and lysed in RIPA buffer [50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1% (v/v) Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) sodium dodecyl sulfate (SDS)] with a CompleteTM Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics GmbH). Clarified lysates were immunoprecipitated with a monoclonal anti-V5 antibody (Invitrogen). Proteins were precipitated with protein A/G plus agarose beads (Santa Cruz). Immunoprecipitated proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, 7% gel) and transferred to polyvinylidene fluoride membranes (Schleicher & Schuell). Membranes were then incubated with horseradish peroxidase coupled V5-antibody (Invitrogen) for 16h at 4°C. Proteins were revealed with the chemiluminescent ECL plusTM reagent (Amersham Biosciences). SARS-CoV specific hyperimmune mouse ascitic fluid (HMAF) was kindly provided by Dr. Pierre Rollin and Thomas G. Ksiazek (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). HMAF for SARS-CoV was made by a previously described protocol (15).

Peptides and *in vitro* assay

The intramolecularly quenched fluorogenic spike peptides (QS1 = Abz-E₇₅₅-Q-D-R-N-T-R₇₆₁-E-V-F-A-Q-3-Nitro-Y-CONH₂, QS2 = Abz-P-D-P-L-K-P-T-K-R₇₉₇-S-F-I-E-D-3-Nitro-Y-Ala-CONH₂, and QS3 = Abz-S-Y-H-T-V-S-L-L-R₆₆₇-S-T-S-3-Nitro-Y-CONH₂, where Abz = 2-amino benzoic acid) were synthesized by solid phase Fmoc chemistry using Pioneer instrument (ABI) as described earlier (16;17). Crude peptides were purified and characterized by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-tof) mass spectrometry (ABI). *In vitro* digestion of each peptide (20 µg) was carried at 37°C for 8h in a total volume of 50 µL buffer consisting of 25 mM Tris + 25 mM 2-Morpholinoethanesulfonic acid + 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4 with recombinant furin (New England Biolab Inc, 2 µL) exhibiting an enzymatic activity of 2 units/µL, 1 unit representing the release of 1 pmol/minute (pmol/min) of free 7-amino-4-methylcoumarin from 100 µM Boc-RVRR-4-methylcoumarin-7-amide. In addition, similar digestions were also performed in the presence of either 10 µM decanoyl-RVKR-chloromethylketone (dec-

RVKR-cmk) or 20 mM EDTA following a 20 min pre-incubation with the enzyme before the quench peptide substrate was added. Each digestion was monitored for 8h by progress curves and end time assay (excitation and emission wavelengths fixed at 320 and 420 nm respectively), following which the reaction was stopped with glacial acetic acid (2 μ L) and the resultant crude digests were analyzed by reverse phase high pressure chromatography (RP-HPLC) with on line dual (UV and fluorescence) detection systems followed by MALDI-tof mass spectrometry analysis of each collected peptide.

SARS-CoV infection, metabolic labeling and immunofluorescence

The proprotein convertase inhibitor dec-RVKR-cmk was purchased from Biomol (PA, USA). Vero E6 cells stably expressing the PCs (see text above) were infected with SARS-CoV at a multiplicity of infection (MOI) of 1 for 1h. After removal of the inoculums, cells were extensively washed with PBS. Eighteen hours post-infection, prior to labeling with [³⁵S]cysteine, the virus containing supernatants were removed, subjected to centrifugation at 12,000 revolutions per min and stored at -80°C until the titrations were performed. Cells were pulsed with [³⁵S]cysteine for 30 min and lysed in RIPA. Clarified cell lysates were incubated with HMAF and immunoprecipitated proteins separated by NuPAGE® (7% gel, Invitrogen). Gels were dried and proteins were revealed by autoradiography. For dec-RVKR-cmk pulse labeling experiments, Vero E6 cells were infected for 1h with SARS-CoV at MOI=0.5 (see text above). After virus removal, cells were incubated in 1 mL of OPTI-MEM medium (Invitrogen) containing 60 μ M dec-RVKR-cmk for 18h. The onset of CPE was monitored by light microscopy. Immunofluorescence staining was performed with HMAF. Briefly, cells were fixed with a mix an equimolar solution of methanol and acetone for 15 at -20°C. SARS-CoV reactive protein(s) were revealed with an anti-mouse fluorescein coupled antibody (ICN).

Treatments of SARS-CoV infected Vero E6 cells with dec-RVKR-cmk were achieved with the following protocol. Upon removal of the inoculums and extensive washing, cells were maintained in fresh OPTI-MEM media with 15, 30 or 60 μ M concentration of dec-

RVKR-cmk for 15 to 18h. Cells were then labeled for 30 min with [³⁵S]cysteine in the presence of appropriate quantities of dec-RVKR-cmk. In some experiments, cells were chased for 3h with cold medium. Clarified cell supernatants were also immunoprecipitated with HMAF, and in parallel-unlabeled media were stored at -80°C for viral titers determination. Titration was performed on a fresh monolayer of Vero E6 cells. Serial dilutions of the virus containing supernatants were added to cells followed by agar overlay. The plaques were visualized by neutral red staining and counted.

RESULTS

Processing of recombinant SARS-CoV proS

In order to address the significance of the PCs in proS processing, we cloned the S gene in a pIRES2-EGFP bicistronic vector, and added a V5-tag at its C-terminus for immunological detection (pIR-proS-V5; Fig. 1A). Addition of such an epitope in C-terminal was reported not to interfere with the SARS-CoV spike glycoprotein mediated fusion (18). We first obtained furin-deficient FD11 cells (19) stably expressing either the vector alone or one of the PCs of the constitutive secretory pathway, namely: furin, PC5A, PC5B, PC7 and PACE4. A functional proprotein convertase activity assay showed that these enzymes induced complete processing of proplatelet derived growth factor-A (proPDGF-A) (20) into PDGF-A (*not shown*). The expression and processing of the spike protein was analyzed by transient transfection of the cDNA encoding S, followed by Western blotting using a V5 reactive monoclonal antibody. In absence of overexpressed convertase (vector) we observed the presence of a ~190 kDa and a ~210 kDa proteins (Fig. 1B, lane 2). Endoglycosidase treatment indicated that the ~190 kDa protein was endoH sensitive, possibly an endoplasmic reticulum (ER) form, and the ~210 kDa protein was endoH resistant, likely representing a Golgi-modified form (*not shown*). A very small amount of non-glycosylated proS was also detected (~150 kDa). In addition to the ER and Golgi forms, we also observed two V5-immunoreactive C-terminal fragments (CTFs): a ~110 kDa protein and a very small amount of an ~80 kDa protein (Fig 1B, lane 2). Interestingly, the level of the ~80 kDa CTF was enhanced by overexpression of the membrane-bound furin or PC7, and least by PC5B (Fig 1B, lanes 3, 5 and 6), but not by the soluble PC5A or PACE4 (lanes 4 and 7), nor by a soluble form of furin lacking the transmembrane domain (*not shown*). We also noticed that whenever processing occurred, the level of the ~210 kDa proS was significantly reduced. This agrees with the known zymogen activation of furin, PC7 and PC5B in the *trans* Golgi network (TGN). The ~110 kDa product was least affected by the over-expression of the PCs. The enhancement in the appearance of the ~80 kDa CTF in membrane-bound PC-overexpressing cells suggests that the spike protein of SARS-CoV is a potential substrate for PC-dependant cleavage. It remains to be seen whether the cleavage is a result of direct action of the PCs or

indirect via the activation by PCs of other cellular proteases to effect the generation of the ~80 kDa CTF.

ProS is cleaved in SARS-CoV infected cells

In order to verify the relevance and authenticity of the observed processing products of recombinant proS, we analyzed the biosynthesis of proS produced following SARS-CoV infection of Vero E6 cells stably expressing either an empty vector or a recombinant of each of the PCs. Sixteen hours post-infection, the cells were pulse-labeled with [³⁵S]cysteine for 30 min and the cell lysates were immunoprecipitated with the spike reactive polyclonal antibody HMAF. In the vector co-expressing cells, a ~190 kDa protein was visualized together with significant amounts of ~110, and ~80 kDa proteins and low levels of ~150 and ~125 kDa proteins (Fig 1C, Vector lane). Interestingly, the levels of the ~110 and ~80 kDa products were significantly increased upon over-expression of furin, PC7 and PC5B (Fig. 1C, lanes 5-7), the same convertases that enhanced the production of the ~80 kDa CTF from recombinant proS (Fig. 1B). The ~125 kDa product, which was not observed in the V5 antibody experiments (Fig 1B), might represent an N-terminal S1 fragment, only seen with the HMAF antibody. Thus, apart from the ~125 kDa protein, the SDS- polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) profile of SARS CoV infected cells closely resembled that observed with the recombinant proS in furin-expressing FD11 cells (Fig. 1B). The low levels of the processed proteins precluded microsequencing analysis and hence the N-terminal sequences of the cleavage products could not be determined.

Enhanced virus release in Vero E6 cells stably expressing Furin, PC7 or PC5B

Since membrane-bound PCs increased the processing of proS (Figs. 1B and C), we measured the cytopathic effect (CPE) (Table 1) and the SARS-CoV titers (Fig. 2) from those cells 24h post- infection. We observed a correlation between the efficiency of processing with both the extent of CPE (Table 1) and titer of the virus recovered from the media (Fig. 2A). Accordingly, PC7, furin and PC5B released more viruses resulting in more extensive

CPE than either vector alone or PC5A expressing Vero E6 cells. Although the increase in virus titer is modest (~2-3-fold), it concurs with the notion that PC-mediated processing of the spike protein enhances virus release.

PC inhibition reduce SARS-CoV spread and abrogate CPE

Since membrane-bound PCs increased both spike processing and viral titers, we investigated whether the membrane-permeable PC-inhibitor, decanoyl-RVKR-chloromethylketone (dec-RVKR-cmk) could interfere with CPE, viral spread, and proS processing. This type of PC-inhibitor has been widely used to block glycoprotein processing and infectivity of several viruses including HIV-1 (11), respiratory syncytial virus (21), and MHV (8). Thus, Vero E6 cells were infected with SARS-CoV for 1h without inhibitor; the inoculums were then changed with fresh media supplemented with 60 μ M of dec-RVKR-cmk and incubated for 15-24h. Microscopic examination of the cell monolayer indicated that the infected cells showed extensive CPE, while virtually no CPE was observed with the dec-RVKR-cmk treated cells (left panels in Fig. 3). This demonstrates that the extracellularly added PC-inhibitor abrogated the CPE caused by SARS-CoV infection. In an attempt to gain more insight about the infection process, we performed immunofluorescence of dec-RVKR-cmk treated and untreated infected cells (right panels in Fig. 3). Infected cells showed extensive antigen staining while dec-RVKR-cmk treated cells showed a modest number of cells infected with greatly reduced spreading evident throughout the intact monolayer. The concentration dependence of the dec-RVKR-cmk effect revealed that at 60 μ M the viral titer was reduced by a factor of ~100 (Fig. 2B) and that the CPE was abolished (Table 1). These results strongly suggested the possibility that the inhibitor dec-RVKR-cmk blocks a PC-mediated processing step required for extensive virus spread and ensuing CPE.

Dec-RVKR-cmk inhibition of proS processing

We next analyzed whether dec-RVKR-cmk could inhibit SARS-CoV proS processing. Accordingly, we incubated infected Vero E6 cells in the presence of increasing doses of

this inhibitor for 1h, and then pulse-labeled the cells for 30 min, followed by immunoprecipitation of the lysates with the HMAF antibody (Fig. 4A). The data revealed a dose-dependent inhibition of the formation of the ~80 kDa CTF (~86% inhibition at 60 μ M; Fig. 4B) and at most only a ~40% effect on the ~110 kDa CTF (Fig. 4B). This suggests that the dec-RVKR-cmk exerts a dominant inhibitory effect on the generation of the ~80 kDa CTF. In addition, it may also exert a partial, possibly non-specific, inhibitory effect on the enzymes generating the ~100-110 kDa CTF. Such dominant inhibitory effect of dec-RVKR-cmk has been previously reported for β -secretase (22) and Adamalysins (ADAMs) (10). Since viral titer and CPE were maximally reduced at 60 μ M of dec-RVKR-cmk (Figs. 2B, 4B and Table 1), we propose that the inhibition of the ~80 kDa CTF production best correlates with these observations.

Pulse-chase analysis revealed S-immunoreactive high molecular weight SDS resistant complexes (>500 kDa, Fig. 4C). These complexes were only observed in SARS-CoV infected cells, but not in cells transfected with recombinant proS, possibly due to the different heating and gel conditions used. Indeed, similar large molecular weight proteins were recently observed by Song *et al.* (23) that disappear upon boiling at 100°C, a similar temperature used in our transfection experiments. In contrast, our protein analysis involving SARS-CoV infection was performed using NuPAGE gel system which requires heating of the samples at 70°C for 10 min. Size exclusion chromatography, suggested that the ~570 kDa complex likely represents a homotrimer of proS (23). In the media of infected Vero E6 cells, S-containing complexes were largely dominant over proS (Fig. 4C), and no processed products were detected. This raises the possibility that either budding virions selectively incorporated proS or that proS-cleavage products are tightly bound to the high molecular weight complexes. It should be noted that no accumulation of processed spike glycoproteins were observed upon chase periods. However, incubation with dec-RVKR-cmk increased the cellular level of the Golgi-modified ~210 kDa proS form in parallel with the inhibition of its cleavage (Fig. 4C). Taken together, our data demonstrate that dec-RVKR-cmk exerts a dose-dependent inhibitory effect on the generation of ~80 kDa CTF

with a concomitant increase in the levels of the Golgi-modified proS form, clearly demonstrating an alteration in the SARS-CoV spike biosynthesis.

Mutagenesis of the potential processing sites

We next attempted to identify the cleavage positions by site directed mutagenesis of selected basic amino acids in and around site A and B (Fig. 1A). While the mutant K672A did not abrogate processing, the R667A variant diminished the formation of the ~80 kDa product (Fig. 5A). These data suggest that while Lys₆₇₂ is not critical for the generation of the ~110 or ~80 kDa CTF-products, Arg₆₆₇ influences the level of the ~80 kDa product, possibly via a conformational effect. Since all the mutations tested around the potential sites A and B (Fig. 5A) did not block the processing and in some cases resulted in major retention in the ER (R761A) (*not shown*), we are unable to precisely map by mutagenesis the processing sites. However, to better define if the generation of the ~110 kDa CTF results from the a processing around site A, we tried to enhance proS processing at the potential site A through replacement of the SLLR₆₆₇ sequence (Fig. 1A) by a furin-favored RRKR₆₆₇ motif (9). Compared to control (WT), furin caused a drastic reduction of this mutant ~210 kDa Golgi form at the expense of an enhanced ~105-110 kDa protein, without significantly increasing the levels of the ~80 kDa product (Fig. 5B). Based on the mobility in SDS-PAGE, we suggest that the ~110 kDa CTF is produced by processing of proS at a site close to the aligned cleavage sites in other coronaviruses (site A; Fig. 1A), and that the ~80 kDa CTF is generated by cleavage at a site downstream from Arg₆₆₇ by either PC-like enzymes or proteinases activated by PCs. The presence of the RNTR₇₆₁ and PTKR₇₉₇ motifs within the S-protein suggested that one of them might represent the sought PC-like cleavage site responsible for the generation of the ~80 kDa CTF. However, neither of the mutants R758A (P4 mutant), R761K or R761Q (P1 mutants), or the double mutant R758A + R761K (P1 + P4 mutant), nor the R797A (P1 mutant; data not shown) eliminated the ~80 kDa CTF (Fig. 5A). This suggests that none of them are candidate PC-sites, or that another compensating enzyme(s) could cleave these mutagenized sites, as reported for Ebola virus (24).

Furin cleavage of a proS site B synthetic internally quenched fluorogenic peptide

Since the mutagenesis studies were inconclusive, we used an alternative approach whereby we tested the *in vitro* cleavage by recombinant furin of synthetic internally quenched fluorogenic peptides (17) mimicking the candidate sites A and B. Site B encompassing peptide (QS1; Abz-E-Q-D-R-N-T-R₇₆₁↓E-V-F-A-Q-3-nitrotyrosine amide; Abz = 2 amino benzoic acid) was incubated with purified furin in the presence or absence of inhibitors (EDTA and dec-RVKR-cmk) and analyzed by RP-HPLC. The RP-HPLC chromatogram of the furin digestion showed the disappearance of the QS1 peptide (retention time: R_t=34.3 min, Fig. 6A, UV panel) and the appearance of two cleavage products (R_t=19.4 and 31.2 min). In contrast, when EDTA and dec-RVKR-cmk (CMK) were added to the peptide digestions, such cleavage was prevented as expected. Detection using the fluorescence channel indicated the appearance of the N terminal cleaved product eluting at 19.6 min. To confirm the identity of the location of the peptide bond cleavage, we analyzed the collected peptides by MALDI-tof mass spectrometry. Mass spectral data showed that the RNTR₇₆₁ containing peptide was indeed cleaved by furin C-terminal to R₇₆₁. (Fig. 6B). In contrast, the PTKR₇₉₇ (QS2) and SLLR₆₆₇ (QS3) containing peptides were not cleaved at all (*not shown*). This may be rationalized by molecular modeling of S, whereby the RNTR₇₆₁ sequence is in a turn sandwiched between two α -helices, while the PTKR₇₉₇ is itself within a α -helix (25), a secondary structure that usually does not favor cleavage (26). Although the above *in vitro* data suggested that furin is able to process a peptide encompassing the RNTR₇₆₁ site, and the inhibitor dec-RVKR-cmk reduced the generation of the ~80 kDa, *ex vivo* processing was not affected by mutations around this sequence (Fig. 5A). We conclude that it is likely that the ~80 kDa CTF is generated indirectly by a PC-activated enzyme.

DISCUSSION

The present report demonstrated that both recombinant proS and SARS-CoV infected cells produce an ~80 kDa CTF. Although other investigators reported the lack of proS processing (27-30), this report and others (31;32) detected CTFs by transient transfection of recombinant spike glycoprotein. The inconsistency between these observations may perhaps be due to the recombinant virus expression systems chosen, levels of expression and the antibodies used. Pulse labeling analysis of infected Vero E6 lysates with a commercially available S-specific antibody and with sera of convalescent patients (*not shown*) also detected proS processing products. In Vero E6 cells or Vero E6 cells expressing the empty vector alone, the levels of the ~80 kDa product was very modest (less than 10 % of proS). This would mean that the processing is very inefficient, but that possibly such low level of cleavage may be sufficient to support virus assembly and spread. On the other hand, in cells overexpressing membrane-bound PCs (furin, PC7, PC5B), we observed an enhancement of CPE and viral titers, indicating a positive correlation between those parameters and the increased appearance of the ~80 kDa protein. Interestingly, a soluble form of furin lacking its transmembrane domain was not able to mediate the processing to the ~80 kDa protein (*not shown*). The significance of proS cleavage in SARS-CoV infection was further emphasized by the complete abrogation of CPE with a PC specific inhibitor (dec-RVKKR-cmk) (Table 1).

Even though no basic-amino acid stretch aligned with the S-sequences of group II coronaviruses, at least one of the cleavages of the SARS-CoV proS is likely to occur within or close to aa 667, as demonstrated by the enhancement of the ~110 kDa CTF production with the RRKR₆₆₇ mutant. The enzyme responsible for this cleavage appears to be active early in the secretory pathway, since the fungal metabolite brefeldin A (33) does not affect its activity (*not shown*). It is possible that the cognate protease could be related to the one responsible for the early cleavage of the Crimean Congo Hemorrhagic fever Gc glycoprotein (34). Moreover, peptides encompassing this region were not cleaved *in vitro* by furin; supporting the conclusion that furin does not directly generate the ~110 kDa CTF.

In contrast, the generation of the ~80 kDa CTF was sensitive to dec-RVKR-cmk in a dose-dependent manner. Additionally, based on *in vitro* and *ex vivo* data, furin or membrane-bound PCs are likely to process proS into an ~80 kDa CTF. Whether the proS cleavage is effected directly by the PCs or indirectly by PCs activating another cellular protease remains to be elucidated. The fact that the fluorogenic peptide containing RNTR₇₆₁ is efficiently cleaved by furin and the cleavage is inhibited by EDTA or dec-RVKR-cmk raised the possibility for a direct role for PCs in proS processing. If that was true, then our extensive mutagenesis analyses should have enabled us to identify the potential processing site(s). Since none of the mutations of the candidate cleavage sites have resulted in the lack of processing, we suggest that the role played by PCs is indirect. In the case of Nipah virus, the F0 protein is cleaved ubiquitously into F1 and F2 and here also none of the mutations of potential cleavage sites were able to inhibit the processing (35). The authors concluded that Nipah virus fusion protein is processed by a ubiquitous protease which is different from the PCs since it does not require the presence of basic residues at the cleavage site. It is possible that SARS-CoV spike protein is processed by similar proteases, which may require PCs for activation.

Interestingly, it was reported that addition of trypsin augmented proS cleavage into an ~85 kDa CTF (similar to the ~80 kDa CTF described in this work), which resulted in efficient cell-cell fusion (syncytia) (36). This result raised the possibility that the kinetics of SARS-CoV syncytia formation or cell to cell spread is affected by proS processing. Furthermore, a recent report demonstrated the significance of dec-RVKR-cmk in the prevention of murine hepatitis coronavirus (MHV) spike protein processing and the subsequent effect on cell-cell fusion and not virus-cell fusion as supported by dec-RVKR-cmk treatment (8). Similarly, in our experiments, dec-RVKR-cmk directly or indirectly reduced the appearance of the ~80 kDa protein, which in turn may have resulted in the abrogation of the cytopathicity associated with virus spread. The concentration of dec-RVKR-cmk used in these experiments did not result in microscopically identifiable toxicity effects to the cells and is well below the concentration used in other reports. Future studies

should address if the replication of virus was affected by dec-RVKR-cmk. Taken together, our work strongly suggest that proS processing and viral spread are interconnected, and that processed proS may be required for direct cell-cell spread and/or for CPE initiation resulting in enhanced secretion of mature virions (4).

In conclusion, this work showed that SARS-CoV S protein processing is upregulated by the overexpression of membrane-bound PCs and suppression of the processing by dec-RVKR-cmk results in abrogation of CPE and decline in virus titer. Inhibition of the PCs may represent an alternative strategy beneficial to patients infected with SARS-CoV, as already suggested for other infectious pathogens requiring host cell PC-processing of their surface proteins (10). A PC-inhibitor could possibly be used along with vaccination (37) and/or in conjunction with interferon treatment (13) or with the novel compounds targeting the SARS-CoV proteins recently reported (38). In view of the widespread implication of the PCs in the processing of various surface glycoproteins of infectious viruses, development of a small molecule inhibitor of the convertases is urgently needed, as its usefulness may also extend to too many emerging deadly infectious agents.

Acknowledgments

We thank S. Basak for peptide synthesis and in vitro furin analysis, M.-C. Asselin for help in cell biology. We thank Dr. J. Towner and J. Dover for their suggestions for the plaque assay and Dr. P. Rollin and Dr. T. Ksiazek for generously providing the SARS-CoV stocks, antibodies, and support. This work was supported by a Canadian PENCE grant (T3), CIHR group Grant #MGC-64518 (to N.G.S. and M.C.), and CIHR Grant #MGP-44363 (to N.G.S.). The secretarial help of Brigitte Mary was greatly appreciated.

REFERENCES

1. Ksiazek,T.G., Erdman,D., Goldsmith,C.S., Zaki,S.R., Peret,T., Emery,S., Tong,S., Urbani,C., Comer,J.A., Lim,W., Rollin,P.E., Dowell,S.F., Ling,A.E., Humphrey,C.D., Shieh,W.J., Guarner,J., Paddock,C.D., Rota,P., Fields,B., DeRisi,J., Yang,J.Y., Cox,N., Hughes,J.M., LeDuc,J.W., Bellini,W.J., and Anderson,L.J. (2003) *N.Engl.J.Med.* **348**, 1953-1966.
2. Marra,M.A., Jones,S.J., Astell,C.R., Holt,R.A., Brooks-Wilson,A., Butterfield,Y.S., Khattra,J., Asano,J.K., Barber,S.A., Chan,S.Y., Cloutier,A., Coughlin,S.M., Freeman,D., Girm,N., Griffith,O.L., Leach,S.R., Mayo,M., McDonald,H., Montgomery,S.B., Pandoh,P.K., Petrescu,A.S., Robertson,A.G., Schein,J.E., Siddiqui,A., Smailus,D.E., Stott,J.M., Yang,G.S., Plummer,F., Andonov,A., Artsob,H., Bastien,N., Bernard,K., Booth,T.F., Bowness,D., Czub,M., Drebot,M., Fernando,L., Flick,R., Garbutt,M., Gray,M., Grolla,A., Jones,S., Feldmann,H., Meyers,A., Kabani,A., Li,Y., Normand,S., Stroher,U., Tipples,G.A., Tyler,S., Vogrig,R., Ward,D., Watson,B., Brunham,R.C., Krajden,M., Petric,M., Skowronski,D.M., Upton,C., and Roper,R.L. (2003) *Science* **300**, 1399-1404.
3. Rota,P.A., Oberste,M.S., Monroe,S.S., Nix,W.A., Campagnoli,R., Icenogle,J.P., Penaranda,S., Bankamp,B., Maher,K., Chen,M.H., Tong,S., Tamin,A., Lowe,L., Frace,M., DeRisi,J.L., Chen,Q., Wang,D., Erdman,D.D., Peret,T.C., Burns,C., Ksiazek,T.G., Rollin,P.E., Sanchez,A., Liffick,S., Holloway,B., Limor,J., McCaustland,K., Olsen-Rasmussen,M., Fouchier,R., Gunther,S., Osterhaus,A.D., Drosten,C., Pallansch,M.A., Anderson,L.J., and Bellini,W.J. (2003) *Science* **300**, 1394-1399.

4. Ng,M.L., Tan,S.H., See,E.E., Ooi,E.E., and Ling,A.E. (2003) *J.Gen.Virol.* **84**, 3291-3303.
5. Nicholls,J.M., Poon,L.L., Lee,K.C., Ng,W.F., Lai,S.T., Leung,C.Y., Chu,C.M., Hui,P.K., Mak,K.L., Lim,W., Yan,K.W., Chan,K.H., Tsang,N.C., Guan,Y., Yuen,K.Y., and Peiris,J.S. (2003) *Lancet* **361**, 1773-1778.
6. Li,W., Moore,M.J., Vasilieva,N., Sui,J., Wong,S.K., Berne,M.A., Somasundaran,M., Sullivan,J.L., Luzuriaga,K., Greenough,T.C., Choe,H., and Farzan,M. (2003) *Nature* **426**, 450-454.
7. Gallagher,T.M. and Buchmeier,M.J. (2001) *Virology* **279**, 371-374.
8. de Haan,C.A., Stadler,K., Godeke,G.J., Bosch,B.J., and Rottier,P.J. (2004) *J.Virol.* **78**, 6048-6054.
9. Seidah,N.G. and Chretien,M. (1999) *Brain Res.* **848**, 45-62.
10. Thomas,G. (2002) *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **3**, 753-766.
11. Hallenberger,S., Bosch,V., Angliker,H., Shaw,E., Klenk,H.D., and Garten,W. (1992) *Nature* **360**, 358-361.
12. Stadler,K., Massignani,V., Eickmann,M., Becker,S., Abrignani,S., Klenk,H.D., and Rappuoli,R. (2003) *Nat.Rev.Microbiol.* **1**, 209-218.
13. Haagmans,B.L., Kuiken,T., Martina,B.E., Fouchier,R.A., Rimmelzwaan,G.F., Van Amerongen,G., van Riel,D., de Jong,T., Itamura,S., Chan,K.H., Tashiro,M., and Osterhaus,A.D. (2004) *Nat.Med.* **10**, 290-293.
14. Bergeron,E., Basak,A., Decroly,E., and Seidah,N.G. (2003) *Biochem.J.* **373**, 475-484.

15. Brandt,W.E., Buescher,E.L., and Hetrick,F.M. (1967) *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **16**, 339-347.
16. Basak,A., Chretien,M., and Seidah,N.G. (2002) *FEBS Lett.* **514**, 333-339.
17. Basak,A., Zhong,M., Munzer,J.S., Chretien,M., and Seidah,N.G. (2001) *Biochem.J.* **353**, 537-545.
18. Hofmann,H., Hattermann,K., Marzi,A., Gramberg,T., Geier,M., Krumbiegel,M., Kuate,S., Uberla,K., Niedrig,M., and Pohlmann,S. (2004) *J.Virol.* **78**, 6134-6142.
19. Gordon,V.M., Klimpel,K.R., Arora,N., Henderson,M.A., and Leppla,S.H. (1995) *Infect.Immun.* **63**, 82-87.
20. Siegfried,G., Khatib,A.M., Benjannet,S., Chretien,M., and Seidah,N.G. (2003) *Cancer Res.* **63**, 1458-1463.
21. Sugrue,R.J., Brown,C., Brown,G., Aitken,J., and McL,R.H. (2001) *J.Gen.Virol.* **82**, 1375-1386.
22. Benjannet,S., Elagoz,A., Wickham,L., Mamarbachi,M., Munzer,J.S., Basak,A., Lazure,C., Cromlish,J.A., Sisodia,S., Checler,F., Chretien,M., and Seidah,N.G. (2001) *J.Biol.Chem.* **276**, 10879-10887.
23. Song,H.C., Seo,M.Y., Stadler,K., Yoo,B.J., Choo,Q.L., Coates,S.R., Uematsu,Y., Harada,T., Greer,C.E., Polo,J.M., Pileri,P., Eickmann,M., Rappuoli,R., Abrignani,S., Houghton,M., and Han,J.H. (2004) *J.Virol.* **78**, 10328-10335.
24. Wool-Lewis,R.J. and Bates,P. (1999) *J.Virol.* **73**, 1419-1426.

25. Spiga,O., Bernini,A., Ciutti,A., Chiellini,S., Menciacsi,N., Finetti,F., Causarono,V., Anselmi,F., Prischi,F., and Niccolai,N. (2003) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **310**, 78-83.
26. Brakch,N., Rholam,M., Boussetta,H., and Cohen,P. (1993) *Biochemistry* **32**, 4925-4930.
27. Bisht,H., Roberts,A., Vogel,L., Bukreyev,A., Collins,P.L., Murphy,B.R., Subbarao,K., and Moss,B. (2004) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 6641-6646.
28. Bukreyev,A., Lamirande,E.W., Buchholz,U.J., Vogel,L.N., Elkins,W.R., St Claire,M., Murphy,B.R., Subbarao,K., and Collins,P.L. (2004) *Lancet* **363**, 2122-2127.
29. Xiao,X., Chakraborti,S., Dimitrov,A.S., Gramatikoff,K., and Dimitrov,D.S. (2003) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **312**, 1159-1164.
30. Yao,Y.X., Ren,J., Heinen,P., Zambon,M., and Jones,I.M. (2004) *J.Infect.Dis.* **190**, 91-98.
31. Ying,W., Hao,Y., Zhang,Y., Peng,W., Qin,E., Cai,Y., Wei,K., Wang,J., Chang,G., Sun,W., Dai,S., Li,X., Zhu,Y., Li,J., Wu,S., Guo,L., Dai,J., Wang,J., Wan,P., Chen,T., Du,C., Li,D., Wan,J., Kuai,X., Li,W., Shi,R., Wei,H., Cao,C., Yu,M., Liu,H., Dong,F., Wang,D., Zhang,X., Qian,X., Zhu,Q., and He,F. (2004) *Proteomics* **4**, 492-504.
32. Wu,X.D., Shang,B., Yang,R.F., Yu,H., Ma,Z.H., Shen,X., Ji,Y.Y., Lin,Y., Wu,Y.D., Lin,G.M., Tian,L., Gan,X.Q., Yang,S., Jiang,W.H., Dai,E.H., Wang,X.Y., Jiang,H.L., Xie,Y.H., Zhu,X.L., Pei,G., Li,L., Wu,J.R., and Sun,B. (2004) *Cell Res.*
33. Lippincott-Schwartz,J., Yuan,L., Tipper,C., Amherdt,M., Orci,L., and Klausner,R.D. (1991) *Cell* **67**, 601-616.

34. Vincent,M.J., Sanchez,A.J., Erickson,B.R., Basak,A., Chretien,M., Seidah,N.G., and Nichol,S.T. (2003) *J.Virol.* **77**, 8640-8649.
35. Moll,M., Diederich,S., Klenk,H.D., Czub,M., and Maisner,A. (2004) *J.Virol.* **78**, 9705-9712.
36. Simmons,G., Reeves,J.D., Rennekamp,A.J., Amberg,S.M., Piefer,A.J., and Bates,P. (2004) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 4240-4245.
37. Yang,Z.Y., Kong,W.P., Huang,Y., Roberts,A., Murphy,B.R., Subbarao,K., and Nabel,G.J. (2004) *Nature* **428**, 561-564.
38. Kao,R.Y., Tsui,W.H., Lee,T.S., Tanner,J.A., Watt,R.M., Huang,J.D., Hu,L., Chen,G., Chen,Z., Zhang,L., He,T., Chan,K.H., Tse,H., To,A.P., Ng,L.W., Wong,B.C., Tsoi,H.W., Yang,D., Ho,D.D., and Yuen,K.Y. (2004) *Chem.Biol.* **11**, 1293-1299.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Processing of the SARS-CoV spike glycoprotein precursor. (A) Schematic representation of the S protein. Arrows point to potential cleavage sites (sites A and B). The signal peptide (SP), S1/S2 domains, heptad repeats (HR1, HR2), cytosolic tail (CT) and V5-epitope (V5) are illustrated. Underneath the spike scheme is an amino acids (aa) alignment of group II coronaviruses cleavage sites with the SARS-CoV S. Basic aa are emphasized in bold. Downward arrows indicate group II proS identified cleavage sites (B) FD11 cells stably expressing either the vector alone or a defined convertase were transiently transfected with the spike glycoprotein cDNA. At 48h post-transfection with the designated constructs, cell-lysates were V5-immunoprecipitated, proteins were resolved by 7% SDS-PAGE and analyzed by Western blot with a V5 antibody. (C) Vero E6 cells stably expressing the PCs were infected with SARS-CoV, control (CTL) represents uninfected cells. After virus adsorption at a multiplicity of infection (MOI) of 1 for 1h, inoculums were removed. Pulse-labeled cell lysates proteins were HMAF-immunoprecipitated and resolved by 7% NuPAGE. Proteins were visualized by autoradiography. Asterisk (*) denotes increased spike processing.

Fig. 2. The membrane bound PCs increase SARS-CoV titers and their inhibition by dec-RVKR-cmk reduces SARS-CoV titers. (A) Cells were infected as in Fig. 1C. Twenty-four hours post-infection, clarified cell supernatants were titrated. Serial dilutions of the virus containing supernatant were added to a fresh monolayer of Vero E6 cells followed by agar overlay. The plaques were visualized by neutral red staining. (B) Vero E6 cells were infected as in Fig. 1C except that different doses of dec-RVKR-cmk were added to the media after inoculum removal. Viruses were titrated as described in (A). These data are representative of at least 4 independent experiments and are presented as average with the corresponding standard deviation.

Fig. 3. PC-CMK inhibits SARS-CoV spread and CPE. Vero E6 cells were infected with SARS-CoV (MOI = 0.5) as in Fig. 1C. Upon removal of the virus fresh media containing 60 μ M of dec-RVKR-cmk was added to the cells. The onset of CPE was monitored by microscopic

observation. Left panel pictures were taken 24h post-infection. At 15h post-infection, another set of cells were permeabilized and viral antigens probed with HMAF and stained with a fluorescein-conjugated secondary antibody (right panel).

Fig. 4. Biosynthetic analysis of PC-inhibition of SARS-CoV S-processing. (A) Vero E6 cells were infected as described in Fig. 1C. Cells were then incubated with media containing the indicated concentrations of dec-RVKR-cmk for 16h. Labeling and electrophoresis were performed as in Fig. 1D except that starvation and pulse labeling were performed in the presence of indicated amounts of dec-RVKR-cmk. (B) Percentage inhibition of ~110 and ~80 kDa CTFs levels were quantified from the Phosphor Imager acquired data of panel A. (C) Infections and dec-RVKR-cmk treatments were done as in panel A, except that the samples were chased with cold media for 3h. CTL lane indicates an uninfected control treated with 60 μ M dec-RVKR-cmk. At the end of the 3h chase period, media were immunoprecipitated with the antiserum HMAF.

Fig. 5. Processing of proS mutants. (A) Wild type (WT) and mutant proS were transfected in FD11 cells stably expressing furin. (B) Stable FD11-furin cells were transfected with either proS-V5 or proS-(RRKR₆₆₇)-V5 mutant. Immunoprecipitation and Western blot were performed as in Fig. 1B.

Fig. 6. *In vitro* digestion of proS QS1 peptide by recombinant furin. (A) The internally quenched fluorogenic peptide QS1 was incubated with recombinant furin in the absence or presence of EDTA and dec-RVKR-cmk (CMK) as indicated. Crude reactions were submitted to RP-HPLC equipped with consecutive online monitoring of ultraviolet (UV) absorbance followed by fluorescence emission. Chromatograms of QS1 were produced by the simultaneous monitoring of UV absorbance (left panel) and fluorescence emission (right panel). Control indicates undigested QS1 that showed a single major peak with a retention time (R_t) of 34.3 min. The asterisk marks a peak not specific to furin digestion. Note in the furin digest chromatogram

(furin) the disappearance of the 34.3 min peak and appearance of a fluorescent N-terminal ($R_t = 19.6$ min) and a non-fluorescent C-terminal ($R_t = 31.2$ min) products. These processing peptides were not detected with dec-RVKR-cmk or EDTA. **(B)** Mass spectrometry identified each peptide: undigested peptide showed peaks at an m/z of 1841 ($M+Na$)⁺, 1819 ($M+H$)⁺, 1803 ($M+H-NH_2$)⁺ and 1787 ($M+H-2NH_2$)⁺. The N-terminal product exhibited an m/z of 1036 ($M+H$)⁺ and 1020 ($M+H-NH_2$)⁺. The C-terminal product displayed an m/z of 801 ($M+H$)⁺ and 823 ($M+Na$)⁺, indicating cleavage after Arg₇₆₁.

Table 1. CPE evaluation of SARS-CoV infected cells. Vero E6 overexpressing PCs (Cell line) or incubated with dec-RVKR-cmk. Vero E6 were infected at a MOI of 0.5 for 1h. Inoculums were removed and medium containing or not different doses of dec-RVKR-cmk were added to the cells. 24h later cytopathic effects (CPE) were monitored by microscopy.

Cell line	CPE
Vector	+++
PACE4	+++
PC5A	+++
PC5B	+++++
furin	++++++
PC7	+++++++
[dec-RVKR-cmk]	CPE
None	+++++++
15 μ M	+++++
30 μ M	+++
60 μ M	-

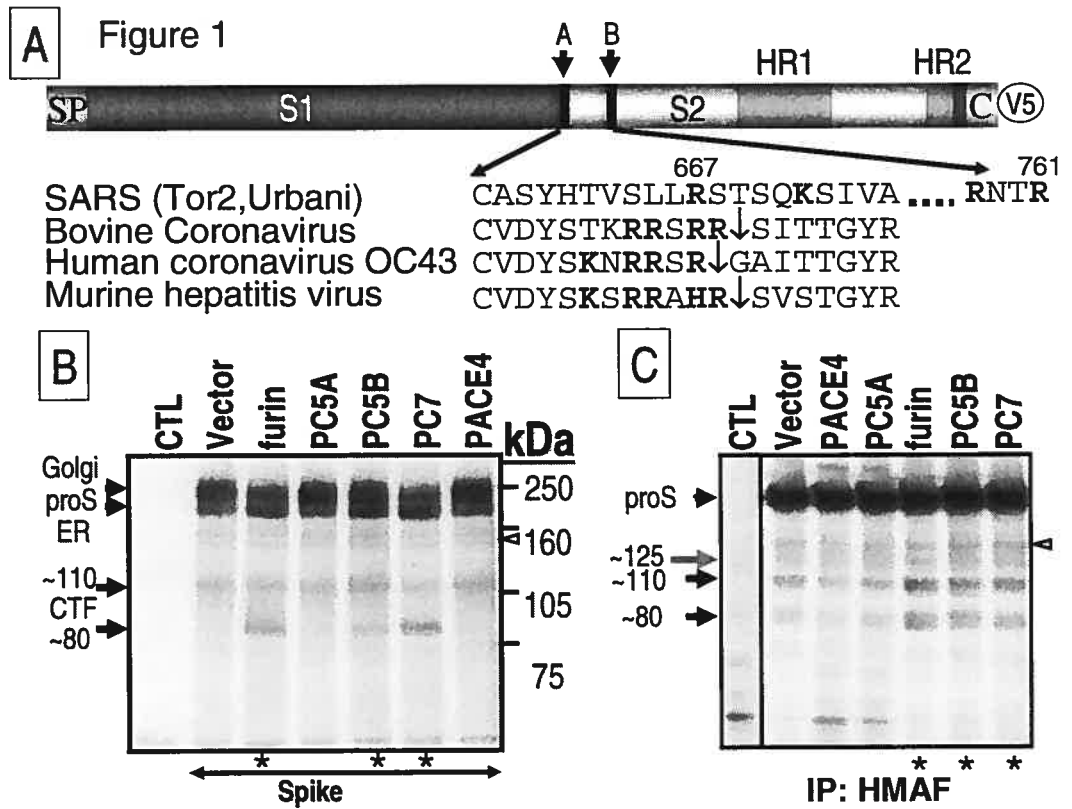
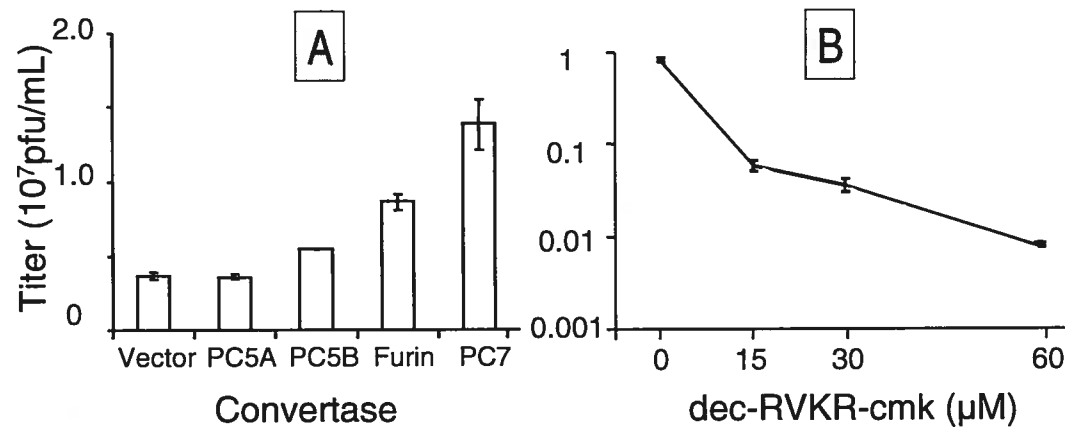


Figure 2



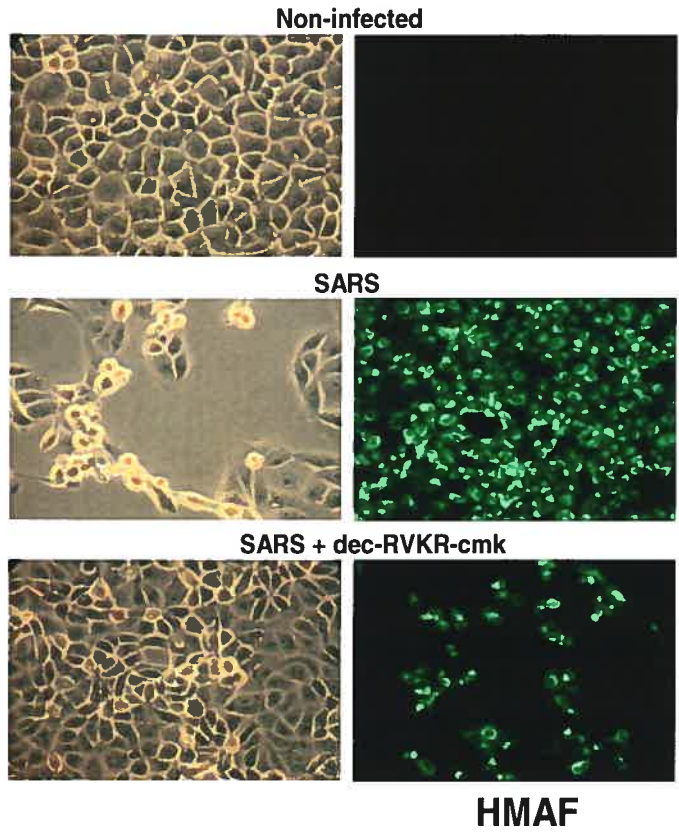


Figure 3

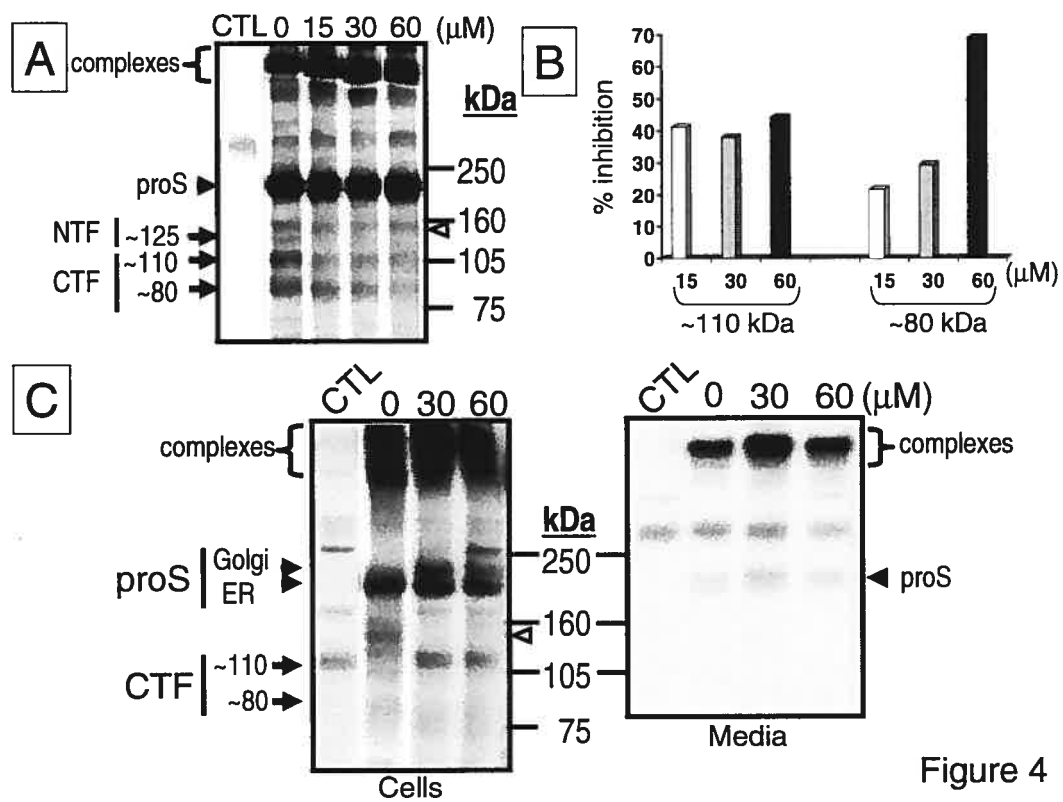
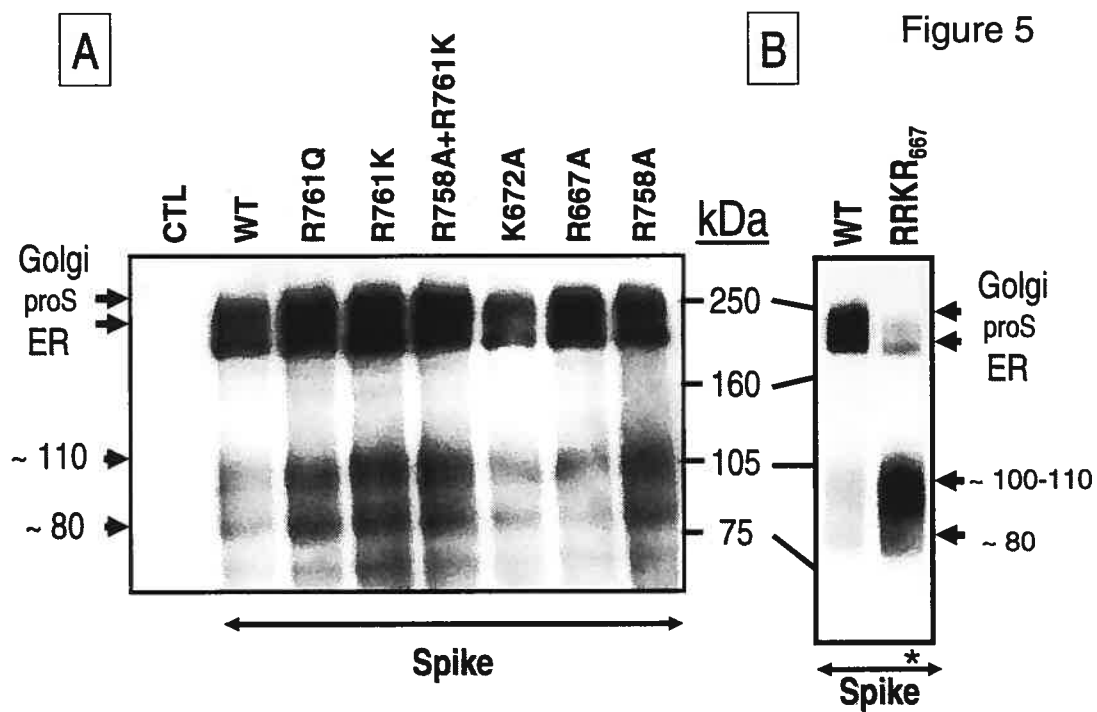
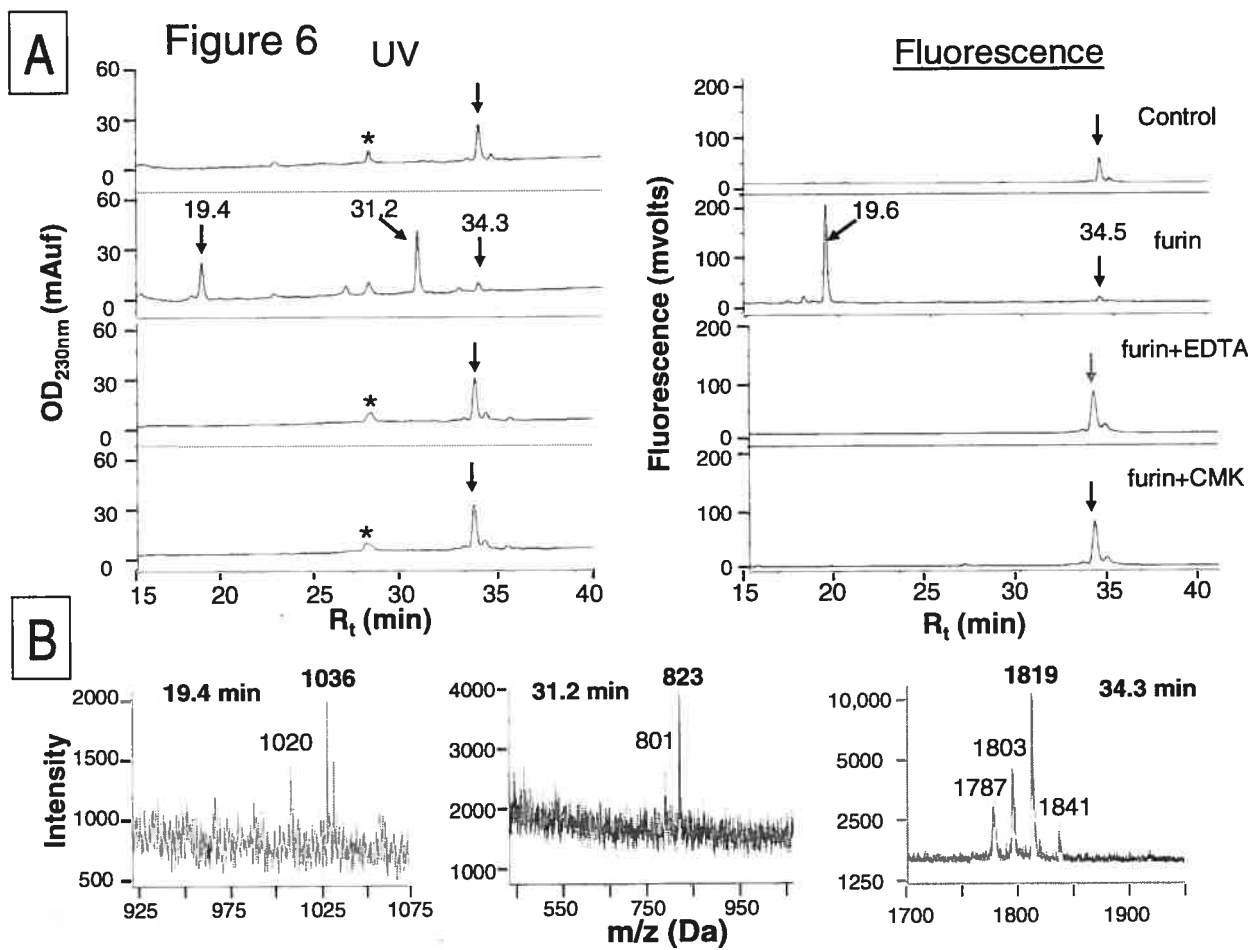


Figure 4





Chapitre 5. Discussion et perspectives futures

Nous avons étudié la protéolyse limitée de deux glycoprotéines dont les origines sont cellulaires ou virales, l'intégrine α_4 et la GPS-SRAS. L'activité de certaines PCs de la famille Kexine augmente significativement la protéolyse de ces glycoprotéines à des sites de clivage dérogeant du motif minimal RXXR↓ de la furine, ou RXLX↓ de SKI-1. La mutagenèse dirigée et la digestion *in vitro* de peptides englobant les différents sites potentiels permettent de conclure que PC5A et la furine clivent directement la sous-unité α_4 des intégrines. Par contre, la GPS-SRAS serait indirectement coupée dans une voie requérant l'activité des PCs membranaires (PC7, la furine ou PC5B).

5.1 PC5A et la furine, les convertases des intégrines

L'article 1 démontre clairement que PC5A et la furine augmentent drastiquement l'endoprotéolyse de l'intégrine α_4 en sa forme mature de 80 et 70 kDa. Ces mêmes PCs sont également très efficaces à cliver l' α_6 (groupe I), l' α_5 et α_v (groupe II) (Lissitzky et coll., 2000). Nos travaux et ceux de Lissitzky et collaborateurs (2000) confirment donc la prépondérance de la furine et PC5A à cliver les intégrines α indépendamment des motifs de clivage présents (groupe I ou II). Contrairement à Lissitzky et collaborateurs (2000), nous confirmons l'efficacité de ces PCs (la furine et PC5) à scinder une intégrine endogène (cellules CEM-T4) par les transfections stables de ces convertases. De plus, la corrélation positive observée entre l'expression de la furine et la maturation de l' α_4 appuie l'hypothèse selon laquelle, la furine clive cette intégrine majoritairement leucocytaire. La forte concentration d'intégrines α_5 immatures dans le foie des souris nulles en la furine supporte *in vivo* le rôle de la furine sur la protéolyse des intégrines de type II, mais il reste une maturation résiduelle probablement dépendante de PC5A ou MT1-MMP (Roebroek et coll., 2004; Ratnikov et coll., 2002). Le dec-RVKR-cmk ou des oligonucléotides antisens dirigés

contre PC5 augmentent également l'expression de l' α_v immature (Stawowy et coll., 2004). L'efficacité de ces oligonucléotides antisens suggère que PC5 clive une proportion significative de l' α_v endogène des cellules vasculaires des muscles lisses. Il est également intéressant de noter que l'isoforme PC5B dont le site catalytique est identique à PC5A, est inefficace à maturer l' α_4 et d'autres sous-unités α (Lissitzky et coll., 2000). La localisation de PC5A à la surface cellulaire ou dans la matrice extracellulaire (Nour et coll., non publié)(Tsuji et coll., 2003) pourrait rationaliser sa grande efficacité à cliver les chaînes α des intégrines qui sont majoritairement présentes à la membrane plasmique.

Le VEGF-C (*vascular endothelial growth factor-C*) présente un motif biochimiquement similaire à l' α_4 (VEGF-C : **HSIIRR↓SL** vs α_4 : **HVISKR↓ST**). L'importance de l'histidine n'est pas déterminée pour ce substrat, mais la furine, PC5A et PC7 sont les PCs les plus efficaces à cliver ce facteur de croissance (Siegfried et coll., 2003). Même si le motif du VEGF-C est comparable à celui des intégrines de type II, PC7 clive seulement le VEGF-C. Contrairement au VEGF-C, nos travaux et ceux de Lissitzky et coll. (2000) confirment que PC7 ne mature aucune des intégrines α natives testées et ce même *in vitro*, mais un peptide englobant le site de l' α_4 l'est (Bergeron et Seidah, résultats non-publiés). Ceci confirme que le motif de clivage de l' α_4 est reconnu par PC7, mais que les structures secondaires de la région de clivage des intégrines α natives préviennent vraisemblablement leur protéolyse par cette PC. Une situation analogue aux intégrines pourrait prévenir le clivage de la p62 du virus de la forêt de Semliki, parce que contrairement à la furine, PC7 clive cette protéine seulement en présence de détergent. Il serait possible de vérifier si l'addition de Triton X-100 permettrait aussi la protéolyse des intégrines par PC7 *in vitro*. Ceci confirmerait la sensibilité de PC7 aux structures secondaires des sites de clivage.

Certaines intégrines α (α_v , α_3 , α_5) seraient aussi clivées par la MT1-MMP (*membrane-type-1 matrix metalloproteinase*) à des sites adjacents aux motifs reconnus par les PCs, mais l'intégrine α_2 qui n'est pas un substrat des PCs, ne l'est pas (Ratnikov et coll.,

2002). Il serait donc intéressant de déterminer si les intégrines clivées en leur centre (α_4) ou en N-terminal (α_5) sont également clivables par MT1-MMP puisque l'endoprotéolyse des autres intégrines clivées par cette métalloprotéase présentent des coupures PC-dépendantes en C-terminal, seulement. La complexité de la protéolyse des intégrines α ne se limite pas à PC5A, la furine et MT1-MMP, en effet, l'uPA (*urokinase plasminogen activator*), une sérine protéase, coupe l' α_6 dans la région correspondante au site de clivage de l' α_4 . Clairement, la protéolyse de certaines intégrines est complexe, car elle peut impliquer les PCs, d'autres protéases et différents sites de clivage.

5.1.1. Le clivage régulé de l'intégrine α_4

Nos expériences ont permis d'établir que les mêmes PCs (PC5A, la furine) clivaient efficacement l' α_4 et les intégrines clivées en C-terminal (Lissitzky et coll., 2000), donc la position centrale du site de clivage ou le type de motif n'influence pas la nature des PCs capables de cliver ces intégrines. Pourquoi l' α_4 est-elle alors plus résistante à l'endoprotéolyse que les autres intégrines? Comment peut-on expliquer cette différence? Nos travaux ne se sont pas penché spécifiquement sur ce point mais quatre hypothèses devraient être considérées 1) la position centrale du site clivage de l' α_4 , 2) la nature des acides aminés en P', 3) la structure secondaire, ou 4) l'accessibilité du site de clivage.

La première et la deuxième hypothèse pourrait être testées par la permutation des différents sites de clivage (P8 à P2') de l' α_4 avec celui des autres intégrines clivées constitutivement. De plus, l'importance des résidus en P1' et P2' devrait être plus spécifiquement adressée parce que contrairement au consensus présent chez les intégrines clivées constitutivement (P1'=Asp/Glu et P2'=Aliphatique), l' α_4 possède des résidus hydroxylés à ces positions (P1'=Ser et P2'=Thr). L'absence de résidus optimaux en P' (P1'=Asp/Glu et P2'=Aliphatique) selon les structures des S' correspondants (Henrich et coll., 2003; Henrich et coll., 2005) pourrait expliquer pourquoi cette intégrine est clivée moins efficacement.

Troisièmement, les structures secondaires des sites de clivage peuvent s'avérer critiques à la protéolyse des PCs, mais les travaux traitant sur ce sujet se limitent à la l'utilisation de peptides (Moulard et coll., 1998; Oliva et coll., 2003; Brakch et coll., 2000). L' α_4 représenterait un modèle expérimental intéressant de la structure des sites d'endoprotéolyse parce que son clivage est sensible aux changements de conformation (Chen et coll., 2004). En effet, l'ouverture artificielle de la tête de l'intégrine, la partie liant le ligand, par mutagenèse de l' $\alpha_4\beta_7$ (β_7 , Q324T) augmente de deux fois le niveau d'endoprotéolyse de l' α_4 (Chen et coll., 2004) suggérant fortement que la structure ou l'accessibilité du site de clivage est modifiée. La comparaison de la structure tridimensionnelle du mutant Q324T versus celle du type sauvage fournirait les données structurales nécessaires à la résolution de cette hypothèse.

5.1.2. L'histidine en P6 de l' α_4

Jusqu'à présent très peu de travaux ont traité de la contribution de la position P6 sur le clivage de substrats. Les intégrines α du groupe II arborent une histidine strictement conservée à cette position. Nos expériences confirment l'importance d'un résidu chargé positivement à cette position et que la protonation de cette histidine, modulable par des variations de pH physiologiques, restreint le clivage de l' α_4 à des compartiments acides. L'article 1 confirme plusieurs conclusions de Krysan et collaborateurs (1999) tant qu'à la spécificité de la furine en P6. Ces auteurs ont déterminé la spécificité énergétique relative de la furine pour des résidus basiques en P1, P2, P4 et P6. Ils conclurent que la furine reconnaissait préférentiellement le P1 et le P4 tandis que l'énergie des contacts secondaires (P2 et P6) étaient de moindre énergie (ex. Arg en P4 équivaut à environ 3 contacts secondaires en P2 ou P6) (Krysan et coll., 1999). Si on ne tient pas compte de l'His en P6, les sites de clivage des intégrines du groupe II n'auraient qu'un contact primaire (P1=Arg) et un secondaire (P2=Lys) avec les sous-sites correspondants de la furine. Nous avons donc rationalisé que la protonation de l'His en P6 contribuerait favorablement à la

protéolyse de l' $\alpha 4$ par certaines PCs parce que la présence d'acides aminées basiques en P6 contribuent aux clivages efficaces de la pro-PTH, du site secondaire du domaine pro de la furine et de la pro-albumine (Krysan et coll., 1999; Lazure et coll., 1998; Anderson et coll., 1997; Brennan et Nakayama, 1994a). La structure cristallographique de la furine corrobore sa sensibilité pour des charges positives en P6 (Henrich et coll., 2003). Contrairement aux S1, S2 et S4 qui accommodent préférentiellement des résidus Lys ou Arg, le S6 de la furine est plus ouvert et reconnaît les charges positives plutôt que des résidus basiques particuliers. Selon ce modèle, l'His protonée en P6 des intégrines du groupe II devrait être reconnue favorablement par le S6 de la furine. Par contre, la corpulence de ce résidu ne permettrait vraisemblablement pas la formation de contacts favorables lorsque positionné en P1, P2 ou P4 (Henrich et coll., 2003; Henrich et coll., 2005). Ce modèle est en accord avec l'inhibition du clivage de la pro-albumine par la mutation de la Lys en P2 par une His et par l'inefficacité relative de la furine à couper le NCAM-L1 (*Neural Adhesion Molecule L1*), un substrat avec une His en P4 (Kalus et coll., 2003).

À l'instar de l' $\alpha 4$, l'His en P6 favorise la protéolyse à pH acide du site secondaire du BMP-4 (*Bone Morphogenetic Protein-4*) (Degnin et coll., 2004). Le BMP-4 est clivé de façon ordonnée en deux temps, en premier lieu, à un site optimal RX(K/R)R↓ insensible au pH, et en un second temps, à un site minimal RXXR↓ sensible au pH (Cui et coll., 2001; Degnin et coll., 2004). Ce site minimal présente une His en P6 (HVRISR↓SL) qui favorise son clivage par la furine à pH acide. Le mécanisme par lequel cette histidine régule le clivage du BMP-4 à son site secondaire serait différent. Par opposition à l' $\alpha 4$, l'His en P6 régulerait négativement la maturation du BMP-4 à son site secondaire à pH neutre parce que sa mutation en un résidu non-protoné (Thr) augmente son clivage par la furine particulièrement à pH neutre. Les différences subtiles entre les deux motifs de clivage aux positions clés que sont le P2, P4 et P2' ($\alpha 4$ =HVISKR↓ST vs BMP-4 secondaire=HVRISR↓SL) pourraient expliquer ce phénomène inverse. Si l'on omet le rôle de l'His en P6, le site secondaire du BMP-4 serait un meilleur substrat parce qu'il devrait

engendrer deux contacts primaires (P1 et P4) avec la furine tandis que l' $\alpha 4$ n'aurait qu'un contact primaire (P1) et un secondaire (P2). De plus, une leucine en P2' du BMP-4 est plus favorable que la thréonine correspondante de l' $\alpha 4$. Il est possible que l'histidine déprotonée en P6 du BMP-4 bloque la reconnaissance du site de clivage et sa protonation permettrait l'accès au motif minimal RXXR↓. La structure cristallographique de la furine suggère qu'un résidu en P6 puisse se replier pour occuper la pochette S4, donc l'His en P6 du BMP-4 pourrait empêcher le P4 Arg d'occuper la pochette S4. Selon ce modèle, on peut supposer que cette His déprotonée bloque la liaison critique de l'Arg en P4 avec la pochette catalytique de la furine (Degnin et coll., 2004) et que la protonation de l'His à pH acide entraînerait une répulsion de charges qui libérerait l'Arg en P4 de cette contrainte.

Par opposition au BMP-4, l'His en P6 de l' $\alpha 4$ régule positivement sa maturation *in vivo* et *in vitro*, surtout à pH acide comme l'indique les digestions de nos peptides correspondants aux sites de clivage sauvages ou mutés. La mutagenèse du P6 en Arg, Lys, Glu, Ala et Leu est en accord avec le rôle favorable d'un résidu chargé en P6 sur le rendement du clivage des PCs endogènes des cellules CHO-K1 et de l'efficacité accrue de la furine envers le peptide sauvage à pH 6.0. Nous proposons que l'histidine en P6 ne régule pas négativement le clivage de l' $\alpha 4$ parce que les résidus importants pour la protéolyse se trouvent en P1 et P2 plutôt qu'en P1 et P4 (BMP-4) et que dans le contexte de l' $\alpha 4$, la contribution de l'His protonée P6 doit engendrer des contacts avec le S6 acide de la furine pour être clivé efficacement. Par contre, ces contacts ne seraient pas aussi critiques pour le clivage du BMP-4 probablement parce qu'elle engendre des contacts énergétiquement plus importants (P4 et P2' vs. P2). La structure de ces substrats à pH neutre et acide éclaircirait le mécanisme par lequel la protonation de cette histidine critique contrôle l'endoprotéolyse du BMP-4 et de l' $\alpha 4$. Fait intéressant les résidus His en P1' et P2' pourrait possiblement réguler négativement la maturation du précurseur *nodal* de la famille du TGF- β . Ce précurseur est relativement résistant à la protéolyse mais la mutation de l'His^{P2'} en Leu (aliphatique) augmente sa sensibilité au clivage. Puisque les résidus

chargés positivement en P' ne sont pas favorables aux PCs, la protonation de ces histidines pourrait vraisemblablement réduire l'efficacité des PCs à cliver *nodal*. Donc, par opposition aux His en P6 de l' $\alpha 4$ et du BMP-4, les histidines en P' pourraient favoriser le clivage de *nodal* à pH neutre.

Selon le modèle tridimensionnel théorique de PC5 (Henrich et coll., 2005), le S6 de cette PC devrait aussi favoriser des résidus chargés positivement. Par contre, les digestions *in vitro* de peptides comprenant le site de clivage de l' $\alpha 4$ muté en P6 démontrent que PC5 dépend moins d'un résidu chargé en P6 que la furine, même si les résidus acides du sous-site S6 sont conservés (Tableau 3). La contribution de cette Ile en P4 pourrait aussi s'avérer importante parce que, 1) elle est conservé chez plusieurs substrats du même type que l' $\alpha 4$ (VEGF-C, l' αv et l' $\alpha 8$), 2) les résidus aliphatiques sont favorables en P4 pour la kexine (Rockwell et Fuller, 1998), et 3) la valine à cette position semble favoriser la furine (Lazure et coll., 1998). La mutagenèse systématique du P4 de l' $\alpha 4$ définirait l'identité des résidus permettant son clivage efficace. Si, à l'instar de la pro-PTH, un résidu aliphatique en P4 est équivalent à une arginine, cette mutagenèse permettrait l'élargissement de notre compréhension de la spécificité de la furine et des autres PCs pour les substrats sans résidu basique en P4.

5.1.3. Le rôle biologique du clivage de l'intégrine $\alpha 4$

Un objectif secondaire de nos travaux consistait à préciser la fonction du clivage de l' $\alpha 4$. Pour ce faire nous avons testé l'adhérence des cellules CHO-K1 exprimant de l' $\alpha 4$ clivée (WT) ou non (R597A) au ligand cellulaire du VLA-4, le VCAM-1. Ces essais confirment les résultats de Teixido et coll. (1992) selon lesquels la protéolyse de l' $\alpha 4$ n'influence pas l'adhésion. De plus, un constat similaire fut observé pour le MadCAM-1 (ligand $\alpha 4\beta 7$, *mucosa addressin cell adhesion molecule-1*) (Chen et coll., 2004). Contrairement aux cellules K562 utilisées par Teixido et coll. (1992), les cellules CHO-K1 de notre étude exprimaient de l' $\alpha 4\beta 1$ sous une conformation de haute-affinité (Faull et coll.,

1993; Rose et coll., 2000), donc le clivage n'influencerait pas l'affinité du VLA-4, une conclusion partagée pour l' $\alpha_v\beta_5$ (Berthet et coll., 2000). Globalement, tous ces résultats semblent confirmer qu'*in vitro* l'adhésion de l' α_4 sur la FN, le VCAM-1 et le MadCAM-1, n'est pas modifiée par sa protéolyse et ce, dans différents types cellulaires (K562, CHO-K1 et 293T).

Alternativement, nous avons exploré l'hypothèse que le PMA augmenterait sélectivement l'adhésion de la forme clivée de l' α_4 . Contrairement à l' α_6 (Delwel et coll., 1997; Delwel et coll., 1996), les résultats non-publiés démontrent que l'adhésion du VLA-4 au VCAM-1 des cellules CHO-K1 transfectées avec l' α_4 n'est pas significativement stimulée par le PMA, un agent favorisant l'avidité des intégrines,. Il est peu probable qu'un essai similaire avec des cellules K562 transfectées avec l' α_4 (faible affinité) génèrerait une conclusion différente. La stimulation de l'adhésion du VLA-4 par le PMA est très modeste (moins de 50%) dans ce type cellulaire (Alon et coll., 1995), comparativement à l' $\alpha_6\beta_1$ où la réponse au PMA est au moins deux cents fois plus grande (Delwel et coll., 1996). L'identification d'un type cellulaire répondant significativement au PMA permettrait de confirmer si, à l'instar de l' α_6 , la stimulation de l'adhésion dépend de la protéolyse des PCs. Même si un tel type cellulaire était identifié, il reste probable que la fonction du clivage de l' α_4 soit différente parce que son site de clivage n'est pas en C-terminal de la molécule et que la fonction du clivage des intégrines apparait variable selon l'interaction intégrine-matrice étudiée (Berthet et coll., 2000).

Berthet et collaborateurs (2000, 2004) ont démontré que l'adhérence et la migration à la vitronectine des cellules HT29 exprimant l' α_1 -PDX (clivage des intégrines inhibé) est réduite. Par contre, l'adhésion à la lamine-1 n'est pas affectée même si l'adhésion à cette matrice nécessite des intégrines (α_3 et α_6) clivées par les PCs. Ce travail suggère que dans un même type cellulaire, l'adhésion constitutive à la vitronectine cellulaire requiert le clivage des PCs, mais celle à la laminine est probablement indépendante du clivage de l' α_3

et l' α_6 , ce qui est en accord avec les travaux de Delwel et collaborateurs (1996, 1997). Berthet et collaborateurs (2000) ont aussi rapporté que le PMA n'affecte pas l'adhésion à la vitronectine, indépendamment du clivage de l' α_v . Toutefois, ce même article ne précise pas l'effet de cet activateur de la protéine kinase C sur l'adhésion des mêmes cellules HT29-PDX à la laminine, laissant un doute justifié quant à l'universalité des deux modèles. Par contre, la migration des cellules HT29-PDX sur la vitronectine est stimulée davantage par le PMA que la cellule contrôle tandis que sur la laminine la stimulation est la même (Berthet et coll., 2004).

La modèle selon lequel le clivage de l' α_v favorise l'adhésion et la migration dépendante de l' α_v pourrait être renforcé par la mutagenèse de son site de clivage et par la reconstitution du clivage de la pro- α_v des cellules LoVo (Lehmann et coll., 1996) par l'expression de la furine. L'étude du clivage des autres intégrines, plus particulièrement les récepteurs à la fibronectine, permettrait de mieux comprendre si les modèles suggérés par Berthet et collaborateurs (2000, 2004) et Delwel et collaborateurs (1996, 1997) se limite à des systèmes expérimentaux précis et aux adhésions dépendantes d' α_6 et α_v .

Malgré le peu de résultats disponibles, ces travaux suggèrent que le clivage des intégrines affecte leur agrégation qui favorise le renforcement de l'adhésion. La structure des intégrines est effectivement très dynamique (Giancotti, 2003) et le clivage laisse présager un rôle sur leur conformation qui affecterait la signalisation des intégrines. La comparaison de la structure de l' α_4 clivée (sauvage) ou d'une autre intégrine avec sa forme précurseur (R597A) en présence ou en absence de ligand pourrait définir la portée du clivage sur sa structure (global vs local).

Nos mutants plus ou moins résistants à l'endoprotéolyse des PCs seraient également utiles pour déterminer le rôle biologique de l' α_4 *in vivo*. La région codante pour le site de clivage de l' α_4 d'un embryon de souris pourrait être remplacée par des versions mutées (*knockin*) afin qu'elles soient résistantes (R597A), semi-résistantes (H592E) ou

hypersensibles (H592R) à l'endoprotéolyse. Ces progénitures mutantes mesureraient l'importance de l'endoprotéolyse de l' α_4 dans divers processus biologiques importants comme : l'embryogenèse, le développement cardiaque, l'inflammation et la circulation leucocytaire (Yang et coll., 1995; Sengbusch et coll., 2002). De plus, des études de migration et de signalisation cellulaire pourraient identifier la fonction du clivage de l' α_4 .

5.2 La protéolyse de la glycoprotéine du CoV-SRAS

Lors de la découverte du CoV-SRAS, nous avons noté que la GPS de ce nouveau pathogène humain n'avait pas conservé un site de clivage riche en acides aminés basiques (région R667) typique des coronavirus du groupe II. Nous voulions donc définir : 1) si cette glycoprotéine était clivée par un ou plusieurs homologues de mammifère de la subtilisine 2) définir le site de clivage, 3) identifier les acides aminés critiques à la protéolyse et 4) définir la fonction du clivage. Notre hypothèse de départ voulait que cette glycoprotéine soit clivée par SKI-1 au motif HTVSL↓RS, ce site de clivage aurait représenté un motif de clivage atypique de SKI-1 parce qu'il ne contient pas d'Arg en P4. Comme SKI-1 clive certaines glycoprotéines virales (Vincent et coll., 2003; Beyer et coll., 2003; Lenz et coll., 2001), cette convertase nous apparaissait comme une candidate potentielle.

Cependant, SKI-1 n'influence pas la maturation de la GPS-SRAS dans les cellules SRD12B déficientes en SKI-1 et dans les cellules FD11 (résultats non publiés, Bergeron et Seidah). Par contre, l'article 2 démontre que la transfection des PCs transmembranaires (furine, PC7 et PC5B) favorise la transformation du précurseur (proS) en une sous-unité S2 d'environ 80 kDa. De plus, nous avons observé la présence d'un autre fragment C-terminal (CTF) d'environ 110 kDa, mais la surexpression des PCs n'accentue pas sa formation. Ces résultats démontraient pour la première fois que les PCs influençaient le clivage de la proS du CoV-SRAS même si aucun motif basique typiquement reconnu par la furine ne se trouve dans cette région de la GPS-SRAS (Tableau 6).

Ces résultats sont en accord avec trois articles publiés récemment qui décrivent des fragments S2 de tailles similaires (Simmons et coll., 2004; Wu et coll., 2004; Wang et coll., 2005). En effet, Wu et ses collaborateurs (2004) ont observé la proS et la sous-unité S2 à environ 85 kDa par immunobuvardage d'un lysat infecté. De plus, Simmons et ses collaborateurs (2004, Figures supplémentaires) ont observé deux CTFs (d'environ 100 et 80 kDa) qui sont significativement augmentés par un traitement à la trypsine. Puisque le niveau de clivage de la GPS-SRAS est modeste, nous n'avons pas réussi à définir biochimiquement la localisation des sites de clivages qui donnent naissance aux CTFs.

Par contre, la mutagenèse de la région de l'Arg₆₆₇ (VLLR₆₆₇) en un motif furine optimal (RKKR₆₆₇) indique cependant que les CTFs deviennent plus abondants et que leurs tailles sont similaires aux CTFs dérivés de la proS sauvage. La maturation de ce mutant nous indique qu'un clivage a lieu à proximité de l'Arg₆₆₇ parce que le CTF de 110 kDa est plus particulièrement augmenté. Par contre, PC7 ne clive pas ce mutant (RKKR₆₆₇) (résultats non publiés, Bergeron et Seidah) et ce, même si cette PC est la plus efficace à induire la production du CTF de 80 kDa à partir de la proS sauvage. Pour le moment, il n'est pas clair pourquoi PC7 ne clive pas le mutant RKKR₆₆₇, mais cette situation pourrait être analogue au clivage *in vitro* de la glycoprotéine p62 du virus de la forêt de Semliki (Zhang et coll., 2003). Cette GP est clivée par PC7 seulement en présence de détergent. Cependant, la furine clive ce substrat *in vivo* et *in vitro* en absence de détergent. Ceci suggère que PC7 ne reconnaît pas la forme native de la p62 du virus de la forêt de Semliki. Il serait donc intéressant de vérifier si la présence de détergent permet également le clivage *in vitro* du mutant RKKR₆₆₇ par PC7.

Nous avons aussi tenté d'optimiser le second site d'intérêt (RNTR₇₆₁) de la même façon (DRNTR₇₆₁ en RRKKR₇₆₁). Cependant, la mutagenèse de ce deuxième site potentiel a empêché la maturation de la proS de 190 kDa en proS de 210 kDa, probablement parce que son repliement est compromis. Le seul argument pour le clivage direct de la GPS-SRAS au site RNTR₇₆₁ est fourni par la digestion *in vitro* d'un peptide mimant cette région.

Par contre, la mutagenèse de l'Arg₇₅₈ et de l'Arg₇₆₁ suggère le contraire puisque ces mutations ne bloquent pas la protéolyse de cette GPS. Il reste que la proS pourrait être clivé directement par la furine au site minimal RNTR₇₆₁, mais si tel était le cas, nous devrions admettre qu'une protéase présente dans les cellules FD11-furine clive la GPS-SRAS à proximité du motif RNTR₇₆₁ muté (sans P1 et P4 Arg).

5.2.1 La convertase de la GPS-SRAS

Nos travaux n'ont pas permis de déterminer la ou les convertases de la GPS-SRAS. Par contre, nous avons clairement établi que la GPS-SRAS recombinante ou virale étaient tous deux partiellement clivées. L'activité des PCs membranaires corrélait particulièrement avec l'abondance du CTF de 80 kDa, suggérant que l'activité des PCs est nécessaire à sa formation.

Les PCs permettent le clivage d'une panoplie de substrats dans la voie sécrétoire. Le rôle des PCs sur la production du CTF de 80 kDa, l'effet cytotoxique et les titres viraux pourrait donc être indirect. Pour le moment, nos travaux et nos connaissances sur les coronavirus ne nous permettent pas de proposer une cible cellulaire ou virale des PCs qui expliqueraient nos observations. Néanmoins, au moins une protéase cellulaire clive la GPS-SRAS et son activité semble favorisée par l'action des PCs.

Les protéases sont généralement synthétisées sous la forme de zymogènes qui s'autoactivent ou activent d'autres pro-protéases. Les PCs s'autoactivent et activent certaines pro-protéases cellulaires (Benjannet et coll., 2001; Srour et coll., 2003; Thomas, 2002). Par conséquent, il apparaît justifié d'émettre l'hypothèse que le clivage de la GPS-SRAS est réalisé par une telle pro-protéase activée par les PCs. Cependant, la surexpression de quatre pro-protéases activées par les PCs (BACE-1, MT1-MMP, MT2-MMP, ADAM-17) n'affecte pas le clivage de la GPS-SRAS (résultats non publiés, Bergeron et Seidah).

Les PCs clivent directement plusieurs GP virales, mais d'autres le sont par des protéases à sérine de la famille de la trypsine (Kido et coll., 1999; Klenk et Garten, 1994; Goto et Kawaoka, 1998) ou des protéases non-identifiés (Springfeld et coll., 2005; Moll et coll., 2004). La tryptase Clara et la plasmine activeraient certaines souches d'influenza humaines à des sites comprenant une seule arginine en P1. D'ailleurs, l'addition de trypsine exogène à ces souches d'influenza est souvent nécessaire à leur réplication en culture cellulaire (Klenk et Garten, 1994). Dans le cas du CoV-SRAS l'addition de trypsine n'est pas nécessaire à la réplication, mais elle augmente dramatiquement la maturation de la GPS-SRAS en ses deux CTFs (Simmons et coll., 2004). Ces données suggèrent que certains membres de la famille de la trypsine devraient être particulièrement considérés comme des convertases candidates de la GPS-SRAS.

Plus récemment, le clivage de la glycoprotéine du virus Ebola par les cathepsines B et L fut défini comme essentiel à l'entrée du virus dans la cellule (Chandran et coll., 2005). Il est intéressant de noter que la GP de ce virus est également clivée par la furine et que contrairement au clivage dépendant des cathepsines, celui réalisé par les PCs n'est pas nécessaire à la réplication du virus Ebola en culture cellulaire (Neumann et coll., 2002). La GP du virus Ebola représente un exemple probant que les glycoprotéines peuvent être clivées par différentes familles de protéases et que chaque classe joue un rôle distinct sur la biologie d'un virus. À l'instar de la GP du virus Ebola, différentes enzymes pourraient cliver les différents sites de coupure de la GPS-SRAS.

5.2.2 La fonction du clivage de la GPS-SRAS

La fonction du clivage de la GPS-SRAS reste ouverte, même le rôle du clivage des GPS des coronavirus des groupes II et III demeure nébuleux à bien des égards. L'observation la plus soutenue veut que les niveaux de clivage des GPS corréleraient positivement avec la formation de syncytia (Bos et coll., 1995; Yamada et coll., 1997; Hingley et coll., 2002; de Haan et coll., 2004). Par contre, le clivage de la MHV-GPS

n'apparaît pas comme essentiel à la fusion virus-cellule (de Haan et coll., 2004). Cependant, de Han et ses collaborateurs démontrent que l'ajout de chlorpromazine, un inhibiteur de l'endocytose dépendante de la clathrine ou de bafilomycine A1, un inhibiteur des V-ATPases, inhibent davantage la fusion du MHV-A59 produit en présence de l'inhibiteur dec-RVKR-cmk (de Haan et coll., 2004). Comment interpréter ces résultats?

Contrairement au coronavirus du groupe I (GPS non-clivé) qui utiliserait seulement la voie endocyttaire (Hansen et coll., 1998), le MHV (groupe II) peut fusionner directement avec la membrane plasmique à pH neutre ou avec les membranes des endosomes à pH acide (Kooi et coll., 1991; Nash et Buchmeier, 1997). L'hypersensibilité du MHV-A59 dont la GPS est non clivée à ces deux drogues suggère que l'entrée du MHV-A59 sans GPS serait restreinte à la voie endocyttaire. Par opposition, les coronavirus arborant une GPS clivée ou partiellement clivée (MHV-A59 sauvage) utiliseraient les deux voies d'entrée (membrane plasmique et endosomes).

Contrairement au MHV, aucun produit de clivage n'a pu être identifié dans les milieux de culture de cellules infectées avec le CoV-SRAS. Seulement la proS et des oligomères de la GPS-SRAS furent identifiés par biosynthèse. Bien que d'autres travaux confirment la présence de CTFs dans les lysats cellulaires (Wu et coll., 2004; Simmons et coll., 2004; Wang et coll., 2005), personne n'a rapporté la présence de produits de clivage de la GPS-SRAS associés aux virus. Ceci suggère que seulement la proS est incorporée dans les particules virales du CoV-SRAS produites en culture. Même des pseudovirus exprimant la GPS-SRAS ne présentent que le précurseur à leur surface (Simmons et coll., 2004). Selon notre hypothèse, la proS permettrait l'entrée des coronavirus seulement par la voie endocyttaire. En accord avec celle-ci, les pseudovirus décorés de la proS du CoV-SRAS semblent pénétrer les cellules cibles par la voie endocyttaire parce que leur entrée est fortement inhibé par des agents lysomotropes (chloroquine et le chlorure d'ammonium) (Simmons et coll., 2004; Yang et coll., 2004). De plus, nos résultats suggèrent que l'entrée du CoV-SRAS est très bien inhibée par ces agents lysomotropes (Annexe 1). Toutefois,

des études de microscopie électronique suggèrent que le CoV-SRAS fusionne avec la membrane plasmique et les endosomes (Ng et coll., 2003). Comment est-ce que le coronavirus du SRAS fusionne avec la membrane plasmique sans être clivé? Serait-il clivé à la surface cellulaire ou suite à son endocytose? Ces questions restent sans réponses, mais elles devraient être adressées si on désire établir la fonction du clivage de la GPS-SRAS et des autres GPS.

A l'instar de la GPS-SRAS, les coronavirus du groupe II forment des syncytia à pH neutre (Yamada et coll., 1997; Gallagher, 2001). Contrairement aux autres GPS du groupe II, l'addition de trypsine est nécessaire à la fusion cellule-cellule induite par la GPS-SRAS (Simmons et coll., 2004). De plus, la simple acidification du milieu de culture ne permet pas la formation de syncytia en absence de trypsine ajoutée (Simmons et coll., 2004). Selon ces résultats, la fusion cellule-cellule requiert aussi le clivage de la GPS-SRAS (Simmons et coll., 2004). Lors de la réalisation de nos travaux nous n'avons pas détecté la formation de syncytia par l'infection du CoV-SRAS (communication personnelle, Vincent M.). Par contre, la formation de syncytia semble détectable *in vivo* (Nicholls et coll., 2003) ou par l'infection des cellules HuH7 (Tang et coll., 2005), une lignée cellulaire extrêmement riche en furine (Annexe 2). Curieusement, les cellules LoVo déficientes en furine (Takahashi et coll., 1993) sont sensibles au CoV-SRAS, mais leur infection est persistante et n'engendre pas d'effets cytotoxiques (Chan et coll., 2004). Les cellules LoVo complémentées par la furine ou l'inhibition des PCs des cellules HuH7 par le dec-RVKR-cmk pourraient confirmer le rôle des PCs sur l'effet cytotoxique du CoV-SRAS et la formation de syncytia.

Nos résultats et la littérature suggèrent que le clivage des GPS favorise la propagation cellule-cellule et que ce phénomène requiert l'activité des PCs. Des expériences supplémentaires avec des CoV-SRAS recombinants (Yount et coll., 2003) exprimant la GPS-SRAS mutante hypersensible à la furine (RKKR₆₆₇) confirmeraient l'influence du clivage de la GPS-SRAS sur la voie d'entrer du virus (membrane plasmique versus la endocyttaire) et sur la fusion cellule-cellule.

5.2.3 Les inhibiteurs des PCs et les infections à coronavirus

Cette thèse démontre qu'un inhibiteur général des PCs (dec-RVKR-cmk) réduit la propagation du virus du SRAS en culture cellulaire. Par contre, nous avons observé que la transfection stable de l' α 1-PDX, un inhibiteur plus sélectif envers la furine et PC5 (Jean et coll., 2000), n'abolissait pas l'effet cytotoxique du CoV-SRAS, malgré une inhibition significative du clivage de la GPS-SRAS (communication personnelle, Vincent M.). L'explication la plus simple serait que l'inhibition des PCs est partielle ou absente dans ces transfectants stables (PC7 est peu inhibé par l' α 1-PDX (Jean et coll., 2000)).

De plus, nous avons observé que les Vero E6- α 1-PDX exprimaient deux fois plus du récepteur de la GPS-SRAS (ACE2) à leur surface cellulaire (Annexe 3). Par contre, un traitement avec le dec-RVKR à 60 μ M pendant vingt-quatre heures (Article 2) n'affecte pas l'expression de l'ACE2 à la surface cellulaire (résultats non publiés, Bergeron et Seidah). Un traitement prolongé (plus de 24 heures) des cellules Vero E6 avec le dec-RVKR-cmk pourrait aussi augmenter l'expression de l'ACE2 à la surface de ces cellules, mais ceci reste à confirmer.

Comment les PCs affectent-elles alors l'expression de l'ACE2? L'ACE2 peut être clivée près de son domaine transmembranaire (*shedding*) par l'ADAM-17 mature (Lambert et coll., 2005). Une fois activée par les PCs, cette métalloprotéase clive plusieurs protéines ancrées par des domaines transmembranaires (Moss et Lambert, 2002). Selon ces prémisses, il serait donc probable qu'un traitement prolongé avec un inhibiteur des PCs réduise le *shedding* de l'ACE2 et favorise l'infection du CoV-SRAS (Hofmann et coll., 2004) parce que le ratio ACE2 sheddé/ACE2 ancré serait réduit.

Ces données suggèrent qu'un inhibiteur des PCs augmenterait l'expression de l'ACE2 *in vivo*. Cependant, personne n'a démontré dans un modèle animal que l'augmentation de l'ACE2 augmentait la pathogénicité ou même la réplication du CoV-SRAS. Fait intéressant, l'activité enzymatique de l'ACE2 sur son substrat, l'angiotensine

II, protège les souris contre la détresse respiratoire (Imai et coll., 2005), un phénomène observé chez les cas graves de SRAS (Hui et Wong, 2004). Une augmentation d'ACE2 par l'inhibition des PCs ou d'ADAM-17 pourrait ainsi protéger contre la détresse respiratoire causée par la disparition de l'ACE2 cellulaire provoquée par sa liaison à la GPS-SRAS (Kuba et coll., 2005). Le mécanisme par lequel la GPS-SRAS fait disparaître l'ACE2 n'a pas été établi, mais il devrait passer soit par le *shedding* du récepteur, soit par la dégradation intracellulaire ou par une réduction de sa transcription. Pour conclure, l'effet de l'inhibition des PCs sur l'expression de l'ACE2 devrait être considéré dans les futures études pourtant sur les PCs et le CoV-SRAS.

Chapitre 6. Conclusions

Les PCs participent à l'endoprotéolyse limitée de plusieurs glycoprotéines cellulaires et virales. La plupart de ces GPs clivées dans la voie sécrétoire constitutive présentent un motif RXXR↓. Cependant, la présence d'acides aminés particuliers à d'autres positions influence l'efficacité de clivage des substrats. Plusieurs travaux sur la spécificité des PCs tendent à démontrer une certaine redondance de leur activité. Cependant, les différents phénotypes associés à la disruption génétique de ces convertases suggèrent une redondance partielle ou la présence de substrats spécifiques. La structure des sites de clivage et la localisation cellulaire de leurs formes actives sont des éléments essentiels à la compréhension de leur activité. La combinaison judicieuse de ces éléments expliquerait vraisemblablement leur spécificité *in vivo*. Nos travaux sur l'intégrine $\alpha 4$ suggèrent que la structure d'un substrat peut réguler son clivage, un concept peu exploré de la biologie des PCs. Des études sur la structure tertiaire des substrats et des PCs en parallèle pourraient révéler pourquoi des substrats sont clivés par des PCs particulières.

Contrairement au clivage direct des GPSs des coronavirus du groupe II, nos travaux sur la GPS-SRAS démontrent que l'activité des PCs influence le clivage d'une GPS par une voie indirecte. L'identification de la convertase de la GPS-SRAS pourrait expliquer comment les PCs favorisent son activité. Un inhibiteur efficace des PCs pourrait s'avérer un outil utile contre le SRAS, si son activité est démontrée dans un modèle animal de la maladie.

Bibliographie

- Abifadel, M., Varret, M., Rabes, J.P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., Derre, A., Vileger, L., Farnier, M., Beucler, I., Bruckert, E., Chambaz, J., Chanu, B., Lecerf, J.M., Luc, G., Moulin, P., Weissenbach, J., Prat, A., Krempf, M., Junien, C., Seidah, N.G., et Boileau, C. (2003). Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 34, 154-156.
- Abraham, S., Kienzle, T.E., Lapps, W., et Brian, D.A. (1990). Deduced sequence of the bovine coronavirus spike protein and identification of the internal proteolytic cleavage site. *Virology* 176, 296-301.
- Abrami, L., Fivaz, M., Decroly, E., Seidah, N.G., Jean, F., Thomas, G., Leppla, S.H., Buckley, J.T., et van der Goot, F.G. (1998). The pore-forming toxin proaerolysin is activated by furin. *J Biol Chem* 273, 32656-32661.
- Ahner, A., et Brodsky, J.L. (2004). Checkpoints in ER-associated degradation: excuse me, which way to the proteasome? *Trends Cell Biol* 14, 474-478.
- Allan, B.B., et Balch, W.E. (1999). Protein sorting by directed maturation of Golgi compartments. *Science* 285, 63-66.
- Allured, V.S., Collier, R.J., Carroll, S.F., et McKay, D.B. (1986). Structure of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0-Angstrom resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 1320-1324.
- Alon, R., Kassner, P.D., Carr, M.W., Finger, E.B., Hemler, M.E., et Springer, T.A. (1995). The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol* 128, 1243-1253.

- Anderson, E.D., Molloy, S.S., Jean, F., Fei, H., Shimamura, S., et Thomas, G. (2002). The ordered and compartment-specific autoproteolytic removal of the furin intramolecular chaperone is required for enzyme activation. *J Biol Chem* 277, 12879-12890.
- Anderson, E.D., Thomas, L., Hayflick, J.S., et Thomas, G. (1993). Inhibition of HIV-1 gp160-dependent membrane fusion by a furin-directed alpha 1-antitrypsin variant. *J Biol Chem* 268, 24887-24891.
- Anderson, E.D., VanSlyke, J.K., Thulin, C.D., Jean, F., et Thomas, G. (1997). Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage. *Embo J* 16, 1508-1518.
- Assadi, M., Sharpe, J.C., Snell, C., et Loh, Y.P. (2004). The C-terminus of prohormone convertase 2 is sufficient and necessary for Raft association and sorting to the regulated secretory pathway. *Biochemistry* 43, 7798-7807.
- Bachert, C., Lee, T.H., et Linstedt, A.D. (2001). Lumenal Endosomal and Golgi-Retrieval Determinants Involved in pH-sensitive Targeting of an Early Golgi Protein. *Mol Biol Cell* 12, 3152-3160.
- Barbero, P., Rovere, C., De Bie, I., Seidah, N., Beaudet, A., et Kitabgi, P. (1998). PC5-A-mediated processing of pro-neurotensin in early compartments of the regulated secretory pathway of PC5-transfected PC12 cells. *J Biol Chem* 273, 25339-25346.
- Barnard, R.J., Narayan, S., Dornadula, G., Miller, M.D., et Young, J.A. (2004). Low pH is required for avian sarcoma and leukosis virus Env-dependent viral penetration into the cytosol and not for viral uncoating. *J Virol* 78, 10433-10441.

- Basak, A., et Lazure, C. (2003). Synthetic peptides derived from the prosegments of proprotein convertase 1/3 and furin are potent inhibitors of both enzymes. *Biochem J* 373, 231-239.
- Basak, A., Toure, B.B., Lazure, C., Mbikay, M., Chretien, M., et Seidah, N.G. (1999). Enzymic characterization in vitro of recombinant proprotein convertase PC4. *Biochem J* 343 Pt 1, 29-37.
- Basak, S., Chretien, M., Mbikay, M., et Basak, A. (2004). In vitro elucidation of substrate specificity and bioassay of proprotein convertase 4 using intramolecularly quenched fluorogenic peptides. *Biochem J* 380, 505-514.
- Bednarczyk, J.L., Szabo, M.C., et McIntyre, B.W. (1992). Post-translational processing of the leukocyte integrin alpha 4 beta 1. *J Biol Chem* 267, 25274-25281.
- Benjannet, S., Elagoz, A., Wickham, L., Mamarbachi, M., Munzer, J.S., Basak, A., Lazure, C., Cromlish, J.A., Sisodia, S., Checler, F., Chretien, M., et Seidah, N.G. (2001). Post-translational Processing of beta -Secretase (beta -Amyloid-converting Enzyme) and Its Ectodomain Shedding. THE PRO- AND TRANSMEMBRANE/CYTOSOLIC DOMAINS AFFECT ITS CELLULAR ACTIVITY AND AMYLOID-beta PRODUCTION. *J Biol Chem* 276, 10879-10887.
- Benjannet, S., Rhains, D., Essalmani, R., Mayne, J., Wickham, L., Jin, W., Asselin, M.C., Hamelin, J., Varret, M., Allard, D., Trillard, M., Abifadel, M., Tebon, A., Attie, A.D., Rader, D.J., Boileau, C., Brissette, L., Chretien, M., Prat, A., et Seidah, N.G. (2004). NARC-1/PCSK9 and Its Natural Mutants: ZYMOGEN CLEAVAGE AND

EFFECTS ON THE LOW DENSITY LIPOPROTEIN (LDL) RECEPTOR AND LDL CHOLESTEROL. *J Biol Chem* 279, 48865-48875.

- Benjannet, S., Savaria, D., Laslop, A., Munzer, J.S., Chretien, M., Marcinkiewicz, M., et Seidah, N.G. (1997). Alpha1-antitrypsin Portland inhibits processing of precursors mediated by proprotein convertases primarily within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem* 272, 26210-26218.
- Berthet, V., Rigot, V., Champion, S., Secchi, J., Fouchier, F., Marvaldi, J., et Luis, J. (2000). Role of endoproteolytic processing in the adhesive and signaling functions of alphavbeta5 integrin. *J Biol Chem* 275, 33308-33313.
- Berthet, V., Rigot, V., Nejjari, M., Marvaldi, J., et Luis, J. (2004). The endoproteolytic processing of alphavbeta5 integrin is involved in cytoskeleton remodelling and cell migration. *FEBS Lett* 557, 159-163.
- Beyer, W.R., Popplau, D., Garten, W., von Laer, D., et Lenz, O. (2003). Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P. *J Virol* 77, 2866-2872.
- Bhattacharjya, S., Xu, P., Xiang, H., Chretien, M., Seidah, N.G., et Ni, F. (2001). pH-induced conformational transitions of a molten-globule-like state of the inhibitory prodomain of furin: Implications for zymogen activation. *Protein Sci* 10, 934-942.
- Blue, M.L., Davis, G., Conrad, P., et Kelley, K. (1993). Specific cleavage of the alpha 4 integrin associated with activation of peripheral T lymphocytes. *Immunology* 78, 80-85.

- Bos, E.C., Heijnen, L., Luytjes, W., et Spaan, W.J. (1995). Mutational analysis of the murine coronavirus spike protein: effect on cell-to-cell fusion. *Virology* 214, 453-463.
- Bos, E.C., Luytjes, W., et Spaan, W.J. (1997). The function of the spike protein of mouse hepatitis virus strain A59 can be studied on virus-like particles: cleavage is not required for infectivity. *J Virol* 71, 9427-9433.
- Bosch, B.J., van der Zee, R., de Haan, C.A., et Rottier, P.J. (2003). The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol* 77, 8801-8811.
- Bosman, F.T. (1993). Integrins: cell adhesives and modulators of cell function. *Histochem J* 25, 469-477.
- Boudreault, A., Gauthier, D., et Lazure, C. (1998). Proprotein convertase PC1/3-related peptides are potent slow tight-binding inhibitors of murine PC1/3 and Hfurin. *J Biol Chem* 273, 31574-31580.
- Brakch, N., Rholam, M., Simonetti, M., et Cohen, P. (2000). Favourable side-chain orientation of cleavage site dibasic residues of prohormone in proteolytic processing by prohormone convertase 1/3. *Eur J Biochem* 267, 1626-1633.
- Bravo, D.A., Gleason, J.B., Sanchez, R.I., Roth, R.A., et Fuller, R.S. (1994). Accurate and efficient cleavage of the human insulin proreceptor by the human proprotein-processing protease furin. Characterization and kinetic parameters using the purified, secreted soluble protease expressed by a recombinant baculovirus. *J Biol Chem* 269, 25830-25837.

- Brennan, S.O., et Nakayama, K. (1994a). Cleavage of proalbumin peptides by furin reveals unexpected restrictions at the P2 and P'1 sites. *FEBS Lett* 347, 80-84.
- Brennan, S.O., et Nakayama, K. (1994b). Furin has the proalbumin substrate specificity and serpin inhibitory properties of an in situ hepatic convertase. *FEBS Lett* 338, 147-151.
- Brenner, C., et Fuller, R.S. (1992). Structural and enzymatic characterization of a purified prohormone-processing enzyme: secreted, soluble Kex2 protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 922-926.
- Bresnahan, P.A., Leduc, R., Thomas, L., Thorner, J., Gibson, H.L., Brake, A.J., Barr, P.J., et Thomas, G. (1990). Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. *J Cell Biol* 111, 2851-2859.
- Bruzzaniti, A., Goodge, K., Jay, P., Taviaux, S.A., Lam, M.H., Berta, P., Martin, T.J., Moseley, J.M., et Gillespie, M.T. (1996). PC8, a new member of the convertase family. *Biochem J* 314 (Pt 3), 727-731.
- Cain, B.M., Vishnuvardhan, D., Wang, W., Foulon, T., Cadel, S., Cohen, P., et Beinfeld, M.C. (2002). Production, Purification, and Characterization of Recombinant Prohormone Convertase 5 from Baculovirus-Infected Insect Cells. 24, 227.
- Campan, M., Yoshizumi, M., Seidah, N.G., Lee, M.E., Bianchi, C., et Haber, E. (1996). Increased proteolytic processing of protein tyrosine phosphatase mu in confluent vascular endothelial cells: the role of PC5, a member of the subtilisin family. *Biochemistry* 35, 3797-3802.

- Carnell, L., et Moore, H.P. (1994). Transport via the regulated secretory pathway in semi-intact PC12 cells: role of intra-cisternal calcium and pH in the transport and sorting of secretogranin II. *J Cell Biol* 127, 693-705.
- Cavanagh, D., Davis, P.J., Pappin, D.J., Binns, M.M., Boursnell, M.E., et Brown, T.D. (1986). Coronavirus IBV: partial amino terminal sequencing of spike polypeptide S2 identifies the sequence Arg-Arg-Phe-Arg-Arg at the cleavage site of the spike precursor polypeptide of IBV strains Beaudette and M41. *Virus Res* 4, 133-143.
- Chambers, P., Pringle, C.R., et Easton, A.J. (1990). Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *J Gen Virol* 71, 3075-3080.
- Chan, J.R., Hyduk, S.J., et Cybulsky, M.I. (2000). $\alpha_4\beta_1$ Integrin/VCAM-1 Interaction Activates $\alpha_L\beta_2$ Integrin-Mediated Adhesion to ICAM-1 in Human T Cells. *J Immunol* 164, 746-753.
- Chan, P.K., To, K.F., Lo, A.W., Cheung, J.L., Chu, I., Au, F.W., Tong, J.H., Tam, J.S., Sung, J.J., et Ng, H.K. (2004). Persistent infection of SARS coronavirus in colonic cells in vitro. *J Med Virol* 74, 1-7.
- Chanat, E., et Huttner, W.B. (1991). Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 115, 1505-1519.
- Chandran, K., Sullivan, N.J., Felbor, U., Whelan, S.P., et Cunningham, J.M. (2005). Endosomal Proteolysis of the Ebola Virus Glycoprotein Is Necessary for Infection. *Science* 308, 1643-1645.

- Chen, J., Lee, K.H., Steinhauer, D.A., Stevens, D.J., Skehel, J.J., et Wiley, D.C. (1998). Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell* 95, 409-417.
- Chen, J., Takagi, J., Xie, C., Xiao, T., Luo, B.-H., et Springer, T.A. (2004). The Relative Influence of Metal Ion Binding Sites in the I-like Domain and the Interface with the Hybrid Domain on Rolling and Firm Adhesion by Integrin $\alpha_4\beta_7$. *J Biol Chem* 279, 55556-55561.
- Chiron, M.F., Fryling, C.M., et FitzGerald, D. (1997). Furin-mediated Cleavage of Pseudomonas Exotoxin-derived Chimeric Toxins. *J Biol Chem* 272, 31707-31711.
- Choe, S., Bennett, M.J., Fujii, G., Curmi, P.M., Kantardjieff, K.A., Collier, R.J., et Eisenberg, D. (1992). The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature* 357, 216-222.
- Chretien, M., et Li, C.H. (1967). Isolation, purification, and characterization of gamma-lipotropic hormone from sheep pituitary glands. *Can J Biochem* 45, 1163-1174.
- Comellas-Bigler, M., Maskos, K., Huber, R., Oyama, H., Oda, K., et Bode, W. (2004). 1.2 A crystal structure of the serine carboxyl proteinase pro-kumamolisin; structure of an intact pro-subtilase. *Structure (Camb)* 12, 1313-1323.
- Constam, D.B., et Robertson, E.J. (1999). Regulation of Bone Morphogenetic Protein Activity by Pro Domains and Proprotein Convertases. *J Cell Biol* 144, 139-149.

- Costaguta, G., Stefan, C.J., Bensen, E.S., Emr, S.D., et Payne, G.S. (2001). Yeast Gga Coat Proteins Function with Clathrin in Golgi to Endosome Transport. *Mol Biol Cell* *12*, 1885-1896.
- Creemers, J.W., Vey, M., Schafer, W., Ayoubi, T.A., Roebroek, A.J., Klenk, H.D., Garten, W., et Van de Ven, W.J. (1995). Endoproteolytic cleavage of its propeptide is a prerequisite for efficient transport of furin out of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* *270*, 2695-2702.
- Cui, Y., Hackenmiller, R., Berg, L., Jean, F., Nakayama, T., Thomas, G., et Christian, J.L. (2001). The activity and signaling range of mature BMP-4 is regulated by sequential cleavage at two sites within the prodomain of the precursor. *Genes Dev* *15*, 2797-2802.
- Dalbey, R.E., et Von Heijne, G. (1992). Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes--a new protease family. *Trends Biochem Sci* *17*, 474-478.
- De Bie, I., Marcinkiewicz, M., Malide, D., Lazure, C., Nakayama, K., Bendayan, M., et Seidah, N.G. (1996). The isoforms of proprotein convertase PC5 are sorted to different subcellular compartments. *J Cell Biol* *135*, 1261-1275.
- de Haan, C.A., Stadler, K., Godeke, G.J., Bosch, B.J., et Rottier, P.J. (2004). Cleavage inhibition of the murine coronavirus spike protein by a furin-like enzyme affects cell-cell but not virus-cell fusion. *J Virol* *78*, 6048-6054.
- De Melker, A.A., Kramer, D., Kuikman, I., et Sonnenberg, A. (1997). The two phenylalanines in the GFFKR motif of the integrin alpha6A subunit are essential for heterodimerization. *Biochem J* *328 (Pt 2)*, 529-537.

- Decroly, E., Wouters, S., Di Bello, C., Lazure, C., Ruyschaert, J.M., et Seidah, N.G. (1996). Identification of the paired basic convertases implicated in HIV gp160 processing based on in vitro assays and expression in CD4(+) cell lines. *J Biol Chem* 271, 30442-30450.
- Degnin, C., Jean, F., Thomas, G., et Christian, J.L. (2004). Cleavages within the Prodomain Direct Intracellular Trafficking and Degradation of Mature Bone Morphogenetic Protein-4. *Mol Biol Cell* 15, 5012-5020.
- DeGrendele, H.C., Estess, P., Picker, L.J., et Siegelman, M.H. (1996). CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J Exp Med* 183, 1119-1130.
- Delwel, G.O., Hogervorst, F., et Sonnenberg, A. (1996). Cleavage of the alpha6A subunit is essential for activation of the alpha6Abeta1 integrin by phorbol 12-myristate 13-acetate. *J Biol Chem* 271, 7293-7296.
- Delwel, G.O., Kuikman, I., van der Schors, R.C., de Melker, A.A., et Sonnenberg, A. (1997). Identification of the cleavage sites in the alpha6A integrin subunit: structural requirements for cleavage and functional analysis of the uncleaved alpha6Abeta1 integrin. *Biochem J* 324 (Pt 1), 263-272.
- Denault, J., Bissonnette, L., Longpre, J., Charest, G., Lavigne, P., et Leduc, R. (2002). Ectodomain shedding of furin: kinetics and role of the cysteine-rich region. *FEBS Lett* 527, 309-314.

- Dimitrov, D.S. (2004). Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* 2, 109-122.
- Duckert, P., Brunak, S., et Blom, N. (2004). Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Eng Des Sel* 17, 107-112.
- Duguay, S.J., Milewski, W.M., Young, B.D., Nakayama, K., et Steiner, D.F. (1997). Processing of Wild-type and Mutant Proinsulin-like Growth Factor-IA by Subtilisin-related Proprotein Convertases. *J Biol Chem* 272, 6663-6670.
- Duncan, E.A., Brown, M.S., Goldstein, J.L., et Sakai, J. (1997). Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem* 272, 12778-12785.
- Duplaa, C., Couffignal, T., Dufourcq, P., Llanas, B., Moreau, C., et Bonnet, J. (1997). The integrin very late antigen-4 is expressed in human smooth muscle cell. Involvement of alpha 4 and vascular cell adhesion molecule-1 during smooth muscle cell differentiation. *Circ Res* 80, 159-169.
- Earp, L.J., Delos, S.E., Park, H.E., et White, J.M. (2005). The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 285, 25-66.
- Eckert, D.M., et Kim, P.S. (2001). Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem* 70, 777-810.
- Eder, J., Rheinnecker, M., et Fersht, A.R. (1993a). Folding of subtilisin BPN': characterization of a folding intermediate. *Biochemistry* 32, 18-26.

- Eder, J., Rheinnecker, M., et Fersht, A.R. (1993b). Folding of subtilisin BPN': role of the pro-sequence. *J Mol Biol* 233, 293-304.
- Eichler, R., Lenz, O., Strecker, T., Eickmann, M., Klenk, H.D., et Garten, W. (2003). Identification of Lassa virus glycoprotein signal peptide as a trans-acting maturation factor. *EMBO Rep* 4, 1084-1088.
- Eickmann, M., Becker, S., Klenk, H.D., Doerr, H.W., Stadler, K., Censini, S., Guidotti, S., Massignani, V., Scarselli, M., Mora, M., Donati, C., Han, J.H., Song, H.C., Abrignani, S., Covacci, A., et Rappuoli, R. (2003). Phylogeny of the SARS coronavirus. *Science* 302, 1504-1505.
- Elagoz, A., Benjannet, S., Mammabassi, A., Wickham, L., et Seidah, N.G. (2002). Biosynthesis and cellular trafficking of the convertase SKI-1/S1P: ectodomain shedding requires SKI-1 activity. *J Biol Chem* 277, 11265-11275.
- Ellgaard, L., et Frickel, E.M. (2003). Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding. *Cell Biochem Biophys* 39, 223-247.
- Elshuber, S., Allison, S.L., Heinz, F.X., et Mandl, C.W. (2003). Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus. *J Gen Virol* 84, 183-191.
- Espenshade, P.J., Cheng, D., Goldstein, J.L., et Brown, M.S. (1999). Autocatalytic processing of site-1 protease removes propeptide and permits cleavage of sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* 274, 22795-22804.

- Faull, R.J., Kovach, N.L., Harlan, J.M., et Ginsberg, M.H. (1993). Affinity modulation of integrin alpha 5 beta 1: regulation of the functional response by soluble fibronectin. *J Cell Biol* 121, 155-162.
- Ferreira, O.C., Jr., Valinsky, J.E., Sheridan, K., Wayner, E.A., Bianco, C., et Garcia-Pardo, A. (1991). Phorbol ester-induced differentiation of U937 cells enhances attachment to fibronectin and distinctly modulates the alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 fibronectin receptors. *Exp Cell Res* 193, 20-26.
- Fons, R.D., Bogert, B.A., et Hegde, R.S. (2003). Substrate-specific function of the translocon-associated protein complex during translocation across the ER membrane. *J Cell Biol* 160, 529-539.
- Frana, M.F., Behnke, J.N., Sturman, L.S., et Holmes, K.V. (1985). Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: host-dependent differences in proteolytic cleavage and cell fusion. *J Virol* 56, 912-920.
- Fugere, M., Limperis, P.C., Beaulieu-Audy, V., Gagnon, F., Lavigne, P., Klarskov, K., Leduc, R., et Day, R. (2002). Inhibitory Potency and Specificity of Subtilase-like Pro-protein Convertase (SPC) Prodomains. *J Biol Chem* 277, 7648-7656.
- Fuller, R.S., Brake, A., et Thorner, J. (1989a). Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca²⁺-dependent serine protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1434-1438.
- Fuller, R.S., Brake, A.J., et Thorner, J. (1989b). Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science* 246, 482-486.

- Gallagher, T.M. (1997). A role for naturally occurring variation of the murine coronavirus spike protein in stabilizing association with the cellular receptor. *J Virol* 71, 3129-3137.
- Gallagher, T.M. (2001). Murine coronavirus spike glycoprotein. Receptor binding and membrane fusion activities. *Adv Exp Med Biol* 494, 183-192.
- Garred, O., van Deurs, B., et Sandvig, K. (1995). Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *J Biol Chem* 270, 10817-10821.
- Giancotti, F.G. (2003). A structural view of integrin activation and signaling. *Dev Cell* 4, 149-151.
- Giroglou, T., Cinatl, J., Jr., Rabenau, H., Drosten, C., Schwalbe, H., Doerr, H.W., et von Laer, D. (2004). Retroviral Vectors Pseudotyped with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus S Protein. *J Virol* 78, 9007-9015.
- Gluschankof, P., et Fuller, R.S. (1994). A C-terminal domain conserved in precursor processing proteases is required for intramolecular N-terminal maturation of pro-Kex2 protease. *Embo J* 13, 2280-2288.
- Gombold, J.L., Hingley, S.T., et Weiss, S.R. (1993). Identification of peplomer cleavage site mutations arising during persistence of MHV-A59. *Adv Exp Med Biol* 342, 157-163.
- Gordon, V.M., Benz, R., Fujii, K., Leppla, S.H., et Tweten, R.K. (1997a). Clostridium septicum alpha-toxin is proteolytically activated by furin. *Infect Immun* 65, 4130-4134.

- Gordon, V.M., Rehemtulla, A., et Leppla, S.H. (1997b). A role for PACE4 in the proteolytic activation of anthrax toxin protective antigen. *Infect Immun* 65, 3370-3375.
- Goto, H., et Kawaoka, Y. (1998). A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10224-10228.
- Grabovsky, V., Feigelson, S., Chen, C., Bleijs, D.A., Peled, A., Cinamon, G., Baleux, F., Arenzana-Seisdedos, F., Lapidot, T., van Kooyk, Y., Lobb, R.R., et Alon, R. (2000). Subsecond Induction of α_4 Integrin Clustering by Immobilized Chemokines Stimulates Leukocyte Tethering and Rolling on Endothelial Vascular Cell Adhesion Molecule 1 under Flow Conditions. *J Exp Med* 192, 495-506.
- Gron, H., Meldal, M., et Breddam, K. (1992). Extensive comparison of the substrate preferences of two subtilisins as determined with peptide substrates which are based on the principle of intramolecular quenching. *Biochemistry* 31, 6011-6018.
- Hansen, G.H., Delmas, B., Besnardeau, L., Vogel, L.K., Laude, H., Sjostrom, H., et Noren, O. (1998). The coronavirus transmissible gastroenteritis virus causes infection after receptor-mediated endocytosis and acid-dependent fusion with an intracellular compartment. *J Virol* 72, 527-534.
- Hatsuzawa, K., Murakami, K., et Nakayama, K. (1992). Molecular and enzymatic properties of furin, a Kex2-like endoprotease involved in precursor cleavage at Arg-X-Lys/Arg-Arg sites. *J Biochem (Tokyo)* 111, 296-301.

- Hattermann, K., Muller, M.A., Nitsche, A., Wendt, S., Donoso Mantke, O., et Niedrig, M. (2005). Susceptibility of different eukaryotic cell lines to SARS-coronavirus. *Arch Virol*.
- Heinz, F.X., Stiasny, K., Puschner-Auer, G., Holzmann, H., Allison, S.L., Mandl, C.W., et Kunz, C. (1994). Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology* 198, 109-117.
- Hemler, M.E., Elices, M.J., Parker, C., et Takada, Y. (1990). Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions. *Immunol Rev* 114, 45-65.
- Hemler, M.E., Huang, C., Takada, Y., Schwarz, L., Strominger, J.L., et Clabby, M.L. (1987). Characterization of the cell surface heterodimer VLA-4 and related peptides. *J Biol Chem* 262, 11478-11485.
- Henrich, S., Cameron, A., Bourenkov, G.P., Kiefersauer, R., Huber, R., Lindberg, I., Bode, W., et Than, M.E. (2003). The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat Struct Biol* 10, 520-526.
- Henrich, S., Lindberg, I., Bode, W., et Than, M.E. (2005). Proprotein Convertase Models based on the Crystal Structures of Furin and Kexin: Explanation of their Specificity. *J Mol Biol* 345, 211-227.
- Higy, M., Junne, T., et Spiess, M. (2004). Topogenesis of membrane proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* 43, 12716-12722.

- Hingley, S.T., Leparc-Goffart, I., Seo, S.H., Tsai, J.C., et Weiss, S.R. (2002). The virulence of mouse hepatitis virus strain A59 is not dependent on efficient spike protein cleavage and cell-to-cell fusion. *J Neurovirol* 8, 400-410.
- Hingley, S.T., Leparc-Goffart, I., et Weiss, S.R. (1998). The Spike Protein of Murine Coronavirus Mouse Hepatitis Virus Strain A59 Is Not Cleaved in Primary Glial Cells and Primary Hepatocytes. *J Virol* 72, 1606-1609.
- Ho, Y., Lin, P.H., Liu, C.Y., Lee, S.P., et Chao, Y.C. (2004). Assembly of human severe acute respiratory syndrome coronavirus-like particles. *Biochem Biophys Res Commun* 318, 833-838.
- Hofmann, H., Geier, M., Marzi, A., Krumbiegel, M., Peipp, M., Fey, G.H., Gramberg, T., et Pohlmann, S. (2004). Susceptibility to SARS coronavirus S protein-driven infection correlates with expression of angiotensin converting enzyme 2 and infection can be blocked by soluble receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319, 1216-1221.
- Holyoak, T., Kettner, C.A., Petsko, G.A., Fuller, R.S., et Ringe, D. (2004). Structural basis for differences in substrate selectivity in Kex2 and furin protein convertases. *Biochemistry* 43, 2412-2421.
- Holyoak, T., Wilson, M.A., Fenn, T.D., Kettner, C.A., Petsko, G.A., Fuller, R.S., et Ringe, D. (2003). 2.4 Å resolution crystal structure of the prototypical hormone-processing protease Kex2 in complex with an Ala-Lys-Arg boronic acid inhibitor. *Biochemistry* 42, 6709-6718.

- Horimoto, T., Nakayama, K., Smeekens, S.P., et Kawaoka, Y. (1994). Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses. *J Virol* 68, 6074-6078.
- Hsu, C.H., Ko, T.P., Yu, H.M., Tang, T.K., Chen, S.T., et Wang, A.H. (2004). Immunological, structural, and preliminary X-ray diffraction characterizations of the fusion core of the SARS-coronavirus spike protein. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 761-767.
- Huang, Y., Yang, Z.Y., Kong, W.P., et Nabel, G.J. (2004). Generation of synthetic severe acute respiratory syndrome coronavirus pseudoparticles: implications for assembly and vaccine production. *J Virol* 78, 12557-12565.
- Hui, D.S., et Wong, G.W. (2004). Advancements in the battle against severe acute respiratory syndrome. *Expert Opin Pharmacother* 5, 1687-1693.
- Hwang, D.M., Chamberlain, D.W., Poutanen, S.M., Low, D.E., Asa, S.L., et Butany, J. (2005). Pulmonary pathology of severe acute respiratory syndrome in Toronto. *Mod Pathol* 18, 1-10.
- Hynes, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.
- Ikemura, H., Takagi, H., et Inouye, M. (1987). Requirement of pro-sequence for the production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 262, 7859-7864.
- Imai, Y., Kuba, K., Rao, S., Huan, Y., Guo, F., Guan, B., Yang, P., Sarao, R., Wada, T., Leong-Poi, H., Crackower, M.A., Fukamizu, A., Hui, C.C., Hein, L., Uhlig, S.,

- Slutsky, A.S., Jiang, C., et Penninger, J.M. (2005). Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* 436, 112-116.
- Ingallinella, P., Bianchi, E., Finotto, M., Cantoni, G., Eckert, D.M., Supekar, V.M., Bruckmann, C., Carfi, A., et Pessi, A. (2004). Structural characterization of the fusion-active complex of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8709-8714.
- Inocencio, N.M., Moehring, J.M., et Moehring, T.J. (1994). Furin activates *Pseudomonas* exotoxin A by specific cleavage in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 269, 31831-31835.
- Jackwood, M.W., Hilt, D.A., Callison, S.A., Lee, C.W., Plaza, H., et Wade, E. (2001). Spike glycoprotein cleavage recognition site analysis of infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 45, 366-372.
- Jean, F., Boudreault, A., Basak, A., Seidah, N.G., et Lazure, C. (1995). Fluorescent Peptidyl Substrates as an Aid in Studying the Substrate Specificity of Human Prohormone Convertase PC1 and Human Furin and Designing a Potent Irreversible Inhibitor. *J Biol Chem* 270, 19225-19231.
- Jean, F., Stella, K., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Reason, A.J., et Thomas, G. (1998). alpha 1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: Application as an antipathogenic agent. *PNAS* 95, 7293-7298.
- Jean, F., Thomas, L., Molloy, S.S., Liu, G., Jarvis, M.A., Nelson, J.A., et Thomas, G. (2000). A protein-based therapeutic for human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2864-2869.

- Jeffers, S.A., Tusell, S.M., Gillim-Ross, L., Hemmila, E.M., Achenbach, J.E., Babcock, G.J., Thomas, W.D., Jr., Thackray, L.B., Young, M.D., Mason, R.J., Ambrosino, D.M., Wentworth, D.E., Demartini, J.C., et Holmes, K.V. (2004). CD209L (L-SIGN) is a receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 15748-15753.
- Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R., et Thorner, J. (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell* *37*, 1075-1089.
- Jutras, I., Seidah, N.G., et Reudelhuber, T.L. (2000). A predicted alpha-helix mediates targeting of the proprotein convertase PC1 to the regulated secretory pathway. *J Biol Chem* *275*, 40337-40343.
- Kajiji, S., Tamura, R.N., et Quaranta, V. (1989). A novel integrin (alpha E beta 4) from human epithelial cells suggests a fourth family of integrin adhesion receptors. *Embo J* *8*, 673-680.
- Kalus, I., Schnegelsberg, B., Seidah, N.G., Kleene, R., et Schachner, M. (2003). The Proprotein Convertase PC5A and a Metalloprotease Are Involved in the Proteolytic Processing of the Neural Adhesion Molecule L1. *J Biol Chem* *278*, 10381-10388.
- Kawasaki-Nishi, S., Nishi, T., et Forgac, M. (2003). Proton translocation driven by ATP hydrolysis in V-ATPases. *FEBS Lett* *545*, 76-85.
- Kido, H., Murakami, M., Oba, K., Chen, Y., et Towatari, T. (1999). Cellular proteinases trigger the infectivity of the influenza A and Sendai viruses. *Mol Cells* *9*, 235-244.

- Kiefer, M.C., Tucker, J.E., Joh, R., Landsberg, K.E., Saltman, D., et Barr, P.J. (1991). Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15. *DNA Cell Biol* 10, 757-769.
- Klenk, H.-D., et Garten, W. (1994). Host cell proteases controlling virus pathogenicity. 2, 39.
- Klimpel, K.R., Molloy, S.S., Thomas, G., et Leppla, S.H. (1992). Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10277-10281.
- Koch, A.E., Halloran, M.M., Haskell, C.J., Shah, M.R., et Polverini, P.J. (1995). Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature* 376, 517-519.
- Kokkonen, N., Rivinoja, A., Kauppila, A., Suokas, M., Kellokumpu, I., et Kellokumpu, S. (2004). Defective Acidification of Intracellular Organelles Results in Aberrant Secretion of Cathepsin D in Cancer Cells. *J Biol Chem* 279, 39982-39988.
- Kolodziej, M.A., Vilaire, G., Gonder, D., Poncz, M., et Bennett, J.S. (1991). Study of the endoproteolytic cleavage of platelet glycoprotein IIb using oligonucleotide-mediated mutagenesis. *J Biol Chem* 266, 23499-23504.
- Komiyama, T., et Fuller, R.S. (2000). Engineered eglin c variants inhibit yeast and human proprotein processing proteases, Kex2 and furin. *Biochemistry* 39, 15156-15165.

- Kooi, C., Cervin, M., et Anderson, R. (1991). Differentiation of acid-pH-dependent and -nondependent entry pathways for mouse hepatitis virus. *Virology* 180, 108-119.
- Krokhin, O., Li, Y., Andonov, A., Feldmann, H., Flick, R., Jones, S., Stroehrer, U., Bastien, N., Dasuri, K.V., Cheng, K., Simonsen, J.N., Perreault, H., Wilkins, J., Ens, W., Plummer, F., et Standing, K.G. (2003). Mass Spectrometric Characterization of Proteins from the SARS Virus: A Preliminary Report. *Mol Cell Proteomics* 2, 346-356.
- Krysan, D.J., Rockwell, N.C., et Fuller, R.S. (1999). Quantitative Characterization of Furin Specificity. ENERGETICS OF SUBSTRATE DISCRIMINATION USING AN INTERNALLY CONSISTENT SET OF HEXAPEPTIDYL METHYLCOUMARINAMIDES. *J Biol Chem* 274, 23229-23234.
- Ksiazek, T.G., Erdman, D., Goldsmith, C.S., Zaki, S.R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J.A., Lim, W., Rollin, P.E., Dowell, S.F., Ling, A.E., Humphrey, C.D., Shieh, W.J., Guarner, J., Paddock, C.D., Rota, P., Fields, B., DeRisi, J., Yang, J.Y., Cox, N., Hughes, J.M., LeDuc, J.W., Bellini, W.J., et Anderson, L.J. (2003). A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348, 1953-1966.
- Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., Gao, H., Guo, F., Guan, B., Huan, Y., Yang, P., Zhang, Y., Deng, W., Bao, L., Zhang, B., Liu, G., Wang, Z., Chappell, M., Liu, Y., Zheng, D., Leibbrandt, A., Wada, T., Slutsky, A.S., Liu, D., Qin, C., Jiang, C., et Penninger, J.M. (2005). A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med*.

- Kuiken, T., Fouchier, R.A., Schutten, M., Rimmelzwaan, G.F., van Amerongen, G., van Riel, D., Laman, J.D., de Jong, T., van Doornum, G., Lim, W., Ling, A.E., Chan, P.K., Tam, J.S., Zambon, M.C., Gopal, R., Drosten, C., van der Werf, S., Escriou, N., Manuguerra, J.C., Stohr, K., Peiris, J.S., et Osterhaus, A.D. (2003). Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 362, 263-270.
- Kwee, L., Baldwin, H.S., Shen, H.M., Stewart, C.L., Buck, C., Buck, C.A., et Labow, M.A. (1995). Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. *Development* 121, 489-503.
- Lamango, N.S., Zhu, X., et Lindberg, I. (1996). Purification and enzymatic characterization of recombinant prohormone convertase 2: stabilization of activity by 21 kDa 7B2. *Arch Biochem Biophys* 330, 238-250.
- Lambert, D.W., Yarski, M., Warner, F.J., Thornhill, P., Parkin, E.T., Smith, A.I., Hooper, N.M., et Turner, A.J. (2005). Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the SARS-CoV receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J Biol Chem*.
- Lazure, C., Gauthier, D., Jean, F., Boudreault, A., Seidah, N.G., Bennett, H.P.J., et Hendy, G.N. (1998). In Vitro Cleavage of Internally Quenched Fluorogenic Human Parathyroid Hormone and Parathyroid-related Peptide Substrates by Furin. GENERATION OF A POTENT INHIBITOR. *J Biol Chem* 273, 8572-8580.

- Ledgerwood, E.C., George, P.M., Peach, R.J., et Brennan, S.O. (1995). Endoproteolytic processing of recombinant proalbumin variants by the yeast Kex2 protease. *Biochem J* 308 (Pt 1), 321-325.
- Lehmann, M., Rigot, V., Seidah, N.G., Marvaldi, J., et Lissitzky, J.C. (1996). Lack of integrin alpha-chain endoproteolytic cleavage in furin-deficient human colon adenocarcinoma cells LoVo. *Biochem J* 317 (Pt 3), 803-809.
- Lenz, O., ter Meulen, J., Klenk, H.D., Seidah, N.G., et Garten, W. (2001). The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12701-12705.
- Leren, T.P. (2004). Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet* 65, 419-422.
- Lesage, G., Prat, A., Lacombe, J., Thomas, D.Y., Seidah, N.G., et Boileau, G. (2000). The Kex2p proregion is essential for the biosynthesis of an active enzyme and requires a C-terminal basic residue for its function. *Mol Biol Cell* 11, 1947-1957.
- Lesage, G., Tremblay, M., Guimond, J., et Boileau, G. (2001). Mechanism of Kex2p inhibition by its proregion. *FEBS Lett* 508, 332-336.
- Lissitzky, J.C., Luis, J., Munzer, J.S., Benjannet, S., Parat, F., Chretien, M., Marvaldi, J., et Seidah, N.G. (2000). Endoproteolytic processing of integrin pro-alpha subunits involves the redundant function of furin and proprotein convertase (PC) 5A, but not paired basic amino acid converting enzyme (PACE) 4, PC5B or PC7. *Biochem J* 346 Pt 1, 133-138.

- Liu, S., Xiao, G., Chen, Y., He, Y., Niu, J., Escalante, C.R., Xiong, H., Farmar, J., Debnath, A.K., Tien, P., et Jiang, S. (2004). Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors. *Lancet* 363, 938-947.
- Lobb, R.R., et Hemler, M.E. (1994). The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. *J Clin Invest* 94, 1722-1728.
- Lontok, E., Corse, E., et Machamer, C.E. (2004). Intracellular targeting signals contribute to localization of coronavirus spike proteins near the virus assembly site. *J Virol* 78, 5913-5922.
- Lusson, J., Benjannet, S., Hamelin, J., Savaria, D., Chretien, M., et Seidah, N.G. (1997). The integrity of the RRGDL sequence of the proprotein convertase PC1 is critical for its zymogen and C-terminal processing and for its cellular trafficking. *Biochem J* 326 (Pt 3), 737-744.
- Lusson, J., Vieau, D., Hamelin, J., Day, R., Chretien, M., et Seidah, N.G. (1993). cDNA structure of the mouse and rat subtilisin/kexin-like PC5: a candidate proprotein convertase expressed in endocrine and nonendocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6691-6695.
- Machen, T.E., Chandy, G., Wu, M., Grabe, M., et Moore, H.P. (2001). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and H⁺ permeability in regulation of Golgi pH. *Jop* 2, 229-236.
- Magiorkinis, G., Magiorkinis, E., Paraskevis, D., Vandamme, A.M., Van Ranst, M., Moulton, V., et Hatzakis, A. (2004). Phylogenetic analysis of the full-length SARS-

CoV sequences: evidence for phylogenetic discordance in three genomic regions. *J Med Virol* 74, 369-372.

Mains, R.E., Berard, C.A., Denault, J.B., Zhou, A., Johnson, R.C., et Leduc, R. (1997). PACE4: a subtilisin-like endoprotease with unique properties. *Biochem J* 321 (Pt 3), 587-593.

Marcinkiewicz, M., Day, R., Seidah, N.G., et Chretien, M. (1993). Ontogeny of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the mouse hypophysis and their colocalization with corticotropin and alpha-melanotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4922-4926.

Marcinkiewicz, M., Ramla, D., Seidah, N.G., et Chretien, M. (1994). Developmental expression of the prohormone convertases PC1 and PC2 in mouse pancreatic islets. *Endocrinology* 135, 1651-1660.

Marra, M.A., Jones, S.J., Astell, C.R., Holt, R.A., Brooks-Wilson, A., Butterfield, Y.S., Khattra, J., Asano, J.K., Barber, S.A., Chan, S.Y., Cloutier, A., Coughlin, S.M., Freeman, D., Girn, N., Griffith, O.L., Leach, S.R., Mayo, M., McDonald, H., Montgomery, S.B., Pandoh, P.K., Petrescu, A.S., Robertson, A.G., Schein, J.E., Siddiqui, A., Smailus, D.E., Stott, J.M., Yang, G.S., Plummer, F., Andonov, A., Artsob, H., Bastien, N., Bernard, K., Booth, T.F., Bowness, D., Czub, M., Drebot, M., Fernando, L., Flick, R., Garbutt, M., Gray, M., Grolla, A., Jones, S., Feldmann, H., Meyers, A., Kabani, A., Li, Y., Normand, S., Stroher, U., Tipples, G.A., Tyler, S., Vogrig, R., Ward, D., Watson, B., Brunham, R.C., Kraiden, M., Petric, M., Skowronski, D.M., Upton, C., et Roper, R.L. (2003). The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 300, 1399-1404.

- Martin, K.H., Slack, J.K., Boerner, S.A., Martin, C.C., et Parsons, J.T. (2002). Integrin connections map: to infinity and beyond. *Science* 296, 1652-1653.
- Martoglio, B. (2003). Intramembrane proteolysis and post-targeting functions of signal peptides. *Biochem Soc Trans* 31, 1243-1247.
- Martoglio, B., et Dobberstein, B. (1998). Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* 8, 410-415.
- Martoglio, B., Graf, R., et Dobberstein, B. (1997). Signal peptide fragments of preprolactin and HIV-1 p-gp160 interact with calmodulin. *Embo J* 16, 6636-6645.
- Matsuyama, S., Delos, S.E., et White, J.M. (2004). Sequential roles of receptor binding and low pH in forming prehairpin and hairpin conformations of a retroviral envelope glycoprotein. *J Virol* 78, 8201-8209.
- Matsuzawa, T., Fukui, A., Kashimoto, T., Nagao, K., Oka, K., Miyake, M., et Horiguchi, Y. (2004). Bordetella dermonecrotic toxin undergoes proteolytic processing to be translocated from a dynamin-related endosome into the cytoplasm in an acidification-independent manner. *J Biol Chem* 279, 2866-2872.
- Matthews, D.A., Alden, R.A., Birktoft, J.J., Freer, S.T., et Kraut, J. (1975). X-ray crystallographic study of boronic acid adducts with subtilisin BPN' (Novo). A model for the catalytic transition state. *J Biol Chem* 250, 7120-7126.
- Matthews, D.J., Goodman, L.J., Gorman, C.M., et Wells, J.A. (1994). A survey of furin substrate specificity using substrate phage display. *Protein Sci* 3, 1197-1205.

- Maxwell, K.N., et Breslow, J.L. (2004). Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 7100-7105.
- Maxwell, K.N., Fisher, E.A., et Breslow, J.L. (2005). Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 2069-2074.
- Mayer, G., Boileau, G., et Bendayan, M. (2003). Furin interacts with proMT1-MMP and integrin alphaV at specialized domains of renal cell plasma membrane. *J Cell Sci* *116*, 1763-1773.
- 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., et 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.
- Meerabux, J., Yaspo, M.L., Roebroek, A.J., Van de Ven, W.J., Lister, T.A., et Young, B.D. (1996). A new member of the proprotein convertase gene family (LPC) is located at a chromosome translocation breakpoint in lymphomas. *Cancer Res* *56*, 448-451.
- Miyakawa, Y., Nishimura, T., Ueyama, Y., Miyake, K., Miyasaka, M., Ikeda, Y., et Habu, S. (1996). Cell adhesion via murine alpha4 human beta1 integrin chimera on transfected K562 cells to endothelial cells. *Exp Cell Res* *226*, 75-79.
- Mizuno, K., Nakamura, T., Ohshima, T., Tanaka, S., et Matsuo, H. (1989). Characterization of KEX2-encoded endopeptidase from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* *159*, 305-311.

- Moll, M., Diederich, S., Klenk, H.D., Czub, M., et Maisner, A. (2004). Ubiquitous activation of the Nipah virus fusion protein does not require a basic amino acid at the cleavage site. *J Virol* 78, 9705-9712.
- Molloy, S.S., Bresnahan, P.A., Leppla, S.H., Klimpel, K.R., et Thomas, G. (1992). Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J Biol Chem* 267, 16396-16402.
- Molloy, S.S., Thomas, L., VanSlyke, J.K., Stenberg, P.E., et Thomas, G. (1994). Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *Embo J* 13, 18-33.
- Moore, H.P., Andresen, J.M., Eaton, B.A., Grabe, M., Haugwitz, M., Wu, M.M., et Machen, T.E. (2002). Biosynthesis and secretion of pituitary hormones: dynamics and regulation. *Arch Physiol Biochem* 110, 16-25.
- Morita, E., Ebina, H., Muto, A., Himeno, H., Hatakeyama, K., et Sugiyama, K. (1998). Primary structures of hemagglutinin-esterase and spike glycoproteins of murine coronavirus DVIM. *Virus Genes* 17, 123-128.
- Mortola, E., et Roy, P. (2004). Efficient assembly and release of SARS coronavirus-like particles by a heterologous expression system. *FEBS Lett* 576, 174-178.
- Moss, M.L., et Lambert, M.H. (2002). Shedding of membrane proteins by ADAM family proteases. *Essays Biochem* 38, 141-153.

- Mothes, W., Boerger, A.L., Narayan, S., Cunningham, J.M., et Young, J.A. (2000). Retroviral entry mediated by receptor priming and low pH triggering of an envelope glycoprotein. *Cell* 103, 679-689.
- Mouchantaf, R., Watt, H.L., Sulea, T., Seidah, N.G., Alturaihi, H., Patel, Y.C., et Kumar, U. (2004). Prosomatostatin is proteolytically processed at the amino terminal segment by subtilase SKI-1. *Regul Pept* 120, 133-140.
- Moulard, M., Chaloin, L., Canarelli, S., Mabrouk, K., et Darbon, H. (1998). Retroviral envelope glycoprotein processing: structural investigation of the cleavage site. *Biochemistry* 37, 4510-4517.
- Mounir, S., Labonte, P., et Talbot, P.J. (1993). Characterization of the nonstructural and spike proteins of the human respiratory coronavirus OC43: comparison with bovine enteric coronavirus. *Adv Exp Med Biol* 342, 61-67.
- Muller, L., Cameron, A., Fortenberry, Y., Apletalina, E.V., et Lindberg, I. (2000). Processing and sorting of the prohormone convertase 2 propeptide. *J Biol Chem* 275, 39213-39222.
- Munzer, J.S., Basak, A., Zhong, M., Mamarbachi, A., Hamelin, J., Savaria, D., Lazure, C., Benjannet, S., Chretien, M., et Seidah, N.G. (1997). In Vitro Characterization of the Novel Proprotein Convertase PC7. *J Biol Chem* 272, 19672-19681.
- Nagai, K., Oubridge, C., Kuglstatter, A., Menichelli, E., Isel, C., et Jovine, L. (2003). Structure, function and evolution of the signal recognition particle. *Embo J* 22, 3479-3485.

- Nakagawa, T., Hosaka, M., Torii, S., Watanabe, T., Murakami, K., et Nakayama, K. (1993). Identification and functional expression of a new member of the mammalian Kex2-like processing endoprotease family: its striking structural similarity to PACE4. *J Biochem (Tokyo)* 113, 132-135.
- Nakayama, K. (1997). Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J* 327 (Pt 3), 625-635.
- Nakayama, K., Kim, W.S., Torii, S., Hosaka, M., Nakagawa, T., Ikemizu, J., Baba, T., et Murakami, K. (1992). Identification of the fourth member of the mammalian endoprotease family homologous to the yeast Kex2 protease. Its testis-specific expression. *J Biol Chem* 267, 5897-5900.
- Nandi, A., Estess, P., et Siegelman, M. (2004). Bimolecular complex between rolling and firm adhesion receptors required for cell arrest; CD44 association with VLA-4 in T cell extravasation. *Immunity* 20, 455-465.
- Nash, T.C., et Buchmeier, M.J. (1997). Entry of mouse hepatitis virus into cells by endosomal and nonendosomal pathways. *Virology* 233, 1-8.
- Naureckiene, S., Ma, L., Sreekumar, K., Purandare, U., Lo, C.F., Huang, Y., Chiang, L.W., Grenier, J.M., Ozenberger, B.A., Jacobsen, J.S., Kennedy, J.D., DiStefano, P.S., Wood, A., et Bingham, B. (2003). Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K. *Arch Biochem Biophys* 420, 55-67.
- Nejjari, M., Berthet, V., Rigot, V., Laforest, S., Jacquier, M.F., Seidah, N.G., Remy, L., Bruyneel, E., Scoazec, J.Y., Marvaldi, J., et Luis, J. (2004). Inhibition of proprotein

convertases enhances cell migration and metastases development of human colon carcinoma cells in a rat model. *Am J Pathol* 164, 1925-1933.

Neumann, G., Feldmann, H., Watanabe, S., Lukashevich, I., et Kawaoka, Y. (2002). Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture. *J Virol* 76, 406-410.

Ng, M.L., Tan, S.H., See, E.E., Ooi, E.E., et Ling, A.E. (2003). Proliferative growth of SARS coronavirus in Vero E6 cells. *J Gen Virol* 84, 3291-3303.

Nicholls, J.M., Poon, L.L., Lee, K.C., Ng, W.F., Lai, S.T., Leung, C.Y., Chu, C.M., Hui, P.K., Mak, K.L., Lim, W., Yan, K.W., Chan, K.H., Tsang, N.C., Guan, Y., Yuen, K.Y., et Peiris, J.S. (2003). Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361, 1773-1778.

Nour, N., Basak, A., Chretien, M., et Seidah, N.G. (2003). Structure-function analysis of the prosegment of the proprotein convertase PC5A. *J Biol Chem* 278, 2886-2895.

Oda, K., et Ikehara, Y. (1985). Weakly basic amines inhibit the proteolytic conversion of proalbumin to serum albumin in cultured rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 152, 605-609.

Oliva, R., Falcigno, L., D'Auria, G., Dettin, M., Scarinci, C., Pasquato, A., Di Bello, C., et Paolillo, L. (2003). Structural investigation of the HIV-1 envelope glycoprotein gp160 cleavage site, 2: relevance of an N-terminal helix. *Chembiochem* 4, 727-733.

- Owen, M.C., Brennan, S.O., Lewis, J.H., et Carrell, R.W. (1983). Mutation of antitrypsin to antithrombin. alpha 1-antitrypsin Pittsburgh (358 Met leads to Arg), a fatal bleeding disorder. *N Engl J Med* 309, 694-698.
- Pager, C.T., Wurth, M.A., et Dutch, R.E. (2004). Subcellular localization and calcium and pH requirements for proteolytic processing of the Hendra virus fusion protein. *J Virol* 78, 9154-9163.
- Paroutis, P., Touret, N., et Grinstein, S. (2004). The pH of the Secretory Pathway: Measurement, Determinants, and Regulation. *Physiology* 19, 207-215.
- Pelkmans, L., Puntener, D., et Helenius, A. (2002). Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* 296, 535-539.
- Petosa, C., Collier, R.J., Klimpel, K.R., Leppla, S.H., et Liddington, R.C. (1997). Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature* 385, 833-838.
- Plaimauer, B., Mohr, G., Wernhart, W., Himmelspach, M., Dorner, F., et Schlokot, U. (2001). 'Shed' furin: mapping of the cleavage determinants and identification of its C-terminus. *Biochem J* 354, 689-695.
- Pujades, C., Teixido, J., Bazzoni, G., et Hemler, M.E. (1996). Integrin alpha 4 cysteines 278 and 717 modulate VLA-4 ligand binding and also contribute to alpha 4/180 formation. *Biochem J* 313 (Pt 3), 899-908.
- Puthavathana, P., Auewarakul, P., Charoenying, P.C., Sangsiriwut, K., Pooruk, P., Boonnak, K., Khanyok, R., Thawachsupa, P., Kijphati, R., et Sawanpanyalert, P.

- (2005). Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. *J Gen Virol* 86, 423-433.
- Rashid, S., Curtis, D.E., Garuti, R., Anderson, N.N., Bashmakov, Y., Ho, Y.K., Hammer, R.E., Moon, Y.A., et Horton, J.D. (2005). Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5374-5379.
- Ratnikov, B.I., Rozanov, D.V., Postnova, T.I., Baciuc, P.G., Zhang, H., DiScipio, R.G., Chestukhina, G.G., Smith, J.W., Deryugina, E.I., et Strongin, A.Y. (2002). An alternative processing of integrin alpha(v) subunit in tumor cells by membrane type-1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 277, 7377-7385.
- Rockwell, N.C., et Fuller, R.S. (1998). Interplay between S1 and S4 subsites in Kex2 protease: Kex2 exhibits dual specificity for the P4 side chain. *Biochemistry* 37, 3386-3391.
- Rockwell, N.C., et Fuller, R.S. (2001). Direct measurement of acylenzyme hydrolysis demonstrates rate-limiting deacylation in cleavage of physiological sequences by the processing protease Kex2. *Biochemistry* 40, 3657-3665.
- Rockwell, N.C., et Fuller, R.S. (2002). Specific modulation of Kex2/furin family proteases by potassium. *J Biol Chem* 277, 17531-17537.
- Rockwell, N.C., et Thorner, J.W. (2004). The kindest cuts of all: crystal structures of Kex2 and furin reveal secrets of precursor processing. *Trends Biochem Sci* 29, 80-87.

- Rockwell, N.C., Wang, G.T., Krafft, G.A., et Fuller, R.S. (1997). Internally consistent libraries of fluorogenic substrates demonstrate that Kex2 protease specificity is generated by multiple mechanisms. *Biochemistry* 36, 1912-1917.
- Roebroek, A.J., Schalken, J.A., Leunissen, J.A., Onnekink, C., Bloemers, H.P., et Van de Ven, W.J. (1986). Evolutionary conserved close linkage of the c-fes/fps proto-oncogene and genetic sequences encoding a receptor-like protein. *Embo J* 5, 2197-2202.
- Roebroek, A.J., Taylor, N.A., Louagie, E., Pauli, I., Smeijers, L., Snellinx, A., Lauwers, A., Van de Ven, W.J., Hartmann, D., et Creemers, J.W. (2004). Limited redundancy of the proprotein convertase furin in mouse liver. *J Biol Chem*.
- Rose, D.M., Cardarelli, P.M., Cobb, R.R., et Ginsberg, M.H. (2000). Soluble VCAM-1 binding to alpha 4 integrins is cell-type specific and activation dependent and is disrupted during apoptosis in T cells. *Blood* 95, 602-609.
- Rosen, G.D., Sanes, J.R., LaChance, R., Cunningham, J.M., Roman, J., et Dean, D.C. (1992). Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis. *Cell* 69, 1107-1119.
- Rota, P.A., Oberste, M.S., Monroe, S.S., Nix, W.A., Campagnoli, R., Icenogle, J.P., Penaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M.H., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J.L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D.D., Peret, T.C., Burns, C., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Sanchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, J., McCaustland, K., Olsen-Rasmussen, M., Fouchier, R., Gunther, S., Osterhaus, A.D., Drosten, C., Pallansch, M.A., Anderson, L.J., et Bellini, W.J. (2003).

Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 300, 1394-1399.

Rovere, C., Luis, J., Lissitzky, J.C., Basak, A., Marvaldi, J., Chretien, M., et Seidah, N.G. (1999). The RGD motif and the C-terminal segment of proprotein convertase 1 are critical for its cellular trafficking but not for its intracellular binding to integrin alpha5beta1. *J Biol Chem* 274, 12461-12467.

Rozan, L., Krysan, D.J., Rockwell, N.C., et Fuller, R.S. (2004). Plasticity of Extended Subsites Facilitates Divergent Substrate Recognition by Kex2 and Furin. *J Biol Chem* 279, 35656-35663.

Ruiz-Arguello, M.B., Martin, D., Wharton, S.A., Calder, L.J., Martin, S.R., Cano, O., Calero, M., Garcia-Barreno, B., Skehel, J.J., et Melero, J.A. (2004). Thermostability of the human respiratory syncytial virus fusion protein before and after activation: implications for the membrane-fusion mechanism. *J Gen Virol* 85, 3677-3687.

Sakai, J., Rawson, R.B., Espenshade, P.J., Cheng, D., Seegmiller, A.C., Goldstein, J.L., et Brown, M.S. (1998). Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol Cell* 2, 505-514.

Schechter, I., et Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* 27, 157-162.

Schmidt, W.K., et Moore, H.P. (1995). Ionic milieu controls the compartment-specific activation of pro-opiomelanocortin processing in AtT-20 cells. *Mol Biol Cell* 6, 1271-1285.

- Schweighoffer, T., Tanaka, Y., Tidswell, M., Erle, D.J., Horgan, K.J., Luce, G.E., Lazarovits, A.I., Buck, D., et Shaw, S. (1993). Selective expression of integrin alpha 4 beta 7 on a subset of human CD4+ memory T cells with Hallmarks of gut-trophism. *J Immunol* *151*, 717-729.
- Seidah, N.G., Benjannet, S., Pareek, S., Savaria, D., Hamelin, J., Goulet, B., Laliberte, J., Lazure, C., Chretien, M., et Murphy, R.A. (1996a). Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J* *314* (Pt 3), 951-960.
- Seidah, N.G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S.B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A., et Chretien, M. (2003). The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 928-933.
- Seidah, N.G., et Chretien, M. (1997). Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins. *Curr Opin Biotechnol* *8*, 602-607.
- Seidah, N.G., et Chrétien, M. (1999). Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res* *848*, 45-62.
- Seidah, N.G., Day, R., Hamelin, J., Gaspar, A., Collard, M.W., et Chretien, M. (1992). Testicular expression of PC4 in the rat: molecular diversity of a novel germ cell-specific Kex2/subtilisin-like proprotein convertase. *Mol Endocrinol* *6*, 1559-1570.

- Seidah, N.G., Day, R., Marcinkiewicz, M., et Chretien, M. (1998). Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Ann N Y Acad Sci* 839, 9-24.
- Seidah, N.G., Gaspar, L., Mion, P., Marcinkiewicz, M., Mbikay, M., et Chretien, M. (1990). cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases. *DNA Cell Biol* 9, 789.
- Seidah, N.G., Hamelin, J., Mamarbachi, M., Dong, W., Tardos, H., Mbikay, M., Chretien, M., et Day, R. (1996b). cDNA structure, tissue distribution, and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3388-3393.
- Seidah, N.G., Marcinkiewicz, M., Benjannet, S., Gaspar, L., Beaubien, G., Mattei, M.G., Lazure, C., Mbikay, M., et Chretien, M. (1991). Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, Furin, and Kex2: distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2. *Mol Endocrinol* 5, 111-122.
- Seidah, N.G., Mowla, S.J., Hamelin, J., Mamarbachi, A.M., Benjannet, S., Toure, B.B., Basak, A., Munzer, J.S., Marcinkiewicz, J., Zhong, M., Barale, J.C., Lazure, C., Murphy, R.A., Chretien, M., et Marcinkiewicz, M. (1999). Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1321-1326.

- Sengbusch, J.K., He, W., Pinco, K.A., et Yang, J.T. (2002). Dual functions of $\alpha_4\beta_1$ integrin in epicardial development: initial migration and long-term attachment. *J Cell Biol* 157, 873-882.
- Shimizu, Y., Van Seventer, G.A., Horgan, K.J., et Shaw, S. (1990). Regulated expression and binding of three VLA (beta 1) integrin receptors on T cells. *Nature* 345, 250-253.
- Shioji, K., Mannami, T., Kokubo, Y., Inamoto, N., Takagi, S., Goto, Y., Nonogi, H., et Iwai, N. (2004). Genetic variants in PCSK9 affect the cholesterol level in Japanese. *J Hum Genet* 49, 109-114.
- Sieczkarski, S.B., et Whittaker, G.R. (2002). Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol* 83, 1535-1545.
- Siegfried, G., Basak, A., Cromlish, J.A., Benjannet, S., Marcinkiewicz, J., Chretien, M., Seidah, N.G., et Khatib, A.-M. (2003). The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J Clin Invest* 111, 1723-1732.
- Siezen, R.J., Creemers, J.W., et Van de Ven, W.J. (1994). Homology modelling of the catalytic domain of human furin. A model for the eukaryotic subtilisin-like proprotein convertases. *European Journal of Biochemistry* 222, 255-266.
- Siezen, R.J., et Leunissen, J.A. (1997). Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci* 6, 501-523.

- Simmons, G., Reeves, J.D., Rennekamp, A.J., Amberg, S.M., Piefer, A.J., et Bates, P. (2004). Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 4240-4245.
- Smeeckens, S.P., Avruch, A.S., LaMendola, J., Chan, S.J., et Steiner, D.F. (1991). Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 340-344.
- Smeeckens, S.P., et Steiner, D.F. (1990). Identification of a human insulinoma cDNA encoding a novel mammalian protein structurally related to the yeast dibasic processing protease Kex2. *J Biol Chem* *265*, 2997-3000.
- Snijder, E.J., Bredenbeek, P.J., Dobbe, J.C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon, L.L., Guan, Y., Rozanov, M., Spaan, W.J., et Gorbalenya, A.E. (2003). Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J Mol Biol* *331*, 991-1004.
- Springfield, C., von Messling, V., Tidona, C.A., Darai, G., et Cattaneo, R. (2005). Envelope Targeting: Hemagglutinin Attachment Specificity Rather than Fusion Protein Cleavage-Activation Restricts Tupaia Paramyxovirus Tropism. *J Virol* *79*, 10155-10163.
- Srour, N., Lebel, A., McMahon, S., Fournier, I., Fugere, M., Day, R., et Dubois, C.M. (2003). TACE/ADAM-17 maturation and activation of sheddase activity require proprotein convertase activity. *554*, 275.

- Stadler, K., Allison, S.L., Schlich, J., et Heinz, F.X. (1997). Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol* *71*, 8475-8481.
- Stawowy, P., Kallisch, H., Veinot, J.P., Kilimnik, A., Prichett, W., Goetze, S., Seidah, N.G., Chretien, M., Fleck, E., et Graf, K. (2004). Endoproteolytic activation of alpha(v) integrin by proprotein convertase PC5 is required for vascular smooth muscle cell adhesion to vitronectin and integrin-dependent signaling. *Circulation* *109*, 770-776.
- Steiner, D.F., Cunningham, D., Spigelman, L., et Aten, B. (1967). Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science* *157*, 697-700.
- Strive, T., Borst, E., Messerle, M., et Radsak, K. (2002). Proteolytic processing of human cytomegalovirus glycoprotein B is dispensable for viral growth in culture. *J Virol* *76*, 1252-1264.
- Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., Hemphill, M., Rowe, T., Shaw, M., Xu, X., Fukuda, K., et Cox, N. (1998). Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* *279*, 393-396.
- Supekar, V.M., Bruckmann, C., Ingallinella, P., Bianchi, E., Pessi, A., et Carfi, A. (2004). Structure of a proteolytically resistant core from the severe acute respiratory syndrome coronavirus S2 fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 17958-17963.

- Tadros, H., Chretien, M., et Mbikay, M. (2001). The testicular germ-cell protease PC4 is also expressed in macrophage-like cells of the ovary. *J Reprod Immunol* 49, 133-152.
- Taguchi, F., Ikeda, T., Saeki, K., Kubo, H., et Kikuchi, T. (1993). Fusogenic properties of uncleaved spike protein of murine coronavirus JHMV. *Adv Exp Med Biol* 342, 171-175.
- Takahashi, S., Kasai, K., Hatsuzawa, K., Kitamura, N., Misumi, Y., Ikehara, Y., Murakami, K., et Nakayama, K. (1993). A mutation of furin causes the lack of precursor-processing activity in human colon carcinoma LoVo cells. *Biochem Biophys Res Commun* 195, 1019-1026.
- Tang, B.S., Chan, K.H., Cheng, V.C., Woo, P.C., Lau, S.K., Lam, C.C., Chan, T.L., Wu, A.K., Hung, I.F., Leung, S.Y., et Yuen, K.Y. (2005). Comparative host gene transcription by microarray analysis early after infection of the Huh7 cell line by severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus 229E. *J Virol* 79, 6180-6193.
- Taooka, Y., Chen, J., Yednock, T., et Sheppard, D. (1999). The integrin alpha9beta1 mediates adhesion to activated endothelial cells and transendothelial neutrophil migration through interaction with vascular cell adhesion molecule-1. *J Cell Biol* 145, 413-420.
- Teixido, J., Parker, C.M., Kassner, P.D., et Hemler, M.E. (1992). Functional and structural analysis of VLA-4 integrin alpha 4 subunit cleavage. *J Biol Chem* 267, 1786-1791.

- Teuchert, M., Schafer, W., Berghofer, S., Hoflack, B., Klenk, H.D., et Garten, W. (1999). Sorting of furin at the trans-Golgi network. Interaction of the cytoplasmic tail sorting signals with AP-1 Golgi-specific assembly proteins. *J Biol Chem* 274, 8199-8207.
- Thomas, G. (2002). Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 753-766.
- Thomas, G., Thorne, B.A., Thomas, L., Allen, R.G., Hruby, D.E., Fuller, R., et Thorner, J. (1988). Yeast KEX2 endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cells. *Science* 241, 226-230.
- Timms, K.M., Wagner, S., Samuels, M.E., Forbey, K., Goldfine, H., Jammulapati, S., Skolnick, M.H., Hopkins, P.N., Hunt, S.C., et Shattuck, D.M. (2004). A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum Genet* 114, 349-353.
- Toure, B.B., Munzer, J.S., Basak, A., Benjannet, S., Rochemont, J., Lazure, C., Chretien, M., et Seidah, N.G. (2000). Biosynthesis and enzymatic characterization of human SKI-1/S1P and the processing of its inhibitory prosegment. *J Biol Chem* 275, 2349-2358.
- Tripet, B., Howard, M.W., Jobling, M., Holmes, R.K., Holmes, K.V., et Hodges, R.S. (2004). Structural characterization of the SARS-coronavirus spike S fusion protein core. *J Biol Chem* 279, 20836-20849.
- Tsuji, A., Ikoma, T., Hashimoto, E., et Matsuda, Y. (2002). Development of selectivity of {alpha}1-antitrypsin variant by mutagenesis in its reactive site loop against

proprotein convertase. A crucial role of the P4 arginine in PACE4 inhibition. *Protein Eng 15*, 123-130.

Tsuji, A., Sakurai, K., Kiyokage, E., Yamazaki, T., Koide, S., Toida, K., Ishimura, K., et Matsuda, Y. (2003). Secretory proprotein convertases PACE4 and PC6A are heparin-binding proteins which are localized in the extracellular matrix. Potential role of PACE4 in the activation of proproteins in the extracellular matrix. *Biochim Biophys Acta 1645*, 95-104.

Tsuneoka, M., Nakayama, K., Hatsuzawa, K., Komada, M., Kitamura, N., et Mekada, E. (1993). Evidence for involvement of furin in cleavage and activation of diphtheria toxin. *J Biol Chem 268*, 26461-26465.

Ueda, K., Lipkind, G.M., Zhou, A., Zhu, X., Kuznetsov, A., Philipson, L., Gardner, P., Zhang, C., et Steiner, D.F. (2003). Mutational analysis of predicted interactions between the catalytic and P domains of prohormone convertase 3 (PC3/PC1). *Proc Natl Acad Sci U S A 100*, 5622-5627.

Umata, T., Moriyama, Y., Futai, M., et Mekada, E. (1990). The cytotoxic action of diphtheria toxin and its degradation in intact Vero cells are inhibited by bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase. *J Biol Chem 265*, 21940-21945.

Van Rompaey, L., Ayoubi, T., Van De Ven, W., et Marynen, P. (1997). Inhibition of intracellular proteolytic processing of soluble proproteins by an engineered alpha 2-macroglobulin containing a furin recognition sequence in the bait region. *Biochem J 326 (Pt 2)*, 507-514.

- Vennema, H., Godeke, G.J., Rossen, J.W., Voorhout, W.F., Horzinek, M.C., Opstelten, D.J., et Rottier, P.J. (1996). Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *Embo J* 15, 2020-2028.
- Villemure, M., Fournier, A., Gauthier, D., Rabah, N., Wilkes, B.C., et Lazure, C. (2003). Barley serine proteinase inhibitor 2-derived cyclic peptides as potent and selective inhibitors of convertases PC1/3 and furin. *Biochemistry* 42, 9659-9668.
- Villeneuve, P., Lafortune, L., Seidah, N.G., Kitabgi, P., et Beaudet, A. (2000). Immunohistochemical evidence for the involvement of protein convertases 5A and 2 in the processing of pro-neurotensin in rat brain. *J Comp Neurol* 424, 461-475.
- Vincent, M.J., Sanchez, A.J., Erickson, B.R., Basak, A., Chretien, M., Seidah, N.G., et Nichol, S.T. (2003). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein proteolytic processing by subtilase SKI-1. *J Virol* 77, 8640-8649.
- Voorhees, P., Deignan, E., van Donselaar, E., Humphrey, J., Marks, M.S., Peters, P.J., et Bonifacino, J.S. (1995). An acidic sequence within the cytoplasmic domain of furin functions as a determinant of trans-Golgi network localization and internalization from the cell surface. *Embo J* 14, 4961-4975.
- Wagner, D.D., Mayadas, T., et Marder, V.J. (1986). Initial glycosylation and acidic pH in the Golgi apparatus are required for multimerization of von Willebrand factor. *J Cell Biol* 102, 1320-1324.
- Wang, S., Chou, T.-h.W., Sakhatsky, P.V., Huang, S., Lawrence, J.M., Cao, H., Huang, X., et Lu, S. (2005). Identification of Two Neutralizing Regions on the Severe

Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Glycoprotein Produced from the Mammalian Expression System. *J Virol* 79, 1906-1910.

Watanabe, T., Nakagawa, T., Ikemizu, J., Nagahama, M., Murakami, K., et Nakayama, K. (1992). Sequence requirements for precursor cleavage within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem* 267, 8270-8274.

Watson, D.G., Moehring, J.M., et Moehring, T.J. (1991). A mutant CHO-K1 strain with resistance to *Pseudomonas* exotoxin A and alphaviruses fails to cleave Sindbis virus glycoprotein PE2. *J Virol* 65, 2332-2339.

Wedekind, J.E., Trame, C.B., Dorywalska, M., Koehl, P., Raschke, T.M., McKee, M., FitzGerald, D., Collier, R.J., et McKay, D.B. (2001). Refined crystallographic structure of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and its implications for the molecular mechanism of toxicity. *J Mol Biol* 314, 823-837.

Weller, R.O., Engelhardt, B., et Phillips, M.J. (1996). Lymphocyte targeting of the central nervous system: a review of afferent and efferent CNS-immune pathways. *Brain Pathol* 6, 275-288.

Wesseling, J.G., Vennema, H., Godeke, G.J., Horzinek, M.C., et Rottier, P.J. (1994). Nucleotide sequence and expression of the spike (S) gene of canine coronavirus and comparison with the S proteins of feline and porcine coronaviruses. *J Gen Virol* 75 (Pt 7), 1789-1794.

Wilcox, C.A., et Fuller, R.S. (1991). Posttranslational processing of the prohormone-cleaving Kex2 protease in the *Saccharomyces cerevisiae* secretory pathway. *J Cell Biol* 115, 297-307.

- Wise, R.J., Barr, P.J., Wong, P.A., Kiefer, M.C., Brake, A.J., et Kaufman, R.J. (1990). Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9378-9382.
- Wong, S.K., Li, W., Moore, M.J., Choe, H., et Farzan, M. (2004). A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem* 279, 3197-3201.
- Wool-Lewis, R.J., et Bates, P. (1999). Endoproteolytic processing of the ebola virus envelope glycoprotein: cleavage is not required for function. *J Virol* 73, 1419-1426.
- Wouters, S., Leruth, M., Decroly, E., Vandenbranden, M., Creemers, J.W., van de Loo, J.W., Ruyschaert, J.M., et Courtoy, P.J. (1998). Furin and proprotein convertase 7 (PC7)/lymphoma PC endogenously expressed in rat liver can be resolved into distinct post-Golgi compartments. *Biochem J* 336 (Pt 2), 311-316.
- Wu, X.D., Shang, B., Yang, R.F., Yu, H., Ma, Z.H., Shen, X., Ji, Y.Y., Lin, Y., Wu, Y.D., Lin, G.M., Tian, L., Gan, X.Q., Yang, S., Jiang, W.H., Dai, E.H., Wang, X.Y., Jiang, H.L., Xie, Y.H., Zhu, X.L., Pei, G., Li, L., Wu, J.R., et Sun, B. (2004). The spike protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) is cleaved in virus infected Vero-E6 cells. *Cell Res* 14, 400-406.
- Xiang, Y., Molloy, S.S., Thomas, L., et Thomas, G. (2000). The PC6B cytoplasmic domain contains two acidic clusters that direct sorting to distinct trans-Golgi network/endosomal compartments. *Mol Biol Cell* 11, 1257-1273.

- Xu, Y., Lou, Z., Liu, Y., Pang, H., Tien, P., Gao, G.F., et Rao, Z. (2004a). Crystal structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein fusion core. *J Biol Chem* 279, 49414-49419.
- Xu, Y., Zhu, J., Liu, Y., Lou, Z., Yuan, F., Liu, Y., Cole, D.K., Ni, L., Su, N., Qin, L., Li, X., Bai, Z., Bell, J.I., Pang, H., Tien, P., Gao, G.F., et Rao, Z. (2004b). Characterization of the heptad repeat regions, HR1 and HR2, and design of a fusion core structure model of the spike protein from severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus. *Biochemistry* 43, 14064-14071.
- Yamada, Y.K., Takimoto, K., Yabe, M., et Taguchi, F. (1997). Acquired fusion activity of a murine coronavirus MHV-2 variant with mutations in the proteolytic cleavage site and the signal sequence of the S protein. *Virology* 227, 215-219.
- Yana, I., et Weiss, S.J. (2000). Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol Biol Cell* 11, 2387-2401.
- Yang, J.T., Rayburn, H., et Hynes, R.O. (1995). Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development* 121, 549-560.
- Yang, Z.-Y., Huang, Y., Ganesh, L., Leung, K., Kong, W.-P., Schwartz, O., Subbarao, K., et Nabel, G.J. (2004). pH-Dependent Entry of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Is Mediated by the Spike Glycoprotein and Enhanced by Dendritic Cell Transfer through DC-SIGN. *J Virol* 78, 5642-5650.

- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., et Goldstein, J.L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 6, 1355-1364.
- Yednock, T.A., Cannon, C., Fritz, L.C., Sanchez-Madrid, F., Steinman, L., et Karin, N. (1992). Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 356, 63-66.
- Ying, W., Hao, Y., Zhang, Y., Peng, W., Qin, E., Cai, Y., Wei, K., Wang, J., Chang, G., Sun, W., Dai, S., Li, X., Zhu, Y., Li, J., Wu, S., Guo, L., Dai, J., Wang, J., Wan, P., Chen, T., Du, C., Li, D., Wan, J., Kuai, X., Li, W., Shi, R., Wei, H., Cao, C., Yu, M., Liu, H., Dong, F., Wang, D., Zhang, X., Qian, X., Zhu, Q., et He, F. (2004). Proteomic analysis on structural proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus. *Proteomics* 4, 492-504.
- Yount, B., Curtis, K.M., Fritz, E.A., Hensley, L.E., Jahrling, P.B., Prentice, E., Denison, M.R., Geisbert, T.W., et Baric, R.S. (2003). Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12995-13000.
- Zarkik, S., Decroly, E., Wattiez, R., Seidah, N.G., Burny, A., et Ruyschaert, J.M. (1997). Comparative processing of bovine leukemia virus envelope glycoprotein gp72 by subtilisin/kexin-like mammalian convertases. *FEBS Lett* 406, 205-210.
- Zdanovsky, A.G., Chiron, M., Pastan, I., et FitzGerald, D.J. (1993). Mechanism of action of Pseudomonas exotoxin. Identification of a rate-limiting step. *J Biol Chem* 268, 21791-21799.

- Zhang, X., Fugere, M., Day, R., et Kielian, M. (2003). Furin processing and proteolytic activation of Semliki Forest virus. *J Virol* 77, 2981-2989.
- Zhong, M., Munzer, J.S., Basak, A., Benjannet, S., Mowla, S.J., Decroly, E., Chretien, M., et Seidah, N.G. (1999). The prosegments of furin and PC7 as potent inhibitors of proprotein convertases. In vitro and ex vivo assessment of their efficacy and selectivity. *J Biol Chem* 274, 33913-33920.
- Zhou, A., Martin, S., Lipkind, G., LaMendola, J., et Steiner, D.F. (1998). Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases. *J Biol Chem* 273, 11107-11114.
- Zhou, A., Paquet, L., et Mains, R.E. (1995). Structural elements that direct specific processing of different mammalian subtilisin-like prohormone convertases. *J Biol Chem* 270, 21509-21516.
- Zhou, Y., et Lindberg, I. (1993). Purification and characterization of the prohormone convertase PC1(PC3). *J Biol Chem* 268, 5615-5623.
- Zhu, J., Xiao, G., Xu, Y., Yuan, F., Zheng, C., Liu, Y., Yan, H., Cole, D.K., Bell, J.I., Rao, Z., Tien, P., et Gao, G.F. (2004). Following the rule: formation of the 6-helix bundle of the fusion core from severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein and identification of potent peptide inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 319, 283-288.

Annexe 1: Article 3

(Article publié dans *Virology Journal* (2005), 2, 69)

Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread


Martin J. Vincent,¹ **Eric Bergeron**,² Suzanne Benjannet,² Bobbie R. Erickson,¹ Pierre E. Rollin,¹ Thomas G. Ksiazek,¹ Nabil G. Seidah,² and Stuart T. Nichol,^{1*}

¹Special Pathogens Branch, Division of Viral and Rickettsial Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Road, Atlanta, Georgia, 30333

²Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology, Clinical Research Institute of Montreal, 110 Pine Ave West, Montreal, QC, H2W1R7, Canada

*Corresponding author.

Mailing address: Stuart T. Nichol, Special Pathogens Branch, Mail Stop G-14, Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Road, Atlanta, 30333.


Tel: 404 639 1122

Fax: 404 639 1118

Key words: severe acute respiratory syndrome coronavirus, chloroquine, inhibition, therapy

ABSTRACT

Background: Severe acute respiratory syndrome (SARS) is caused by a newly discovered coronavirus (SARS-CoV). No effective prophylactic or post-exposure therapy is currently available.

Results: We report, however, that chloroquine has strong antiviral effects on SARS-CoV infection of primate cells. These inhibitory effects are observed when the cells are treated with the drug either before or after exposure to the virus, suggesting both prophylactic and therapeutic advantage. In addition to the well-known functions of chloroquine such as elevations of endosomal pH, the drug appears to interfere with terminal glycosylation of the cellular receptor, angiotensin-converting enzyme 2. This may negatively influence the virus-receptor binding and abrogate the infection, with further ramifications by the elevation of vesicular pH, resulting in the inhibition of infection and spread of SARS CoV at clinically admissible concentrations.

Conclusions: Chloroquine is effective in preventing the spread of SARS CoV in cell culture. Favorable inhibition of virus spread was observed when the cells were either treated with chloroquine prior to after SARS CoV infection. In addition, the indirect immunofluorescence assay described herein represents a simple and rapid method for screening SARS-CoV antiviral compounds.

BACKGROUND

Severe acute respiratory syndrome (SARS) is an emerging disease that was first reported in Guangdong Province, China, in late 2002. The disease rapidly spread to at least 30 countries within months of its first appearance, and concerted worldwide efforts led to the identification of the etiological agent as SARS coronavirus (SARS-CoV), a novel member of the family *Coronaviridae* (1). Complete genome sequencing of SARS-CoV (2, 3) confirmed that this pathogen is not closely related to any of the previously established coronavirus groups. Budding of the SARS-CoV occurs in the Golgi apparatus (4) and results in the incorporation of the envelope spike glycoprotein into the virion. The spike glycoprotein is a type I membrane protein that facilitates viral attachment to the cellular receptor and initiation of infection, and angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) has been identified as a functional cellular receptor of SARS-CoV (5). We have recently shown that the processing of the spike protein was effected by furin-like convertases and that inhibition of this cleavage by a specific inhibitor abrogated cytopathicity and significantly reduced the virus titer of SARS-CoV (6).

Due to the severity of SARS-CoV infection, the potential for rapid spread of the disease, and the absence of proven effective and safe *in vivo* inhibitors of the virus, it is important to identify drugs that can effectively be used to treat or prevent potential SARS-CoV infections. Many novel therapeutic approaches have been evaluated in laboratory studies of SARS-CoV: notable among these approaches are those using siRNA (7), passive antibody transfer (8), DNA vaccination (9), vaccinia or parainfluenza virus expressing the spike protein (10, 11), interferons (12, 13), and monoclonal antibody to the S1-subunit of the spike glycoprotein that blocks receptor binding (14). In this report, we describe the identification of chloroquine as an effective pre- and post-infection antiviral agent for SARS-CoV. Chloroquine, a 9-aminoquinoline that was identified in 1934, is a weak base that increases the pH of acidic vesicles. When added extracellularly, the non-protonated portion of chloroquine enters the cell, where it becomes protonated and concentrated in acidic, low-pH organelles, such as endosomes, Golgi vesicles, and lysosomes. Chloroquine

can affect virus infection in many ways, and the antiviral effect depends in part on the extent to which the virus utilizes endosomes for entry. Chloroquine has been widely used to treat human diseases, such as malaria, amoebiasis, HIV, and autoimmune diseases, without significant detrimental side effects (15). Together with data presented here, showing virus inhibition in cell culture by chloroquine doses compatible with patient treatment, these features suggest that further evaluation of chloroquine in animal models of SARS-CoV infection would be warranted as we progress toward finding effective antivirals for prevention or treatment of the disease.

RESULTS

Preinfection chloroquine treatment renders Vero E6 cells refractory to SARS-CoV infection

In order to investigate if chloroquine might prevent SARS-CoV infection, permissive Vero E6 cells (1) were pretreated with various concentrations of chloroquine (0.1-10 μ M) for 20-24 h prior to virus infection. Cells were then infected with SARS-CoV, and virus antigens were visualized by indirect immunofluorescence as described in Materials and Methods. Microscopic examination (Fig. 1A) of the control cells (untreated, infected) revealed extensive SARS-CoV-specific immunostaining of the monolayer. A dose-dependant decrease in virus antigen-positive cells was observed starting at 0.1 μ M chloroquine, and concentrations of 10 μ M completely abolished SARS-CoV infection. For quantitative purposes, we counted the number of cells stained positive from three random locations on a slide. The average number of positively stained control cells was scored as 100% and was compared with the number of positive cells observed under various chloroquine concentrations (Fig. 1B). Pretreatment with 0.1, 1, and 10 μ M chloroquine reduced infectivity by 28%, 53%, and 100%, respectively. Reproducible results were obtained from three independent experiments. These data demonstrated that pretreatment of Vero E6 cells with chloroquine rendered these cells refractory to SARS-CoV infection.

Postinfection chloroquine treatment is effective in preventing the spread of SARS-CoV infection

In order to investigate the antiviral properties of chloroquine on SARS-CoV after the initiation of infection, Vero E6 cells were infected with the virus and fresh medium supplemented with various concentrations of chloroquine was added immediately after virus adsorption. Infected cells were incubated for an additional 16-18 h, after which the presence of virus antigens was analyzed by indirect immunofluorescence analysis. When chloroquine was added after the initiation of infection, there was a dramatic dose-dependant decrease in the number of virus antigen-positive cells (Fig. 2A). As little as 0.1-1 μM chloroquine reduced the infection by 50% and up to 90-94% inhibition was observed with 33-100 μM concentrations (Fig. 2 B). At concentrations of chloroquine in excess of 1 μM , only a small number of individual cells were initially infected, and the spread of the infection to adjacent cells was all but eliminated. A half-maximal inhibitory effect was estimated to occur at $4.4 \pm 1.0 \mu\text{M}$ chloroquine (Fig. 2 C). These data clearly show that addition of chloroquine can effectively reduce the establishment of infection and spread of SARS-CoV if the drug is added immediately following virus adsorption.

Electron microscopic analysis indicated the appearance of significant amounts of extracellular virus particles 5-6 h after infection (16). Since we observed antiviral effects by chloroquine immediately after virus adsorption, we further extended the analysis by adding chloroquine 3 and 5 h after virus adsorption and examined for the presence of virus antigens after 20 h. We found that chloroquine was still significantly effective even when added 5 h after infection (Fig. 3); however, to obtain equivalent antiviral effect, a higher concentration of chloroquine was required if the drug was added 3 or 5 h after adsorption.

Ammonium chloride inhibits SARS-CoV infection of Vero E6 cells

Since chloroquine inhibited SARS-CoV infection when added before or after infection, we hypothesized that another common lysosomotropic agent, NH_4Cl , might also

function in a similar manner. Ammonium chloride has been widely used in studies addressing endosome-mediated virus entry. Coincidentally, NH_4Cl was recently shown to reduce the transduction of pseudotype viruses decorated with SARS-CoV spike protein (17, 18). In an attempt to examine if NH_4Cl functions similarly to chloroquine, we performed infection analyses in Vero E6 cells before (Fig. 4A) and after (Fig. 4B) they were treated with various concentrations of NH_4Cl . In both cases, we observed a 93-99% inhibition with NH_4Cl at ≥ 5 mM. These data indicated that NH_4Cl (≥ 5 mM) and chloroquine (≥ 10 μM) are very effective in reducing SARS-CoV infection. These results suggest that effects of chloroquine and NH_4Cl in controlling SARS CoV infection and spread might be mediated by similar mechanism(s).

Effect of chloroquine and NH_4Cl on cell surface expression of ACE2

We performed additional experiments to elucidate the mechanism of SARS-CoV inhibition by chloroquine and NH_4Cl . Since intra-vesicular acidic pH regulates cellular functions, including N-glycosylation trimming, cellular trafficking, and various enzymatic activities, it was of interest to characterize the effect of both drugs on the processing, glycosylation, and cellular sorting of SARS-CoV spike glycoprotein and its receptor, ACE2. Flow cytometry analysis was performed on Vero E6 cells that were either untreated or treated with highly effective anti-SARS-CoV concentrations of chloroquine or NH_4Cl . The results revealed that neither drug caused a significant change in the levels of cell-surface ACE2, indicating that the observed inhibitory effects on SARS-CoV infection are not due to the lack of available cell-surface ACE2 (Fig. 5A). We next analyzed the molecular forms of endogenous ACE2 in untreated Vero E6 cells and in cells that were pre-incubated for 1 h with various concentrations of either NH_4Cl (2.5-10 mM) or chloroquine (1 and 10 μM) and labeled with ^{35}S -(Met) for 3 h in the presence or absence of the drugs (Fig. 5B and C). Under normal conditions, we observed two immunoreactive ACE2 forms, migrating at ~ 105 and ~ 113 kDa, respectively (Fig. 5B, lane 1). The ~ 105 -kDa protein is endoglycosidase H sensitive, suggesting that it represents the endoplasmic reticulum (ER)

localized form, whereas the ~113-kDa protein is endoglycosidase H resistant and represents the Golgi-modified form of ACE2 (19). The specificity of the antibody was confirmed by displacing the immunoreactive protein bands with excess cold-soluble human recombinant ACE2 (+ rhACE2; Fig.5B, lane 2). When we analyzed ACE2 forms in the presence of NH_4Cl , a clear stepwise increase in the migration of the ~113-kDa protein was observed with increasing concentrations of NH_4Cl , with a maximal effect observed at 10 mM NH_4Cl , resulting in only the ER form of ACE2 being visible on the gel (Fig. 5B, compare lanes 3-5). This suggested that the trimming and/or terminal modifications of the N-glycosylated chains of ACE2 were affected by NH_4Cl treatment. In addition, at 10 mM NH_4Cl , the ER form of ACE2 migrated with slightly faster mobility, indicating that NH_4Cl at that concentration might also affect core glycosylation. We also examined the terminal glycosylation status of ACE2 when the cells were treated with chloroquine (Fig. 5C). Similar to NH_4Cl , a stepwise increase in the electrophoretic mobility of ACE2 was observed with increasing concentrations of chloroquine. At 25 μM chloroquine, the faster electrophoretic mobility of the Golgi-modified form of ACE2 was clearly evident. On the basis of the flow cytometry and immunoprecipitation analyses, it can be inferred that NH_4Cl and chloroquine both impaired the terminal glycosylation of ACE2, while NH_4Cl resulted in a more dramatic effect. Although ACE2 is expressed in similar quantities at the cell surface, the variations in its glycosylation status might render the ACE2-SARS-CoV interaction less efficient and inhibit virus entry when the cells are treated with NH_4Cl and chloroquine.

To confirm that ACE2 undergoes terminal sugar modifications and that the terminal glycosylation is affected by NH_4Cl or chloroquine treatment, we performed immunoprecipitation of ^{35}S -labeled ACE2 and subjected the immunoprecipitates to neuraminidase digestion. Proteins were resolved using SDS-PAGE (Fig 5 D). It is evident from the slightly faster mobility of the Golgi form of ACE2 after neuraminidase treatment (Fig 5D, compare lanes 1 and 2), that ACE2 undergoes terminal glycosylation; however, the ER form of ACE2 was not affected by neuraminidase. Cells treated with 10 μM chloroquine did not result in a significant shift; whereas 25 μM chloroquine caused the

Golgi form of ACE2 to resolve similar to the neuraminidase-treated ACE2 (Fig 5D, compare lanes 5 and 6). These data provide evidence that ACE2 undergoes terminal glycosylation and that chloroquine at anti-SARS-CoV concentrations abrogates the process.

Effect of chloroquine and NH₄Cl on the biosynthesis and processing of SARS-CoV spike protein

We next addressed whether the lysomotropic drugs (NH₄Cl and chloroquine) affect the biosynthesis, glycosylation, and/or trafficking of the SARS-CoV spike glycoprotein. For this purpose, Vero E6 cells were infected with SARS-CoV for 18 h. Chloroquine or ammonium chloride was added to these cells during while they were being starved (1 h), labeled (30 min) or chased (3 h). The cell lysates were analyzed by immunoprecipitation with the SARS-specific polyclonal antibody (HMAF). The 30-min pulse results indicated that pro-spike (proS) was synthesized as a ~190-kDa precursor (proS-ER) and processed into ~125-, ~105-, and ~80-kDa proteins (Fig. 6A, lane 2), a result identical to that in our previous analysis (6). Except for the 100 μM chloroquine (Fig. 6A, lane 3), there was no significant difference in the biosynthesis or processing of the virus spike protein in untreated or chloroquine-treated cells (Fig. 6A, lanes 4-6). It should be noted that chloroquine at 100 μM resulted in an overall decrease in biosynthesis and in the levels of processed virus glycoprotein. In view of the lack of reduction in the biosynthesis and processing of the spike glycoprotein in the presence of chloroquine concentrations (10 and 50 μM) that caused large reductions in SARS-CoV replication and spread, we conclude that the antiviral effect is probably not due to alteration of virus glycoprotein biosynthesis and processing. Similar analyses were performed with NH₄Cl, and the data suggested that the biosynthesis and processing of the spike protein were also not negatively affected by NH₄Cl (Fig. 6A, lanes 7-12). Consistent with our previous analysis (6), we observed the presence of a larger protein, which is referred to here as oligomers. Recently, Song et al. (20) provided evidence that these are homotrimers of the SARS-CoV spike protein and were incorporated into the virions. Interestingly, the levels of the homotrimers in cells

treated with 100 μ M chloroquine and 40 and 20 mM NH_4Cl (Fig. 6A, lanes 3, 9, and 10) were slightly lower than in control cells or cells treated with lower drug concentrations.

The data obtained from a 30-min pulse followed by a 3-h chase (Fig. 6B, lanes 2 and 8) confirmed our earlier observation that the SARS-CoV spike protein precursor (proS-ER) acquires Golgi-specific modifications (proS-Golgi) resulting in a ~210-kDa protein (6). Chloroquine at 10, 25, and 50 μ M had no substantial negative impact on the appearance of the Golgi form (Fig. 6B, compare lane 2 to lanes 4-6). Only at 100 μ M chloroquine was a reduction in the level of the Golgi-modified pro-spike observed (lane 3). On the other hand, NH_4Cl abrogated the appearance of Golgi-modified forms at ≥ 10 mM (compare lane 8 with 9-11) and had a milder effect at 1 mM (lane 12). These data clearly demonstrate that the biosynthesis and proteolytic processing of SARS-CoV spike protein are not affected at chloroquine (25 and 50 μ M) and NH_4Cl (1mM) doses that cause virus inhibitory effects. In addition, with 40, 20, and 10 mM NH_4Cl , there was an increased accumulation of proS-ER with a concomitant decrease in the amount of oligomers (Fig. 6B, lanes 9-11). When we examined the homotrimers, we found that chloroquine at 100 μ M and NH_4Cl at 40 and 20 mM resulted in slightly faster mobility of the trimers (Fig. 6B, lanes 3, 9, and 10), but lower drug doses, which did exhibit significant antiviral effects, did not result in appreciable differences. These data suggest that the newly synthesized intracellular spike protein may not be a major target for chloroquine and NH_4Cl antiviral action. The faster mobility of the trimer at certain higher concentration of the drugs might be due the effect of these drugs on the terminal glycosylation of the trimers.

DISCUSSION

We have identified chloroquine as an effective antiviral agent for SARS-CoV in cell culture conditions, as evidenced by its inhibitory effect when the drug was added prior to infection or after the initiation and establishment of infection. The fact that chloroquine exerts an antiviral effect during pre- and post-infection conditions suggest that it is likely to have both prophylactic and therapeutic advantages. Recently, Keyaerts et al. (21) reported

the antiviral properties of chloroquine and identified that the drug affects SARS-CoV replication in cell culture, as evidenced by quantitative RT-PCR. Taken together with the findings of Keyaerts et al. (21), our analysis provides further evidence that chloroquine is effective against SARS-CoV Frankfurt and Urbani strains. We have provided evidence that chloroquine is effective in preventing SARS-CoV infection in cell culture if the drug is added to the cells 24 h prior to infection. In addition, chloroquine was significantly effective even when the drug was added 3-5 h after infection, suggesting an antiviral effect even after the establishment of infection. Since similar results were obtained by NH_4Cl treatment of Vero E6 cells, the underlying mechanism(s) of action of these drugs might be similar.

Apart from the probable role of chloroquine on SARS-CoV replication, the mechanisms of action of chloroquine on SARS-CoV are not fully understood. Previous studies have suggested the elevation of pH as a mechanism by which chloroquine reduces the transduction of SARS-CoV pseudotype viruses (17, 18). We examined the effect of chloroquine and NH_4Cl on the SARS-CoV spike proteins and on its receptor, ACE2. Immunoprecipitation results of ACE2 clearly demonstrated that effective anti-SARS-CoV concentrations of chloroquine and NH_4Cl also impaired the terminal glycosylation of ACE2. However, the flow cytometry data demonstrated that there are no significant differences in the cell surface expression of ACE2 in cells treated with chloroquine or NH_4Cl . On the basis of these results, it is reasonable to suggest that the pre-treatment with NH_4Cl or chloroquine has possibly resulted in the surface expression of the underglycosylated ACE2. In the case of chloroquine treatment prior to infection, the impairment of terminal glycosylation of ACE2 may result in reduced binding affinities between ACE2 and SARS-CoV spike protein and negatively influence the initiation of SARS-CoV infection. Since the biosynthesis, processing, Golgi modification, and oligomerization of the newly synthesized spike protein were not appreciably affected by anti-SARS-CoV concentrations of either chloroquine or NH_4Cl , we conclude that these events occur in the cell independent of the presence of the drugs. The potential contribution of these drugs in the elevation of endosomal pH and its impact on subsequent virus entry or exit could not be

ruled out. A decrease in SARS-CoV pseudotype transduction in the presence of NH_4Cl was observed and was attributed to the effect on intracellular pH (17, 18). When chloroquine or NH_4Cl are added after infection, these agents can rapidly raise the pH and subvert on-going fusion events between virus and endosomes, thus inhibiting the infection.

In addition, the mechanism of action of NH_4Cl and chloroquine might depend on when they were added to the cells. When added after the initiation of infection, these drugs might affect the endosome-mediated fusion, subsequent virus replication, or assembly and release. Previous studies of chloroquine have demonstrated that it has multiple effects on mammalian cells in addition to the elevation of endosomal pH, including the prevention of terminal glycosylation of immunoglobulins (22). When added to virus-infected cells, chloroquine inhibited later stages in vesicular stomatitis virus maturation by inhibiting the glycoprotein expression at the cell surface (23), and it inhibited the production of infectious HIV-1 particles by interfering with terminal glycosylation of the glycoprotein (24, 25). On the basis of these properties, we suggest that the cell surface expression of underglycosylated ACE2 and its poor affinity to SARS-CoV spike protein may be the primary mechanism by which infection is prevented by drug pretreatment of cells prior to infection. On the other hand, rapid elevation of endosomal pH and abrogation of virus-endosome fusion may be the primary mechanism by which virus infection is prevented under post-treatment conditions. More detailed SARS CoV spike-ACE2 binding assays in the presence or absence of chloroquine will be performed to confirm our findings. Our studies indicate that the impact of NH_4Cl and chloroquine on the ACE2 and spike protein profiles are significantly different. NH_4Cl exhibits a more pronounced effect than does chloroquine on terminal glycosylation, highlighting the novel intricate differences between chloroquine and ammonium chloride in affecting the protein transport or glycosylation of SARS-CoV spike protein and its receptor, ACE2, despite their well-established similar effects of endosomal pH elevation.

The infectivity of coronaviruses other than SARS-CoV are also affected by chloroquine, as exemplified by the human CoV-229E (15). The inhibitory effects observed on SARS-CoV infectivity and cell spread occurred in the presence of 1-10 μM chloroquine,

which are plasma concentrations achievable during the prophylaxis and treatment of malaria (varying from 1.6-12.5 μM) (26) and hence are well tolerated by patients. It recently was speculated that chloroquine might be effective against SARS and the authors suggested that this compound might block the production of TNF α , IL6, or IFN β 1. Our data provide evidence for the possibility of using the well-established drug chloroquine in the clinical management of SARS.

CONCLUSIONS

Chloroquine, a relatively safe, effective and cheap drug used for treating many human diseases including malaria, amoebiasis and human immunodeficiency virus is effective in inhibiting the infection and spread of SARS CoV in cell culture. The fact that the drug has significant inhibitory antiviral effect when the susceptible cells were treated either prior to or after infection suggests a possible prophylactic and therapeutic use.

METHODS

SARS-CoV infection, immunofluorescence, and immunoprecipitation analyses

Vero E6 cells (an African green monkey kidney cell line) were infected with SARS-CoV (Urbani strain) at a multiplicity of infection of 0.5 for 1 h. The cells were washed with PBS and then incubated in OPTI-MEM (Invitrogen) medium with or without various concentrations of either chloroquine or NH $_4$ Cl (both from Sigma). Immunofluorescence staining was performed with SARS-CoV-specific hyperimmune mouse ascitic fluid (HMAF) (8) followed by anti-mouse fluorescein-coupled antibody.

Eighteen hours after infection, the virus-containing supernatants were removed, and the cells were pulsed with ^{35}S -(Cys) for 30 min and chased for 3 h before lysis in RIPA buffer. Clarified cell lysates and media were incubated with HMAF, and immunoprecipitated proteins were separated by 3-8% NuPAGE gel (Invitrogen); proteins were visualized by autoradiography. In some experiments, cells were chased for 3 h with

isotope-free medium. Clarified cell supernatants were also immunoprecipitated with SARS-CoV-specific HMAF.

ACE2 flow cytometry analysis and biosynthesis

Vero E6 cells were seeded in Dulbecco's modified Eagle medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum. The next day, the cells were incubated in Opti-MEM (Invitrogen) in the presence or absence of 10 μ M chloroquine or 20 mM NH_4Cl . To analyze the levels of ACE2 at the cell surface, cells were incubated on ice with 10 μ g/mL affinity-purified goat anti-ACE2 antibody (R&D Systems) and then incubated with FITC-labeled swine anti-goat IgG antibody (Caltag Laboratories). Labeled cells were analyzed by flow cytometry with a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). For ACE2 biosynthesis studies, Vero E6 cells were pulsed with 250 μ Ci ^{35}S -(Met) (Perkin Elmer) for 3 h with the indicated concentrations of chloroquine or NH_4Cl and then lysed in RIPA buffer. Clarified lysates were immunoprecipitated with an affinity-purified goat anti-ACE2 antibody (R&D systems), and the immunoprecipitated proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

MV did all the experiments pertaining to SARS CoV infection and coordinated the drafting of the manuscript. EB and SB performed experiments on ACE2 biosynthesis and FACS analysis. BE performed data acquisition from the immunofluorescence experiments. PR and TK provided critical reagents and revised the manuscript critically. NG and SN along with MV and EB participated in the planning of the experiments, review and interpretation of data and critical review of the manuscript. All authors read and approved the content of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Claudia Chesley and Jonathan Towner for critical reading of the manuscript. This work was supported by a Canadian PENCE grant (T3), CIHR group grant #MGC 64518, and CIHR grant #MGP-44363 (to NGS).

REFERENCES

1. Ksiazek TG, Erdman, D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarner J, Paddock CD, Rota P, B. Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox N. Hughes J, LeDuc JW, Bellini, WJ, Anderson, LJ and SARS Working Group. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N.Engl .J. Med.* 2003, 348: 1953-1966
2. Marra, M.A., Jones SJ, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YS, Khattri J, Asano JK, Barber SA, Chan SY, Cloutier A, Coughlin SM, Freeman D, Girm N, Griffith OL, Leach SR, Mayo, H. McDonald, S. B. Montgomery, P. K. Pandoh, A. S. Petrescu, A. G. Robertson, J. E. Schein, A. Siddiqui, D. E. Smailus, J. M. Stott, G. S. Yang, F. Plummer, A. Andonov, H. Artsob, N. Bastien, K. Bernard, T. F. Booth, D. Bowness, M. Czub, M. Drebot, L. Fernando, R. Flick, M. Garbutt, M. Gray, A. Grolla, S. Jones, H. Feldmann, A. Meyers, A. Kabani, Y. Li, S. Normand, U. Stroher, G. A. Tipples, S. Tyler, R. Vogrig, D. Ward, B. Watson, R. C. Brunham, M. Krajden, M. Petric, D. M. Skowronski, C. Upton, and R. L. Roper, R.L The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 2003, 300: 1399-1404.
3. Rota, P.A., M. S. Oberste, S. S. Monroe, W. A. Nix, R. Campagnoli, J. P. Icenogle, S. Penaranda, B. Bankamp, K. Maher, M. H. Chen, S. Tong, A. Tamin, L. Lowe, M. Frace, J. L. DeRisi, Q. Chen, D. Wang, D. D. Erdman, T. C. Peret, C. Burns, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, A. Sanchez, S. Liffick, B. Holloway, J. Limor, K. McCaustland, M. Olsen-Rasmussen, R. Fouchier, S. Gunther, A. S. Osterhaus, C. Drosten, C, M. A. Pallansch, L. J. Anderson, and Bellini, W.J. (2003)

- Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*, 2003, 300:1394-1399.
4. Ng, M. L., S. H. Tan, E. E. See, E. E. Ooi, and A. E. Ling. Proliferative growth of SARS coronavirus in Vero E6 cells. *J.Gen.Virol.* 2003, 84: 3291-3303.
 5. Li, W., M. J. Moore, N. Vasilieva, J. Sui, S. K. Wong, M. A. Berne, M. Somasundaran, J. L. Sullivan, K. Luzuriaga, T. C. Greenough, H. Choe, and M. Farzan. (2003) Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 426: 450-454.
 6. Bergeron, E., M. J. Vincent, L. Wickham, J. Hamelin, A. Basak, S.T. Nichol, M. Chrétien and N.G. Seidah.. Implication of proprotein convertases in the processing and spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2005, 326: 554-563.
 7. Zhang, Y., Li, T, Fu, L, Yu, C, Li, Y, Xu, X, Wang, Y, Ning, H, Zhang, S, Chen, W, Babiuk, L.A, and Chang, Z. Silencing SARS-CoV spike protein expression in cultured cells by RNA interference. *FEBS Lett.* 2004, 560: 141-146.
 8. Subbarao, K., McAuliffe, J, Vogel, L, Fahle, G, Fischer, S, Tatti, K, Packard, M, Shieh, W. J, Zaki, S, and Murphy, B. Prior infection and passive transfer of neutralizing antibody prevent replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus in the respiratory tract of mice. *J.Virol.* 2004, 78: 3572-3577.
 9. Yang, Z.Y., Kong, W. P, Huang, Y, Roberts, A, Murphy, B.R, Subbarao, K, and Nabel, G.J. A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature* 2004, 428: 561-564.
 10. Bisht, H., A. Roberts, L. Vogel, A. Bukreyev, P. L. Collins, B. R. Murphy, K. Subbarao, and Moss. B. Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004, 101: 6641-6646.
 11. Bukreyev, A., E. W. Lamirande, U. J. Buchholz, L. N. Vogel, W. R. Elkins, M. St. Claire, B. R. Murphy, K. Subbarao, and Collins, P. L. Mucosal immunization of African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) with an attenuated parainfluenza

- virus expressing the SARS coronavirus spike protein for the prevention of SARS. *Lancet*. 2004, 363: 2122-2127.
12. Sainz B Jr, Mossel E.C, Peters C.J, Garry, R.F. Interferon-beta and interferon-gamma synergistically inhibit the replication of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) *Virology*.2004, 329:11-17.
 13. Stroher, U., DiCaro, A, Li, Y, Strong, J.E, Aoki, F, Plummer, F, Jones, S.M, and Feldmann, H. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus is inhibited by interferon- alpha. *J.Infect.Dis*. 2004, 189: 1164-1167.
 14. Sui, J., Li, W., Murakami, A, Tamin, A, Matthews, L.J, Wong, S.K, Moore, M.J, Tallarico, A.S, Olurinde, M, Choe, H, Anderson, L.J, Bellini, W.J, Farzan, M, and Marasco, W.A. Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004, 101: 2536-2541.
 15. Savarino, A., J. R. Boelaert, A. Cassone, G. Majori, and R. Cauda. Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases? *Lancet Infect.Dis*. 2003, 3: 722-727.
 16. Ng, M, L., S. H. Tan, E. E. See, E. E. Ooi, and A. E. Ling. Early events of SARS coronavirus infection in vero cells. *J.Med.Virol*. 2003, 71: 323-331.
 17. Simmons, G., Reeves, J.D, Rennekamp, A.J, Amberg, S.M, Piefer, A.J, and Bates, P. Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004, 101, 4240-4245.
 18. Yang, Z.Y., Huang, Y, Ganesh, L, Leung, K, Kong, W.P, Schwartz, O, Subbarao, K., and Nabel, G. J. pH-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus is mediated by the spike glycoprotein and enhanced by dendritic cell transfer through DC-SIGN. *J.Virol*. 2004, 78: 5642-5650.
 19. Tipnis, S.R., Hooper, N.M, Hyde, R, Karran, E, Christie, G, and Turner, A.J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J.Biol.Chem*. 2000, 275: 33238-33243.

20. Song, H.C., Seo, M.Y, Stadler, K, Yoo, B.J, Choo, Q.L, Coates, S.R, Uematsu, Y, Harada, T, Greer, C.E, Polo, J.M, Pileri, P, Eickmann, M, Rappuoli, R. Abrignani, S, Houghton, M, and Han, J.H. Synthesis and characterization of a native, oligomeric form of recombinant severe acute respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein. *J Virol.* 2004, 78: 10328-10335.
21. Keyaerts, E., L. Vijgen, P. Maes, J. Neyts, and M. V. Ranst. In vitro inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus by chloroquine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004, 323: 264-268.
22. Thorens, B. and Vassalli, P. Chloroquine and ammonium chloride prevent terminal glycosylation of immunoglobulins in plasma cells without affecting secretion. *Nature* 1986, 321: 618-620.
23. Dille, B.J., and T. C. Johnson. Inhibition of vesicular stomatitis virus glycoprotein expression by chloroquine. *J Gen Virol.* 1982, 62: 91-103.
24. Tsai, W.P., Nara, P.L, Kung, H.F, and Oroszlan, S. Inhibition of human immunodeficiency virus infectivity by chloroquine. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1990, 6: 481-489.
25. Savarino, A., M. B. Lucia, E. Rastrelli, S. Rutella, C. Golotta, E. Morra, E. E. Tamburrini, C. F. Perno, J. R. Boelaert, K. Sperber, R. C. Cauda. Anti-HIV effects of chloroquine: inhibition of viral particle glycosylation and synergism with protease inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004, 35: 223-232.
26. Ducharme, J. and R. Farinotti. Clinical pharmacokinetics and metabolism of chloroquine. Focus on recent advancements. *Clin.Pharmacokinet.* 1996, 31, 257-274

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Prophylactic effect of chloroquine

Vero E6 cells pre-treated with chloroquine for 20 hrs. Chloroquine-containing media were removed and the cells were washed with phosphate buffered saline before they were

infected with SARS-CoV (0.5 multiplicity of infection) for 1 h. in the absence of chloroquine. Virus was then removed and the cells were maintained in Opti-MEM (Invitrogen) for 16-18 h in the absence of chloroquine. SARS-CoV antigens were stained with virus-specific HMAF, followed by FITC-conjugated secondary antibodies. **(A)** The concentration of chloroquine used is indicated on the top of each panel. **(B)** SARS-CoV antigen-positive cells at three random locations were captured by using a digital camera, the number of antigen-positive cells was determined, and the average inhibition was calculated. Percent inhibition was obtained by considering the untreated control as 0% inhibition. The vertical bars represent the range of SEM.

Figure 2. Post-infection chloroquine treatment reduces SARS-CoV infection and spread

Vero E6 cells were seeded and infected as described for Fig. 1 except that chloroquine was added only after virus adsorption. Cells were maintained in Opti-MEM (Invitrogen) containing chloroquine for 16-18 h, after which they were processed for immunofluorescence. **(A)** The concentration of chloroquine is indicated on the top. **(B)** Percent inhibition and SEM were calculated as in Fig. 1B. **(C)** The effective dose (ED_{50}) was calculated using commercially available software (Grafit, version 4, Erithacus Software).

Figure 3. Timed post-infection treatment with chloroquine

This experiment is similar to that depicted in Fig. 2 except that cells were infected at 1 multiplicity of infection, and chloroquine (10, 25, and 50 μ M) was added 3 or 5 h after infection.

Figure 4. NH_4Cl inhibits SARS-CoV during pre or post infection treatment

NH_4Cl was added to the cells either before **(A)** or after **(B)** infection, similar to what was done for chloroquine in Figs 1 and 2. Antigen-positive cells were counted, and the results were presented as in Fig. 1B.

Figure 5. Effect of lysomotropic agents on the cell-surface expression and biosynthesis of ACE2

(A) Vero E6 cells were cultured for 20 h in the absence (control) or presence of chloroquine (10 μ M) or NH_4Cl (20 mM). Cells were labeled with anti-ACE2 (grey histogram) or with a secondary antibody alone (white histogram). (B) Biosynthesis of ACE2 in untreated cells or in cells treated with NH_4Cl . Vero E6 cells were pulse-labeled for 3 h with ^{35}S -Met, and the cell lysates were immunoprecipitated with an ACE2 antibody (lane 1). Preincubation of the antibody with recombinant human ACE2 (rhACE2) completely abolished the signal (lane 2). The positions of the endoglycosidase H-sensitive ER form and the endoglycosidase H-resistant Golgi form of ACE2 are emphasized. Note that the increasing concentration of NH_4Cl resulting in the decrease of the Golgi form of ACE2. (C) A similar experiment was performed in the presence of the indicated concentrations of chloroquine. Note the loss of terminal glycans with increasing concentrations of chloroquine. (D) The terminal glycosidic modification of ACE2 was evaluated by neuraminidase treatment of immunoprecipitated ACE2. Here cells were treated with 1-25 μ M concentrations of chloroquine during starvation, pulse, and 3-h chase.

Figure 6. Effects of NH_4Cl and chloroquine (CQ) on the biosynthesis, processing, and glycosylation of SARS-CoV spike protein

Vero E6 cells were infected with SARS-CoV as described in Fig.2. CQ or NH_4Cl was added during the periods of starvation (1 h) and labeling (30 min) with ^{35}S -Cys and followed by chase for 3 h in the presence of unlabeled medium. Cells were lysed in RIPA buffer and immunoprecipitated with HMAF. Virus proteins were resolved using 3-8% NuPAGE gel (Invitrogen). The cells presented were labeled for 30 min (A) and chased for 3 h (B). The migration positions of the various spike molecular forms are indicated at the right side, and those of the molecular standards are shown to the left side. proS-ER and

proS-Golgi are the pro-spike of SARS-Co in the ER and Golgi compartments, respectively and proS-ungly is the unglycosylated pro-spike ER.

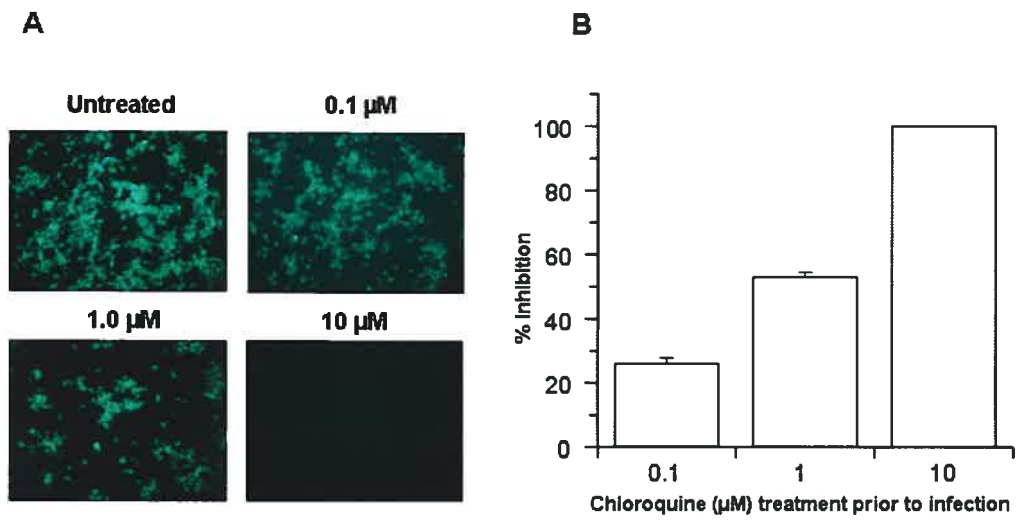


Figure 1

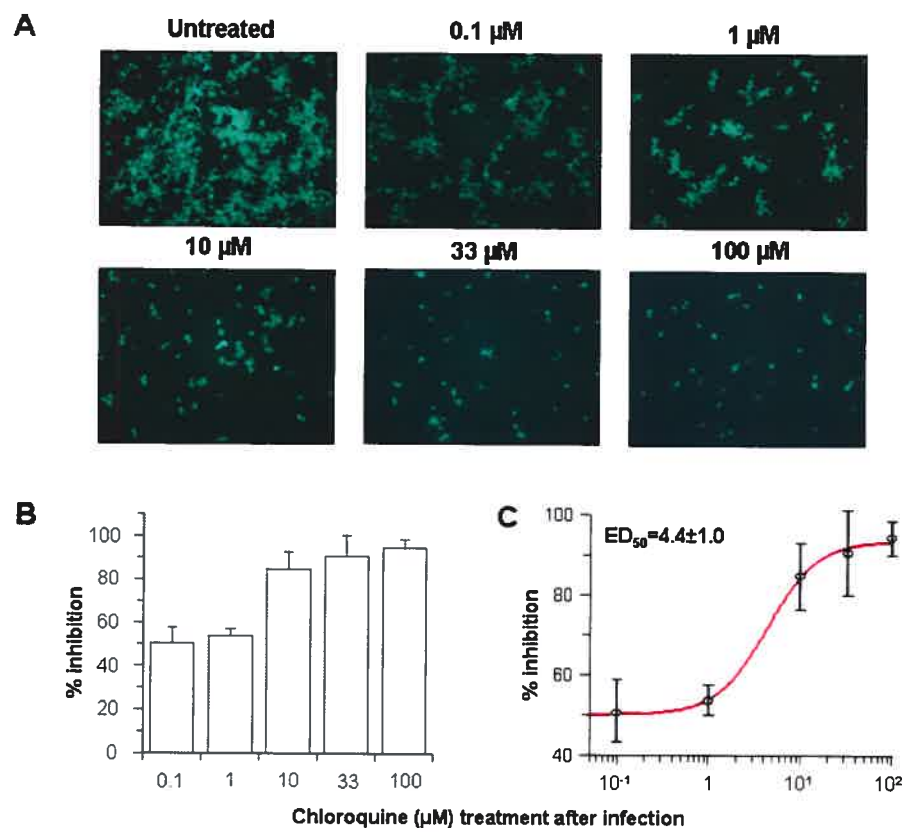


Figure 2

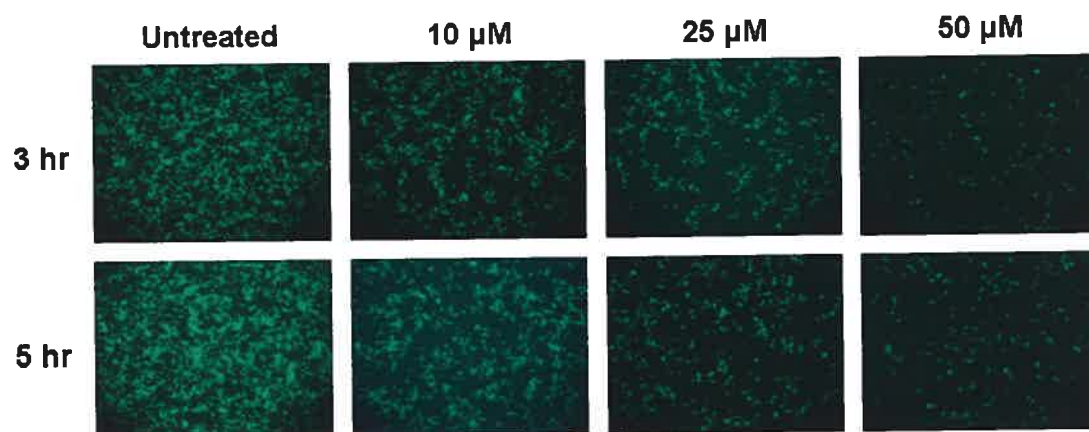
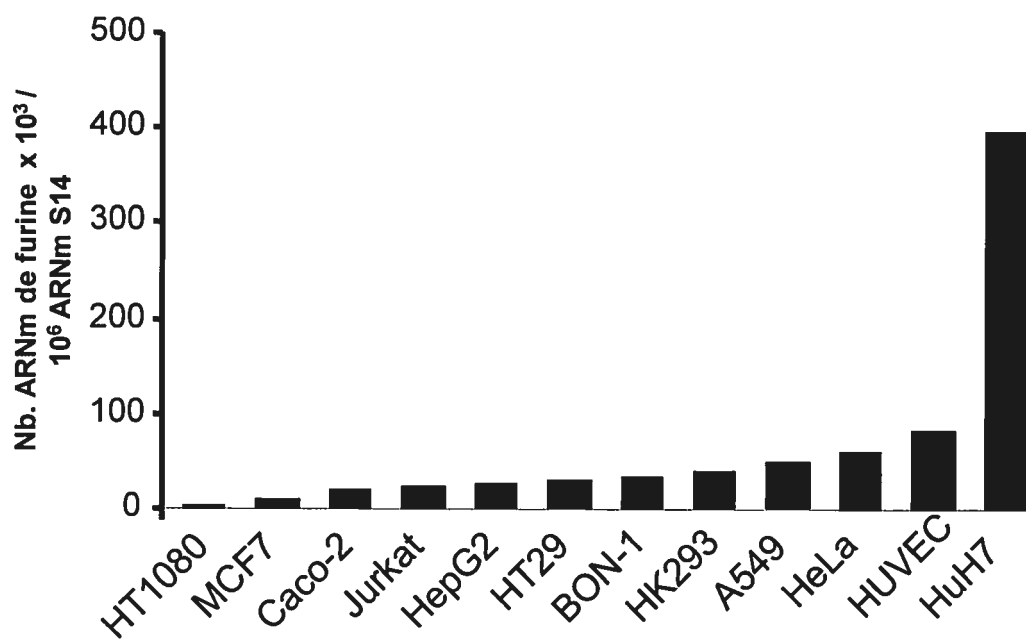


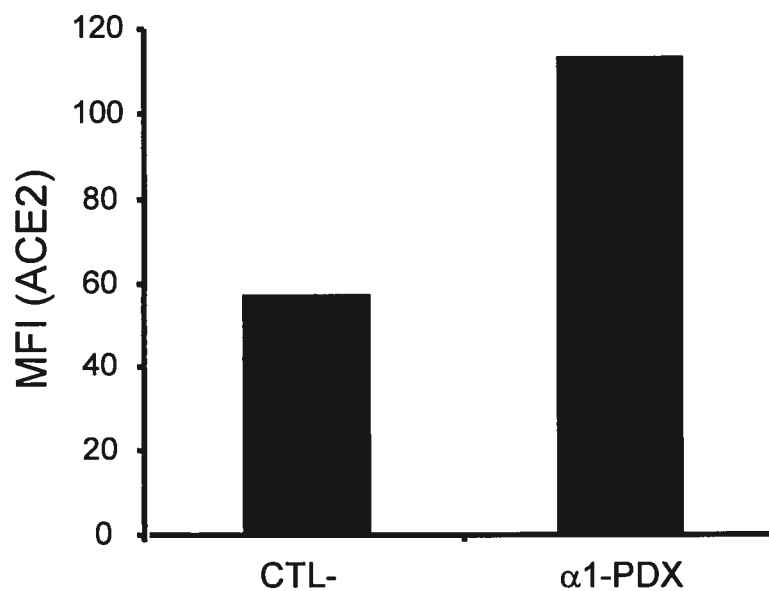
Figure 3

Annexe 2 : L'expression de la furine dans différentes lignées cellulaires



Les niveaux normalisés d'ARNm de furine ont été déterminés par PCR quantitative.

Annexe 3 : L' α 1-PDX augmente l'expression de l'ACE2 à la surface cellulaire des cellules Vero E6



La surface cellulaire des transfectants stables Vero E6 ont été marqué avec un anticorps ACE2 tel que décrit dans l'annexe 1. Les moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) de l'ACE2 ont été déterminées par cytométrie de flux.



