



**HAL**  
open science

# Etude de l'hétérogénéité et de la maturation de la thyroperoxydase humaine

Valerie Le Fourn

► **To cite this version:**

Valerie Le Fourn. Etude de l'hétérogénéité et de la maturation de la thyroperoxydase humaine. Biochimie [q-bio.BM]. Université de la Méditerranée - Aix-Marseille II, 2005. Français. NNT : . tel-00310978

**HAL Id: tel-00310978**

**<https://theses.hal.science/tel-00310978>**

Submitted on 12 Aug 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**DOCTORAT**  
**DE L'UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE**

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

**ETUDE DE L'HETEROGENEITE**  
**ET DE LA MATURATION DE**  
**LA THYROPEROXYDASE HUMAINE**

THESE

Présentée par

**Valérie LE FOURN**

Pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences  
de l'Université d'Aix-Marseille II

Spécialité : Biologie des Eucaryotes

Soutenue le 27 octobre 2005 devant le jury suivant :

Président	Prof. Alain ENJALBERT, UMR6544	Aix-Marseille II
Rapporteur	Dr. Jean-Michel VERDIER, INSERM 710	Montpellier II
Rapporteur	Dr. Corinne DUPUY, INSERM 486	Université Paris XI
Examineur	Dr. Raymond MIQUELIS, FRE2738	Aix-Marseille II
Examineur	Dr. Daniel GROS, UMR6545	Aix-Marseille II
Directeur de thèse	Dr. Jean-Louis FRANC, UMR6544	Aix-Marseille II

*A ma sœur, Céline,  
Mon alliée et mon cœur,  
Pour ce que les mots ne peuvent dire,*

*A tous ceux qui de près ou de loin, en actes ou en pensées,  
ont soutenu mes efforts et se sont souvent efforcés de me  
soutenir dans les moments de doute.*

*Ils se reconnaîtront sans mal, Maman, Papa, Soffiane...*

*«Et si la vie n'est qu'un vaste contrôle de qualité où chaque  
checkpoint peut être fatal, j'espère croiser autant, sinon plus  
de «chaperons» et de «catalyseurs» bienveillants que ma  
partenaire de jeu, la thyroperoxydase...»*

Je tiens à remercier tout d'abord le Professeur Alain ENJALBERT et l'ensemble du laboratoire I.C.N.E, UMR6544 CNRS, de la Faculté de Médecine Nord de Marseille, pour m'avoir accueillie en cours de thèse et pour avoir soutenu mes projets de financements.

J'adresse mes remerciements au Docteur Corinne DUPUY et au Docteur Jean-Michel VERDIER pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse.

Je remercie également le Docteur Raymond MIQUELIS et le Docteur Daniel GROS pour avoir accepté d'examiner mes travaux.

*Je voudrais à présent exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse le Docteur Jean-Louis FRANÇ. Je te remercie de m'avoir apporté toutes tes connaissances et tes compétences scientifiques pendant ces quatre années et de l'avoir fait avec autant de confiance et de patience...*

*Merci également pour tes critiques constructives et tes coups de gueule...rares mais salutaires. Enfin, je te remercie d'avoir toujours été disponible et à l'écoute de tous mes petits maux de labo et de tous mes grands maux de la vie.*

*Nos discussions et tes conseils me suivent...*

*Je tiens à faire part de toute ma gratitude à Mme Mireille FERRAND pour avoir largement participé à ce travail et partagé les bons comme les pires moments que la vie de laboratoire a mis sur notre chemin. Alors merci d'avoir partagé un bout de vie avec moi et un coin de torchon quand il faisait noir dans «le fond du placard» mais surtout merci pour tes fous rires et ton caractère ...sans pareils...et bien plus encore.*

Je remercie Mme Jeanne LANNET qui m'a donné de son temps et de ses compétences techniques durant les premières années de ma thèse.

Je remercie, bien entendu, tous les membres du laboratoire ICNE, des plus agréables et sociables aux plus changeants et...hum...singuliers... pour avoir contribué à créer une vie de laboratoire que je n'avais pas eu la chance de connaître jusque-là. Merci pour les bouts de paillasse et les spatules partagés ou disputés (!), les deux tonnes de vaisselle toujours nickel, les conseils en informatique qui me permettent de « négocier » avec mon ordi avec sérénité ou presque (!)... Merci pour ce souffle et ces leçons de vie...

Je remercie Stéphanie et Joanna, et Nicolas, pour avoir partagé repas, discussions sans fin et morceaux de Vie en tout genre...

Je remercie l'A.D.E.R.E..M. et la Fondation pour la Recherche Médicale ainsi que le comité d'organisation des Journées Scientifiques de l'IFR Jean-Roche pour leur soutien financier.



<b>ABBREVIATIONS</b> .....	1
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	2

## Partie I

### **LE CONTROLE DE QUALITE DE LA VOIE DE SECRETION DE LA CELLULE : MATURATION ET DEGRADATION DES PROTEINES**

<b>I. La voie de sécrétion: du réticulum endoplasmique à la surface cellulaire</b> .....	2
I.1. Les différents compartiments de la voie de sécrétion .....	2
I.2. La synthèse, le repliement et les modifications co- et post-traductionnelles des protéines de la voie de sécrétion.....	4
A. La synthèse et la translocation des protéines dans le RE.....	4
B. Le repliement des protéines.....	5
a. La structure des protéines.....	5
b. Les mécanismes de repliement des protéines.....	6
C. Les modifications co- et post-traductionnelles des protéines.....	10
a. La formation des ponts disulfures.....	10
b. La N-glycosylation.....	11
I.3. Le trafic intracellulaire à travers la de la voie de sécrétion .....	14
A. Le trafic antérograde et rétrograde des protéines .....	14
B. La sélection des protéines.....	15
<b>II. Le contrôle de qualité des protéines de la voie de sécrétion</b> .....	17
II.1. Généralités.....	17
II.2. Les acteurs du contrôle de qualité des protéines.....	18
A. La protéine BiP.....	18
B. Les lectines : la calnexine et la calreticuline.....	22
C. La grp94.....	26
D. La famille des protéines disulfure isomérase.....	27

II.3. La sélection des substrats du contrôle de qualité du RE.....	30
A. Action concertée et séquentielle des chaperons.....	30
B. Les facteurs intrinsèques aux protéines intervenant dans le CQ.....	32
D. Ségrégation et interdépendance des mécanismes de repliement et de dégradation.....	34
II.4. Les mécanismes de dégradation associés au contrôle de qualité du RE.....	35
A. La dégradation par le protéasome.....	36
a. La retranslocation des protéines.....	36
b. L'ubiquitinylation.....	36
c. Le complexe 26S du protéasome.....	38
B. Les voies de dégradation alternatives : les protéases du RE.....	39
 <b>III. La protéolyse limitée des précurseurs protéiques</b> .....	41
III.1. Généralités.....	41
III.2. Une famille d'endoprotéases : la famille des convertases.....	42
B. Les caractéristiques structurales des PCs.....	42
C. La localisation tissulaire et cellulaire.....	44
D. La synthèse et l'activation des PCs.....	46
E. Les substrats des convertases.....	49
a. Les moyens d'études des PCs.....	49
b. Les divers substrats des PCs.....	52
III.3. Le rôle des régions propeptidiques.....	58
A. Les propeptides intervenant dans le mécanisme de repliement des protéines ...	59
a. Le mécanisme d'action moléculaire des propeptides.....	59
b. Les caractéristiques structurales des propeptides .....	60
B. Le rôle des propeptides dans la stabilité et la dégradation des protéines.....	63
a. L'implication des prorégions dans la stabilité des protéines.....	64
b. Les propeptides et le système de dégradation des protéines incorrectement maturées .....	65
C. Les propeptides responsables du trafic intracellulaire des protéines.....	67

**Partie II**  
**LA THYROÏDE**

<b>I. L'hormonosynthèse thyroïdienne.....</b>	<b>71</b>
I.1. La glande thyroïdienne.....	71
I.2. La concentration et le transport de l'iode.....	73
I.3. Le système de génération de l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	75
I.4. Le support des hormones thyroïdiennes : la thyroglobuline.....	76
I.5. Le mécanisme d'iodation de la Tg.....	78
A. L'iodation des tyrosines et couplage des iodo- et diiodotyrosines de la Tg.....	78
B. Le stockage de la Tg iodée.....	82
C. L'internalisation de la Tg.....	82
D. La protéolyse de la thyroglobuline et la sécrétion des hormones thyroïdiennes.....	82
<b>II. La thyroperoxydase humaine.....</b>	<b>89</b>
II.1. Le gène de la TPO .....	90
A. Le clonage et la structure du gène.....	90
B. La régulation de la transcription.....	90
II.2. La TPO-1, la TPO-2 et la TPO Zanelli ou TPO-3.....	91
A. Les différents transcrits de la thyroperoxydase.....	91
B. L'expression des différents transcrits et des isoformes protéiques correspondantes.....	93
II.3. La biosynthèse de la thyroperoxydase humaine.....	94
A. La structure de la thyroperoxydase.....	94
B. La localisation cellulaire de la TPO.....	97
C. Les modifications post-traductionnelles thyroperoxydase.....	98
a. La fixation de l'hème.....	98
b. La N-glycosylation de la thyroperoxydase.....	99
D. La maturation et la dégradation de la thyroperoxydase humaine.....	101
a. Le repliement correct de la thyroperoxydase.....	101
b. Les différentes voies de dégradation de la TPO.....	102

### **Partie III :**

#### **RESULTATS ET ARTICLES**

<b>Introduction aux articles I et II</b> .....	105
I. Les mécanismes d'épissage des ARN messagers précurseurs.....	105
II. Le rôle de l'épissage alternatif .....	109
III. La dérégulation de l'expression génétique lors de la tumorigénèse thyroïdienne.....	113
<i>« Increasing diversity of human thyroperoxydase generated by alternative splicing. Characterization by molecular cloning of new transcripts with single-and multi-spliced mRNAs »</i>	
Conclusion de l'article I.....	119
<i>« Differential expression of Thyroperoxidase mRNA splice variants in human thyroid tumors »</i>	
Conclusion de l'article II.....	122
<b>Introduction à l'article III</b> .....	123
<i>« Endoproteolytic cleavage of human thyroperoxydase. Role of the propeptide in the protein folding process »</i>	
Conclusion de l'article III.....	125
<b>Introduction à l'article IV</b> .....	127
<i>« Competition between calnexin and BiP can lead to the folding or degradation of human thyroperoxidase »</i>	
Conclusion de l'article IV.....	129

### **Partie IV**

#### **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

I. Recherche des différents transcrits issus de l'épissage alternatif de la thyroperoxydase humaine.....	130
II. L'épissage alternatif de la TPO dans les cancers thyroïdiens.....	131
III. Le clivage du propeptide de la TPO dans les cellules CHO et dans la thyroïde.....	134
IV. Mise en évidence des isoformes de la TPO exprimées dans la thyroïde .....	137
V. Recherche et étude du rôle des partenaires moléculaires du RE intervenant dans le processus de repliement et de dégradation de la TPO.....	137
VI. Etude du rôle respectif des 4 sites potentiels de glycosylation de la TPO.....	139
VII. Identification des protéases du RE impliquées dans la dégradation de la TPO.....	140

#### **BIBLIOGRAPHIE**

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADNc : acide désoxyribnucléique complémentaire	IMCs: <i>intramolecular chaperons</i>
AIT : <i>apical iodure transport</i>	LPH: lipoprotéine humaine
ARNm: acide ridonucléique messenger	LPO: lactoperoxydase
BDNF: <i>brain-derived neurotrophic factor</i>	mAb : <i>monoclonal antibody</i>
BFA: brefeldine A	MIT: monoiodotyrosine
BiP: <i>binbing immunoglobulin protein</i>	MMPs : <i>matrix metalloproteinases</i>
C4b: protéine 4b du complement	MPO : myéloperoxydase
CFTR: <i>cystic fibrosis transmembrane conductance factor</i>	MT-MMPs : <i>membrane type-matrix metalloproteinases</i>
CHO: <i>chinese hamster ovary</i>	NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
CMH; complexe majeur d'histo compatibilité	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase : pompe à sodium et potassium
COP: <i>coated protein</i>	NIS : <i>Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter</i>
CNX: calnexine	PCs : protéines convertases
CPY: carboxypeptidase de levure	PDI : protéine disulfure isomerase
CQ: controle de qualité	PNGase F : peptide-N-glycanase F
CRT:calreticuline	PTB : <i>polypyrimidine tract binding (protein)</i>
CST: castanospermine	Pu : purine
DIT: diiodotyrosine	Py : pyrimidine
DTT: dithiothréitol	RE : réticulum endoplasmique
EDEM: <i>ER degradation enhancing [̢]-mannosidase-like protein</i>	SCD : <i>stéaroyl-CoA désaturase</i>
EGF: <i>epidermal growth factor</i>	SDS-PAGE : électrophorèse en gel d'acrylamide en SDS (sodium dodécyl sulfate)
Endo H: endo- $\beta$ -N-acétyl glucosaminidase H	snRNPs : <i>small nuclear ribonucleoproteins</i>
ERAD: <i>endoplasmic reticulum associated degradation</i>	SRP et R-SRP: <i>signal recognition particle and receptor</i>
ERGIC: <i>endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment</i>	SRp : <i>splicing regulator protein</i>
FAD: flavine adenine dinucléotide	T3 : 3,5,3', triiodothyronine
FMN: flavine mononucléotide	T4 : 3,5,3',5'-tétraiodothyronine
FRTL-5: <i>fisher rat thyroid cell line 5</i>	Tg : thyroglobuline
GlcNac: N-acétylglucosamine	TGFs: <i>transforming growth factors</i>
GTP: guanidine triphosphate	TGN: <i>trans-Golgi network</i>
Grp: <i>glucose regulated protein</i>	THOX/DUOX: NADPH oxydoréductases thyroïdiennes
HA: hemagglutinine du virus influenza	TPO: thyroperoxydase
hnRNPs: <i>heterologous nuclear ribonucleoroteins</i>	TRP-2: <i>tyrosine receptor protein-2</i>
HSP: <i>heat shock protein</i>	TSH et R-TSH: <i>thyroid stimulating hormone and receptor</i>
HT: hormones thyroïdiennes	Tu: tunicamycine
Ig: immunoglobuline	UGGT: <i>UDP-glucose :glycoprotein glucosyltransferase</i>
IGF : <i>insulin growth factor</i>	UPR: <i>unfolded protein response</i>

## **I. La voie de sécrétion : du réticulum endoplasmique à la surface cellulaire**

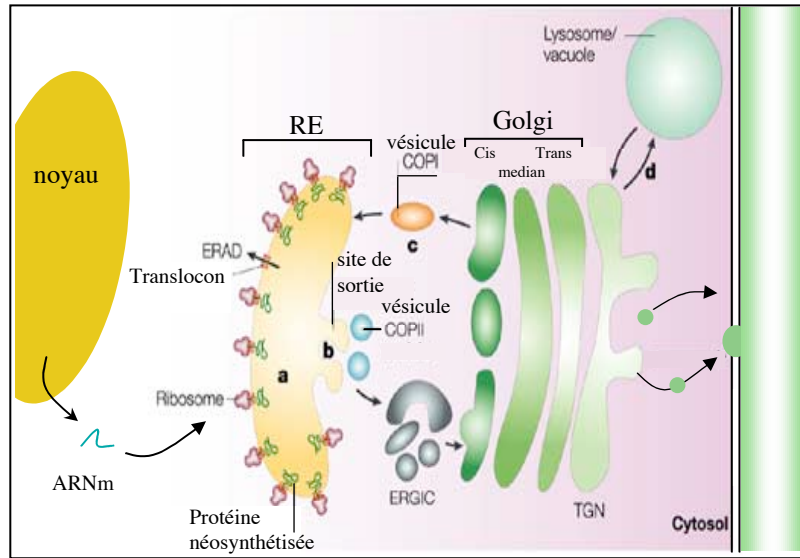
### **I.1. Les différents compartiments de la voie de sécrétion**

Les protéines solubles ou membranaires, devant rejoindre la surface cellulaire, les organites cellulaires ou être sécrétées par les cellules sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) puis vont suivre la voie de sécrétion de la cellule. On distingue la voie de sécrétion constitutive et la voie de sécrétion régulée réservée aux protéines dont la sécrétion dépend de signaux extracellulaires comme les hormones.

Ces deux voies empruntent un réseau de compartiments intracellulaires dans lesquels les protéines vont successivement se replier et subir différentes modifications post-traductionnelles, avant de rejoindre leur destination finale.

Le RE, qui représente un large ensemble membranaire, est le lieu de synthèse, de repliement et de maturation précoces des protéines sécrétées ou membranaires. C'est également dans ce compartiment que le « contrôle de qualité des protéines » (CQ) décide du devenir des protéines en discriminant les protéines capables de poursuivre leur maturation, des protéines ne présentant pas un repliement correct et devant être éliminées de la voie de sécrétion (voir II). Ainsi, les protéines satisfaisant le CQ du RE vont rejoindre le complexe de l'appareil de Golgi subdivisé en compartiments morphologiquement et fonctionnellement différents, le cis-golgi, le compartiment médian et le compartiment le plus extrême, le trans-golgi. Le complexe golgien est précédé d'un compartiment intermédiaire entre le RE et l'appareil de Golgi, nommé ERGIC et suivi du réseau trans-golgien, dit TGN, dernier compartiment de la voie de sécrétion à partir duquel les protéines sont aiguillées vers la surface cellulaire, les compartiments lysosomiaux ou les granules de sécrétion ou de stockage pour les protéines dont la sécrétion est régulée (Fig. 1).

La progression des protéines à travers cette voie de sécrétion pose encore de nombreuses questions. Le modèle le plus accepté définit des compartiments stables contenant des protéines résidentes, à travers lesquels les protéines sont transportées par des vésicules bourgeonnant de la membrane d'un compartiment proximal pour fusionner avec la membrane du compartiment suivant en y délivrant les protéines englobées (Pfeffer et coll, 1987). Cependant, un autre modèle envisage la maturation successive des différents compartiments jusqu'aux vésicules de sécrétion.



**Fig. 1: Les différents compartiments et le trafic intracellulaire antérograde et rétrograde des protéines de la voie de sécrétion.**

La voie de sécrétion est composée de compartiments morphologiquement et moléculairement différents. Ils possèdent chacun un ensemble de protéines et d'enzymes caractéristiques de leurs fonctions propres. Le RE, lieu de synthèse des protéines de la voie de sécrétion et notamment des modifications par N-glycosylation est suivi d'un compartiment appelé ERGIC. Ce dernier joue l'intermédiaire entre le RE et l'appareil de Golgi.

L'appareil de Golgi est sous-compartimenté en trois ensembles de saccules distinctes par leur contenu et leurs fonctions: le cis, le médian et le trans. Enfin avant la sécrétion vers la membrane cellulaire ou l'adressage vers les granules de sécrétion ou les lysosomes (d), les protéines passent par le réseau trans-golgien (TGN) à partir duquel se forment les vésicules de sécrétion.

La protéine issue de la traduction de son ARNm au niveau des ribosomes fixés sur le RE rugueux est directement déversée dans le RE. Elle suit ensuite la voie antérograde en empruntant des vésicules recouvertes de molécules COPII pour atteindre l'appareil de Golgi. La progression des protéines dans la voie de sécrétion est controversée. L'idée d'un passage entre compartiment médiée par des vésicules issues du bourgeonnement des membranes plasmiques des compartiments s'oppose à l'hypothèse d'une maturation progressive des différents compartiments et donc de leurs contenus. La voie rétrograde entre l'appareil de golgi et le RE entretient quant à elle la formation de vésicules tapissées de protéines COPI, responsables notamment du transport rétrograde © des protéines résidentes du RE (portant les séquences spécifiques KDEL, XXKK) échappées du RE. (D'après Ellgaard et Helenius, 2003)

Dans ce cas, le cis-golgi serait issu de la fusion de plusieurs composants ERGIC et les citernes de l'appareil de Golgi évolueraient de manière vectorielle pour acquérir les caractères des compartiments médian puis trans, pour se déstructurer en vésicules de sécrétion ou de stockage. Le transport rétrograde des protéines à partir des compartiments existant vers les nouveaux compartiments assurerait l'acquisition des protéines spécifiques du compartiment nouvellement maturé (Glick; 2000). Ces deux scénarii apparemment en opposition sont cependant tous les deux confortés par différentes données. En effet, l'existence des vésicules de transport entre les différents compartiments de l'appareil de Golgi remplies de protéines à sécréter est en faveur du modèle de stabilité morphologique des compartiments, cependant l'inexistence de telles vésicules entre l'ERGIC et le cis-golgi appuie l'hypothèse de la maturation des compartiments de la voie de sécrétion (Glick; 2000). Ces deux modèles pourraient intervenir en parallèle, le modèle de progression étant réservé au transport des protéines de taille importante et le modèle médié par des vésicules, au transport rapide des protéines de taille moins importante.

## **I.2. La synthèse, le repliement et les modifications co- et post-traductionnelles des protéines de la voie de sécrétion.**

### **I.2.A. La synthèse et la translocation des protéines dans le réticulum endoplasmique**

Les protéines de la voie de sécrétion sont synthétisées au niveau du RE, c'est-à-dire que le transport de la protéine naissante dans la lumière du RE se fait de manière co-traductionnelle par la translocation de la chaîne peptidique en cours d'élongation à travers la membrane du RE.

Les protéines solubles ou membranaires empruntent un même système de translocation qui nécessite d'une part la présence sur la protéine d'un signal d'adressage au RE et d'autre part l'utilisation d'un canal transmembranaire permettant le passage à travers la membrane ou l'insertion du ou des domaines transmembranaires de la protéine dans la bicouche lipidique.

Pour les protéines solubles et transmembranaires de type I (possédant un domaine transmembranaire et l'extrémité amino-terminale dans la lumière du RE), le signal d'adressage et de translocation dans le RE est constitué par un segment de 15 à 22 acides aminés hydrophobes présents à l'extrémité amino-terminale de la séquence protéique appelé la séquence signal.



Après la traduction de la séquence signal sur un ribosome libre dans le cytoplasme, une protéine de reconnaissance du signal, appelée SRP, se fixe au ribosome et arrête la traduction jusqu'à son interaction avec son partenaire membranaire, le récepteur SRP exprimé sur la membrane du RE. Ce dernier est associé au canal transmembranaire de translocation, appelé le translocon, qui est un complexe hétérotrimérique de protéines Sec61. Le complexe ainsi formé, la translocation de la protéine s'effectue de manière co-translationnelle, après l'insertion puis clivage de la séquence signal dans le RE (Ng et coll, 1994). Pour les protéines de type II et III, le premier segment transmembranaire joue le rôle de motifs d'adressage à la machinerie de translocation.

Une fois dans le RE, la protéine va se replier pour acquérir sa conformation native. Cependant, si elle n'y parvient pas le contrôle de qualité l'adresse au système de dégradation associé au RE appelé ERAD, pour « *ER associated degradation* » (voir II.3.). Ce mécanisme de dégradation des protéines mal repliées fait intervenir le complexe de dégradation cytoplasmique du protéasome et nécessite donc la « retranslocation » des protéines à travers la membrane du RE, de la lumière du RE vers le cytoplasme, grâce au translocon (Suzuki et coll, 1998). Cette « retranslocation » requiert des mécanismes de reconnaissance et de dépliage de la protéine encore mal connus. Des protéines résidentes du RE, telles que BiP, et les molécules d'ubiquitine dans le cytoplasme favorisent ce mécanisme.

## **I.2.B. Le repliement des protéines**

### **I.2.B.a. La structure des protéines**

On distingue 4 niveaux de structure des protéines. La structure primaire est la séquence en acides aminés de la protéine dont l'enchaînement est dicté par le message génétique. La structure secondaire définit des agencements particuliers de la chaîne peptidique, suivant des figures imposées par les caractéristiques biochimiques et l'enchaînement des acides aminés dans une protéine donnée. On distingue ainsi les structures secondaires majeures dites en feuillets  $\beta$  et en hélices  $\alpha$ .

Ces structures vont alors s'organiser en structures tertiaires pour former les différents domaines de la protéine si nécessaire ou directement la conformation tridimensionnelle de la protéine.

Les feuillets  $\beta$  et les hélices  $\alpha$  s'agencent alors entre eux en enfouissant les régions hydrophobes à l'intérieur de la protéine et en laissant apparaître des régions moins structurées en forme de boucle ou de coude, en périphérie. Cette conformation définit la stabilité et la solubilité de la protéine ainsi que ces fonctionnalités physiologiques.

Certaines protéines requièrent un niveau de structuration supplémentaire, dit quaternaire, pour être fonctionnelles, qui illustre l'interaction de plusieurs chaînes peptidiques identiques ou différentes.

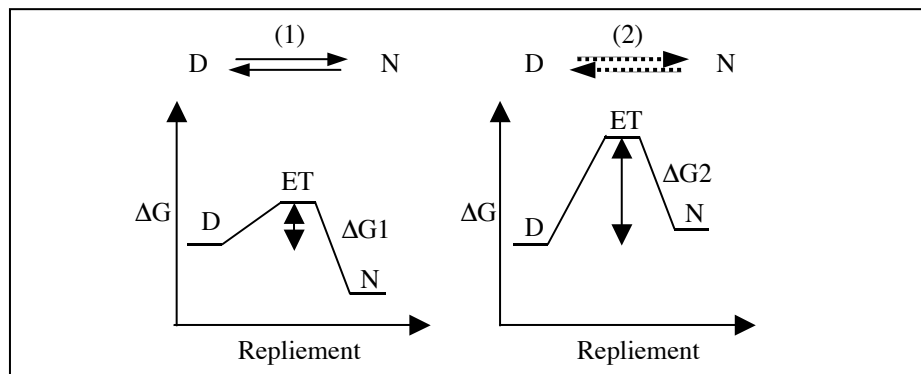
### **I.2.B.b. Le repliement des protéines**

Le repliement des protéines implique donc le passage de la chaîne polypeptidique néosynthétisée d'un état déplié, c'est-à-dire linéaire, à un état replié bien précis, la conformation native, qui est la forme biologiquement active de la protéine.

Depuis plusieurs décennies, les chercheurs tentent de comprendre et d'établir des règles pour prédire le repliement des protéines. Plusieurs hypothèses ont successivement vues le jour. Elaborées à partir de données expérimentales thermodynamiques et cinétiques, elles visent à répondre à la question : comment la protéine acquiert-elle la conformation tridimensionnelle énergétiquement la plus stable dans un laps de temps raisonnable.

Classiquement, le passage de l'état déplié (D) à l'état natif (N) implique de nombreuses interactions entre les résidus de la protéine. Pour passer de D à N, la protéine subit des changements conformationnels qui induisent la formation d'intermédiaires de repliement stables et en équilibre, avec des structures secondaires natives mais un profil tridimensionnel intermédiaire entre ceux de l'état déplié et de l'état natif. La population la plus instable énergétiquement durant le processus de repliement, représente l'état de transition qui donne la valeur de la barrière énergétique que la protéine devra franchir pour se replier correctement (Fersht et coll, 1995) (Fig. 2).

Le mécanisme de nucléation-diffusion propose que la prise de conformation tridimensionnelle se propage à partir d'un site de nucléation qui définit en fait une partie de la protéine condensée en structures secondaires, comme une hélice  $\alpha$  par exemple. Puis après la mise en évidence de l'existence d'intermédiaires de repliement, deux autres hypothèses, compatibles avec ces nouveaux éléments, se sont développées.



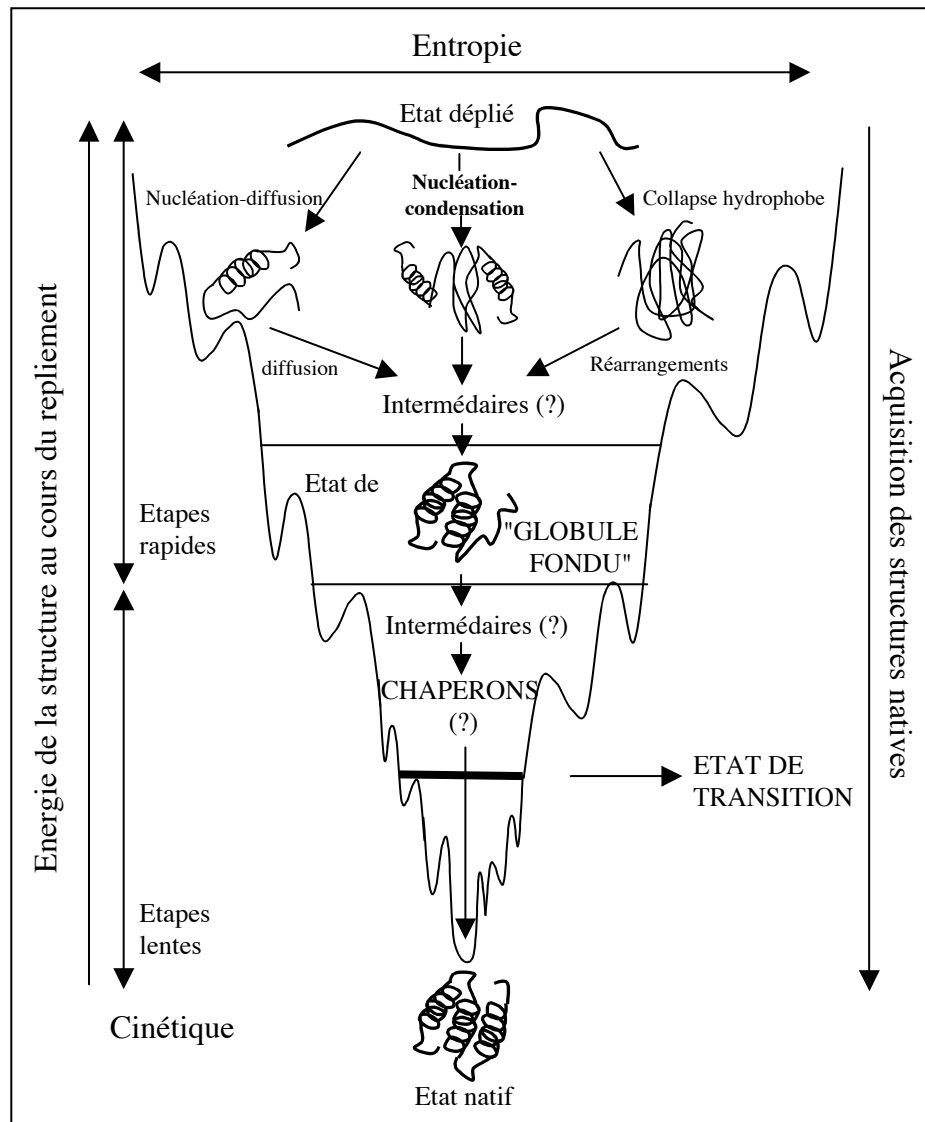
**Fig 2 : Présentation des diagrammes énergétiques du repliement des protéines.**

(1) Cas d'une protéine dont l'état natif (N) est plus stable énergétiquement que l'état déplié (D). La barrière énergétique de l'état de transition ( $\Delta G_1$ ) est faible, et les deux populations sont en équilibre. (2) Dans ce cas la protéine native (N) est dans une conformation thermodynamiquement moins stable que l'état déplié (D), En raison de l'importante énergie de transition ( $\Delta G_2 > \Delta G_1$ ), les protéines natives formées sont cinétiquement stables. (D'après Fersht et coll, 1995 et Cunningham et coll, 1999)

Ainsi le mécanisme de diffusion décrit un processus dans lequel la protéine entière se structure en conformations secondaires avant de prendre sa conformation native tandis que le mécanisme de condensation hydrophobe envisage la formation d'un intermédiaire de repliement issu d'interactions hydrophobes non spécifiques. Puis, cet intermédiaire appelé « globule fondu » ou état métastable, ainsi formé, se réorganiserait pour donner à la protéine sa structure native (Daggett et coll, 2003) (Fig. 3).

Les nombreuses contraintes induites par ces mécanismes ont conduit les chercheurs à envisager un processus intermédiaire appelé nucléation-condensation reprenant les caractéristiques des hypothèses précédemment envisagées à savoir la formation d'interactions et de noyaux hydrophobes à partir desquels la protéine se replierait correctement en structures secondaires puis tertiaires (Fersht et coll, 1995). Cette hypothèse satisfait l'existence d'un état de transition structuré en conformations secondaires et tertiaires plus ou moins proches de celles identifiées dans l'état natif, et également le fait qu'après dénaturation, les protéines ne sont pas totalement destructurées. Cependant, ces mécanismes s'appliquent généralement à des protéines de courtes séquences d'une centaine de résidus d'acides aminés (Daggett et coll, 2003). D'autre part, une analyse réalisée sur un large panel de protéines globulaires a démontré que le processus de nucléation et les interactions hydrophobes intervenaient de manière simultanée lors du repliement de ces protéines (Uversky et coll., 2002).

Pour des protéines plus importantes et/ou possédant différents domaines, ce processus coopératif et impliquant des intermédiaires de repliement peut également être envisagé en considérant les différents domaines comme des unités de repliement indépendantes les unes des autres. Dans ce contexte, le repliement de chaque module est mené à partir de sites de condensation-nucléation initiaux et présente un profil énergétique équivalent aux protéines présentant un état de transition. Ce mécanisme de multinucléation donne naissance après « regroupements » des modules à la conformation native de la protéine (Daggett et coll., 2003).



**Fig 3 : Représentation schématique du concept de repliement en entonnoir et des différents modèles de repliement des protéines.**

Cet entonnoir représente le comportement thermodynamique et cinétique d'une protéine en cours de repliement. Au cours de la progression vers la structure native, l'entropie, représentée par la largeur de l'entonnoir, et l'énergie libre des structures, donnée par la profondeur du cône, diminuent au fur et à mesure que s'établissent les interactions et les structures natives (échelle de droite).

Les populations de l'état de globule fondu et de transition sont mentionnés. Les différents modèles de repliement par diffusion-collision, par collapse hydrophobe ainsi que le mécanisme par nucléation-condensation unifiant les deux premiers et applicable aux protéines multidomaines. (D'après Socci et coll, 1998 et Daggett et coll, 2003)

### **I.2.C. Les modifications co- et post-traductionnelles intervenant dans le repliement des protéines et dans la voie de sécrétion des protéines.**

De nombreuses modifications post-traductionnelles accompagnent le repliement, la maturation et le trafic intracellulaire des protéines. Nous nous attarderons dans cette partie sur l'acquisition des ponts disulfures et des motifs oligosaccharidiques liés sur les résidus d'asparagine des glycoprotéines et de manière plus approfondie dans la partie III, sur la protéolyse limitée de certains précurseurs protéiques de la voie de sécrétion.

#### **I.2.C.a La formation des ponts disulfures**

Le repliement et l'assemblage de certaines protéines nécessitent la formation de ponts disulfures entre deux résidus de cystéines. Cette liaison covalente entre les deux groupements –thiol stabilise les structures secondaires et tertiaires des protéines et garantit le maintien de la conformation tridimensionnelle fonctionnelle des protéines, notamment des protéines de la voie de sécrétion vouées à intervenir dans des conditions physiologiques particulières.

Le compartiment du RE est un environnement oxydant qui favorise l'oxydation des groupements –thiol et entraîne la formation des ponts disulfures intramoléculaires et inter-chaines lors de la maturation des protéines. Cependant, lors du repliement précoce des protéines, certains ponts S-S non natifs peuvent se former entre deux cystéines rapprochées dans un intermédiaire de repliement. Ainsi, certaines protéines synthétisées dans le RE requièrent l'assistance de protéines de la famille des PDI, pour « *protein disulfide isomerase* », spécialisées dans la formation des ponts S-S (voir II.2.D.). Ces dernières interviennent de manière co- et post-traductionnelle pour catalyser la formation des ponts disulfures natifs et le réarrangement des liaisons incorrectement établies entre deux cystéines d'un intermédiaire de repliement.

En effet, la formation des ponts disulfures est cruciale pour le repliement correct et l'expression de très nombreuses protéines comme par exemple l'albumine ou une des sous-unités du récepteur d'asialoglycoprotéines (Lodish et coll, 1993). En effet, en présence d'un agent réducteur, le DTT, ces protéines n'acquièrent pas leur structure native et sont retenues au niveau du RE. Après élimination de l'agent réducteur, les protéines peuvent prendre leur structure native et sortir du RE.

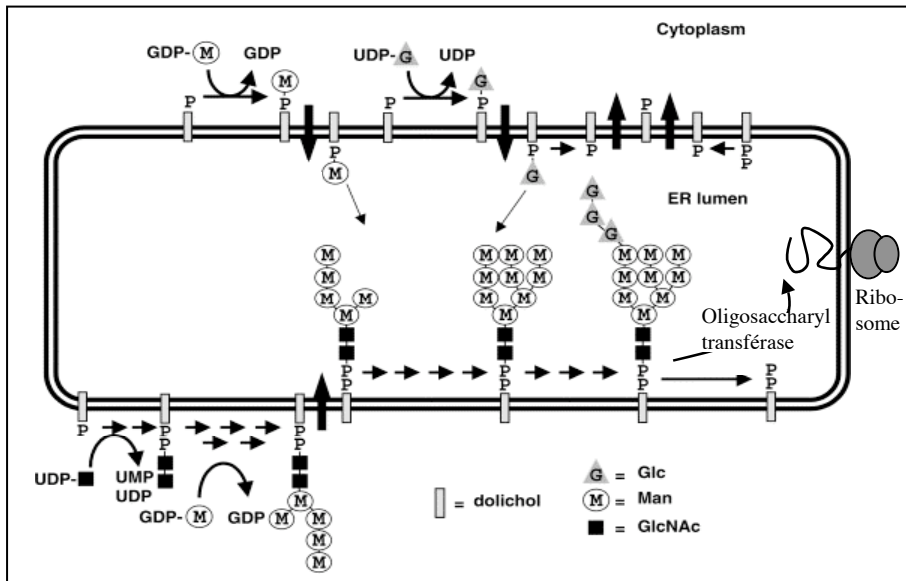
### I.2.C.b. La N-glycosylation

Une seconde modification post-traductionnelle survenant dans le RE est la glycosylation de résidus d'asparagine (Asn) au niveau de la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr, où X peut être n'importe quel acide aminé sauf une cystéine ou une proline. L'oligosaccharide fixé sur la protéine est assemblé au niveau d'un dolichyl-phosphorylé ancré dans la membrane du RE. Les premières étapes, consistant en la fixation successive d'un résidu de N-acétylglucosamine (GlcNac) phosphorylé, d'un second GlcNac puis de cinq résidus de mannose sur le dolichyl-phosphorylé, ont lieu sur la face cytoplasmique du RE. Cette structure est alors transloquée sur la face luminale du RE où se poursuit la maturation de l'oligosaccharide par l'ajout de 4 nouveaux résidus de mannose et de 3 de glucose, pour former le motif glycanique final : GlcNac<sub>2</sub>-Man<sub>9</sub>-Glc<sub>3</sub> (Helenius et Aebi, 2002). Ce motif oligosaccharidique est alors transféré sur une Asp de la protéine en cours d'élongation grâce à l'action de l'oligosaccharyltransférase qui reconnaît la séquence consensus de N-glycosylation (Fig. 4).

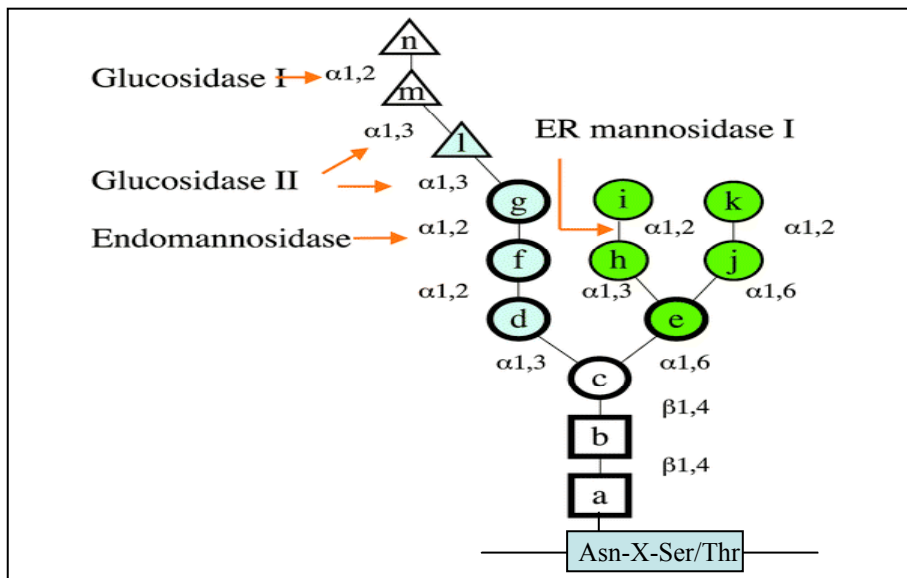
Plusieurs étapes de maturation interviennent sur le motif oligosaccharidique au niveau du RE, puis plus tard dans l'appareil de Golgi après repliement correct et transport de la protéine hors du RE. Dans le RE, deux glucosidases, l' $\alpha$ -1,2 glucosidase I et l' $\alpha$ -1,3 glucosidase II, clivent respectivement le glucose terminal et les deux autres molécules de glucoses restantes, et l' $\alpha$ -mannosidase I du RE clive le mannose lié en position  $\alpha$ -1,2 de la branche interne du motif glycanique (Fig. 5).

Une fois dans l'appareil de Golgi, l' $\alpha$ -mannosidase I, peut enlever les autres résidus de mannose liés en position  $\alpha$ -1,2 des branches externes du sucre. A partir de ce motif, GlcNac<sub>2</sub>-Man<sub>5</sub>, la formation de motif dits complexes ou hybrides peut se poursuivre tout au long du trafic de la protéine au travers des différents saccules de l'appareil de Golgi, par l'ajout successif de résidus monnosaccharidiques. Ce processus est dirigé par l'action de la mannosidase II de l'appareil de Golgi et de diverses glycosyltransférases. Ces dernières permettent d'ajouter des résidus de GlcNac, de galactose, de fucose et d'acide sialique.

Ces différentes modifications conduisent à la formation de motifs complexes portant 2 à 4 branches de résidus cités précédemment ou à la formation de motifs hybrides présentant une branche de motif complexe sur le mannose lié en  $\alpha$ -1,3 et des résidus oligomannosylés sur la seconde branche.



**Fig 4: Biosynthèse des motifs N-glycanniques.** La formation du précurseur des N-glycannes débute du côté cytoplasmique de la membrane du RE à partir d'un groupement de dolichyl-phosphorylé. Des protéines membranaires appelées « flippases » sont responsables de l'orientation luminale du groupement Man5-GlcNac2 sur lequel sont alors ajoutés les sucres restants pour former le précurseur oligosaccharidique Glc3-Man9-GlcNac2. Ce dernier est chargé sur un résidu d'Asn par le complexe de l'oligosaccharyltransférase. (D'après Helenius et Aebi, 2002.)



**Fig 5 : Le motif oligosaccharidique initialement chargé sur les protéines néosynthétisées au niveau du RE.** Le groupement oligosaccharidique fixé au niveau de la séquence Asn-X-Ser/Thr est composé d'une tige de 2 résidus N-acetylglucosamine et d'un résidu de mannose à partir de laquelle partent les 3 branches oligomannosylées. Sur la branche A seront fixées les 3 molécules de glucoses sensibles aux glucosidases I et II du RE. Le mannose de la branche B est clivé par la mannosidase I du RE



Ainsi, la glycosylation d'une protéine peut nous renseigner sur son trafic et sur sa localisation intracellulaires. En effet, les motifs oligomannosylés, caractéristiques du RE, sont sensibles à l'endo- $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase H (endo H), une enzyme qui reconnaît spécifiquement les structures présentant le motif Man $\alpha$ -1,3-Man $\alpha$ -1,6-Man $\alpha$ -1,4-GlcNac et clive entre les deux résidus de GlcNac. Une autre enzyme, la peptide N-glycanase F (PNGase F), clive quant à elle tous les motifs oligosaccharidiques entre le résidu GlcNac et l'asparagine de la protéine, même les motifs de types complexes résistants à l'endo H.

La N-glycosylation joue différents rôles dans la maturation et la fonctionnalité des protéines de la voie de sécrétion.

L'utilisation de tunicamycine drogue inhibant toute N-glycosylation et de la castanospermine drogue inhibant la glucosidase I et bloquant ainsi la structure oligosaccharidique sous la forme GlcNac<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub>, entraîne une accumulation de certaines protéines au niveau du RE et l'inhibition du trafic vers l'appareil de Golgi. Cette accumulation s'accompagne parfois de la formation d'agrégats. En effet, pour un certain nombre de protéines, la N-glycosylation aide au repliement correct des protéines en permettant l'interaction de ces dernières avec des lectines du RE, la calnexine (CNX) et la calréticuline (CRT), protéines chaperons du repliement des protéines (voir II.2.B.), (Fayadat et coll, 1998 et 2000; Negriou et coll, 2003).

La glycosylation peut également intervenir dans le trafic intracellulaire et l'adressage des protéines. Le mécanisme le mieux étudié jusqu'à présent, implique la phosphorylation en position 6 d'un résidu de mannose sur les motifs oligosaccharidiques au niveau de l'appareil de Golgi, qui pourra être reconnu par le récepteur des résidus mannose-6-phosphate. Ce dernier adresse spécifiquement les protéines qu'il lie aux compartiments lysosomaux. D'autres protéines sont impliquées dans le trafic intracellulaire des glycoprotéines. ERGIC-53, une lectine transmembranaire du RE, fixe les motifs oligomannosylés des protéines du RE et favorise leur transport vers le compartiment intermédiaire ERGIC et vers l'appareil de Golgi, via son interaction avec les molécules COP II recouvrant les vésicules de trafic entre les compartiments du RE et de l'appareil de Golgi (Itin et coll, 1995).

De nombreuses autres protéines reconnaissant des motifs glycaniques sont probablement responsables de la rétention ou du trafic intracellulaire des protéines.

Enfin, les motifs oligosaccharidiques sont souvent impliqués dans la solubilité des protéines et dans la protection contre la dégradation.

### **I.3. Le trafic intracellulaire des protéines à travers la voie de sécrétion**

#### **I.3.A. Le transport antérograde et rétrograde des protéines**

Le trafic intracellulaire des protéines à travers la voie de sécrétion est assuré par la formation de vésicules issues du bourgeonnement de la membrane d'un compartiment et recouvertes de protéines dites de recouvrement, la famille des protéines COP, associées à des GTPases qui régulent le mécanisme de bourgeonnement et de fusion des vésicules (Rohtman et coll, 1996). Le transport antérograde définit la progression des protéines du RE jusqu'à leur sécrétion tandis que le transport rétrograde définit le retour des protéines spécifiques d'un compartiment de la voie de sécrétion dans leur compartiment d'origine. C'est le cas notamment des protéines chaperons ou de transport qui après avoir accompagné le transport effectif des protéines doivent rejoindre leur compartiment de départ.

Le transport des protéines synthétisées au niveau du RE et satisfaisant le CQ, vers les compartiments distaux de la voie de sécrétion, est assuré par des vésicules issues du bourgeonnement de la membrane du RE recouvertes de protéines COP-II associées aux protéines SAR-GTP. Ces vésicules de transport, COP-II, fusionnent avec le compartiment intermédiaire ERGIC qui jouerait alors, lui même, le rôle de compartiment de transport vers la face cis de l'appareil de Golgi.

Le transport des protéines à travers les différents saccules de l'appareil de Golgi et le transport rétrograde de l'appareil de Golgi vers le RE sont réalisés quant à eux par des vésicules recouvertes de COP-I en association avec les protéines ARF (Rothman et coll, 1994). Cependant, il apparaît également que les vésicules COP-I pourraient être impliquées dans le transport antérograde du RE vers l'appareil de Golgi de certaines protéines.

Le transport des protéines hors du TGN est réalisé par des vésicules morphologiquement très variables. Le transit vers la membrane plasmique se fait à l'aide de larges vésicules polymorphiques ayant conservées les caractéristiques du TGN dont elles sont issues. Ces structures, par leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles, pourraient ressembler au complexe de transport entre le RE et l'appareil de Golgi via les compartiments ERGIC (Stephens et coll, 2001; Glick, 2000).

Les vésicules transportant les protéines du TGN vers les compartiments endosomaux et lysosomaux, sont issues du bourgeonnement de la membrane du TGN recouverte de molécules de clathrine, associés comme les protéines COPs avec une GTPase, ARF.

### **I.3.B. La sélection des protéines**

La sélection des protéines compétentes pour le transport fait intervenir des signaux de sortie et de rétention qui peuvent être des séquences en acides aminés ou des conformations tridimensionnelles spécifiques. Ces signaux permettent de sélectionner les protéines au niveau des vésicules, par interactions directe ou indirecte, à l'aide de récepteurs membranaires, avec les protéines COP recouvrant ces vésicules. Ainsi, en même temps que les vésicules de transport se forment par bourgeonnement et recrutement des protéines COPs, elles concentrent les protéines à transporter au niveau de la membrane et de l'espace luminal de la future vésicule de transport.

Les différents signaux de transport identifiés jusqu'à présent, sont des signaux de rétention au niveau du RE ou des signaux d'adressage vers les compartiments des endosomes et lysosomes.

Ainsi, la présence du motif KDEL (HDEL chez la levure) dans la séquence des protéines solubles ou du domaine cytoplasmique des protéines membranaires de type I, ainsi que les motifs KKXX et XXRR pour les protéines transmembranaires de type I et II respectivement, entraînent la rétention de ces protéines dans le RE (Pelhman et coll, 1990). Ces signaux permettent également le recyclage continu de protéines résidentes du RE mais qui sont associées au transport de certaines protéines hors du RE ou qui ont échappé au RE dans le flux continu des vésicules de transport et doivent donc être rapatriées vers leur compartiment d'origine. Ces protéines sont retenues dans le RE ou empruntent la voie de transport rétrograde en interagissant avec des récepteurs transmembranaires incapables de se lier aux protéines COPs de la voie antérograde mais susceptibles de lier celles impliquées dans la formation des vésicules de transport de la voie rétrograde (Rothman et coll, 1996). Ainsi, différents récepteurs ou familles de récepteurs pourraient intervenir, en association avec le transport vésiculaire dépendant des COPs, dans le transport ou la rétention des innombrables protéines ou familles de protéines empruntant la voie de sécrétion.

Les signaux d'adressage des protéines du TGN au système endosomes/lysosomes utilisent le motif di-leucine – LL – présent dans des régions riches en tyrosines au niveau du domaine cytoplasmique des protéines ou bien encore le motif oligosaccharidique portant une molécule de mannose 6-phosphate reconnu par les récepteurs de mannose 6-phosphate exprimés au niveau du TGN.

D'autres signaux d'adressage vers les lysosomes sont portés par les séquences propeptidiques de certaines protéines de la voie de sécrétion synthétisées sous forme de précurseurs protéiques. Ces propeptides, généralement en position amino-terminale, restent associés à la protéine après son repliement et sa maturation dans le RE et l'appareil de Golgi et les aiguillent jusque dans les compartiments lysosomaux ou endosomaux où l'environnement acide entraîne la dissociation et la libération des protéines actives (voir III.3.C.).

Jusqu'à présent, aucun signal protéique spécifique de l'adressage des protéines à la membrane plasmique n'a été identifié. Le transport des protéines vers la surface cellulaire pourrait être la voie de sécrétion par défaut des protéines ni sélectionnées pour la rétention et le transport rétrograde vers les compartiments proximaux ni pour l'adressage aux lysosomes et endosomes.

La sortie des protéines du RE et leur progression à travers l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane plasmique pourrait dépendre d'une combinaison d'éléments de séquence et de conformation protéiques, spécifiques de chaque étape du maturation et responsable de l'interaction de la protéine étudiée avec les protéines de transport et/ou de rétention présentes dans le compartiment.

Par exemple, seules les protéines ayant acquis une conformation correcte et des modifications post-traductionnelles satisfaisant le CQ du RE, sont capables de sortir du compartiment pour progresser vers l'appareil de Golgi et la membrane plasmique. Le RE abrite de nombreuses protéines résidentes, enzymes, protéines chaperons, catalyseurs de repliement et senseurs du CQ des protéines et du système de dégradation associé au RE (voir II.1.). Tant que le processus de repliement, de maturation et/ou d'assemblage n'a pas abouti, les protéines ne peuvent quitter le compartiment en raison de leur interaction prolongée avec ces facteurs possédant des séquences de rétention dans le RE.

Ainsi, des combinaisons de séquences et de conformations protéiques, d'interactions avec des récepteurs membranaires et des protéines résidant dans les différents compartiments de la voie de sécrétion, et de vésicules de transport, permettent le transport intracellulaire des protéines néosynthétisées.

L'intégrité de ce système garantit que seules les protéines ayant subi les modifications post-traductionnelles attendues et acquis leur conformation tridimensionnelle native progressent à travers la voie de sécrétion jusqu'à leur localisation finale.

## II. Le contrôle de qualité des protéines de la voie de sécrétion

### II.1. Généralités

Pour être fonctionnelles, les protéines doivent acquérir leurs structures tridimensionnelles natives et rejoindre leur lieu d'action.

La cellule présente dans ses compartiments de biosynthèse, le cytosol et le RE, des systèmes moléculaires indispensables au repliement et à la maturation correcte des protéines ainsi que des mécanismes d'élimination des protéines incorrectement repliées ou assemblées. Ces mécanismes composent le contrôle de qualité des protéines (CQ) qui décide d'aiguiller les protéines vers la maturation ou vers la dégradation. Ils mettent en jeu entre autre, une large famille de protéines appelées les protéines de choc thermique ou Hsp pour «*heat shock protein* ». Surexprimées en réponse à un stress thermique ou toxique provoquant un défaut de repliement ou une dénaturation des protéines, elles permettent de rétablir le bon fonctionnement cellulaire en facilitant la renaturation et l'élimination des protéines anormales accumulées.

Dans des conditions normales, elles aident les protéines néosynthétisées à prendre leur conformation native en évitant à ces dernières des interactions inappropriées avec d'autres protéines ou entre elles, d'où leur nom de protéine chaperon. Les protéines synthétisées dans la voie de sécrétion sont soumises à un CQ dans le RE. Le CQ du RE met en jeu différentes protéines: des protéines chaperons, des catalyseurs de repliement et des enzymes qui modulent par interaction avec les protéines néosynthétisées, la maturation et la dégradation de ces dernières, en cas de stress de la cellule comme en conditions physiologiques (Ma et coll, 2004).

Les protéines de stress majoritairement exprimées dans le RE sont la grp78 appelée aussi BiP et la grp94 appartenant à la famille des Grp pour «*glucose regulated protein* », appelées ainsi en raison de leur induction en réponse à la privation de glucose. Ces protéines sont respectivement, des homologues des Hsp70 et Hsp90 qui sont des protéines chaperons du CQ du cytoplasme. Le RE contient également des protéines spécifiques comme la calnexine (CNX) et la calreticuline (CRT), homologues des lectines végétales, qui reconnaissent spécifiquement les protéines portant des motifs oligosaccharidiques.

Ces deux groupes de protéines chaperons interviennent en association avec des catalyseurs de repliement, membres de la famille des PDI, qui catalysent notamment la formation des ponts disulfures présents dans les protéines de la voie de sécrétion.

Ensemble, ils forment des complexes chaperons qui facilitent le repliement des protéines nouvellement synthétisées dans le RE, et représentent des points de contrôle à partir desquels les protéines correctement repliées poursuivent leur progression à travers la voie de sécrétion et les protéines non conformes sont aiguillées vers la dégradation.

La décision dépend de déterminants propres à chaque protéine, du rôle joué par les complexes chaperons fixés, vis à vis de cette protéine, ainsi que de différentes enzymes qui vont jouer le rôle « d'interrupteur » des interactions entre la protéine néosynthétisée et les acteurs du CQ (Ellgaard et Helenius, 2003). Ces dernières sont des glucosidases et des mannosidases responsables de l'élagage des molécules de glucoses et de mannosés des motifs glycaniques fixés sur les protéines néosynthétisées, ainsi que d'une glucosyl-transférase.

Les protéines ne satisfaisant pas le CQ sont adressées aux systèmes de dégradation associée au RE, aussi appelés ERAD par «*ER associated degradation* ». Ils impliquent l'intervention du complexe cytoplasmique de dégradation des protéines, le protéasome 26S après la retranslocation des protéines dans le cytoplasme. Des études ont ainsi montré que plus de 30% des protéines nouvellement synthétisées dans la cellule sont dégradées par le protéasome (Schubert et coll, 2000; Turner et coll, 2000). Des voies de dégradations alternatives impliquant des protéases mêmes du RE sont certainement responsables de la dégradation des protéines non conformes du RE (Schmitz et Herzog, 2004).

## **II.2. Les acteurs du contrôle de qualité de la cellule**

### **II.2.A. La protéine BiP**

La protéine Grp78 appelée également BiP pour « *binding immunoglobulin protein* » appartient à la famille des Hsp70. Initialement identifiée en raison de sa régulation induite par une privation de glucose, elle est la protéine chaperon la plus abondante du RE où elle joue différents rôles dans le CQ du RE et intervient pour résorber les agrégations de protéines accumulées dans le RE pouvant survenir lors de stress du RE

### **II.2.A.a. La structure et le mécanisme d'action de BiP**

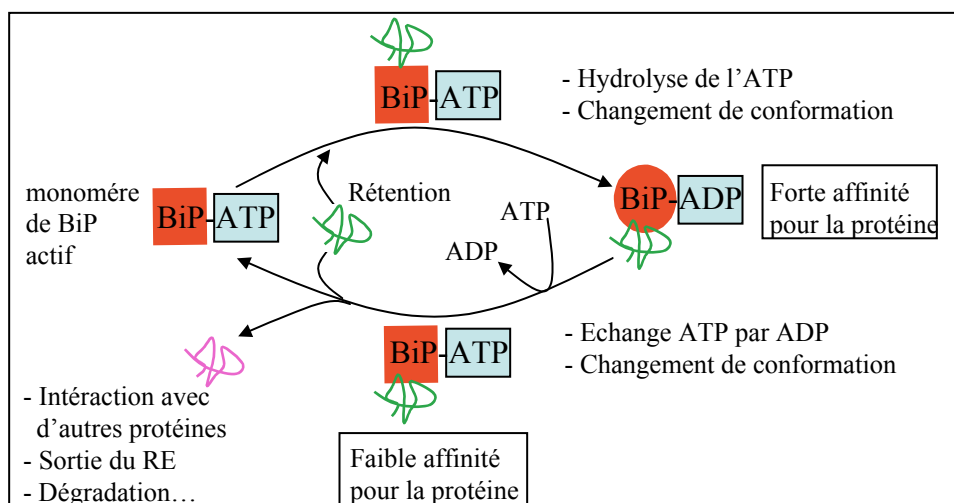
BiP présente comme la famille des Hsp70, un domaine N-terminal fixant l'ATP et un domaine C-terminal fixant les substrats (Bukau et coll, 1998). La structure tridimensionnelle des homologues cytosoliques, Hsp70, et bactériens, DnaK, de BiP ont été établis. Le domaine de fixation des substrats est formé d'un canal dont la conformation est modifiée par la fixation et l'hydrolyse de l'ATP.

La protéine BiP reconnaît spécifiquement des régions hydrophobes exposées à la surface des protéines en cours de repliement (Kim et coll, 1992), sur les protéines mutantes ou incapables de se replier correctement. L'interaction avec ces régions, généralement confinées à l'intérieur des protéines natives, évite aux protéines néosynthétisées de s'agréger entre elles ou de faire des mésappariements dès leur entrée dans le RE.

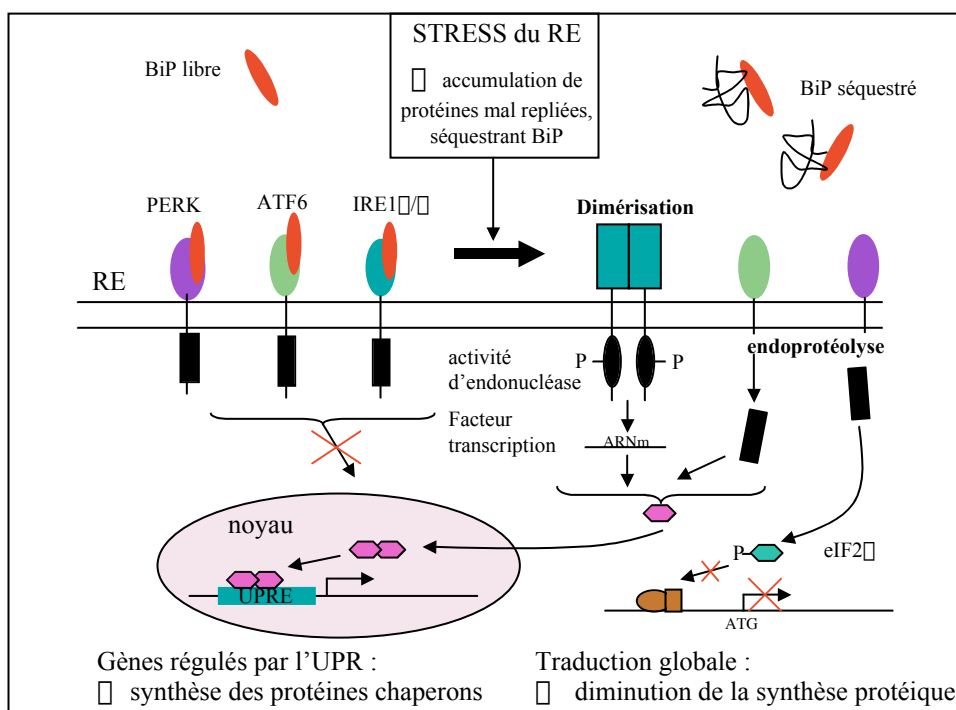
Un programme informatique élaboré à partir de la mise en évidence de l'association de BiP et de différents peptides, a permis de définir la séquence consensus des sites de fixation de BiP. Il s'agit d'un heptapeptide composé d'acides aminés hydrophobes, Hy-(W/X)-Hy-X-Hy-X-My (Blonb-Elguindi et coll, 1993).

La fixation d'un substrat présentant une région hydrophobe sur BiP est suivie de l'hydrolyse de l'ATP qui imprime un changement de conformation au domaine C-terminal, emprisonnant alors le substrat (Gething et coll, 1992; Wei et coll, 1995). Après échange de l'ADP par l'ATP, un changement de conformation conduit à l'ouverture du canal du domaine fixant le substrat et donc à la libération de ce dernier. La protéine BiP se trouve alors sous sa forme active et compétente pour la fixation d'un nouveau substrat et peut ainsi entrer dans un nouveau cycle d'interaction (Fig. 6). Les études ont démontré l'importance du caractère transitoire et cyclique de la fixation de BiP pour ses différentes fonctions (Hendershot et coll, 1996). De plus, la nature même du substrat semble moduler l'activité ATPase de BiP en réduisant par exemple la vitesse des cycles d'association/dissociation suivants (Mayer et coll, 2003).

L'établissement de mutants de BiP, déficient pour la fixation (mutant G226D), pour l'hydrolyse de l'ATP (mutant G229D) ou déficient pour le changement de conformation (mutant T37G), a permis d'une part de mettre en évidence ce mécanisme d'action de BiP et d'autre part d'étudier son implication dans le repliement et la maturation des protéines de la voie de sécrétion (Gaut et coll, 1993; Wei et coll, 1995; Hendershot et coll, 1996).



**Fig 6: Cycle d'interaction de la protéine néosynthétisée avec les protéines BiP (GRp78).** Le cycle d'association/dissociation de BiP est dépendant de l'ATP et de la présence de régions hydrophobes sur les protéines. Les monomères actifs de BiP ont une affinité pour ces dernières. Après hydrolyse de l'ATP, BiP possède une forte affinité pour son substrat. L'échange de l'ADP par l'ATP, diminue cette affinité et entraîne la libération de la protéine. Cette dernière peut entrer à nouveau dans un cycle d'interaction avec BiP ou poursuivre sa maturation



**Fig 7: Intervention de BiP lors de la réponse UPR.** Les protéines mal repliées accumulées dans le RE rentrent en compétition pour la fixation de BiP avec des protéines kinases transmembranaires, impliquées dans l'activation de facteurs de transcription stimulant la synthèse des protéines chaperons, IRE1 □ □ et ATF6, ou inhibant l'action de facteurs impliqués dans le complexe de traduction des protéines, PERK. (D'après Ma et Hendershot, 2004)



### **II.2.A.b. Les rôles de BiP**

Les nombreuses études réalisées sur les immunoglobulines et d'autres protéines, ont permis de mettre en évidence, le rôle de BiP dans le repliement correct et l'assemblage des protéines multimériques ainsi que son intervention dans la rétention des protéines incorrectement repliées ou mutantes (Cotner et coll, 1995). En effet, l'association de BiP à la chaîne légère des immunoglobulines est indispensable au repliement correct des Ig et après dissociation à l'assemblage des chaînes  $\kappa$  et  $\lambda$ , complexes compétents pour le transport à travers la voie de sécrétion (Hendershot et coll, 1990; Lee et coll, 1999). En absence de la synthèse de la chaîne lourde, la protéine BiP reste fixée aux chaînes  $\kappa$ , induisant leur rétention au niveau du RE dans un état non agrégé (Chillaron et coll, 2000).

De même, l'association de BiP avec le précurseur de la convertase PC7/PC8, inhibe son agrégation, mais entraîne la rétention de la protéine dans le RE et la diminution de son taux de repliement (Creemers et coll, 2000). Une autre étude a mis en évidence l'augmentation de la stabilité des sous-unités non assemblées de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase induite par l'interaction avec BiP, suggérant le rôle protecteur de BiP contre la dégradation précoce des protéines non assemblées (Beggah et coll, 1996).

La protéine BiP intervient également dans le processus de dégradation associé au RE qui nécessite la retranslocation des protéines du RE vers le cytoplasme. En effet, elle évite l'agrégation de la protéine et permet ainsi le maintien dans un état compétent pour une retranslocation à travers le complexe Sec61 de la membrane du RE (Nishikawa et coll, 2001).

Dans ses différentes fonctions, la fixation de BiP apparaît transitoire et fait appel à des cycles d'association/dissociation avec les substrats, dépendants de l'ATP (Katsumi et coll, 1996; Knittler et coll, 1992).

Ainsi suivant la protéine fixée et son temps d'association avec cette dernière, BiP peut contribuer au repliement correct comme à la rétention et à la dégradation des protéines incorrectement repliées ou assemblées.

### **II.2.A.c. La régulation de BiP**

Lorsque la cellule subit un stress physiologique ou pathologique entraînant une accumulation des protéines mal repliées dans le RE, elle y répond par la synthèse accrue des protéines chaperons et une diminution de la synthèse globale des protéines.

Les voies de signalisation responsables de la réponse à cette accumulation de protéines mal repliées, appelée UPR pour « *unfolded protein response* », font intervenir comme premier senseur au niveau du RE, la protéine BiP. En effet, les protéines mal repliées fixent et séquestrent BiP qui ne peut plus interagir avec des protéines kinases transmembranaires du RE (Kimata et coll, 2003) (Fig. 7). Cette compétition pour la fixation des BiP libres, entraîne l'activation de ces protéines membranaires possédant un domaine cytosolique actif.

Initialement caractérisée chez la levure, la protéine kinase Ire1 induit après dimérisation, l'activation de son domaine cytoplasmique. Ce dernier entraîne l'activation de facteurs de transcription reconnaissant les éléments UPREs sur les régions promotrices des gènes codant pour des protéines chaperons (Gething et coll, 1999; Kimata et coll, 2003). Dans les cellules animales, les homologues d'Ire1, Ire $\alpha$  et  $\beta$ , sont également impliqués dans l'activation de facteurs de transcription. De même, ATF6, présente un domaine cytoplasmique qui après activation joue le rôle de facteur de transcription.

En parallèle, une autre protéine transmembranaire du RE, PERK, induit la phosphorylation d'un facteur d'initiation de la traduction, eIF2, réduisant alors l'efficacité du complexe de traduction et donc la synthèse protéique.

Ce système permet ainsi de coordonner les actions nécessaires d'une part pour désengorger le RE en réduisant la quantité de protéines délivrées dans le compartiment et d'autre part pour accélérer le repliement, la rétention et/ou la dégradation des protéines mal repliées ou anormales accumulées.

## **II.2.B. Les lectines : la calnexine et la calréticuline**

### **II.2.B.a. La structure et le cycle d'association/dissociation de la CNX/CRT**

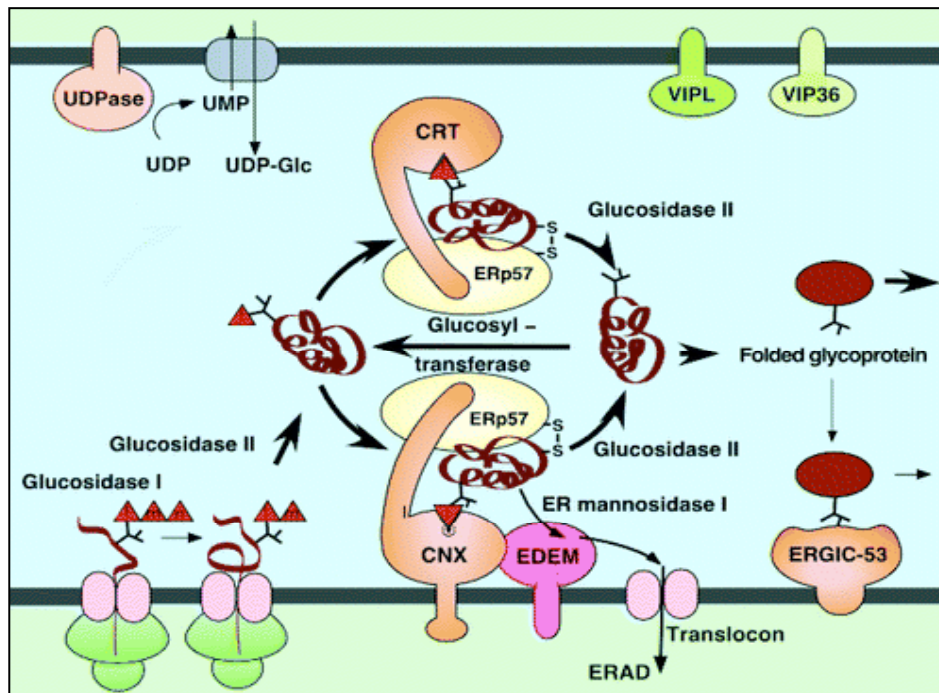
La calnexine et la calréticuline sont des homologues des lectines végétales. Elles présentent une forte homologie de séquences et de structure tridimensionnelle et leur différence essentielle repose sur le caractère transmembranaire de la CNX (65 kDa) et soluble de la CRT (46 kDa). Le large domaine amino-terminal se replie en un domaine globulaire et se prolonge par une structure en forme de bras, formant un espace où se fixe le substrat.

La CNX et la CRT fixent préférentiellement les protéines possédant des motifs oligosaccharidiques monoglucosylés, Glc1-Man7-9-GlcNac2 (Ware et coll, 1995 ; Cannon et coll, 1996). Cette association est comme pour BiP un phénomène transitoire et cyclique qui dépend, non pas directement de l'état conformationnel de la protéine, mais de la présence de motifs oligosaccharidiques monoglucosylés.

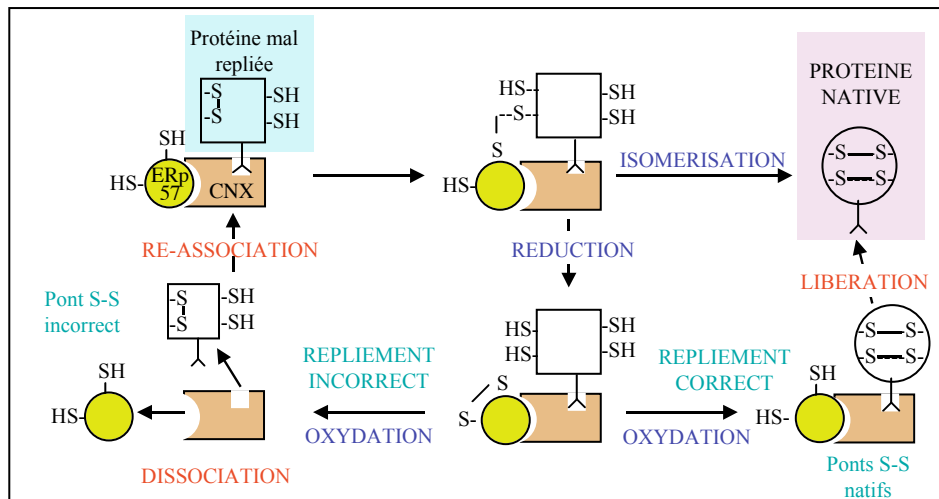
Ces motifs sont issus de l'action des glucosidases I et II du RE, qui clivent respectivement la première et les deuxième et troisième molécules de glucose liées à la branche A des motifs oligomannosylés (Fig. 5), ainsi que de l'action de l'UDP-Gluc : glycoprotéine glucosyltransferase (UGGT), qui ajoute une molécule de glucose sur un motif oligomannosylé pour former le motif Glc1-Man7-9-GlcNac2 (Hebert et coll, 1995) (Fig. 8). L'UGGT reconnaît préférentiellement des régions protéiques hydrophobes exposées à la surface des protéines nouvellement synthétisées et en cours de repliement (Sousa et coll, 1995). La protéine ainsi mono-glucosylée devient donc un substrat pour la CNX/CRT en association avec ERp57, un membre de la famille des protéines impliquées dans la formation des ponts disulfures et nécessaire à la prise de la conformation native (voir II .2.D). ERp57 fixé au niveau du prolongement amino-terminal de la lectine peut donc agir sur les protéines fixées sur la CNX/CRT (Leach et coll, 2002).

Le signal intervenant dans la libération de la glycoprotéine n'a pas encore clairement établi. En effet, l'action de la glucosidase II sur le dernier glucose pourrait intervenir après la dissociation de la CNX/CRT et ainsi ne pas être directement impliqué dans la diminution de l'affinité de la lectine pour la protéine (Hebert et coll, 1995). Quoiqu'il en soit, dépourvue de son motif de fixation pour les lectines, si la protéine ne peut pas acquérir sa conformation native après dissociation et qu'elle présente à nouveau des régions hydrophobes accessibles en surface, elle redevient un substrat pour l'UGGT et après reglucosylation, peut à nouveau entrer dans un cycle d'association/dissociation avec la CNX/CRT. L'UGGT apparaît donc comme le senseur des cycles d'association/dissociation des protéines en cours de repliement ou incorrectement repliées avec les lectines CNX et CRT.

Il faut cependant noter que la CNX et la CRT peuvent se fixer sur certaines protéines non glycosylées ou mutantes pour les sites de glycosylation (Saito et coll, 1999; Swanton et coll, 2003) ou faire intervenir de telles interactions en plus de la fixation dépendante de la glycosylation lors de leur association avec les glycoprotéines (Danilczyk et coll, 2001; Leach et coll, 2002). Cette interaction, indépendante des oligosaccharides, pourrait faire intervenir le domaine P de la CNX et de la CRT (Saito et coll, 1999).



**Fig 8 : Le cycle d'association/dissociation de la calnexine ou calréticuline aux protéines en cours de repliement.** Les différents composants moléculaires jouant un rôle dans le cycle CNX/CRT sont représentés dans cette figure (D'après Helenius et coll, 2004).



**Fig 9 : Coopération entre CNX et ERp57 pour la formation des ponts S-S corrects.** L'ERp57 associé à la CNX/CRT fixant les protéines en cours de repliement, catalyse l'isomérisation des ponts disulfures incorrects et la formation des ponts S-S entre cystéines proches, par des réactions d'oxydo-réduction. Le mécanisme requiert plusieurs cycles d'association/dissociation du complexe CNX/ERp57/protéine associé à la prise de conformation de la protéine (D'après Zapun et coll, 1999).

### **II.2.B.b. Les rôles des lectines chaperons du RE.**

L'effet et le rôle de la fixation de la CNX/CRT sur les protéines peut être étudié par l'utilisation d'inhibiteurs qui bloquent l'action de la glucosidase I avec la formation de motifs porteurs de 3 glucoses, la castanospermine et la désoxynojirimycine (Hammond et coll, 1994; Fayadat et coll, 1998).

Par leur capacité à lier spécifiquement des glycoprotéines reglucosylées par l'UGGT et qui présentent un état de repliement intermédiaire ou incorrect de leurs chaînes peptidiques, la CNX et la CRT, protéines résidentes du RE, permettent de retenir préférentiellement les protéines n'ayant pas encore acquis leur structure native ou présentant une conformation anormale (Ihara et coll, 1999). Cependant, une étude montre que la CNX/CRT peut aussi se lier à des protéines ayant acquis leur structure native (Allen et coll, 1997; Wearsch et coll, 2004).

Le cycle de la CNX/CRT est un point clé dans le CQ du RE. La fixation à la CNX/CRT est possible jusqu'à ce que la protéine atteigne sa conformation native ou jusqu'au déclenchement des mécanismes l'entraînant vers la dégradation.

Bien que les lectines chaperons n'aient pas une action directe sur le repliement, elles permettent d'une part la fixation de l'isomérase de ponts disulfures, ERp57 (voir II.2.D), et d'autre part le maintien des glycoprotéines dans un état compétent pour le repliement, pour le transport hors du RE et dans certains cas pour la dégradation des protéines. En effet, fixée à la CNX/CRT, une protéine donnée peut être protégée de l'agrégation et avoir une chance supplémentaire d'acquies sa structure native tandis que l'interaction prolongée d'une autre protéine avec la CNX/CRT peut l'entraîner vers la dégradation. Différentes glycoprotéines interagissent ainsi avec la CNX/CRT jusqu'à leur repliement correct comme la myeloperoxydase (Nauseef et coll, 1998), la TPR-2, membre de la famille des tyrosinases (Negriou et coll, 2003) ou le récepteur de l'insuline (Bass et coll, 1998), et jusqu'à leur assemblage comme les chaînes des Igs (Vassilikos et coll, 1996). Dans d'autres cas, l'association avec la CNX peut entraîner la rétention de la protéine dans le RE et empêcher sa dégradation. C'est par exemple le cas de la protéolipoprotéine (PLP) pour laquelle l'association durable avec la CNX, inhibe la dégradation (Swanton et coll, 2003).

Pour d'autres protéines enfin, la fixation de la CNX est également impliquée dans les mécanismes de dégradation. Ainsi, la fixation de la CNX au CFTR ou au facteur pro- $\alpha$  pourrait les conduire par des mécanismes encore non identifiés, à la retranslocation et à la dégradation par le protéasome (Farinha et coll, 2005; Mc Cracken et coll, 1996).

## II.2.C. La Grp94

### II.2.C.a. La structure et le mécanisme d'action de Grp94

Une autre protéine chaperon majeure du RE et du CQ est la Grp94. Cette protéine régulée par une privation en glucose appartient à la famille des Hsp90 avec lesquelles elle partage près de 60% d'homologies de séquence. Comme ces dernières, la Grp94 se présente sous forme d'homodimère. Elle arbore un domaine capable de fixer l'ATP, malgré sa faible activité d'hydrolyse de l'ATP, ainsi qu'une région C-terminale contenant la séquence de rétention dans le RE, KDEL (pour revue, Argon et coll, 1999).

Le mécanisme d'interaction de Grp94 avec les peptides et les protéines reste mal connu. Les protéines qui interagissent avec la Grp94 comme les chaînes  $\mu$  et  $\delta$  des Igs, la thyroglobuline ou bien la protéine C, une protéase à sérine aux propriétés anticoagulantes, sont sous formes d'intermédiaires de repliement ou en cours d'assemblage. De plus, un choc thermique augmente les capacités d'interaction de Grp94 (Wearsch et coll, 2004). Ceci laisse donc à penser que Grp94 se lie préférentiellement à des protéines incorrectement repliées ou assemblées présentant probablement des régions hydrophobes et habituellement non exposées.

Le mécanisme d'interaction de la Grp94 avec les protéines est stimulé par la fixation des nucléotides au niveau du domaine de liaison N-terminal de ces derniers. Cette fixation entraîne en effet, un changement conformationnel de la Grp94 qui augmente les capacités de fixation des protéines et l'activité de Grp94 (Wassenberg et coll, 2000 ; Immormino et coll, 2004). Ainsi, la fixation de l'ATP entraînerait un changement de conformation et la dimérisation des domaines N-terminaux des homodimères de Grp94, présentant alors le site de fixation pour les substrats de la chaperon, tandis que la dissociation du nucléotide engendrerait par la suite la dissociation des domaines amino-terminaux et la libération des protéines (Immormino et coll, 2004). Ce mécanisme d'activation de la Grp94, indépendant de l'hydrolyse de l'ATP diffère par rapport au mécanisme d'activation proposé pour les Hsp90, qui décrit un mécanisme dépendant de la fixation et de l'hydrolyse de l'ATP (Scheibel et coll, 1998).

### **II.2.C.b. Les rôles de Grp94**

Les études réalisées sur les immunoglobulines ou la protéine C, ont montré que les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des Igs, en cours de repliement et d'assemblage (Melnick et coll, 1992), et un mutant de la protéine C (Katsumi et coll, 1995), sont retenus au niveau du RE en association avec la Grp94 de manière plus prononcée que ce que ne le sont les Igs assemblés et les hétérodimères de la protéine C.

De plus, les complexes formés avec la Grp94 contiennent également la protéine BiP. Ceci suggère donc que BiP et Grp94 peuvent agir de concert mais de manière séquentielle pour permettre la rétention dans le RE et pour prévenir l'agrégation des chaînes peptidiques des protéines en cours de repliement et/ou non assemblées jusqu'à leur repliement et leur assemblage corrects (Melnick et coll, 1992 et 1994). De même, il a été démontré qu'une surexpression de la Grp94 augmente le temps de rétention de la thyroglobuline (Tg) au niveau du RE et que cette dernière est associée en complexes avec la Grp94 et la protéine BiP (Muresan et coll, 1997). Le fait que Grp94 et BiP agissent de manière séquentielle sur les mêmes intermédiaires de repliement, suggère que bien qu'elles se fixent sur les protéines nouvellement synthétisées, exposant des régions hydrophobes, elles présentent probablement des spécificités de reconnaissance différentes (Melnick et coll, 1994 ; Muresan et coll, 1997).

Ainsi, Grp94 se lie préférentiellement aux intermédiaires de repliement ou aux oligomères incomplètement assemblés et peut rester associé après l'assemblage des sous unités (cas des Igs), ce qui suggère son activité de protéine chaperon et son intervention dans les étapes tardives du repliement des protéines (Melnick et coll, 1994).

### **II.2.D. La famille des protéines disulfure isoméras**

Avec la protéine BiP et la GRp94, la PDI, premier membre de la famille des PDI identifié, est fortement exprimée dans le RE où elle y est retenue grâce à son motif KDEL. Comme les protéines chaperons majeures, elle est régulée au niveau transcriptionnel en réponse à un stress du RE (UPR) grâce à des éléments UPRES présents dans sa région promotrice.

### II.2.D.a. La structure et le mécanisme d'action des PDI

Les protéines de la famille des PDI sont des oxydo-réductases possédant des domaines similaires à la thiorédoxine, oxydoréductase des groupements –thiol impliquée dans de nombreuses réactions d'oxydo-réduction.

Différentes membres de cette famille, exprimés de manière ubiquitaire dans les cellules animales, ont été identifiées, la PDI mais également l'ERp72, l'ERp57 ou ER60 (Bourdi et coll, 1995) ou bien encore la «*protein disulfure isomerase-related protein*», la PDIR. La PDI et l'ERp57 présentent deux domaines thiorédoxines tandis que l'ERp72 et la PDIR en présente trois. Ces domaines arborent chacun deux séquences thiorédoxines C-X-X-C qui composent les sites catalytiques de l'oxydoreductase.

Les autres domaines, par exemple le domaine b' de la PDI (Pirneskoski et coll, 2004), de la PDIR (Horibe et coll, 2004) ou de l'ERp57 (Russell et coll, 2004; Urade et coll, 2004) ainsi que le domaine c de la PDI (Tian et coll, 2004), sont impliqués dans l'interaction et la stabilisation de l'interaction entre l'isomérase et les intermédiaires de repliement. Ils jouent également sur la spécificité de reconnaissance des substrats (Horibe et coll, 2004). Les différentes PDI pourraient donc agir sur des classes de substrats différents. Ainsi, si la PDI semble avoir une affinité pour les peptides caractéristiques des protéines en cours de repliement, résidus chargés et hydrophobes exposés en surface (Zapun et coll, 1999), les études menées sur ERp57 ont mis en évidence l'intervention spécifique, de cette dernière, dans le repliement des glycoprotéines (Elliott et coll, 1997; Oliver et coll, 1997). ERp57 reconnaît ainsi les glycoprotéines néosynthétisées incorrectement repliées et monoglucosylées en association avec la CNX ou la CRT (Oliver et coll, 1999; Radcliffe et coll, 2002; Kang et coll, 2002).

Les PDI sont responsables d'une part de la formation des ponts disulfures entre 2 résidus de cystéines et d'autre part du réarrangement des ponts S-S incorrects existant dans les protéines en cours de repliement ou définitivement mal repliées. Ces deux fonctions font appel à des réactions d'oxydo-réduction et d'isomérisation. Dans le RE, la forme oxydée de la PDI attaque les groupements thiols des cystéines entraînant la formation des ponts disulfures. La forme réduite réagit avec les ponts disulfures présents sur les intermédiaires de repliement. Cette réaction peut conduire à la formation des ponts S-S natifs et à la libération de la PDI ou après réduction de la liaison PDI-cystéine, à la libération des groupements thiols de la protéine (Wilkinson et coll, 2004).



Plusieurs cycles d'oxydoréduction sont probablement nécessaires pour établir les ponts S-S natifs. Dans le cas des glycoprotéines, l'action de l'ERp57 est dépendante des cycles d'association/dissociation avec la CNX/CRT (Fig. 9).

#### **II.2.D.b. Les rôles connus des PDI**

Le rôle principal des PDI est d'assister la formation et le réarrangement des ponts disulfures incorrects qui s'établissent au cours du repliement des protéines. Elles permettent ainsi, aux protéines mal repliées, d'acquérir leur conformation et/ou leur assemblage correct.

Bien qu'elles agissent toujours en tandem avec les protéines chaperons, elles pourraient également jouer elle-même, un rôle de chaperons, à proprement parler. Par exemple, les chaînes des molécules du CMH-I (Farmery et coll, 2000) ou une des sous-unités du récepteur des asialoglycoprotéines (Frenkel et coll, 2004) restent associées à ERp57 après dissociation de la CNX/CRT, de manière indépendante des oligosaccharides. Dans ces cas, les PDI pourraient être responsables du maintien des protéines dans un état compétent pour le repliement (Pandhare et coll, 2004) ou pour l'assemblage de sous-unités, (McLaughlin et coll, 1998; Bottomley et coll, 2001), ou être indispensable à la protection des protéines contre une dégradation prématurée (Frenkel et coll, 2004) ou au contraire nécessaire pour la rétention au niveau du RE des protéines mal repliées avant leur translocation et dégradation (Farmery et coll, 2000; Qui et coll, 2004).

De manière intéressante, les PDI peuvent intervenir dans la maturation et la sécrétion de protéines ne présentant pas de ponts disulfures dans leur état natif (Smith et coll, 2004). De telles associations avec la PDI ou l'ERp57 pourraient impliquer des déterminants conformationnels témoins d'un état non natif ou la formation de liaisons disulfures entre les isomérase et les cystéines exposées à la surface des intermédiaires de repliement des (glyco)protéines en cours de repliement (Smith et coll, 2003 ; Frenkel et coll, 2004). Ceci renforce l'hypothèse de l'activité chaperon des membres de la famille des PDI.

De plus, il a été démontré que la PDI pouvait également promouvoir l'agrégation de certaines protéines en fonction de sa concentration. Ainsi, en présence de concentrations croissantes de PDI, le lysozyme est retenu sous forme agrégée dans le RE (Sideraki et coll, 2000). Cette fonction dite anti-chaperon, de la PDI (Whiteley et coll, 1997), permet de stocker les protéines dans un état incorrectement replié mais réversible qui après maturation peuvent acquérir une conformation native et suivre la voie de sécrétion.

Ainsi les différents membres de la famille des PDI semblent présenter une fonction de protéine chaperon en plus de leur rôle de catalyseurs de la formation des ponts disulfures.

### **II.3. La sélection des substrats du contrôle de qualité du RE**

Une des questions cruciales dans l'étude du CQ des protéines est de savoir comment la machinerie du CQ distingue les protéines néosynthétisées en cours de repliement de celles ayant acquis leur conformation native et surtout comment elle discrimine les intermédiaires de repliement des protéines définitivement mal repliées ou anormales devant être adressées aux mécanismes de dégradation.

Le lien existant entre les machineries de repliement et de dégradation associées au CQ repose essentiellement sur l'intervention concertée et/ou séquentielle des protéines chaperons et des différents senseurs du repliement et de la dégradation des protéines ainsi que des facteurs intrinsèques des protéines, comme le type protéique, la vitesse de repliement et la stabilité.

#### **II.3.A. Action concertée et séquentielle des chaperons.**

Comme nous l'avons vu précédemment, les protéines synthétisées dans le RE, interagissent dès leur entrée dans la lumière du compartiment avec les protéines résidentes du RE. Le CQ du RE, basé sur la rétention des protéines néosynthétisées, permet aux protéines de stationner dans le compartiment de repliement et d'assemblage des protéines de la voie de sécrétion et garantit la dégradation des produits non conformes et la sortie des protéines aptes au service.

Les études menées pour mettre en évidence le rôle et l'action des protéines chaperons et des autres catalyseurs de repliement ont montré l'existence de complexes multimériques issus de l'association de différents facteurs moléculaires. Ainsi, on distingue « le complexe BiP » qui se compose de la protéine BiP associée à la PDI et « le complexe CNX » qui compte la CNX et la protéine isomérase ERp57. La CRT qui est soluble interagit avec ERp57 et est parfois associée au complexe BiP. Certaines protéines interagissent plus particulièrement avec « le complexe CNX » comme la glycoprotéine HA (Daniels et coll, 2003) ou avec « le complexe BiP » comme les immunoglobulines (Mayer et coll, 2000 ; Chillaron et coll, 2000) ou le mutant soluble de la tyrosinase humaine (Popescu et coll, 2005).

D'autres protéines font intervenir les deux complexes de manière successive comme la thyroglobuline (Kim et Arvan, 1992 et 1993), les molécules du CMH de classe I (Radcliffe et coll, 2002 ; Kang et coll, 2002 ; Paulsson et coll, 2003), la sécrétase  $\alpha$  (Molinari et coll, 2002) ou l'apolipoprotéine B (Zhang et coll, 2003).

Ces interactions séquentielles avec les deux systèmes, CNX et BiP, peuvent être nécessaires pour obtenir le repliement correct des protéines comme dans le cas de la protéine pE du virus SVF (Molinari et coll, 2001) ou avoir des effets opposés comme dans le cas de la  $\alpha$  sécrétase pour laquelle la CNX a un rôle protecteur et le complexe BiP/PDI un rôle de senseur de la dégradation (Molinari et coll, 2002).

Les protéines chaperons et catalyseurs de repliement peuvent également mener au sein même du complexe chaperon des actions concertées ou distinctes. Ainsi pour la myéloperoxydase, la CNX fixe les proformes et les pro-MPO ainsi que les apopro-MPO respectivement pourvues et dépourvues de l'hème tandis que la CRT n'interagit qu'avec l'apopro-MPO, suggérant un relais entre la CRT puis la CNX lors du processus de repliement et de maturation de la protéine (Naussef et coll, 1998). De manière similaire, la dégradation des formes mal repliées du facteur pro- $\alpha$  est conduite par l'action successive de la BiP, responsable de la dissociation des formes agrégées du facteur, puis de la PDI qui adresse vraisemblablement via d'autres facteurs, les formes monomériques vers le translocon et la dégradation par le protéasome (Gillece et coll, 1999).

Des rôles opposés ont également été attribués à la CNX et à ERp57. En effet, lors de la maturation des chaînes du récepteur des asialoglycoprotéines, la CNX retient les protéines dans le RE avant leur retranslocation tandis qu'une association prolongée avec ERp57 les protège de la dégradation et favorise le repliement correct (Frenkel et coll, 2004). Ici, comme pour les molécules du CMH-I (Farmery et coll, 2000), la prolongation de l'interaction avec l'ERp57 après dissociation des lectines chaperons, protège les protéines de la dégradation et assiste leur repliement correct.

Ces actions concertées et séquentielles reflètent l'existence de sous-ensembles des acteurs du CQ, séparés de manière spatiale ou temporelle au niveau du RE. En effet, une étude a mis en évidence la co-immunoprécipitation de BiP avec Grp94, la PDI et d'autres intervenant du CQ dans un complexe multi-protéique excluant la CNX, la CRT et l'ERp57 (Tatu et coll, 1997).

De même, une autre étude confirme l'existence d'une sous-compartmentalisation fonctionnelle du RE en montrant la colocalisation de la CNX avec la CRT mais pas avec BiP ni PDI, dans une région riche en complexe Sec61 lorsque l'on inhibe les mécanismes d'ubiquitinylation et de dégradation (Kamhi-Nesher et coll, 2001). Dans ces conditions, les chaînes lourdes des molécules du CMH-I incorrectement repliées et assemblées se concentrent dans une sous-région entre l'ERGIC et le cis-golgi (Kamhi-Nesher et coll, 2001).

Ainsi, il apparaît évident que les différents complexes et protéines chaperons rassemblées dans des sous compartiments du RE, ont des actions concertées et combinées dont les effets peuvent être orientés dans une même voie ou peuvent être opposés pour conduire les protéines naissantes vers le repliement et la dégradation.

### **II.3.B. Les facteurs intrinsèques aux protéines intervenant dans le CQ**

Les études menées pour identifier les déterminants responsables de l'interaction sélective des protéines avec l'un ou l'autre des complexes chaperons ont mis en évidence le rôle primordial de la N-glycosylation et de l'exposition en surface de régions hydrophobes, habituellement enfouies dans la protéine.

Ces deux principaux signaux et motifs de reconnaissance modulent ainsi la fixation simultanée ou séquentielle de chaque senseur du CQ du RE pour une protéine donnée. En effet, la CNX et la CRT ou bien encore EDEM (voir II.3.C) reconnaissent des motifs oligosaccharidiques particuliers portés par les protéines tandis que l'UGGT et BiP ont une affinité pour des régions hydrophobes présentes sur les protéines en cours de repliement.

La présence d'un motif oligosaccharidique dans les 50 premiers résidus amino-terminal de la chaîne néosynthétisée favorise l'interaction avec la CNX tandis qu'en absence de N-glycosylation précoce, la fixation de BiP est prioritaire (Molinari et coll, 2000).

Cependant, d'autres caractéristiques intrinsèques à la protéine en cours de repliement expliquent son interaction avec les acteurs du CQ. Ainsi, malgré la présence de nombreux sites potentiels de fixation de la protéine BiP sur de nombreuses protéines, l'interaction effective de BiP avec ces dernières n'est pas garantie. En effet, l'étude réalisée sur les immunoglobulines montre que malgré la présence de sites potentiels de fixation de BiP sur le domaine constant aucune interaction de ce dernier avec la protéine BiP n'est détectée à l'inverse du domaine variable. La rapidité de repliement du domaine constant de la chaîne légère des Ig empêche la fixation de BiP, tandis que le repliement plus lent et la stabilité plus faible du domaine variable de la chaîne, favorise la reconnaissance avec BiP.

Ainsi, la fixation de BiP est largement dépendante de la stabilité et de la rapidité de repliement des protéines (Hellman et coll, 1999). Cette étude suggère que BiP se fixe préférentiellement à des protéines qui se replient lentement et/ou présentent une instabilité conformationnelle de leur forme repliée.

Comme pour BiP, l'interaction avec les autres acteurs du CQ pourrait largement dépendre du taux de repliement de la protéine et de la stabilité de la protéine, et donc du temps passé dans le RE. Ainsi, l'instabilité des formes dépliées par rapport aux états natifs des protéines expliquent l'interaction et la rétention prolongées des formes incorrectement repliées avec les acteurs du CQ du RE, et pourrait justifier la dégradation préférentielle de ces dernières (Wu et coll, 2003).

Un autre déterminant structural impliqué dans la sélection des substrats du CQ est la classe de la protéine considérée. En effet, en étudiant le mécanisme de dégradation de différentes protéines membranaires ou solubles, il est apparu que les substrats membranaires sont retenus dans le RE, tandis que les solubles sont d'abord transportés dans le Golgi avant d'être retransloqués dans le RE et dégradés (Calwell et coll, 2001 ; Vashist et coll, 2001).

Cette ségrégation des CQ suivant la classe des protéines est renforcée par les travaux de l'équipe de Ng. D'après ces études, les molécules membranaires seraient soumises à un CQ impliquant les protéines chaperons cytoplasmiques telle Hsp70 ou Hsp90, comme dans le cas d'un mutant du CFTR (Loo et coll, 1998b; Farinha et coll, 2005), tandis que les molécules solubles de la voie de sécrétion feraient intervenir les facteurs du CQ du RE comme BiP et htm1p/EDEM (Vashist et coll, 2001 et 2004). Ces deux mécanismes de CQ distincts suivant le caractère soluble ou membranaire de la protéine, agiraient successivement en scannant dans un premier temps les domaines cytoplasmiques des protéines membranaires puis leurs domaines exposés dans la lumière du RE et les protéines solubles, suggérant donc que le site protéique présentant un défaut de repliement est responsable de la sélection du mécanisme d'ERAD utilisé pour dégrader la protéine (Vashist et coll, 2004).

Cependant, les cas et les études contradictoires, notamment dans le cas des mutants solubles de la CPY et du facteur pro- $\alpha$  dont les mécanismes de dégradation sont indépendants de BiP et du transport vers l'appareil de Golgi (Taxis et coll, 2003; McCracken et coll, 1996), laissent entrevoir la complexité des processus de dégradation associée au CQ suivant les caractéristiques propres des protéines et les facteurs moléculaires requis.

### II.3.C. Ségrégation et interdépendance des mécanismes de repliement et de dégradation.

Lorsqu'une protéine donnée entre dans le RE une décision finale devra être prise pour l'acheminer vers les compartiments distaux de la voie de sécrétion ou l'envoyer vers la dégradation. Les acteurs du CQ impliqués dans son repliement correct et/ou dans sa dégradation agissent de manière fine pour promouvoir le repliement mais garantir la dégradation des protéines qui n'auront pas atteint ce but.

Le mécanisme le mieux étudié et caractérisé concerne le CQ des glycoprotéines via le cycle d'interaction avec la CNX/CRT. En effet, comme décrit précédemment, la glycoprotéine naissante interagit avec la CNX/CRT de manière cyclique jusqu'à sa libération finale et son transport hors du RE. Mais si elle ne parvient pas à acquérir une conformation correcte, elle peut être adressée au mécanisme d'ERAD. Les cycles d'association/dissociation à la CNX et l'adressage à l'ERAD sont respectivement modulés par l'action de la glucosidase II et de l'UGGT, et de la mannosidase I du RE et d'une lectine similaire à la mannosidase I, la molécule EDEM. Tant que la protéine présente des régions hydrophobes, les cycles de glycosylation/deglycosylation et donc d'association/dissociation avec la CNX s'enchaînent, donnant à chaque fois une chance à la protéine d'acquérir sa conformation native, par exemple par l'intervention de ERp57 sur les ponts disulfures et la protégeant de la dégradation. Lorsque la mannosidase I intervient, l'affinité de la protéine dé-mannosylée pour l'UGGT et/ou la glucosidase II est alors diminué. Le cycle d'association/dissociation entre la CNX et la protéine est alors interrompu. Si la protéine n'est toujours pas dans une conformation correcte et compétente pour le transport, le mécanisme de dégradation prend alors le relais. Il fait intervenir la lectine EDEM pour «*ER degradation enhancing  $\beta$ -mannosidase-like protein* » (htm1p chez la levure). Cette protéine membranaire est associée à la CNX et reconnaît les protéines présentant un motif Man8GlcNac2 (Hosokawa et coll, 2001; Oda et coll, 2003; Molinari et coll, 2003).

L'interaction avec EDEM conduit à la translocation vers le protéasome cytoplasmique de la CPY, du CFTR et d'un mutant de l'inhibiteur  $\alpha$ -1 antitrypsine (Jakob et coll, 2001; Hosokawa et coll, 2003; Gnann et coll, 2001; Farinha et coll, 2005). Le mécanisme d'adressage à la dégradation des glycoprotéines après interaction avec EDEM est mal connu et pourrait faire intervenir d'autres facteurs protéiques pour d'une part discriminer les conformations des protéines et d'autre part pour permettre l'interaction entre EDEM et la machinerie de translocation.

En outre, l'existence de motifs oligomannosylés autres que Man<sub>8</sub>GlcNac<sub>2</sub> et issus de l'action d'autres mannosidase du RE (Hosokawa et coll, 2001) ou de l'appareil de Golgi, pour les protéines dont la dégradation dépend du trafic RE-Golgi (Caldwell et coll, 2001), suggère fortement l'implication d'autres couples « motif oligosaccharidique/lectine » dans les mécanismes de dégradation des glycoprotéines (Wilson et coll, 2000). De plus, l'importance des mannosidases semble aller au-delà de leur implication dans la dégradation par le protéasome, puisque ces dernières pourraient jouer un rôle dans l'adressage des protéines vers la dégradation par les protéases du RE, par exemples pour la CPY (Mancini et coll, 2003) ou la TPO (V. Le Fourn et J-L. Franc, données non publiées).

Les différents acteurs du CQ, senseurs du repliement comme l'UGGT et la glucosidase II et senseurs des voies de dégradation comme les mannosidases et les lectines du RE rentrent en compétition pour la fixation des mêmes substrats. Il est envisagé que les mannosidases agissent moins rapidement et avec moins d'affinité sur les protéines néosynthétisées que l'UGGT. De plus, la répartition des différents senseurs du repliement et de la dégradation des protéines est probablement une des clés de la compréhension du CQ des protéines de la voie de sécrétion. En effet, la localisation de Sec61, de l'UGGT, de la glucosidase II et des mannosidases, dans des sous-compartiments du RE et de la voie de sécrétion (Kamhi-Nesher et coll, 2001; Zuber et coll, 2000 et 2001), suggère que la répartition spatiale et temporelle des acteurs du CQ est fortement impliquée dans la ségrégation et l'interdépendance des mécanismes de repliement et de dégradation des protéines.

#### **II.4. Les mécanismes de dégradation associés au contrôle de qualité du RE**

Le contrôle de qualité de la voie de sécrétion, implique la dégradation des protéines qui ne peuvent acquérir leur structure tridimensionnelle native au cours de leur passage dans le RE. Le modèle de dégradation associé au RE, appelé ERAD fait intervenir le protéasome cytoplasmique responsable de la dégradation des protéines solubles du cytoplasme. Il nécessite donc la retranslocation des protéines solubles et transmembranaires du RE et peut impliquer le mécanisme d'ubiquitinylation des protéines devant être adressées au complexe protéolytique du protéasome.

La dégradation effective de certaines protéines du RE en présence d'inhibiteurs du protéasome a mis en évidence le rôle de protéases du RE dans le contrôle de qualité et la dégradation associée au RE.

## **II.4.A. La dégradation par le protéasome**

### **II.4.A.a. La retranslocation des protéines hors du RE**

Les protéines mal repliées retenues au niveau du RE doivent, pour être dégradées par le protéasome cytoplasmique, traverser la membrane du RE. De nombreuses études ont démontré l'implication du *translocon*, complexe protéique transmembranaire composé de plusieurs protéines sec61. Ainsi, en plus de son rôle dans la translocation co-translationnelle des protéines néosynthétisées, il joue un rôle dans la retranslocation de ces dernières.

Cependant, l'identification des protéines associées aux canaux sec61 lors de la retranslocation suggère l'existence de deux sous-populations de translocons spécialisés dans la translocation ou dans la retranslocation. On ne sait pas si un même translocon peut jouer successivement ces deux rôles suivant les partenaires protéiques recrutés dans son complexe ou si les deux populations distinctes sont permanentes et/ou topologiquement établies.

Chez la levure, les protéines membranaires associées à Sec61 sont la lectine Htm1p/EDEM, impliquée dans les mécanismes de dégradation des glycoprotéines, Hrd3 et Der3/Hrd1 qui ont un rôle dans l'ubiquitinylation des protéines transloquées (Kostova et coll, 2003).

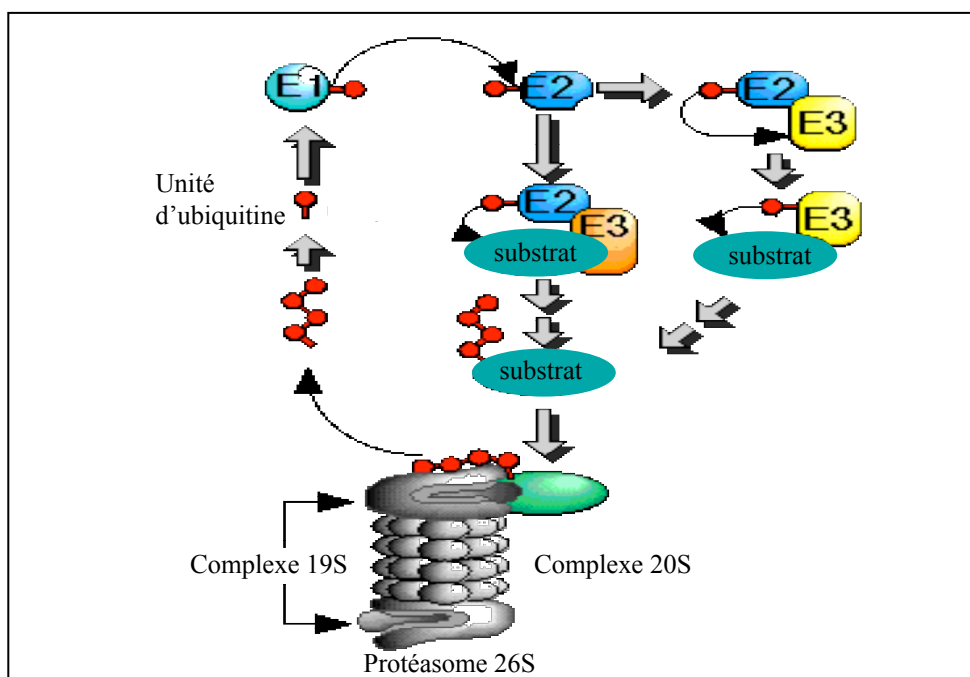
De plus, un complexe cytosolique composé de protéines cdc48, membre de la famille des ATPases AAA, est impliqué dans l'extraction des protéines à travers la membrane du RE. Ce complexe intervient notamment dans la dégradation de mutant du CFTR (Gnann et coll, 2004).

### **II.4.A.b. L'ubiquitinylation**

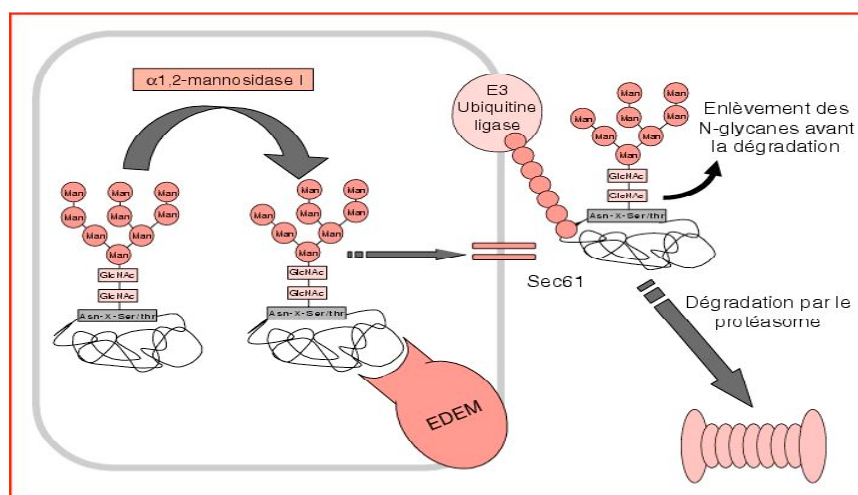
La dégradation des protéines cytosoliques par le protéasome nécessite le marquage des protéines à dégrader par l'ajout de plusieurs molécules d'ubiquitine signalant et adressant ainsi au protéasome les protéines à éliminer.

L'ubiquitinylation consiste en la fixation sur des résidus lysine des protéines, de plusieurs molécules de 76 résidus d'acides aminés, l'ubiquitine. Le mécanisme ubiquitinylation requiert l'action de trois types d'enzymes, d'activation, E1s, de conjugaison, E2s, et de liaison, E3s et de l'ubiquitine. Les molécules d'ubiquitine sont liées de manière dépendante de l'ATP aux enzymes d'activation E1s, puis transférées sur l'enzyme de conjugaison E2s. Enfin, la ligase E3 catalyse la fixation de l'ubiquitine sur un résidu lysine de la protéine.





**Fig 10: Le système de dégradation par le protéasome 26S.** Le système de dégradation par le protéasome, formé des complexes 19S et 20S, fait généralement intervenir le « marquage » des protéines à dégrader par plusieurs unités de molécules d'ubiquitine. Ces dernières sont fixées sur la protéines de manière covalente par un complexe enzymatique de diverses ligases et protéines activatrices.



**Fig 11: Dégradation des glycoprotéines dépendante de la N-glycosylation.** L'action de la mannosidase I du RE entraîne la formation du motif glycanique Man<sub>8</sub>-GlcNAc sur les glycoprotéines. Ce motif est reconnu par une lectine appelée EDEM qui par interaction favorise l'adressage de certaines glycoprotéines vers la dégradation associée au RE (ERAD) par le protéasome.

Plusieurs molécules d'ubiquitine sont généralement liées de manière coopérative sur la lysine en position 48 de la molécule d'ubiquitine précédente.

Chez la levure, la machinerie d'ubiquitinylation des protéines du RE vouées à la dégradation, a été identifiée au niveau de la face cytoplasmique de la membrane du RE. Elle se compose de différentes protéines membranaires et solubles similaires aux enzymes cytosoliques E1s, E2s et E3s. Diverses enzymes UBC, pour « *ubiquitine conjugating enzyme* », Ubc1, 6, 7 et protéines dites HRD/DER, pour « *Hmg-CoA reductase degradation* » et « *degradation in the ER* », Hrd/der3, ont ainsi été retrouvées associées aux complexes sec61. Les homologues de ces enzymes dans les cellules animales restent à identifier. La protéine gp78 présentant des similitudes fonctionnelles avec les enzymes E3s a été identifiée au niveau de la membrane du RE (Fang et coll, 2001).

L'ubiquitinylation des protéines sert d'une part à la reconnaissance des substrats par le protéasome et d'autre part à la retranslocation unidirectionnelle des protéines hors du RE. Ainsi, l'ubiquitinylation progressive des protéines en cours de retranslocation servirait de mécanisme d'extraction des protéines.

De très nombreux substrats de l'ubiquitinylation sont actuellement connus comme le CFTR, la réductase HMG-CoA (Hampton et coll, 1996) ou bien encore la pompe à proton H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (Kimura et coll, 2003). Cependant, d'autres substrats de l'ERAD ne requièrent pas d'ubiquitinylation pour être reconnus et dégradés par le protéasome. C'est le cas du facteur pro- $\alpha$  (McCracken, 1996) ou de l'ApoB (Liao et coll, 2003). Une étude récente suggère que le rôle de l'ubiquitinylation ne va pas au-delà de sa fonction d'adressage des protéines au protéasome (Janse et coll, 2004).

### **II.3.A.c. Le complexe du protéasome**

Le complexe protéolytique du protéasome 26S, est composé d'une structure centrale, le 20S, formant un canal et de deux structures 19S, formant la base et le couvercle du canal. La structure cylindrique 20S comporte 4 rangs de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , tandis que les structures 19S sont constituées d'ATPases et de protéines non ATPases intervenant dans l'interaction des substrats avec le protéasome, dans la dé-ubiquitinylation ainsi que dans la régulation des entrées/sorties du protéasome.

Une fois dans le canal 20S, les protéines subissent une protéolyse grâce aux activités endoprotéolytiques du protéasome similaires à celles de la trypsine, de la chymotrypsine et de la peptidyl-glutamyl peptidase.

Le protéasome pourrait également être lui-même impliqué dans l'extraction des protéines hors du RE. Cette hypothèse provient d'études montrant le blocage de la rétrotranslocation par des inhibiteurs du protéasome. Ceci suggère l'association des complexes du protéasome avec les canaux de retranslocation Sec61 sur la face cytoplasmique de la membrane du RE, soit de manière directe, impliquant l'existence de translocons exclusivement dédiés à la retranslocation, soit de manière indirectement via son interaction avec la machinerie d'ubiquitinylation recrutée au niveau du canal Sec61 (McCracken et coll, 2003).

Les protéines de la voie de sécrétion dégradées par ce mécanisme sont nombreuses. Les études majeures ont porté sur le CFTR (Jensen et coll, 1995), le facteur pro- $\alpha$  (McCracken et coll, 1996), les formes incorrectement repliées de la TPO (Fayadat et coll, 2000a), ainsi que le mutant Z de l'inhibiteur  $\alpha$ 1-antitrypsine (Teckman et coll, 2001).

### **II.3.B. Les voies de dégradation alternatives : les protéases du RE**

Différentes études ont mis en évidence l'abolition partielle de la dégradation de certaines protéines du RE synthétisées en présence d'inhibiteurs du protéasome comme le MG132, la lactacystine ou l'ALLN. Ceci a suggéré l'intervention de mécanisme de dégradation alternatif au protéasome comme pour le CFTR (Jensen et coll, 1995; Farinha et coll, 2005), la hTPO (Fayadat et coll, 2000), ou la CPY (Mancini et coll, 2003).

Ces voies de dégradation alternatives impliquent vraisemblablement des protéases du RE. Ces dernières peuvent initier le mécanisme de dégradation de certaines protéines incorrectement repliées comme le récepteur de l'insuline (Bass et coll, 2000) ou un mutant de la glycoprotéine P de la famille des ABC transporteurs (Loo et Clarke, 1998) ou être directement responsable de la dégradation du substrat notamment pour la protéine membranaire stéaroyl-CoA désaturase (SCD) (Heinemann et coll, 2003a, b, c).

Les études d'inhibition de cette voie de dégradation alternative suggèrent que des protéases à sérine et à cystéine ou des metalloprotéases pourraient être directement impliquées dans la dégradation de certaines protéines non mutées mais incorrectement repliées comme la TPO humaine (Fayadat et coll, 2000) et l'ApoB (Qui et coll, 2004) ou de protéines mutantes comme le lysozyme humain (Otsu et coll, 1995).

Les études menées sur la dégradation de l'apolipoprotéine B, suggèrent l'implication de la protéine ERp57. En effet, cette dernière possède une activité similaire à celle des protéases à cystéine inhibées par l'ALLN, la leupeptine et l'E64 (Urade et coll, 1992).

Responsable de la dégradation *in vitro* d'un mutant du lysozyme humain incapable de se replier correctement (Otsu et coll, 1995), la surexpression de ERp57 dans les cellules exprimant l'ApoB accroît la dégradation et diminue la sécrétion de la protéine (Qui et coll, 2004). Cependant, l'action de ERp57 sur la dégradation non protéasomale de l'ApoB pourrait être indirecte et liée à son rôle de protéines chaperon du CQ du RE (Schmitz et Herzog, 2004).

De manière beaucoup plus évidente, la SCD, impliquée dans le métabolisme des acides gras au niveau des cellules hépatiques, est dégradée dans le RE par un mécanisme insensible à la lactacystine, mettant en jeu des protéases à sérines membranaires (Heinemmann et coll, 2003). Les études suivantes ont permis de caractériser la protéase impliquée dans cette dégradation. Il s'agit d'une protéine membranaire de 90kDa similaire au plasminogène précurseur de la plasmine, enzyme protéolytique plasmatique (Heinemmann et coll, 2003a).

Les profils d'inhibition de la dégradation de certaines protéines par un mécanisme indépendant du protéasome laissent à penser que d'autres protéases résidant dans le RE pourraient être engagés dans les mécanismes d'ERAD.

La diversité des protéines sécrétées et membranaires, des modifications post-traductionnelles et des mécanismes de repliement et de dégradation identifiées jusqu'à présent ont mis en évidence la complexité et l'adaptabilité du CQ du RE et de la voie de sécrétion en général.

Les nombreuses études visant à établir des règles permettant de prédire le mode de repliement et de trafic intracellulaire des protéines, et de manière générale la synthèse des protéines, se heurtent déjà aux exceptions des mécanismes de CQ édictés jusqu'ici. Par exemple les glycoprotéines dont la dégradation par le protéasome n'implique pas un facteur de type lectine ou les protéines incorrectement assemblées qui passent quand même le CQ. De plus, les mécanismes de repliement et de dégradation des protéines non-glycosylées et/ou ne faisant pas intervenir le complexe CNX, mais les autres acteurs du CQ, BiP, PDI (Gillece et coll, 1999), impliquent probablement d'autres censeurs qui restent à déterminer.

Ces données suggèrent l'existence de nombreux modèles de CQ à découvrir.

### III. La protéolyse limitée des précurseurs protéiques

#### III 1. Généralités

De nombreuses protéines membranaires ou sécrétées, synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique et traversant la voie de sécrétion, sont initialement exprimées sous formes de précurseurs protéiques actifs ou inactifs. Durant leur maturation, elles subissent une protéolyse limitée d'une ou plusieurs parties de leur chaîne polypeptidique. Ces clivages sont catalysés par des protéases de la voie de sécrétion qui excisent de manière constitutive ou régulée des régions peptidiques appelées propeptides, prodomaines ou prosequences. Ces processus peuvent également engendrer la production de protéines différentes à partir d'un même précurseur protéique.

La nature et le lieu d'action des protéases ainsi que le rôle du propeptide, avant et après clivage, varient d'une protéine à l'autre et dépendent des processus biologiques auxquels participent ces protéines.

Une large famille d'endoprotéases à sérines, regroupées sous le nom de *convertases* ou PCs, pour « *Proprotéines Convertases* », est impliquée dans ces protéolyses limitées. Ce processus de maturation a été initialement mis en évidence pour diverses protéases procaryotes et eucaryotes notamment les PCs elles-mêmes. Dans ce cas, le propeptide intervient dans l'activation et ou l'inhibition du domaine catalytique. Mais de nombreuses protéines sans activité catalytique, comme les pro-neuropeptides et pro-hormones du système neuroendocrinien des mammifères supérieurs ou certains récepteurs membranaires subissent l'action de ces convertases. Enfin, certaines protéines pathogènes utilisent les PCs dans leur mécanisme d'action, comme nous le verrons.

Les propeptides interviennent généralement dans la prise de conformation et/ou en tant qu'inhibiteur de l'activité catalytique de la protéine. Ils peuvent également favoriser le trafic intracellulaire et l'adressage des protéines matures vers leurs lieux d'expression et d'action physiologiques. Ces questions seront abordées dans le paragraphe III.3.

### III. 2. Une famille d'endoprotéases: la famille des convertases.

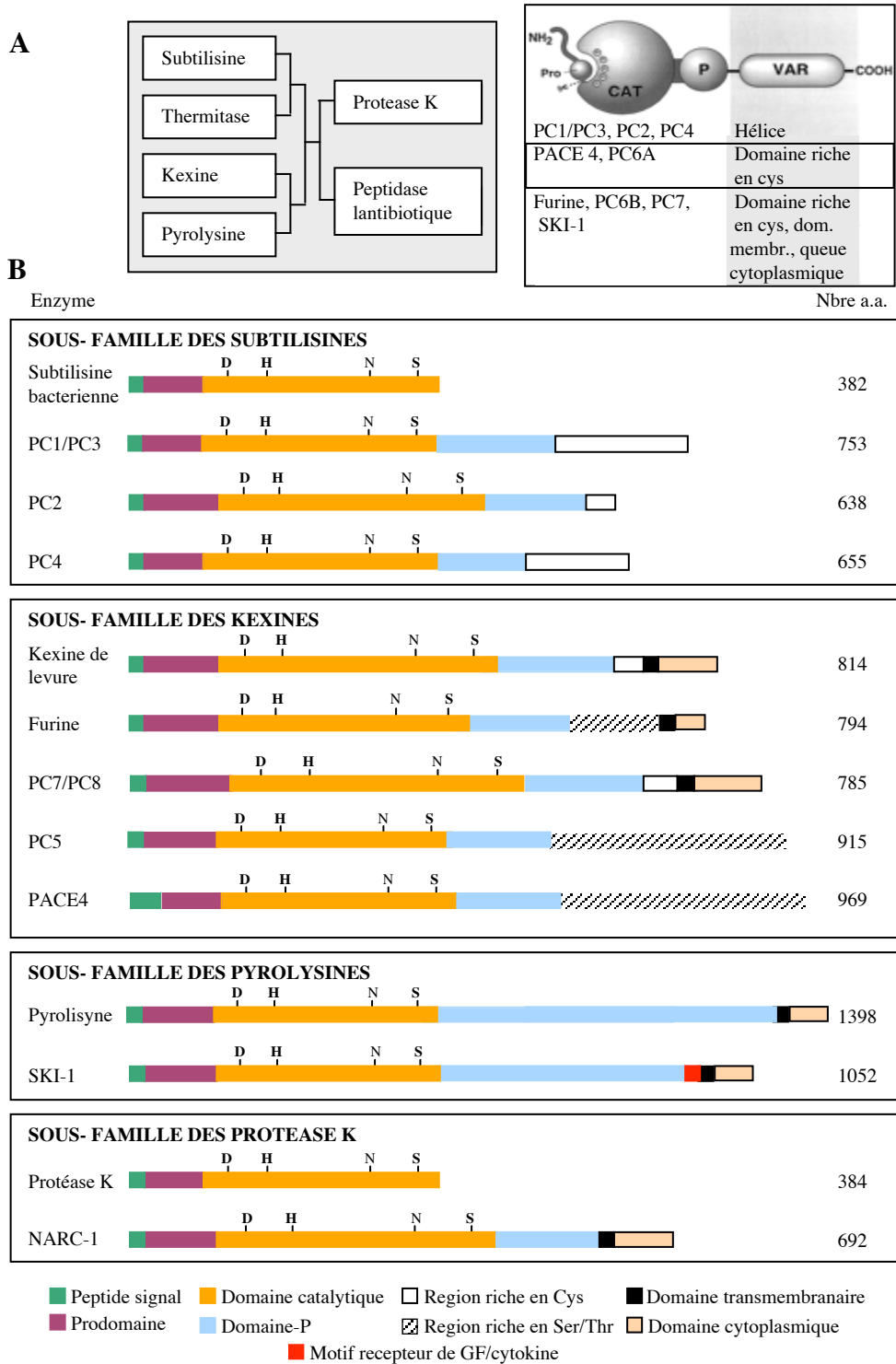
De nombreuses protéases similaires aux subtilisines bactériennes et aux kexines de levures ont été identifiées chez les eucaryotes supérieurs. Elles sont regroupées dans une superfamille d'endoprotéases appelées subtilases ou convertases (Siezen et coll, 1997). Par homologie de séquence entre leurs domaines catalytiques et d'après leur spécificité de clivage, les différentes PCs sont réparties dans six grandes sous familles. On note ainsi, les subtilisines, initialement identifiées chez les micro-organismes, et les kexines identifiées chez les eucaryotes, mais également les thermitases, les protéases K, les peptidases lantibiotiques et les pyrolysines que nous ne développerons pas (Fig 12. A).

#### III.2.A. Les caractéristiques structurales des convertases

Jusqu'à ce jour, neuf convertases ont été caractérisées chez les mammifères supérieurs. D'après le degré d'homologie de leur domaine catalytique, on peut rattacher les 9 PCs humaines aux différentes sous familles de subtilases.

Ainsi la PC1/PC3, la PC2 et la PC4 s'apparentent à la sous-famille des subtilisines tandis que la furine aussi appelée PACE pour « *paired amino-acid converting enzyme* », la PACE4, la PC5 et la PC7 au sous-groupe des kexines. Ces sept convertases clivent les précurseurs protéiques au niveau de motifs mono- ou dibasiques. La séquence de reconnaissance consensus, (Arg/Lys)-(X)<sub>n</sub>-Arg□, implique le clivage en C-terminal de l'arginine en position 1 (P1) et la présence d'un résidu d'arginine ou de lysine en position P2, P4 ou P6 en amont du site de clivage.

Deux autres PCs, plus récemment identifiées, clivent leurs substrats au niveau de résidus non basiques et de motifs de reconnaissance beaucoup moins spécifiques. Ainsi, SKI-1/S1P, avec son large domaine catalytique rejoint la famille des pyrolysines (Seidah et coll, 1999c). Cette convertase a été initialement identifiée comme étant l'endoprotéase S1P, responsable d'un des clivages endoprotéolytiques subis par les SREBPs, protéines impliquées dans le métabolisme des lipides (Sakai et coll, 1997). Elle clive préférentiellement après une leucine ou une thréonine au niveau du motif consensus, (Arg/Lys)-X-a.a.hydrophobe-(L,T,K,F)□, (Elagoz et coll, 2002). Quant à NARC-1, encore peu étudié, elle se rapproche des Protéases K et pourrait cliver les précurseurs après une leucine ou une méthionine (Naureckiene et coll, 2003 ; Seidah et coll, 2003).



**Fig 12 : Représentation de la superfamille des proprotéases convertases par homologies de séquence avec la subtilisine BPN<sup>o</sup> bactérienne et la kexine2 de levures.**

(A) L'arbre phylogénique représente les 6 sous-familles de la superfamille des subtilases basée sur l'homologie de séquence de leur domaine catalytique. Le modèle de structuration générale de cette famille est figurée dans le cadre de droite (d'après Zhou et coll, 1999). (B) La structure des différentes convertases de proprotéines (PCs) identifiées chez l'homme est représentée par homologie de séquence avec le représentant de la sous famille à laquelle elles appartiennent et entre elles, d'après la classification de Siezen, RJ, 1997. Le nom et le nombre de résidus d'acides aminés sont indiqués pour chaque PCs.

Bien qu'ayant des spécificités de clivage, des localisations tissulaires et cellulaires différentes (III.2.B.), elles ont toutes une structure similaire (Fig. 12. A) (Zhou et coll, 1999). Après une séquence signal, de 24 à 62 résidus, les PCs présentent un domaine propeptidique composé de 80 à 104 résidus. Le domaine catalytique qui suit le propeptide est d'environ 330 résidus et arbore la triade catalytique indispensable à l'activité biologique endoprotéasique des PCs. On trouve ainsi les résidus d'arginine et d'histidine en position N-terminale du domaine ainsi qu'une sérine à l'extrémité C-terminale. Après repliement correct et activation des convertases (III.2.C.), ces résidus se trouvent à proximité les uns des autres dans le site catalytique actif. A la suite de cette région amino-terminale très fortement conservée, entre 30 et 70% d'homologie (Seidah et coll, 1999b), les PCs présentent une région variable spécifique du sous-groupe de PCs auquel elles appartiennent. Un domaine plus ou moins long, nommé P-domaine, possédant des séquences riches en Cys ou en Ser/Thr, semble impliqué dans le trafic intracellulaire des PCs. Certaines convertases portent à la suite de cette région un domaine transmembranaire, c'est le cas pour la furine, PC5 et PC7 mais aussi pour SKI-1 et NARC-1.

### **III.2.B. La localisation cellulaire et tissulaire**

Par des techniques d'immunohistochimie, d'hybridation *in situ* ou de northern blot, l'expression des diverses PCs a été recherchée dans différents tissus et organes humains (Fig. 13). La furine et PC7 mais également SKI-1 et NARC-1 représentent une classe de PCs largement exprimée dans une variété de tissus (Seidah et coll, 1996b, 1999a, 2003). On les retrouve ainsi dans le système nerveux central aussi bien au niveau des cellules neuronales que des cellules gliales et des membranes épithéliales. La furine (Day et coll, 1993) et SKI-1 (Hendy et coll, 1995) sont également exprimées dans les tissus endocriniens comme l'hypophyse et la thyroïde. Elles interviennent généralement sur les substrats au niveau du TGN, dans les granules de sécrétion immatures et matures ou à la surface cellulaire. En ce qui concerne SKI-1, son activité peut intervenir dès le RE, lieu de son activation. PACE4 et PC5, également ubiquitaires et exprimées au niveau du TGN, semblent impliquées dans les stades du développement embryonnaire (Dong et coll, 1995 ; Hendy et coll, 1995). L'expression de PC1/PC3, PC2 et PC4 est beaucoup plus restreinte. PC1 et PC2 sont exprimées uniquement au niveau des cellules neuro-endocriniennes, notamment du système nerveux central, de l'hypophyse (Day et coll, 1995) et de la thyroïde (Kurabuchi et coll, 2002) où elles sont responsables du clivage de nombreux pro-neuropeptides et pro-hormones.



Enzyme	Localisation tissulaire	Localisation cellulaire	Précurseur protéique clivé
<b>Furine</b>	<i>Expression ubiquitaire en particulier :</i>  <i>système nerveux (SN) :</i> neurones, cellules gliales <i>système endocrinien :</i> hypothalamus hypophyse thyroïde parathyroïde pancréas	TGN /  Surface cellulaire /	<i>Pro-neuropeptides :</i> - pro-NGF, pro-BDNF, pro-neurotrophines <i>Pro-hormones :</i> - pro-PTH - pro-somatostatine <i>Prorecepteurs/proprotéases:</i> - pro-recepteur à l'insuline - MMPs et MT-MMPs
<b>PC7/PC8</b>			<i>Protéines pathogènes :</i> - GP virales (gp160),
<b>PACE4</b>	- (+SN, neurones)	Endosomes	- pro-toxines (pro-HA...)
<b>PC5/PC6</b>	- (+intestin grêle)		- prohormones - prorecepteurs
<b>PC1/PC3</b>	<i>Cellules neuro/endocriniennes :</i> SN: neurones Hypophyse Thyroïde Pancréas	Granules de sécrétion	<i>Pro-hormones :</i>  POMC (ACTH, □-LPH) pro-insuline pro-glucagon POMC (ACTH, □-MSH)
<b>PC2</b>			
<b>PC4</b>	<i>Cellules germinales :</i> testicules ovaires	ND	- pro-PACAP (polypeptide activant l'adnylate cyclase) - pro-ADAMs/integrines: ?
<b>SKI-1</b> <i>(Subtilisin/kexin isoenzyme-1)</i>	<i>Expression ubiquitaire en particulier :</i> hypophyse, thyroïde foie neurones (SNC et SNP)	RE/ TGN/ Surface cellulaire/ endosomes	<i>Pro-hormones :</i> - POMC, pro-somatostatine <i>Protéines pathogènes :</i> - GP virales (GP du virus de lassa, LCMV)
<b>NARC-1</b> <i>(Neural apoptosis-regulated convertase-1)</i>	<i>Expression transitoire</i> Neurones Intestin grêle foie, rein	ND	<i>Rôle dans la prolifération/différenciation</i> <i>Rôle dans la neurogénèse, l'hépatogénèse et la néphrogénèse.</i>

**Fig 13: Présentation des 9 convertases de la famille des subtilisines.** Pour chacune d'entre elles, sont donnés la localisation tissulaire et cellulaire ainsi que des exemples de substrats clivés. ND/? : non déterminé ou non identifié. (D'après Seidah et coll, 1997 et 1999).

Dans ce cas, les PCs sont exprimées au niveau de la voie de sécrétion régulée au sein des granules de sécrétion. Quant à PC4, son expression est limitée aux cellules germinales.

### **III.2.C. La synthèse et l'activation des convertases**

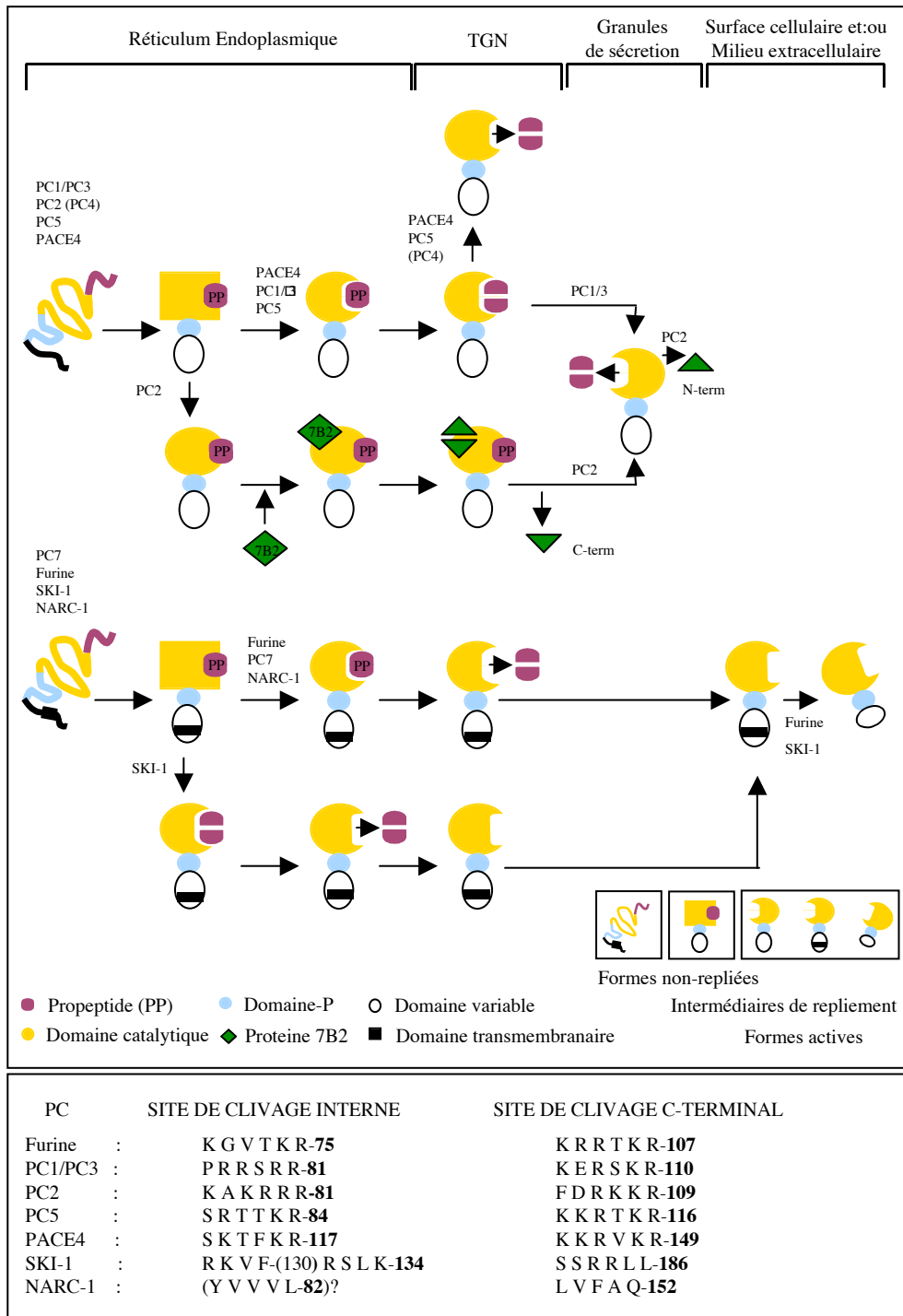
Les convertases responsables des clivages endoprotéolytiques des précurseurs protéiques de la voie de sécrétion des cellules eucaryotes sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique rugueux. Elles doivent, comme leurs futurs substrats, subir elles-mêmes un processus endoprotéolytique pour être activées. En effet, les PCs sont produites sous formes de zymogènes, dont la région propeptidique amino-terminale devra être clivée pour que la protéine puisse acquérir sa conformation biologiquement active. Le mécanisme d'activation des PCs a été établi à partir de celui de la furine, membre des PCs le plus étudié jusqu'à présent (Anderson et coll, 1997). Cependant d'autres études ont permis d'adapter ce dernier à chaque PC, notamment dans le cas de PC2 et de SKI-1 (Elagoz et coll, 2002). Les différentes données sur le mécanisme de repliement et d'activation des PCs sont schématisées dans la Fig. 14.

Les convertases néosynthétisées au niveau du RE initient leur repliement après le clivage de leur séquence signal. La présence de la séquence propeptidique est indispensable pour la production de PCs actives. En effet des expériences visant à définir l'implication de ces séquences démontrent que des mutations par délétion complète du propeptide conduisent à la rétention des PCs dans les compartiments du RE. En fait, les propeptides facilitent la prise de conformation en jouant le rôle de protéines chaperons intramoléculaires, notion détaillée par la suite (III.3.A). Avant de gagner l'appareil de Golgi et le TGN, lieu d'activation finale de la plupart des PCs, à l'exception de SKI-1 et de PC2, les PCs subissent un premier processus autocatalytique qui conduit au clivage de l'extrémité C-terminale de la séquence propeptidique (Vey et coll, 1994). A ce stade, la proséquence clivée n'est pas libérée dans le milieu, mais reste associée au domaine catalytique et plus particulièrement au niveau du site actif. Le propeptide joue alors un rôle d'inhibiteur des PCs en bloquant l'accès au site actif de la protéase, garantissant ainsi la protection de protéines de la voie de sécrétion contre une protéolyse injustifiée. Ces complexes inactifs sont alors compétents pour être transportés hors du RE vers l'appareil de Golgi, où ils subissent, les autres modifications connues des protéines de la voie de sécrétion, notamment la maturation des motifs N-glycanniques (Vey et coll, 1994).

Ce n'est que dans le TGN que les séquences propeptidiques vont subir un second clivage endoprotéolytique, probablement autocatalytique mais pouvant également être catalysé par d'autres endoprotéases ou PCs (Anderson et coll, 1997). Ce second clivage dit interne est dépendant de l'augmentation du pH et de la concentration calcique caractéristique des compartiments trans-golgiens. Ces conditions favorisent la dissociation du propeptide du site catalytique. Ainsi la furine (Molloy et coll, 1994), PC7 (Munzer et coll, 1997), PC5, PACE4, et probablement PC4 (Seidah et coll, 1999) se trouvent activées au niveau du TGN.

Pour les convertases de la voie de sécrétion régulée, PC1/PC3 et PC2, la dissociation du propeptide et donc l'activation finale des PCs, a lieu au niveau des granules de sécrétion. De plus, pour PC2, le mécanisme d'activation apparaît plus complexe. En effet, ce dernier requiert la présence d'une « protéine accessoire », nommée 7B2, elle-même synthétisée sous forme de précurseur. C'est au niveau du RE, que les deux précurseurs, pro-PC2 et pro-7B2, s'associent (Benjannet et coll, 1995). Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que ces dernières se lient au niveau du domaine catalytique de PC2 et forment un complexe inactif mais compétent pour le transport vers l'appareil de Golgi (Benjannet et coll, 1998). Dans le TGN, pro-PC2 et pro-7B2 sont clivés au niveau de leurs proséquences. La région carboxy-terminale de 7B2 joue alors au même titre que le propeptide de PC2 le rôle d'inhibiteur de l'activité de PC2 en restant fixée au niveau du domaine catalytique de la protéase (Benjannet et coll, 1998). La partie amino-terminale resterait également fixée de manière transitoire, afin de stabiliser la conformation de la protéase partiellement activée. Ce n'est que dans les granules de sécrétion matures que les propeptides se dissocient en libérant ainsi les PC2 actives. Ces données suggèrent que la protéine 7B2, au même titre que le propeptide des convertases, joue un rôle d'inhibiteur de la protéase, et de protéine chaperon en facilitant le trafic intracellulaire de PC2 jusqu'à leur localisation finale (Muller et coll, 1997).

Contrairement aux autres PCs, totalement activées au niveau du TGN ou des granules de sécrétion, l'activation complète de SKI-1 est réalisée au sein même du réticulum endoplasmique (Cheng et coll, 1999). En effet, les deux clivages endoprotéolytiques et successifs de la séquence propeptidique ont lieu dans le réticulum endoplasmique et de manière autocatalytique bien que le site interne de clivage ne soit pas définitivement identifié (Touré et coll, 2000). Le mécanisme de maturation de SKI-1 entraîne donc, contrairement aux autres PCs actives dans les compartiments tardifs de la voie de sécrétion du TGN ou des granules de sécrétion, l'activation dès le réticulum endoplasmique.



**Fig 14 : Mécanisme d'activation des différentes PCs.**

Les différentes étapes nécessaires à l'activation d'une part des PCs solubles, de la voie constitutive (PACE4, PC5, PC4) et de la voie régulée (PC1/PC3 et PC2) et d'autre part des PCs membranaires (furine, PC7, SKI-1 et NARC-1) sont schématisées suivant leurs points communs (compartiments d'activation...) et leurs particularités (protéine 7B2 pour PC2...). Le mécanisme général fait intervenir deux clivages autocatalytiques de la partie propeptidique des PCs dont les positions C-terminale et interne sont indiquées pour chaque convertase dans le cadre inférieur.

Les différentes PCs de la voie de sécrétion constitutive présentant un domaine transmembranaire comme SKI-1, la furine (Molloy et coll, 1999), PC7 ou NARC-1, sont également retrouvées actives au niveau de la membrane plasmique. La furine peut également, par un mécanisme de clivage en amont de leur domaine transmembranaire, vraisemblablement entre le domaine P et le domaine membranaire, être sécrétée sous forme active dans le milieu extracellulaire (Vidricaire et coll, 1993). Ce mécanisme dit de '*shedding*' pourrait être réalisé par d'autres PCs exprimées à la surface cellulaire mais également par d'autres endoprotéases telles que les metalloprotéases à sérines (Elagoz et coll, 2002).

### **III.2.D. Les substrats des convertases**

Différents moyens d'études ont permis d'identifier les nombreuses proprotéines soumises à l'action des PCs et de mettre en lumière le rôle primordial des PCs dans les mécanismes biologiques.

#### **III.2.D.a. Les moyens d'études des convertases.**

##### III.2.D.a.1. Les inhibiteurs des PCs

###### ❖ Les agents chélateurs.

L'activité catalytique des PCs est dépendante du pH et des concentrations en calcium. Ces caractéristiques varient d'une convertase à l'autre et reflètent la différence des microenvironnements des organelles dans lesquels elles sont actives. Ainsi la furine, active au niveau du TGN, présente une activité optimale à pH 7,0 et nécessite des concentrations calciques de 1 à 2 nM. En revanche, PC1/PC3 et PC2, actives au niveau des granules de sécrétion, requièrent un pH plus acide au alentour de 6,0 et des concentrations en calcium avoisinant 10 nM (Nakayama et coll, 1997).

La sensibilité des PCs à la concentration en calcium permet d'utiliser des agents chélateurs de cations comme l'EDTA ou l'EGTA pour inhiber l'activité des convertases (Munzer et coll, 1997). L'inhibition de SKI-1 par ces agents chélateurs nécessite cependant des concentrations beaucoup plus importantes que pour les autres PCs (Cheng et coll, 1999).

❖ Les inhibiteurs de protéases.

L'inhibition de l'activité catalytique des convertases a été testé à l'aide des divers inhibiteurs classiques des protéases à sérines comme l'aprotinine ou des protéases à cystéine et sérine comme la leupeptine ou le E64d (inhibiteurs de la trypsine et des cathepsines). L'action de divers autres inhibiteurs comme la pepstatine, la tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone (TPCK) ou la N-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) inhibiteurs de la chymotrypsine et de la trypsine respectivement ou des deux comme le Fluorure de phényl-méthyl sulfoxide (PMSF) a également été étudié. Il apparaît qu'aucun d'entre eux n'abolisse ou n'inhibe de manière significative l'activité des PCs. Seuls le PMSF et le TLCK diminuent sensiblement l'activité des PCs. Suivant les études, l'activité in vitro de la furine (Hatsuzawa et coll, 1992), de PC7 (Munzer et coll, 1997) ou de SKI-1 (Seidah et coll, 1999 ; Touré et coll, 2000) affichent une diminution d'activité de 15 et 30% en présence de ces inhibiteurs. L'antipaine, connue pour intervenir sur la papaine et la trypsine, semble avoir un effet inhibiteur un peu plus prononcé (jusqu'à 55% d'inhibition) sur la furine et PC7 (Hatsuzawa et coll, 1992). Cependant ces effets apparaissent indépendants de la dose d'inhibiteurs utilisés et révèlent le caractère non spécifique de ces inhibiteurs.

❖ Les peptides et protéines inhibiteurs.

Dans le but d'inhiber de manière spécifique l'activité catalytique des convertases, des inhibiteurs basés sur la séquence consensus reconnue par les différentes PCs, ont été élaborés. Ainsi plusieurs inhibiteurs sont utilisés pour prouver l'implication des convertases.

- Le decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chloromethyl ketone (d-R-V-K-R-CMK) inhibe la furine et toutes les PCs clivant spécifiquement au niveau de résidu basique, comme l'arginine ou la lysine (Hallenberger et coll, 1992).

- Des variants de l' $\alpha$ -1 antitrypsine, une serpine connue pour inhiber l'élastase, ont été élaborés par mutagenèse dirigée au niveau de la séquence du site impliqué dans la fixation et l'inhibition de l'enzyme. Ainsi, l' $\alpha$ -1 antitrypsine de Portland ou  $\alpha$ 1-PDX, présentant la séquence consensus de la furine au niveau de la boucle réactive abolie totalement l'activité de la furine (Anderson et coll, 1993) mais également celles de PC5 et PC7. PACE4 est quant à lui insensible à l' $\alpha$ 1-PDX (Mains et coll, 1997).

- Sur le même principe, des inhibiteurs de SKI-1 contenant les séquences R-R-V-L, R-R-Y-L et R-R-I-L, proches de la séquence consensus de clivage par SKI-1 ont été mis au point (Pullikotil et coll, 2004).

#### ❖ Les proséquences inhibitrices

Une autre stratégie s'est basée sur le rôle d'inhibiteur des prosegments des PCs (II.2.C.). En effet jusqu'à leur clivage et dissociation du site catalytique de la convertase, les propeptides jouent le rôle d'inhibiteur de l'activité enzymatique de la protéase. De ce fait, il a été envisagé d'inhiber l'activité des PCs en transfectant dans les cellules eucaryotes l'ADNc du propeptide pourvu de la séquence signal mais délété de la totalité de la séquence codant pour le domaine catalytique et le reste de la protéase. Cette expression du propeptide dite *en trans* c'est-à-dire en tant que peptide indépendant ne nécessitant pas le clivage de la convertase mère, permet en effet d'inhiber les PCs (Zhong et coll, 1999). Un des avantages supplémentaires de ces inhibiteurs est d'être pour la plupart spécifique de la PC dont ils sont issus et non plus de l'ensemble des convertases. Cette technique permet notamment d'inhiber l'activité catalytique de PCs, comme SKI-1, dont le motif de reconnaissance consensus est assez large et donc ne favorise pas l'élaboration d'inhibiteurs « chimiques » spécifiques efficaces.

#### III.2.D.a.2. Les lignées de cellules déficientes en PCs

Cependant en raison de la forte homologie de séquence entre les motifs de reconnaissance des PCs, notamment entre la furine, PACE4 et PC7, et de leur expression ubiquitaire, il y a une possibilité de redondance de fonction. Cependant dans des conditions physiologiques, la ou les convertases réellement impliquées dans la maturation d'un précurseur protéique peuvent être tout autre que celle(s) efficace(s) *in vitro*.

Différentes lignées cellulaires déficientes pour l'une ou l'autre des PCs ont été isolées et ont ainsi permis de statuer sur ces questions. Ainsi, les cellules Lovo issues de cellules de tumeurs du colon et les RPE-40 dérivées de cellules d'ovaires de hamster (CHO) sont déficientes en furine. Les cellules Lovo présentent une mutation des deux allèles du gène de la furine au niveau du domaine P (Takahashi et coll, 1995). Les RPE-40 quant à elles ont deux mutations alléliques différentes du gène *Fur*, dont l'une entraîne un défaut d'épissage des transcrits primaires et l'autre une mutation proche du résidu d'arginine impliqué dans la réaction catalysée par la furine (Spence et coll, 1995). Une autre lignée déficiente en SKI-1, la lignée SRD-12B, a été obtenue à partir de cellules CHO mutées, ne catalysant plus le clivage des protéines SREBPs (Rawson et coll, 1998).

Ces lignées peuvent donc être utilisées, après transfections avec le gène d'intérêt et co-transfections avec la séquence codante de la PC suspectée, pour étudier le rôle des convertases dans la maturation endoprotéolytique des protéines. Il faut cependant noter que l'expression effective des autres PCs dans ces cellules, notamment de PACE4 et de PC7 dans les lovo et les RPE-40, pourrait remplacer la furine pour le clivage de certains substrats (Inocencio et coll, 1997).

### **III.2.D.b. Les divers substrats des convertases.**

Bien qu'appartenant à la même famille, les différentes convertases interviennent dans la maturation de substrats de natures très variables (Fig. 13). C'est leur différence de spécificité de clivage mais également leur particularité d'expression tissulaire et de localisation cellulaire qui expliquent leur intervention. Ainsi la furine, PC7 ou bien SKI-1, exprimées de manière ubiquitaire, sont responsables du clivage des précurseurs de récepteurs membranaires, de facteurs de croissance ou bien encore de protéines pathogènes. A l'inverse, les convertases spécifiquement exprimées au niveau des cellules du système neuroendocrinien et notamment des granules de sécrétion sont engagées dans la maturation de prohormones et proneuropeptides exprimés de manière régulée. La régulation de l'expression d'une PC par rapport à une autre ou d'un tissu à l'autre, peut promouvoir à partir d'un même précurseur la synthèse de produits ayant des activités biologiques et donc des rôles physiologiques différents. De même des dérégulations dans ces mécanismes de maturation, par mutation inactivant les PCs ou après mutation des sites de clivages sur les précurseurs, peuvent être à l'origine de pathologies humaines. C'est ainsi que l'étude de patients atteints de maladies impliquant vraisemblablement un dysfonctionnement du système neuroendocrinien a permis d'identifier les convertases impliquées ainsi que leurs cibles.

#### **III.2.D.b.1. Les précurseurs des hormones et neuropeptides.**

De nombreuses hormones du système neuroendocrinien sont synthétisées sous forme de précurseurs. Ce n'est qu'après endoprotéolyse que la production d'hormones est rendue possible. Pour la plupart d'entre eux, ce sont les convertases PC1/PC3 et/ou PC2 qui interviennent dans la voie de sécrétion régulée. Ainsi le POMC, précurseur de l'ACTH et de la LPH, au niveau de la glande hypophyse est clivé par les PCs.



Cependant le mécanisme de maturation d'autres précurseurs comme les précurseurs des neurotrophines par des cellules non neuro-endocriniennes peut faire intervenir des PCs de la voie de sécrétion constitutive comme la furine ou PACE4. Les résultats détaillés par la suite pour un nombre limité de pro-hormones et -neuropeptides mettent en lumière le rôle majeur des mécanismes de maturation post-traductionnelle gouvernés par les convertases.

❖ Le précurseur des hormones cortico- et mélanotropes, POMC.

Dans la glande hypophyse, un large polypeptide appelé POMC est le précurseur de différentes prohormones. L'adénocorticotrophine (ACTH), les lipotrophines (LPH) ainsi que l'hormone mélanostimulante (MSH) et les  $\beta$ -endorphines sont produites à partir de ce précurseur par clivages endoprotéolytiques (Fig. 15. A). Ce processus de maturation est coordonné avec le trafic intracellulaire du précurseur et implique des convertases (Tanaka et coll, 2003). En effet, c'est à partir d'expériences de co-expression des PCs avec le précurseur POMC que l'on a ainsi démontré le rôle des convertases de la voie de sécrétion régulée, PC1/PC3 et PC2, dans la production de ces hormones. Plus tard, l'importance de PC1/PC3 a été confirmée par l'étude réalisée à partir d'une patiente atteinte de troubles hormonaux majeurs associés à une hyperproinsulinémie et des problèmes d'obésité, pour laquelle on a diagnostiqué une double mutation inactivante de la convertase PC1/PC3 (revue Zhou et coll, 1993).

Les PC1/3 et PC2 interviennent de manière consécutive sur le précurseur POMC et de manière sélective suivant le type de cellules hypophysaires, pour produire les différentes hormones. Ainsi l'ACTH et la  $\beta$ -LPH sont produites après clivages par la PC1/PC3 tandis que la PC2 intervient sur l'ACTH pour engendrer les LPH $\alpha$  et  $\beta$  ainsi que la MSH et la  $\beta$ -endorphine (Benjannet et coll, 1991 ; Zhou et coll, 1994). De manière intéressante, ce profil de maturation peut être mis en parallèle avec l'expression différentielle de PC1/PC3 et PC2 dans les cellules de type corticotrope et de type mélanotrope respectivement (Day et coll, 1992). Ceci explique l'expression spécifique de l'hormone mélanostimulante dans les mélanotropes et de manière plus générale l'existence et l'importance de la régulation de l'expression des convertases dans différents types cellulaires. Ceci suggère également le rôle physiologique de l'activation tardive de PC2 par rapport à celle de PC1 (voir III.2.C.) puisque cette dernière doit intervenir en amont de PC2 (Zhou et coll, 1994 ; Benjannet et coll, 1995).

❖ Les précurseurs des facteurs de croissance Pro-NGF et Pro-BDNF.

Les facteurs de croissance neurotrophiques, appelés neurotrophines, tels que NGF et BDNF, exprimés au niveau du système nerveux central et périphérique participent au développement et à la survie des cellules neuronales en se liant à la famille des récepteurs tyrosine kinase, Trk (Fig. 15. B). Ils sont synthétisés sous formes de précurseurs de 31 à 35 kDa qui après maturation donnent naissance à leurs formes matures de poids moléculaires compris entre 13 et 16 kDa. Le processus de maturation est spécifique du tissu dans lequel il se produit, mais fait intervenir les PCs dont la furine, PACE4 et PC5. Dans les cellules constitutives, les études montrent que la maturation des précurseurs engendre deux produits, de 16,5 et 13,5 kDa pour le NGF et de 28 et 14 kDa pour le BDNF tandis que dans des cellules régulées ou possédant les deux voies, seulement les formes de poids moléculaires inférieurs sont produites ou largement majoritaires (Seidah et coll, 1996a; Mowla et coll, 2001). Il apparaît d'une part que les formes de 16,5 kDa du NGF et de 28 kDa du BDNF ne sont pas des produits de maturation intermédiaires des formes matures. Pour BDNF, la production de la forme de 28 kDa est insensible à l'□1-PDX et présente un site de clivage pouvant impliquer SKI-1 lors de sa production dans des cellules constitutives (Seidah et coll, 1999a; Mowla et coll, 2001). Cependant, il faut remarquer que ces formes ainsi que leurs précurseurs pourraient avoir des activités biologiques différentes des formes matures des neurotrophines. En effet, le pro-NGF est un ligand du récepteur pro-apoptotique p75<sup>NTR</sup> qui inhibe la croissance neuronale (Lee et coll, 2001). Ceci met en évidence la complexité des mécanismes de maturation post-traductionnelle des peptides biologiquement actifs et le rôle central des convertases impliqués dans le développement neuronal.

III.2.D.b.2. Les précurseurs de protéases membranaires : les metalloprotéases

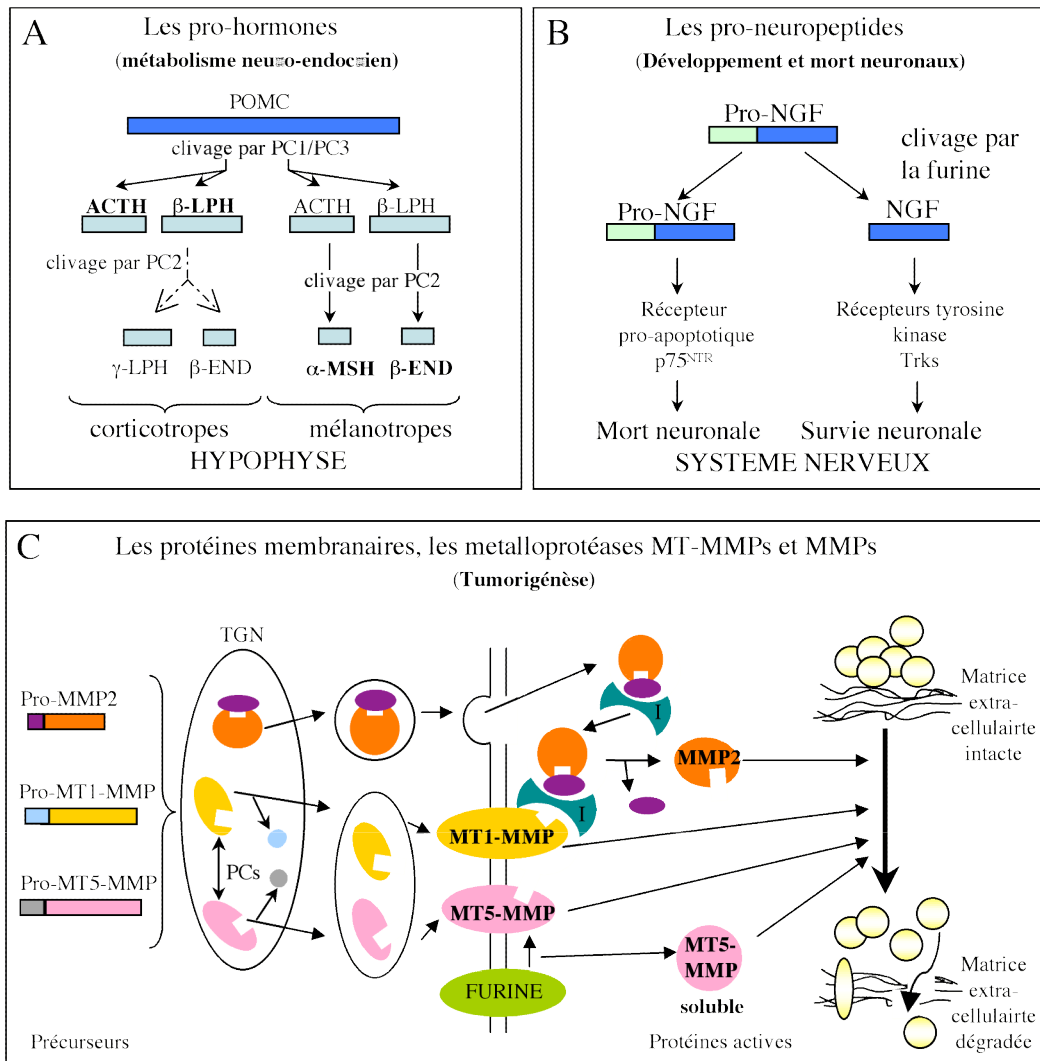
Une famille de protéases regroupées sous le terme MMPs pour « *matrix metalloprotéases* », impliquée dans le remodelage des matrices extracellulaires par dégradation des composants de la matrice intercellulaire comme les fibres de collagènes ou de fibronectines (Nagase et coll, 1999), est indispensable au développement et à la croissance de l'organisme, mais est également engagée dans les mécanismes de tumorigénèse. Les MT-MMP qui sont des MMPs de type membranaire (MT), sont capables d'activer les MMPs solubles responsables de la dégradation des éléments extracellulaires et de l'activation des collagénases.

Ces protéases sont exprimées sous formes de zymogènes dont l'activation dépend du clivage d'une séquence propeptidique amino-terminale (Fig. 15. C.).

De nombreuses études ont montré le rôle des PCs dans le processus de maturation et d'activation des MMPs. Ainsi la MT1-MMP, la MT3-MMP et la MT5-MMP sont activées par le clivage au niveau des séquences R<sub>108</sub>RKR (Yana et coll, 2000), R<sub>116</sub>RKR (Kang et coll, 2002) et d'un motif dibasique R-R (Wang et coll, 2001) respectivement. L'□1-PDX co-exprimé avec les MT-MMPs (Yana et coll, 2000) ou le d-R-V-K-R-CMK (Kang et coll, 2002 ; Wang et coll, 2001), bloquent le clivage du propeptide des protéases immatures. Ces études révèlent le rôle majeur des convertases et en particulier de la furine dans le mécanisme de maturation des MMPs. En effet, l'expression de MT1-MMP dans des cellules Lovo ou RPE-40 abolie l'activité de cette dernière (Yana et coll, 2000), tandis que Kang et coll, montrent la co-localisation cellulaire de MT3-MMP et de la furine. Cependant bien que la furine semble spécifiquement responsable de ces clivages, d'autres PCs de la voie constitutive, et sensibles à l'□1-PDX, comme PACE4 (exprimé dans les cellules RPE-40), PC6 (exprimé dans les cellules Lovo) ou PC7 pourraient intervenir dans l'activation de MT1-MMP et plus largement des MMPs (Yana et coll, 2000).

De plus la MT5-MMP peut également subir un clivage supplémentaire en amont de son domaine transmembranaire (Wang et coll, 2001). Ce clivage, sensible au d-RVKR-CMK et intervenant dans le TGN ou à la surface cellulaire au niveau d'un motif dibasique RR, implique vraisemblablement une convertase. Ce mécanisme permet la libération d'une MT5-MMP soluble et active dans le milieu extracellulaire et suggère l'existence d'un mécanisme permettant de moduler l'expression en surface de MT5-MMP fonctionnels.

Dans des conditions pathologiques cancéreuses, les convertases sont trouvés surexprimées dans de nombreux tissus par rapport aux conditions physiologiques normales (Cheng et coll, 1997). Ainsi de manière générale, la dérégulation de l'expression ou de l'activité des PCs pourrait être à l'origine de la modification des mécanismes d'activation et de sécrétion des MMPs observée dans les pathologies cancéreuses (Bassi et coll, 2000).



**Fig 15: Substrats clivés par les endoprotéases de la famille des convertases.**

(A) Le précurseur, POMC, est clivée par PC1/PC3 et PC2 de manière séquentielle dans les cellules neuro-endocrinienne de l'hypophyse. De manière intéressante dans les lignage de type corticotrope, les produits principaux sont l'ACTH et la β-LPH tandis que dans les cellules mélanotropes on trouve principalement les β-End et α-MSH issus du clivage de l'ACTH et de la β-LPH respectivement par la PC2. POMC, pro-piomelanocortine; ACTH, adrénocorticotropine; β-LPH, β -lipotropine; β-END, β-endorphine; α-MSH, α-melanotropine. (d'après Tanaka, 2003). (B) La furine clive le prodomaine des facteurs de croissance neuronaux (NGFs) comme les précurseurs pro-β-NGF et pro-BDNF. Pour β-NGF, cette maturation module la fonction cellulaire du facteur sécrété, par le biais de la fixation à des récepteurs de mort ou de développement. (d'après Seidah et coll, 1996 et Lee et coll, 2001). (C) Les PCs et notamment la furine activent les protéases de la famille des metalloprotéases, MT1-MMP et MT5-MMP au niveau du TGN. MT1-MMP active à son tour la gélatinase pro-MMP-2 en MMP-2. La furine peut également cliver la MT5-MMP à la surface cellulaire et libérer ainsi des gélatinases actives solubles. Toutes ces formes dégradent les constituants de la matrice extracellulaire (collagènes, protéoglycanes...) et favorisent la tumorigénèse. (d'après Yana et coll, 2000, Wang et coll, 2001, Thomas et coll, 2002).

### III.2.D.b.3. Les précurseurs des protéines pathogènes

#### ❖ Les toxines bactériennes

De nombreuses toxines bactériennes nécessitent un processus d'activation pour acquérir leurs fonctions toxiques. Ce processus requiert un clivage endoprotéolytique des protéines au niveau de la surface cellulaire ou des endosomes précoces de la voie d'endocytose de la cellule hôte. Une étude visant à déterminer le processus pathogénique du bacille de l'anthrax a mis en évidence le rôle majeur des convertases et vraisemblablement de la furine dans l'activation de la toxine PA. Cette protéine ainsi que les deux autres toxines, EF pour *oedema factor* et LF pour *lethal factor*, sont responsables de la toxicité de l'anthrax. Pour atteindre le cytosol de la cellule attaquée, ces deux dernières toxines doivent interagir avec PA et utiliser un canal membranaire réalisé à partir d'oligomères de la toxine PA au niveau des membranes des endosomes. Pour cela la protéine PA subit un clivage au niveau de la séquence amino-terminale, R<sub>164</sub>KKR<sub>167</sub>. Des expériences de mutation dirigée ainsi que le profil d'inhibition de ce clivage suggère l'implication de la furine (Klimpel et coll, 1992).

D'autres agents pathogènes bactériens sécrétant des toxines utilisent également les convertases des cellules hôtes pour les activer. C'est par exemple cas de *Pseudomonas aeruginosa* ou de *Shigella dysenteriae* (voir revue Gordon et coll, 1994).

#### ❖ Les glycoprotéines de surface virales.

De la même manière de nombreuses glycoprotéines d'enveloppe virale (gp ou GP) doivent être activées par protéolyse limitée notamment pour acquérir leur activité fusogénique. C'est le cas de la gp160 du VIH-1 clivée en gp120 et gp41, protéine responsable de la capacité des virus à fusionner avec les membranes plasmiques de cellules. La gp160 est ainsi clivée au niveau de la séquence R<sub>508</sub>EKR<sub>511</sub> dans les compartiments de la voie de sécrétion, le RE ou l'appareil de Golgi (Kido et coll, 1993). Différentes équipes ont par la suite démontré que les PCs comme, la furine, PACE4 ou bien encore PC6 et PC7 clivent efficacement la gp160 (Hallenberger et coll, 1992 ; Moulard et coll, 1999). Cependant l'implication physiologique de ces différentes PCs dans l'activation de la gp160 est controversée. En effet, d'une part, seules la furine et PC7 sont exprimées dans les cellules lymphocytaires, LT CD4+, infectées dans les étapes précoces de l'infection. D'autre part des études montrent l'existence du clivage dans des cellules déficientes en furine. Ainsi, d'autres endoprotéases pourraient durant la maturation de la gp160 (Inocencio et coll, 1997).

Au même titre que pour le VIH-1, d'autres GP virales, comme celles du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) ou du virus de Lassa à l'origine de fièvres hémorragiques sont activées par clivages endoprotéolytiques. Les analyses menées sur différentes souches virales, révèlent que les clivages ont lieu au niveau de résidus non basiques. Ainsi le clivage de la GP du LCMV survient après le résidu 265 dans le motif consensus **R-(R/K/H)-L-(A/L/S/T/F)** (Beyer et coll, 2003) et celui de la GP du virus de Lassa au niveau de la leucine 259 dans le motif **R-X-(L/I/V)-L** (Lenz et coll, 2001). Ces séquences mettent en évidence la présence d'un résidu d'arginine en position P4, et de préférence d'un résidu hydrophobe, notamment une leucine, en position P2 en amont du site de clivage. Ces caractéristiques typiques de l'intervention de SKI-1 sont confirmées par l'abolition des clivages de ces GP dans les cellules déficientes en SKI-1, les SRD-12B. De manière intéressante, cette PC active dès le RE, clive vraisemblablement la GP du virus de Lassa dans le RE ou dans le compartiment cis-golgien (Lenz et coll, 2001), mais intervient sur la GP du LCMV dans les compartiments tardifs de l'appareil de Golgi ou dans le TGN (Beyer et coll, 2003). Ceci, confirme que SKI-1 peut agir tout le long de la voie de sécrétion.

### **III.3. Le rôle des régions propeptidiques**

La mise en évidence de la modification post-traductionnelle par protéolyse limitée de précurseurs protéiques, a soulevé la question du rôle des régions éliminées, les propeptides, dans la maturation des protéines.

En effet, si dans le cas des précurseurs permettant après clivages la production de multiples protéines biologiquement actives, le rôle des clivages endoprotéolytiques paraît évident, celui des prodomaines issus d'un clivage amino- ou carboxy-terminal l'est moins.

Les nombreuses études visant à définir ce rôle ont mis en lumière différentes fonctions possibles des propeptides. Ils peuvent d'une part faciliter, et même pour certains, garantir le repliement correct de la protéine en jouant un rôle similaire à la fonction de protéine chaperon (voir II.2.). D'autre part ils peuvent influencer la stabilité des protéines ou intervenir dans le trafic intracellulaire des protéines. Enfin, ils peuvent prendre part au mécanisme d'activation et/ou d'inhibition des protéines biologiquement actives, pour éviter par exemple, que ces protéines soient actives avant d'être arrivées sur leur lieu d'action.

### **III.3.A. Les propeptides intervenant dans le mécanisme de repliement des protéines.**

Bien que certaines protéines acquièrent leur structure native dans des conditions d'expression *in vitro* sans agents extérieurs, leur expression *in vivo* nécessite parfois des interactions avec des protéines chaperons et catalyseurs du repliement des protéines (voir II).

Plus récemment, il est apparu que des domaines internes des protéines pouvaient intervenir durant ce processus. C'est le cas des régions propeptidiques qui par définition sont traduites de manière co-translationnelle avec leur protéine associée. La notion de « protéine chaperon intramoléculaire », ou IMC est alors apparue et s'applique à ces régions intrinsèques des précurseurs protéiques, généralement amino-terminale, qui jouent un rôle dans le processus de maturation et plus particulièrement dans la prise de conformation de la protéine.

Le rôle des propeptides et la notion d'IMCs, ont tout d'abord été révélés pour des protéases bactériennes de la famille des subtilisines et des protéases □-lytiques.

En effet chez ces dernières, le prodomaine est indispensable au repliement correct et donc à l'activité enzymatique de la protéase. Ainsi délétées des 77 et des 166 résidus amino-terminaux de leur séquence respective, la subtilisine bactérienne BPN' et la protéase □-LP ne présentent plus d'activité enzymatique (Silen et coll, 1989 ; Eder et coll, 1993). De manière intéressante, la co-expression de ces propeptides en tant que peptides synthétisés de manière indépendante avec le reste de la séquence de leurs protéines délétée du propeptide, entraîne la production de protéases actives. Ceci suggère donc que l'ajout du propeptide permet le repliement de la protéine vers sa conformation tridimensionnelle biologiquement active (Eder et coll, 1993 ; Sohl et coll, 1998). De même les études menées sur la carboxypeptidase de levure, la CPY, montrent qu'après dénaturation, l'enzyme peut retrouver son activité en présence de son propeptide (Winther et coll, 1991).

#### **II.3.A.a. Le mécanisme d'action moléculaire des propeptides**

Pour comprendre le mécanisme d'action de ces régions propeptidiques, des équipes de recherche ont entrepris d'étudier la structure et la stabilité des protéines au cours de leur repliement. Ainsi par des techniques de dichroïsme circulaire et de spectroscopie détectant la présence des structures secondaires et tertiaires et par des mesures calorimétriques et de sensibilité à des traitements dénaturants, la structure tridimensionnelle et la stabilité des protéines en cours de maturation ont été déterminées.

Il est ainsi apparu que les formes natives de la BPN' et de l'□-LP sont thermodynamiquement moins stables que leurs proformes, ce qui reflète l'existence d'une barrière énergétique extrêmement importante entre la protéine non repliée et la protéine native (Sohl et coll, 1998 ; Eder et coll, 1993). En absence de leur prorégion, la BPN' et l'□-LP ne se replient que très lentement en passant par un intermédiaire de repliement présentant des structures secondaires similaires à celles de la protéase native mais manifestant une conformation 3D moins compacte que la protéase native et active (Eder et coll, 1993). Cet intermédiaire ressemble au « globule fondu » (I.2.B.b.). En présence de la prorégion, cet intermédiaire de repliement est fortement stabilisé, ce qui abaisse la barrière énergétique que la protéine doit franchir pour atteindre son état natif (Cunningham et coll, 1999 ; Eder et coll, 1993). Une fois la prorégion libérée et dégradée, la large barrière énergétique la séparant de la proforme défavorise son retour à un état déplié. La protéine se retrouve alors « figée » dans sa conformation tridimensionnelle native (Cunningham et coll, 1999; Shinde et coll, 2000; Subbian et coll, 2005), (Fig. 16).

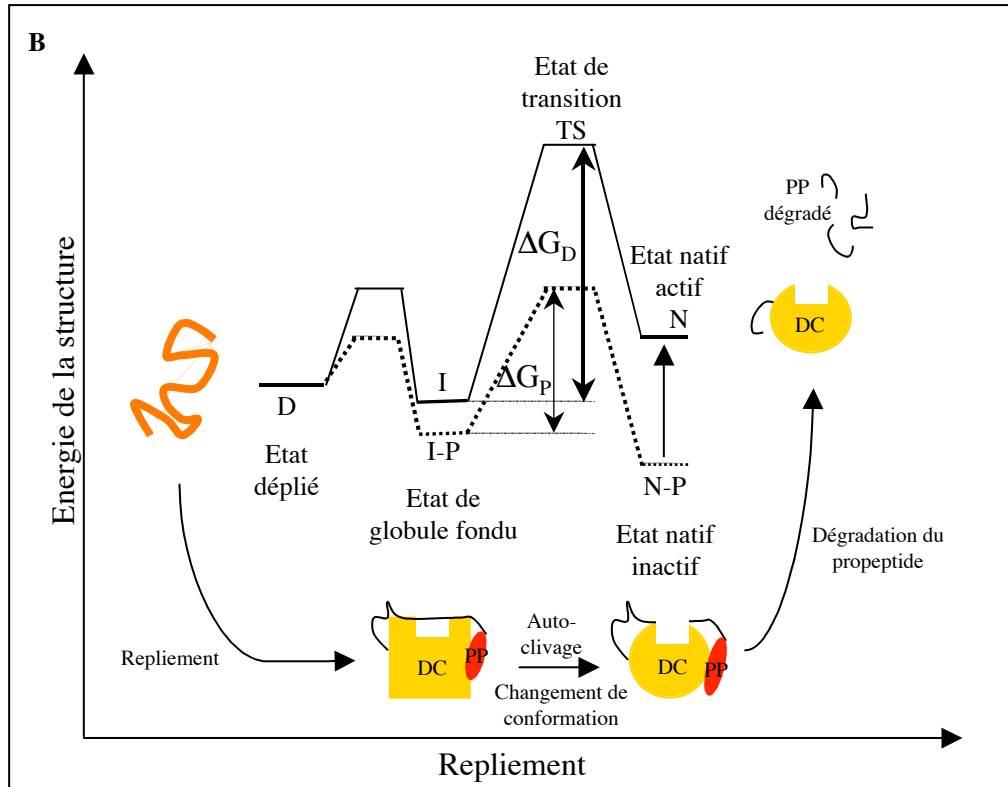
### II.3.A.b. Les caractéristiques structurales des propeptides

La structure des domaines propeptidiques et des complexes intermédiaires ont pu être déterminé grâce à la cristallisation de ces derniers. Différentes caractéristiques structurales ont alors été dégagées en ce qui concerne les prodomaines ainsi que les interactions existant entre les séquences propeptidiques et le reste de la protéine associée.

Les différentes études menées sur la BPN' (Eder et coll, 1993), l'□-LP (Cunningham et coll, 1999), la CPY (Sorenson et coll, 1993) ou l'hydrolase intestinale de lactose, la LPH (Jacob et coll, 2002) ont mis en évidence le caractère compact de leurs prodomaines respectifs.

En effet, la large région propeptidique amino-terminale de la LPH, la LPH□, arbore plus de 45% de résidus hydrophobes et 11 cystéines (Jacob et coll, 2002) et le propeptide de la CPY, présente de nombreuses structures secondaires notamment en hélices □ (Sorenson et coll, 1993 ; Ramos et coll, 1994). De même, malgré des homologies de séquences faibles, les propeptides des subtilisines présentent des similitudes structurales. Ainsi deux motifs riches en résidus hydrophobes identifiés du côté amino-terminal, motif N1, et carboxy-terminal, motif N2, sont structurés en hélices □ et feuillettes □ et sont fortement conservés à travers les nombreux membres de la famille des subtilisines (Shinde et coll, 1999).





**Fig 16 : Représentation du diagramme énergétique du repliement des subtilisines.**

L'état natif (N) de la protéase est moins stable que la protéine dénaturée (D). En absence du propeptide, la protéase se replie en passant par un intermédiaire de repliement (I) similaire au « globule fondu ». Celui-ci se replie vers la forme native (N) à un taux très lent en raison de l'importante barrière énergétique ( $\Delta G_D$ ) qu'il doit franchir. En présence du propeptide (en cis ou en trans), la protéase passe par l'intermédiaire de repliement I-P et rejoint rapidement son état natif et inactif, N-P. Ce dernier est thermodynamiquement stable et réduit l'énergie de l'état de transition TS-P à  $\Delta G_P < \Delta G_D$ . La dégradation du propeptide entraîne le passage de l'état inactif N-P à l'état métastable N et « fige » ainsi la protéase dans sa conformation native. La conformation des différentes structures présentes au cours du repliement est schématisée en parallèle. (PP: propeptide; DC : domaine catalytique) (D'après Cunningham et coll, 1999 et Shinde et coll, 2000)

La forte présence de résidus hydrophobes et de structures secondaires, caractéristiques des protéines globulaires, a conduit les chercheurs à penser que ces régions propeptidiques se replient rapidement et qu'elles sont relativement stables en raison de leur structure compacte. D'autre part, ces domaines présentent des structures en hélice  $\alpha$  et pour certains des résidus d'acides aminés chargés au même titre que les protéines chaperons (Winther et coll, 1991), A partir de ces observations, les auteurs suggèrent que ces régions propeptidiques, synthétisées par définition avant la biosynthèse complète de la protéine, prennent rapidement leur conformation tridimensionnelle et propagent le processus de repliement à l'ensemble de la protéine en interagissant avec elle (Cunningham et coll, 1999).

De manière intéressante les expériences de mutagenèse aléatoire de la séquence des prodomaines ont permis de caractériser des résidus et/ou des motifs spécifiquement impliqués dans le processus de repliement du prodomaine et pour d'autres dans les interactions spécifiques avec le reste de la protéine. Ainsi des expériences de mutagenèse aléatoire de la région propeptidique de la CPY ont démontré que la délétion des 34 derniers résidus de sa partie C-terminale entraîne la production d'une protéine active mais en très faible quantité, la majorité étant mal repliée et dégradée, suggérant un rôle prépondérant de la région C-terminale du propeptide dans le repliement correct de la protéine. Par contre des mutations au niveau de la partie amino-terminale altèrent de manière moins importante le repliement et l'activité de la protéase (Ramos et coll, 1994). Les mêmes expériences de mutagenèse réalisées sur la carboxypeptidase de rat, la CPA1, ont permis d'identifier l'existence d'interactions entre les résidus d'Asp36 et de Glu89 du prodomaine et les résidus d'Arg71 et d'Arg124 du site actif de la protéase. Ces interactions aident au repliement correct du domaine catalytique en stabilisant l'intermédiaire de repliement de la protéine (Phillips et coll, 1996).

De même, des mutations ponctuelles dans les motifs N1 et N2 de la BPN' influencent le repliement de la protéine. Ainsi, des mutations stabilisant la prodomaine favorisent le repliement de la protéase en accélérant le passage de la proforme à la forme native (Wang et coll, 1999), tandis que des mutations déstabilisantes bloquent le processus (Shinde et coll, 1999).

Cependant, malgré ces similitudes structurales, les propeptides ne sont pas interchangeables d'une protéine à l'autre. Par exemple, le propeptide de la LPH est incapable de promouvoir le repliement correct d'autres hydrolases glycosidiques comme l'isomaltase possédant des homologues de séquences avec l'hydrolase de lactose (Jacob et coll, 2002).

De même, les propeptides des diverses PCs sont plus ou moins efficaces dans leur fonction d'inhibiteur des domaines catalytiques des différentes PCs (Seidah et coll, 1999). Par exemple, le prodomaine de la furine qui arbore 60% de similitude avec celui de PACE4 inhibe cette dernière avec une efficacité 27 fois moins importante que pour la furine (Zhong et coll, 1999). Ceci suppose une spécificité d'action et donc d'interaction entre la prorégion et le reste de la protéine et donc l'existence de déterminants spécifiques au niveau des propeptides. Pour les subtilisines, cette spécificité semble être détenue par la région variable comprise entre les motifs N1 et N2 (Shinde et coll, 1999). En effet, une mutation au niveau de cette région spécifique de chaque membre de la famille de subtilisines n'inhibe pas la prise de conformation, mais altère la spécificité de la protéase vis à vis de ses substrats connus, suggérant ainsi une altération de la conformation du site catalytique (Shinde et coll, 1999).

Ce phénomène, connu sous le nom de « mémoire protéique », exprime un mécanisme par lequel, une mutation dans la région propeptidique d'une protéine possédant une fonction de protéine chaperon intramoléculaire peut entraîner un changement de conformation du reste de la protéine sans aucun changement de sa séquence d'acides aminés. Si une telle modification altère la structure du domaine catalytique, la spécificité d'action des protéines biologiquement actives peut être modifiée par des mutations de leurs prorégions (Shinde et coll, 1997; Takagi et coll, 2003).

Ces résultats suggèrent que les prodomaines peuvent être des sites de nucléation initiant le repliement des chaînes peptidiques et jouant le rôle de véritables « modèles de structuration » en interagissant avec les domaines similaires de la protéine associée (Shinde et coll, 1999 ; Jacob et coll, 2002). De plus il apparaît que ces propeptides possèdent des déterminants essentiels pour initier le mécanisme de repliement ainsi que des éléments de séquences spécifiques, indispensables pour garantir une conformation finale unique de la protéine associée (Fu et coll, 2000).

### **II.3.B. Le rôle des propeptides dans la stabilité et la dégradation le contrôle des protéines.**

Cependant pour d'autres protéines, les régions propeptidiques ne catalysent pas directement le processus de repliement, mais agissent plus tardivement pour protéger la protéine de la dégradation ou pour la maintenir dans une conformation spécifique par exemple compétente pour le trafic intracellulaire.

### II.3.B.a. L'implication des propeptides dans la stabilité des protéines

Une étude intéressante sur la maturation de la conotoxine TxVI a mis en avant le rôle peu commun de son prodomaine dans le processus de sécrétion de la protéine (Conticello et coll, 2003). Les conotoxines sont de petits peptides de 7 à 35 acides aminés issus de mollusques venimeux. La conotoxine TxVI possède une région propeptidique et est capable d'échapper au contrôle de qualité des protéines malgré son caractère très hydrophobe. La recherche de partenaires pouvant être impliqués dans son processus de maturation et de sécrétion a permis de mettre en évidence l'interaction du domaine propeptidique de TxVI avec la sortilisine, protéine impliquée dans le trafic TGN-endosome (Conticello et coll, 2003). Cette interaction, qui débute au niveau du RE, permet la stabilisation du domaine hydrophobe de la conotoxine mature grâce à la fixation de son prodomaine à une protéine rapidement transportée à travers le RE, lui permettant ainsi d'échapper au CQ de la cellule (Conticello et coll, 2003).

Les propeptides de nombreuses autres protéines peuvent également jouer sur la stabilité de la protéine mature

Les membres de la famille de facteurs de croissance de type TGF, synthétisés en précurseurs au niveau du RE, sont sécrétés sous forme d'homodimères après le clivage de leur propeptide par des convertases de la famille des subtilisines dans les compartiments post-golgiens (Bauskin et coll, 2000). Bien que facilitant le repliement des proformes monomériques, le propeptide de TGF $\beta$ 1 est également impliqué dans la régulation de la sécrétion des dimères actifs. En effet, la sécrétion des formes actives de TGF $\beta$ 1 passe par la constitution de complexes inactifs, ou complexes latents, formés par l'association des dimères des régions propeptidiques, nommées  $\beta$ 1-LAP pour «  *$\beta$ 1-latency-associated peptides* », et des formes matures de TGF $\beta$ 1. Exprimées sans cette prorégion, les TGF $\beta$ 1 ne sont pas sécrétés (Gray et coll, 1990).

Les expériences de mutagenèse dirigée réalisées par la suite ont permis de caractériser le rôle des différentes régions du prodomaine. Ainsi une mutation dans la partie amino-terminale de la proséquence, et plus particulièrement du segment compris entre les résidus 50 et 85, maintient la dimérisation et la sécrétion des prodomaines exprimés seuls, mais abolit la formation des complexes inactifs et la sécrétion des formes matures des mêmes mutants de pro-TGF $\beta$ 1.

Ceci suggère que l'interaction entre cette région propeptidique et les formes matures de TGF $\beta$ 1 dans les complexes latents favorise la stabilité de la conformation correcte et compétente pour le transport des TGF $\beta$ 1 (Sha et coll, 1991). En effet, le propeptide des TGFs interagit avec une région fortement conservée de la région mature, riche en hélices  $\alpha$ , et permet ainsi de masquer le profil hydrophobe des TGF $\beta$ 1 matures afin d'éviter des mésappariements avec d'autres protéines durant le processus de maturation (Fairlie et coll, 2001).

Le rôle de stabilisateur de la conformation protéique est également envisagé pour le propeptide des protéases de la famille des metalloprotéases à zinc ou MMPs. En effet, la MMP-3 ou stromelysine (Wetmore et coll, 1996) et l'enzyme de conversion du TNF $\alpha$ , ou TACE, possèdent un propeptide contenant une cystéine, résidu fortement conservé dans la famille des MMPs, qui interagit avec l'atome de zinc fixé au niveau du site catalytique. Cette liaison induit la formation d'une structure dite fermée de la protéase qui est également inactive. Bien que les propeptides inhibent l'activité de ces enzymes, cette interaction n'est pas indispensable au rôle inhibiteur du prodomaine pour TACE (Gonzales et coll, 2004) ni au repliement du domaine catalytique de MMP-3 (Wetmore et coll, 1996). En revanche, la mutation ponctuelle de cette cystéine entraîne la dégradation intracellulaire des protéases en comparaison des formes non mutées. Ainsi, le prodomaine semble par le biais de son interaction avec l'atome de zinc du site catalytique, stabiliser la conformation de la protéase et ainsi la protéger de la protéolyse intracellulaire (Leonard et coll, 2004; Wetmore et coll, 1996).

### **II.3.B.b. Les propeptides et le système de dégradation des protéines incorrectement maturées.**

Certains propeptides pourraient également être directement impliqués les mécanismes d'ERAD des protéines. La machinerie de dégradation des protéines incorrectement repliées ou maturées fait notamment intervenir un complexe protéique cytoplasmique, le protéasome. Celui-ci peut dégrader les protéines de la voie de sécrétion après leur re-translocation à travers la membrane plasmique du RE vers le cytoplasme (voir chapitre III.4.).

La protéine MIC-1, pour « *macrophage inhibitory cytokine-1* », appartenant à la famille des facteurs de croissance TGFs, ne semble pas avoir besoin de son prodomaine pour être sécrétée sous une forme biologiquement active (Bauskin et coll, 2000).

Cependant, en présence de diverses substances connues pour inhiber le protéasome, les précurseurs pro-MIC monomériques s'accumulent dans les compartiments intracellulaires sans influencer la sécrétion des dimères actifs de MIC-1 (Bauskin et coll, 2000). A l'inverse, dépourvus du prodomaine et plus particulièrement des 28 premiers résidus amino-terminaux, les précurseurs de MIC-1 sont insensibles à ces inhibiteurs. Ces données suggèrent que l'interaction entre le prodomaine et la région mature des MIC-1 monomériques, expose un signal d'adressage au mécanisme de dégradation par le protéasome. Ce signal, enfouis dans les homo-dimères de MIC-1 matures, permet la dégradation spécifique des monomères mal repliés et/ou incapables de se dimériser et garantit ainsi que seuls les dimères de MIC-1 matures sortent du RE (Bauskin et coll, 2000).

La région propeptidique de MIC-1 présente donc une fonction dans le CQ des précurseurs monomériques mal repliés et/ou dimérisés. Le propeptide pourrait directement porter les signaux d'adressage au mécanisme de dégradation par le protéasome ou indirectement en favorisant l'intervention d'autres protéines parfois impliquées dans la dégradation comme la protéine BiP.

Une étude portant sur un autre membre de la famille des TGFs, la protéine BMP-4 pour « *bone morphogenic protein-4* » propose également un rôle de médiateur de la dégradation pour les régions propeptidiques (Degnin et coll, 2004). En effet, la BMP-4 subit un processus de maturation qui fait intervenir deux clivages successifs au niveau du prodomaine. Ces clivages sont catalysés par des endoprotéases de la famille des convertases probablement la furine ou PC6 (Cui et coll, 1998). De manière intéressante les clivages aux sites S1 et S2 modulent le niveau de production de BMP-4 mature. En effet, des expériences de mutations des sites de clivages montrent qu'un clivage successif des 2 sites augmente la sécrétion tandis qu'un clivage de S1 seulement diminue l'activité mesurée par rapport à des BMP-4 matures sauvages issus du clivage séquentiel des sites S1 puis S2 (Cui et coll, 2001). Le mécanisme responsable de la régulation de la sécrétion des protéines BMP-4 matures implique probablement une dégradation des formes matures BMP-4 non clivées au niveau du site S2. Il a en effet été démontré que le prodomaine non clivé au site S2 reste associé aux protéines matures et les adresse au mécanisme de dégradation par le protéasome (Degnin et coll, 2004). Ainsi, les prodomaines fixés aux BMP-4 non clivées pourraient induire un changement de conformation des protéines alors reconnues par le CQ ou bien induire une augmentation de l'affinité des BMP-4 matures non clivées pour leurs récepteurs, et les adresser aux lysosomes après leur endocytose (Degnin et coll, 2004).

Ces études proposent donc une nouvelle fonction pour les régions propeptidiques dans la maturation des protéines, en suggérant un rôle de senseur de la dégradation des protéines. Par interaction directe avec les acteurs du système de dégradation intracellulaire ou indirectement par la modulation de la conformation et de la stabilité des proformes, les propeptides entraîneraient la dégradation des protéines incorrectement repliées ou maturées soient invalidées par le mécanisme de contrôle de qualité des protéines.

### **II.3.C. Les propeptides responsables du trafic intracellulaire des protéines**

Dans les exemples précédemment exposés, il apparaît que le propeptide joue sur le trafic intracellulaire et la sécrétion des protéines, via son rôle dans l'acquisition et/ou le maintien d'une conformation tridimensionnelle correcte et donc compétente pour le transport des protéines à travers la voie de sécrétion de la cellule.

Cependant les prodomaines peuvent être plus directement impliquer dans le trafic intracellulaire des protéines. Le prodomaine des protéases de la famille des cathepsines joue ainsi un rôle dans la sécrétion de ces protéines en agissant dans le transport des précurseurs protéiques vers les lysosomes, lieux d'action physiologique de ces protéines.

Les premières explications vis à vis de la diminution ou même de l'inhibition totale de la sécrétion des molécules de la cathepsines D dépourvues de leurs prodomaines sont que ces dernières sont indispensables à leur sécrétion (Conner et coll, 1992). Cependant, il apparaît que les propeptides pourraient présenter de véritables signaux de trafic intracellulaire au niveau de leur séquence. En effet, la cathepsine D, délétée de son domaine propeptidique est correctement repliée, mais n'est alors plus adressée aux lysosomes. De même, fusionnée avec le propeptide d'autres protéases à aspartate, la cathepsine D est à nouveau correctement repliée mais n'est toujours pas adressée aux lysosomes. Ceci suggère donc que le propeptide porte dans sa séquence ou sa conformation, des éléments déterminants pour l'adressage de la cathepsine D aux lysosomes (Fortenberry et coll, 1995).

De même, la dégradation des précurseurs des protéines BMP-4, associées à leurs prodomaines non clivés, pourrait impliquer plus directement le propeptide. En effet, le fait que la dégradation des BMP-4 fasse intervenir les compartiments lysosomaux, suggère que les prodomaines fixés aux BMP-4 non clivées au niveau du site S2 pourraient eux-mêmes porter des signaux de fixation à des récepteurs d'adressage aux lysosomes (Degnin et coll, 2004).

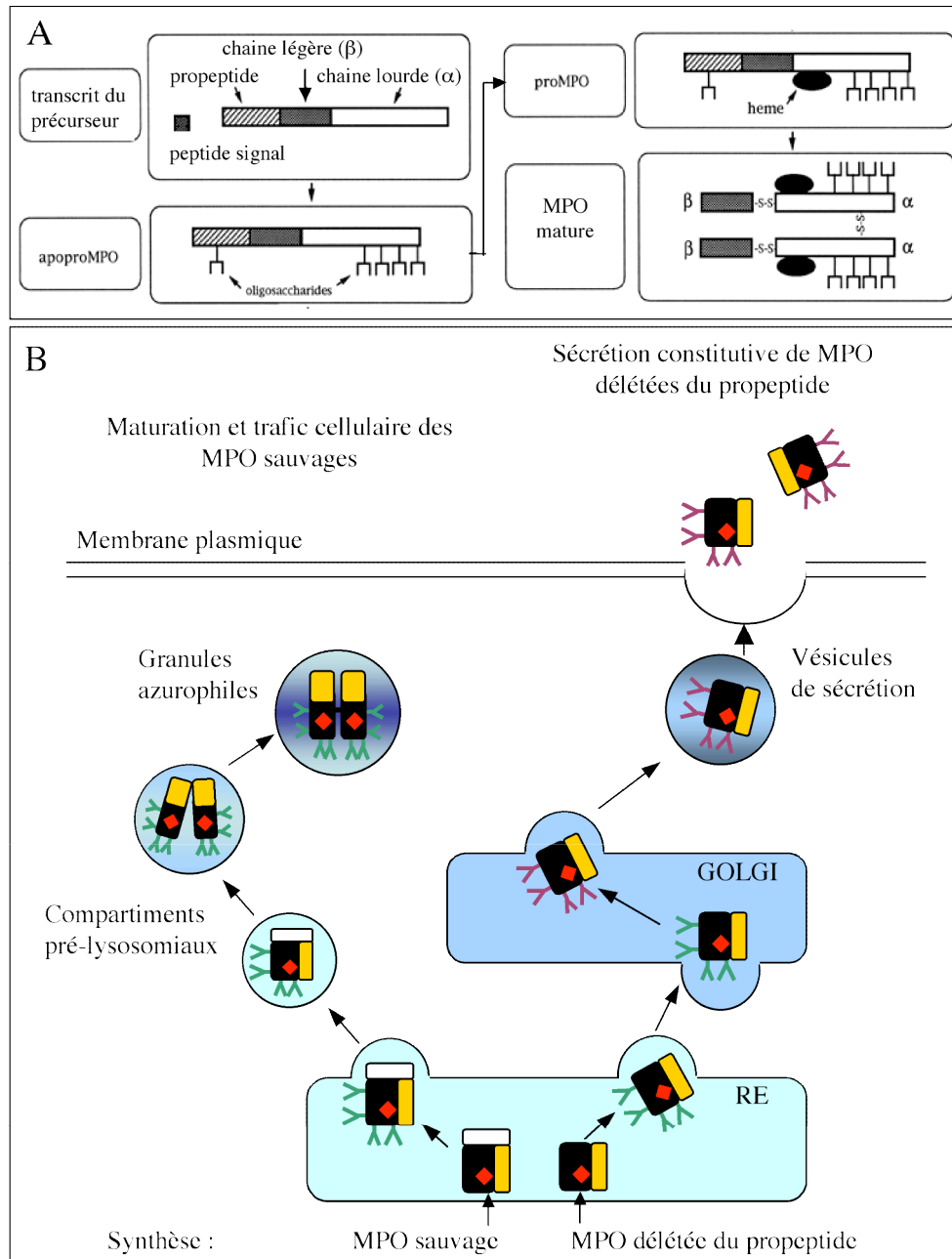
La région propeptidique du TGF $\beta$ 1, présentée précédemment comme étant indispensable pour la sécrétion des dimères actifs, pourrait également contenir des signaux de trafic intracellulaire dans sa partie C-terminale. En effet, délétés des résidus 110 à 210, les dimères de propeptides ( $\beta$ 1-LAP) exprimés seuls ou associés au reste de la protéine ne sont pas sécrétés, contrairement aux  $\beta$ 1-LAP mutés dans la partie amino-terminale (résidus 40 à 110) et sont retrouvés dans les compartiments intracellulaires (Sha et coll, 1991). Cette séquence pourrait donc contenir des signaux d'exportation pour les TGF $\beta$ 1 matures.

Le prodomaine de la myéloperoxydase (MPO) pourrait également présenter de tels signaux. En effet, la MPO, protéine de la famille des peroxydases et protéine majoritaire des granules des neutrophiles, est synthétisée sous forme de précurseur protéique au niveau du RE, la pro-MPO. Elle subit un mécanisme de maturation complexe durant son trafic à travers la voie de sécrétion impliquant notamment des clivages endoprotéolytiques. Ceux-ci interviennent dans la formation des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  constituant les homodimères actifs de la MPO et également dans la libération d'une région propeptidique amino-terminale (Fig.17. A).

Les études visant à déterminer le rôle de cette proséquence dans la biosynthèse de la MPO montrent d'une part qu'elle est en partie responsable du temps de rétention des précurseurs au niveau du RE (Bulow et coll, 2002 ; Olsson et coll, 2004) et d'autre part de l'adressage des MPO vers les granules azurophiles (Bening et coll, 1998 ; Andersson et coll, 1998). En effet, alors que les molécules de MPO sauvages sont en majorité intracellulaire, délétée de la région propeptidique, les MPO sont sécrétées suivant la voie de sécrétion constitutive via l'appareil de Golgi. Ces proformes sont capables d'incorporer le groupement prosthétique indispensable à l'activité enzymatique de l'enzyme, mais ne subissent pas le clivage final des sous-unités intervenant dans les étapes terminales de la maturation de la MPO au sein des compartiments lysosomiaux (Andersson et coll, 1998) (Fig.17. B).

Ces résultats suggèrent donc que sans le propeptide, le repliement de la MPO s'effectue correctement mais que son trafic intracellulaire est modifié. Une expérience menée avec la protéine du lysozyme fusionnée avec la région propeptidique de la MPO, confirme que cet adressage vers les lysosomes dépend de la présence de la proséquence de la MPO et démontre que l'aiguillage des proformes matures de MPO intervient en amont des compartiments médian et trans de l'appareil de Golgi (Bening et coll, 1998 ; Olsson et coll, 2004). Ceci explique le caractère presque exclusivement oligomannosylées des formes sauvages de la MPO par rapport à la présence de motifs de types complexes sur les MPO dépourvues du prodomaine (Andersson et coll, 1998).





**Fig 17: Représentation schématique de la biosynthèse et du trafic intracellulaire de la myéloperoxydase.** (A) Schématisation des différentes formes de MPO au cours de sa maturation. (B) La synthèse de la MPO débute sur les ribosomes liés au RE. Le précurseur subit les modifications post-traductionnelles par N-glycosylation et fixation du groupement prosthétique (losange rouge) au niveau du RE. Les formes sauvages sont aiguillées vers les compartiments pré-lysosomiaux où une série de clivages endoprotéolytiques entraînent la libération des 125 résidus de la prorégion (rectangle blanc) et la formation des chaînes lourdes α (rectangle noir) et légères β (rectangle jaune) de la protéine. Par la suite les hétérodimères αβ se dimérisent pour donner les formes matures de la MPO stockées dans les granules azurophiles. Par contre les proformes délétées du propeptide continuent dans la voie de sécrétion constitutive en passant par l'appareil de Golgi jusqu'aux vésicules de sécrétion. Elles acquièrent des motifs glycanniques de types complexes mais ne sont pas correctement maturées. (d'après Andersson et coll, 1998 et Nauseef et coll, 1998)

Ainsi, le propeptide de la MPO possède des signaux de rétention dans les compartiments précoces de la voie de sécrétion pour les précurseurs de MPO mal conformés ou n'ayant pas encore incorporé l'hème (Bulow et coll ; 2002) ainsi que des signaux d'adressage vers les granules de stockage des neutrophiles, localisation indispensable à la maturation terminale des proMPO correctement repliés (Nauseef et coll, 1998; Olsson et coll, 2004).

## I. L'hormonosynthèse thyroïdienne

### I.1. La glande thyroïdienne

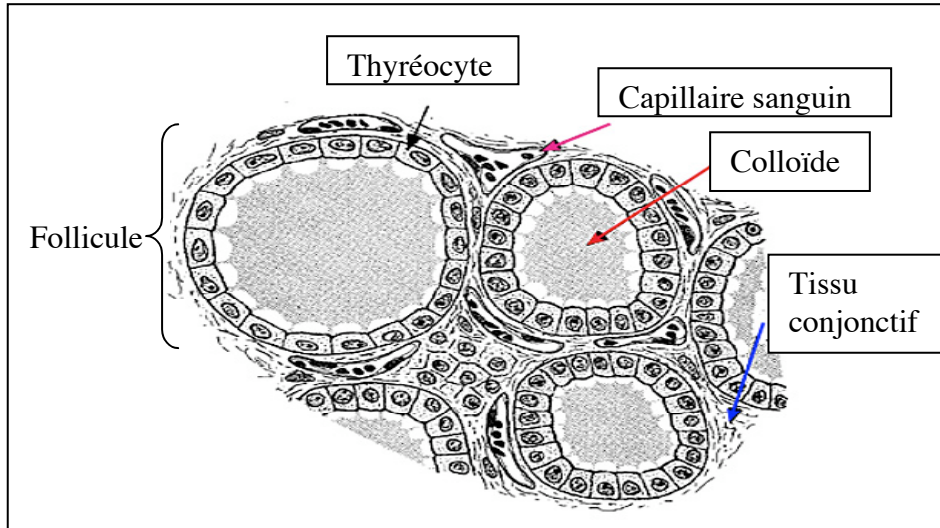
Les hormones thyroïdiennes, la 3,5,3'-tri-iodotyrosine (T3) et la 3,5,3',5'-tetra-iodotyrosine (T4) ou thyroxine sont impliquées dans le développement et le métabolisme de tous les vertébrés. L'organisme synthétise ces hormones au niveau d'une glande endocrine, la thyroïde, qui a la capacité de concentrer l'iodure et de maintenir un taux constant d'hormones thyroïdiennes dans le sang malgré les variations d'apport en iode. Constituée de deux lobes, la thyroïde est située à la base du cou, entre la trachée et le cartilage thyroïdien.

La thyroïde est constituée de structures folliculaires qui sont les unités fonctionnelles de la glande. Ces vésicules reposent sur le tissu conjonctif thyroïdien et la glande est largement vascularisée (Fig. 18).

Les follicules sont formés d'une couche unique de cellules épithéliales polarisées, les thyrocytes (Fig. 19), enfermant un espace, la lumière folliculaire, rempli de colloïde. Cette dernière est la substance intra-folliculaire qui contient principalement la protéine précurseur des hormones T3 et T4, la thyroglobuline. Des cellules parafolliculaires, cellules C, synthétisant la calcitonine, sont trouvées entre les follicules et la lame basale.

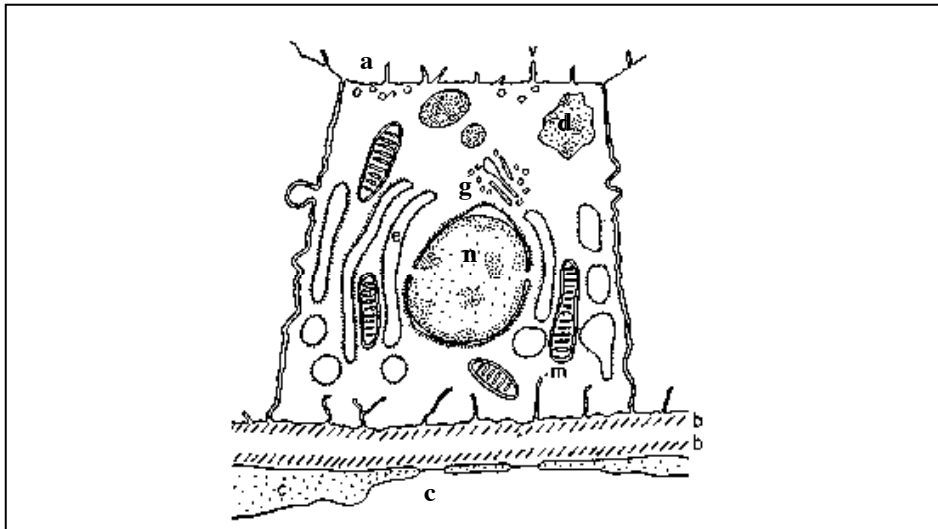
La polarisation des thyrocytes détermine d'une part la membrane basolatérale en contact avec la circulation sanguine d'où provient l'iodure et où sont libérées les hormones thyroïdiennes synthétisées dans la cellule, et d'autre part la membrane apicale en contact avec la colloïde, formant de nombreuses microvillosités où est exprimé le système de production des hormones thyroïdiennes.

Le système de production des hormones thyroïdiennes (HT) fait intervenir différentes protéines membranaires des thyrocytes. Ainsi on compte, le cotransporteur basolatéral de Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>, NIS, et les transporteurs apicaux qui sont responsables de la concentration de l'iodure dans la thyroïde mais également les protéines impliquées dans le système de génération d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à la membrane apicale ainsi que la thyroperoxydase qui est l'enzyme clé de la synthèse des HT. Cette dernière catalyse à la membrane apicale des thyrocytes, à la fois l'iodation des tyrosines de la thyroglobuline qui est le précurseur des hormones thyroïdiennes et le couplage de ces iodotyrosines.



**Fig 18 : Coupe de follicules thyroïdiens.**

Les cellules épithéliales qui composent les follicules thyroïdiens de forme sphérique, sont les thyrocytes. Il délimite un espace intra-folliculaire appelé colloïde contenant en majorité de la Tg. Les follicules reposent sur un tissu conjonctif parcouru par des capillaires sanguins où les HT sont libérées.



**Fig 19 : Schéma d'un thyrocyte.** Membrane apicale, a ; membrane basolatérale, b ; capillaire sanguin, c ; vésicules de colloïde internalisée, d ; réticulum endoplasmique, e ; appareil de Golgi, g ; mitochondrie, m ; noyau, n ; microvillus, v.

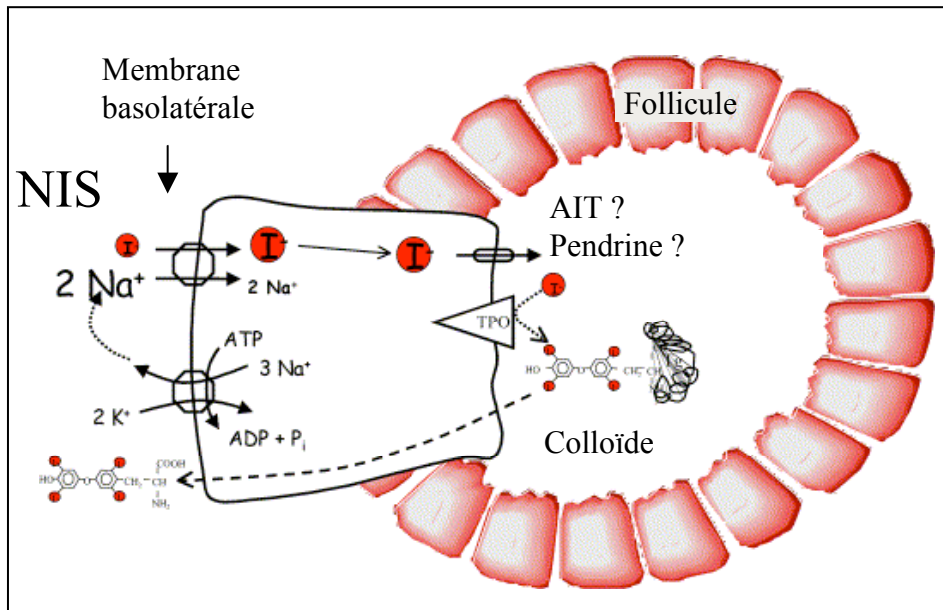
## I.2. La concentration et le transport de l'iode

L'iodure est l'élément essentiel à la formation des HT. L'accumulation de l'iodure issu de l'alimentation dans la thyroïde nécessite, d'une part, son transport du sang vers le cytoplasme des cellules folliculaires thyroïdiennes et d'autre part, sa libération dans la lumière du follicule (Fig. 20). Ainsi, après son transport, l'iode est concentré au niveau de la glande thyroïdienne par un facteur de 20 à 40 fois sa concentration sanguine.

L'ion iodure,  $I^-$ , est activement transporté du sang dans le cytoplasme des thyrocytes grâce au symporteur NIS, un cotransporteur de  $Na^+$  et d' $I^-$  inséré dans la membrane basolatérale des cellules folliculaires. Le clonage successif du gène NIS de rat (Dai et coll, 1996), d'homme (Smanik et coll, 1996) puis de souris ainsi que la génération d'anticorps ont permis de caractériser la structure et la fonction de ce transporteur. Chez l'homme (Smanik et coll, 1996), le gène de NIS situé sur le chromosome 19 code pour une protéine de 634 acides aminés présentant 13 domaines transmembranaires et 3 sites de glycosylations aux positions 225, 485 et 4970 (Levy et coll, 1997 et 1998). Le domaine C-terminal intracytoplasmique présente différents motifs, di-leucine et di-aspartate ou glutamate, qui par homologie avec d'autres protéines membranaires pourrait être impliqué dans le trafic intracellulaire du NIS (Dohan et coll, 2003). La protéine NIS présente également des résidus de sérines phosphorylées. Bien que le rôle précis de la phosphorylation ne soit pas défini, celle-ci est modulée par la thyrotropine (TSH) l'hormone stimulant la synthèse des hormones thyroïdiennes, et pourrait ainsi réguler la distribution cellulaire du transporteur (Riedel et coll, 2001).

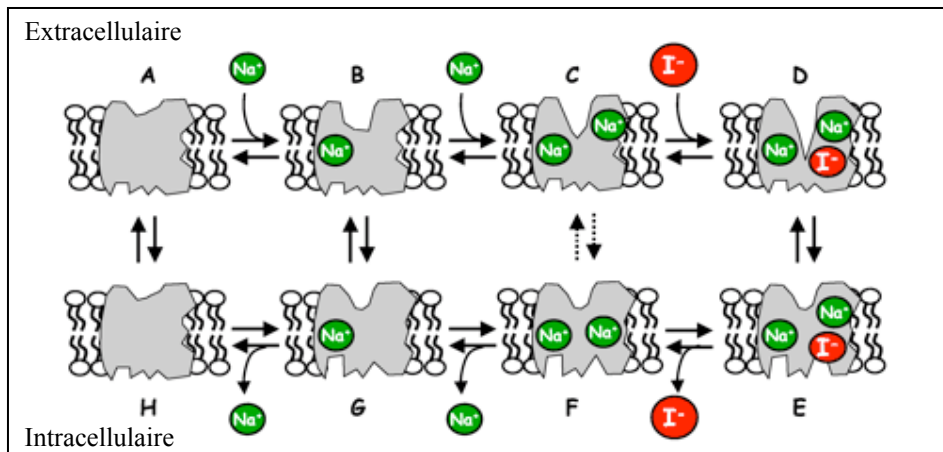
Le mécanisme de transport utilise le flux entrant de  $Na^+$  suivant son gradient de concentration pour cotransporter l'iodure contre le sien. Le modèle retenu suggère la fixation séquentielle de deux ions de  $Na^+$  puis d'un ion  $I^-$  présents dans le milieu extracellulaire et après un changement conformationnel, le transport simultané et la libération de l' $I^-$  puis des deux  $Na^+$  dans le cytoplasme des thyrocytes (Fig. 21). L'énergie nécessaire au transport de l'iodure est fournie par une  $Na^+/K^+$  ATPase qui maintient le gradient électrochimique du  $Na^+$  (Eschandari et coll, 1997). Récemment l'équipe de Carrasco a mis en évidence la présence d'oligomères de NIS (Dohan et coll, 2003).

A l'inverse de ce transport actif, le mécanisme de transfert de l'iodure à travers la membrane apicale est passif. Deux récepteurs potentiels ont été mis en évidence (Fig. 20).



**Fig 20 : Les différents acteurs du transport de l'iode dans le follicule thyroïdien.**

Le symporteur Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>, NIS, inséré dans la membrane basolatérale des thyrocytes permet le transport actif de l'iodure de la circulation sanguine dans les cellules thyroïdiennes. La diffusion de l'iodure dans la colloïde implique la présence de protéines de transport insérées dans la membrane apicale des thyrocytes, tels l'AIT ou la pendrine. (d'après Dohan et Carrasco, 2003).



**Fig 21 : Représentation du mécanisme de transport de l'iodure par NIS.** Les deux ions Na<sup>+</sup> se fixent successivement avant l'ion iodure. Le changement de conformation imprimé par la fixation des ions, permet à l'iodure de se retrouver exposé du côté intracellulaire. Les deux Na<sup>+</sup> libérés dans le cytoplasme seront éliminés via la pompe ATPase à sodium/potassium. Le symporteur retrouve une conformation permettant à nouveau la fixation des ions iodures extracellulaires. (d'après Eskandari et coll., 1997).

La pendrine d'une part, dont la mutation entraîne le syndrome de Pendred caractérisé par des problèmes auditifs ainsi que par un goitre (Everett et coll, 1997), est un transporteur membranaire de divers anions dont le  $\text{Cl}^-$  et  $\text{I}^-$  (Scott et coll, 1999), localisé au niveau de la membrane apicale des thyrocytes (Porra et coll, 2002). Cependant, bien que l'effet de l'altération de l'expression de la pendrine soit corrélé à l'hyper- ou l'hypo-fonctionnement de divers tissus pathologiques thyroïdiens, les faibles variations d'expression suggèrent l'implication d'autres facteurs dans le métabolisme de l'iodure dans les tissus thyroïdiens (Porra et coll, 2002). Ainsi plus récemment, le transporteur apical d'iodure humain, défini en anglais par le terme « hAIT », a été identifié par homologie avec le gène NIS (Rodriguez et coll, 2002; Lacroix et coll, 2004). Cette protéine de 610 résidus, localisée au niveau de la membrane apicale des thyrocytes, permet la diffusion facilitée de  $\text{I}^-$  dans la lumière folliculaire.

### **I.3. Le système de génération de l' $\text{H}_2\text{O}_2$**

L'iodation des résidus de tyrosines de la thyroglobuline et le couplage de ces iodotyrosines catalysés par la thyroperoxydase nécessitent la présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et de  $\text{Ca}^{2+}$  (Bjorkman et coll, 1988). Le système impliqué dans la génération d' $\text{H}_2\text{O}_2$  fait intervenir des protéines de la famille des NADPH oxydases au niveau de la membrane apicale des thyrocytes (Dupuy et coll, 1991). Ces enzymes catalysent l'oxydation de NADPH en  $\text{NADP}^+$  qui en présence d' $\text{O}_2$  produit de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Dupuy et coll, 1991; De Deken et coll, 2002). Des études antérieures avaient envisagé la formation d'ions  $\text{O}_2^-$  intermédiaire convertis en  $\text{H}_2\text{O}_2$  par une superoxyde dismutase (Nakamura et coll, 1987).

Jusqu'à présent différentes NADPH oxydases ont été identifiées. Ainsi THOX1/DUOX1 et THOX2/DUOX2 (Dupuy et coll, 1999 et 2000; De Deken et coll, 2000) sont des hémoglycoprotéines de 180 kDa co-localisées au niveau de la membrane apicale des thyrocytes avec la thyroperoxydase. Présentant de fortes homologies avec la famille des flavoprotéines, on retrouve dans le domaine intracytoplasmique de THOX1 et 2, les quatre résidus d'histidine et celui d'arginine, spécifiques du domaine de fixation de l'hème et représentant les domaines d'interaction avec NADPH/(FAD) ainsi qu'un domaine d'activation fixant le  $\text{Ca}^{2+}$ . La partie extracellulaire présente quant à elle une forte homologie avec les peroxydases et pourrait être impliqué dans des interactions avec la thyroperoxydase (De Deken et coll, 2000).

Ces NADPH oxydases récemment rebaptisées LNOX1 et 2 font partie d'un système NADPH :O<sub>2</sub> oxydo-reducteur composé d'autres partenaires moléculaires spécifiques de la thyroïde, non encore identifiés (De Deken et coll, 2000).

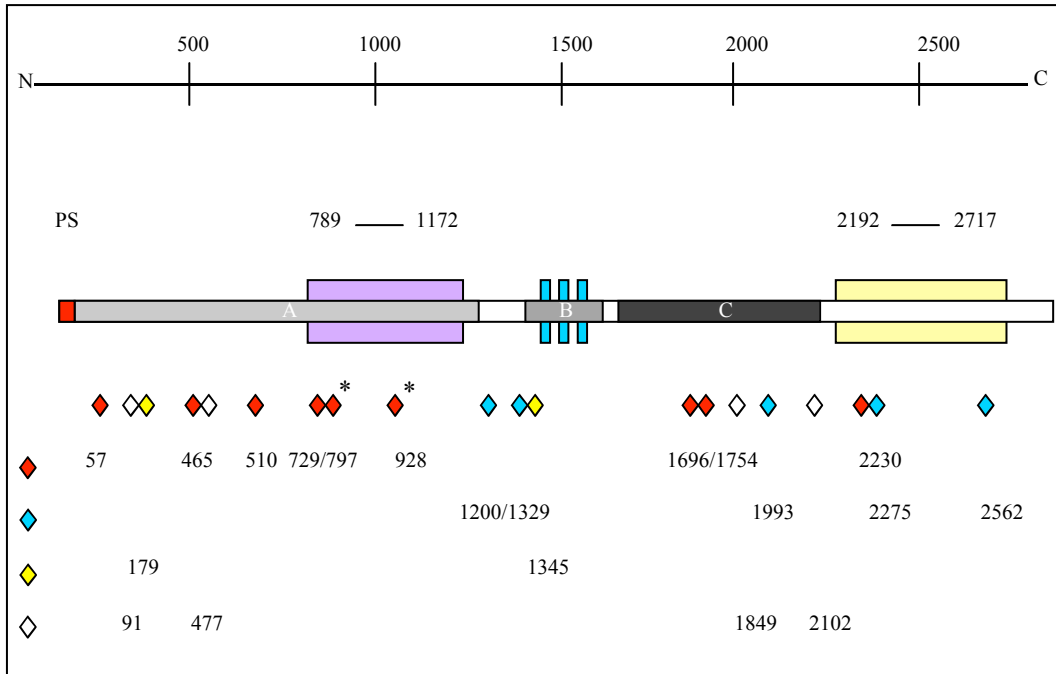
#### **I.4. Le support des hormones thyroïdiennes : la thyroglobuline**

Le gène de la Tg situé sur le chromosome 8 présente 48 exons. Les facteurs de transcription spécifiques de la thyroïde, TTF-1, TTF-2 et Pax 8 régulent la transcription d'un précurseur de l'ARN messager de la Tg de 8.7 kb. Divers variants issus de l'épissage alternatif existent dans les tissus thyroïdiens normaux et pathologiques. Jusqu'à présent, plusieurs délétions ont été identifiées, la délétion des exons 3, 4, 6, 17, 18, 22, 26, 46, des variants délétés de plusieurs exons, 17 à 19 et 17 à 20, ainsi que des variants délétés de la séquence partielle des exons 15 à 19 et des exons 42 à 43. Bien que l'influence de ces délétions sur la protéine de Tg ne soit pas élucidée, il est probable qu'elles modifient la maturation de la protéine, l'efficacité de l'iodation (cas de la délétion de l'exon 4, possédant la tyrosine 130, un site donneur important) ou bien encore qu'elles engendrent une susceptibilité plus ou moins importante à la dégradation et donc à la libération des hormones thyroïdiennes.

La thyroglobuline ou prohormone thyroïdienne est la matrice peptidique servant de support à la formation des hormones thyroïdiennes. En effet, elle possède des résidus de tyrosines qui seront des sites accepteurs d'iodation ou des sites donneurs d'iodotyrosines qui cèderont leur groupement iodophénol lors de la formation et du couplage des iodotyrosines dans la colloïde.

Cette glycoprotéine est synthétisée sous forme de monomères de 330 kDa (molécule 12 S) au niveau du RE des thyrocytes (Kim et coll, 1991). Au cours de sa maturation la Tg subit différentes modifications post-traductionnelles. Ainsi, 10% des sites potentiels de N-glycosylation de la Tg sont glycosylés dans le RE puis une partie de ces motifs N-glycanniques de types oligomannosylés sont convertis en structures complexes dans l'appareil de Golgi (Yang et coll, 1996). La dimérisation de deux molécules 12 S de manière non-covalente dans un compartiment pré-golgien conduit à la formation d'une protéine 19 S, de 660 kDa, forme de la Tg, active pour le transport intracellulaire et sécrétée dans la lumière folliculaire. Ce n'est que lors de l'iodation que les dimères seront liés de manière covalente, via la formation de ponts disulfures intermoléculaires (Kim et coll, 1991 et 1993).





**Fig 22: Représentation schématique d'une chaîne monomérique de thyroglobuline**

Le domaine d'homologie avec l'acétylcholinestérase (boite jaune), le domaine impliqué dans l'interaction avec le récepteur de N-acetylglucosamine d'après Mezghrani (boite violette), les trois domaines thioredoxine aux séquences 1440-1444, 1453-1457, 1471-1474 (boites bleues), ainsi que les différents domaines de séquences répétées riches en cystéines de type 1, région 12-1191 (A), de type 2, région 1437-1484 (B) et de type 3, région 1584-2168 (C) sont représentés avec leur position. Les différents sites de N-glycosylation sont indiqués en rouge pour les motifs de type complexe, en bleu pour les motifs oligomannosylés, en jaune pour les motif de type hybride et en blanc pour les autres sites potentiels de glycosylation. Les astérisques indiquent les sites de glycosylation impliqués dans la modulation de l'interaction Tg-récepteur.

La Tg possède divers domaines d'homologie dont un domaine d'homologie avec l'acétylcholinestérase au niveau de l'extrémité C-terminale (chez l'homme, résidus 2211 à 2768) (Van De Graaf et coll, 2001). Ce domaine agit comme un « domaine de dimérisation », en aidant au repliement et au transport intracellulaire correct de la Tg (Park et coll, 2004). Trois domaines thioredoxine débutant au niveau des résidus 1440, 1454 et 1471 seraient également impliqués dans le repliement correct de la Tg ainsi que dans la formation de ponts disulfures intermoléculaires lors de la dimérisation des Tg dans la lumière folliculaire (Klein et coll, 2000).

Plusieurs autres domaines d'homologie potentiellement impliqués dans l'interaction de la Tg au niveau de la membrane apicale ont également été identifiés. Un domaine de fixation pour un récepteur de N-acétyl-glucosamine a été trouvé au niveau des résidus 789 à 1173 (Mezghrani et coll, 1997). Une séquence d'homologie avec les domaines fixant l'héparine, identifiée au niveau des résidus 2582-2587 pourrait être impliquée dans la fixation à la mégaline lors de l'endocytose de la Tg iodée (Marino et coll, 1999 et 2000a).

Enfin, plusieurs domaines de séquences de résidus de cystéines sont trouvés tout au long de la séquence de la protéine. Ces séquences pourraient intervenir en modulant la fixation et l'action des protéases impliquées dans la dégradation de la Tg-iodée nécessaire à la libération des hormones T4 (Molina et coll, 1996).

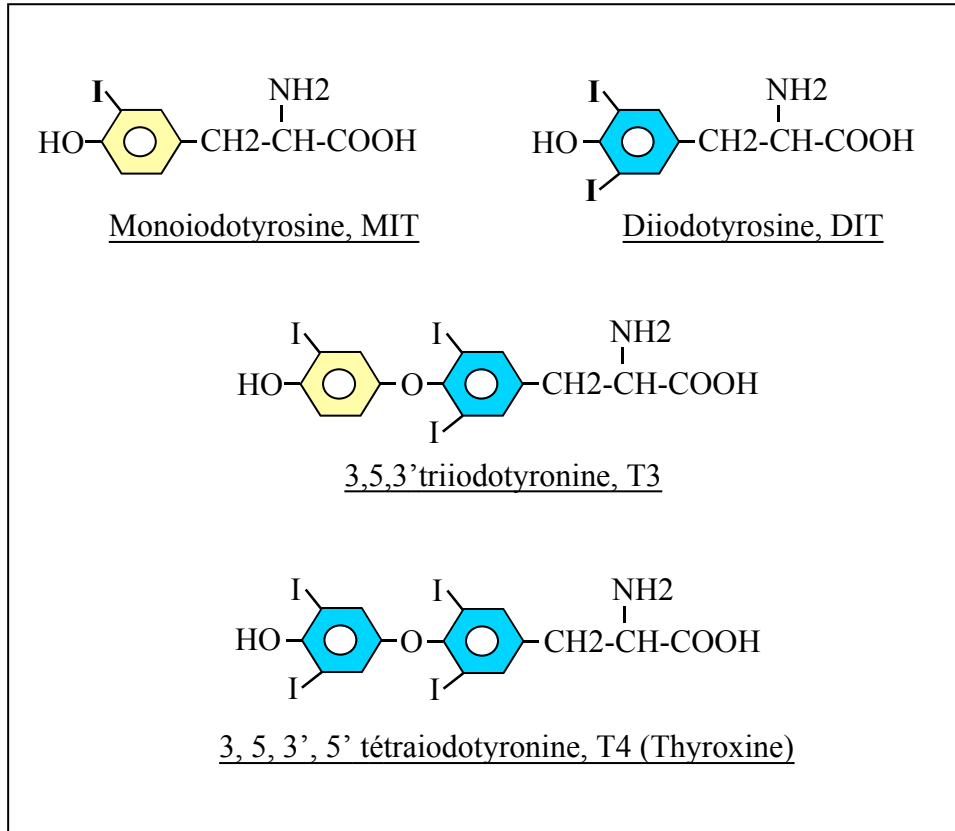
L'ensemble de ces données est représenté dans la figure 22.

## **I.5. Le mécanisme d'iodation de la Tg**

### **I.5.A. Iodation des tyrosines et couplage des iodo- et diiodotyrosines de la Tg**

Les différents acteurs du système de génération des hormones thyroïdiennes décrits précédemment participent au niveau de la membrane apicale à l'iodation de certains résidus de tyrosines de la Tg, réactions catalysées par la thyroperoxydase (Ekholm et coll, 1984), et conduisant à la formation des hormones T3 et T4 (Fig. 23).

Sur les 134 résidus de tyrosines que compte un dimère de Tg, seulement 1/3 d'entre eux sont iodés. Les sites d'iodation précoces majeurs ont été identifiés au niveau des résidus de tyrosine 2554, 130, 685, 847, 1448 et 5 (Lamas et coll, 1989 ; Marriq et coll, 1991), 2553 et 2520 (Xiao et coll, 1996) et aussi 1291 (Gentile et coll, 1997) (Fig. 24).



**Fig. 23: Les hormones thyroïdiennes et de leurs précurseurs.**

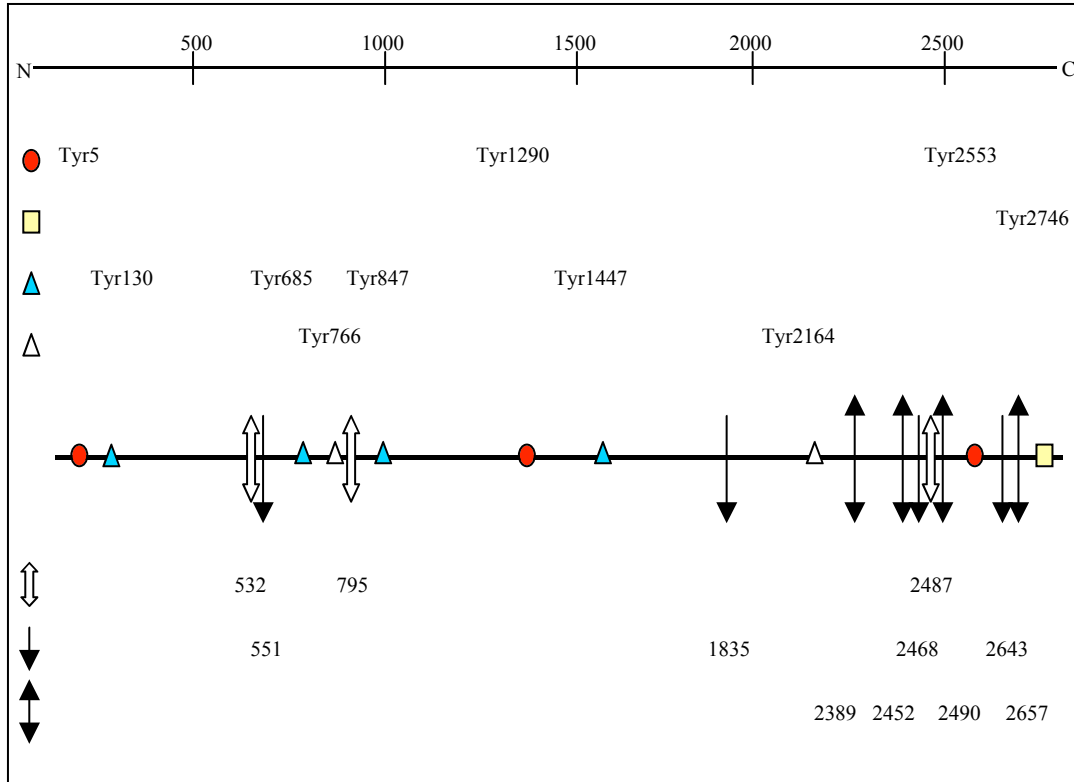
Les résidus de tyrosines mono- (MIT) et di-iodés (DIT) sont les précurseurs des formes actives des hormones thyroïdiennes, T3 et T4, issues du couplage d'un résidu MIT et d'un résidu DIT ou de deux résidus DIT, respectivement.

Parmi ces sites, on distingue les sites hormonogéniques T4, tyr 5, tyr 2554 et 1290 et T3 au niveau de la tyr 2747, (Xiao et coll, 1996). Les autres sites précoces d'iodation pourraient être les sites donneurs de groupement iodo-phénol lors du couplage des iodotyrosines. Jusqu'à présent seulement le site Tyr130 a été identifié comme site donneur pour le site majeur dans la formation de l'hormone T4 au niveau de la tyrosine 5 (Marriq et coll, 1991; Dunn et coll, 1998). Il apparaît en outre que la sélection des sites d'iodation dépend fortement de la conformation de la Tg plutôt que de la thyroperoxydase elle-même (Xiao et coll, 1996; Dunn et coll, 1999).

La production des HT nécessite, d'une part l'iodation des tyrosines de la Tg et d'autre part, le couplage des tyrosines ainsi iodées. La première réaction conduit à la formation de monoiodotyrosines ou MIT possédant un atome d'iode en position 3 de leur cycle benzénique ou de diiodotyrosines ou DIT en comptant deux en position 3 et 5. Le couplage d'une MIT et d'une DIT ou de deux DIT conduit à la formation des hormones T3 et T4 respectivement (Fig. 23). Les groupements tyrosyls ou iodotyrosyls ainsi que l'iodure, occupent chacun une des deux niches du domaine catalytique de la TPO. Ces deux sites pourraient en outre avoir des spécificités d'interaction pour l'une ou l'autre de ces populations.

Les mécanismes réactionnels mis en jeu sont soumis à controverse (Taurog, 1970; Ohtaki et coll, 1982). L'hypothèse radicalaire suggère que l'oxydation de l'iodure et de la tyrosine entraîne la formation de radicaux libres  $I^{\bullet}$  et tyrosyl $^{\bullet}$  par enlèvement d'un électron en position 3 ou 5 de son cycle. La seconde hypothèse envisage la formation de l'ion iodium,  $I^+$ , par perte de deux électrons, qui en raison de son caractère très électrophile attaquerait directement la tyrosine au niveau de la double liaison du cycle benzénique en position 3 ou 5.

La réaction chimique intervenant lors du couplage est également discutée. Une des hypothèses serait qu'elle passerait par l'oxydation de deux tyrosines, puis par la formation d'un intermédiaire réactionnel présentant une liaison quinol éther et enfin par la rupture de la liaison de groupement benzénique de la tyrosine donneuse. La réaction conduit à la formation des HT, T3 et T4, ainsi qu'à la libération d'une déhydroalanine convertie par la suite en sérine par hydrolyse. Dans la seconde hypothèse, le mécanisme de couplage pourrait être radicalaire, avec formation de radicaux libres de MIT $^{\bullet}$  et de DIT $^{\bullet}$ , ou électrophile par formation de iodotyrosines cationiques (Gavaret et coll, 1981). Les intermédiaires et les produits finaux de la réaction étant identiques dans ces deux hypothèses, il est difficile de trancher en faveur de l'hypothèse radicalaire ou de l'hypothèse ionique.



**Fig 24 : Position des différents sites d'iodation de la Tg et des sites de clivages par les endoprotéases lysosomales sur la séquence de la thyroglobuline.**

Les positions des sites hormonogéniques majeurs T3 (carré jaune) et T4 (rond rouge), des sites iodés préférentiellement et potentiellement donneurs de iodotyrosines (triangle bleu) ainsi que d'autres sites iodés d'après plusieurs études (triangle blanc) sont indiquées dans la partie supérieure. Les sites de clivages par la cathepsine B (flèche pleine), par la cathepsine L (double flèche) et par la cathepsine D (flèche simple) sont indiqués au dessous de la séquence.

L'iodation est également associée à un clivage peptidique de la Tg. Ce clivage produit dans un premier temps un iodopeptide de 26 kDa qui contient le site hormonogénique T4 principal (Dunn et coll, 1982) et dans un second temps un iodopeptide de 18 kDa issu du premier. Cette maturation de la Tg iodée pourrait initier le mécanisme de dégradation nécessaire à la libération des hormones T3 et T4 de leur matrice peptidique.

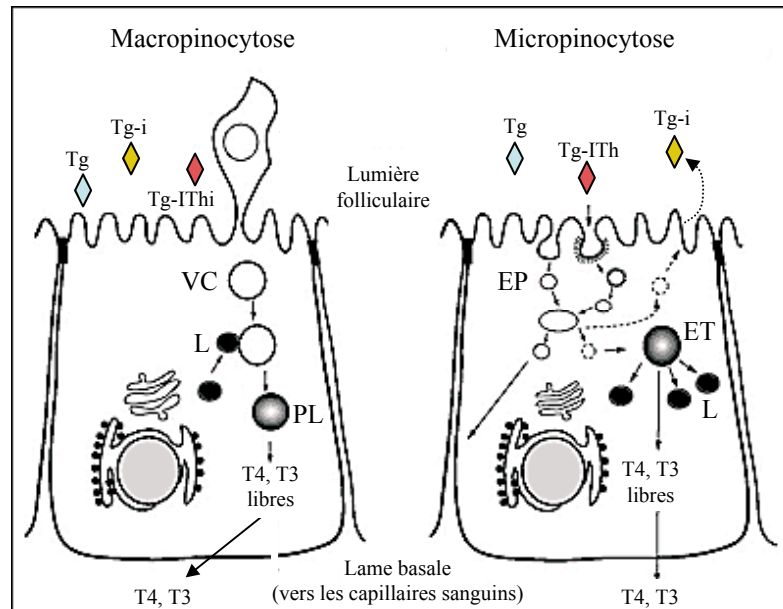
### **I.5.B. Le stockage de la Tg iodée**

La thyroglobuline présente dans la lumière folliculaire est constituée de plusieurs populations dont des Tg matures plus ou moins glycosylées récemment sécrétées et des Tg iodées ou en cours d'iodation. La Tg est accumulée dans la colloïde sous formes dimériques porteuses des hormones T3 et T4 et sous formes multimériques. Ces dernières entraînent la formation de globules de Tg insolubles, les i-Tg, qui sont issus de la formation de ponts disulfures intermoléculaires (Berndorfer et coll, 1996) et du couplage de iodothyrosines intermoléculaires (Baudry et coll, 1998). De manière intéressante, cette population contient davantage d'iode que les dimères 19S mais peu d'hormones (Xiao et coll, 1996). Après stimulation par la TSH, ces formes insolubles sont partiellement dégradées au niveau de la membrane apicale (Gerard et coll, 2004). La polymérisation et la dégradation des i-Tg fait intervenir un mécanisme oxydatif impliquant le système TPO-THOX (Baudry et coll, 1998) et pourrait associer les exo- et endo-protéases de la famille des cathepsines.

Le rôle de ces formes est controversé. En effet, alors que la Tg dimérique représente la forme de stockage des hormones thyroïdiennes, les i-Tg pourraient être des formes de stockage de l'iode qui après dégradation et dé-iodation des tyrosines serait recyclé vers la lumière folliculaire (Baudry et coll, 1998). Ces formes pourraient également être des stocks de prohormone, utilisable même après fragmentation pour la synthèse des hormones thyroïdiennes (Berndorfer et coll, 1996 ; Gerard et coll, 2004).

### **I.5.C. L'internalisation de la Tg**

Pour produire les hormones thyroïdiennes, les thyrocytes dans un premier temps, internalisent la Tg porteuse d'hormones T3 et T4 et dans un second temps, réalisent le clivage protéolytique des hormono-peptides dans les compartiments lysosomaux.



**Fig 25: Les mécanismes d'internalisation de la thyroglobuline.**

La macropinocytose de la Tg implique la formation de pseudopodes englobant des « gouttes » de colloïde (VC). Ce mécanisme indépendant de l'état de maturation et d'iodation de la Tg, conduit la Tg vers les phagolysosomes (PL) après fusion des lysosomes (L). La micropinocytose des Tg portant des iodothyronines (Tg-Ith) est réalisée par l'intermédiaire de récepteurs membranaires au niveau de puits d'endocytose (VC). Dans ce cas, les Tg aboutissent après maturation des endosomes précoces (EP) au niveau des endosomes tardifs (ET) dans lesquels les HT, T4 et T3, sont libérées et à partir desquels la Tg restante est adressée aux lysosomes. La voie de recyclage des Tg immatures (Tg-i) est représenté par les flèches en pointillés (d'après Marino et coll, 2000).

L'internalisation de la thyroglobuline présente dans la colloïde est réalisée par macropinocytose (phagocytose) ou par micropinocytose (endocytose), (Fig. 25). La macropinocytose intervient après une stimulation par la TSH par la formation de pseudopodes à la surface apicale des thyrocytes. La micropinocytose au niveau de structures membranaires tapissées de clathrine (les puits de clathrine) peut-être médiée ou non par des récepteurs membranaires pour former des vésicules d'endocytose (Bernier-Valentin et coll, 1990). La voie de dégradation de la Tg iodée implique la fusion des vésicules d'endocytose avec les compartiments lysosomiaux où des exo- et endo-protéases permettent la libération de la T4 et de la T3. La Tg peut aussi être internalisée et recyclée vers la colloïde (Kostrouch et coll, 1993). Enfin, un mécanisme de transcytose par transport direct de la Tg internalisée de la membrane apicale à la membrane basolatérale, déroute la Tg des compartiments lysosomiaux (Romagnoli et coll, 1991). Cette voie explique notamment, la présence de Tg dans la circulation sanguine.

Différentes études ont permis d'identifier les récepteurs possibles de ces différentes voies d'internalisation de la Tg et d'envisager ainsi leurs rôles dans le contrôle de la production des hormones thyroïdiennes (Marino et coll, 2000).

L'équipe de Consiglio a montré une corrélation entre la capacité de la Tg à interagir avec la membrane thyroïdienne et l'absence de résidus d'acide sialique au niveau des motifs glycaniques de la Tg (Consiglio et coll, 1979). Ainsi le récepteur d'asialoglycoprotéines identifié au niveau de la membrane apicale de cellules thyroïdiennes de rat (lignée PCC13) se lie préférentiellement au niveau du domaine amino-terminal des Tg faiblement sialylées (Montuori et coll, 1999). Bien que l'affinité de la Tg pour ce récepteur soit faible au pH neutre de la colloïde, cette interaction doit être maintenue ou établie dans les compartiments pré-lysosomiaux plus acides et permettre ainsi le recyclage de ces Tg immatures vers la membrane apicale.

La fixation de la Tg sur les membranes thyroïdiennes est augmentée en absence de molécules de galactose (Consiglio et coll, 1981). Le récepteur impliqué dans la reconnaissance des résidus N-acétylglucosamines (GlcNac) a été étudié par l'équipe de Miquelis. Ce récepteur des asialo-agalactothyroglobulines se fixe au niveau d'un domaine de 383 résidus des Tg immatures (Mezghrani et coll, 1997). Ce domaine d'interaction porte des sites de glycosylation et d'iodation qui modulent l'internalisation de la Tg en fonction de la maturation et de l'iodation de la prohormone. Les formes immatures non sialylées et peu galactosylées contiennent un nombre de tyrosines iodées moindre que les Tg matures (Consiglio et coll, 1981).



Ainsi les récepteurs de GlcNac pourraient être impliqués dans l'internalisation et le recyclage des Tg immatures via l'appareil de golgi (Miquelis et coll, 1993). Une fois dans la colloïde, les Tg immatures recyclées pourront à nouveau subir l'iodation et le couplage de leurs résidus tyrosines, augmentant ainsi la production des hormones thyroïdiennes (Marino et coll, 2000). Le récepteur des N-acétylglucosamine n'a cependant pas été complètement caractérisé (Thibault et coll, 1993).

Une étude plus récente suggère l'implication de la PDI dans le recyclage des Tg immatures, en plus de sa fonction de protéine chaperon. Dans les cellules FRTL-5, la PDI est sécrétée et associée aux membranes et pourrait après endocytose se lier aux molécules de Tg immatures dans les compartiments pré-lysosomaux et entraîner son recyclage vers la colloïde (Mezgrhani et coll, 2000).

La mégaline, une protéine membranaire ayant une forte homologie de séquence avec la famille des récepteurs des LDL, est impliquée dans les mécanismes d'endocytose de divers ligands à la surface apicale de diverses cellules épithéliales dont les cellules thyroïdiennes (Zheng et coll, 1994). Des expériences de compétition ont montré la fixation spécifique des Tg de rat contenant peu d'hormone T4 sur ces récepteurs (Marino et coll, 2000a) via un domaine homologue au domaine fixant l'héparine au niveau de l'extrémité carboxy-terminale de la Tg (Marino et coll, 1999). Ces Tg internalisées via la mégaline échappent à la voie lysosomale et sont orientées vers la membrane basolatérale par transcytose (Lisi et coll, 2003). Faiblement exprimée dans des conditions physiologiques, une stimulation par la TSH augmente l'expression de la mégaline ainsi que la transcytose de la Tg et diminue la quantité de T3 produites (Marino et coll, 2000b). Cependant cette voie semble nécessaire pour la libération des hormones thyroïdiennes en conditions physiologiques, en effet, celle-ci cible préférentiellement les Tg faiblement hormonogéniques qui entreraient en compétition avec les Tg fortement hormonogéniques pour la voie de dégradation lysosomale (Lisi et coll, 2003).

Ainsi, jusqu'à présent les récepteurs membranaires identifiés et impliqués dans l'endocytose de la Tg, orientent celle-ci dans une voie de recyclage vers la membrane apicale ou vers la membrane basolatérale par transcytose. La voie de dégradation lysosomale pourrait ainsi être la voie d'adressage par défaut des Tg matures et fortement hormonogéniques dont la structure ne permet pas d'interaction avec les différents récepteurs décrits.

### **I.5.D. La protéolyse de la thyroglobuline et la sécrétion des hormones thyroïdiennes**

Après la fusion des vésicules d'endocytose avec les compartiments lysosomaux, la Tg iodée subit d'une part, une protéolyse sélective qui permet la libération des hormones thyroïdiennes et d'autre part, une protéolyse non sélective qui conduit à la dégradation totale de la Tg. En effet, il apparaît que la libération des hormones T4 et T3 s'effectue à des sites à la surface de la protéine sans qu'il y ait une dégradation complète de la Tg (Dunn et coll, 1999). Ce n'est qu'après déplétion en iodotyronines que la Tg est soumise à la protéolyse totale (Rousset et coll, 1989).

Différentes enzymes lysosomales sont susceptibles d'entraîner la libération des hormones T3 et T4 (Fig. 23). Les principales endopeptidases impliquées dans cette protéolyse sélective sont des protéases à aspartate ou cystéines, les cathepsines B, D et L (Dunn et coll, 1991) ainsi que des di-peptidases lysosomales (Dunn et coll, 1996).

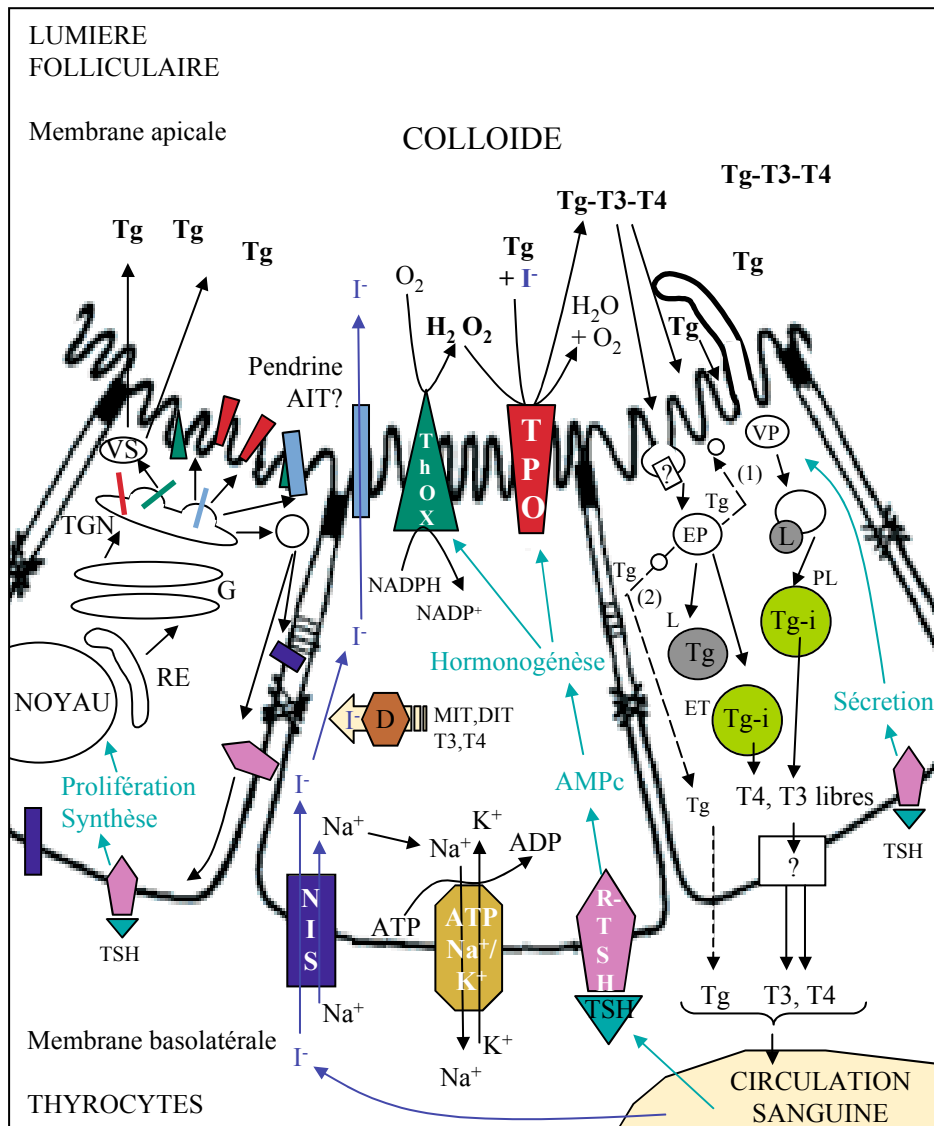
Le mécanisme de protéolyse est un mécanisme complexe et probablement régulé par la TSH. Ces peptidases ont une spécificité d'action. En effet, la cathepsine B agit au niveau de extrémité N-terminale, tandis que la cathepsine L intervient préférentiellement dans le clivage au niveau de la séquence carboxy-terminale (Dunn et coll, 1991). La faible activité *in vitro* de la cathepsine B ainsi que son activité d'exopeptidase sur la Tg, suggère une action séquentielle et combinée d'endo- et d'exo-peptidases (Dunn et coll, 1996). Ainsi la dipeptidase lysosomale I (LPDI) agit de concert avec la cathepsine B pour libérer la T4 du site hormonogénique Tyr 5. De même une autre dipeptidase, la DPPII, pourrait intervenir en synergie avec la cathepsine D ou L pour d'autres sites hormonogéniques. Des études montrent que cette protéolyse peut intervenir avant endocytose de la Tg dans la lumière du follicule par les cathepsines B et L (Brix et coll, 1996). De plus, la cathepsine K est impliquée dans la libération de l'hormone T4 au niveau de la surface apicale des thyrocytes avant internalisation (Tepel et coll, 2000).

Le Tg internalisée est également soumise à un mécanisme de désiodation de ses résidus mono-iodo et di-iodotyrosine non impliqués dans la synthèse hormnale. L'enzyme impliquée dans ce mécanisme, dépendant de la présence de NADPH, est une flavoprotéine à FMN de 42 kDa (Rosenberg et coll, 1979). Plus récemment, une protéine de 27 Kda exprimée au niveau des tissus thyroïdiens et possédant une activité de désiodation a été identifiée (Toyoda et coll, 1992).

La désiodation des résidus MIT et DIT de la Tg permet ainsi le recyclage de l'iodure non utilisé pour la formation des hormones thyroïdiennes. Il apparaît ainsi que l'iodure intra-thyroïdal provient en grande partie de ce mécanisme de recyclage.

Après protéolyse des molécules de Tg iodées dans les lysosomes, les hormones thyroïdiennes T4 et T3 doivent être libérées dans la circulation sanguine. Le mécanisme de transfert des hormones T3 et T4 des lysosomes dans la circulation sanguine est peu connu et pourrait faire intervenir un transport passif.

Les différents acteurs moléculaires et cellulaires impliqués dans la synthèse des hormones thyroïdiennes sont représentés dans la figure 26. Dans ce schéma récapitulatif, est également représentée la principale voie de régulation de l'hormonogénèse thyroïdienne, via la TSH. La thyrotropine ou TSH pour « *thyroid stimulating hormone* » est sécrétée par les cellules thyrotropes adénohypophysaires et se fixe sur son récepteur, le R-TSH, exprimé au niveau de la membrane plasmique des cellules thyroïdiennes. La TSH stimule la prolifération cellulaire ainsi que la synthèse des différentes protéines intervenant dans l'hormonogénèse, de manière dépendante de l'AMPc. Elle régule également de manière positive l'internalisation de la Tg et donc la sécrétion des HT, T3 et T4 dans la circulation sanguine.



**Fig 26: Schéma récapitulatif des différents acteurs et étapes intervenant lors de la synthèse des hormones thyroïdiennes.** Trois cellules folliculaires thyroïdiennes sont utilisées pour représenter : la biosynthèse des protéines membranaires (NIS, TPO, ThOX...) et soluble (Tg) actrices de la synthèse hormonale (cellule de gauche); le transport de l'iodure et les étapes conduisant à l'iodation de la Tg (cellule centrale); l'internalisation et la protéolyse de la Tg et la libération des HT, T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub>, dans le sang (cellule de droite). Le recyclage de la Tg vers la membrane apicale (1) et son transport vers la membrane basale par transcytose (2) sont représentés par des pointillés. Les points de régulation cellulaires et métaboliques via la TSH et le R-TSH sont mentionnés (flèches vertes). Abréviations : G, appareil de Golgi; VS, vésicule de sécrétion; VP, vésicule de phagocytose; EP, endosome précoce; ET, endosome tardif; L, lysosome; PL, phagolysosome.

## II. La thyroperoxydase humaine

La TPO est l'enzyme clé de la biosynthèse des HT, T3 et T4. Elle est également impliquée dans les pathologies auto-immunes de la thyroïde, la maladie de Basedow et d'Hashimoto.

La thyroïdite d'Hashimoto est caractérisée par une hypothyroïdie et une atrophie des tissus thyroïdiens avec augmentation du volume de la glande. La thyroïdite de Basedow confère un état hyperthyroïdien avec apparition d'un goitre. Dans les deux cas, la présence d'auto-anticorps dirigés contre des antigènes thyroïdiens a été mise en relation avec la dérégulation de la synthèse des hormones thyroïdiennes et la destruction, à terme, de la thyroïde.

Les antigènes impliqués sont la thyroglobuline, la TSH ainsi que des antigènes dits microsomaux, ou AgMc, car présents sur les microsomes sous-jacents de la membrane apicale des thyrocytes. Ces anticorps semblent être responsables de la cytotoxicité des anticorps anti-AgMc à l'encontre de la thyroïde.

Par immunoprécipitation et western blot réalisés à partir de microsomes de tissus thyroïdiens et de sérums de patients atteints de maladies auto-immunes thyroïdiennes, une protéine de 107 kDa fut identifiée comme étant l'AgMc (Hamada et coll., 1985). Par la suite, grâce à la production d'anticorps monoclonaux (mAb) reconnaissant la TPO, la purification de celle-ci mit en évidence après électrophorèse une large bande protéique migrant dans la zone des 100-105 kDa. L'inhibition par les sérums contenant les anticorps anti-AgMc de l'immunoprécipitation de cette TPO avec les mAb, laissa suggérer des caractéristiques communes entre la TPO et l'AgMc (Czarnocka et coll., 1985). Par la suite, le criblage d'une banque d'ADNc de thyroïde humaine, d'une part avec les mAb de TPO et d'autre part avec des sérums de patients atteints de la maladie d'Hashimoto contenant donc des anticorps anti-AgMc, révéla des clones identiques présentant un épitope de la TPO, confirmant ainsi que l'AgMc est la TPO (Libert et coll., 1987a).

Après le clonage du gène de la thyroperoxydase humaine en 1987, différentes équipes de recherche se sont attachées à étudier la régulation de la transcription et de la traduction protéique de la TPO, afin de comprendre le mécanisme de biosynthèse de cette glycoprotéine indispensable au métabolisme thyroïdien.

## II.1. Le gène de la thyroperoxydase

### II.1.A. Le clonage et la structure du gène de la TPO

C'est à partir du criblage d'une banque d'ADN complémentaire de thyroïdes de porc et de thyroïdes humaines que les gènes de la TPO porcine (pTPO) et humaine (hTPO) ont été clonés (Kimura et coll, 1987; Libert et coll, 1987; Magnusson et coll, 1987). L'ARN messenger (ARNm) de la pTPO s'étend sur 3175 nucléotides (Magnusson et coll, 1987) et celui de la hTPO sur 3060 nucléotides (Magnusson et coll, 1987). Un second messenger de la hTPO, appelé TPO-2, délété de 171 nucléotides dans la partie 1598 à 1768 a été identifié (Kimura et coll, 1987).

Le gène de la hTPO a été situé sur le chromosome 2 (Kimura et coll., 1987). Par la suite en criblant une banque d'ADN génomique à l'aide de l'ADNc de la TPO entière, la séquence et la structure du gène ont été établies (Kimura et coll, 1989). Ce dernier couvre une séquence de 150 kb structurée en 17 exons et 16 introns. Le site d'initiation de la transcription est situé dans l'exon 2 et le codon stop se situe à 177 nucléotides en amont de l'extrémité 3'. Le gène de la hTPO présente une forte homologie avec celui de la myéloperoxydase granulocytaire, la MPO. Il partage avec lui 46 % d'homologie de séquence et une organisation intron/exon identique suggérant qu'ils proviennent d'un gène ancestral commun (Kimura et coll., 1989). En effet, les exons 3 à 11 de la hTPO correspondent aux introns 2 à 11 de la MPO avec une différence pour l'exon 8 de la TPO qui correspond aux exons 7 et 8 de la myéloperoxydase. Les introns 13 à 15 de la TPO présentent quant à eux des homologies de séquence avec les gènes de la famille de l'EGF et du complément C4b (Libert et coll, 1987b).

### II.1.B. La régulation de la transcription

L'expression de la TPO est stimulée par la thyrotropine ou TSH via la voie dépendant de l'AMP cyclique et modulée par l'insuline et l'IGF-1 dans les thyrocytes de rat et de chiens (Isozaki et coll, 1989; Aza-blanc et coll, 1993). Cependant, les travaux visant à comprendre les mécanismes de cette régulation ont révélé des résultats contradictoires et dépendant du modèle cellulaire utilisé. Ainsi, dans une lignée de cellules thyroïdiennes immortalisées de rat, les FRTL-5, la transcription du gène de la TPO de rat (Isozaki et coll, 1989) ou humaine (Foti et coll, 1990a) n'est pas modulée par la TSH ni l'insuline.

L'augmentation du taux d'ARN messager de la TPO, observée dans ces conditions de stimulation, suggère alors que la régulation se fait au niveau post-transcriptionnel par augmentation de la stabilité des ARNm (Isozaki et coll, 1989; Foti et coll, 1990). A l'inverse, dans des thyrocytes humains ou canins (Abramowicz et coll, 1992), la régulation de l'expression de la TPO se fait au niveau transcriptionnel. Ces différences pourraient s'expliquer par l'utilisation de régions promotrices plus ou moins longues et intégrant donc des éléments de réponse activateurs ou suppresseurs différents (Aza-blanc et coll, 1993).

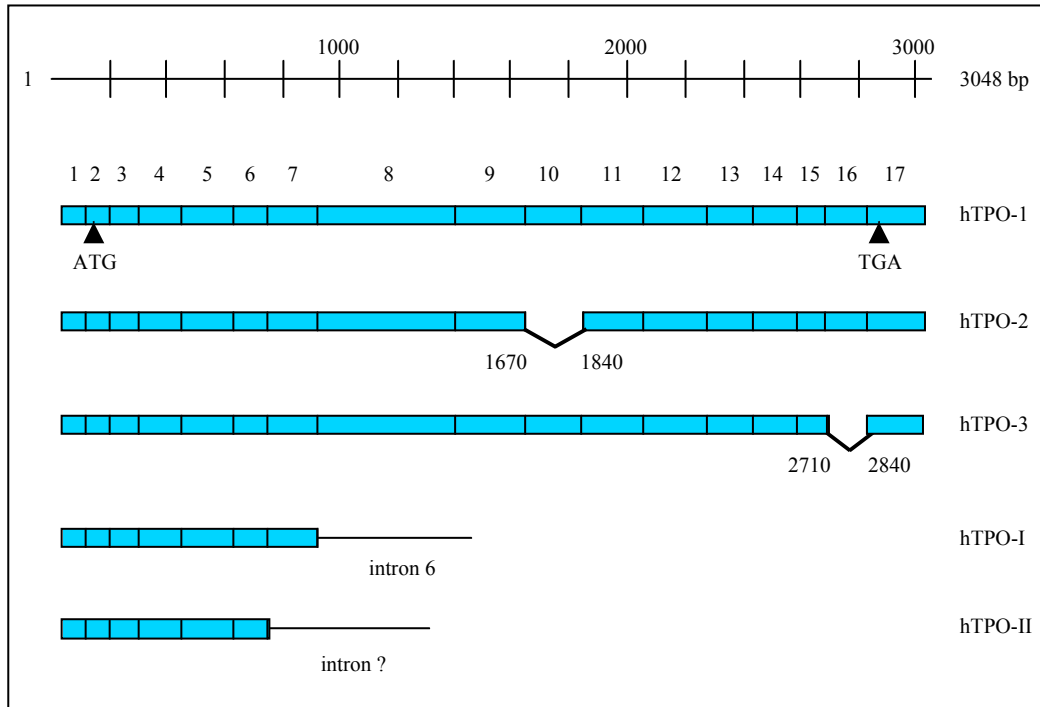
La région promotrice minimale a été définie dans les 130 pb en amont du site +1 de la transcription (Foti et coll, 1990). Mais la région s'étendant sur les 550 pb promotrices de la TPO humaine, semble posséder des éléments de réponses activateurs supplémentaires (Kikkawa et coll, 1990). La région minimale présente des domaines de fixation pour différents facteurs de transcription spécifiques de la thyroïde. Ainsi TTF-1 et TTF-2 se fixent respectivement dans la région -119/-105 (Abramowicz et coll, 1992) et -97/-74 (Aza-blanc et coll, 1993). Plus récemment, un domaine de fixation pour le facteur de transcription Pax8 a été identifié sur la région promotrice de la TPO humaine (Esposito et coll, 1998).

## **II.2. La TPO-1, la TPO-2 et la TPO Zanelli ou TPO-3**

### **II.2.A. Les différents transcrits de la TPO**

La majorité de la TPO est transcrite sous la forme d'un ARNm de 3,1 kb correspondant à la TPO entière ou TPO-1. Cependant, il est apparu très rapidement que le gène présentait divers transcrits issus de l'épissage alternatif des précurseurs des messagers (Fig. 27).

En effet, dans l'étude de Kimura de 1987, deux ADNc de TPO sont identifiés à partir des tissus de thyroïdes de Basedow. Les analyses de l'expression des ARNm de la TPO dans ces tissus révèlent en effet la présence de deux populations de messagers de la TPO de 3 kb (Kimura et coll., 1987; Nagayama et coll, 1990). Ces deux bandes sont attribuées à la TPO-1, dont le messager de 3,1 kDa donne naissance à la protéine entière de 933 résidus et à la TPO-2, dont le messager de 2,9 kDa entraîne la production d'une protéine de 876 résidus, dépourvue de 57 acides aminés par délétion de 171 nucléotides de l'exon 10 (résidus 1670 à 1840) (Kimura et coll., 1987).



**Fig 27: Structure du cDNA de la TPO sauvage et de ses transcrits**

La TPO-1 est la forme native identifiée dans les thyrocytes humains et comptant 17 exons sur 3048 bp. Différents autres transcrits issus de l'épissage alternatif ont été identifiés. Ainsi, la figure représente la hTPO-2 déléetée de l'exon 10 et la hTPO-3 ou TPO Zanelli, déléetée de l'exon 16. Deux autres transcrits, I et II, comportent seulement les exons 1 à 7 et 1 à 6 respectivement.



Un autre transcrit de la TPO, la TPO-3, a également été identifié dans les tissus thyroïdiens de patients atteints de la maladie de Basedow. Ce transcrit présente l'épissage des 130 pb de l'exon 16 qui entraîne, grâce à un décalage du cadre de lecture, la synthèse d'une protéine de TPO de 929 acides aminés dont les 56 derniers résidus carboxy-terminaux sont différents de ceux de la TPO-1 (Zanelli et coll, 1990).

D'autres transcrits de 2,1 kDa et 1,7 kDa ont été mis en évidence dans des cultures primaires de thyrocytes humains et de tissus thyroïdiens (Nagayama et coll., 1990). Le transcrit de 2,1 kDa présente une taille de 1753 nucléotides correspondant aux exons 1 à 6 suivis d'une séquence de l'intron 6, tandis que le transcrit de 1,7 kDa de 1044 pb correspond aux exons 1 à 5 suivis d'une séquence intronique.

### **II.2.B. L'expression des différents transcrits et des isoformes protéiques correspondantes.**

Les expériences qui ont permis de caractériser les différents transcrits de la TPO humaine ont été réalisées à partir de tissus thyroïdiens de patients atteints de la maladie de Basedow. Cependant d'autres études ont montré que les autres transcrits pouvaient être présents dans les thyroïdes normales. Ainsi, la présence d'ARNm de la TPO-2 et de la TPO-3 a été confirmée dans des tissus thyroïdiens normaux (Elisei et coll., 1991). Cependant, la stabilité de ces ARNm ainsi que leurs expressions relatives dans les tissus thyroïdiens normaux et également lors de pathologies thyroïdiennes cancéreuses restent à définir.

Au point de vue protéique, après purification et électrophorèse dénaturante, la protéine de la TPO issue de thyroïdes humaines de Basedow se présente sous la forme de deux bandes très larges de 95 et 105 kDa elles-mêmes constituées de multiples bandes (Czarnocka et coll, 1985 ; Hosoya et coll, 1994; Gardas et coll, 1997). Ces deux bandes ont tout d'abord été attribuées à l'expression de la TPO-1 et de la TPO-2 dont la séquence n'est différente que de 57 acides aminés (Kimura et coll, 1987), la TPO-3 ne présentant que 7 résidus de moins que la TPO-1 (Zanelli et coll, 1990). Cependant, la TPO-2, délétée de l'exon 10, est exprimée en tant que protéine à un niveau non détectable dans les tissus thyroïdiens sains et issus de patients atteints de la thyroïdite d'Hashimoto (Gardas et coll, 1997) ou de Basedow (Cetani et coll, 1995). Par la suite, les expériences d'expression de la TPO-2 réalisées dans un système hétérologue ont confirmé la rétention dans des compartiments intracellulaires et la dégradation rapide de la TPO-2 (Niccoli et coll, 1997).

En revanche, la TPO-3 est correctement exprimée à la surface cellulaire et conserve une activité enzymatique similaire à la TPO-1 (Niccoli et coll, 2001).

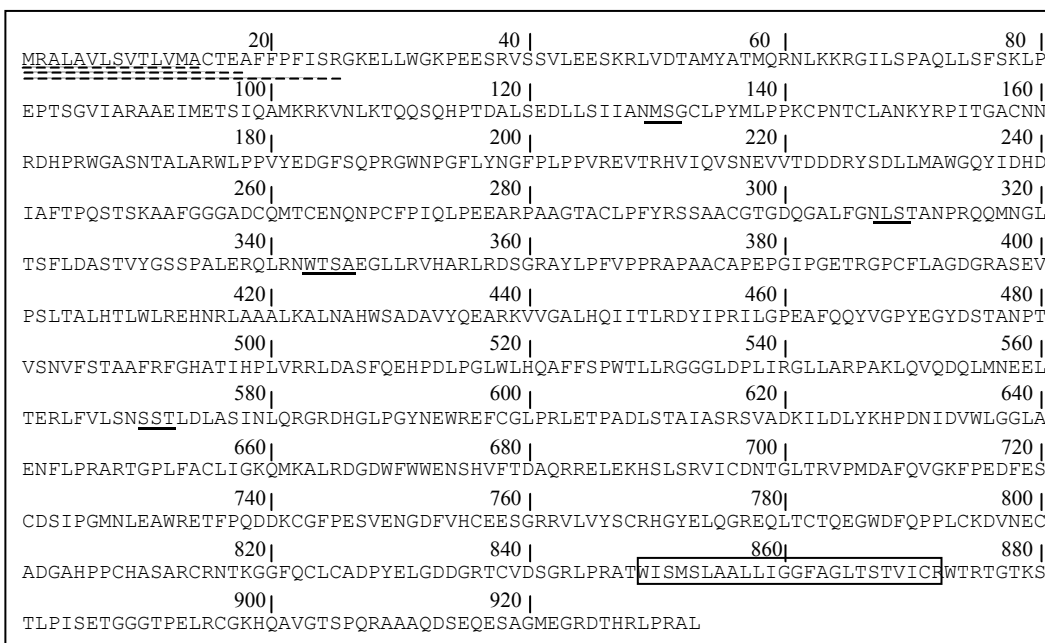
Ces études ont ainsi mis en évidence le caractère hétérogène de la thyroperoxydase humaine au niveau des transcrits des ARNm du gène, mais également des isoformes protéiques synthétisées à partir de ces derniers et susceptibles de jouer un rôle dans l'hormonogénèse thyroïdienne, par exemple dans le cas de la TPO-3. Elles suggèrent également l'existence d'autres modifications post-traductionnelles par épissage alternatif ainsi que des modifications post-traductionnelles connus du RE pouvant expliquer l'hétérogénéité protéique des TPO purifiées à partir de glande thyroïde humaine.

### **II.3. La biosynthèse de la thyroperoxydase humaine.**

#### **II.3.A. La structure de la TPO humaine**

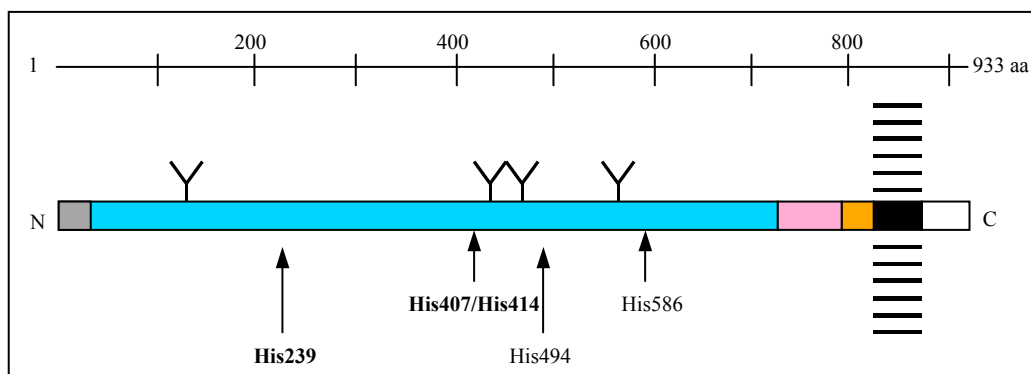
D'après l'ADN complémentaire isolé et cloné par les équipes de Kimura et de Libert, la séquence protéique de la TPO entière a été déterminée (Fig. 28). Elle compte 933 résidus d'acides aminés pour la hTPO et 926 pour la pTPO (Kimura et coll., 1987; Libert et coll., 1987 ; Magnusson et coll, 1987). D'après son profil d'hydrophobicité, le peptide signal de la hTPO s'étend jusqu'à l'alanine 14, à l'alanine 18 (Libert et coll, 1987) ou à l'arginine 26. De plus, la séquence présente un enchaînement de 24 résidus hydrophobes en C-terminal (résidu 848 à 871) correspondant à un domaine transmembranaire (Libert et coll., 1987 ; Magnusson et coll., 1987) et expliquent en partie les difficultés rencontrées lors de l'extraction et de la purification de la TPO (Czarnocka et coll., 1985; Yokoyama et coll., 1988; Foti et coll., 1990). La présence d'un domaine transmembranaire dans les 85 derniers acides aminés et plus précisément de 852 à 876, sera confirmé par la suite lors de la génération de TPO soluble et active après délétion de cette région (Foti et coll, 1990).

La comparaison de la séquence primaire de la TPO avec celle de la myéloperoxydase humaine (MPO), de la lactoperoxydase (LPO) et la éosinoperoxydase (EPO), autres membres de la famille des peroxydases, a mis en évidence une importante homologie de séquence entre elles (Taurog et coll, 1999) (Fig. 29).



**Fig 28: Séquence en résidus d’acides aminés de la TPO**

Sur les 933 acides aminés de la TPO humaine, sont soulignés les 4 sites potentiels de N-glycosylation et encadré le domaine transmembranaire. Les positions potentielles, 1-14, 1-18 et 1-26, de la séquence signal sont soulignées en pointillés.



**Fig 29 : Représentation de la structure primaire de la hTPO-1**

Les différents sites d’homologie sont représentés. La région d’homologie avec la myéloperoxydase, séquence 1 à 739 (boite bleue); le région C4b like, séquence 740 à 794 (boite rose); la séquence d’homologie avec l’EGF, région 795 à 842 (boite orange), ainsi que le domaine transmembranaire sur la séquence 843 à 871 (boite noire). La séquence signal (boite grise) et les 4 sites potentiels de N-glycosylation, au niveau des résidus d’asparagine 129, 307, 342 et 569 ainsi que les résidus histidines potentiellement impliqués dans la fixation de l’hème sont indiqués.

La TPO et la MPO possèdent 42% d'homologie sur la totalité de la séquence protéique (Libert et coll., 1987 ; Kimura et coll., 1988) et 74 % pour la région catalytique contenant le domaine d'homologie avec la cytochrome c oxydase, résidus 514 à 571 (Libert et coll., 1987) et le résidu d'His 407 (Kimura et coll., 1988). La TPO et la LPO présente quant à elles 44,6 % d'homologie (Cals et coll., 1991).

La structure tridimensionnelle de la TPO n'est pas encore définie. La difficulté d'obtenir de la TPO native à partir de thyroïdes saines en quantité suffisante, a poussé les équipes de recherche à travailler sur de la TPO purifiée à partir de tissus issus de patients atteints de la maladie de Basedow (Czarnocka et coll., 1985; Taurog et coll., 1990). Cette TPO présente les mêmes propriétés enzymatiques que la TPO de porc et la TPO issue de thyroïde humaine normale, ce qui fait d'elle un outil de substitution pour étudier la TPO humaine (Hosoya et coll., 1994). Cependant, les études visant à analyser la structure par diffraction aux rayons X, sont limitées par les difficultés rencontrées lors de la cristallisation en raison de l'importante hétérogénéité de la TPO purifiée à partir de thyroïdes humaines (Gardas et coll., 1997).

Les études réalisées sur les autres membres de la famille des peroxydases montrent que la MPO et l'EPO sont synthétisées sous formes de précurseurs qui donnent après maturation une chaîne lourde de 55 kDa et une chaîne légère de 15 kDa (Morishita et coll., 1987; Sakamaki et coll., 1989). La MPO est un dimère de 2 chaînes légères et 2 chaînes lourdes tandis que l'EPO est constitué d'un seul monomère. La TPO et la LPO présentent qu'une seule chaîne peptidique donnant respectivement des protéines d'environ 100 kDa (Czarnocka et coll., 1985; Kimura et coll., 1987; Hosoya et coll., 1994) et de 70 kDa (Sakamaki et coll., 1989).

La MPO (Zeng et coll., 1992), la TPO (Yokoyama et coll., 1989) et l'EPO (Thomsen et coll., 2000) présentent toutes des ponts disulfures intrachainés. Les 12 cystéines de la MPO canine impliquées dans ces ponts disulfures (Zeng et coll., 1992), correspondent aux 12 cystéines de l'EPO retrouvées liées (Thomsen et coll., 2000). La conservation de ces cystéines dans la séquence des autres peroxydases notamment la hTPO (Thomsen et coll., 2000) ainsi que la présence d'un taux élevé et similaire d'hélices  $\alpha$  dans la région 1 à 741 de la hTPO (Banga et coll., 1990), laissent penser que le domaine catalytique de la TPO possède une conformation tridimensionnelle proche des peroxydases animales, notamment de celle de la MPO.

La TPO présente également des homologies de séquence avec d'autres protéines (Libert et coll, 1987). Ainsi on a défini un domaine identique à la protéine C4b du complément, des résidus 744 à 798, correspondant à l'exon 13 ainsi qu'un domaine similaire à l'EGF dans la région 795 à 847, correspondant à l'exon 14 de la TPO (Kimura et coll, 1989) (Fig. 29). Ces domaines présentent probablement une structure 3D comparable à ces protéines respectives et se replient en tant que modules indépendants (Banga et coll, 1990).

Il est également à noter que différentes études, menées sur la TPO humaine, ont suggéré l'existence de dimères de 220 kDa. En effet, Baker et coll ont montré qu'en conditions non dénaturantes, la TPO purifiée à partir de thyroïdes humaines immunoréagit avec les sérums de patients atteints de maladies thyroïdiennes auto-immunes sous la forme d'une bande de 220 kDa (Baker et coll, 1994). Cette dernière est convertie en bande de 110 kDa en condition dénaturante ce qui suggère la présence de dimères de TPO dans la glande thyroïde. De mêmes travaux réalisés à partir de cellules CHO transfectées avec l'ADNc de la TPO-1 ont également établi la présence de ces dimères de 220 kDa (Kaufman et coll, 1989). Cependant par la suite, d'autres travaux ont réfuté ces résultats, et démentis la présence de dimères spécifiques de la TPO en mettant en cause les conditions d'extraction protéique utilisées dans ces premières études (Cétani et coll, 1995; Fayadat et coll, 1998).

### **II.3.B. La localisation cellulaire de la TPO**

Différentes études ont localisé la TPO à la surface apicale des thyrocytes mais également au niveau de la membrane nucléaire et des compartiments du réticulum endoplasmique rugueux et de l'appareil de Golgi ainsi que des vésicules apicales (Alquier et coll, 1989; Zimmer et coll, 1992 et 1997 ; Masini-Repiso et coll, 2004). La TPO apparaît également à la membrane basolatérale en contact avec la circulation sanguine dans des thyrocytes normaux (Kuliawat et coll, 1995) ou issus de patients atteints de la maladie de Basedow ou de pathologies thyroïdiennes cancéreuses (Zimmer et coll, 1997; Masini-Repiso et coll, 2004 ). Les travaux sur le trafic intracellulaire de la TPO exprimée dans les cellules thyroïdiennes, ont démontré la présence d'une activité peroxydase dans les vésicules de sécrétion classique, ainsi que l'internalisation de la TPO par micropinocytose au niveau de la membrane apicale (Ericson et coll, 1990). Les travaux de l'équipe d'Arvan ont également fait mention de la distribution largement intracellulaire de la TPO par rapport à l'expression à la surface cellulaire. Seulement 30 % de TPO sont exprimées à la membrane de thyrocytes issues de glandes thyroïdes (Kuliawat et coll, 1995).

L'importante proportion de TPO dans les compartiments intracellulaires et particulièrement la rétention de cette dernière dans le RE a été confirmé par des études menées avec des lignées de CHO (cellules d'ovaires de hamster) ou de PCCL3 (cellules thyroïdiennes de rats) exprimant de manière stable la TPO entière ou TPO-1 (Hata et coll, 1989; Fayadat et coll, 1998; Zhang et coll, 2000).

D'après ces études seulement 2% de la TPO néosynthétisée atteint vraisemblablement la surface cellulaire des cellules CHO soit une proportion de TPO en surface de 15 % à 30 % (Fayadat et coll, 1998). Une autre étude établie la proportion de cette population dans les PCCL3 à 50% de la TPO totale (Zhang et coll, 2000). Bien que l'expression en surface de la TPO dans les thyroïdes humaines puisse être plus importante que celle observée dans les lignées immortalisées, la forte sensibilité de la TPO purifiée à partir de thyroïdes humaines à l'Endo H spécifique des motifs oligosaccharidiques (Giraud et coll, 1992), est en faveur d'une importante compartimentalisation intracellulaire de la TPO. Cependant, une étude a révélé la distribution majoritaire de la TPO à la surface cellulaire de thyrocytes humains et a fait mention de la sensibilité de cette population à l'endo H (Kuliawat et coll, 2005). Ainsi, la TPO pourrait atteindre la membrane apicale par une voie indépendante de l'appareil de Golgi. Il est à noter qu'à l'inverse, le trafic de la TPO à la membrane basolatérale semble faire intervenir l'appareil de golgi. Cette localisation membranaire basolatérale en faible proportion et dépendante de l'appareil de golgi explique l'antigénicité de la TPO et suggère un mécanisme de transcytose de la TPO dans les cellules épithéliales thyroïdiennes de Basedow (Zimmer et coll, 1997). De plus, la localisation cellulaire de la TPO est variable suivant les pathologies cancéreuses et les thyroïdites (Masini-Repiso et coll, 2004).

### **II.3.C. Les modifications post-traductionnelles de la thyroperoxydase**

#### **II.3.C.a. La fixation de l'hème**

Les propriétés spectrales des différentes peroxydases animales suggèrent la présence d'un groupement prosthétique ferrique qui interagit avec deux résidus d'histidines et se fixe de manière covalente par des liaisons ester avec des résidus de glutamates et d'aspartates (Fiedler et coll, 2000; Watanabe et coll, 2000).

Les sites de fixations du groupement prosthétique de la TPO humaine ont tout d'abord été extrapolé par homologie de séquences avec les sites de fixation connus pour la MPO.

Ainsi, l'équipe de Kimura a proposé dans un premier temps que les résidus d'His 407 ou 414 pouvaient être le site de fixation proximal et que les His 496 ou 586 le site distal (Kimura et coll, 1988).

Grâce à la caractérisation de la structure tridimensionnelle de la MPO canine et donc la définition plus précise des résidus d'His impliqués dans la fixation de l'hème (Zeng et coll, 1992), on a défini le site proximal de fixation de l'hème de la TPO humaine au niveau de l'His 239 et le site distal en position 494 (Taurog et coll, 1998; Taurog, 1999). D'autres résidus semblent également être impliqués dans la fixation du groupement prosthétique des peroxydases animales. Ainsi, les résidus de glutamate 242 et d'aspartate 94 de la MPO canine sont impliqués dans la fixation de l'hème (Zeng et coll, 1992). La cristallisation de la MPO humaine a confirmé l'implication de ces résidus dans la fixation covalente de l'hème (Fiedler et coll, 2000). Plus récemment, les expériences de mutagenèse dirigée des résidus de glutamate 375 et d'aspartate en position 225 de la LPO bovine, résidus homologues de la MPO, ont confirmé l'implication de ces résidus dans la fixation covalente de l'hème (Suriano et coll, 2001). Ces résidus, largement conservés dans les séquences des autres peroxydases animales, correspondent à la glutamine 399 et à l'aspartate 238 dans la séquence de la TPO humaine qui pourraient donc fixer l'hème de la TPO (Taurog, 1999).

Les travaux réalisés sur la LPO et la TPO ont mis en avant le rôle de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le mécanisme de fixation de l'hème au niveau du site actif et dans la stabilité de ces peroxydases. En effet, il apparaît qu'en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'hème se lie de manière covalente à la LPO (DePillis et coll, 1997). Comme pour la LPO, la fixation de l'hème sur la TPO exprimée à la surface des cellules CHO ou de cultures primaires de thyrocytes, se fait par un mécanisme autocatalytique dépendant de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fayadat et coll, 1999). De plus, dans le cas de la TPO, la fixation de l'hème dans les compartiments intracellulaires est primordiale pour l'expression en surface d'une TPO active (Fayadat et coll, 1999).

### **II.3.C.b. La N-glycosylation**

D'après la séquence protéique issue de l'ADN complémentaire de la TPO humaine, quatre sites potentiels de N-glycosylation ont été identifiés au niveau des résidus d'Asn 129, 307, 342 et 569 (Kimura et coll, 1987; Libert et coll, 1987) (Fig. 28, 29). L'équipe de Magnusson a également identifié les résidus d'Asn représentant les sites de N-glycosylation potentiels aux positions 129, 265, 272, 307 et 342 de la TPO porcine (Magnusson et coll, 1987).

L'expression de la TPO humaine dans les cellules CHO a permis de mettre en évidence la présence de motifs glycaniques liés aux résidus d'Asparagine mais vraisemblablement l'absence de O-glycosylation (Foti et coll, 1990b; Guo et coll, 1998).

De nombreuses études ont par la suite cherché à caractériser le type de motifs glycaniques portés par la TPO. L'étude réalisée sur la TPO humaine issue de cellules CHO montre que la majorité de ces motifs sont de types oligomannosidiques car sensibles à l'action de l'endo H (Foti et coll, 1990). De même, les études réalisées sur de la TPO purifiée à partir de thyroïdes de porc (Long et coll, 1991; Rawitch et coll, 1992) ou de thyroïdes humaines (Giraud et coll, 1992) confirment ces résultats. En effet, toutes deux sont davantage sensibles à l'action de l'Endo H qu'à celle de la PNGase F agissant au niveau des résidus de types complexes (Long et coll, 1991; Giraud et coll, 1992).

Les travaux réalisés par la suite ont établi que les TPO portant des motifs de types complexes sont les molécules exprimées à la surface cellulaire et que les molécules intracellulaires arborent des motifs oligomannosylés (Fayadat et coll, 1998; Guo et coll, 1998). En effet, une étude menée dans le but d'améliorer les techniques de purification de la TPO a révélé qu'une TPO recombinante soluble, ne comportant que les 848 premiers résidus dépourvus du domaine transmembranaire, exprimée et sécrétée par les cellules CHO est déglycosylée par la PNGase F mais insensible à l'Endo H (Guo et coll, 1998). L'utilisation de la technique de biotinylation de surface a confirmé que la TPO exprimée à la surface des cellules porte des motifs de types complexe (Fayadat et coll, 1998).

L'étude de l'équipe de Taurog sur la pTPO a permis de définir les sites effectivement glycosylés. Ainsi, l'Asn 129, 277, 307 et 342 présentent des glycannes riches en mannose. Le motif en position 307 peut également porter des motifs de types hybrides (Rawitch et coll, 1992). Par homologie de séquence avec les sites de glycosylation de la TPO porcine, les Asn 129, 307, 342 de la TPO humaine sont probablement glycosylées (Kimura et coll, 1989). Après déglycosylation complète, la TPO humaine affiche une différence de migration électrophorétique de 13 kDa par rapport à la TPO non déglycosylée (Guo et coll, 1998). A raison d'une contribution de 3,5 kDa par motif, ceci suggère que les 4 sites de la TPO humaine sont glycosylés.

Les résidus N-glycaniques n'interviennent pas dans la fixation de la TPO aux autoanticorps issus de sérums de patients atteints de la thyroïdite d'Hashimoto (Foti et coll, 1990b; Kaufman et coll, 1989) et de manière générale dans l'immunoréactivité de la protéine associée aux pathologies thyroïdiennes.



Par contre la glycosylation intervient dans le mécanisme de maturation et de trafic intracellulaire de la TPO. En effet, comme pour la TPO de porc (Long et coll, 1991), la déglycosylation de la TPO purifiée à partir de thyroïde humaine entraîne une perte d'activité enzymatique de la protéine (Giraud et coll, 1992). Puisque cette dernière ne s'accompagne pas d'un changement d'immunoréactivité vis à vis des anticorps anti-TPO, ces résultats suggèrent que les motifs glycaniques interviennent dans le maintien de la structure conformationnelle du domaine catalytique de la TPO (Long et coll, 1991; Giraud et coll, 1992). De même, les travaux réalisés sur des cellules CHO exprimant de manière stable la TPO, montrent qu'un traitement par la tunicamycine entraîne une diminution de l'activité enzymatique en surface découlant d'une diminution de l'expression de la TPO à la membrane (Fayadat et coll, 1998).

De manière intéressante ces études démontrent que ce sont les motifs de type oligomannosylé qui sont impliqués dans ces mécanismes. En effet, l'inhibition de la formation des motifs de type complexe ne modifie ni le trafic intracellulaire de la TPO ni son activité (Fayadat et coll, 1998). Ces résultats suggèrent que les motifs N-glycaniques jouent un rôle primordial dans les étapes précoces de la biosynthèse de la TPO.

### **II.3.D. La maturation et la dégradation de la thyroperoxydase humaine**

#### **II.3.D.a. Le repliement correct de la thyroperoxydase.**

Le fait qu'un faible pourcentage de la TPO soit exprimé à la membrane plasmique des thyrocytes humains et que la majorité se trouve dans les compartiments intracellulaires a conduit à étudier de manière détaillée le mécanisme de biosynthèse et de maturation de cette glycoprotéine.

De nombreux anticorps dirigés contre la hTPO ont été produits (Ruf et coll, 1989). Deux d'entre eux, le mAb47 et le mAb15 reconnaissent respectivement un épitope linéaire de la séquence protéique (Finke et coll, 1991; Fayadat et coll, 1998) et un épitope conformationnel de la TPO (Ruf et coll, 1989; Fayadat et coll, 1998). Ces derniers ont permis d'étudier la prise de conformation de la TPO en suivant l'apparition des formes correctement repliées, immunoprécipitées par le mAb15, et la disparition des formes néosynthétisées incorrectement repliées reconnues par le mAb47 seulement (Fayadat et coll, 1998).

Il a été démontré qu'une grande partie de la hTPO exprimée dans la lignée cellulaire CHO est retenue dans le réticulum endoplasmique et par la suite dégradée (voir II.3.D.b.) et que seulement 2% des molécules néosynthétisées est correctement repliées et atteint la surface cellulaire (Fayadat et coll, 1998).

Les travaux réalisés sur le rôle de la glycosylation dans la maturation de la TPO ont mis en évidence l'intervention des protéines chaperon du RE, comme la CNX et la CRT, dans les étapes précoces du repliement de la protéine (Fayadat et coll, 2000b). En effet, la TPO exprimée dans les cellules CHO, interagit avec la CNX/CRT dans le RE. Traitée avec la castanospermine, le temps de demi-vie de la TPO passe de 17 h à 2,5 h et le taux d'expression en surface à l'état d'équilibre est de 7,5 % contre 30 % dans des conditions de culture sans traitement, suggérant ainsi que comme pour de nombreuses autres protéines, les protéines chaperons et en particulier la CNX/CRT jouent un rôle crucial dans le mécanisme de repliement et le CQ de la TPO (Fayadat et coll, 2000b). Cependant, si l'interaction de la TPO avec ces protéines chaperons est indispensable à la maturation de la protéine, l'absence d'effet de la surexpression de la CNX ou de la CRT sur le repliement correct final et la stabilité de la TPO suggère que d'autres partenaires moléculaires ainsi que d'autres facteurs interviennent lors de sa synthèse.

Ainsi, l'étude du rôle de l'hème a également mis en avant son implication dans le repliement correct ainsi que dans le trafic intracellulaire de la TPO (Fayadat et coll, 1999). Ces résultats pourraient expliquer, l'instabilité et la dégradation rapide de la TPO-2 délétée de l'exon 10 qui contient un résidu d'His susceptible d'intervenir dans la fixation de l'hème et donc indispensable à la maturation de l'hémo-TPO.

### **II.3.D.b. Les différentes voies de dégradation de la TPO**

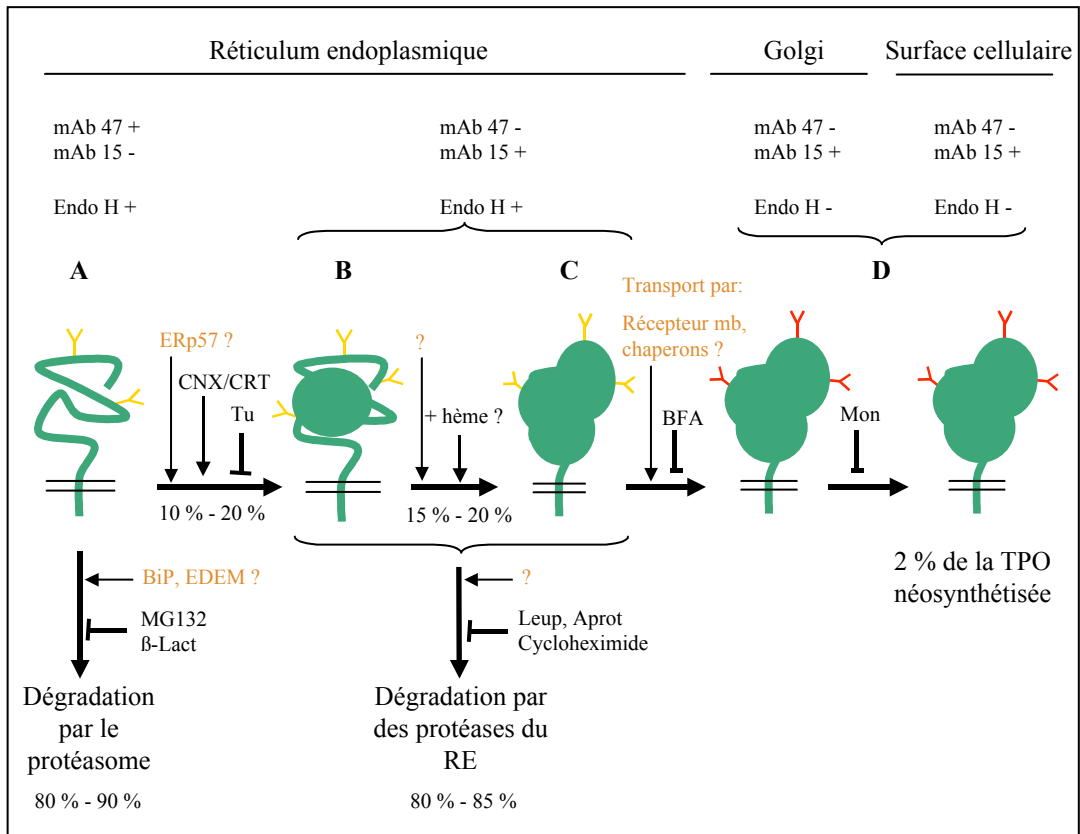
La TPO humaine retenue dans le RE est rapidement dégradée par des mécanismes dépendant de l'état de repliement de la TPO (Fayadat et coll, 1998; Fayadat et coll, 2000a). En effet, il est démontré que les molécules de TPO néosynthétisées n'ayant pas encore pris leur structure tridimensionnelle correcte et reconnues par le mAb47 sont dégradées par un mécanisme sensible à la  $\beta$ -lactone ou au MG132 qui sont tous deux des inhibiteurs du protéasome (Fayadat et coll, 2000). Les TPO incorrectement repliées sont donc éliminées par le CQ des protéines et orientées vers la voie de dégradation par le protéasome impliqué dans le processus ERAD (voir partie I, II.4).

Comme pour de nombreuses autres protéines du RE, les TPO sont probablement retransloquées dans le cytoplasme à travers la membrane du RE. .

En revanche, la dégradation des TPO partiellement ou correctement repliées, reconnues par le mAb15, est insensible aux inhibiteurs du protéasome ainsi qu'aux inhibiteurs et agents lysosomotropiques (Fayadat et coll, 2000b). De manière intéressante il a été démontré que la dégradation de ces formes est maintenue en présence de brefeldine A et qu'elle survient donc dans un compartiment pré-golgien au niveau du RE (Fayadat et coll, 2000b). Les tests d'inhibition réalisés par la suite, ont établis que des protéases à sérine ou cystéine interviennent dans la dégradation de ces TPO mAb 15 + retenues au niveau du RE et que ces protéases sont associées aux membranes (Fayadat et coll, 2000). Ces travaux ont ainsi été parmi les premiers à mettre en évidence l'existence de voies de dégradation dépendantes de l'état de repliement d'une protéine. Ils ont également été parmi les premiers à considérer que la dégradation des protéines non conformes du RE peut être réalisée dans ce compartiment, sans rétrotranslocation vers le protéasome cytoplasmique et que cette dégradation fait intervenir des protéases mêmes du RE. Ce mécanisme d'abord largement controversé a été par la suite mis en évidence pour d'autres protéines du RE, notamment la carboxypeptidase Y (Mancini et coll, 2003) ou la stéaroyl-CoA désaturase (SCD) impliquée dans le métabolisme lipidique (Heinemann et coll, 2003, a, b, c).

Les différentes étapes et partenaires moléculaires intervenant dans la biosynthèse de la TPO sont représentés dans la figure 30. Ce schéma récapitulatif établi le modèle de repliement, de dégradation et de trafic intracellulaire de la TPO envisagé à partir des différentes données notamment obtenues dans notre groupe.

La TPO est pour ces caractéristiques un modèle intéressant pour étudier les modes de repliement, de dégradation et de manière plus générale le CQ des glycoprotéines. En effet, sa rétention importante dans le RE suggère qu'elle se replie lentement et/ou difficilement. Pour cette raison, les différentes étapes de son repliement requièrent probablement l'intervention des nombreux acteurs du CQ du RE. L'interaction avec la CNX confirme cette hypothèse. Cependant, l'absence d'augmentation du taux de repliement et d'expression en surface de la TPO exprimées dans les cellules CHO surexprimant la CNX ou la CRT suggèrent que d'autres protéines chaperons et/ou catalyseurs de repliement sont impliqués dans le processus de repliement de la protéine. De même, d'autres facteurs moléculaires du CQ du RE interviennent probablement dans l'adressage des formes non conformes de la TPO vers les voies de dégradation associée au CQ du RE.



**Fig 30: Modèle de repliement, de dégradation et de transport cellulaire de la hTPO dans les cellules CHO.**

La hTPO néosynthétisée au niveau du RE, forme A, est rapidement glycosylée. 10 à 20 % de celles-ci vont acquérir une structure partiellement repliée, forme B. A nouveau 15 à 20 % de la forme B vont prendre une structure tridimensionnelle correcte, forme C avec fixation de l'hème. La forme C lors de son passage dans l'appareil de Golgi va acquérir des motifs N-glycanniques de types complexes, forme D, avant d'être exportée à la surface membranaire.

Les étapes précoces du repliement sont largement dépendantes de la N-glycosylation et de l'intervention de protéines chaperons, tels la calnexine ou la calréticuline (CNX/CRT). Le transport intracellulaire de la hTPO du RE à l'appareil de Golgi et de ce dernier à la surface cellulaire sont inhibés par la brefeldine A (BFA) et la monensine (Mon) respectivement. Ce transport peut être suivi par l'acquisition des résidus glycaniques et de leur structure par l'utilisation de l'endo H spécifique des motifs de type oligomannosylés présent dans les compartiment pré-golgiens (Y jaunes). Cette enzyme est inefficace sur les motifs de type complexes (Y oranges) synthétisés au niveau de l'appareil de Golgi et sensibles à la PNGase F.

Les hTPO incorrectement repliées sont dégradées par un mécanisme sensible aux inhibiteurs du protéasome, la lactacystine ( $\beta$ -Lact) ou le MG132, au niveau du RE, appelé ERAD tandis que jusqu'à 85 % des hTPO partiellement ou correctement repliées sont dégradées par des protéases à sérine ou cystéine du RE. Ainsi seul 2% de la hTPO néosynthétisée atteignent la surface membranaire, lieu de son activité.

Les différents acteurs connus du CQ du RE pouvant intervenir dans les mécanismes de repliement, de dégradation et de sortie du RE de la TPO, sont envisagés pour les différentes étapes de la biosynthèse de la thyroperoxydase humaine (dactylographiés en orange).

## INTRODUCTION AUX ARTICLES (I) et (II)

### Généralités

Les ARN pré-messagers issus de la transcription des gènes présentent des régions codantes, c'est-à-dire qui seront traduites en résidus d'acides aminés, appelés exons, ainsi que des régions non codantes, appelées introns, qui seront excisées du pré-messager et non exprimées au sein de la protéine. Le mécanisme conduisant à l'excision des régions non codantes et à la liaison des régions codantes entre elles est nommé épissage. En moyenne les ARN pré-messagers présentent chez l'homme 8 exons et 7 introns qui après excision donnent naissance à une protéine donnée. Cependant pour la plupart des gènes humains, les produits de la transcription sont soumis à un épissage alternatif. A côté de l'épissage dit constitutif qui définit l'élimination des régions introniques des messagers primaires des gènes, l'épissage alternatif engendre l'excision de tout ou partie d'un exon ou combinaison de plusieurs exons ou bien la rétention d'un intron. Les ARN messagers ainsi épissés peuvent donc conduire après traduction à la synthèse de protéines de séquence en acides aminés différente et possédant donc des propriétés fonctionnelles différentes. Comme nous le verrons, ce mécanisme d'épissage alternatif peut être spécifique du type cellulaire ou tissulaire dans lequel il se produit ou d'un stade développemental donné pour répondre à des besoins et fonctionnalités biologiques physiologiques. Cependant, l'épissage alternatif peut également intervenir de manière anormale et être à l'origine de l'émergence et/ou de la progression de pathologies humaines.

### I. Les mécanismes d'épissage des ARN messagers précurseurs.

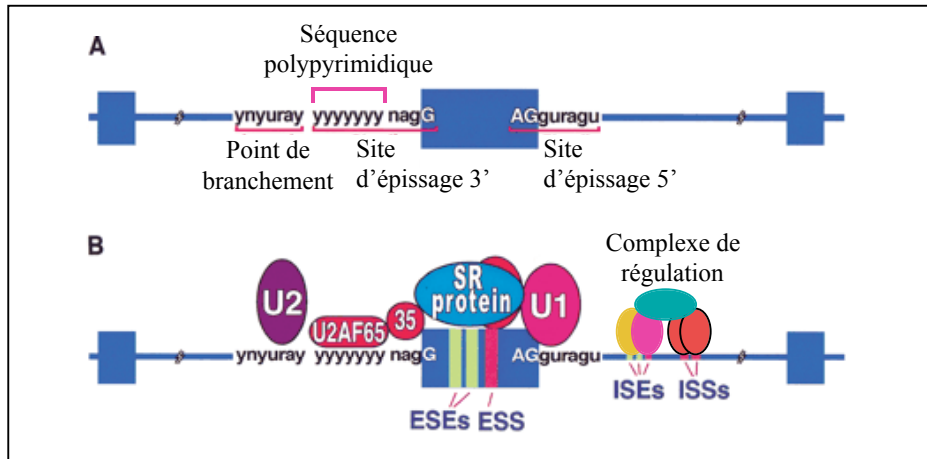
#### I.1. Epissage constitutif

L'excision des introns est dirigée par la reconnaissance de séquences spécifiques au niveau des pré-messagers par la machinerie d'épissage (Fig. 31). La séquence en position 3' de l'intron est composée de la séquence dinucléotidique GU dans le motif consensus  $AG\boxed{3'}GU$ -PuAGU. En 5' de l'intron, on trouve le second motif spécifique, le dinucléotidique AG dans la séquence consensus  $nAG\boxed{5'}G$  (n : n'importe quelle base). Ces deux séquences spécifiques définissent les extrémités 5' et 3' de la majorité des introns.

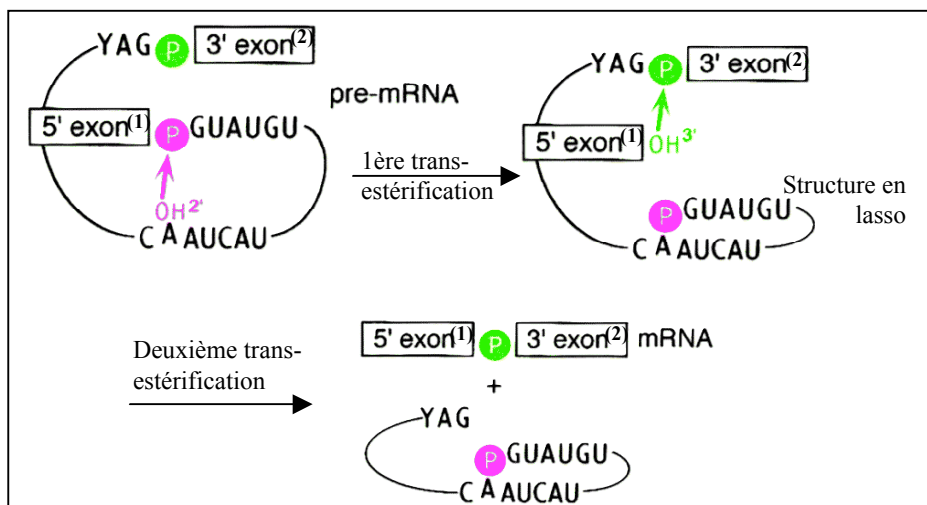
En plus de ces séquences frontières, on trouve dans l'intron même, le point de branchement de l'extrémité 3' utilisé lors de l'excision de l'intron, au niveau d'une base adénosine, A, hautement conservée, de la séquence consensus CUPu-A-Py. On a également identifié de larges séquences de polypyrimidine (Py) constituant des motifs de fixation pour les protéines intervenant lors de l'épissage. En plus de ces motifs de reconnaissance classique, des régions introniques et exoniques nommées ISE et ESE, pour « enhancers » ou activatrices, et ISS et ESS, pour « silencers » ou répresseurs, aident à la reconnaissance des exons lors de l'épissage constitutif (Faustino et coll, 2003).

Le complexe protéique impliqué dans le mécanisme d'épissage est appelé le spliceosome. Il se compose de ribonucléotides de petite taille, les snRNPs, notées U1, U2, U3 (Fig. 31). Ces derniers possèdent des domaines de fixation à l'ARN et s'assemblent au niveau des séquences spécifiques des introns pour permettre le rapprochement des extrémités des exons et l'excision des introns (Norton et coll, 1994; Staley et coll, 1999). En plus de ces composants majeurs du spliceosome, divers facteurs protéiques non-snRNPs et autres particules ribonucléotidiques interviennent lors de l'épissage constitutif, en venant se fixer au niveau de séquences auxiliaires introniques et exoniques, à partir desquelles ils modulent la stabilité du spliceosome en interagissant entre eux et avec les snRNPs du complexe de base de l'épissage. On compte parmi ces particules, la large famille des protéines SRp, pour « *splicing regulator protein* », présentant un domaine amino-terminal se fixant sur l'ARN, les PTB, pour « *polypyrimidine tract binding protein* », qui se fixent au niveau des séquences polypyrimidiques introniques ainsi que la famille des hnRNPs, pour « *heterologous nuclear ribonucleoprotein particles* » (Norton et coll, 1994; Black, 2003). Ces facteurs de régulation peuvent vraisemblablement avoir des effets positifs et négatifs sur l'épissage constitutif selon le gène et leur lieu de fixation sur ce dernier (Black, 2003).

Après la fixation du spliceosome et des éléments de régulation, le mécanisme d'épissage des introns est une suite de 3 événements majeurs. La première étape est l'attaque par le groupement hydroxyl de l'adénosine du point de branchement sur l'extrémité 3' de l'intron. Ceci conduit à la rupture de la liaison exon (1)-intron (3') et à la formation d'une boucle dit en lasso entre l'extrémité 3' de l'intron et le point de branchement. Le groupement hydroxyle libre de l'extrémité 5' de l'exon (1) attaque alors l'extrémité 5' de l'intron et entraîne la liaison des deux exons et l'excision de la région intronique (Burge et coll, 1999) (Fig. 32).



**Fig 31: Représentation des signaux d'épissage et des composants du spliceosome, impliqués dans la machinerie d'épissage.** (A) Les sites de reconnaissance et les motifs consensus de base sont représentés en position 3' et 5' d'un exon (rectangle bleu). y: pyrimidine, r: purine et n: A, G, U ou C. (B) Les protéines snRNPs et autres facteurs classiques et auxiliaires du spliceosome sont mentionnées au niveau des séquences avec lesquelles elles interagissent. Les régions introniques (IS) et exoniques (ES), activatrices (ESE et ISE) ou inhibitrices (ESS et ISS) interviennent dans l'épissage constitutif et alternatif en modulant la formation du spliceosome de manière positive ou négative (par compétition). Les protéines SR et autres particules non snRNP se fixent aux niveaux de ces séquences (d'après Faustino et coll, 2003).



**Fig 32: Représentation du mécanisme d'épissage.**

L'excision de l'intron constitutif et la liaison de deux exons et une série de deux réaction de trans-estérification. La première répond à l'attaque du groupement hydroxyl de l'adénosine du point de branchement sur le phosphate en position 5' de l'exon (1). La liaison ester qui s'en suit entraîne la formation de la structure dite en lasso. La seconde réaction concerne l'attaque du -OH libéré en 5' de l'exon (1) sur le phosphate en position 3' de l'exon (2). Cette réaction entraîne la liaison des deux exons et l'excision de l'intron (d'après Staley et coll, 1998).

## I.2. Epissage alternatif

A partir d'un ARN messager précurseur, l'épissage alternatif de tel ou tel exon ou de combinaison d'exons peut conduire à différentes populations d'ARN messagers. Ce mécanisme dépend des sites d'épissage sélectionnés pour la fixation des différents composants de base et de régulation du spliceosome. Ainsi, suivant la présence de telles ou telles séquences de régulation exoniques et introniques et la combinaison des facteurs susceptibles de s'y fixer exprimés dans la cellule, l'épissage alternatif de tel ou tel exon sur un gène donné pourra se produire (Norton et coll, 1994; Faustino et coll, 2003; Black, 2003). Différents modèles d'épissage ont jusqu'ici été mis en évidence (Fig. 33). L'excision ou la rétention d'un exon ou d'un intron (Fig. 33 G) peut être unique (Fig. 33 A) ou combinée avec d'autres exons de manière associée (Fig. 33 H) ou par exclusion mutuelle (Fig. 33 B). Le choix de l'extrémité 3' ou 5' intervenant dans le processus d'épissage peut cependant produire les mêmes transcrits alternatifs (Fig. 33 C-D). Enfin, suivant l'exon épissé, de nouveaux sites d'initiation de la traduction ou de polyadénylation peuvent apparaître ou disparaître (Fig. 33 E-F).

Selon le profil d'expression et le rapport de concentration des différentes protéines SR et hnRNPs se fixant sur les éléments de régulation ESE et ESS ou ISE et ISS, le(s) site(s) d'épissage choisi(s) pourra(ont) être différent(s) d'un tissu à l'autre ou pour un stade développemental particulier (Norton et coll, 1994; Hanamura et coll, 1998). La régulation des protéines SR, hnRNP ou PTB se fait au niveau transcriptionnel, notamment par épissage alternatif mais également au niveau post-traductionnel par un processus de phosphorylation/déphosphorylation qui module le trafic intracellulaire de ces facteurs entre le noyau et le cytoplasme et donc la disponibilité de ces derniers au lieu de l'épissage (Hannamura et coll, 1998; Black, 2003).

La décision d'épisser ou non un exon est donc dépendante de la combinaison d'éléments activateurs et répresseurs présents au niveau de la séquence des précurseurs des ARN messagers et des divers facteurs cellulaires impliqués dans la machinerie d'épissage exprimés dans un tissu spécifique, dans des conditions physiologiques ou en réponse à une stimulation extracellulaire donnée (Grabowski et coll, 2001; Faustino et coll, 2003).



## **II. Le rôle de l'épissage alternatif**

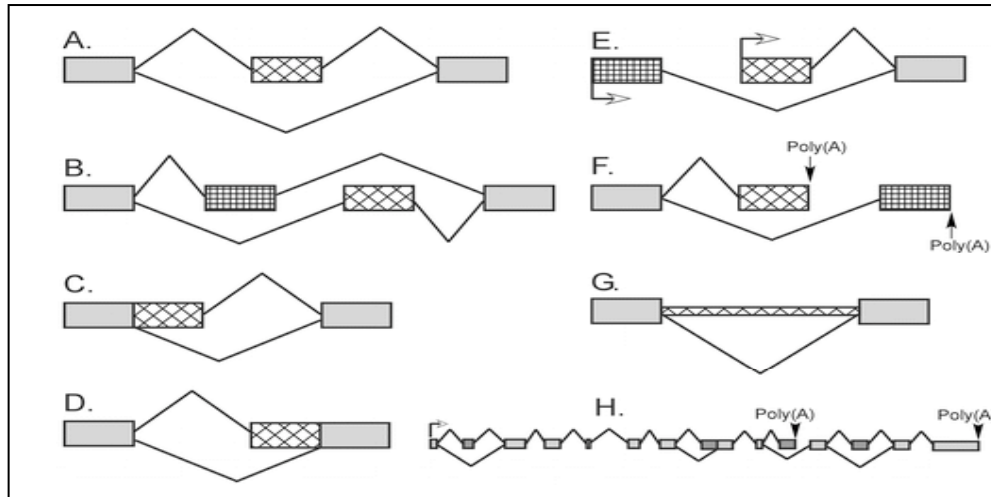
### **II.1. L'épissage alternatif dans des conditions physiologiques**

L'épissage alternatif intervient dans des processus biologiques physiologiques normaux. Dans ce cas, il prend la dénomination d'épissage fonctionnel en contribuant à la diversité des protéines produites dans un type cellulaire et d'un tissu à l'autre de manière constitutive ou à un moment donné du développement (Kriventseva et coll, 2003; Sorek et coll, 2004).

Ainsi, de nombreux processus biologiques, notamment ceux qui sont impliqués dans les programmes de prolifération, de différenciation et de mort cellulaire intervenant dans le développement et l'homéostasie des organismes, sont gouvernés par l'épissage alternatif de toute ou partie de domaines fonctionnels des protéines jouant un rôle dans ces processus. Les facteurs de transcription comme les facteurs de croissance et leurs récepteurs y sont aussi soumis (Grabowski et coll, 2001; Lareau et coll, 2004).

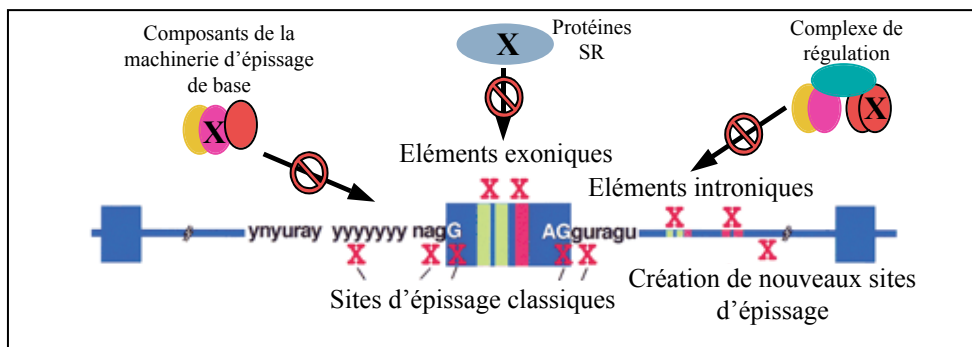
Un des processus biologiques impliquant l'épissage alternatif de protéines le mieux étudié est ainsi la détermination du sexe chez la drosophile. Chez cette dernière, la détermination du sexe est sous la dépendance d'une protéine, Sxl, se fixant au niveau de l'ARN. Exprimée chez les femelles, elle réprime l'expression des gènes nécessaires au développement des caractères mâles en jouant sur la machinerie d'épissage de ces derniers (Black, 2003).

A côté de ces épissages qui jouent sur la nature et la fonctionnalité des protéines produites, l'épissage alternatif peut également jouer sur la localisation et la stabilité même des ARN messagers. Les ARN épissés peuvent présenter un changement du cadre de lecture qui entraîne l'apparition d'un codon stop prématuré et l'adressage des transcrits épissés vers la dégradation (Maquat et coll, 2004). Bien que ce mécanisme de dégradation en relation avec l'épissage alternatif des précurseurs de messagers soit mal connu, il semble être un véritable processus de régulation et en l'occurrence de répression de l'expression génétique dans les cellules eucaryotes (Lareau et coll, 2004). Les facteurs de régulation de l'épissage alternatif comme les protéines SR sont elles-mêmes soumises à ce mécanisme.



**Fig 33: Modèles d'épissage alternatif**

(A) Un exon peut être excisé ou retenu. (B) L'épissage de deux exons s'exclut mutuellement. (C) et (D) Des sites alternatifs d'épissage en 3' ou en 5' d'un exon peuvent ne pas être sélectionnés lors de l'épissage. (E) et (F) L'excision ou la rétention d'un exon possédant un site d'initiation de la traduction ou un site de polyadénylation modifie le produit du gène. (G) Rétention d'un intron. (H) Des combinaisons d'épissage alternatif de plusieurs exons d'un ARNm précurseur donné, produit différents transcrits (d'après Black, 2003).



**Fig 34: Mutations à l'origine d'une dérégulation de l'épissage constitutif ou alternatif**

Des mutations (X) au niveau des sites d'épissage classique ou des régions introniques et exoniques de régulation positive ou négative peuvent engendrer une dérégulation de l'épissage. Des mutations en dehors de ces sites peuvent entraîner l'apparition ou l'activation de nouveaux sites d'épissage ou de séquences régulatrices. De même, des mutations au niveau des composants de la machinerie de base et/ou de régulation de l'épissage constitutif et alternatif peut créer des dérégulations majeures de l'épissage (d'après Faustino et coll, 2003).

## **II.2. La dérégulation de l'épissage alternatif dans les pathologies humaines**

### **II.2.A. Les mécanismes de dérégulation de l'épissage alternatif**

Des anomalies au niveau de l'épissage alternatif des précurseurs des ARN messagers sont associées à l'émergence et au développement de certaines pathologies humaines. La plupart de ces affections sont causées par des mutations des séquences spécifiques ou auxiliaires intervenant dans la reconnaissance des exons et la régulation de l'épissage. Cependant des mutations touchant les composants de base et les facteurs de régulation de la machinerie d'épissage conduisent également à des erreurs d'épissage à l'origine de maladies (Grabowski et coll, 2001; Faustino et coll, 2003) (Fig. 34).

Ces mutations influencent de manière plus ou moins grave la physiologie cellulaire et tissulaire, suivant qu'elles touchent un ou plusieurs éléments de la machinerie d'épissage constitutive et donc l'ensemble des ARN messagers d'une cellule ou qu'elles soient restreintes à une population de précurseurs de messagers et donc une fonction métabolique ou un processus cellulaire limité (Faustino et coll, 2003).

### **II.2.B. La dérégulation de l'épissage dans les pathologies cancéreuses et autoimmunes**

Les anomalies de l'épissage alternatif sont fréquemment associées à des pathologies notamment cancéreuses (Nissim-Rafinia et coll, 2002). En effet, la dédifférenciation qui peut suivre les phénomènes de tumorigénèse peut entraîner la perte de la régulation de l'épissage constitutif et alternatif de toute une batterie de messagers, par l'activation ou l'inhibition de certains composants de base de la machinerie d'épissage et de certains régulateurs spécifiques des tissus (Grabowski et coll, 2001). Elles concernent dans ce cas, des messagers des protéines impliquées dans les programmes de prolifération et de mort cellulaire, comme les suppresseurs de tumeurs ou les proto-oncogènes, mais aussi des protéines membranaires impliquées dans l'adhésion et la migration cellulaires (Venables et coll, 2004; Kalnina et coll, 2005).

Par exemple, le récepteur des facteurs de croissance des fibroblastes, FGFR-1, est soumis à l'épissage alternatif. Dans des tissus sains, l'isoforme  $\alpha$  est retrouvé majoritairement, tandis que dans les cellules gliales issues de tumeurs cérébrales, c'est l'isoforme  $\beta$ , dépourvue de l'exon dit  $\alpha$ , qui est exprimée. Les travaux ont montré que l'isoforme  $\beta$  avait une plus grande affinité pour les ligands du récepteur et procure donc un avantage prolifératif aux cellules gliales tumorales (Jin et coll, 1999). L'étude démontre que cette évolution tumorale fait suite à l'absence d'une particule régulatrice de l'épissage alternatif.

De même, l'expression de la molécule d'adhésion CD44 a été largement étudiée dans des tissus cancéreux. Ainsi dans les cas de tumeurs pancréatiques chez le rat (Faustino et coll, 2003) on note une augmentation globale du niveau d'expression des ARN messagers de CD44 et des isoformes normalement peu exprimées dans des tissus sains. La perte de contrôle de l'épissage alternatif est causée notamment par une expression massive de certaines protéines SR (Faustino et coll, 2003). Ces changements dans le profil d'expression de CD44 et plus généralement des molécules d'adhésion cellulaire, pourraient influencer le développement tumoral et promouvoir le potentiel métastatique de ces tumeurs.

La dérégulation des mécanismes d'épissage des ARN messagers dans les pathologies cancéreuses peut également atteindre des fonctions métaboliques de base ou spécifiques d'un type cellulaire. C'est le cas de l'enzyme tyrosinase, exprimée dans les mélanocytes où elle est impliquée dans la biosynthèse de la mélanine, qui par un défaut d'épissage alternatif entraîne l'apparition d'une dépigmentation dans les cas de mélanomes (Le fur et coll, 1997).

Le dérèglement de la machinerie d'épissage constitutif et alternatif peut entraîner l'apparition de nouvelles protéines ou moduler le niveau d'expression des variants existants en conditions normales. La délétion d'un ou plusieurs exons ou la rétention d'un intron peut entraîner des changements de la conformation des protéines ou la synthèse de nouvelles protéines. Ces dernières sont de nouveaux épitopes pour l'organisme et peuvent être considérés comme antigéniques et pris pour cible par le système immunitaire via des lymphocytes T circulants ou des auto-anticorps. Les réponses immunitaires dirigées contre ces auto-antigènes issus de l'épissage alternatif de divers ARNm, peuvent contribuer à la perte de certaines fonctions métaboliques ou à la destruction même de certains tissus ou organes après réponse cytotoxique du système immunitaire.

Pris ensemble ces études suggèrent que les anomalies d'épissage pourraient aider d'une part au diagnostic clinique des pathologies et d'autre part à leur traitement. Ainsi, dans le cas des affections tumorales certains transcrits ou protéines issus de l'épissage alternatif pourraient servir de marqueurs tumoraux spécifiques ou généraux mais également de cibles thérapeutiques anti-tumorales. C'est ce que suggère notamment une étude réalisée sur la protéine TRP-2 dans les cas de mélanomes humains. En effet, un variant issu de l'épissage alternatif de cette protéine, exclusivement exprimé dans les cellules tumorales, déclenche une réponse immunitaire cytotoxique à l'encontre des mélanocytes tumoraux (Wang et coll, 1996). De même, le cancer du poumon, est associé à l'expression d'un transcrit alternatif d'un gène particulier, XAGE-1, qui déclenche une réponse humorale du système immunitaire. L'étude suggère que cet épitope dominant tumoral, issu de l'épissage alternatif, pourrait être utilisé pour développer une thérapie vaccinale anti-tumorale (Ali Eldib et coll, 2004).

### **III. La dérégulation de l'expression génétique lors de la tumorigénèse thyroïdienne.**

#### **III.1. Les tumeurs thyroïdiennes**

La thyroïde peut présenter des tumeurs bénignes, en majorité des adénomes vésiculaires (AV), et des tumeurs malignes différenciées de type vésiculaire (CV), papillaire (CP) ou médullaire (CM). Les CP représente de 60 % à 80 % des cancers thyroïdiens, les CF entre 15 % et 30 % et les CM moins de 10 %.

D'un point de vue histologique, les CP présentent des structures ramifiées entre les tissus conjonctif et vasculaire avec des cellules cubiques de part et d'autre de ces axes avec parfois des structures vésiculaires à l'espace intrafolliculaire réduit pour les variant vésiculaires des CP. Les CV présentent quant à eux des structures vésiculaires entourées d'une capsule fibreuse. Enfin les CM sont des tumeurs paravésiculaires des cellules C.

Le diagnostique des cancers thyroïdiens se fait par palpation cervicale, dosage de la TSH et des hormones thyroïdiennes T3 et T4 et cytoponction au niveau des nodules thyroïdiens détectés. Le diagnostique histologique est délicat en raison des fortes ressemblances observées entre, par exemple les adénomes folliculaires et les CF, présentant tous deux des capsules fibreuses et de manière générale suivant la différenciation plus ou moins importante des cellules cancéreuses. Les CP donnent rarement des métastases ou seulement au niveau des ganglions locaux tandis que les CF peuvent évoluer après diffusion sanguine par des métastases essentiellement pulmonaires ou osseuses.

En absence de métastases, le diagnostic s'appuie sur la présence d'invasion vasculaire ou capsulaire.

Sur les nombreux oncogènes responsables des processus de tumorigénèse chez l'homme, c-myc et ras sont exprimés dans les cancers et adénomes thyroïdiens. De plus, des réarrangements au niveau du gène ret et des mutations du suppresseur de tumeur p53 surviennent également dans les cancers thyroïdiens notamment papillaires. Toutes ces modifications sont à l'origine du processus de tumorigénèse de la thyroïde.

### **III.2. La dérégulation de l'expression des gènes impliqués dans la prolifération et la signalisation cellulaire.**

Comme dans la majorité des cancers, on retrouve pour les tumeurs d'origine thyroïdienne, une dérégulation de l'expression et de l'épissage alternatif de certains gènes impliqués dans le cycle cellulaire et les voies de signalisation cellulaire.

Ainsi, le proto-oncogène ret, récepteur transmembranaire de type tyrosine kinase fixant les facteurs de la famille des GDNF, est touché. Dans les tissus thyroïdiens cancéreux, on démontre une augmentation de l'expression globale des ARN messagers et de la protéine ret sauvage, particulièrement dans les cancers papillaires (Fluge et coll, 2001). De plus, dans la plupart des biopsies issues de CP, CM et de CF, les expériences de RT-PCR ont mis en évidence l'expression de nombreuses populations de transcrits alternatifs de ret (Fluge et coll, 2001). Ces derniers présentent des délétions d'un ou d'une combinaison d'exons de la région codant pour la partie extracellulaire (Lorenzo et coll, 1995; Fluge et coll, 2001) ou pour l'extrémité du domaine intracellulaire de la protéine ret (Fluge et coll, 2001). Ces variants d'épissage pourraient moduler la spécificité d'interaction de ret avec ses ligands ainsi que la signalisation intracellulaire induite et avoir des conséquences majeures dans le processus de tumorigénèse de la thyroïde (Fluge et coll, 2001). Plus récemment, le facteur intracellulaire, Smad4, impliqué dans la voie de signalisation médiée par les facteurs TGF, a été étudié dans les cancers thyroïdiens. Les travaux montrent dans les tissus cancéreux et plus particulièrement les CP, une augmentation de l'épissage alternatif de Smad4 en des variants d'épissage qui abolissent les fonctions de Smad4 soit en inhibant l'expression même de la protéine soit en conduisant à la synthèse d'une protéine non fonctionnelle (Lazzereschi et coll, 2005).

La dérégulation des processus d'épissage alternatif de ces gènes et d'autres facteurs impliqués dans la morphogenèse, la prolifération et la signalisation cellulaires pourrait être à l'origine du développement des cancers thyroïdiens et de leur progression (Lazzereschi et coll, 2005).

Une autre classe de protéines largement concernées par des défauts de l'épissage lors des phénomènes de tumorigénèse et notamment associée au développement métastatique de ces dernières, regroupe les molécules d'adhésion qui interviennent dans les interactions entre cellules et avec la matrice extracellulaire. Dans les cancers thyroïdiens et plus particulièrement les CP, nombreuses d'entre elles, comme la fibronectine (FN1), la laminine (LAMB3) ou bien les mucines (Magro et coll, 2003) sont surexprimées au niveau de leurs ARNm totaux (Huang et coll, 2001).

La molécule CD44, largement étudiée dans les cancers d'origine variée, a été étudiée dans les cas de cancers thyroïdiens. Les multiples variants d'épissage alternatif connus pour cette protéine, sont retrouvés par RT-PCR dans des CP et des adénomes thyroïdiens où ils présentent une augmentation globale en comparaison avec des tissus sains (Ermak et coll, 1995). L'isoforme CD44v6 est par exemple, plus particulièrement augmenté dans les CP (Ermak et coll, 1995; Gu et coll, 1998) et dans les CF et à un moindre niveau dans les AV (Gu et coll, 1998). De manière intéressante, la présence des variants CD44v6 et CD44v3 est amplifiée pour les tissus issus de patients CP présentant des métastases nodales (Gu et coll, 1998). Une étude réalisée sur des rats transplantés avec des cellules thyroïdiennes tumorales confirme une augmentation de la quantité des variants des ARNm de CD44 et leur association avec un développement métastatique au niveau pulmonaire caractéristique de la pathologie (Kitahori et coll, 1998). Ces variants d'épissage de CD44 pourraient donc être des marqueurs permettant de diagnostiquer les cancers thyroïdiens et également de prévoir le caractère métastatique associé ou non à la progression de la pathologie (Gu et coll, 1998).

### **III.3. La dérégulation de l'expression des gènes impliqués dans la fonction thyroïdienne.**

L'expression et la régulation au niveau post-transcriptionnel de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans les fonctions métaboliques de la thyroïde ont été étudiées. En effet, la plupart des pathologies cancéreuses thyroïdiennes sont associées à une dérégulation des fonctions de la thyroïde engendrant généralement une hypothyroïdie.

La perte de la capacité à stocker l'iode et à produire les HT dans les cas de cancers thyroïdiens suggère en effet, une perte de fonction des protéines essentielles à la capture de l'iode et/ou à l'iodation de la Tg.

Les travaux menés à ce sujet ont mis en évidence une diminution de la quantité des ARN messagers du NIS et de la pendrine dans les adénomes et carcinomes thyroïdiens en comparaison avec des tissus sains (Huang et coll, 2001; Lazar et coll, 1999). De même, la quantité globale des ARN messagers de la TPO est fortement diminuée dans les CP (Umeki et coll, 1996; Huang et coll, 1998) et dans les CF (Lazar et coll, 1999). La Tg quant à elle présente une diminution globale de ses ARN messagers dans les adénomes (Bertaux et coll, 1991) et les cancers différenciés (Bertaux et coll, 1991; Lazar et coll, 1999). Enfin, le R-TSH, impliqué dans le contrôle des fonctions thyroïdiennes, présente des dérégulations du niveau de l'expression de ses messagers dans les cancers thyroïdiens mais beaucoup moins prononcés que pour les autres gènes indispensables à l'activité de la thyroïde (Lazar et coll, 1999). Ceci suggère de plus l'existence de mécanismes de régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle différents pour le R-TSH par rapport aux gènes impliqués dans la fonction métabolique de la thyroïde.

Ces modifications de la quantité des ARN messagers de gènes spécifiquement impliqués dans les fonctions thyroïdiennes pourraient être associés à des variations au niveau post-transcriptionnel par une dérégulation des processus d'épissage alternatif. La présence de variants d'ARN messagers de la TPO dans des tissus sains (Elisei et coll, 1991) suggère qu'une modulation de leur quantité respective pourrait notamment être impliqué dans la progression de la pathologie cancéreuse et dans la perte d'activité de l'enzyme (hypothyroïdie).



## ARTICLE (I)

### *introduction*

La TPO est l'enzyme clé de la synthèse des hormones thyroïdiennes, puisque c'est l'enzyme responsable de l'iodation des résidus tyrosines de la Tg et du couplage de ces derniers, à l'origine de la formation des hormones T3 et T4.

Le gène de la TPO humaine situé sur le chromosome 2, produit un transcrit de 3048 pb contenant 17 exons et 16 introns, en ce qui concerne la TPO entière. Cependant, dès les premiers travaux réalisés sur l'expression et la régulation de l'expression du gène de la TPO, différents transcrits issus de l'épissage alternatif du précurseur messager du gène ont été mis en évidence. Ainsi, un premier transcrit, appelé TPO-2, présentant une excision de l'exon 10, a été mis en évidence à partir d'expériences de RT-PCR menées sur des tissus issus de patients atteints de la maladie de Basedow ainsi que dans des thyroïdes normales (Kimura et coll, 1987). Puis un transcrit supplémentaire, appelé TPO-3 ou TPO Zanelli, dépourvu de l'exon 16 et avec un décalage du cadre de lecture, a également été identifié dans ces mêmes tissus (Zanelli et coll, 1990).

Ces différents variants d'épissage alternatif, exprimés dans des cellules hétérologues de la lignée CHO, sont traduits en protéines de 876 et 929 résidus d'acides aminés, pour la TPO-2 et la TPO-3 respectivement. Malgré leur synthèse effective au niveau protéique ces deux populations présentent probablement des fonctionnalités différentes. En effet, en comparaison avec la TPO-1 correspondant à l'ARNm complet de la TPO, la TPO-2 est rapidement dégradée dans les compartiments intracellulaires en raison d'un défaut de maturation et ne présente, en conséquence, aucune activité enzymatique de surface (Nicolli et coll, 1997), tandis que la TPO-3 acquiert des propriétés d'expression et de fonction similaires à celles de la TPO-1 (Nicolli et coll, 2001).

La purification et le profil électrophorétique de la TPO issue de glandes thyroïdes humaines sont venus confirmer l'existence de nombreux isoformes de la TPO humaine dues à des variations de l'épissage alternatif précédemment identifiés et non encore identifiés ou à des modifications post-traductionnelles. En effet, la déglycosylation des échantillons ne réduit pas l'hétérogénéité de la TPO et fait apparaître de nombreuses bandes, ce qui confirme l'implication des modifications post-transcriptionnelles, par épissage alternatif et/ou post-traductionnelles par endoprotéolyse.

Dans ce premier article, nous nous sommes attachés à rechercher d'autres transcrits de la TPO issus de l'épissage alternatif du précurseur messager de la TPO ainsi qu'à étudier les propriétés immunoréactives et enzymatiques de ces variants par rapport à celles de la TPO-1.

Dans un premier temps, des expériences de RT-PCR ont été réalisées à partir des ARN messagers issus d'échantillons de glandes thyroïdes de patients atteints de la maladie de Basedow. A partir de ces travaux, nous avons mis en évidence cinq nouveaux transcrits issus de l'épissage alternatif de la TPO, deux sont délétés d'un seul exon et les trois autres présentent une délétion de plusieurs exons.

Dans un second temps, nous avons étudié les propriétés immunoréactives et enzymatiques des deux transcrits délétés d'un seul exon, afin de déterminer leur expression au niveau protéique et d'envisager leur rôle dans le métabolisme thyroïdien. Pour ce faire, nous avons réalisé le clonage des ADNc de ces deux transcrits et leur expression dans une lignée de cellules ovariennes de hamster, les cellules CHO.

Afin d'estimer leur structure tridimensionnelle, nous avons testé leur capacité d'interaction avec les différents anticorps dirigés contre la TPO et disponibles dans le laboratoire. En réalisant des expériences de marquage métabolique en « pulse-chase », suivis de l'immunoprécipitation de la TPO à l'aide d'anticorps dirigés contre les formes non repliées (mAb47) et contre les formes correctement repliées (mAb15) de la protéine, nous avons estimé le taux de repliement et de dégradation ainsi que le temps de demi-vie des variants par rapport à ceux de la TPO-1.

Enfin, nous avons évalué la fonctionnalité de ces variants en mesurant d'une part leur expression à la surface cellulaire, lieu d'action physiologique de la TPO, et d'autre part leur activité enzymatique. Ces mesures ont été réalisées à l'aide de la technique de biotinylation qui permet de marquer des protéines exprimées à la surface cellulaire et par le test d'iodation de la BSA, en présence d'iodure radioactif et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Les résultats obtenus sont discutés par rapport à la grande hétérogénéité protéique de la TPO observée après électrophorèse dénaturante et d'après les propriétés biochimiques envisagées pour les domaines codés par les exons épissés dans les différents variants.

# Increasing Diversity of Human Thyroperoxidase Generated by Alternative Splicing

CHARACTERIZATION BY MOLECULAR CLONING OF NEW TRANSCRIPTS WITH SINGLE- AND MULTISPPLICED mRNAs\*

Received for publication, September 17, 2002, and in revised form, November 19, 2002  
Published, JBC Papers in Press, November 25, 2002, DOI 10.1074/jbc.M209513200

Mireille Ferrand, Valérie Le Fourn‡, and Jean-Louis Franc§

From the U555 INSERM, Faculté de Médecine, Université de la Méditerranée, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 5, France

The human thyroperoxidase (hTPO) gene is composed of 17 exons. The longest complete cDNA sequence determined so far contains a full-length hTPO (TPO1) encoding a 933-amino acid polypeptide. Several mRNA species encoding for hTPO isoforms are present in normal thyroid tissues, including TPO2 with exon 10 deleted and TPOzanelli with exon 16 deleted. In the present study, we established the existence of two new single-spliced transcripts, TPO4 and TPO5, lacking exons 14 and 8, respectively. Upon transfecting the TPO4 cDNA into Chinese hamster ovary cells, it was observed that TPO4 is able to reach the cell surface, is enzymatically active, and is able to be recognized by a panel of 12 monoclonal antibodies directed against hTPO, whereas TPO5 does not fold correctly and is unable to reach the cell surface. In normal tissues, the expression of TPO4 mRNA was examined by performing quantitative reverse transcription PCR. This deleted TPO mRNA amounted to  $32 \pm 11\%$  of the total TPO mRNAs. In the same tissues, the TPO2, TPOzanelli, and TPO5 amounted to  $35 \pm 12\%$ ,  $36 \pm 14\%$ , and  $\sim 10\%$ , respectively. The sum of these four species (not including TPO1) was more than 100%, possibly due to the presence of multispliced mRNAs. This possibility was tested, and three new variants were identified: TPO2/3, lacking exons 10 and 16, TPO2/4, lacking exons 10 and 14, and an unexpected variant, TPO6, corresponding to the deletion of exons 10, 12, 13, 14, and 16. In conclusion, these results indicate the existence of five new transcripts. One of them, TPO4, codes for an enzymatically active protein, whereas TPO5 is unable to fold correctly. The functional significance of the other newly spliced mRNA variants still remains to be elucidated, but these results might help to explain the heterogeneity of the hTPO purified from the thyroid gland.

kbp in size, is located on chromosome 2, locus 2p25, and consists of 17 exons and 16 introns (for a review, see Ref. 1). The complete sequence of the human TPO coding region is known (2–4). The full-length 3048-bp transcript (TPO1) codes for a protein consisting of 933 amino acids, which have a large extracellular domain, a transmembrane domain consisting of 60 residues, and a short intracytoplasmic tail consisting of 60 residues. Two other transcripts have been described, namely TPO2, in which exon 10 is spliced out, and TPOzanelli (TPO3), in which exon 16 is spliced out. TPO2 and TPO3 have been found to occur in normal thyroid tissues as well as in Graves' tissues (2, 5, 6). These two forms code for proteins consisting of 876 and 929 residues, respectively. TPO2 is rapidly degraded after its synthesis, does not reach the cell surface, and does not have any enzymatic activity (7), whereas TPO3 is able to reach the cell surface and shows enzymatic activity (8).

After being purified from the human thyroid gland, TPO is known to show up in SDS-PAGE under reducing conditions as a double band of 105 and 110 kDa. The relative intensity of these bands varies from one gland to another, and it has been established that TPO2 does not correspond to one of these bands (9, 10), certainly because it is too rapidly degraded after its synthesis (7). The difference in molecular weight between TPO1 and TPO3 (four amino acids) does not explain the existence of two bands, and glycosylation is not responsible for this heterogeneity either (11). The presence of other isoforms and/or the occurrence of endoproteolysis might explain the existence of these different species.

The aim of the present study was to search for the presence of new TPO transcripts that might help to explain this heterogeneity. Reverse transcription was carried out from the total RNAs, and PCRs were performed with various pairs of primers. Two new single spliced species (TPO4 and TPO5) were identified. After quantification of the four spliced isoforms TPO2, TPO3, TPO4, and TPO5 in normal thyroid tissues, the possible existence of multispliced isoforms was hypothesized. The existence of two isoforms with double splicing and one isoform with five spliced exons was established.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**RNA Isolation**—Frozen normal thyroid tissue was used in these experiments. Tissues were homogenized and prepared using the Promega kit (SV total RNA isolation system) according to the manufacturer's instructions, and the preparation was then treated with DNase. The RNA concentration was determined from the spectrophotometric absorption at 260 nm, and the RNAs were aliquoted and stored in water

Thyroperoxidase (TPO)<sup>1</sup> is the key enzyme in the process of thyroid hormone synthesis. The human TPO gene is about 150

\* This work was supported by INSERM (U555) and the Ligue Nationale Contre le Cancer. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the GenBank™/EBI Data Bank with accession number(s) AY136822, AF533528, AF533530, AF533531, and AF533529.

‡ Supported during this work by the Association pour le Développement des Recherches Médicales.

§ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-4-91-32-43-77; Fax: 33-4-91-79-65-11; E-mail: jean-louis.franc@medecine.univ-mrs.fr.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: TPO, thyroperoxidase; hTPO, human TPO; GSP, gene-specific primer; RT, reverse transcription; CHO, Chi-

nese hamster ovary; FBS, fetal bovine serum; MEM, minimum Eagle's medium; PBS, phosphate-buffered saline; mAb, monoclonal antibody; BSA, bovine serum albumin; EGF, epidermal growth factor; MPO, myeloperoxidase.

TABLE I  
Primer sequences for RT-PCR

Primer	Exon	Position	Sequence
PE2F	2	53–73	5'-CCTTCTTCCCTTCATCTCGA-3'
PE9Fa	9	1392–1413	5'-GCAGTACGTGGGTCCCTATGAA-3'
PE9Fb	9	1382–1401	5'-AGGCCTTCCAGCAGTACGTG-3'
PE9R	9	1416–1397	5'-GGGATGTAATCCCTCAGGGTG-3'
PE11F	11	1833–1862	5'-AGCCATCGCCAGCAGGAGCGTGGCCGACAA-3'
PE11R	11	1794–1773	5'-GCAGAACTCCCTCCACTCATG-3'
PE12F	12	2111–2140	5'-TGCCCATGGATGCCTTCCAAGTCGGCAAAT-3'
PE15F	15	2577–2606	5'-CGGAGGCTTCGCAGGTCTCACCTCGACGGT-3'
PE15R	15	2573–2603	5'-TCGAGGTGAGACCTGCGAAGCCTCCGATCA-3'
PE17Ra	17	2881–2851	5'-TTTGCTGTGTTTGGAAAAGAGTCGTACGG-3'
PE17Rb	17	2793–2773	5'-TCTCGGCAGCCTGTGAGTATC-3'
P-TPO4-F	13-15		5'-GATGGGATTTCCAGCTCCCTCTGCAAAGACTCCGGGAGGCTCCCTCGG-3'
P-TPO4-R	15-13		5'-CCGAGGGAGCCTCCCGGAGTCTTTGCAGAGGGGAGGCTGAAATCCCATC-3'
P-TPO5-F	7-9		5'-AACCCATGTTTCCATACAAATCATCACCTGAGGGATTAC-3'
P-TPO5-R	9-7		5'-GTAATCCCTCAGGGTGATGATTGTATGGAAAACATGGGTT-3'

at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further use. The absorption ratio (260/280) was between 1.7 and 2.0 with all the preparations.

**Reverse Transcription**—Depending on the experiments, reverse transcription was carried out using either 0.5  $\mu\text{g}$  of oligo(dT)<sub>12–18</sub>, 1  $\mu\text{g}$  of random hexamers, or 2 pmol of gene-specific primer (GSP). A 40- $\mu\text{l}$  reverse transcription reaction mixture containing hexamers, GSP, or oligo(dT)<sub>12–18</sub>, 0.9  $\mu\text{g}$  of RNA, 0.25 mM dNTP mix, 10 mM dithiothreitol, and 4 units of RNase recombinant inhibitor (Invitrogen) was incubated at 42  $^{\circ}\text{C}$  for 2 min when GSP and oligo(dT)<sub>12–18</sub> were used, or at 25  $^{\circ}\text{C}$  for 10 min when random hexamers were used. Superscript II RNase H<sup>-</sup> reverse transcriptase (0.2 units) (Invitrogen) was then added, and the mixture was incubated at 42  $^{\circ}\text{C}$  for 50 min. The reaction was inactivated by heating the preparation at 70  $^{\circ}\text{C}$  for 15 min. The mixture then treated with 2 units of RNase H (*Escherichia coli*) at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 20 min.

**PCR, Cloning, and Sequencing**—Reaction mixtures (50  $\mu\text{l}$ ) consisted of 2 units of Fast Start Taq polymerase (Roche Molecular Biochemicals), Taq buffer, 0.3  $\mu\text{M}$  oligonucleotide primers, 300  $\mu\text{M}$  dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, and 5  $\mu\text{l}$  of GC-rich solution (Roche Molecular Biochemicals). A DNA sample was added to this mixture, and PCR was performed with the following profile: 5 min at 95  $^{\circ}\text{C}$  for an initial denaturation followed by 35 cycles of 30 s of denaturation at 94  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s of annealing at temperatures depending on the primers, and a 45-s extension at 72  $^{\circ}\text{C}$ , ending with a 5-min final extension at 72  $^{\circ}\text{C}$  and a soak at 4  $^{\circ}\text{C}$ . The products obtained were electrophoresed on agarose gel in TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.3) buffer and stained with ethidium bromide. When necessary, the various PCR products were extracted from the gel using Qiaquick gel extraction kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions, and sequence analysis (Genomexpress, Grenoble France) or subcloning were then performed. Subcloning of the purified PCR products was performed using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen). Size analysis of the fragment inserted and sequence analysis of this insert in the vector were performed with the various clones obtained.

**Quantification of TPO mRNA Variants**—To study the relative levels of expression of the various hTPO mRNA variants, RT-PCR was performed as described in Ref. 12 with some modifications. PCR reactions were performed as described above except that the volume of the mixture was 100  $\mu\text{l}$ , and 9- $\mu\text{l}$  aliquots were taken from the reaction after each consecutive cycle and loaded onto 2% agarose gel. After staining the products with ethidium bromide, bands were detected, and their intensity was quantified using an Image Station 440 (Kodak). To correct the difference in nucleotide length, the density of the smaller size band was multiplied by a factor corresponding to this difference. To determine whether the detection of a variant was really dependent on its initial proportion within the cDNA population, we performed PCR amplifications with various quantities of the three cloned variants, pcDNA3-TPO2, pcDNA3-TPO3, or pcDNA3-TPO4 in relation to that of pcDNA3-TPO1 (3:1, 1:1, and 1:3, respectively). In all the cases that were tested, the ratio between the isoforms after their amplification corresponded to their initial proportions.

**Construction of pcDNA3-TPO4 and pcDNA3-TPO5**—Full-length 3060-kb TPO1 cDNA kindly provided by B. Rapoport was cloned into the HindIII and XbaI sites of the eukaryotic transfer vector pcDNA3 (Invitrogen). The internal deletion of the cDNA corresponding to exon 14 or exon 8 was performed using a single PCR procedure (13, 14). The primer pair used was P-TPO4F or P-TPO5F (sense) and P-TPO4R or P-TPO5R (antisense) (see Table I). The PCR mixture contained 160 ng of each primer, 50 ng of the pcDNA-TPO1, 200  $\mu\text{M}$  dNTPs, 10% (v/v)

dimethyl sulfoxide, 2.5 units of PfuTurbo DNA polymerase (Stratagene), and the corresponding buffer in a total volume of 50  $\mu\text{l}$ . The reaction was performed under the following conditions: denaturation at 95  $^{\circ}\text{C}$  for 30 s followed by 17 cycles of denaturation at 95  $^{\circ}\text{C}$  for 30 s, annealing at 55  $^{\circ}\text{C}$  for 1 min, and an extension at 68  $^{\circ}\text{C}$  for 17 min. PCR products were incubated with 10 units of DpnI for 2 h, and 5  $\mu\text{l}$  of this solution was then transformed into 50  $\mu\text{l}$  of MAX efficiency DH5 $\alpha$  (Invitrogen). Parts of this transformant were spread onto LB agar plates. Correct pcDNA3-TPO4 and -TPO5 clones were evidenced by sequencing. pcDNA3-TPO4 and -TPO5 pure plasmid DNA preparations were obtained with the Wizard Midipreps kit (Promega, Madison, WI).

**CHO Cell Cultures and Transfection**—CHO cells (ECACC no. 85050302) were kept in Ham's F-12 medium supplemented with 10% FBS, penicillin (100 IU/ml), and streptomycin (0.1 mg/ml). Cells were transfected using LipofectAMINE (Invitrogen) with pcDNA3-TPO4 or pcDNA3-TPO5. Cells were incubated in a saturated atmosphere (5% CO<sub>2</sub>/95% air) at 37  $^{\circ}\text{C}$ . Stable transfectants were selected in the presence of geneticin (400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and subcloned using limiting dilutions. Positive TPO4 and TPO5 expressing cell lines were identified by performing Western blotting or immunoprecipitation after [<sup>35</sup>S](Met + Cys) labeling (EXPRE<sup>35</sup>S<sup>35</sup>S protein labeling mix, PerkinElmer Life Sciences). A significant level of TPO1, TPO4, and TPO5 expression was obtained by growing TPO1-CHO, TPO4-CHO, and TPO5-CHO cell lines as described previously (15).

**Metabolic Labeling of TPO**—Cells were incubated in cysteine- and methionine-free MEM supplemented with 10% FBS, 10 mM sodium butyrate, and 100  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  [<sup>35</sup>S](Met + Cys). The incubation was carried out for 5, 16, or 48 h. In the pulse-chase experiments, cells were incubated for 1 h in Cys- and Met-free MEM supplemented with 10% dialyzed FBS and 10 mM sodium butyrate. Cells were then pulsed for 30 min in the presence of 100  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  [<sup>35</sup>S](Met + Cys). After the pulse, the labeling medium was removed, and the cell surface was washed three times with PBS and then replaced by Ham's F-12 medium supplemented with 10% FBS, 5 mM Met, and 5 mM Cys. Chases were performed for 30 min and 1, 3, 5, 16, and 24 h.

**Cell Lysis and Immunoprecipitation**—After being metabolically labeled, cells were washed twice with PBS, harvested on ice by scraping them into 1 ml of PBS, and centrifuged at 200  $\times g$  for 7 min. Cell pellets were resuspended in 600  $\mu\text{l}$  of TPO extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.3% sodium deoxycholate, and protease inhibitors (Complete<sup>TM</sup>, Roche Molecular Biochemicals)), vortexed every 2 min for 20 min, and centrifuged at 10,000  $\times g$  for 5 min. Radiolabeled supernatants were incubated for 2 h at room temperature with a pair of mAbs recognizing either a sequential region (mAb 47) or a conformational epitope (mAb 15) of the TPO molecule (16). These mAbs were previously complexed with protein A-Sepharose 4B (Zymed Laboratories Inc.) by incubating them overnight at 4  $^{\circ}\text{C}$ . Immune complexes were then retrieved by performing a brief centrifugation (10,000  $\times g$ , 10 s) and washed 4 times with 1 ml of TPO extraction buffer and once with 1 ml of PBS. Immunoprecipitated TPO was recovered from mAb-protein A-Sepharose 4B complexes by boiling the complexes for 5 min in 80  $\mu\text{l}$  of electrophoresis buffer (62 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, and 5% glycerol), and it was then analyzed by SDS-PAGE (7.5%). Protein-associated radioactivity was detected and quantified using a phosphorimaging device (Fujix BAS 1000).

TPO was also immunoprecipitated with a panel of mAbs directed against various antigenic domains of the TPO1 molecule (16). In this



experiment, [<sup>35</sup>S](Met + Cys)-radiolabeled CHO-TPO cell lysates were immunoprecipitated for 4 h at 25 °C with 50 µg of each of the TPO-mAbs previously complexed with protein A-Sepharose 4B.

**Cell Surface Biotinylation**—TPO1-, TPO4-, and TPO5-CHO confluent monolayers were metabolically labeled for 18 h with 100 µCi/ml [<sup>35</sup>S](Met + Cys) in the presence of 10 mM sodium butyrate, and cell surfaces were biotinylated as described previously (15). Cells were washed twice with PBS supplemented with 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 1 mM MgCl<sub>2</sub> and exposed to a 0.5 mg/ml EZ-link sulfo NHS-SS-Biotin (Pierce) for 20 min at 4 °C. The cross-linker was removed, and the procedure was repeated once. The biotin reagent was quenched by incubating the preparation with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS for 10 min at 4 °C. Cells were washed with PBS and harvested. To recover the immunoprecipitated antigens, the complexes were supplemented with 10 µl of 10% SDS, boiled for 5 min, diluted with 600 µl of TPO-extraction buffer, and centrifuged (10,000 × *g*, 3 min). Supernatant containing the total TPO was incubated for 2 h with avidin-agarose (Pierce). Biotinylated surface TPO and intracellular TPO were separated by centrifugation (10,000 × *g*, 10 s). The beads were washed four times with TPO-extraction buffer and once with PBS, resuspended in electrophoresis buffer, and boiled for 5 min. The supernatants were analyzed by SDS-PAGE (7.5%).

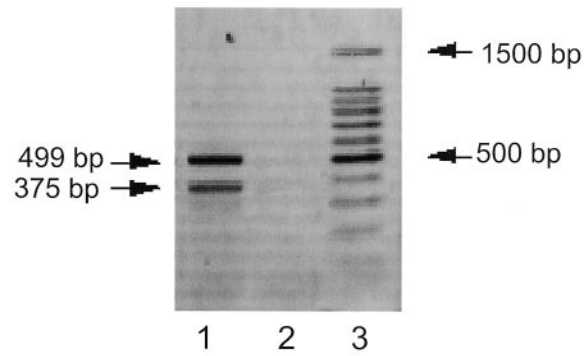
**TPO4 Total Enzymatic Activity**—Microsomal fraction pellets, prepared as described previously (7), were solubilized by resuspending them in 15 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, and 0.1 mM potassium iodide. Microsomes prepared from CHO cells transfected with pcDNA3 were used as a negative control. Microsomal fractions were centrifuged (10,000 × *g*, 2 min), and the supernatant was used for the enzymatic assay. Extracts containing approximately the same amount of protein were added to 1 ml of 40 mM guaiacol (Fluka Chimie, St. Quentin-Fallavier, France) and 67 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5. The reaction was performed at room temperature and initiated by adding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to obtain a final concentration of 0.25 mM. Guaiacol oxidation was measured by absorbance at 470 nm and monitored spectrophotometrically every 15 s for 3 min.

**TPO4 Cell Surface Enzymatic Activity**—Cell surface enzymatic activity was assayed as in Ref. 17, with slight modifications. TPO1- and TPO4-CHO cells were incubated in Ham's F12 medium supplemented with 10 mM sodium butyrate and 20 µM hemin for 48 h. CHO cells transfected with pcDNA3 alone or TPO1-CHO cells were used as a negative or positive control, respectively. The medium was removed, and the cells were washed twice with PBS before being incubated with BSA (5 mg/ml in PBS) and Na<sup>125</sup>I (10<sup>6</sup> cpm/ml), with or without 2 mM 2-mercapto-1-methylimidazole, as the control medium. The reaction was initiated by adding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to obtain a final concentration of 0.5 mM, and cells were incubated for 20 min at room temperature. The medium was then transferred to cold reaction tubes; the cell surface was washed out with 0.5 ml PBS, and the wash was added to the medium. Each tube was filled with 1 ml of ice-cold 20% (w/v) trichloroacetic acid supplemented with 10<sup>-4</sup> M KI, and incubated for 20 min at 4 °C before being centrifuged (2000 × *g*, 6 min). The supernatant was discarded, and the acid-insoluble iodinated material obtained was washed three times with 2 ml of 10% (w/v) trichloroacetic acid. The radioactivity remaining in the pellet was counted.

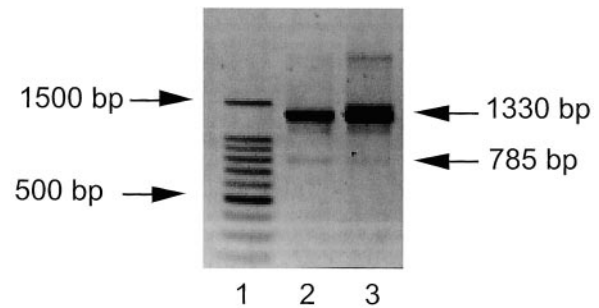
## RESULTS

**Identification of the Deletion Variants of Exon 8 and 14**—A strategy was developed to search for new isoforms of hTPO. It is known that the various transcripts resulting from alternative splicing can have different lengths of the poly(A) tail (18), and, consequently, some isoforms cannot be detected by using oligo(dT)<sub>12-18</sub> during the RT experiments. In the present study, after extracting the total RNA from normal thyroid tissues, three different kind of primers were thus used in the first strand cDNA synthesis reaction depending on the experiment, namely random hexamers, GSPs, and oligo(dT)<sub>12-18</sub>. Random hexamers lead to the production of short cDNA fragments and can therefore be used to avoid secondary structure problems or when the mRNA has a short poly(A) tail. In the latter case, GSP can also be used.

In the first set of experiments, which was designed to detect any alternative splicing between exons 9 and 17, reverse transcriptions were performed using random hexamers, and several different pairs of primers were then used in the PCR experiments. Two PCR products were obtained with one of

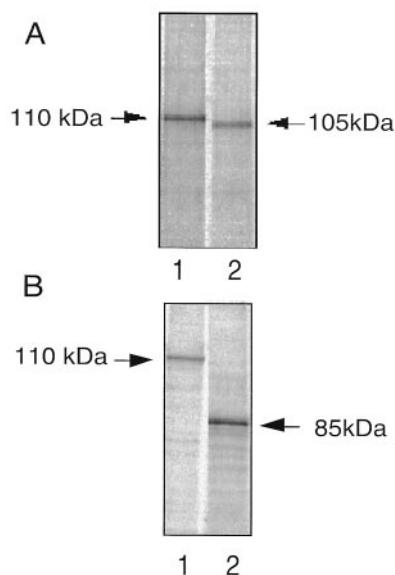


**FIG. 1. Identification of exon 14 deletion.** Reverse-transcription was performed using random hexamers, and TPO cDNAs were amplified by performing PCR as described under "Experimental Procedures" using PE12F and PE15R with an annealing temperature of 70 °C. PCR products were analyzed on a 2% agarose gel. Lane 1, RT-PCR products obtained using RNA from a normal thyroid tissue; lane 2, negative control; lane 3, DNA size marker.



**FIG. 2. Identification of exon 8 deletion.** Reverse-transcription was performed using the gene-specific primer PE9R, and TPO cDNAs were amplified by performing PCR as described under "Experimental Procedures" using PE2F and PE9R with an annealing temperature of 55 °C. PCR products were analyzed on a 1% agarose gel. Lane 1, DNA size marker; lanes 2 and 3, RT-PCR products obtained using RNA from two different normal thyroid tissues.

these pairs located in exons 12 and 15, a band with an apparent size of 499 bp corresponding to the predicted full-sized mRNA of 493 bp and a smaller 375-bp band (Fig. 1). Sequence analysis of the latter band showed that this was a 362-bp species from which exon 14 had been specifically deleted. This new variant of hTPO was named TPO4 (GenBank™ accession number AY136822). Exon 14 codes for an extracellular part of the protein near its transmembrane domain. This part of the protein corresponds exactly to its EGF-like domain (3). Juxtaposing exons 13 and 15 did not induce any changes in the reading frame and the corresponding full-length cDNA codes for a protein consisting of 889 amino acids. To detect any alternative splicing occurring between exons 2 and 9, reverse transcription was performed using a GSP located in exon 9 (PE9R), and a PCR experiment was then performed using a pair of primers located in exons 2 and 9 (PE2F and PE9R). Two bands were obtained, one with an apparent size of 1330 bp corresponding to the predicted full-size cDNA of 1311 bp, and a smaller one with an apparent size of 785 bp (Fig. 2). This band was purified and sequenced and found to correspond to a 793-bp species from which exon 8 had been deleted. This variant was named TPO5 (GenBank™ accession number AF533528). Exon 8 codes for an extracellular part of the protein located in its myeloperoxidase-like domain. Juxtaposing exons 7 and 9 did not lead to any changes in the open reading frame, and the corresponding full-length protein codes for a protein of 760 amino acids. Two hypothetically crucial residues are spliced out in TPO5, namely Arg-396, which may participate in the catalytic mechanism

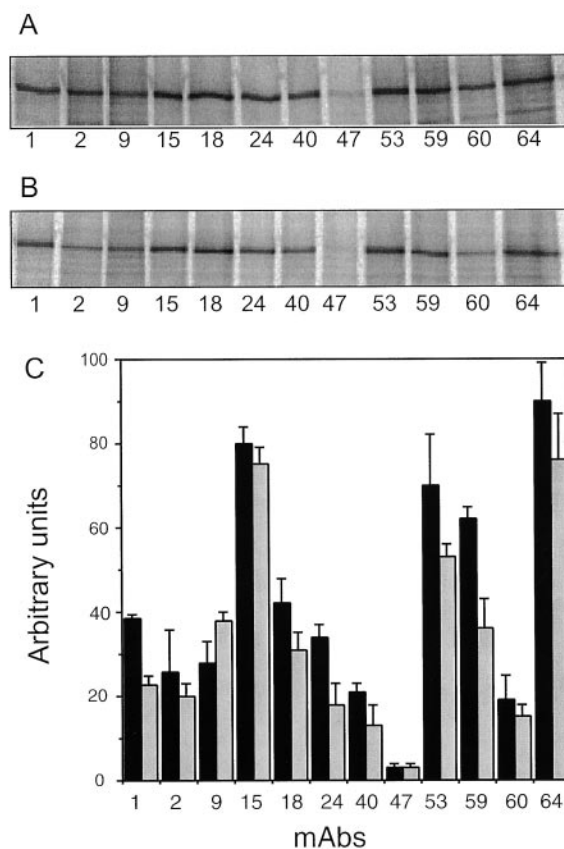


**FIG. 3. Immunoprecipitation of [<sup>35</sup>S](Met + Cys)-labeled TPO1, TPO4, and TPO5 from stably transfected CHO cell lines.** Stably transfected cell lines TPO1, TPO4, and TPO5 were incubated for 16 h with [<sup>35</sup>S](Met + Cys) before being lysed. TPO1 (A and B, lanes 1), TPO4 (A, lane 2), and TPO5 (B, lane 2) were immunoprecipitated with the pair mAb 15 + mAb 47. Samples were run on SDS-PAGE (7.5%), and the band was detected by phosphorimaging.

underlying the formation of compound I, and Glu-399, which may covalently bind to the heme prosthetic group through ester linkage (19). Two potential *N*-glycosylation sites (Asn-307 and Asn-342) are also spliced out. Contrary to what occurs in TPO5, the deleted exon in TPO4 mRNA codes for a whole domain (the EGF-like domain) that is not included in the main catalytic part of the molecule. It therefore seemed possible that this isoform might be active. We therefore examined the properties of the proteins corresponding to these two transcripts, focusing in particular on TPO4.

**Expression of TPO4 and of TPO5 in CHO Cell Line**—pcDNA3-TPO4 and pcDNA3-TPO5 were constructed from pcDNA3-TPO1 using a one stage PCR protocol compatible with the deletion of exon 14 or exon 8. CHO cells were transfected with pcDNA3-TPO4 or pcDNA3-TPO5, and several clones expressing significant levels of TPO4 or TPO5 were then isolated. After a metabolic labeling step using [<sup>35</sup>S](Met + Cys), immunoprecipitation was performed using the pair mAb15 + mAb47, and TPO4 and TPO5 showed up as bands with the predicted molecular weight on the SDS-PAGE analysis (Fig. 3, A and B).

**Stability, Immunoreactivity, and Intracellular Trafficking of TPO4**—To determine whether TPO4 has a modified three-dimensional structure in comparison with TPO1, we used a panel of 12 mAbs directed against hTPO. All of these mAbs except one, mAb47, were directed against conformational epitopes. TPO1- and TPO4-CHO cells were labeled for 16 h with [<sup>35</sup>S](Met + Cys), and, after the extraction step, immunoprecipitations were performed with each of the 12 mAbs (Fig. 4, A and B). TPO1 as well as TPO4 immunoreactivity was observed with all the mAbs. However, mAbs 1, 24, and 59 showed a slight decrease in immunoreactivity with TPO4 as compared with TPO1 (Fig. 4C). This seems to indicate that most of the TPO4 fold correctly in comparison with TPO1 and that none of the mAbs used were directed against the EGF-like domain. To determine whether the small differences observed affect the global half-life of the TPO4 synthesized in CHO cells, we performed a pulse-chase experiment. Cells were pulsed for 30 min with [<sup>35</sup>S](Met + Cys) and then chased for various times. Im-

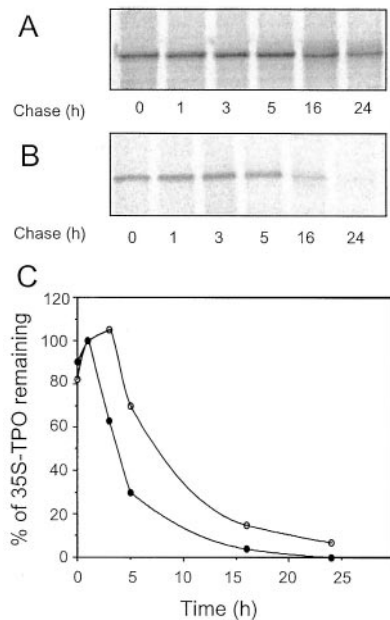


**FIG. 4. Analysis of TPO1 and TPO4 reactivity against a panel of TPO-mAbs.** TPO1- (A) and TPO4-CHO cells (B) were incubated for 5 h in the presence of [<sup>35</sup>S](Met + Cys) and lysed. TPOs were immunoprecipitated using mAb-protein A-Sepharose complexes and analyzed by SDS-PAGE (7.5%). The bands were detected and quantified by phosphorimaging (C). This figure gives the mean value of three different experiments.

muno-precipitation of TPO was performed, and samples were analyzed by SDS-PAGE. Quantification of these bands (Fig. 5) showed that TPO4 has a shorter half-life than TPO1, *i.e.* 5 *versus* 7.5 h. All of these events may affect the intracellular trafficking of TPO4 and hence its level of expression at the cell surface. To check whether TPO4 can reach the cell surface of the CHO cells, the cell surface expression of the two isoforms was determined after labeling CHO cells with [<sup>35</sup>S](Met + Cys) for 48 h and performing cell surface biotinylation (Fig. 6A). Quantification of the bands obtained showed that 25% of the TPO1 and only 12% of the TPO4 were present at the cell surface (Fig. 6B).

When expressed in CHO cells, TPO5 showed reactivity with mAb47 but not with mAb15, which indicates that this isoform was not able to fold correctly. In addition, this isoform is not able to reach the cell surface (data not shown).

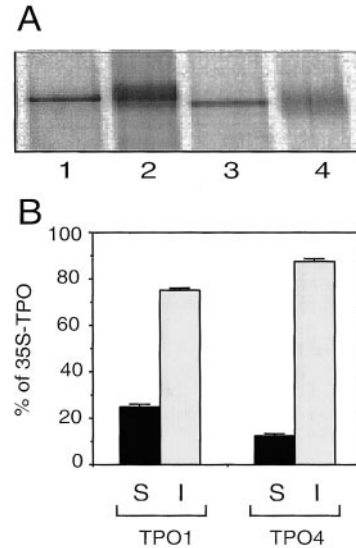
**Enzymatic Activity of TPO4**—The following two methods were used to detect whether TPO4 has any enzymatic activity. In the first step, microsomes were prepared from TPO1-, TPO4-, and pcDNA3-CHO cells, and, after protein extraction, guaiacol oxidation was performed (Fig. 7A). As expected, TPO1 was enzymatically active, and three times less activity was detected with TPO4. The difference in activity was due to the fact that TPO1-CHO cells express three times more TPO than TPO4-CHO cells. Cell surface enzymatic activity was also determined. The TPO1 present at the cell surface was able to catalyze the iodination of BSA. Some activity was also detected with TPO4 (Fig. 7B). This activity was seven times lower than that obtained with TPO1; however, this difference is consistent



**FIG. 5. Rate of degradation of TPO1 and TPO4.** Cells were pulsed for 30 min in the presence of  $100\mu\text{Ci/ml}$  of  $[^{35}\text{S}](\text{Met} + \text{Cys})$  in a Cys- and Met-free MEM supplemented with 10% FBS. After the pulse step, the medium was removed and replaced by Ham's F-12 medium supplemented with 5 mM Cys and Met. At the times indicated, after the extraction step, TPO from radiolabeled cell lysate was immunoprecipitated using the pair mAb 15 + mAb 47. Immunoprecipitated TPO1 (A) and TPO4 (B) were analyzed by SDS-PAGE. Bands corresponding to TPO1 (○) and TPO4 (●) were quantified by phosphorimaging. This figure gives the results of an experiment that is representative of four identical experiments performed.

with the fact that the level of TPO4 expression is three times lower in CHO cells and only half as high as that of steady state TPO1 at the cell surface. These results show that TPO4 is enzymatically active and that it may be involved in thyroid hormone synthesis.

**Quantification of TPO mRNA Variants**—The level of involvement of TPO4 in thyroid hormone synthesis depends on the level of expression of this isoform in thyroid tissues. Quantitative RT-PCR was therefore performed to measure the level of TPO4 mRNA expression as compared with the other transcripts. RT was performed using random hexamers, and PCR was performed with primers PE11F and PE15R. The 493-bp and 362-bp products obtained were separated on 2% agarose gel (Fig. 8A). After quantification, a correction of 1.36 was applied because of the difference in product size. The normalized band intensities were plotted as a function of the number of cycles (Fig. 8B). The semi-logarithmic plot of the product accumulation *versus* the number of cycles (Fig. 8C) showed that the efficiencies of the PCRs (as given by the slopes of the lines) were the same with both of these species. Under these conditions, the relative difference between the original abundance of these two samples was taken to be  $2^n$ , where  $n$  is the difference between the number of cycles necessary to reach a threshold value (12) (Fig. 8B). The threshold value was the value in the exponential part of the curve at which a statistically significant increase in fluorescence was detected. RNAs from 14 different thyroid tissues were used, and the results obtained showed that TPO4 mRNA amounted to  $32 \pm 11\%$  of the total TPO mRNAs. In Fig. 8, the TPO1/TPO4 transcript ratio differs from that shown in Fig. 1, because the mRNAs used were obtained from different thyroid glands. The level of TPO2 mRNA expression in normal thyroid tissues has never been exactly determined, and in the case of TPO3 it is only known that in thyroid from Graves' disease its mRNA accounts for  $\sim 50\%$  of the total

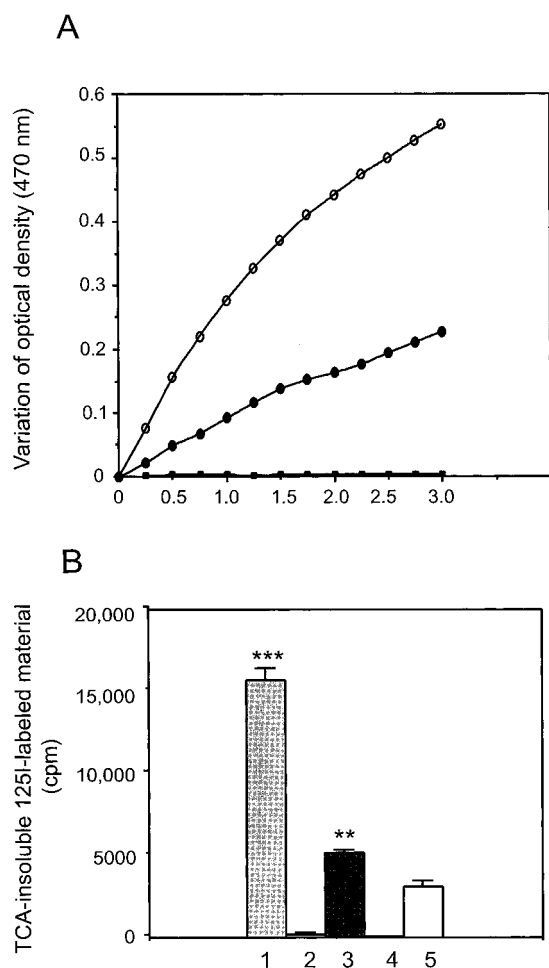


**FIG. 6. Cell surface expression of TPO1 and TPO4.** TPO1- and TPO4-CHO cells were metabolically labeled for 16 h with  $[^{35}\text{S}](\text{Met} + \text{Cys})$ , and cell surface biotinylation was then carried out as described under "Experimental Procedures." The cells were lysed, and TPO was immunoprecipitated with the couple mAb 15 + mAb 47 prior to reprecipitating the TPO present at the cell surface by adding avidin-agarose. The tagged fraction and only one-tenth of the supernatant corresponding to the intracellular fraction were analyzed by SDS-PAGE (7.5%). A, supernatants corresponding to the intracellular fractions are shown in lane 1 (TPO1) and lane 3 (TPO4). Supernatants corresponding to cell surface fractions are shown in lane 2 (TPO1) and lane 4 (TPO4). The bands were detected and quantified by phosphorimaging. B, the percentages of intracellular TPO (gray) and TPO expressed at the cell surface (black) were calculated. This figure gives the mean value of three different experiments.

hTPO mRNA. We also quantified these two variant mRNAs by RT-PCR. Primers located in exons 9 and 11 and exons 15 and 17 were used to quantify mRNA with exons 10 (Fig. 9A) and 16 deleted (Fig. 9B), respectively. TPO2 amounted to  $35 \pm 12\%$ , and TPO3 amounted to  $36 \pm 14\%$ . In the case of TPO5, we did not find in this part of the molecule any pair of primers giving a similar reaction efficiency between TPO1- and TPO5-cDNAs. However the quantity of TPO5 mRNA probably accounts for  $\sim 10\%$  (Fig. 2). The sum of the percentages of these four species (not including TPO1) was more than 100%, possibly due to the presence of multispliced mRNAs.

**RT-PCR, Cloning, and Identification of a Multispliced Variant of hTPO**—As it is not possible to synthesize the full-length coding region of the hTPO mRNA efficiently, we searched for the existence of multispliced mRNAs in its 3'-terminal part corresponding to the exon 10, 12, and 16 deletions. These TPO variant cDNAs can be amplified using primers located in exons 9 (PE9Fb) and 17 (PE17Rb). RT was performed using oligo(dT)<sub>12-18</sub>, and after an amplification step, PCR products were analyzed on 1% agarose gel. Three main bands migrated with apparent sizes of 1416, 1283, and 1160 bp, and faint bands with smaller sizes were observed (Fig. 10). The expected size of TPO1 (no exon deletion) was 1413 bp, which corresponded no doubt to the widest band obtained. As we were looking for multispliced isoforms, the smaller bands were purified, and the cDNAs were subcloned and sequenced. Twenty-five clones were analyzed, and three multispliced variants were identified, namely TPO2/3 corresponding to the deletion of exons 10 and 16 (GenBank<sup>TM</sup> accession number AF533530), TPO2/4 corresponding to the deletion of exons 10 and 14 (GenBank<sup>TM</sup> accession number AF533531), and an unexpected variant, TPO6, corresponding to the deletion of exons 10, 12, 13, 14, and 16 (GenBank<sup>TM</sup> accession number AF533529). The latter clone





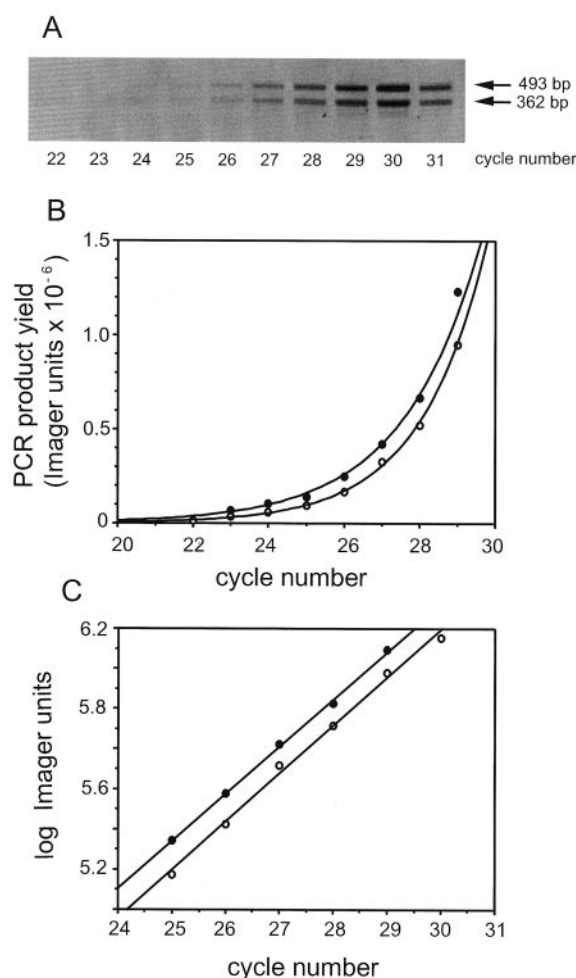
**FIG. 7. Enzymatic activity of TPO1 and TPO4 in TPO-CHO cells.** *A*, guaiacol oxidation activity of TPO1 and TPO4 in microsomal fractions obtained from TPO1- and TPO4-CHO cells. Extracts from the same quantity of microsomes containing TPO1 (○) and TPO4 (●) and extracts from cells transfected with pcDNA3 (■) were used to oxidize guaiacol. *B*, enzymatic activity of TPO1 and TPO4 at the cell surface of transfected CHO cells. TPO1- (1, 2), TPO4- (3, 4), or CHO cells transfected with pcDNA3 alone (5) were incubated with PBS containing BSA (5 mg/ml) and Na<sup>125</sup>I (10<sup>6</sup> cpm). Negative controls were run in which 2 mM mercapto-1-imidazole was added (2, 4). The reaction was initiated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to a final concentration of 0.5 mM. Cells were incubated for 20 min at room temperature, the supernatant was then discarded, and the acid-insoluble material obtained was washed three times with 2 ml of 10% trichloroacetic acid. The radioactivity remaining in the pellet was counted. The data are means from three different experiments. Statistically significant differences *versus* pcDNA3-CHO cells as follows: \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$  (by paired Student's *t* test).

certainly corresponds to one of the faint bands with a smaller size, which can be seen in Fig. 10.

It is also worth noting that when we analyzed the intensity of the bands obtained after RT using oligo(dT)<sub>12-18</sub> and 35 cycles of PCR amplification using primers located in exons 9 and 17 (Fig. 10), the ratio between TPO1 and the various other isoforms did not correlate with the results obtained by quantitative RT-PCR, because the major mRNA species seems to be the TPO1 mRNA. One of the differences between these two experiments was that oligo(dT)<sub>12-18</sub> was used in this experiment, and random hexamers were used in the quantitative RT-PCR. This confirms that the choice of RT procedure is of great importance when analyzing the level of expression of these various isoforms.

#### DISCUSSION

Some years ago, five variants of hTPO were characterized, *i.e.* the full-length mRNA TPO1, which consists of 17 exons (2,



**FIG. 8. Relative abundance of TPO mRNAs with exon 14 deleted.** Reverse transcription was performed using random hexamers, and TPO mRNAs were amplified by PCR as described under "Experimental Procedures" using primers PE12F and PE15R with an annealing temperature of 70 °C. Aliquots of 9  $\mu$ l were taken from the reaction mixture between cycles 22 and 31. These aliquots were analyzed with 2% gel agarose, and the bands were detected (*A*) and quantified (*B*) using a Kodak Image Station 440. The amplification efficiency is given by the slope of the line in a semi-logarithmic plot of the product accumulation *versus* the number of cycles (*C*). ●, TPO1; ○, TPO4.

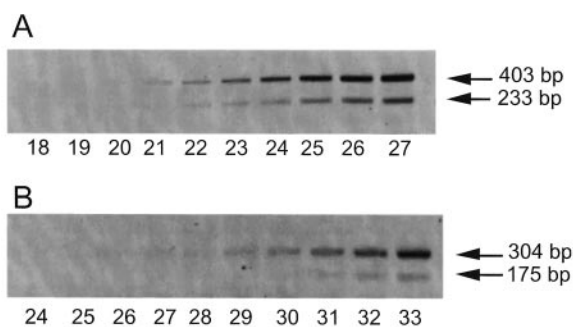
3, 4), the TPO2 with exon 10 deleted (2, 5), the TPO3 with exon 16 deleted (6), TPO I consisting of exons 1–6 plus the 5'-end of intron 6, and TPO II consisting of exons 1–5 plus an unidentified DNA tract 558 bp in length (20). Studies performed by expressing the recombinant variants showed that TPO1 and TPO3 are enzymatically active and able to reach the cell surface of CHO cells (8, 21), whereas TPO2 is rapidly degraded after its synthesis and does not have any enzymatic activity (7).

After being purified from human thyroid glands by affinity chromatography using anti-TPO mAbs, hTPO shows up in SDS-PAGE as a closely migrating double band with a lower molecular weight than that of the TPO1 and TPO3 expressed in CHO cells.<sup>2</sup> This difference may be due to post-transcriptional or post-translational modifications. In the present study, we investigated the possible existence of new variants of hTPO mRNAs, which might help to explain the multiple forms of hTPO obtained.

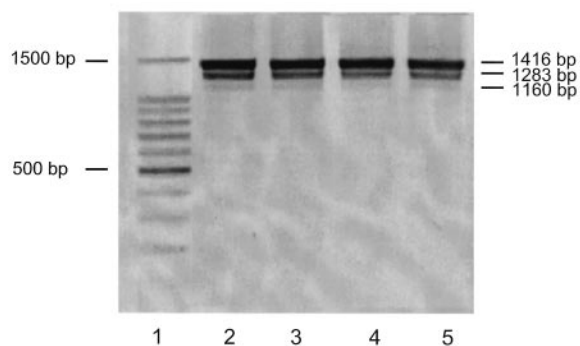
Because it is difficult to detect alternative splicing using the full-length coding region of hTPO, we synthesized smaller cDNA parts of hTPO that together cover the entire mRNA. For

<sup>2</sup> V. Le Fourn, M. Ferrand, and J. L. Franc, unpublished results.





**FIG. 9. Relative abundance of TPO mRNAs with exons 10 or 16 deleted.** The following actions were taken to quantify the relative abundance of TPO mRNA. *A*, with exon 10 deleted, reverse transcription was performed using random hexamers, and TPO mRNAs were amplified by performing PCR as described under "Experimental Procedures" using primers PE9Fa and PE11R with an annealing temperature of 55 °C. *B*, with exon 16 deleted, reverse transcription was performed using random hexamers, and TPO mRNAs were amplified by performing PCR as described under "Experimental Procedures" using primers PE15F and PE17Ra with an annealing temperature of 70 °C. Aliquots of 9  $\mu$ l were taken from the reaction mixture at various cycles. These aliquots were analyzed with 2% gel agarose, and the bands were detected and quantified using a Kodak Image Station 440.



**FIG. 10. Amplified fragments of TPO cDNAs obtained by performing RT-PCR between exons 9 and 17.** Reverse transcription was performed using oligo(dT)<sub>12-18</sub>, and 35 cycles of PCR were then performed using primers PE9Fb and PE17Rb with an annealing temperature of 61 °C. Amplification products were analyzed on 1% agarose gel. *Lane 1*, DNA size marker; *lanes 2-5*, RT-PCR products obtained using RNA from four different normal thyroid tissues.

the reverse transcription procedure, we used random hexamers, GSP or oligo(dT)<sub>12-18</sub>. The use of random hexamers or GSP makes it possible to detect mRNA that either does not possess any tail or has only a very short poly(A) tail. Actually it is well known that various transcripts from one gene can differ in their poly(A) tail length and, in some cases, can be detected with difficulty using oligo(dT)<sub>12-18</sub>. Using this strategy, two new monospliced variants were identified, namely TPO4 lacking exon 14, and TPO5 lacking exon 8. We estimated by quantitative RT-PCR that TPO with exon 14 deleted accounts for  $32 \pm 11\%$  of the total hTPO mRNA. Using the same technique, the level of expression of the known transcript with exon 10 deleted was found to be  $35 \pm 12\%$ , and that with exon 16 deleted was  $36 \pm 14\%$ . The TPO5 mRNA accounts for  $\sim 10\%$  of the total hTPO mRNAs. As the sum of these various forms, not including TPO1, was more than 100%, the existence of multispliced transcripts was hypothesized. The search for multispliced species with exons 10, 14, and 16 deleted showed the existence of two transcripts with a double splicing, namely TPO2/3, and TPO2/4. Although no variant with triple splicing TPO2/3/4 was observed, the presence of this species cannot be ruled out. We did not search for multispliced species with exon 8 deleted, but these transcripts certainly exist. Moreover, an

unexpected multispliced species, TPO6, was detected with splicing of exons 10, 12, 13, 14, and 16. It is worth noting that we never detected the presence of TPO mRNA with a spliced exon 12 or exon 13 alone. We then established the existence of five new hTPO mRNAs with the other known variants; with the multiple possibilities of the multisplicing procedure, it seems quite likely that a greater number of hTPO mRNA variants may be found to exist.

It is not possible to quantify the proportions in which the different multispliced transcripts are present. However, it should be noted that although TPO5 and TPO6 mRNA are not at all abundant, the splicing of exons 10, 14, and 16 is a very common occurrence in normal thyroid tissues, and TPO1 mRNA is perhaps not the main transcript present in the thyroid gland. Northern blot data obtained in previous studies by various groups showed the presence of mRNA species of  $\sim 4.0$ , 3.1, 2.9, 2.1, and 1.7 kb (for a review, see Ref. 1). The 4.0-kb transcript has been thought to be an immature mRNA precursor, whereas the 3.1-kb transcript corresponds to TPO1, and the mRNA species that are 2.1 and 1.7 kb in size correspond to TPO I and TPO II, respectively. The 2.9-kb species might correspond to TPO2, TPO3, and/or TPO4. The 3.1-kb species has been obtained by all the authors, whereas only Kimura *et al.* (2) have reported the existence of the 2.9-kb species. It is difficult to understand why this is so, but determining the mRNA size accurately in Northern blots is known to be rather tricky, and it is also possible that the 3.1- and 2.9-kb species may have been poorly separated because of the small difference in size. It is therefore difficult to obtain an exact idea of the proportion of wild type/splice variant transcripts from these Northern blot experiments.

As to whether the RT-PCR procedure constitutes a valid means of analyzing the expression of these various isoforms, the use of oligo(dT)<sub>12-18</sub> and a random hexamer or GSP clearly yielded very different results (see Figs. 8, 9, and 10). This seems to indicate that some or all of the spliced variants of hTPO have a shorter poly(A) tail than that of TPO1 as was also previously found to occur in the case of TPO I and II (20). Messenger RNAs leave the nucleus with a  $>200$ -residue poly(A) tail and are deadenylated, yielding heterogeneous polymers consisting of adenosine residues. The cytoplasmic control of poly(A) length plays a key role in activating and repressing gene expression. A search for possible different lengths of poly(A) tails, depending on the isoform, is now under way.

Multiple species of MPO were also produced by performing alternative splicing. Two transcripts with deletions of 57 and 171 bp, which were generated by partially skipping exon 9 and completely skipping exon 10 (22), and two other transcripts with modifications in their 5'-ends and with insertions of 96 bp in exon 2 and 82 bp in exon 4 have been described (23). Except for the splicing of exon 10, which corresponds to TPO2, the other alternative splicing shows no similarities between the two peroxidases.

The splicing of one exon can affect the folding of the protein variably, depending on its location. The nucleotide and amino acid sequences corresponding to exons 3-11 in the hTPO gene show some significant similarities with exons 2-11 of MPO (24). The next two exons, 13 and 14, belong to the C4b and EGF gene families, respectively. Exons 15 and 16 code for the transmembrane part of the protein and for its cytoplasmic tail. These polypeptide parts do not show any similarities with other proteins. As far as TPO5 is concerned, exon 8 codes for a large (172 amino acids) and important part of the protein located in the middle of the myeloperoxidase-like domain, which includes Arg-396 and Glu-399. Arg396 corresponds to

the Arg-235 of MPO, which participates in the catalytic mechanism, Glu-399 corresponds to the Glu-242 in MPO and is a possible site of the covalent heme binding process (19). In addition, two potential *N*-glycosylation sites (Asn-307 and Asn-342) are present in this part of the protein. Therefore, as can be expected when expressed in CHO cells, TPO5 is unable to acquire a proper three-dimensional structure and reach the cell surface. The other monospliced species, TPO4, has exon 14 deleted. This exon codes for a whole domain located in the extracellular part of the molecule showing similarities with EGF and is certainly not involved in the function of the enzyme. We expressed this protein in CHO cells and investigated the structural and functional aspects of TPO4 with respect to TPO1 as was previously done with TPO2 and TPO3 (7, 8). Part of the synthesized TPO4 is able to fold correctly and reach the cell surface, but this isoform has a shorter half-life than TPO1 (5 versus 7.5 h). Cell surface biotinylation showed that only 12% of the protein is present in the steady state at the cell surface as compared with 25% in the case of TPO1. Like TPO1 and TPO3, TPO4 is enzymatically active and can therefore be expected to play a role in thyroid hormone synthesis. Some of these results are in agreement with the results of a very recent study by Guo *et al.* (25). To localize the immunodominant region of hTPO, these authors transfected COS-7 cells with TPO cDNA from which the EGF-like domain had been deleted. They established that this TPO (corresponding to TPO4) is able to reach the cell surface. In addition, they established that this protein can be recognized by human monoclonal autoantibodies. The results of this study confirm that the three-dimensional structure of TPO4 is very similar to that of TPO1 and definitively exclude the possibility that the juxtamembrane EGF-like domain is part of the TPO immunodominant region.

Our study also showed the presence of multispliced species. Based on the results obtained after expressing recombinant monospliced species, the effects that the absence of the same exon from multispliced species will have are predictable. For example, we have established that the lack of exon 10 in TPO2 leads to a rapid degradation of this protein (7); it can therefore be expected that all isoforms with exon 10 deleted will be rapidly degraded. By contrast, the deletion of exon 14 or 16 does not have such dramatic effects, and if TPO3/4 exists, it will therefore certainly be active.

The existence of these various transcripts certainly explains, partly, the heterogeneity of the TPO purified from human thyroid glands. The double bands obtained in SDS-PAGE obviously consisted of numerous smaller bands with very similar molecular weights.<sup>2</sup> The existence of these various species was certainly due to the presence of various isoforms as well as to the existence of an endoproteolytic process, because we have established that hTPO, when expressed in CHO cells (26) and the rat thyroid cell line PC Cl3,<sup>3</sup> is cleaved by proprotein

convertases in its N-terminal part.

In conclusion, the present results show that the alternative splicing form of TPO mRNAs gives rise to a great number of different transcripts. Two new monospliced isoforms (TPO4 and TPO5) and three multispliced isoforms (TPO2/3, TPO2/4, and TPO6) have been shown here to exist, but the number of multispliced isoforms is certainly greater. It was established here that TPO4 is enzymatically active and able to reach the cell surface. Further studies will now be required to determine the role played by the other isoforms in the process of thyroid hormone synthesis and the true chemical structure of the thyroperoxidase present in normal human thyroid tissues.

*Acknowledgments*—We thank J. Lanet for expert technical assistance, C. DeMicco for generous cooperation in providing us with thyroid tissues, B. Rapoport for providing full-length hTPO-cDNA, and J. Ruf for providing hTPO mAbs.

#### REFERENCES

1. McLachlan, S. M., and Rapoport, B. (1992) *Endocr. Rev.* **13**, 192–206
2. Kimura, S., Kotani, T., McBride, O. W., Umeki, K., Hirai, K., Nakayama, T., and Ohtaki, S. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 5555–5559
3. Libert, F., Ruel, J., Ludgate, M., Swillens, S., Alexander, N., Vassart, G., and Dinsart, C. (1987) *EMBO J.* **6**, 4193–4196
4. Magnusson, R. P., Chazenbalk, G. D., Gestautas, J., Seto, P., Filetti, S., DeGoot, L. J., and Rapoport, B. (1987) *Mol. Endocrinol.* **1**, 856–861
5. Elisei, R., Vassart, G., and Ludgate, M. (1991) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **72**, 700–702
6. Zanelli, E., Henry, M., Charvet, B., and Malthiery M. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **170**, 735–741
7. Niccoli, P., Fayadat, L., Paneels, V., Lanet, J., and Franc, J. L. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 29487–29492
8. Niccoli-Sire, P., Fayadat, L., Siffroi-Fernandez, S., Malthiery Y., and Franc, J. L. (2001) *Biochemistry* **40**, 2572–2579
9. Gardas, A., Lewartowska, B., Sutton, B. J., Pasiaka, Z., McGregor, A. M., and Banga, J. M. (1997) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 3752–3757
10. Cetani, F., Costagliola, S., Tonacchera, M., Panneels, V., Vassart, G., and Ludgate, M. (1995) *Mol. Cell. Endocrinol.* **115**, 125–132
11. Giraud, A., Franc, J. L., Long, Y., and Ruf, J. (1992) *J. Endocrinol.* **132**, 317–323
12. Spencer, W. S., and Christensen, M. J. (1999) *Biotechnology* **27**, 1044–1051
13. Makarova, O., Kamberov, E., and Margolis B. (2000) *Biotechnology* **29**, 970–972
14. Wang, J., and Wilkinson, M. F. (2000) *Biotechnology* **29**, 976–978
15. Fayadat, L., Niccoli-Sire, P., Lanet, J., and Franc, J. L. (1998) *Endocrinology* **139**, 4277–4285
16. Ruf, J., Toubert, M. E., Czarnocka, B., Durand-Gorde, J. M., Ferrand, M., and Carayon, P. (1989) *Endocrinology* **125**, 1211–1218
17. Fayadat, L., Niccoli-Sire, P., Lanet, J., and Franc, J. L. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 10533–10538
18. Zhao, J., Hyman, L., and Moore, C. (1999) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 405–445
19. Taurog, A. (1999) *Biochimie (Paris)* **81**, 557–562
20. Nagayama, Y., Seto, P., and Rapoport, B. (1990) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **71**, 384–390
21. Kaufman, K. D., Rapoport, B., Seto, P., Chazenbalk, G. D., and Magnusson, R. P. (1989) *J. Clin. Invest.* **84**, 394–403
22. Hosokawa, Y., Kawaguchi, R., Hikiji, K., Suzuki, K., Nakagawa, T., Yoshihara, T., and Yamaguchi, K. (1993) *Leukemia* **7**, 441–445
23. Hashinaka, K., Nishio, C., Hur, S. J., Sakiyama, F., Tsunasawa, S., and Yamada, M. (1988) *Biochemistry* **27**, 5906–5914
24. Kimura, S., Hong, Y. S., Kotani, T., Ohtaki, S., and Kikkawa, F. (1989) *Biochemistry* **28**, 4481–4489
25. Guo, J., McLachlan, S. M., and Rapoport, B. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 40189–40195
26. Le Fourn, V., Lanet, J., and Franc J. L. (2002) *J. Endocrinol. Invest.* **25**, Suppl. 7, 138 (abstr.)

<sup>3</sup> V. Le Fourn, M. Ferrand, and J. L. Franc, manuscript in preparation.

**ARTICLE (I)*****conclusion***

A partir de ces travaux, nous avons mis en évidence deux nouveaux transcrits délétés d'un exon, la TPO-4, présentant une délétion de l'exon 14, ainsi que la TPO-5, dépourvue du large exon 8. Par la suite, la quantification des divers transcrits de la TPO, réalisée par des expériences de RT-PCR avec des primers spécifiques de la TPO-2, TPO-3, TPO-4 et de la TPO-5 ont démontré l'existence de populations d'ARNm de la TPO délétées d'une combinaison d'exon. Trois nouveaux variants multiépissés ont alors été détectés, la TPO-2/3 présentant une délétion des exons 10 et 16, la TPO-2/4 dépourvue des exons 10 et 16 ainsi que la TPO appelée TPO-6 délétée de l'ensemble des exons 10, 12, 13, 14 et 16.

Dans un second temps, les propriétés immunoréactives et enzymatiques de la TPO-4 et de la TPO-5 ont été étudiées, afin de déterminer leur expression au niveau protéique et d'envisager leur rôle dans le métabolisme thyroïdien. La TPO-4, exprimé à un PM de 85 kDa, est immunoprécipitée par les différents anticorps dirigés contre la TPO-1, tandis que la TPO-5 ne présente aucune affinité pour le mAb15 reconnaissant les TPO correctement repliées. Ceci suggère que le TPO-4 à l'inverse de la TPO-5 est capable d'acquérir une conformation native.

Ainsi, la TPO-4 présente des propriétés biochimiques et enzymatiques similaires à la TPO entière, la TPO-5 est, comme la TPO-2, rapidement dégradée et sans activité enzymatique de surface détectable.

D'une part, ces résultats confirment l'importante hétérogénéité de la TPO en raison de nombreux évènements post-transcriptionnels par épissage alternatif et notamment l'existence de variants délétés de plusieurs exons ainsi que l'expression de certains d'entre eux au niveau protéique et donc leur possible rôle dans la physiologie normale de la glande ainsi que dans les pathologies thyroïdiennes. D'autre part, les données rassemblées dans cet article révèlent des résultats intéressants sur les propriétés biochimiques et immunologiques de différentes parties de la protéine. Le large exon 8 possédant deux sites potentiels de glycosylation ainsi que des résidus potentiellement indispensables à l'activité enzymatiques de la TPO, joue probablement un rôle dans le mécanisme de repliement et/ou la stabilité de la TPO. Le domaine similaire à la protéine du complément C4b, codé par l'exon 14, n'est pas indispensable pour un repliement correct de la TPO et ne représente pas une région immunodominante.

Pris ensemble, ces résultats démontrent le rôle primordial de l'épissage alternatif dans l'hétérogénéité de la TPO et nous incitent à rechercher le rôle joué par les différents transcrits dans les maladies thyroïdiennes notamment les pathologies cancéreuses généralement associées, à terme, à une perte des fonctions de la thyroïde.

## ARTICLE (II)

### *introduction*

Dans ce deuxième article, nous avons entrepris de détecter et de quantifier le niveau d'expression des différents variants issus de l'épissage alternatif des précurseurs des ARNm de la TPO identifiés jusqu'à présent.

En effet, au cours des nombreux travaux réalisés pour comprendre les raisons de la grande hétérogénéité de la TPO, différents variants alternatifs des ARNm de la TPO ont été identifiés. Avec la TPO-1, de 3048 pb, on trouve une population de 2877 pb, la TPO-2 sans l'exon 10, de 3036 pb, la TPO-3 délétée de l'exon 16 ainsi que cinq nouvelles populations de variants délétés d'un seul exon, le 14 pour la TPO-4 et le large exon 8 pour la TPO-5, ou de combinaison d'exons, le 10 et le 16 pour la TPO-2/3, le 10 et le 14 pour la TPO-2/4 et de l'ensemble des exons 10, 12,13,14 et 16 pour la TPO-6, mis en évidence dans notre premier article.

Parce que des dérégulations de l'épissage alternatif de nombreux gènes apparaissent durant les processus de tumorigénèse et parce que certains des variants de la TPO présentant une perte fonctionnelle au niveau protéique pourraient être associés aux dysfonctionnements métaboliques de la thyroïde observés dans différents types de cancers thyroïdiens, nous avons trouvés intéressant de déterminer si le mécanisme d'épissage alternatif de la TPO était modulé dans ces divers cancers thyroïdiens différenciés.

Différents tissus issus de cancers thyroïdiens de type papillaire, de variant vésiculaire de cancer papillaire, de cancer vésiculaire plus ou moins invasif ainsi que de tissus adénomateux et issus de thyroïdes normales ont été utilisés dans ces expériences. Après extraction des ARN messagers totaux à partir de ces tissus, nous avons menés des expériences de RT-PCR, c'est à dire de transcription inverse suivie de réaction de polymérisation en chaîne des ADNc ainsi obtenus par RT, afin d'amplifier, de quantifier et d'estimer les unes par rapport aux autres, les différentes sous-populations de transcrits alternatif, TPO-1, TPO-2, TPO-3 et TPO-4, produites dans chaque type tumoral.

Les résultats sont discutés en terme d'impact de la variation des quantités des ARN messagers des divers transcrits de la TPO sur la perte des fonctions métaboliques de la thyroïde souvent associées aux cancers thyroïdiens.

# Differential expression of thyroperoxidase mRNA splice variants in human thyroid tumors

Valérie Le Fourn, Mireille Ferrand, Jean-Louis Franc\*

*INSERM U555, Faculté de Médecine, 27 Bd J. Moulin, 13385 Marseille Cedex 5, France*

*ICNE, UMR6544 CNRS-Université de la Méditerranée, IFR Jean Roche, Faculté de Médecine Secteur Nord, Bd P. Dramard, Marseille, France*

Received 29 July 2003; received in revised form 24 February 2004; accepted 2 March 2004

Available online 17 March 2004

## Abstract

The levels of human thyroperoxidase (hTPO) mRNA expression and the rates of hTPO mRNA with alternatively spliced exons 10, 14, and 16 were analyzed in normal, benign, and malignant thyroid tissues (13 normal thyroid tissues, 9 adenomas, 4 papillary carcinomas, 11 follicular variant of papillary carcinomas, 16 minimally invasive follicular carcinomas, 6 widely invasive follicular carcinomas) using a semi-quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction procedure. The level of hTPO mRNA decreased in the follicular variant of papillary carcinomas and in minimally invasive follicular carcinomas and was more heterogeneous in the other pathological tissues than in normal tissues.

Based on the mean values recorded, the splicing of exons 10 and 16 increased by at least 50% in all the carcinomas, as well as in the benign tissues in the case of exon 10. By contrast, no significant increase was observed in the splicing of exon 14 except in the case of the follicular variant of papillary carcinomas.

In conclusion, the results of this study show that the splicing of hTPO increases in benign and malignant thyroid tissues. This event might partly explain the decrease in both the quantity and the level of activity of hTPO observed in thyroid cancer due to the loss of stability of the spliced isoforms. In addition, an increase in the alternative splicing of other mRNAs may contribute to the process of malignancy. © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Thyroid; Cancer; Thyroperoxidase; mRNA splice variant

## 1. Introduction

Thyroperoxidase (TPO) is the key enzyme in thyroid hormone synthesis. The human TPO (hTPO) gene consists of 17 exons and 16 introns and spans about 150 kb. The complete coding sequence of this enzyme is known [1–3], and several single-spliced variants have been described: TPO2 with exon 10 deleted [4], TPO3 with exon 16 deleted [5], TPO4 with exon 14 deleted, and TPO5 with exon 8 deleted [6]. We have also showed the presence of multi-spliced species, TPO2/3 with exons 10 and 16 deleted, TPO2/4 with exons 10 and 14 deleted and TPO6 with exons 10, 12, 13, 14, and 16 deleted [6].

Several research groups have reported that the levels of enzymatic activity [7–9], immune reactivity [10,11], and

specific mRNAs [12–16] detected decreased or were virtually absent in differentiated thyroid carcinomas.

Variations in the splicing process are known to occur during tumor development [17]. The consequences of alternative splicing range from switching the expression of a protein on and off to the structural and functional diversification of the protein products [18].

As hTPO in normal thyroid tissues undergoes a large number of splicing events, it seemed to be worth investigating whether the hTPO mRNA splicing process is affected in differentiated thyroid carcinomas.

In the present study, we therefore investigated the total hTPO mRNA levels and the rates of expression of the various splice variants corresponding to TPO2, TPO3 and TPO4 in diverse thyroid tumors.

## 2. Materials and methods

### 2.1. RNA isolation

Frozen specimens, 13 of which consisted of normal thyroid tissue, 9 of adenomas, 4 of papillary carcinomas,

*Abbreviations:* hTPO, human thyroperoxidase

\* Corresponding author. ICNE, UMR6544 CNRS-Université de la Méditerranée, Faculté de Médecine secteur nord, Bd Pierre Dramard, 13916 Marseille cedex 20, France. Tel.: +33-4-91-69-87-15; fax: +33-4-91-69-89-20.

*E-mail address:* franc.jl@jean-roche.univ-mrs.fr (J.-L. Franc).



Table 1  
PCR primer sequences

Primer	Exon	Position	Sequence
PE9F	9	1392–1413	5'-GCAGTACGTGGGTCCCTATGAA-3'
PE11F	11	1876–1897	5'-TACAAGCATCCTGACAACATCG-3'
PE11R	11	1794–1773	5'-GCAGAACTCCCTCCACTCATTG-3'
PE12F	12	2111–2140	5'-TGCCCATGGATGCCTTCCAAGTCGGCAAAT-3'
PE13R	13	2209–2230	5'-AGCCACACTTGTCTGCTTTGAGG-3'
PE15F	15	2577–2606	5'-CGGAGGCTTCGCAGGTCTCACCTCGACGGT-3'
PE15R	15	2573–2603	5'-TCGAGGTGAGACCTGCGAAGCCTCCGATCA-3'
PE17R	17	2881–2851	5'-TTTGCTGTGTTTGGAAAAGAGTCGTACGG-3'

11 of follicular variant of papillary carcinomas, 16 of minimally invasive follicular carcinomas, and 6 of widely invasive follicular carcinomas were used in these experiments. Tissues were homogenized and prepared using the Promega kit (SV total RNA isolation system) according to the manufacturer's instructions, and the preparation was then treated with DNase. The RNA concentration was determined from the spectrophotometric absorption at 260 nm, and the RNA were aliquoted and stored in water at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further use. The absorption ratio (260/280) was between 1.7 and 2.0 with all the preparations.

## 2.2. Quantification of total TPO mRNA levels

To study the total TPO mRNA levels, RT was performed using random hexamers and PCR reaction as described in Ref. [19] with primers PE11F and PE13R. The volume of the mixture was 100  $\mu\text{l}$  and aliquots of 9  $\mu\text{l}$  were taken from the reaction mixture after different consecutive cycles and loaded onto 2% agarose gel. After staining the products with ethidium bromide, bands were detected and their intensity quantified using an Image Station 440 (Kodak). The normalized band intensities were plotted as a function of the

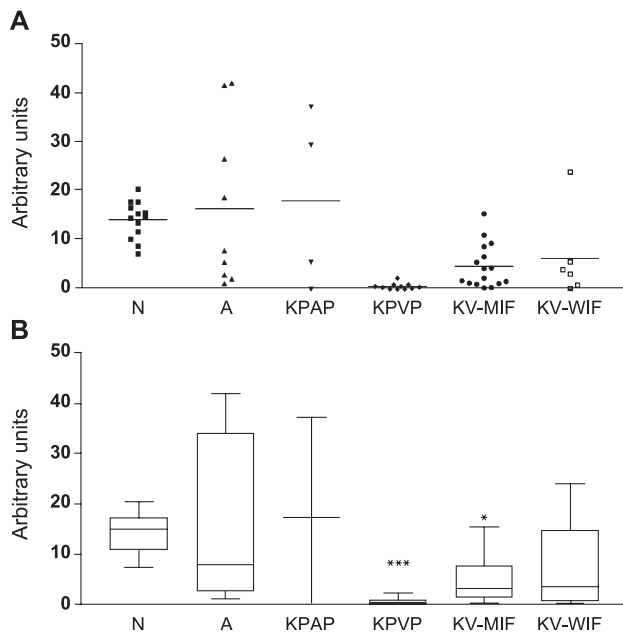


Fig. 1. Quantification of the total TPO mRNA levels recorded in each histological group. N, normal thyroid tissue; A, adenoma; KPAP, papillary carcinoma; KPVP, follicular variant of papillary carcinoma; KV-MIF, minimally invasive follicular carcinoma, and KV-WIF widely invasive follicular carcinoma. (A) scatter graph: the line represents the mean. (B) The box-and-whisker plot shows quartiles: one quarter of the values lie between the top whisker and the top of the box; one quarter lie above the median line within the box; one quarter below the median line within the box, and one quarter between the bottom of the box and the bottom whisker. The box then extends from the 25th percentile to the 75th percentile with a line at the median (the 50th percentile). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  (comparisons between normal tissues versus carcinoma tissues).

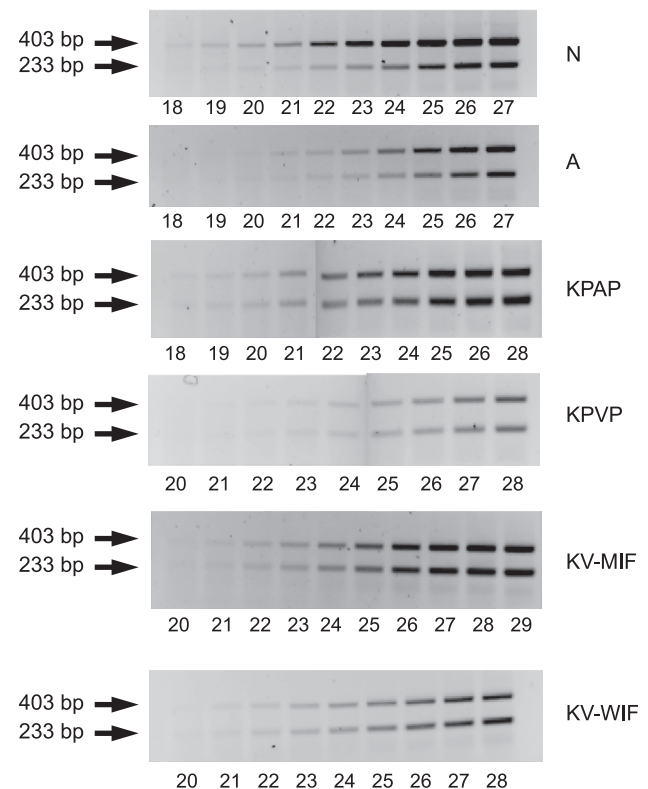


Fig. 2. Relative levels of the TPO mRNAs with exon 10 deleted. Reverse transcriptions and PCR were performed as described in the Experimental Procedures section. Aliquots of 9  $\mu\text{l}$  were taken from the reaction mixture at various cycles and analyzed with 2% gel agarose. The percentage levels of hTPO mRNA with exon 10 deleted were determined as described in Fig. 3. The results obtained showed that hTPO with exon 10 deleted amounted to 29% (N), 49% (A), 60% (KPAP), 56% (KPVP), 61% (KV-MIF), and 63% (KV-WIF).

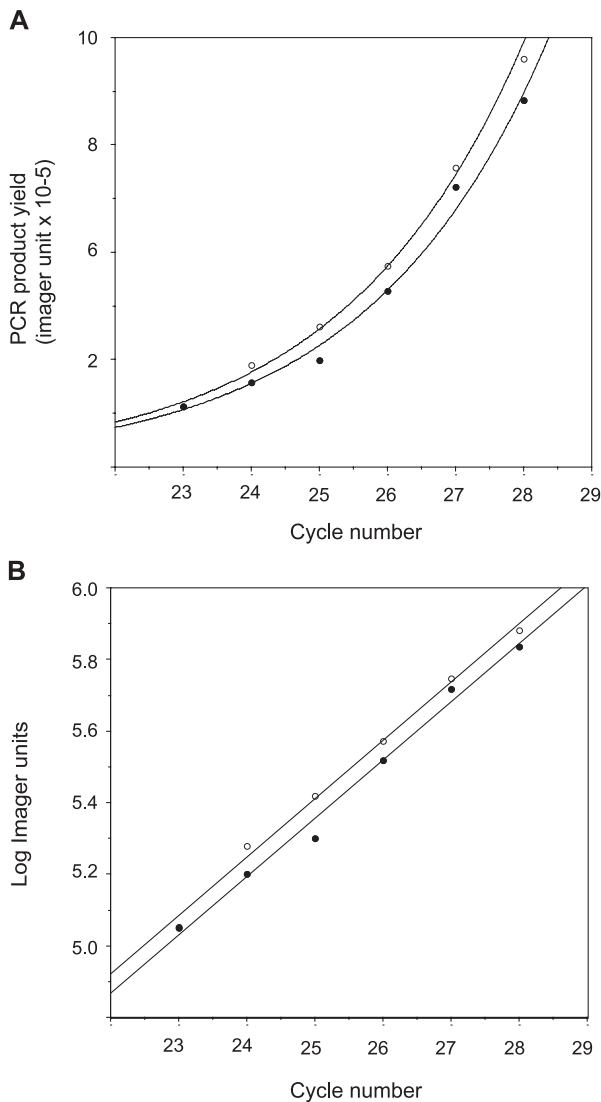


Fig. 3. Calcul of the relative abundance of hTPO mRNA with exon 10 deleted in a follicular variant of papillary carcinoma (KPVP). A, After analysis of the PCR products with 2% gel agarose (see Fig. 2) the bands were quantified; ●, hTPO with deletion of exon 10, ○, hTPO without deletion of exon 10. B, The amplification efficiency is given by the slope of the line in a semi-logarithmic plot of the product accumulation versus the number of cycles.

number of cycles. The semi-logarithmic plot of the product accumulated versus the number of cycles showed that the efficiencies of the PCRs (as given by the slopes of the lines) were the same with the different samples. Under these conditions, the relative difference between the original abundance of these different samples was taken to be  $2^n$ , where  $n$  is the difference between the number of cycles necessary to reach a threshold value. The threshold value adopted here was the value in the exponential part of the curve at which a statistically significant increase in the fluorescence was detected. The normalization of samples was carried out against total RNA in accord with recent instruction [20].

### 2.3. Quantification of the percentage levels of TPO mRNA variants

Semi-quantitative RT-PCR was therefore performed in order to measure the levels of hTPO mRNA in which exon 10, 14 or 16 was spliced out. RT was performed using random hexamers and PCR procedure was performed as follows: the reaction mixture (100  $\mu$ l) consisted of 1 unit of Taq DNA polymerase (Promega) (PE9F and PE11R) or 2 units of Fast Start Roche (0.8  $\mu$ l) (PE12F and PE15R, or PE15F and PE17R), Taq buffer, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 250  $\mu$ M dNTP, 10  $\mu$ l of GC-rich solution, 0.3  $\mu$ M oligonucleotide primers (PE9F and PE11R, PE12F and PE15R, or PE15F and PE17R). The reaction was run with the following program: 6 min at 95 °C, then 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C (PE9F and PE11R) or 30 s at 70 °C (PE12F and PE15R, or PE15F and PE17R) and 1 min at 72 °C followed by a final extension for 7 min at 72 °C. Aliquots of 9  $\mu$ l were taken from the reaction mixture at various cycles and analyzed with 2% gel agarose. The products obtained were separated on 2% agarose gel. After quantification, a correction due to the difference in product size was applied as described previously [6] (1.73 for exon 10, 1.36 for exon 14, 1.73 for exon 16). The normalized band intensities were plotted as a function of the number of

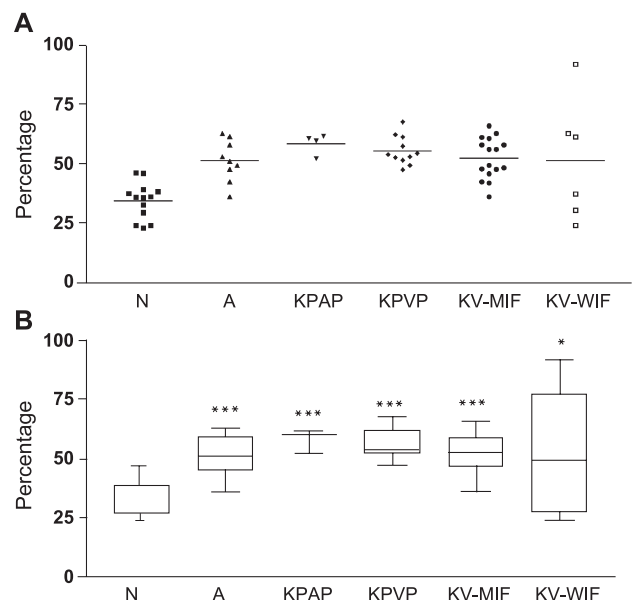


Fig. 4. Percentage levels of TPO mRNA with exon 10 deleted determined in each histological group. N, normal thyroid tissue; A, adenoma; KPAP, papillary carcinoma; KPVP, follicular variant of papillary carcinoma; KV-MIF, minimally invasive follicular carcinoma, and KV-WIF widely invasive follicular carcinoma. (A) scatter graph: the line represents the mean; (B) The box-and-whisker plot shows quartiles: one quarter of the values lie between the top whisker and the top of the box; one quarter in above the median line within the box; one quarter below the median line within the box, and one quarter between the bottom of the box and the bottom whisker. Then the box extends from the 25th percentile to the 75th percentile with a line at the median (the 50th percentile). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  (comparisons between normal tissues versus carcinoma tissues).



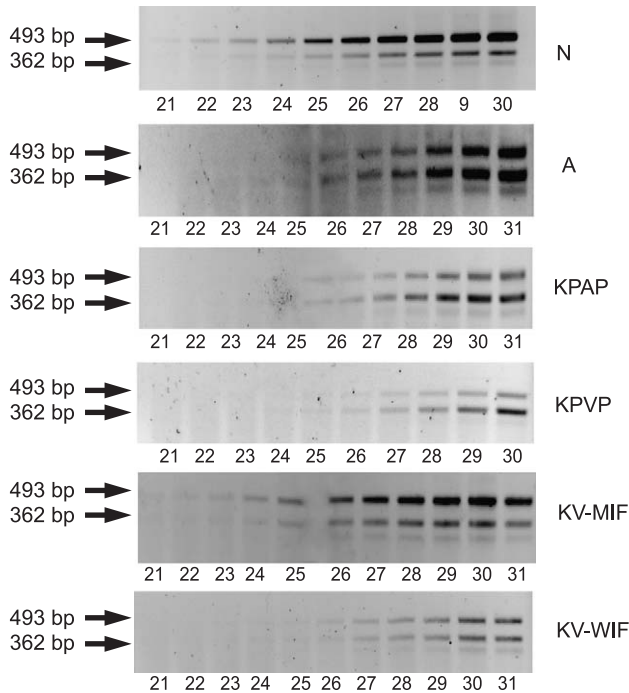


Fig. 5. Relative levels of the TPO mRNAs with exon 14 deleted. Reverse transcriptions and PCR were performed as described in the Experimental Procedures section. Aliquots of 9  $\mu$ l were taken from the reaction mixture at various cycles and analyzed with 2% gel agarose. The percentage levels of hTPO mRNA with exon 14 deleted were determined as described in Fig. 3. The results obtained showed that hTPO with exon 14 deleted amounted to 31% (N), 61% (A), 82% (KPAP), 76% (KPVP), 59% (KV-MIF), and 73% (KV-WIF).

cycles. The semi-logarithmic plot of the product accumulated versus the number of cycles showed that the efficiencies of the PCRs (as given by the slopes of the lines) were the same with both of these species. Under these conditions, the relative difference between the original abundance of these two samples was taken to be  $2^n$ , where  $n$  is the difference between the number of cycles necessary to reach a threshold value [19]. The threshold value adopted here was the value in the exponential part of the curve at which a statistically significant increase in the fluorescence was detected.

To determine whether the presence of a variant was really dependent on its initial proportion within the cDNA population, we performed PCR amplifications with various quantities of the three cloned variants, pcDNA3-TPO2, pcDNA3-TPO3, or pcDNA3-TPO4 with respect to pcDNA3-TPO1 (3/1, 1/1, 1/3). In all the cases tested, the ratio between the isoforms after their amplification corresponded to their initial proportions.

#### 2.4. Statistical analysis

The statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 3.0 for Macintosh. The rates of mRNA expression were compared using one-way ANOVA with

Dunnett's multiple post-tests (comparisons between normal tissues versus carcinoma tissues).

### 3. Results

#### 3.1. Strategy

After the reverse transcription step, the cDNA was used as a template for the PCR amplification procedure using the series of primer pairs listed in Table 1. Each pair was chosen so that a single exon was bracketed. In comparison with an mRNA from which the relevant exon has been deleted, the corresponding full-length mRNA amplifies a more slowly migrating product. After amplification, the reaction products were analyzed by migration on a 2% agarose gel.

#### 3.2. Determination of hTPO mRNA levels

In the first set of experiments, in order to quantify the total hTPO mRNA levels by RT-PCR, we chose primers present in exons 11 (PE11F) and 13 (PE13R) (Table 1) because this part of hTPO is practically never spliced out. Splicing has only been observed in TPO6, and this

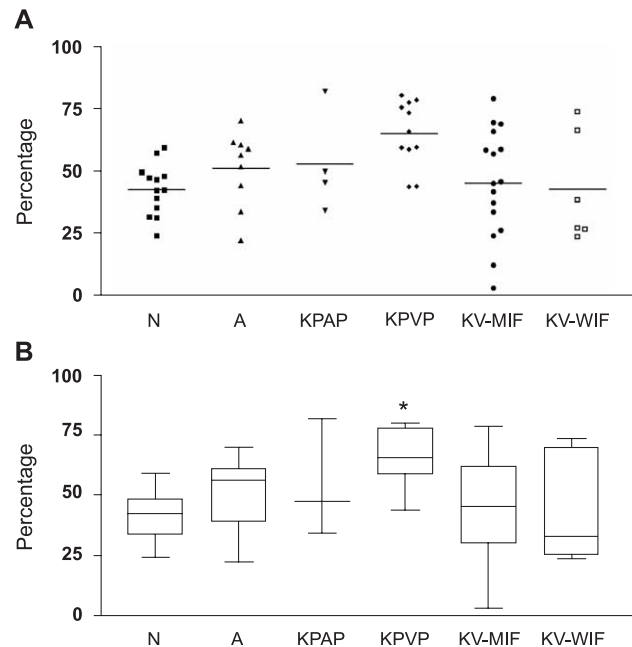


Fig. 6. Percentage levels of TPO mRNA with exon 14 deleted, as determined in each histological group. N, normal thyroid tissue; A, adenoma; KPAP, papillary carcinoma; KPVP, follicular variant of papillary carcinoma; KV-MIF, minimally invasive follicular carcinoma, and KV-WIF widely invasive follicular carcinoma. (A) scatter graph: the line represents the mean; (B) The box-and-whisker plot shows quartiles: one quarter of the values lie between the top whisker and the top of the box; one quarter in above the median line within the box; one quarter below the median line within the box, and one quarter between the bottom of the box and the bottom whisker. The box then extends from the 25th percentile to the 75th percentile with a line at the median (the 50th percentile). \*,  $p < 0.05$  (comparisons between normal tissues versus carcinoma tissues).

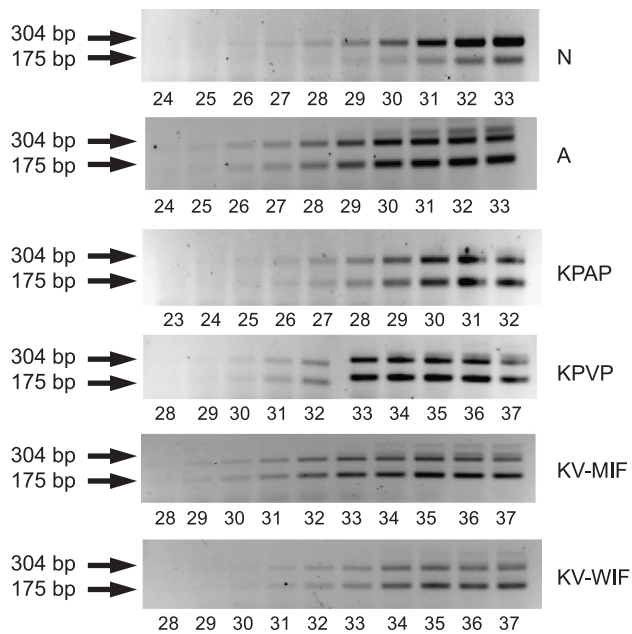


Fig. 7. Relative levels of the TPO mRNAs with exon 16 deleted. Reverse transcriptions and PCR were performed as described in the Experimental Procedures section. Aliquots of 9  $\mu$ l were taken from the reaction mixture at various cycles and analyzed with 2% gel agarose. The percentage levels of hTPO mRNA with exon 16 deleted were determined as described in Fig. 3. The results obtained showed that hTPO with exon 16 deleted amounted to 39% (N), 53% (A), 72% (KPAP), 74% (KPVP), 75% (KV-MIF), and 66% (KV-WIF).

isoform is present in very low levels [6]. The results obtained here showed that the levels were relatively homogenous between the various samples of normal thyroid tissues tested (Fig. 1). The mean rate of expression of hTPO transcripts in adenomas and papillary carcinomas was similar to that observed in the normal tissue, although the values obtained varied considerably (Fig. 1A). The level of mRNA expression was significantly lower, 7–785-fold in the case of the papillary carcinoma follicular variant and 1–45-fold in the case of minimally invasive follicular carcinomas (Fig. 1B). In five of the six widely invasive follicular carcinoma samples studied, the TPO mRNA levels were also greatly reduced.

### 3.3. Determination of the percentage rates of spliced variants with exons 10, 14, and 16 deleted

Splicing of exons 8, 10, 14 and 16 has been previously described in the literature. In our hands, it was possible to quantify the percentage splicing of exons 10, 14 and 16, but when it was attempted to quantify the spliced exon 8 using various pairs of primers, the results obtained were never satisfactory or reproducible [6]. Although it was not possible to obtain quantitative data supporting this assumption, it seems likely that this splicing level increases in the carcinoma in comparison with normal tissue (data not shown).

The primers used to study the deletion of exon 10 were located in exon 9 (PE9F) and exon 11 (PE11R) (Table 1) and led to a full size DNA of 403 bp and a smaller 233 bp DNA corresponding to the spliced variant (Fig. 2). The band intensities were then plotted as a function of a number of cycle, an example is given in Fig. 3A. The semi-logarithmic plot of the product accumulate versus the number of cycle (Fig. 3B) showed that the efficiency of PCR (as given by the slopes of the lines) were the same with the both species. Under these conditions, the relative difference between the original abundance of these two species is given by  $2^n$  where  $n$  is the difference between the number of cycle necessary to reach a threshold value. In the case presented in Fig. 3A, the accumulation of PCR products were given by the equations:  $y = 21.891 \times 10^{0.1628x}$  in the case of hTPO without deletion of exon 10 and  $y = 19.492 \times 10^{0.1626x}$  in the case of hTPO with deletion of exon 10. With a threshold value of  $2 \times 10^5$  a difference of 0.34 cycle was obtained. After a correction of 1.73 because of the difference of the product size, hTPO with exon 10 deleted amounted to 56% and hTPO with exon 10 amounted to 44%.

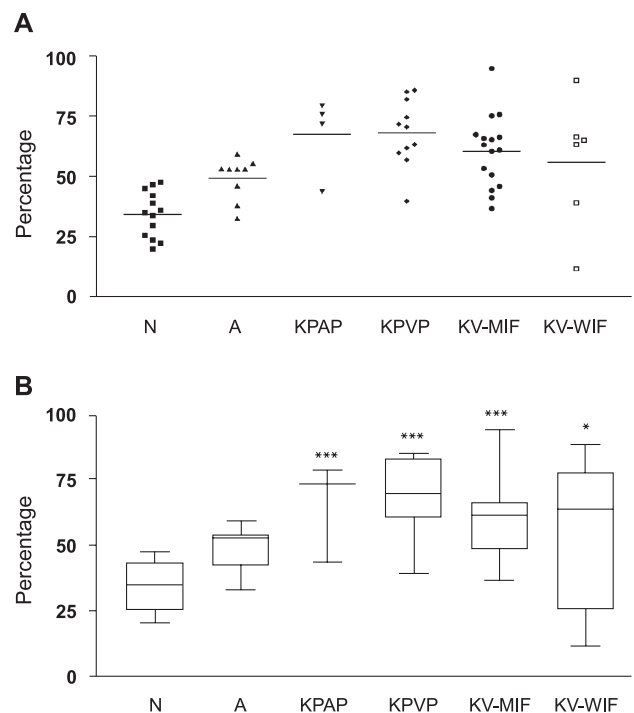


Fig. 8. Quantification of percentage rates of TPO mRNA with exon 16 deleted in each histological group. N, normal thyroid tissue; A, adenoma; KPAP, papillary carcinoma; KPVP, follicular variant of papillary carcinoma; KV-MIF, minimally invasive follicular carcinoma, and KV-WIF widely invasive follicular carcinoma. (A) scatter graph: the line represents the mean; (B) The box-and-whisker plot shows quartiles: one quarter of the values lie between the top whisker and the top of the box; one quarter above the median line within the box; one quarter below the median line within the box, and one quarter between the bottom of the box and the bottom whisker. Then the box extends from the 25th percentile to the 75th percentile with a line at the median (the 50th percentile). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  (comparisons between normal tissues versus carcinoma tissues).

In all the pathological tissues tested, the mRNA levels recorded were significantly greater in those with the exon 10 spliced out (Fig. 4). The mean difference was 50% in the adenomas, 70% in the papillary carcinomas, and 60% in the papillary carcinomas follicular variants, minimally invasive follicular carcinomas, and widely invasive follicular carcinomas. It is worth noting that greater heterogeneity was obtained in the case of KV-WIF samples.

To study the deletion of exon 14, the primers used were those located in exons 12 (PE12F) and 15 (PE15R), and this yielded 493 and 362 bp products (Fig. 5). The level of hTPO mRNA with exon 14 deleted was significantly greater only in the case of the papillary carcinoma follicular variants (Fig. 6). The percentage levels of mRNA obtained in the adenomas and the other carcinomas with exon 14 deleted were approximately the same as in normal tissue. The great variability observed in the case of minimally invasive follicular carcinomas is worth noting.

Primers located in exons 15 (PE15R) and 17 (PE17F) were used to quantify the percentage levels of hTPO mRNA with exon 16 deleted, and this yielded 304 and 175 bp products (Fig. 7).

In comparison with normal tissue, this percentage was significantly higher in all the tumors apart from the adenomas (Fig. 8). Based on the mean values obtained with the various tumors, more than 55% of the mRNA had exon 16 deleted. Here again, as with the splicing of exon 10, the heterogeneity of the results was greater in the case of KV-WIF samples.

#### 4. Discussion

In the first part of this study, we quantified hTPO mRNA in normal thyroid tissues, adenomas, and various carcinomas. The results obtained showed that in normal tissue, adenomas and papillary carcinomas, the means were similar but the levels of mRNA were heterogeneous with variations between the samples amounting to 117- and 35-fold in the case of the adenomas and papillary carcinomas versus 3-fold in that of normal tissues. With the other carcinomas, the mRNA levels were practically always lower in all the samples tested than in normal tissue, especially in the case of the follicular variant of papillary carcinomas.

Many studies have been performed previously with a view to determining the levels of expression of hTPO in differentiated thyroid carcinomas [7–16,20]. The results of all these studies except for one [21] showed that hTPO was strongly underexpressed in carcinomas. These studies were performed using Northern blotting, immunohistochemistry, ELISA, or Western blotting techniques. All the analyses of hTPO mRNA levels except for one [15] were performed using non-quantitative methods.

The splicing of some exons can affect the folding of the hTPO to a variable extent, depending of the splicing location. The splicing of exons 8 and 10 leads to the rapid

degradation of the hTPO, while splicing of exon 14 or 16 leads to a decrease in the half-life of the enzyme but does not affect its enzymatic activity or its intracellular trafficking [6,22,23]. It is possible that the 50% or more increase in the splicing of exons 10, 14, and 16 may lead to a considerable decrease in the hTPO/mRNA hTPO ratio. In this case, it is certainly possible to detect the mRNA of hTPO in carcinomas, but not the protein because of the rapid degradation it undergoes.

Concerning the alternative splicing process, a great increase was observed in the splicing of exons 10 and 16 in malignant tumors as well as in the benign tissues in the case of exon 10. As we have previously described the existence of multi-spliced transcripts, it is also possible that the increase in the splicing of the various exons may lead to an increase in the multi-spliced transcripts [6]. It was not possible here for technical reasons to quantify the rate of splicing of exon 8 corresponding to TPO5 [6]. Some of the results obtained do, however, seem to indicate that an increase in the splicing levels occurred in this exon (data not shown).

In some cases, we noted some heterogeneity in the percentage rate of splicing events in the same specific form of the disease (for example, in the rate of splicing of exon 10 and exon 16 in KV-WIF or exon 14 in KV-MIF). Differences in the percentage rate of splicing events in a specific tumor type either indicate that a change has occurred in some particular samples regardless of the tumor type, or indicate the existence of sub-populations in this specific tumor type. In both cases, the results will be heterogeneous. However, our analysis of all the results obtained showed that the hTPO splicing increased on the whole in carcinomas.

SR proteins play decisive roles in alternative splice site selection and certainly the relative levels and rates of activity of the members of this family of proteins may be one of the main regulatory factors involved in the alternative splicing mechanism [24]. It would therefore be most interesting to determine the pattern and the concentration of the various SR proteins in normal tissue and in carcinomas of various kinds. Since a large number of genes produce alternative transcripts which, when transcribed, lead to protein products with altered structures and functions, changes in these alternative splicing processes may be one of the factors contributing to the development of some forms of cancer. In some tissues, it has been established that many cancer-associated genes such as WT1 and CD44 are alternatively spliced, and alternative splicing processes may therefore be one of the causal steps responsible for the development of some types of cancer [17]. Here we observed that the alternative splicing of hTPO increased in the thyroid carcinomas tested. The extent of the increase depended on the exon. This modification will certainly lead to a decrease in the quantity of hTPO and its rate of activity in thyroid cancer. However, it is not yet clear whether the increase in the percentage rates of the spliced variants of

hTPO observed in this study resulted from the process of tumorigenesis or whether these variants were more directly involved in the actual process of thyroid tumor development. The exact role of the spliced form of hTPO in the development of thyroid tumors cannot be easily explained. First, it is difficult to understand how the splicing variant may be directly involved in the development of thyroid tumors. Recent studies have suggested that splicing alterations might be widespread in human cancer [25]. However, a decrease in the activity of hTPO leads to an iodide organification defect and to congenital goiter. In this case, it is possible that prolonged stimulation by TSH may result in the occurrence of thyroid carcinoma [26].

De Micco et al. [11,27,28] have shown the existence of a correlation between the pattern of immunohistochemical labeling obtained on hTPO with a monoclonal antibody directed against hTPO (mAb47) and the malignancy of the carcinoma. The mAb47 is directed against a linear sequence located in a region corresponding to exon 12 (Lys713–Ser723) [29]. In normal thyroid tissue, exon 12 is never spliced except in TPO6 [6]. This isoform is present in very low levels and we did not observe any increase in the alternative splicing of exon 12 in the carcinomas (data not shown). The results obtained with mAb47 were therefore certainly due to the quantitative decrease in hTPO rather than to an antigenic change in the protein. This conclusion is also supported by data published by Czarnocka et al. [10] showing that hTPO expressed in thyroid cancers displayed similar epitopes to that of hTPO from Grave's disease tissue.

In conclusion, we investigated normal thyroid tissues, adenomas and carcinomas to determine how the hTPO levels and alternative splicing rates were affected by the disease. The levels of hTPO were found to decrease in practically all the carcinomas tested as compared to the normal tissues, and the percentage rates of hTPO mRNAs showing alternative splicing increased in the carcinomas, especially in exons 10 and 16.

## Acknowledgements

We thank C. De Micco for her generous cooperation in providing us with thyroid tissues. This investigation was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (grant to J.L.F.), INSERM (U555), and CNRS and Université de la Méditerranée (UMR6544). During this work, V.L.F. was supported by the Association pour le Développement des Recherches Médicales.

## References

- [1] S. Kimura, T. Kotani, O.W. McBride, K. Umeki, K. Hirai, T. Nakayama, S. Ohtaki, Human thyroid peroxidase: complete cDNA and protein sequence, chromosome mapping, and identification of two alternatively spliced mRNAs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 (1987) 5555–5559.
- [2] F. Libert, J. Ruel, M. Ludgate, S. Swillens, N. Alexander, G. Vassart, C. Dinsart, Complete nucleotide sequence of the human thyroperoxidase-microsomal antigen cDNA, *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 6735.
- [3] R.P. Magnusson, G.D. Chazenbalk, J. Gestautas, P. Seto, S. Filetti, L.J. DeGroot, B. Rapoport, Molecular cloning of the complementary deoxyribonucleic acid for human thyroid peroxidase, *Mol. Endocrinol.* 1 (1987) 856–861.
- [4] R. Elisei, G. Vassart, M. Ludgate, Demonstration of the existence of the alternatively spliced form of thyroid peroxidase in normal thyroid, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 72 (1991) 700–702.
- [5] E. Zanelli, M. Henry, B. Charvet, Y. Malthiery, Evidence for an alternate splicing in the thyroperoxidase messenger from patients with Graves' disease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170 (1990) 735–741.
- [6] M. Ferrand, V. Le Fourn, J.L. Franc, Increasing diversity of human thyroperoxidase generated by alternative splicing. Characterized by molecular cloning of new transcripts with single- and multispliced mRNAs, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 3793–3800.
- [7] P. Fragu, B.M. Nataf, Human thyroid peroxidase activity in benign and malign thyroid disorders, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 45 (1977) 1089–1096.
- [8] L.J. Valenta, Thyroid peroxidase, thyroglobulin, cAMP and DNA in human thyroid, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 43 (1976) 466–469.
- [9] L.J. Valenta, V. Valenta, C.A. Wang, A.L. Vickery Jr., J. Caulfield, F. Maloof, Subcellular distribution of peroxidase activity in human thyroid tissue, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 37 (1973) 560–569.
- [10] B. Czarnocka, D. Pastuszko, M. Janota-Bzowski, A.P. Weetman, P.F. Watson, E.H. Kemp, R.S. McIntosh, M.S. Asghar, B. Jarzab, E. Wloch, J. Wloch, D. Lange, Is there loss or qualitative changes in the expression of thyroid peroxidase protein in thyroid epithelial cancer? *Br. J. Cancer* 85 (2001) 875–880.
- [11] C. De Micco, J. Ruf, M.A. Chrestian, N. Gros, J.F. Henry, P. Carayon, Immunohistochemical study of thyroid peroxidase in normal, hyperplastic, and neoplastic human thyroid tissues, *Cancer* 67 (1991) 3036–3041.
- [12] D. Fabbro, C. Di Loreto, C.A. Beltrami, A. Belfiore, R. Di Lauro, G. Damante, Expression of thyroid-specific transcription factors TTF-1 and PAX-8 in human thyroid neoplasms, *Cancer Res.* 54 (1994) 4744–4749.
- [13] C. Hoang-Vu, H. Dralle, G. Scheumann, C. Maenhaut, R. Horn, A. von zur Muhlen, G. Brabant, Gene expression of differentiation- and dedifferentiation markers in normal and malignant human thyroid tissues, *Exp. Clin. Endocrinol.* 100 (1992) 51–56.
- [14] Y. Huang, M. Prasad, W.J. Lemon, H. Hampel, F.A. Wright, K. Kornacker, V. Li Volsi, W. Frankel, R.T. Kloos, C. Eng, N.S. Pellegata, A. de la Chapelle, Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 15044–15049.
- [15] V. Lazar, J.M. Bidart, B. Caillou, C. Mahe, L. Lacroix, S. Filetti, M. Schlumberger, Expression of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene in human thyroid tumors: a comparison study with other thyroid-specific genes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* Vol 84 (Iss 9) (1999) 3228–3234.
- [16] K. Umeki, T. Tanaka, I. Yamamoto, Y. Aratake, T. Kotani, F. Sakamoto, S. Noguchi, S. Ohtaki, Differential expression of dipeptidyl peptidase IV (CD26) and thyroid peroxidase in neoplastic thyroid tissues, *Endocr. J.* 43 (1996) 53–60.
- [17] O.L. Caballero, S.J. de Souza, R.R. Brentani, A.J. Simpson, Alternative spliced transcripts as cancer markers, *Dis. Markers* 17 (2001) 67–75.
- [18] B.R. Graveley, Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world, *Trends. Genet.* 17 (2001) 100–107.
- [19] W.E. Spencer, M.J. Christensen, Multiplex relative RT-PCR method for verification of differential gene expression, *BioTechniques* 27 (1999) 1044–1046.
- [20] S.A. Bustin, Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems, *J. Mol. Endocrinol.* 29 (2002) 23–39.



- [21] K. Ohta, T. Endo, T. Onaya, The mRNA levels of thyrotropin receptor, thyroglobulin and thyroid peroxidase in neoplastic human thyroid tissues, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174 (1991) 1148–1153.
- [22] P. Niccoli, L. Fayadat, V. Panneels, J. Lanet, J.L. Franc, Human thyroperoxidase in its alternatively spliced form (TPO2) is enzymatically inactive and exhibits changes in intracellular processing and trafficking, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 29487–29492.
- [23] P. Niccoli-Sire, L. Fayadat, S. Siffroi-Fernandez, Y. Malthierry, J.L. Franc, Alternatively spliced form of human thyroperoxidase, tpozanelli: activity, intracellular trafficking, and role in hormonogenesis, *Biochemistry* 40 (2001) 2572–2579.
- [24] M.L. Hastings, A.R. Krainer, Pre-mRNA splicing in the new millennium, *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 (2001) 302–309.
- [25] Q. Xu, C. Lee, Discovery of novel splice forms and functional analysis of cancer-specific alternative splicing in human expressed sequences, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 5635–5643.
- [26] G. Medeiros-Neto, M.J. Gil-Da-Costa, C.L. Santos, A.M. Medina, J.C. Silva, R.M. Tsou, M. Sobrinho-Simoes, Metastatic thyroid carcinoma arising from congenital goiter due to mutation in the thyroperoxidase gene, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (1998) 4162–4166.
- [27] C. De Micco, V. Vasko, S. Garcia, P. Zoro, A. Denizot, J.F. Henry, Fine-needle aspiration of thyroid follicular neoplasm: diagnostic use of thyroid peroxidase immunocytochemistry with monoclonal antibody 47, *Surgery* 116 (1994) 1031–1035.
- [28] S. Garcia, V. Vassko, J.F. Henry, C. De Micco, Comparison of thyroid peroxidase expression with cellular proliferation in thyroid follicular tumors, *Thyroid* 8 (1998) 745–749.
- [29] G.D. Chazenbalk, G. Costante, S. Portolano, S.M. McLachlan, B. Rapoport, The immunodominant region on human thyroid peroxidase recognized by autoantibodies does not contain the monoclonal antibody 47/c21 linear epitope, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77 (1993) 1715–1718.

## **ARTICLE (II)**

### ***conclusion***

De manière générale, les résultats de ce deuxième article, montrent une diminution significative de la quantité totale des messagers de la TPO dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains. Ce phénomène est accentué dans les cas des variants folliculaires des cancers papillaires ainsi que pour les cancers folliculaires. Ceci suggère une dérégulation négative de l'expression de la TPO au niveau transcriptionnel.

Au niveau post-transcriptionnel, on note également des dérégulations dans les tissus tumoraux en comparaison avec les tissus adénomateux et sains. De manière générale, il apparaît que les évènements conduisant à l'épissage alternatif de certains exons soient accentués. Ainsi, la quantité de variants délétés de l'exon 10 et de ceux délétés de l'exon 16 augmente fortement dans les cancers papillaires et les variants folliculaires de ces derniers et à un moindre niveau dans les cancers folliculaires toujours de manière indépendante de leur caractère invasif. L'augmentation des populations dépourvues de l'exon 14 est beaucoup moins significative sauf pour les variants folliculaires des cancers papillaires.

Ces évènements au niveau post-transcriptionnel pourraient se répercuter au niveau protéique par la diminution de la synthèse de TPO, associée à une augmentation de la proportion des formes plus instables comme la TPO-2 et TPO-4 délétées de l'exon 10 et 14 respectivement et donc à une perte de l'activité enzymatique catalysant la biosynthèse des hormones thyroïdiennes, observée chez les patients atteints de tumeurs thyroïdiennes.

## ARTICLE (III)

### *introduction*

Après sa synthèse, la TPO subit de nombreuses modifications post-traductionnelles comme la plupart des protéines membranaires synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique. Ainsi il a été précédemment démontré que la TPO, purifiée à partir de tissus thyroïdiens ou extraite de lignées cellulaires transfectées avec l'ADNc de la protéine, porte des motifs glycaniques en majorité de type oligomannosylé ainsi que des motifs de type complexe. Il a également été montré que la TPO fixe un groupement prosthétique au niveau de son site catalytique, indispensable à l'activité enzymatique de la protéine. Les travaux réalisés par la suite, ont démontré que ces modifications sont nécessaires au processus de maturation correcte et à l'expression de la TPO active au niveau de la membrane plasmique, son lieu d'action physiologique (Fayadat et coll, 1999 et 2000).

Dans ces études précédentes, nous avons utilisé pour modèle d'étude, des cellules CHO transfectées avec l'ADN complémentaire de la TPO entière (TPO-1) de 933 résidus d'acides aminés. Après déglycosylation par la PNGase-F et réduction, on remarque que la TPO exprimée et extraite de ces cellules présente un profil électrophorétique complexe, mettant en évidence l'existence de multiples populations de TPO.

L'étude réalisée dans ce troisième article propose d'élucider les raisons de ce profil d'expression protéique et de mieux comprendre le processus de maturation de la protéine.

Nous avons tout d'abord envisagé que la PNGase F n'avait qu'une action incomplète sur les motifs glycosylés de la TPO et que les différentes populations observées étaient des molécules de TPO partiellement déglycosylées. Cependant l'utilisation d'un inhibiteur de la glycosylation, la tunicamycine, nous a permis d'écarter cette hypothèse et de mettre en évidence l'existence de clivages endoprotéolytiques de la TPO.

Par la suite l'utilisation de TPO délétée de la séquence codant pour la partie intra-cytoplasmique C-terminale de la protéine a confirmé l'existence de clivages dans la partie amino-terminale de la protéine et donc de modifications post-traductionnelles supplémentaires de la TPO.

La suite du travail a été consacrée d'une part à la caractérisation des séquences de la TPO mises en jeu ainsi que des endoprotéases impliquées dans ces clivages et d'autre part à établir le rôle de ces derniers dans le processus de maturation et de trafic intracellulaire de la thyroperoxydase.

Pour répondre aux deux premières questions, nous avons testé l'impact de divers inhibiteurs de protéases ainsi que de substances jouant sur l'intégrité des compartiments de la voie de sécrétion sur l'occurrence des clivages de la TPO. Nous avons également tenté de répondre à ces interrogations en étudiant le(s) clivage(s) endoprotéolytique(s) de la TPO extraite et purifiée à partir de thyroïde humaine. Pour ce faire, le TPO extraite a été purifiée sur une colonne de Sepharose portant les anticorps 15 (mAb15), reconnaissant spécifiquement les molécules partiellement ou correctement repliées. Après électrophorèse dénaturante, nous avons réalisé le séquençage N-terminal des différentes bandes de TPO obtenues afin de déterminer l'extrémité amino-terminale de chaque population de TPO et de définir les séquences susceptibles d'intervenir dans la reconnaissance par des endoprotéases.

A partir des résultats obtenus, nous avons pu définir la séquence d'une région propeptidique de la thyroperoxydase humaine.

Pour déterminer le rôle de cette proséquence dans la biosynthèse de la TPO, nous avons alors engagé des expériences de mutagenèse dirigée pour déléter l'ADNc de la TPO-1 de cette région peptidique. C'est dans le modèle cellulaire des CHO, qu'après transfection transitoire des mutants, nous avons menés des expériences de marquage métabolique en « pulse-chase ». Le suivi du repliement de la TPO néosynthétisée et marquée, se fait après extraction des protéines grâce à une étape d'immunoprécipitation de la TPO à l'aide des anticorps 15 et d'anticorps reconnaissant un épitope linéaire spécifique des formes néosynthétisées de la protéine, les mAb47.

Nous avons donc pu estimer le taux d'expression et de dégradation des mutants dépourvus de la proséquence, ainsi que leur expression en surface et leur activité enzymatique par rapport à la TPO native.

Les résultats nous ont permis d'une part de compléter les données sur les modifications post-traductionnelles subies par la TPO et d'autre part d'envisager le rôle de la proséquence dans le mécanisme de repliement de la protéine.



# Endoproteolytic Cleavage of Human Thyroperoxidase

## ROLE OF THE PROPEPTIDE IN THE PROTEIN FOLDING PROCESS\*

Received for publication, July 16, 2004, and in revised form, November 29, 2004  
Published, JBC Papers in Press, December 7, 2004, DOI 10.1074/jbc.M408042200

Valérie Le Fourn‡, Mireille Ferrand, and Jean-Louis Franc§

From the Laboratoire de Recherche Interactions Cellulaires Neuroendocriniennes, Unité Mixte de Recherche 6544, CNRS-Université de la Méditerranée, Faculté de Médecine, Institut Fédératif de Recherche Jean-Roche, 13916 Marseille, France and U555 INSERM, Faculté de Médecine, 13385 Marseille, France

Human thyroperoxidase (hTPO), the key enzyme involved in thyroid hormone synthesis, is synthesized in the form of a 933-amino acid polypeptide that subsequently undergoes posttranslational modifications such as *N*- and *O*-glycosylation and heme fixation. In the present study, it was established that the N-terminal part of hTPO is cleaved during the maturation of the enzyme. In the first set of experiments performed in this study, Chinese hamster ovary (CHO) cells transfected with hTPO cDNA generated four different species after deglycosylation, namely a 98-kDa species, which corresponds to the full-length deglycosylated hTPO, and two 94-kDa and one 92-kDa species, which were truncated in the N-terminal parts. The three latter forms were detected only at the cell surface. A proprotein convertase inhibitor prevented these cleavages, and experiments using monensin and brefeldin A showed that they occurred in a post-endoplasmic reticulum compartment. Site-directed mutagenesis studies were performed in which Arg<sup>65</sup> was identified as one of the cleavage sites. In the second part of the study, hTPO from human thyroid glands was purified using a monoclonal antibody recognizing the folded form of hTPO. Amino acid determination showed that the N-terminal part of this protein begins at Thr<sup>109</sup>. This cleavage process differs from that observed in CHO cells. The fact that this hTPO was endoglucosaminidase H-sensitive indicated that the cleavage of the propeptide occurs in the endoplasmic reticulum. To analyze the role of the hTPO prosequence, cDNAs with and without prosequence (Cys<sup>15</sup>-Lys<sup>108</sup>) were transfected into CHO cells. hTPO propeptide deletion drastically decreased the proportion of the folded hTPO form, and under these conditions the cell surface activity disappeared completely. These results strongly suggest that the prosequence plays a crucial role as an intramolecular chaperone, facilitating the folding of hTPO.

thyroglobulin and the coupling of some of the iodotyrosyl residues required for the formation of thyroid hormones. The full-length 3048-bp transcript of human TPO (hTPO) codes for a protein consisting of 933 amino acids. Several other transcripts in which various exons are spliced out have been described (1–3). Human TPO is a type I membrane-bound glycoprotein containing a heme prosthetic group (for a review, see Refs. 4 and 5). The large extracytoplasmic domain, which is oriented toward the follicular lumen, contains the catalytic site and four potential *N*-glycosylation sites. Although TPO catalyzes the process of hormonosynthesis at the apical cell surface of the thyrocyte, only a small fraction of this enzyme is to be found at this location, and most of it is located in the endoplasmic reticulum (ER) (6). After transfecting the full hTPO cDNA into CHO cells, a similar pattern of distribution between ER and the cell surface was obtained (7), and only 15–20% of the hTPO molecules were able to acquire at least a partially folded form (they were recognized by the monoclonal antibody (mAb) 15), whereas the unfolded molecules were degraded by the proteasome, and only a small proportion of the forms recognized by mAb15 were able to reach the cell surface (7, 8). In previous studies, we also reported that interactions between hTPO and the molecular chaperones calnexin and calreticulin are of crucial importance to the folding of hTPO (9) and that the insertion of heme is essential for the hTPO to be able to reach the ER (10). In the present study, it was established that hTPO undergoes another posttranslational modification, the cleavage of a propeptide by an endoprotease.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials**—Tissue culture dishes were obtained from BD Biosciences, and Ham's F-12 nutrient mixture was from Invitrogen. Fetal bovine serum was supplied by HyClone (Perbio, France). Eagle's minimum essential medium, glutamine, protease inhibitor mixture, acrylamide/bis-acrylamide 30% solution, TEMED, ammonium persulfate, SDS, Triton X-100, and DOC were purchased from Sigma. Lipofectamine reagent was obtained from Invitrogen, and protein A-Sepharose 4B conjugate came from Zymed Laboratories Inc. EZ-Link™ sulfo-NHS-SS-biotin and ImmunoPure® immobilized avidin gel were purchased from Pierce. NEG-772 Easytag™ express protein labeling mix (<sup>35</sup>S]Met/Cys) was obtained from PerkinElmer Life Sciences. Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase H (Endo H) and peptide:*N*-glycanase F (PNGase F) were purchased from Roche Diagnostics. CNBr-activated Sepharose 4B was supplied by Amersham Biosciences. PfuTurbo DNA

Thyroperoxidase (TPO)<sup>1</sup> is the main enzyme involved in thyroid hormone synthesis; it catalyzes both the iodination of

\* This work was supported in part by CNRS, Université de la Méditerranée (UMR6544), INSERM (U555), and the Ligue Nationale contre le Cancer (to J.-L.F.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ Supported during this work by the Association pour le Développement des Recherches Médicales and by the Fondation pour la Recherche Médicale

§ To whom correspondence should be addressed: ICNE, UMR 6544 CNRS-Université de la Méditerranée, Faculté de Médecine, Bd P. Dramard, 13916 Marseille Cedex 20, France. Tel.: 33-4-91-69-8715; Fax: 33-4-91-69-8920; E-mail: franc.jl@jean-roche.univ-mrs.fr.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: TPO, thyroperoxidase; BFA, brefeldin

A; CHO, Chinese hamster ovary; CMK, decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chloromethyl ketone; DOC, sodium deoxycholate; Endo H, β-endo-*N*-acetylglucosaminidase H; ER, endoplasmic reticulum; HA, hemagglutinin; hTPO, human thyroperoxidase; mAb, monoclonal antibody; NHS-SS-biotin, sulfosuccinimidyl 2-(biotinamido)ethyl-1,3-dithiopropionate; PBS, phosphate-buffered saline buffer; PNGase F, peptide:*N*-glycanase F; PPC, proprotein convertase; pro-hTPO, prosequence of hTPO; Δpro-hTPO, hTPO lacking the prosequence; TEMED, *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine; WCT-hTPO, hTPO without a cytoplasmic tail.

polymerase and buffer were obtained from Stratagene Europe, and dNTP mix came from Invitrogen. Pure plasmid DNA preparations were obtained with GenElute endotoxin-free plasmid midi prep kit from Sigma. Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chloromethyl ketone (CMK) was obtained from Bachem (Weil am Rhein, Germany). hTPO cDNA was a gift from B. Rapoport (Cedars-Sinai Research Institute, Los Angeles, CA) (11). CHO RPE.40 cells were a gift from J. F. Susic (University of Michigan, Flint, MI).

**Cell Culture and Transfection Procedure**—CHO cells and stably transfected hTPO-CHO cells were kept in Ham's-F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin, and streptomycin in a humidified incubator (5% CO<sub>2</sub>).

Transfection of hTPO cDNA was carried out by using the Lipofectamine reagent protocol (Invitrogen). CHO cells in 35-mm dishes were transfected with 1 µg of pcDNA3-hTPO construct for 3 h in serum-free culture medium. The transfection medium was replaced by complete medium, and cells were grown 48 h before use.

**Metabolic Labeling and Extraction**—For metabolic labeling, confluent cells incubated in culture cell medium supplemented with 10 mM sodium butyrate were incubated 24 h with 100 µCi/ml [<sup>35</sup>S]Met/Cys. At the end of the labeling process, cells were washed four times with 2 ml of ice-cold PBS and subjected to either protein extraction or the biotinylation technique (see above).

For pulse-chase experiments, cells were pre-incubated for 2 h in Met- and Cys-free Eagle's minimum essential medium supplemented with 10% dialyzed fetal bovine serum and 10 mM sodium butyrate and then labeled for 30 min with 100 µCi/ml [<sup>35</sup>S]Met/Cys. After the pulse step, cells were washed four times with 1 ml of PBS and chased by adding 1 ml of culture medium supplemented with 5 mM Met/Cys. At the chase times indicated, cells were washed twice with 2 ml of ice-cold PBS.

For protein extraction, cells were scraped into 600 µl of TPO extraction buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 1% Triton X-100, 0.3% DOC, protease inhibitor mixture, and 20 mM *N*-ethylmaleimide) and incubated on ice for 20 min. Samples were then centrifuged for 3 min at 10,000 × *g*, and the supernatants were kept for later use.

**Immunoprecipitation and SDS-PAGE**—The immunoprecipitation step was performed using two antibodies directed against TPO, mAb47, and mAb15 (12), which were previously complexed with protein A-Sepharose by incubating them overnight at 4 °C. As described above, mAb47 immunoprecipitated the unfolded hTPO forms, and mAb15 immunoprecipitated both the partially and completely folded hTPO forms (8). The radiolabeled supernatants obtained after the extraction process were incubated for 3 h with immune complexes. After being briefly centrifuged, the immune complexes were washed four times with TPO extraction buffer and once with PBS. The precipitated TPO was separated from the immune complexes by boiling them for 5 min in 62.5 mM Tris, pH 6.8, containing 2% SDS, 1% β-mercaptoethanol, 5% glycerol, and 10% bromophenol blue. The samples were run on 7.5% acrylamide gels and examined by autoradiography with a phosphorimaging system (Fujix BAS 1000, Japan).

**Cell Surface Biotinylation**—hTPO-CHO cells metabolically labeled for 24 h with 100 µCi/ml [<sup>35</sup>S]Met/Cys were incubated twice for 20 min each time at 4 °C in ice-cold PBS containing 0.5 mg/ml Immopure NHS-SS-Biotin (Pierce). Biotin reagent was then quenched by incubating the preparation with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in ice-cold PBS for 10 min. Cells were scraped into the extraction buffer, and hTPO was immunoprecipitated as described above. The hTPO recovered after a 3-min centrifugation at 10,000 × *g* was diluted in 250 µl of extraction buffer. Cell surface hTPO was separated from the intracellular pool by performing a 2-h incubation with avidin-agarose beads. The supernatant (intracellular hTPO) was stored for further use, and the pellet (cell surface hTPO) was washed four times with the extraction buffer without any *N*-ethylmaleimide. Cell surface hTPO was then eluted from the avidin-agarose beads by boiling them for 5 min in 5 µl of 2% SDS and 1% β-mercaptoethanol diluted in 100 µl of Laemmli buffer. Supernatants corresponding to the cell surface fraction and the intracellular fraction were then analyzed by SDS-PAGE.

**Digestion with Endo H and PNGase F**—Purified hTPO or immunoprecipitated hTPO were denatured by boiling them for 5 min in 0.1% SDS, 2% β-mercaptoethanol, and 0.1% DOC or 1% SDS and 2% β-mercaptoethanol, respectively. Samples were then diluted with glycosidase buffer (50 mM sodium acetate, pH 5, and 1% Triton X-100 for Endo H and 50 mM Tris/HCl, pH 8, and 1% Triton X-100 for PNGase F) and incubated for 16 h with 1 unit of PNGase F or 5 milliunits of Endo H at 37 °C. The samples were then prepared for analysis by SDS-PAGE.

**Site-directed Mutagenesis**—Mutagenesis of potential furin cleavage sites was performed using a QuikChange™ site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and a pcDNA3 plasmid containing the full-length

human wild type hTPO (hTPO-pcDNA3) as a template. The mutagenic primers used for the point mutations R48A, R65A, and R103A were 5'-CTTGAGGAAAGCAAGGCCCTGGTGGACACCCGCATG-3'/5'-CATGGCGGTGTCCACCAGGGCCCTGCTTTCTCCAAG-3', 5'-CAGA-GAAACCTAAGAAAGCAGGAATCCTTTCTCCAGC-3'/5'-GCTGGA-GAAAGGATTCTGCTTTCTTGAGGTTTCTCTG-3', and 5'-GGAAAC-ATCAATACAAGCGATGAAAGCAAAGTCAACCTGAAAATC-3'/5'-GAGTTTTCAGGTTGACTTTTGCTTTTCATCGCTTGATTGA TGTTT-CC-3', respectively. Mutagenesis was confirmed by sequencing (Genome Express SA, France).

**Construction of the cDNA of hTPO Lacking the Cytoplasmic Tail (WCT-hTPO) and the Prosequence (Δpro-hTPO) and Construction of the cDNA of the Prosequence of hTPO (pro-hTPO)**—All of these constructs were prepared using a single PCR procedure (13, 14). The PCR mixture contained 160 ng of each primer, 50 ng of the hTPO-pcDNA3, 200 µM dNTPs, 10% (v/v) dimethyl sulfoxide, 2.5 units of PfuTurbo DNA polymerase (Stratagene), and the corresponding buffer in a total volume of 50 µl. The reaction was performed under the following conditions: denaturation at 95 °C for 30 s followed by 17 denaturation cycles at 95 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 1 min, and an extension at 68 °C for 17 min. PCR products were incubated with 10 units of DpnI for 2 h, and 5 µl of this solution was then transformed into 50 µl of MAX Efficiency DH5 (Invitrogen). Parts of this transformant were spread onto Luria-Bertani agar plates.

The mutagenic primers used for the deletion of the C-terminal part of the hTPO were 5'-GGTGATTTGAGGTGAACACGCACTGGCACTAA-ATCCACTG-3'/5'-GGATTTAGTGCCAGTGCCTGTTTACCTGCAA-ATCACCGTCGAG-3'. These primers introduced a stop codon (in boldface) just after the hTPO transmembrane domain. The hTPO expressed was then deleted from the Trp<sup>873</sup>-Leu<sup>933</sup> cytoplasmic tail sequence.

The mutagenic primers used for prosequence deletion were 5'-TCT-GTCACGCTGGTTATGGCC<sup>126A</sup>409CTCAACAATCACAGCATCCAAC-3'/5'-TCTGTACGCTGGTTATGGCCACTCAACAATCACAGCATC-CACAGC-3'. The underlined nucleotides indicate the end of the signal peptide (position 126), and the bold nucleotides represent the hTPO sequence just after the prosequence (position 409).

The prosequence of hTPO, extending from nucleotide 127 to nucleotide 408, was amplified from the hTPO-pcDNA3 template by performing PCR with 77 oligonucleotide pairs (5'-GAAAAGAAAAGTC-AACCTGAAA<sup>408</sup>TACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTAGA-<sup>409</sup>CTCAACAATCACAGCATCCAACGG-3'/5'-CCGTTGGATGCTGTG-TTGTGTGAGTCTAGGCGTAGTGGGACGTCGTGAGGGGTATT-TCAGGTTGACTTTTCTTTTC-3') inserting the HA epitope sequence YPYDVPDYA (in boldface) just after the propeptide sequence, followed by a stop codon. Underlined sequences correspond to the native hTPO sequence between Lys<sup>102</sup>-Lys<sup>108</sup> and Thr<sup>109</sup>-Thr<sup>116</sup>. Mutagenesis was confirmed by sequencing (Genome Express SA).

**Purification and N-terminal Sequencing of Native hTPO**—Native hTPO was purified from human thyroid tissue as described previously (15). Briefly, microsomes obtained from tissue were incubated overnight in solubilization buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.8, 0.1 mM potassium iodide, and 0.3% DOC). After 105,000 × *g* centrifugation at 4 °C for 1 h, the supernatant was recovered and dialyzed against 10 mM Tris/HCl, pH 7.8, and 0.1 mM potassium iodide. Human TPO was then purified on a mAb15-Sepharose 4B column. After washing with 10 mM Tris/HCl, pH 7.8, 0.1 mM potassium iodide, 0.1% DOC, and 0.5 M KCl, hTPO was eluted with 0.1 mM NH<sub>4</sub>OH, 0.5% DOC, 1 M KCl, and 0.1 mM potassium iodide. Each fraction was tested for peroxidase activity (by guaiacol assay), and the most active fractions were pooled. This pool was extensively dialyzed against 0.1 M sodium phosphate, pH 7.4, and 0.05% DOC buffer and stored at -80 °C until use.

After deglycosylation with Endo H and reduction, 35 µg of native hTPO was resolved by electrophoresis on a 7.5% SDS-polyacrylamide gel. Western blotting was then performed using Problott polyvinylidene difluoride membrane (Applied Biosystems) in Tris borate buffer followed by Amido Black staining. Protein bands of interest were then excised and sequenced by the Protein Microsequencing Laboratory at the Pasteur Institute.

**hTPO Enzymatic Activity**—Forty-eight hours before assaying hTPO enzymatic activity, hTPO-CHO cells were incubated with 10 mM sodium butyrate with or without 50 µM CMK. The medium was then removed, and cells were washed twice with ice-cold PBS buffer. The incubation mixture contained bovine serum albumin (5 mg/ml in PBS) and Na<sup>125</sup>I (10<sup>6</sup> cpm/ml) in the absence or presence of 2 mM mercapto-1-imidazole for the negative control experiments. The reaction was initiated by adding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to obtain a final concentration of 0.5 mM. Cells were incubated for 20 min at room temperature. The medium was then transferred to ice-cold tubes, and the cell surface was washed once with

0.5 ml PBS. Then 1 ml of ice-cold 20% (w/v) trichloroacetic acid, supplemented with  $10^{-4}$  M potassium iodide, was added to each tube. After 20 min at 4 °C, the suspension was centrifuged ( $2000 \times g$  for 6 min). The supernatant was discarded, and the acid insoluble iodinated material obtained was washed three times with 2 ml of 10% trichloroacetic acid. The radioactivity remaining in the pellet was counted.

#### RESULTS

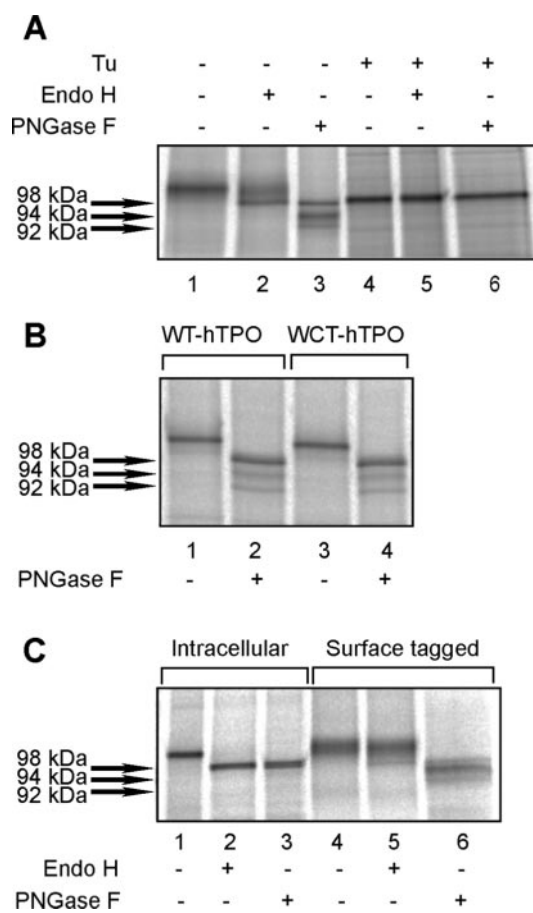
**Evidence for Endoproteolytic Cleavage of hTPO**—In a previous study using stably hTPO-expressing CHO cells metabolically labeled with [ $^{35}$ S]Met/Cys, we reported that the  $^{35}$ S-hTPO gave a single band on SDS-PAGE and, after deglycosylation with PNGase F, yielded three distinct bands (7). We assumed that this was due to an incomplete action of glycanase. At the beginning of the present study, we reassessed this hypothesis by carrying out the following experiments.

After performing metabolic labeling for 24 h with [ $^{35}$ S]Met/Cys, hTPO was immunoprecipitated using the pair of mAbs, mAb15 and mAb47. Under these conditions, as described previously (8), >90% of the hTPO was immunoprecipitated. The samples were then deglycosylated by Endo H or PNGase F (Fig. 1A). As reported previously by our group,  $^{35}$ S-hTPO run on SDS-PAGE gave a specific band of 110 kDa (Fig. 1A, lane 1). After Endo H digestion a supplementary 98-kDa band appeared (Fig. 1A, lane 2), and after PNGase F digestion the hTPO showed up on an SDS-polyacrylamide gel as 98-, 94-, and 92-kDa bands (Fig. 1A, lane 3). The 94-kDa band is actually composed of two distinct bands with very similar molecular masses.

To induce the expression of completely unglycosylated control hTPO samples, hTPO-CHO cells were treated with tunicamycin, an antibiotic that inhibits the formation of all *N*-linked oligosaccharides in proteins. Under these culture conditions, the 98-kDa hTPO band obtained (Fig. 1A, lane 4) was resistant to Endo H or PNGase F digestion (Fig. 1A, lanes 5 and 6) and therefore corresponded to the full-length unglycosylated hTPO. In comparison with this unglycosylated hTPO band, the shift from the 110- to 98-kDa hTPO band extracted from untreated control cells after PNGase F deglycosylation can therefore be attributed to the presence of *N*-linked glycans (Fig. 1A, lanes 3 and 4). By contrast, the migration of the two lower apparent molecular mass bands beyond the unglycosylated hTPO migration band suggests that the 94- and 92-kDa hTPO species cannot have been due to the glycosylation process but rather to the action of protease(s) on the polypeptide structure of the protein.

To determine whether these cleavages occur in the N- or the C-terminal part of the protein, a mutant form of hTPO lacking the cytoplasmic tail was used. The nucleotide sequence encoding 61 amino acids from Trp<sup>873</sup> to Leu<sup>933</sup> was deleted from the hTPO cDNA. This mutant, WCT-hTPO, was expressed in CHO cells and, after immunoprecipitation, was subjected to a PNGase F deglycosylation step. Along lines similar to what occurs in the case of the electrophoretic migration of the full-length hTPO, after PNGase F digestion WCT-hTPO was found to contain the three different apparent molecular mass species (Fig. 1B, lanes 2 and 4). This result indicates that the endoproteolytic cleavages of hTPO occurred in the N-terminal part of the protein.

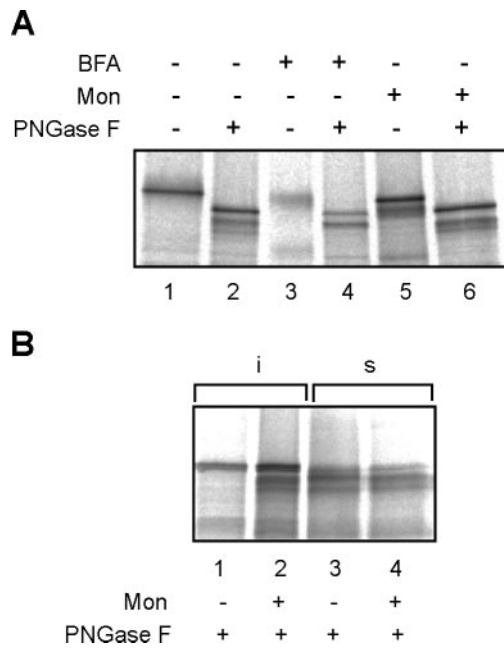
Because the hTPO cleaved species were resistant to Endo H and because this enzyme specifically cleaved the high-mannose type glycans, it is suggested that the endoproteolytic processing did not occur in the ER compartment but rather in the Golgi apparatus or at the cell surface. To confirm this assumption, after a metabolic labeling step the intracellular and cell surface  $^{35}$ S-hTPOs were separated using the cell surface biotinylation technique. Both intracellular and cell surface samples were then subjected to deglycosylation with Endo H or PNGase F.



**FIG. 1. Evidence for the occurrence of an endoproteolytic cleavage of hTPO.** A, Endo H and PNGase F digestion of hTPO. After 24 h of [ $^{35}$ S]Met/Cys metabolic labeling of hTPO-CHO cells in the absence (lanes 1, 2, and 3) and presence (lanes 4, 5, and 6) of tunicamycin (*Tu*) (15  $\mu$ g/ml), hTPO was extracted and immunoprecipitated with the pair of mAbs, mAb47 and mAb15 (lanes 1, 2, and 3) or with mAb47 alone (lanes 4, 5, and 6). Samples were then digested for 16 h at 37 °C with 5 milliunits of Endo H (lanes 2 and 5) or 1 unit of PNGase F (lanes 3 and 6). Control assays were carried out under the same conditions, except that glycosidases were omitted (lanes 1 and 4). Samples were reduced and subjected to SDS-PAGE analysis. B, PNGase F digestion of hTPO lacking a cytoplasmic tail. CHO cells were transfected with the cDNA of hTPO lacking the cytoplasmic tail, WCT-hTPO. Forty-eight hours after transfection, full-length hTPO-transfected (WT-hTPO) CHO control cells (lanes 1 and 2) and WCT-hTPO-transfected CHO cells (lanes 3 and 4) were labeled for 24 h with [ $^{35}$ S]Met/Cys. After extraction and hTPO immunoprecipitation with mAb15, samples were incubated or not with 1 unit of PNGase F and then reduced and subjected to SDS-PAGE analysis. C, Endo H and PNGase F digestion of intracellular and cell surface hTPO. After 24 h of [ $^{35}$ S]Met/Cys metabolic labeling of hTPO-CHO cells, a cell surface biotinylation step was performed with NHS-SS-biotin. After extraction and immunoprecipitation with mAb15, intracellular (lanes 1, 2, and 3) and cell surface hTPOs (lanes 4, 5, and 6) were separated with avidin-agarose beads. Samples were incubated for 16 h at 37 °C with 5 milliunits of Endo H or 1 unit of PNGase F digestion and then reduced and subjected to SDS-PAGE analysis.

Intracellular and cell surface hTPO appeared on an SDS-polyacrylamide gel as a specific 110-kDa band (Fig. 1C, lanes 1 and 4). After Endo H and PNGase F digestion, the intracellular hTPO showed up on an SDS-polyacrylamide gel as a single 98-kDa band (Fig. 1C, lanes 2 and 3), whereas the cell surface hTPO yielded 98-, 94-, and 92-kDa bands (Fig. 1C, lane 6). The fact that the hTPO cleaved species bore complex-type *N*-glycans and were present only at the cell surface therefore suggests that the cleavage process occurred in a late compartment of the secretory pathway on mAb15 recognizing folded or partially folded hTPO forms. The subsequent hTPO immunopre-





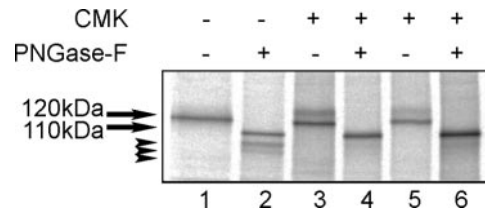
**FIG. 2. Effects of secretory pathway inhibitors on the hTPO endoproteolytic cleavage process.** A, hTPO-CHO cells were metabolically labeled for 24 h with [<sup>35</sup>S]Met/Cys in the absence (A, lanes 1 and 2) or presence of 10  $\mu$ g/ml BFA (A, lanes 3 and 4) or 10  $\mu$ M monensin (Mon) (A, lanes 5 and 6; B, lanes 1–4). After incubation, hTPO-CHO cells were immediately subjected to protein extraction (A, lanes 1–6), or cell surface biotinylation was performed (B). hTPO was immunoprecipitated with mAb15. Samples were treated with PNGase F and then analyzed by SDS-PAGE.

precipitation steps were therefore performed using only the mAb15 antibody.

To characterize the site of this processing more exactly, cell radiolabeling experiments were performed in the presence of brefeldin A (BFA) or monensin. These secretory pathway inhibitors induce the disassembly of the Golgi complex and block ER-Golgi transport and Golgi-cell surface vesicular transport of proteins, respectively. In the presence of BFA, which completely blocked the cell surface expression of hTPO (data not shown), only one of the lower bands (94 kDa) was retrieved after deglycosylation (Fig. 2A, lane 4). In the presence of monensin the cell surface expression of hTPO was not completely inhibited (Fig. 2B), but the deglycosylation of the hTPO remaining in the *trans*-Golgi network gave rise to three different apparent molecular mass populations (Fig. 2B). These results indicate that hTPO cleavages occurred after its transit through the Golgi apparatus but before it reached the cellular surface and that one cleavage can occur when hTPO was retained in the ER under BFA treatment but not under control conditions (Fig. 1C, lanes 1–3)

**Involvement of Proprotein Convertase(s) in the hTPO Cleavages**—To obtain further insights into the endoproteases involved in the proteolytic processing of hTPO, metabolic labeling was performed in the presence of various protease inhibitors. The hTPO cleavages were not affected by serine (aprotin), cysteine (leupeptin) or aspartate (pepstatin A) protease inhibitors. Only the cysteine protease inhibitor E64 and L-1-tosyl-amido-2-phenylethyl chloromethyl ketone were found to slightly reduce the rate of hTPO cleavage (data not shown).

The effects of a proprotein convertase (PPC)-specific inhibitor, CMK, were also tested. Human TPO-CHO cells were metabolically labeled with [<sup>35</sup>S]Met/Cys for 24 h in the absence or presence of CMK. After extraction and immunoprecipitation, hTPO was digested with PNGase F before SDS-PAGE. Contrary to what occurred with the untreated hTPO-CHO cells in which the



**FIG. 3. The CMK furin-type convertase inhibitor blocks hTPO cleavages in the CHO cell line.** hTPO-CHO cells were metabolically labeled for 24 h with [<sup>35</sup>S]Met/Cys in the absence (–) or presence (+) of 50  $\mu$ M (lanes 3 and 4) or 100  $\mu$ M CMK (lanes 5 and 6). After extraction and hTPO immunoprecipitation with mAb15, samples were incubated or not with 1 unit of PNGase F for 16 h at 37 °C. Samples were then reduced and subjected to SDS-PAGE analysis. The arrowheads indicate the molecular mass bands corresponding to the cleaved and non-cleaved hTPO species identified in Fig. 1. The arrows point to the complex N-glycan structures bearing hTPO species.

94- and 92-kDa bands could be observed (Fig. 3, lane 2), CMK treatment prevented the formation of cleaved forms. In the presence of 50 or 100  $\mu$ M CMK, only the 98-kDa band corresponding to the totally deglycosylated full-length hTPO was obtained after digestion with PNGase F (Fig. 3, lanes 4 and 6). Moreover, under CMK treatment, a change in the pattern of mobility of glycosylated hTPO was observed. The large 110-kDa band obtained with control hTPO-CHO cells was observed with two distinct species (Fig. 3, lanes 3 and 5). The lower apparent molecular mass band (110 kDa) corresponded to the high mannose-type, N-glycan structure of the hTPO found in the intracellular hTPO pool under control culture conditions (Fig. 1C, lane 1), and the upper band (120 kDa) observed in CMK-treated hTPO-CHO cells can be attributed to the non-cleaved hTPO species containing complex-type N-glycan structures.

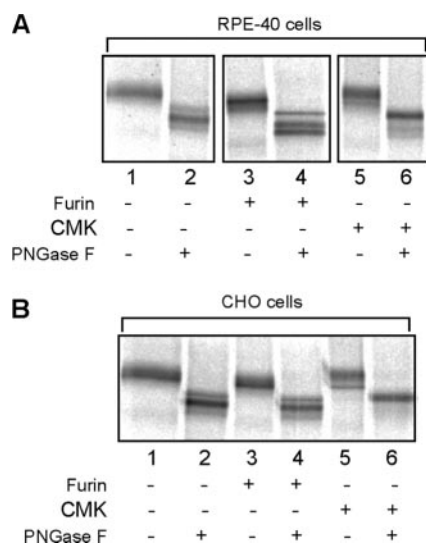
All these results show that the endoproteolytic cleavage of hTPO is specifically inhibited by CMK and strongly suggests that PPCs may be involved in the hTPO processing. This endoprotease family has been found to be implicated in the maturation of numerous precursors of biological active proteins and peptides such as hormones and neuropeptides (for review, see Ref. 16).

Because furin, a member of the PPC family, is known to be required in the processing of various surface glycoproteins such as proreceptors or proproteases, we attempted to determine what role furin itself might possibly play in the processing of hTPO. Transfection of hTPO-pcDNA3 was then performed in the furin-deficient CHO cell strain RPE.40 (17) followed by the [<sup>35</sup>S]Met/Cys metabolic labeling experiments described above. The results showed that hTPO processing was not inhibited in this cell line (Fig. 4A, lanes 1 and 2) and was always sensitive to CMK treatment (Fig. 4A, lanes 5 and 6), based on comparisons with similar experiments using hTPO-transfected CHO cells (Fig. 4B, lanes 1–6). In addition, the co-expression of furin with hTPO in RPE.40 and in hTPO-CHO cells did not increase the rate of hTPO cleavage (Fig. 4, A and B, lanes 3 and 4).

These results suggest that PPCs other than furin are probably involved or may rescue the cleavage(s) of hTPO in these cell lines. However, it is also worth noting that the hTPO cleavage observed when hTPO-CHO cells were treated with BFA was insensitive to CMK digestion, which suggests that in this case an enzyme other than PPC may be involved.

**Determination of the Amino Acid Sequences Involved in hTPO Cleavages in CHO Cells**—Seven members of the subtilisin-like family of PPCs, PC1/PC3, PC2, Furin/PACE, PC4, PACE4, PC5/PC6, and PC7, have been found to cleave protein precursors at basic residues within the general motif (R/K)<sub>n</sub>(R/K), where *n* = 0, 2, 4, or 6.

Analysis of the N-terminal part of hTPO showed the existence of three potential PPC cleavage sites composed of the KR



**FIG. 4. hTPO was efficiently processed in the furin-deficient CHO cell strain RPE.40.** The RPE.40 furin-deficient CHO cell line was transiently transfected with hTPO-pcDNA3. 48 h after transfection, hTPO-transfected RPE.40 cells (A) and hTPO-CHO control cells (B) were metabolically labeled for 24 h with [<sup>35</sup>S]Met/Cys in the absence (–) or presence (+) of 50 μM CMK. Co-expression of furin was also performed in hTPO-CHO control cells and in hTPO-transfected RPE.40 cells (lanes 3 and 4). After protein extraction, hTPO was immunoprecipitated with mAb15 and digested or not with 1 unit of PNGase F and then analyzed by SDS-PAGE.

paired basic amino acid residues at Arg<sup>48</sup>, Arg<sup>65</sup>, and Arg<sup>103</sup> (Fig. 5A). Moreover, a method was recently improved for predicting PPC cleavage sites (18). Using the ProP1.0.b program dealing with this method, we scanned the N-terminal part of the hTPO. The results identified two of the three potential sites with relevant scores at the Arg<sup>48</sup> and Arg<sup>65</sup> positions.

To assess the involvement of these different potential cleavage sites in hTPO processing, site-directed mutagenesis experiments were performed to mutate any PPC recognition motifs. Because the basic residue was essential to recognition by PPCs, the Arg residues at position P1 in these potential sites (Lys-Arg<sup>48</sup>, Lys-Arg<sup>65</sup>, and Lys-Arg<sup>103</sup>) were replaced by Ala residues. CHO cells were then transfected with the hTPO-cDNA of these mutants, and protein expression, followed by [<sup>35</sup>S]Met/Cys metabolic labeling experiments, were carried out as described above.

The R48A and R103A mutations had no effect on the hTPO cleavages (Fig. 5B, lanes 1 and 3) in comparison with the wild-type hTPO cleavages observed in CHO control cells (Fig. 5B, lane 5). Only the mutation of the R65A abolished one of the cleavages corresponding to one of the two 94-kDa bands (Fig. 5B, lane 2). On the other hand, the ER retention-mediated cleavage of hTPO observed in hTPO-CHO cells treated with BFA (Fig. 5C, lane 1) was completely abolished when the Arg<sup>65</sup> was replaced by an Ala residue (Fig. 5C, lane 2). All these results suggest that other members of the PPC family with different cleavage specificities might be involved in hTPO processing in the CHO cell line.

**N-terminal Sequencing of hTPO Extracted from Human Thyroid Gland**—To determine whether these endoproteolytic cleavages were relevant to the physiological process, we decided to perform the N-sequencing of hTPO extracted from human thyroid glands.

After being purified from thyroid glands, hTPO has been reported to show up in SDS-PAGE under reducing conditions as double 105–110- and 95-kDa bands (15, 19) (Fig. 6, lane 1), each of which is composed of multiple other bands. The efficient deglycosylation of native hTPO with Endo H was found to

sustain various species (Fig. 6, lane 2). Similar results were obtained with PNGase F (data not shown). The presence of various mRNA species encoding for different hTPO isoforms might explain the existence of different molecular mass species (3). However, the existence of various endoproteolytically processed forms of hTPO in CHO cells might also account for the great complexity of the electrophoretic bands observed after the deglycosylation of native hTPO.

To answer the above question, we carried out N-terminal sequencing on hTPO purified from human thyroid glands. After purification on a mAb15-Sepharose column, an aliquot of native hTPO was subjected to SDS-PAGE. Electroblooming procedure was then performed onto ProBlott membrane. The two bands of interest were revealed by Amido Black staining (Fig. 6, lane 1, bands a and b), excised, and sequenced.

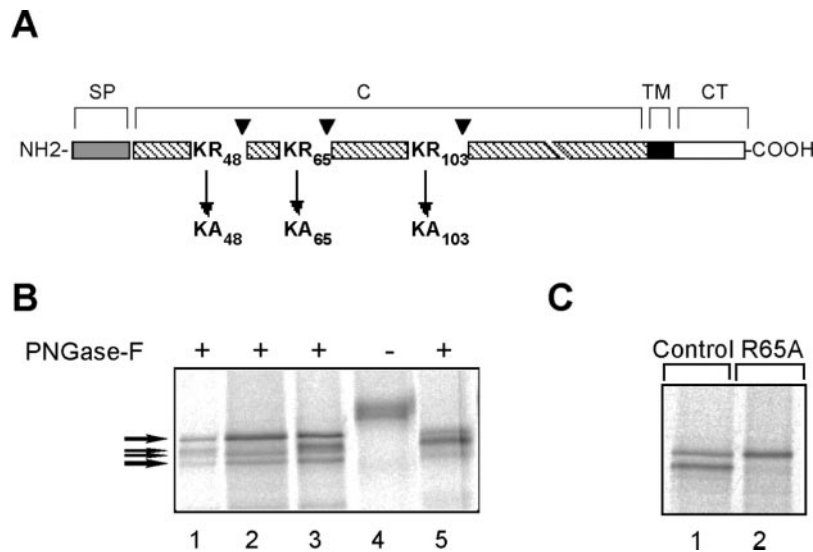
Surprisingly, the N-terminal sequencing data showed that the various native hTPO species all have the same N terminus sequence beginning at Thr<sup>109</sup>. This result suggests that in the thyroid gland, as in CHO cells, the N-terminal part of the hTPO is subjected to proteolytic processing but that the potential propeptide sequence runs from the signal peptide cleavage site to the Thr<sup>109</sup>. Based on the consensus PPC cleavage motif, we immediately identified a potential PPC cleavage site, KRKVN<sup>108</sup>↓T<sup>109</sup>, upstream of the N terminus of the native hTPO with a Lys residue in position P1 and an Arg residue at position P6, which suggests that a PPC may also be involved in hTPO processing in human thyroid gland.

If this cleavage also occurs in the CHO cell line, it might contribute to the formation of the 92-kDa band. However, the mutation of the Arg<sup>103</sup> (Fig. 5B, lane 3) and Lys<sup>108</sup> (data not shown) did not inhibit the cleavage in this cell line. Because it seems likely that the PPC involved in this cleavage process is not expressed in CHO cells, we performed experiments with two other cell lines, the erythroleukemic cell K562, in which the cleavage of the propeptide of another mammalian peroxidase, myeloperoxidase, can occur (20), and the rat thyroid cell PCCL3, which retains most of the typical markers of thyroid differentiation (21). The results obtained on these two cell lines were similar to those obtained with the CHO cells (data not shown).

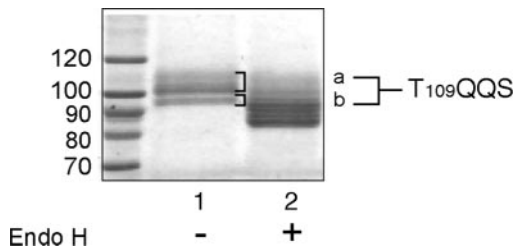
**Role of the Prosequence on the Folding of hTPO**—Many proteins are produced as precursors, and the peptidic sequence at the N terminus end of these proteins, which are called propeptides, has been found to be essential to the folding, stability, intracellular trafficking, and biological activation of several proteins such as proteases, hormones, neuropeptides, and plasma glycoproteins (22, 23). Some of these propeptides act as intramolecular chaperones facilitating protein folding, and others are involved in the cell targeting and sorting processes or in the inhibition of the protein activity.

To test the role of the N-terminal hTPO propeptide in the folding of hTPO, we first generated an hTPO-cDNA construct called Δpro-hTPO and deleted the hTPO propeptide sequence, amino acids Cys<sup>15</sup>–Lys<sup>108</sup> (Fig. 7A). The full-length and Δpro-hTPO were synthesized by performing pulse-chase experiments after transfecting CHO cells. The hTPO folding process was monitored with the two antibodies mAb47, which recognized unfolded hTPO forms (Fig. 7, B and D), and mAb15, which immunoprecipitated the partially and completely folded hTPO forms (Fig. 7, B and E).

The results showed that the proportions of the unfolded and folded forms differed between Δpro-hTPO and the entire hTPO. During the chase step, the newly synthesized unfolded hTPO forms were retrieved in large proportions in the propeptide-deleted hTPO mutant (Fig. 7D), whereas the proportions of the three-dimensional hTPO structure recognized by mAb15 were



**FIG. 5. Determination of amino acid sequences involved in hTPO cleavages in CHO cells.** *A*, scheme of site-directed mutagenesis of potential PPCs cleavage sites detected in the N-terminal part of hTPO. According to the consensus PPC cleavage site and the role of the P1-P2 dibasic motif present in the pattern of PPC substrate recognition, three potential PPC cleavage sites were observed at the Arg<sup>48</sup> (*R*<sub>48</sub>), Arg<sup>65</sup> (*R*<sub>65</sub>), and Arg<sup>103</sup> (*R*<sub>103</sub>) positions. Mutagenesis of these sequences was performed using site-directed mutagenesis procedures in order to include point mutations and transform the Arg residue into an Ala residue (*A*<sub>48</sub>, *A*<sub>65</sub>, and *A*<sub>103</sub>). The respective PPC cleavage site mutants are indicated under each sequence. The numbering of the amino acids includes the signal peptide sequence. (*SP*, signal peptide; *ED*, extracellular domain; *TM*, transmembrane domain; *CT*, cytoplasmic tail). *B*, effects of potential PPC cleavage sites mutation on hTPO cleavage processes. CHO cells were transiently transfected with R48A- (*lane 1*), R65A- (*lane 2*), or R103A-pcDNA3 (*lane 3*). After 48 h of cell culture, hTPO mutant-transfected CHO cells and CHO cells expressing the wild type hTPO (*lanes 4* and *5*) were metabolically labeled for 24 h with [<sup>35</sup>S]Met/Cys. After protein extraction and hTPO immunoprecipitation with mAb15, samples were digested or not with PNGase F and then analyzed by SDS-PAGE. *C*, effects of the mutation of Arg<sup>65</sup> on the cleavage observed in BFA-treated hTPO-CHO cells. R65A cDNA-transfected CHO cells and hTPO-CHO cells expressing the wild type protein were metabolically labeled for 24 h with [<sup>35</sup>S]Met/Cys in the presence of 10 μg/ml BFA. hTPO was immunoprecipitated with mAb15 and digested with PNGase F. Samples were then reduced and subjected to SDS-PAGE analysis.



**FIG. 6. N-terminal sequencing of hTPO extracted from human thyroid gland.** hTPO extracted from human thyroid gland using a mAb15-Sepharose column was subjected to SDS-PAGE under reducing conditions before (*lane 1*) and after Endo H digestion (*lane 2*). The two major distinct bands (*a* and *b*) obtained without the Endo H deglycosylation step are indicated. Under the same conditions Western blotting was performed followed by Amido Black staining and, after their excision, these two bands were sequenced by the Protein Microsequencing Laboratory at the Pasteur Institute. The N-sequencing data showed that the N-terminal ends of these two different molecular mass hTPO species (*a* and *b*) have the same amino acid sequence.

five times lower than in full-length hTPO control cells at various chase times (Fig. 7*E*).

The fact that no significant changes in the rate of hTPO molecule degradation were observed (Fig. 7*C*) suggests that the folding process rather than the degradation of unfolded forms was impaired. Both of these results suggest that the hTPO propeptide sequence might act as an intramolecular, chaperone-like protein.

It is worth noting that the signal peptide cleavage site is not known in the case of hTPO. Predictions made using diverse algorithms suggest that the cleavage may occur between residues 14 and 15, as well as between residues 18 and 19 or 26 and 27. To rule out the possibility that deleting part of the signal peptide may have prevented the Δpro-hTPO to fold correctly, we performed the same experiment after deleting the hTPO propeptide sequence consisting of amino acids Lys<sup>27</sup>-Lys<sup>108</sup>,

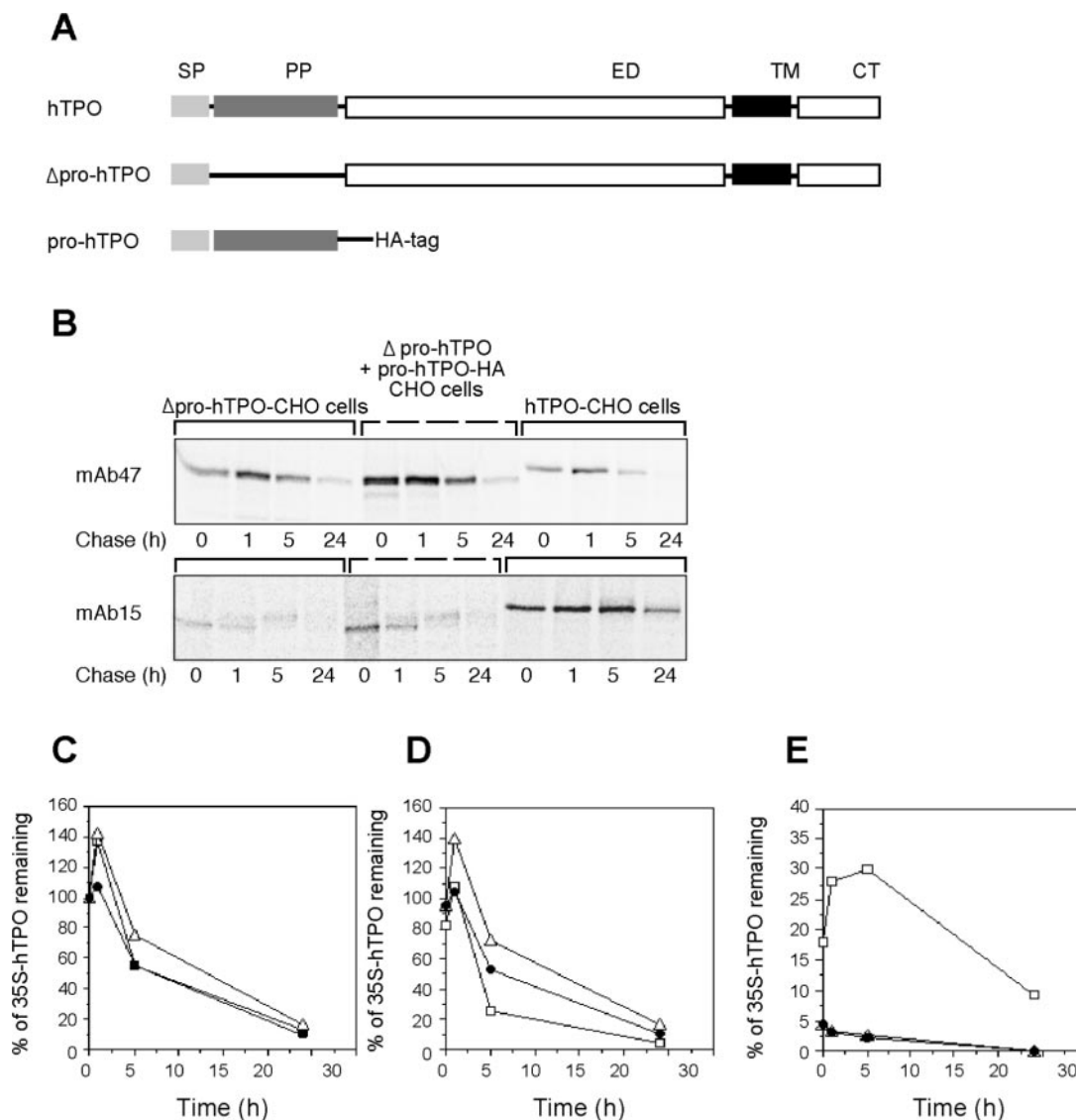
and identical results were obtained (data not shown).

Assuming that the prosequence of hTPO plays this chaperone-like role, we investigated whether it can contribute to a folding assistance in *trans*, i.e. when the hTPO propeptide (pro-hTPO) and the Δpro-hTPO were co-expressed as independent units. Synthesis of pro-hTPO<sub>1-108</sub> in CHO cells was checked by introducing an influenza HA tag on the C terminus side of the propeptide sequence (Fig. 7*A*). Western blotting of the HA-tagged propeptide extracted from transfected CHO cells was performed using an anti-HA antibody. As we expected, an ~11 kDa peptide was obtained that is consistent with the molecular mass of pro-hTPO<sub>1-108</sub>-HA (data not shown).

CHO cells were then co-transfected with the two plasmids encoding Δpro-hTPO and pro-hTPO, and pulse-chase experiments similar to those described previously were carried out. The results showed that when the hTPO propeptide was co-expressed in *trans* with the propeptide-deleted hTPO mutant, the correct folding of hTPO protein was not restored (Fig. 7, *B* and *E*). These results demonstrate that in the human thyroid gland the hTPO prosequence must be attached to the protein to enable the correct folding of the thyroperoxidase to occur.

**Effects of the Prosequence on the Cell Surface Expression and the Activity of hTPO**—The fact that the hTPO propeptide deletion drastically decreased the proportion of the folded forms of hTPO suggested that a loss of cell surface expression and thyroperoxidase activity occurs in Δpro-hTPO transfected cells. To confirm this hypothesis, after performing metabolic labeling on Δpro-hTPO transfected cells, the intracellular and cell surface Δpro-hTPOs were separated using the cell surface biotinylation technique. As we expected, in comparison with the control hTPO-CHO cells, the cell surface expression of hTPO was completely blocked in the Δpro-hTPO transfected cells, whereas inhibition of the cleavage by CMK did not affect the rate of cell surface expression (Fig. 8*A*).





**FIG. 7. Role of the prosequence on the folding of hTPO.** A, scheme of Δpro-hTPO- and pro-hTPO-pcDNA3 constructs lacking the Cys<sup>15</sup>-Lys<sup>108</sup> sequence propeptide (PP) and the Thr<sup>109</sup>-Lys<sup>933</sup> hTPO sequence, respectively, as compared with hTPO. A HA tag has been added to the propeptide sequence in the pro-hTPO-pcDNA3 construct. SP, signal propeptide; ED, extracellular domain; TM, transmembrane domain; CT, cytoplasmic tail. B-E, CHO cells were transiently transfected with Δpro-hTPO-pcDNA3 constructs (● in C, D, and E) or co-transfected with Δpro-hTPO-pcDNA3 and pro-hTPO-pcDNA3 constructs (Δ in C, D, and E). Forty-eight hours after transfection, transfected CHO cells and hTPO-CHO control cells (□ in C, D and E) were radiolabeled for 30 min with 100 μCi/ml [<sup>35</sup>S]Met/Cys. A chase step was performed in Ham's F-12 medium supplemented with 5 mM Met and 5 mM Cys. After extracting the proteins, hTPO was immunoprecipitated with mAb47 plus mAb15 (C), mAb47 (B and D), or mAb15 (B and E). After a reduction step, samples were analyzed on SDS-PAGE, and the band corresponding to hTPO was quantified using a phosphorimaging device.

We then investigated the question as to whether inhibiting the endoproteolytic cleavage of hTPO might affect the enzymatic activity at the cell surface. Surprisingly, after 48 h of incubation in the presence of CMK, the activity of hTPO increased by 33% in comparison with that of the control cells (Fig. 8B). This finding suggests that in the human thyroid gland the efficient cleavage of hTPO may lead to a slight decrease in the activity of this enzyme at the cell surface. Both of the above results suggest that the presence of the propeptide is necessary for the correct folding and the intracellular trafficking of hTPO to occur but that the enzymatic activity does not depend on the occurrence of this cleavage.

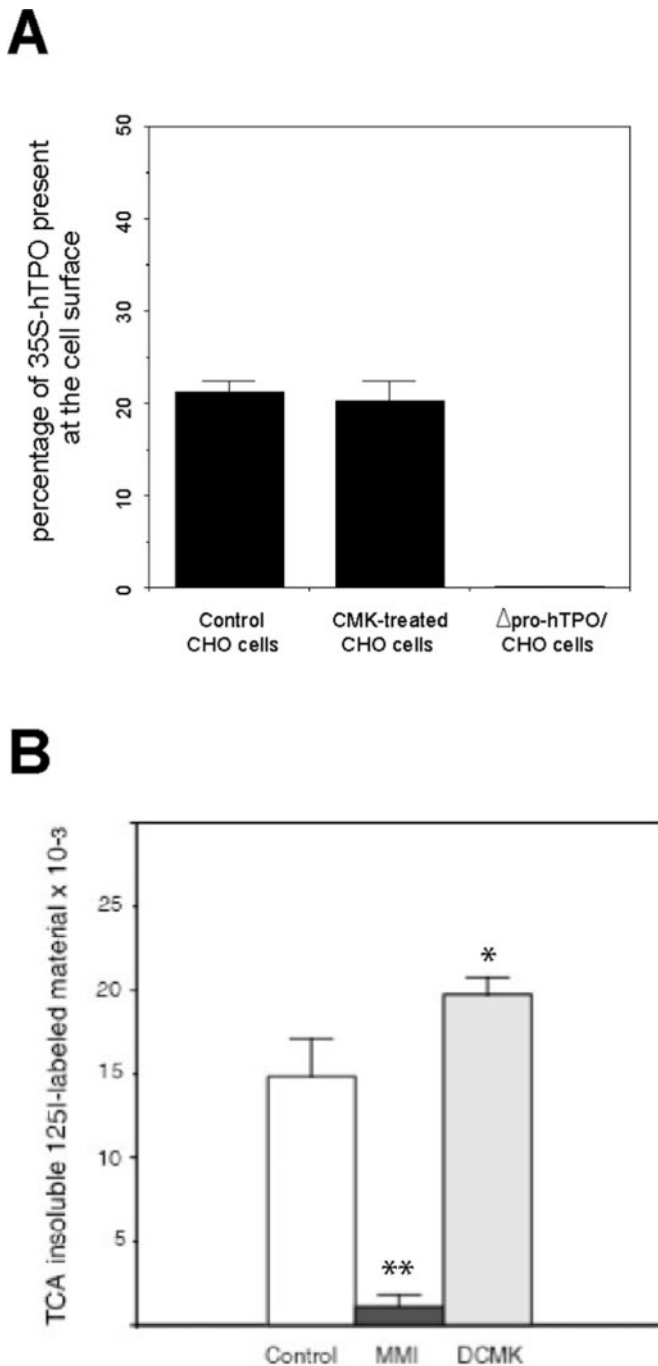
#### DISCUSSION

After its synthesis, hTPO undergoes various posttranslational modifications such as N- and O-glycosylation and heme fixation. The folding of this enzyme seems to be a prerequisite for its maturation and for its ER sorting and cell surface ex-

pression (7, 8). In the present study, we obtained evidence that an endopeptidase cleaves the N-terminal part of the hTPO and that the proper folding of the protein depends on the presence of the propeptide.

In the first set of experiments we established that hTPO expressed in CHO cells is subjected to three different types of cleavage in a post-ER compartment. These cleavage processes are inhibited by CMK, a PPC inhibitor, but the fact that they still occurred in a furin-deficient CHO cell line indicates that PPCs other than furin cleave the prosequence.

It has by now been clearly established that many active forms of proteins are generated after a proteolytic processing step. PPCs are a family of subtilases involved in this cleavage process. Seven PPCs have been identified to date, namely PC1/3, PC2, furin, PC4, PACE4, PC5, and PC7. These enzymes cleave at basic residues (usually Arg) within the general sequence (K/R)<sub>n</sub>(K/R), where n = 2, 4, or 6 and X is any amino



**FIG. 8. Effects of the prosequence on the hTPO cell surface expression and activity.** A,  $\Delta$ pro-hTPO-pcDNA3 transfected cells and hTPO-CHO cells incubated in the absence or presence of 50  $\mu$ M CMK were metabolically labeled for 24 h with [<sup>35</sup>S]Met/Cys. A cell surface biotinylation step was then performed as described above. After protein extraction, hTPO was immunoprecipitated, and the intracellular and cell surface hTPOs were separated. Samples were analyzed by SDS-PAGE, and the radioactivity of the hTPO band was detected and quantified using a phosphorimaging device. B, effects of the inhibition of hTPO cleavages on the enzymatic activity of hTPO at the CHO cell surface. hTPO-CHO cells were preincubated for 16 h in culture medium supplemented with 10 mM sodium butyrate with or without 50  $\mu$ M CMK (DCMK). The incubation assay mixture contained bovine serum albumin (5 mg/ml in PBS) and Na<sup>125</sup>I. A negative control assay in which 2 mM 2-mercapto-1-methylimidazole (MMI) was added was also run. To initiate the reaction, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added at a final concentration of 0.5 mM. Cells were incubated for 20 min and transferred to reaction tubes. Iodinated material was then precipitated with 10% cold trichloroacetic acid (TCA), and the radioactivity was counted. Statistically significant differences versus control were as follows: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

acid except Cys and rarely Pro. However, in a number of cases precursors are cleaved at non-basic residues, and the proteinases involved in these proteolytic processes have not yet been identified (16).

In the present study, only one of the cleavage sites of hTPO in CHO cells was identified; it was found to be located at the Arg<sup>65</sup> level, and the mutations of the two other Arg residues located in positions 48 and 103, which might have been involved in cleavage by PPCs, were found to have no effects. It is also worth noting that, in cells treated with BFA, the hTPO is cleaved between the Arg<sup>65</sup> and the Gly<sup>66</sup> and that this cleavage is not inhibited by CMK. This finding indicates that in these cells another endopeptidase was able to cleave the hTPO present in the ER when the transport between this compartment and the Golgi apparatus was blocked. On the other hand, the inhibition of the cleavages exerted by CMK did not prevent the intracellular trafficking of hTPO, and this inhibition led to an increase in the activity of this enzyme at the cell surface level, which indicates that the removal of the prosequence is not necessary to obtain an active enzyme.

Surprisingly, the N-terminal sequence of the hTPO molecules purified from the human thyroid gland using mAb15-Sepharose began at Thr<sup>109</sup>. Because this hTPO was sensitive to Endo H and also because it is known that hTPO is located mainly in the ER in thyroid cells (6), this cleavage presumably occurs in this compartment, and the propeptide will then probably be quickly removed after the folding of the protein.

Cleavage of the propeptide(s) therefore occurs in both CHO cells and thyroid cells, but the cleavage processes are different. This was confirmed by the fact that the mutation of Arg<sup>103</sup> and Lys<sup>108</sup>, amino acid residues potentially involved in a cleavage mechanism between Lys<sup>108</sup> and Thr<sup>109</sup> in human thyroid, has no effect on the removal of the prosequence in CHO cells. It is therefore possible that, in CHO cells, PPCs other than the furin may be present in the Golgi apparatus where they participate in the cleavage of the prosequence, whereas in thyroid cells some other endoproteases may cleave the prosequence at the ER level.

Five years ago, the first member of a new subfamily of kexin-like PPCs was characterized and found to be involved in the processing of various protein precursors at non-basic residues (24). This protease, called SKI-1, was found to process substrates along the secretory pathway, preferentially in the ER compartment, unlike the other PPCs that cleave protein precursors after their transit to the *trans*-Golgi network. The proposed consensus sequence for SKI-1 is (R/K)X-(hydrophobic)-Z↓, where Z is any amino acid, preferentially Leu, Thr, Lys, or Phe but excluding Val, Pro, Glu, Asp, or Cys (25–27). Because the sequence KRKVN<sup>108</sup> has an aliphatic residue in the P2 position, but not Arg or Lys in position P4, the cleavage in the human thyroid cell cannot be attributable to SKI-1 but must be due to a unknown endoprotease. By contrast, the sequence immediately following Arg<sup>65</sup>, which was previously identified as a potential furin-like cleavage site, also contains a potential SKI-1 cleavage site, R<sup>65</sup>GIL<sup>68</sup>, including the aliphatic residue Ile in P2 and an Arg in P4. Furthermore, SKI-1 is known to be expressed in CHO cells (28). Under these conditions, it seems likely that SKI-1 may be involved in the cleavage process observed in CHO cells exposed to BFA. This would explain why the ER retention-mediated cleavage of hTPO observed in hTPO-CHO cells treated with BFA was insensitive to CMK treatment but completely abolished when the Arg<sup>65</sup> was replaced by an Ala residue (Fig. 5C).

As far as the role of this prosequence is concerned, many proteins are initially synthesized in the form of inactive precursors and need to be cleaved by PPCs in the secretory path-



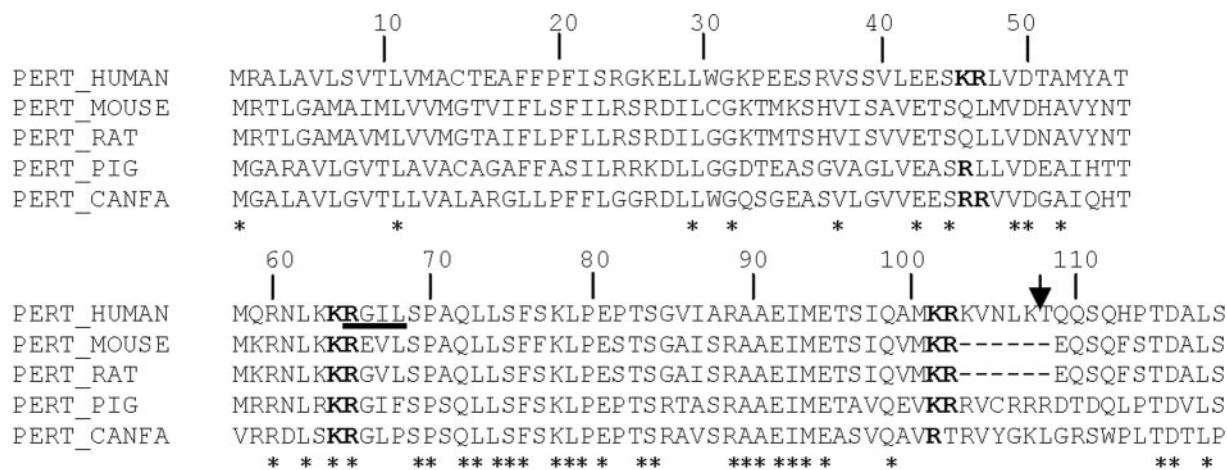


FIG. 9. Alignment of amino acid sequences of the N-terminal part of thyroperoxidases from various mammalian species. The first 120 amino acid residues of the human, mouse, rat, pig, and dog (*CANFA*) were aligned using a ClustalW algorithm (version 1.82) at the European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute web site. The three KR dibasic motifs studied here are shown in **bold print**. The native hTPO N-terminal end determined in this study is shown by an *arrow*, and the potential SKI-1 cleavage site of hTPO in CHO cell line has been *underlined*. The conserved amino acids between species are labeled with *asterisks*.

way before showing any biological activity; in other cases, the prosequence acts as an intramolecular chaperone, and the proper folding of the protein depends on the presence of this chaperone (for a review, see Refs. 22 and 23). In the present study, we observed that the presence of the prosequence is necessary for the correct folding of this glycoprotein to occur and that the cleavage of this prosequence is not a prerequisite for its transport to the cell surface or for its enzymatic activity; on the contrary, a slight decrease in the enzymatic activity was observed in CHO cells when hTPO was cleaved.

Another mammalian peroxidase, myeloperoxidase, undergoes a proteolytic trimming process resulting in the elimination of a propeptide consisting of 164 amino acids (29). Nothing is known so far about the exact nature of the enzyme involved in this cleavage process, but contrary to what occurs with hTPO, it seems to take place in the Golgi apparatus. On the other hand, no sequence homology was observed between the cleavage sites of hTPO and myeloperoxidase. As in the case of hTPO, the propeptide facilitates the folding of the protein, but it also facilitates both the export from the ER and the targeting for the storage granules (for a review, see Ref. 30). It is also worth noting that in CHO, BHK, and Sf9 cells (31–33) transfected with myeloperoxidase cDNA, no processing of myeloperoxidase occurs (31–33), whereas in human erythroleukemia K562 cells a normal process of maturation was observed (20). In the case of hTPO, the results of the present study show that a cleavage occurs in the CHO cells but that this cleavage process is certainly not the same as that occurring in human thyroid cells. To make comparisons on the N-terminal part of hTPO, we transfected the hTPO cDNA to the K562 cells and to the rat thyroid cell line PCCL3; the same pattern of cleavage was observed in these two cell lines as that obtained in CHO cells.

Sequence analysis of the N-terminal part of TPO was carried out on five different species (human, mouse, rat, pig, and dog) (Fig. 9), and the results show that the pair Lys<sup>64</sup>-Arg<sup>65</sup> is conserved in all the sequences and that the pair Lys<sup>102</sup>-Arg<sup>103</sup> is in all the species except dog. By contrast, the pair Lys<sup>108</sup>-Thr<sup>109</sup> was not detected in the other species. Further N-terminal sequencing data now need to be obtained and compared between these various TPO species in order to determine exactly what cleavage processes occur, depending on the species.

In conclusion, the data presented here provide clear-cut evidence of the following. (i) hTPO undergoes a cleavage process during its maturation. (ii) PPCs are involved in these post-translational cleavage processes in CHO, PCCL3, and K562

cells. (iii) In the human thyroid gland the cleavage process differs from that occurring in these three cell lines; and (iv) the proper folding of the hTPO depends on the presence of the propeptide. However, several points, including the following ones, still remain to be elucidated. What enzyme is involved in the cleavage of hTPO in the human thyroid gland, and does this process differ from one species to another?

**Acknowledgments**—We thank B. Rapoport (Cedars-Sinai Research Institute, Los Angeles, CA) for providing the hTPO cDNA, J.F. Susic (University of Michigan, Flint, MI) for providing the RPE.40 cell line, G. Thomas (The Oregon Health Sciences University) for providing HA-tagged furin cDNA, and J. Ruf (U555 INSERM) for providing hTPO mAbs

#### REFERENCES

- Kimura, S., Kotani, T., McBride, O. W., Umeki, K., Hirai, K., Nakayama, T., and Ohtaki, S. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 5555–5559
- Elisei, R., Vassart, G., and Ludgate, M. (1991) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **72**, 700–702
- Ferrand, M., Le Fourn, V., and Franc, J. L. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 3793–3800
- McLachlan, S. M., and Rapoport, B. (1992) *Endocr. Rev.* **13**, 192–206
- Taugo, A. (1999) *Biochimie (Paris)* **81**, 557–562
- Eckholm, R. (1981) *Mol. Cell. Endocrinol.* **24**, 141–163
- Fayadat, L., Niccoli-Sire, P., Lanet, J., and Franc, J. L. (1998) *Endocrinology* **139**, 4277–4285
- Fayadat, L., Siffroi-Fernandez, S., Lanet, J., and Franc, J. L. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 15948–15954
- Fayadat, L., Siffroi-Fernandez, S., Lanet, J., and Franc, J. L. (2000) *Endocrinology* **141**, 959–966
- Fayadat, L., Niccoli-Sire, P., Lanet, J., and Franc, J. L. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 10533–10538
- Magnusson, R. P., Chazenbalk, G. D., Gestautas, J., Seto, P., Filetti, S., DeGroot, L. J., and Rapoport, B. (1987) *Mol. Endocrinol.* **1**, 856–861
- Ruf, J., Toubert, M. E., Czarnocka, B., Durand-Gorde, J. M., Ferrand, M., and Carayon, P. (1989) *Endocrinology* **125**, 1211–1218
- Makarova, O., Kamberov, E., and Margolis, B. (2000) *BioTechniques* **29**, 970–972
- Wang, J., and Wilkinson, M. F. (2000) *BioTechniques* **29**, 976–978
- Czarnocka, B., Ruf, J., Ferrand, M., Carayon, P., and Lissitzky, S. (1985) *FEBS Lett.* **190**, 147–152
- Seidah, N. G., and Chretien, M. (1999) *Brain Res.* **848**, 45–62
- Susic, J. F., Spence, M. J., and Moehring, T. J. (1998) *Somatic Cell Mol. Genet.* **24**, 75–90
- Duckert, P., Brunak, S., and Blom, N. (2004) *Protein Eng. Des. Sel.* **17**, 107–112
- Gardas, A., Lewartowska, A., Sutton, B. J., Pasiaka, Z., McGregor, A. M., and Banga, J. P. (1997) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 3752–3757
- Nauseef, W. M., Cogley, M., and McCormick, S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 9546–9549
- Fusco, A., Berlingieri, M. T., Di Fiore, P. P., Portella, G., Grieco, M., and Vecchio, G. (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3365–3370
- Takagi, H., and Takahashi, M. (2003) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 1–9
- Shinde, U., and Inouye, M. (2000) *Semin. Cell Dev. Biol.* **11**, 35–44
- 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., and Marcinkiewicz, M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 1321–1326

25. Elagoz, A., Benjannet, S., Mammabassi, A., Wickham, L., and Seidah, N. G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 11265–11275
26. Ye, J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U. P., Prywes, R., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (2000) *Mol. Cell* **6**, 1355–1364
27. Lenz, O., ter Meulen, J., Feldmann, H., Klenk, H. D., and Garten, W. (2000) *J. Virol.* **74**, 11418–11421
28. Mouchantaf, R., Watt, H. L., Sulea, T., Seidah, N. G., Alturahi, H., Patel, Y. C., and Kumar, U. (2004) *Regul. Pept.* **120**, 133–140
29. Hashinaka, K., Nishio, C., Hur, S. J., Sakiyama, F., Tsunasawa, S., and Yamada, M. (1988) *Biochemistry* **27**, 5906–5914
30. Gullberg, U., Bengtsson, N., Bulow, E., Garwicz, D., Lindmark, A., and Olsson, I. (1999) *J. Immunol. Methods* **232**, 201–210
31. Moguilevsky, N., Garcia-Quintana, L., Jacquet, A., Tournay, C., Fabry, L., Pierard, L., and Bollen, A. (1991) *Eur. J. Biochem.* **197**, 605–614
32. Cully, J., Harrach, B., Hauser, H., Harth, N., Robenek, H., Nagata, S., and Hasilik, A. (1989) *Exp. Cell Res.* **180**, 440–450
33. Taylor, K. L., Uhlinger, D. J., and Kinkade, J. M., Jr. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 1572–1578

## ARTICLE (III)

### *conclusion*

Dans ce troisième article, nous avons montré l'existence de clivages endoprotéolytiques de la TPO exprimée dans les cellules CHO ainsi que dans la thyroïde.

En effet, le traitement d'un clone de cellules CHO exprimant la TPO de manière stable, avec un inhibiteur de glycosylation, la tunicamycine, a mis en évidence la présence de deux populations de TPO migrant après électrophorèse dénaturante à des poids moléculaires apparents inférieurs à la TPO entière et totalement déglycosylée.

Les clivages endoprotéolytiques donnant lieu à ces populations de TPO, surviennent dans la partie amino-terminale de la protéine puisque lorsque l'on délète la partie intracytoplasmique C-terminale, la TPO conserve après déglycosylation totale, le même profil électrophorétique mettant en évidence la présence de multiples bandes protéiques.

L'utilisation de divers inhibiteurs de protéases et d'inhibiteur du trafic intracellulaire des protéines de la voie de sécrétion, telle la BFA ou la monensine, nous a permis d'impliquer des protéases de la famille des convertases animales, protéases similaires aux subtilisines bactériennes, actives au niveau du TGN et reconnaissant des motifs di-basiques.

Cependant, la furine, souvent impliquée dans les processus de maturation endoprotéolytique de nombreux précurseurs protéiques, ne l'est pas dans les clivages de la TPO.

Le séquençage N-terminal de TPO purifiée à partir de glande thyroïde humaine, montre que le processus de clivage endoprotéolytique survient pour libérer la séquence amino-terminale,  $\square T^{109} QQS$ . Ce résultat a mis en évidence d'une part, la séquence du propeptide de la TPO - de la séquence signal à la lysine 108 - et d'autre part, le site de clivage  $KR^{103} KVN LK^{108} \square$  situé en amont de cette dernière.

On sait que la TPO est largement retenue dans le RE et que la TPO purifiée à partir de glande est en grande majorité sensible à l'endo H et donc issue de cette population. Aussi, bien que la mutation de l'arginine 103 du site de clivage de la TPO n'abolisse pas les clivages de la TPO exprimée dans les cellules CHO, la séquence  $KR^{103} KVN LK^{108}$  pourrait être un site potentiel de reconnaissance et de clivage pour un membre de la famille des convertases actif au niveau du RE, comme la convertase SKI-I.

La suite du travail a mis en évidence le rôle crucial du propeptide dans les étapes précoces du repliement de la TPO. En effet, délétée de cette séquence, la TPO n'acquiert pas sa conformation native et est retenue dans le RE sous forme dépliée (formes immunoprécipitées avec le mAb47) sans jamais atteindre la surface cellulaire.

Ainsi, le propeptide joue le rôle de protéine chaperon intramoléculaire indispensable au repliement correct de la TPO. En revanche son clivage n'est pas nécessaire au trafic intracellulaire et à l'expression en surface de la protéine et n'a qu'un effet limité sur l'activité enzymatique de surface de la TPO. Ces données renforcent son rôle déterminant dans les étapes précoces du processus de repliement et de maturation de la TPO.

L'ensemble de ces données a mis en évidence, une nouvelle modification post-traductionnelle de la TPO, jouant un rôle crucial dans les étapes précoces du mécanisme de maturation de cette glycoprotéine.

## ARTICLE (IV)

### *introduction*

Les protéines synthétisées dans les cellules eucaryotes et plus particulièrement au niveau de la voie de sécrétion, sont soumises à un mécanisme de contrôle de qualité associé à des voies de dégradation protéolytique complexe, appelé ERAD. Ces processus garantissent que seules les protéines correctement maturées subsistent et atteignent leur destination finale. Ils permettent en cas de mutations des protéines ou de conditions pathologiques transitoires de rétablir le bon déroulement des processus de repliement, de trafic intracellulaire et de dégradation des protéines.

Ces processus font intervenir de nombreux acteurs, comme les protéines chaperons du réticulum endoplasmique ou le complexe du protéasome, et peuvent agir différemment suivant la protéine.

Les études précédemment réalisées sur la thyroperoxydase humaine, ont montré que la protéine est fortement retenue et dégradée dans les compartiments intracellulaires et plus particulièrement dans les compartiments pré-golgiens, du réticulum endoplasmique (Fayadat et coll, 1999). Les études suivantes ont permis de mettre en évidence l'intervention des protéines chaperons du RE, la calnexine (CNX) et la calreticuline (CRT), dans le processus de repliement correct de la protéine (Fayadat et coll, 2000) et la dégradation des formes de TPO incorrectement repliées par le protéasome (Fayadat et coll, 2000).

En plus de la CNX et de la CRT, la protéine BiP qui intervient dans le repliement ou la dégradation de nombreuses protéines et glycoprotéines de la voie de sécrétion, pourrait agir lors de la biosynthèse de la TPO. L'action des protéines chaperons du RE apparaît en effet, séquentielle et/ou compétitive. Ainsi, l'équipe de Molinari a mis en évidence la fixation préférentielle de l'une ou de l'autre des protéines chaperons BiP et CNX suivant la position du premier site de N-glycosylation présent sur les glycoprotéines, notamment la fixation préférentielle de la CNX dans le cas où un motif glycanique est présent dans les 50 premiers acides aminés. Sachant que l'intervention de la CNX avec la TPO est fortement dépendante de la présence des motifs glycaniques portés par cette dernière (Fayadat et coll, 2000), la position de tels motifs dans les premiers résidus amino-terminaux de la TPO pourrait être déterminante pour l'intervention de BiP et de la CNX dans le processus de maturation de la TPO.

Le travail présenté dans ce quatrième article fait suite à ces données et se propose donc d'élucider le rôle de BiP et de CNX dans les mécanismes de repliement et de dégradation de la thyroperoxydase ainsi que les éléments modulant leurs actions.

Nous avons donc dans un premier temps testé l'action de BiP dans la biosynthèse de la TPO, en réalisant des expériences de co-immunoprécipitation de BiP avec la TPO. Les résultats montrent en effet une interaction entre ces dernières.

A partir de cela, nous avons entrepris de déterminer si la protéine BiP avait une action positive ou négative sur le repliement correct de la TPO. Pour répondre à cette question, nous avons utilisés des cellules surexprimant BiP d'un facteur 5 ainsi que des cellules transfectées avec des mutants conformationnels de BiP susceptibles de séquestrer les protéines qu'ils fixent. Après transfection de ces dernières avec l'ADNc de la TPO, des expériences de marquage métabolique en « pulse-chase » suivis de l'immunoprécipitation de la TPO à l'aide des mAb47 et mAb15, nous ont permis d'estimer le taux de repliement et de dégradation de la TPO mis en présence d'une quantité accrue de BiP ou de mutants de BiP non fonctionnels.

Dans un second temps nous avons testé l'influence des éléments pouvant moduler l'action de la CNX et celle de BiP. L'un des partenaires connus de la CNX est une protéine intervenant dans la formation des ponts disulfures des protéines, ERp57. Cette protéine pouvant être peu exprimée dans les cellules CHO et dans la thyroïde en proportion de la CNX, nous avons réalisés des expériences de co-surexpression de CNX et de ERp57 dans les cellules CHO-TPO, afin d'augmenter l'efficacité du repliement correct de la TPO. Puis, étant donné que le premier site de glycosylation est en position 129 sur la TPO, nous avons par mutagenèse dirigée créer des mutants de la TPO portant des sites de glycosylation supplémentaires en amont de ce site afin d'analyser si cela favorisait l'action de la CNX au dépend de l'action de BiP.

Tous ces résultats nous ont permis d'obtenir de nouveaux éléments pour expliquer les processus de repliement et de dégradation de la TPO et de mettre en évidence l'importance de la liaison à BiP ou à la CNX dans le devenir de la TPO.

# Competition between calnexin and BiP in the endoplasmic reticulum can lead to the folding or degradation of human thyroperoxidase

*Valérie Le Fourn§†, Sandrine Siffroi-Fernandez†‡, Mireille Ferrand§†, and Jean-Louis Franc†§\**

§ ICNE, UMR 6544 CNRS-Université de la Méditerranée, Faculté de Médecine, IFR Jean-Roche, Marseille, France and † U555 INSERM, Faculté de Médecine, Marseille, France.

E-mail adress: franc.jl@jean-roche.univ-mrs.fr

## RECEIVED DATE

Running title: Folding and degradation of hTPO

\* To whom correspondence should be adressed: ICNE, UMR 6544 CNRS-Université de la Méditerranée, Faculté de Médecine, Bd P. Dramard,13916 Marseille cedex 20, France. Tel: (33)4 9169 87 15; FAX: (33)4 91 69 89 20, E-mail adress: franc.jl@jean-roche.univ-mrs.fr.

‡ Present address: INSERM-Université Louis Pasteur E99.18, CHU regional, 1 place de l'Hopital, 67091 Strasbourg cedex

## ABSTRACT

Previous studies on the fate of human thyroperoxidase (hTPO) molecules have shown that after being synthesized, these glycoproteins interact with calnexin and calreticulin and that only some of them are able to acquire a partially folded structure. The present study was designed to further investigate the potential role of BiP, another major protein chaperon. Co-immunoprecipitation experiments showed the occurrence of interactions between hTPO and BiP. Pulse-chase studies showed that when hTPO was expressed in a CHO cell line overexpressing 5 times more BiP than the parent cells, the rate of hTPO recognized by a monoclonal antibody directed against a conformational structure decreased by 50% after 5 h of chase. Overexpression of the BiP-ATPase mutant G37T also led to a decrease in the correct folding rate of hTPO. When this protein was pulsed in the presence of  $^{35}\text{S}$ -(Met+Cys) and the reducing agent dithiotreitol and then chased in a culture medium without dithiothreitol, a 2.5-fold decrease in the correct folding rate was observed in cells overexpressing BiP. However, adding potential N-glycosylation sites near the N-terminal part of hTPO to facilitate interactions with calnexin during the translocation of hTPO into the endoplasmic reticulum had no effect on its folding behaviour. These data show that the presence of the first chaperone binding site is not crucial here. However, all these findings show that BiP and calnexin have opposite effects on the folding behaviour of hTPO and that the action of specific molecular chaperones may therefore crucially determine the fate of glycoproteins.

**KEYWORDS:** thyroperoxidase, BiP, calnexin, ERp57, folding.



## INTRODUCTION

Human thyroperoxidase (hTPO) is a type I transmembrane heme-containing glycoprotein that plays a key role in the process of thyroid hormone synthesis. Although hTPO catalyzes both thyroglobulin iodination and iodotyrosine coupling at the apical cell surface of thyroid cells, this enzyme is located mainly in the endoplasmic reticulum (ER), and only a small proportion is present at the apical surface (1).

In previous studies using stably transfected CHO cells, we established that: i) after being synthesized only 15-20 % of the hTPO is able to acquire a partially folded form and only 15-20 % of this partially folded hTPO is able to acquire a completely folded form and reach the cell surface. This means that only 2 % of the hTPO molecules synthesized are able to exit from the ER and reach the cell surface (2); ii) interactions between hTPO and calnexin (CNX) and calreticulin (CRT), two molecular chaperones present in the ER, are of crucial importance for the folding of hTPO (3); iii) insertion of the heme is essential for the hTPO to be able to exit from the ER (4); iv) hTPO is degraded at the ER level via two different pathways depending on its folding state (5). The completely non-folded form is degraded by the proteasome, while the partially folded form is degraded by an unknown system involving some ER membrane-bound cysteine/serine proteases.

In the present study, we studied the role of BiP, one of the most important molecular chaperones, and that of ERp57, a partner of CNX and CRT, which rearranges disulfide bonds.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Materials*

Nutrient mixture F-12 (HAM) was from Gibco (Invitrogen Corporation). Fetal bovine serum (FBS) was supplied by HyClone (Perbio, France). Dulbecco's Minimum Essential Medium Eagle (DMEM), Glutamine, Protease Inhibitor Cocktail, Triton X-100, sodium deoxycholate, N-ethylmaleimide, and dithiothreitol (DTT) were purchased from Sigma (St Louis, USA). LipofectAMINE PLUS™ reagent was obtained from Invitrogen (Life Technologies) and Protein A-Sepharose 4B Conjugate from Zymed Laboratories, Inc (California, USA). EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin and ImmunoPure® Immobilized Avidin Gel were purchased from Pierce (Perbio, Rockford, IL). NEG-772 Easytag™ express protein labeling Mix, 35S-(Met+Cys) was obtained from PerkinElmer Life Sciences, Inc. (Boston, USA). Pfu Turbo DNA polymerase and buffer were obtained from Stratagene Europe and dNTP Mix from Gibco (Life Technologies). Pure plasmid DNA preparations were obtained with GenElute Endotoxin-Free plasmid Midi-prep Kit from Sigma Chemical CO (St Louis, USA). Rabbit anti-calnexin polyclonal antibody (SPA-860), rabbit anti-ERp57 polyclonal antibody (SPA-585), Mouse anti-Hsp70 monoclonal antibody (SPA-822) and rabbit anti-Grp78 (BiP) polyclonal antibody (SPA-826) were obtained from Stressgen (Victoria, Canada). The full-length cDNA coding for the CNX was cloned into the Ap<sup>r</sup>M8 vector (6). The human Erp57-pBK-CMV vector was a gift from B. Bourdi (7). The BiP wild type pMT and the BiP-T37G pMT expression vectors were a gift from Dr L. Hendershot (8)

### *Site directed mutagenesis and plasmid constructs*

pcDNA3-hTPO encoding new N-glycosylation sites was obtained using QuickChange™ site directed mutagenesis kit (Stratagene). The consensus sequences for adding an N-glycosylation site in position 35 (hTPO-NG35) or position 61 (hTPO-NG61) were obtained by substituting Glu35 for an Asn, (sense primer: 5'-CTCCTTTGGGGAAAGCCTAAACGAG

TCTCGTGTCTCTA-3', and antisense primer 5'-GCTAGAGACACGAGACTCGTTAGGC

TTTCCCAAAGGAG-3'), and by substituting Lys63 for a Ser, (sense primer: 5'-CCAGCATGCAGAGAAACCTCTCGAAAAGAGGAATCCTTTCTG3', and antisense primer 5'-CAGAAAGGATTCTCTTTTCGAGAGGTTTCTCTGCATGCTGG-3'), respectively.

### *Cell culture and transfection procedure*

The parental CHO cell line (DUKX-B11 cells) and cells overexpressing BiP (BiP-CHO cells) (a generous gift from A. Dorner) have been previously described (9). DUKX cells were kept in alpha medium containing 10% fetal bovine serum, penicillin (100 IU/ml), streptomycin (0.1 mg/ml), and 10  $\mu$ g/ml of adenosine, deoxyadenosine and thymidine. BiP-CHO cells were maintained in the same medium with FBS, without nucleotides but supplemented with  $10^{-7}$  M methotrexate. Cells were incubated in a saturated atmosphere (5% CO<sub>2</sub>-95% air) at 37°C. Cells were transfected with pcDNA3-hTPO, pcDNA3-hTPO-NG35 or pcDNA3-hTPO-NG61 using lipofectAMINE PLUS reagent, and then selected with G418 (400  $\mu$ g/ml) in order to obtain a pool of cells overexpressing hTPO.

CHO cells and stably transfected hTPO-CHO cells were grown in HAM'S-F12 medium supplemented with 10% FBS and protease inhibitor cocktail (Sigma) in a saturated atmosphere (5% CO<sub>2</sub>-95% air) at 37°C. Cells were transiently transfected with ERp57, CNX, BiP or BiP-T37G plasmid constructs using lipofectAMINE PLUS reagent according to the manufacturer's instructions.

### *Specificity of the monoclonal antibodies (mAb) directed against hTPO*

To discriminate between different populations of hTPO molecules differing in their three-dimensional structures, two mAbs were used, namely mAb15 and mAb47 (10). The mAb 47 recognizes a linear epitope and it has been previously established that this mAb does not recognize hTPO when this molecule has acquired a partially or a completely folded form (5). The mAb15 recognizes a three-dimensional epitope in the hTPO and is therefore unable to recognize unfolded hTPO molecules. Immunoprecipitation experiments were performed using these antibodies complexed with proteinA-sepharose beads (Zymed Laboratories INC, CA) for 3 h at room temperature in hTPO-extraction buffer containing 1% Triton X-100, 0.3% sodium deoxycholate, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.15 M NaCl, 20 mM N-ethylmaleimide, and protease inhibitor cocktail.

### *Pulse-chase experiments and extraction of hTPO*

The cells (in dishes of 9.6 cm<sup>2</sup>) were preincubated for 2 h in Met and Cys free DMEM supplemented with 10% dialyzed FBS, and with 10 mM sodium butyrate, and pulsed for 30 min in the same medium supplemented with <sup>35</sup>S-(Met+Cys) (66  $\mu$ Ci/ml). After the pulse step, the radiolabeled medium was removed and the cells were washed twice in PBS, and then chased for various times in culture medium

supplemented with 5 mM Met and 5 mM Cys. When the chase was completed, cells were washed twice with 2 ml ice-cold PBS and then scraped off into 600  $\mu$ l of hTPO-extraction buffer. Cells were then tumbled for 20 min at 4°C and centrifuged for 3 min at 10,000 g. The radiolabeled supernatants obtained were incubated for 2 h at room temperature with previously prepared mAb15- or mAb47-protein A-Sepharose complexes. Immune complexes were retrieved by briefly centrifuging the preparation and washing it 4 times with 1 ml of hTPO extraction buffer and once with 1 ml of PBS. They were then reduced and denatured, and after being centrifuged, the samples were subjected to SDS-PAGE (7.5%) electrophoresis. The radioactivity associated with the hTPO bands was detected and quantified using a phosphorimager (Fudjix BAS 1000, Japan, or GS-363 Molecular Imager System, BioRad).

#### *Sequential immunoprecipitation procedure*

Metabolic labeling and immunoprecipitation were performed as described above, except that 1% CHAPS was used instead of 1% Triton X-100 and 0.3% sodium deoxycholate in the extraction buffer and for the binding step between anti-BiP and anti-Hsp70 antibodies and protein A-Sepharose. CHO-hTPO cells were incubated for 2 h with 10 mM sodium butyrate and radiolabeled for 30 min with  $^{35}$ S-(Met+Cys). The immunoprecipitation step with the first antibody (anti-BiP or anti-Hsp70) was performed as described above. After the first immunoprecipitation step, the proteins were separated from the protein A-Sepharose pellet by heating it for 5 min at 100°C after adding 10  $\mu$ l 10% SDS diluted with 500  $\mu$ l CHAPS buffer. After a 3-minute centrifugation at 10,000 g, the protein A-Sepharose pellet was discarded, and the supernatant was incubated overnight at 4°C with the two associated anti-hTPO mAbs (mAbs 15 and 47) preabsorbed on protein A-Sepharose beads. After immunoprecipitation and a washing step, the second precipitates were resuspended in Laemmli buffer, boiled for 5 min, and then loaded onto SDS-PAGE.

#### *Cell surface biotinylation*

hTPO-CHO and BiP-CHO confluent monolayers were metabolically labeled for 5h, 16h or 48h with 66  $\mu$ Ci/ml  $^{35}$ S-(Met+Cys) in the presence of 10 mM sodium butyrate, and cell surface biotinylation was performed as previously described (2). Cells were washed twice with PBS supplemented with 1mM CaCl<sub>2</sub> and 1mM MgCl<sub>2</sub> and exposed to a 0.5 mg/ml Immunopure NHS-SS-Biotin (Pierce, Oud Beijerland, The Netherlands) for 20 min at 4°C. The cross-linker was removed and the same procedure repeated once. The

biotin reagent was quenched by incubating the preparation with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS for 10 min at 4°C. Cells were washed with PBS and harvested. To recover the immunoprecipitated antigens, we supplemented the complexes with 10 μl of 10% SDS, boiled the mixture for 5 min, diluted it with 600 μl of hTPO-extraction buffer and centrifuged it (10,000 x g, 3 min). Supernatant containing total hTPO was incubated for 2h with avidin-agarose (Pierce, Oud Beijerland, The Netherlands). Biotinylated surface TPO and intracellular hTPO were separated by centrifugation (10,000 x g, 10 s). The beads were washed 4 times with hTPO-extraction buffer and once with PBS, resuspended in electrophoresis buffer and boiled for 5 min. The supernatants were analyzed by SDS-PAGE.

#### BiP score algorithm

Potential BiP-binding site on the hTPO were identified by a computer algorithm as determined by Blond-Elguindi et al (11).

## RESULTS

### *Interaction between hTPO and BiP*

Proteins synthesized at the ER level interact after their translocation with several molecular chaperones. We previously established that hTPO interacts with calnexin (CNX) and calreticulin (CRT) and that these interactions are required for the correct folding of this glycoprotein to occur (3). BiP, one of the other main molecular chaperones present in the ER, which is a member of the Hsp70 family, has been reported to interact with numerous glycoproteins. To determine whether BiP participates in the folding and/or retention of the hTPO in the ER, we screened hTPO-CHO cells. Cells were incubated for 30 min with 35S-(Met+Cys) and cell extracts were then immunoprecipitated with antibodies directed against BiP or with Hsp70. Numerous proteins were associated with both of these molecular chaperones (Fig. 1, lanes 2 and 5). The results obtained after performing a second immunoprecipitation step using mAbs directed against hTPO showed that hTPO interacted with BiP and Hsp70 (Fig. 1, lanes 3 and 6). Hsp70 is located in the cytoplasm but it is known that transmembrane protein can interact with Hsp70 and Hsp90 via its cytoplasmic domain (12).

In order to investigate whether BiP contributes to the folding of hTPO, we used a CHO cell line overexpressing five times more BiP than a parent cell line (9) and we stably transfected the cDNA of the hTPO into these two cell lines. The folding of hTPO was followed by pulse-chase experiments. After a 30-min pulse with 35S-(Met+Cys), hTPO was immunoprecipitated by either mAb15 or mAb47 (see the specificity of these two monoclonal antibodies in Material and Methods) (Fig. 2A and B). Quantification of these bands showed no significant differences in the rate of disappearance of the unfolded form of hTPO recognized by the mAb47 (mAb47+ forms) (Fig. 2C). In the parental cells, after 5 h of chase, 40% of the hTPO synthesized acquired a structure which was recognized by mAb15 (mAb15+ forms) (Fig. 2D). In cells overexpressing BiP, this population decreased and was approximately 50% lower than in the parent cells at all the chase times used.

In order to check whether the decrease in the formation of mAb15+ forms in the hTPO-BiP-CHO cells may have affected the hTPO level present at the cell surface, we incubated these cells and the parental cells in the presence of 35S-(Met+Cys) for 48 h, and the hTPO present at the cell surface was separated from the intracellular hTPO by cell surface biotinylation. Surprisingly, no changes were detected in the hTPO present at the cell surface. The fact that approximately 30% of the total hTPO was consistently recovered at the cell surface (Fig. 3) indicated that the overexpression of BiP did not modify the relative rate of hTPO cell surface expression.

Interactions of protein and molecular chaperones occur in the ER cotranslationally and are a prerequisite for the folding and proper formation of disulfide bonds via PDI family proteins associated with the chaperones. In the case of several proteins, cotranslational disulfide bond formation, folding and oligomerization of protein within the ER are known to be reversibly inhibited when a reducing agent is added (13-15). In order to see whether the formation of a completely unfolded form of hTPO might be reversed differently in parent cells and in cells overexpressing BiP, hTPO-parent cells and hTPO-BiP cells were pulsed in the presence of 35S-(Met+Cys) and dithiotreitol (DTT) and then chased for various times in a culture medium with no radioactivity and DTT. The hTPO was then immunoprecipitated with either mAb47 or mAb15. As was to be expected, DTT decreased the percentage of the partially folded mAb15+ forms recovered at the end of the pulse step and practically all the hTPO was unfolded and immunoprecipitated with mAb47 (Fig. 4). In the parental cell line, 40% of the 35S-hTPO was in the mAb+15 form after 5h of chase, whereas the cells overexpressing BiP showed levels of mAb15+ forms which were at least 2.5 times lower throughout the chase than those recorded in parental cells. These results

indicate that cotranslational formation of disulfide bridges is not necessary for the hTPO to fold correctly, and also confirm that BiP interact negatively in the folding of hTPO.

The results obtained with the BiP-overexpressing CHO cells suggest that BiP may drive hTPO along the degradation pathways rather than contributing to its maturation processes. To study more closely the role of the BiP in the folding and/or degradation of hTPO, pulse-chase experiments were performed using wild-type BiP and BiP ATPase mutant T37G. The latter mutant was able to bind to protein, but was unable to release its substrates after the binding of ATP, and the folding of the substrate protein was therefore not completed (16). Transfection of BiP cDNA into CHO cells led to 1.7-fold expression of BiP (Fig. 5A), and transfection of Bip-T37G cDNA led to the expression of the mutant and to a decrease in the endogenous BiP, as can be seen from the lower and upper bands, respectively, in Figure 5A, along with a 1.5-fold increase in the total BiP. This small increase in total BiP was due to a feedback regulation exerted by the protein translation efficiency (17). Under these conditions, the mAb15+ forms retrieved after 5 h of chase from CHO-TPO cells overexpressing BiP wild type decreased by 15% (Figures. 5B and E). In the presence of BiP-T37G, the maturation process was more severely impaired and decreased by 25% (Fig. 5 B and C). However, this decrease was less pronounced than that obtained with the Dorner's BiP-CHO cells, probably because the latter cells overexpress BiP more efficiently (5-fold as compared with 1.5-fold). These results strongly suggest that by promoting the degradation of the newly synthesized forms, the stable binding of BiP to hTPO reduces the folding ability of hTPO.

#### *Effect of calnexin and ERp57 on the folding of hTPO*

In a previous study, we reported that the binding of CNX and CRT to hTPO is a prerequisite for the initial molecular folding step to be possible (3). It has by now been established that CNX and CRT interact with ERp57, a thiol oxido-reductase belonging to the PDI family (for a review, see (18)). One possible explanation for the incomplete folding of hTPO occurring in cells overexpressing CNX might be the low level of ERp57 in comparison with the level of CNX in the CNX-hTPO-CHO cells. In order to test this hypothesis, we transiently expressed CNX and ERp57 in the hTPO-CHO cells. Under these conditions, the expression of CNX and ERp57 was increased 25-fold and 7-fold, respectively (Fig.6). Pulse-chase experiments were then performed in the presence of 35S-(Met-Cys) and hTPO was immunoprecipitated with either mAb47 or mAb15 (Fig.7A and B). In our previous study, we observed that overexpression of CNX increased the overall quantity of hTPO after the pulse. In the present study, the unfolded and

partially folded forms were also recovered in larger amounts at the end of the pulse step (Fig. 7C and D). However, this overexpression did not affect the relative proportions of the two forms (Fig. 7E and F).

#### *Competition between calnexin and BiP*

It is known that the correct folding of protein required several association/dissociation cycles with different chaperone proteins (for review see (19)). Moreover Molinari and Helenius showed that during the process of synthesis, glycoproteins can first interact with either CNX, CRT or BiP and that the chaperone selected depends on the position of the first N-glycan, because CNX and CRT interact with this N-glycan (20). If the first N-glycan is located among the 50 first amino acids, the protein will be associated with CNX or CRT, but if the glycan is farther away from the N-terminal end, the protein can associated with BiP.

The data obtained here, along with those obtained in our previous study (3), show that hTPO interacts with these three molecular chaperones and that these interactions lead to the folding of the glycoprotein in the case of CNX, and to its degradation in the case of BiP. The first hTPO N-glycan is located on the Asn129. BiP bound to hepta- or octapeptide containing mainly aliphatic residues (21). A BiP-binding site algorithm adapted from that obtained using the Blond-Elguindi method (11) was applied to the hTPO sequence. This program predicted the amino acid sequence liable to stimulate the ATPase activity of BiP, which was consistent with the effective binding of BiP to the target protein.

The results of the latter simulation showed that the hTPO contained many peptides with suitably high BiP scores throughout its sequence (data not shown). Most interestingly, the first 200 residues in the hTPO sequence carried several of these appropriate binding sites, and four of them had scores ranging between 10 and 20 (Fig. 8). In addition, three of these very strongly predictive BiP binding sites, at positions 80, 113 and 133 in the hTPO sequence, were located upstream of or very near the first potential N-glycosylation site in the hTPO, located at the Asn129 level.

In order to favor interactions between hTPO and CNX or CRT, we performed mutagenesis to add an N-glycosylation site in position 35 or 61. These two cDNAs were transfected into a CHO cell line. After the transfection process, cells were incubated in the presence of 35S-(Met+Cys) for 5h and hTPO was then immunoprecipitated using either mAb15, mAb47 or mAb15 + mAb47 (Fig.9A). hTPO-NG35 and hTPO-NG61 immunoprecipitated with mAb47 were found to have a slightly greater apparent molecular weight



than the wild type hTPO (~ 3 kDa), which is consistent with the presence of an additional N-glycan (Fig. 9A lanes 4, and 7 versus lane 1).

After immunoprecipitation with mAb15 and with mAb47 + mAb15, an additional band with a greater molecular weight was observed (Fig. 9A lanes 2, 3, 5, 6, 8, 9, upper arrow). This high molecular weight band was more apparent in the case of hTPO-NG61 (Fig. 9A lane 9). In fact the addition of an N-glycan in position 61 certainly inhibited the cleavage of a prosequence in hTPO (22) and yielded a higher molecular band typical of a glycoprotein bearing complex type.

In order to determine whether adding an N-glycan in position 35 or 61 affects the folding of hTPO and especially, its ability to acquire the three-dimensional structure recognized by mAb15, the hTPO molecules obtained after 5h of labeling with  $^{35}\text{S}$ -(Met+Cys) were immunoprecipitated and analyzed by SDS-PAGE (Fig. 9B). Upon quantifying these bands, no changes were found to have occurred in the relative proportions of the mAb47+ and mAb15+ forms (Fig. 9C). The presence of hTPO at the cell surface after adding one N-glycan was checked by performing cell surface biotinylation. This addition does not affect the intracellular trafficking of hTPO. In all these studies, approximately 20-25% of the hTPO was recovered at the cell surface after metabolic labeling for 5h (data not shown) and 50% after metabolic labeling for 16h (Fig. 9D). It therefore does not seem likely that adding an N-glycan near the N-terminal end of the glycoprotein affected its folding or cell trafficking properties.

## DISCUSSION

In eukaryotic cells, the fidelity of protein production process is monitored by quality control machinery (for a review, see (23)). This process is an extremely complex one and seems to differ from one (glyco)protein to another and from one cell line to another. In this paper, we provide new insights into the role played by BiP in the folding of hTPO.

In a first part of the present study, hTPO was found to interact with Hsp70 and BiP. In the present study we focused on the interactions between hTPO and BiP. This latter belongs to the Hsp70 family and is one of the most important ER molecular chaperones. It binds to newly synthesized protein, assists its translocation (see for review (24)), and also contributes to protein folding and assembly in cooperation with

the protein disulfide isomerase (25). On the other hand, BiP seems to be also essential to the transport of the unfolded polypeptides back across the membrane (26).

In order to ascertain whether BiP contributes importantly to the hTPO folding process, we performed studies using a CHO line overexpressing this molecular chaperone (9). Contrary to what has been found to occur with CNX (Fig.6 and (3)), BiP was found to have negative effects on the folding of this glycoprotein (Fig. 2). In the case of other glycoproteins, BiP can have either positive (27, 28) or negative effects (29-31) on the folding process. It has been established that BiP protects some proteins, such as immunoglobulin light chains, from degradation, and that BiP must be released from the protein for complete protein folding to occur (28). Positive effects of BiP on the protein folding process can be assessed using BiP ATPase mutants, because these mutants are not released and the protein is therefore unable to undergo complete disulfide bond formation (8). In the present study, the presence of BiP ATPase mutant T37G also led to a decrease in the folding of the hTPO. The fact that this negative effect was not much greater than that observed with the BiP (Figure 5) confirms the negative effect of this latter. In order to examine whether the inhibition of disulfide bridge formation affected the folding of hTPO and its interaction with molecular chaperones, experiments were performed in the presence of DTT. The oxidative environment maintained in the ER is necessary for proteins containing disulfide bridges to fold properly. The presence of a reducing agent can lead to the formation of a fully reduced form, and then to an unfolding form of these proteins. The effects of reducing agents have been described in the case of numerous proteins (13-15). Adding DTT or 2-mercaptoethanol results in the accumulation of unfolded forms of proteins in the ER, but if the reducing agents are removed, the proteins can acquire a proper three-dimensional structure (14, 32, 33). When hTPO was synthesized in the constant presence of DTT, this glycoprotein did not fold correctly and was quickly degraded (data not shown). However, when hTPO was pulse labeled in the presence of <sup>35</sup>S-(Met+Cys) and DTT before being chased in the absence of the reducing agent, hTPO was able to form apparently normal post-translational disulfide bonds (Fig. 3A and B). However, it is worth noting that the proportion of the hTPO able to acquire a conformation recognized by mAb15 decreased in comparison with that obtained without any DTT (Fig. 4B versus 2B). This difference may have been due to the fact that during the pulse, the degradation of the mAb47+ form is a faster process (Fig. 4A versus 2A). When similar experiments were performed on the CHO cells overexpressing BiP, the formation of correctly folded hTPO decreased 2.5-fold after 5h of chase. These

data indicate that the increased binding rate of BiP did not enhance the folding of the protein but led rather to its degradation, and thus confirm the fact that BiP had negative effects on the folding of hTPO.

In a previous study (3), we reported that the binding step with CNX and/or CRT is crucial to the folding of hTPO, as well as protecting hTPO from being degraded by the proteasome. The results of the present study confirm this fact and show that the overexpression of CNX and Erp57 increase the quantity of hTPO obtained at the end of the pulse step by stabilizing the protein immediately after its synthesis. The role of CNX, like that of BiP, can vary depending on the protein involved. It has been found to increase the folding rate (34, 35), to stabilize unfolded glycoproteins (36, 37) and to cause glycoproteins to be degraded by the proteasome (38). It is therefore obvious that the presence of a specific molecular chaperone can be crucial to the correct folding of a glycoprotein.

A few years ago, Molinari and Helenius described the competitive process occurring between the CNX pathway and the BiP pathway during the translocation of a newly synthesized glycoprotein (20), and it has been established that in the case of some glycoproteins, CNX and BiP can act sequentially (39, 40). Our own results have shown that CNX and CRT are necessary for hTPO to fold properly and that the binding of hTPO to BiP impairs the folding process. As the position of the first N-glycan might determine the choice of the first chaperone to be bound (20) and as the interactions with CNX or CRT increase when this N-glycan is present within the first 50 residues of the NH<sub>2</sub>-terminal sequence, we performed mutagenesis to add an N-glycosylation site in position 35 or 61. These sites were glycosylated but the folding and intracellular trafficking of these forms were not greatly improved in comparison with the wild type hTPO. Unfortunately, in our system, because low levels of interaction were not detectable, it was not possible to assess whether adding an N-glycan to the N-terminal part of the protein led to an increase in the rate of CNX and CRT binding to hTPO. However, the results of the present study show that adding an N-glycan to the first 50 N-glycans did not suffice to improve the folding of all the glycoprotein in which are required to bind to CNX or CRT.

In other systems, the addition or the presence of an N-glycan in the N-terminal part of a glycoprotein can enhance the secretion but the exact role of these N-glycans has not yet been elucidated (41). On the other hand, it has by now been clearly established that CNX can interact with both glycosylated and non-glycosylated proteins (42, 43). In the latter case, the competition between CNX and BiP will not be glycan dependent. As far as hTPO is concerned, we previously reported that the inhibition of the binding to CNX

induced by castanospermine led to the rapid degradation of hTPO. This finding strongly suggests that the interaction between hTPO and CNX (takes place via) is mediated by the N-glycans.

From the results of all these experiments it is not really clear whether the first chaperone that binds to hTPO during its translocation into the ER is a crucial requirement for the folding of hTPO, or whether the presence of other BiP and CNX binding sites may be a more decisive factor. However, the fact that introducing an N-glycosylation site near the N-terminal end of hTPO did not increase the percentage of correctly folded protein seems to indicate that the first binding site does not play a critical role in this folding process. All these results therefore show that the balance between the expression of BiP and CNX (or CRT) determines the stability and the folding of hTPO at the ER level; these two chaperones compete for the possibility of binding to neosynthesized hTPO and drive it to either the maturation or degradation pathway.

**ACKNOWLEDGMENT** This research was supported by the “Ligue Nationale contre le Cancer” (grant to J.L.F.), INSERM (U555), CNRS, and Université de la Méditerranée (UMR6544). During this research, V.L.F. was supported by the “Association pour le Développement des Recherches Médicales” and the “Fondation pour la Recherche Médicale”. We thank N. Julien for the BiP score program. We thank B. Rapoport for providing full-length hTPO, J. Ruf for providing hTPO mAbs, J. Dorner for providing DUKX- and BiP-CHO cells, LM Endershot for providing pMT-BiP and pMT-BiP T37G, and MB Brenner for providing Ap<sup>M8</sup>-CNX

## REFERENCES

1. Ekholm, R. (1981) *Mol Cell Endocrinol* 24, 141-63.
2. Fayadat, L., Niccoli-Sire, P., Lanet, J., and Franc, J. L. (1998) *Endocrinology* 139, 4277-85.
3. Fayadat, L., Siffroi-Fernandez, S., Lanet, J., and Franc, J. L. (2000) *Endocrinology* 141, 959-66.
4. Fayadat, L., NiccoliSire, P., Lanet, J., and Franc, J. L. (1999) *J Biol Chem Vol 274, Iss 15*, 10533-10538.
5. Fayadat, L., Siffroi-Fernandez, S., Lanet, J., and Franc, J. L. (2000) *J Biol Chem* 275, 15948-54.
6. Rajagopalan, S., Xu, Y., and Brenner, M. B. (1994) *Science* 263, 387-90.
7. Bourdi, M., Demady, D., Martin, J. L., Jabbour, S. K., Martin, B. M., George, J. W., and Pohl, L. R. (1995) *Arch Biochem Biophys* 323, 397-403.
8. Hendershot, L., Wei, J., Gaut, J., Melnick, J., Aviel, S., and Argon, Y. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5269-74.
9. Dorner, A. J., Wasley, L. C., and Kaufman, R. J. (1992) *Embo J* 11, 1563-71.
10. Ruf, J., Toubert, M. E., Czarnocka, B., Durand-Gorde, J. M., Ferrand, M., and Carayon, P. (1989) *Endocrinology* 125, 1211-8.
11. Blond-Elguindi, S., Cwirla, S. E., Dower, W. J., Lipshutz, R. J., Sprang, S. R., Sambrook, J. F., and Gething, M. J. (1993) *Cell* 75, 717-28.
12. Strickland, E., Qu, B. H., Millen, L., and Thomas, P. J. (1997) *J Biol Chem* 272, 25421-4.
13. Alberini, C. M., Bet, P., Milstein, C., and Sitia, R. (1990) *Nature* 347, 485-7.
14. Lodish, H. F., and Kong, N. (1993) *J Biol Chem* 268, 20598-605.

15. Kaji, E. H., and Lodish, H. F. (1993) *J Biol Chem* 268, 22195-202.
16. Wei, J., Gaut, J. R., and Hendershot, L. M. (1995) *J Biol Chem* 270, 26677-82.
17. Gulow, K., Bienert, D., and Haas, I. G. (2002) *J Cell Sci* 115, 2443-2452.
18. Ellgaard, L., and Helenius, A. (2001) *Curr Opin Cell Biol* 13, 431-7.
19. Ellgaard, L., Molinari, M., and Helenius, A. (1999) *Science* 286, 1882-8.
20. Molinari, M., and Helenius, A. (2000) *Science* 288, 331-3.
21. Flynn, G. C., Pohl, J., Flocco, M. T., and Rothman, J. E. (1991) *Nature* 353, 726-30.
22. Le Fourn, V., Ferrand, M., and Franc, J. L. (2004) *J Biol Chem*.
23. Trombetta, E. S., and Parodi, A. J. (2003) *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 649-76.
24. Gething, M. J. (1999) *Semin Cell Dev Biol Vol 10, Iss 5*, 465-472.
25. Mayer, M., Kies, U., Kammermeier, R., and Buchner, J. (2000) *J Biol Chem* 275, 29421-5.
26. Chillaron, J., and Haas, I. G. (2000) *Mol Biol Cell* 11, 217-26.
27. Robinson, A. S., Bockhaus, J. A., Voegler, A. C., and Wittrup, K. D. (1996) *J Biol Chem* 271, 10017-22.
28. Lee, Y. K., Brewer, J. W., Hellman, R., and Hendershot, L. M. (1999) *Mol Biol Cell Vol 10, Iss 7*, 2209-2219.
29. van der Heide, M., Hollenberg, C. P., van der Klei, I. J., and Veenhuis, M. (2002) *Appl Microbiol Biotechnol* 58, 487-94.
30. Siffroi-Fernandez, S., Giraud, A., Lanet, J., and Franc, J. L. (2002) *Eur J Biochem* 269, 4930-7.
31. Watson, L. M., Chan, A. K., Berry, L. R., Li, J., Sood, S. K., Dickhout, J. G., Xu, L., Werstuck, G. H., Bajzar, L., Klamut, H. J., and Austin, R. C. (2003) *J Biol Chem* 278, 17438-47.
32. Allen, S., Naim, H. Y., and Bulleid, N. J. (1995) *J Biol Chem* 270, 4797-804.

33. Braakman, I., Helenius, J., and Helenius, A. (1992) *Embo J* 11, 1717-22.
34. Bass, J., Chiu, G., Argon, Y., and Steiner, D. F. (1998) *J Cell Biol Vol 141, Iss 3*, 637-646.
35. Conesa, A., Jeenes, D., Archer, D. B., van den Hondel, C. A., and Punt, P. J. (2002) *Appl Environ Microbiol* 68, 846-51.
36. Wilson, C. M., Farmery, M. R., and Bulleid, N. J. (2000) *J Biol Chem* 275, 21224-32.
37. Vassilakos, A., Cohen-Doyle, M. F., Peterson, P. A., Jackson, M. R., and Williams, D. B. (1996) *Embo J* 15, 1495-506.
38. Cabral, C. M., Choudhury, P., Liu, Y., and Sifers, R. N. (2000) *J Biol Chem* 275, 25015-22.
39. Hammond, C., and Helenius, A. (1994) *Science* 266, 456-8.
40. Kim, P. S., and Arvan, P. (1995) *J Cell Biol* 128, 29-38.
41. Wenzel-Seifert, K., and Seifert, R. (2003) *Biochem Biophys Res Commun* 301, 693-8.
42. Leach, M. R., and Williams, D. B. (2003) *J Biol Chem*.
43. Swanton, E., High, S., and Woodman, P. (2003) *Embo J* 22, 2948-58.

## FIGURE CAPTIONS

**Figure 1.** Coimmunoprecipitation of hTPO with BiP and Hsp70. hTPO-CHO cells were incubated for 30 min with 35S-(Met+Cys) in DMEM without Met and Cys and supplemented with 10% FBS and 10 mM sodium butyrate. Antibodies against Hsp70 (lanes 1-3) or BiP (lane 4-6) were used to immunoprecipitate detergent cell extracts. After being eluted from protein A–Sepharose, the supernatant was run on 7.5% SDS-PAGE (lanes 2 and 5) or was immunoprecipitated using mAb15 and mAb47 (lanes 3 and 6) or a mAb directed against thyroglobulin (lanes 1 and 4). Samples were run on 7.5% SDS-PAGE, and the bands were detected with a phosphorimager.

**Figure 2.** Effects of BiP overexpression on the folding of hTPO in CHO cells. A cell line overexpressing BiP (BiP-CHO cells; Fig.2 B; ●) and the parental cell line (DUKX cells; Fig.2A; ○) were transfected with hTPO-pcDNA3. After 48 h, pulse-chase analysis was performed. Cells were preincubated for 2 h in Met- and Cys-free medium supplemented with 10% dialyzed FBS and 10 mM sodium butyrate, and then pulsed for 30 min in the same culture medium supplemented with 66  $\mu$ Ci of 35S-(Met+Cys)/ml. After the pulse, cells were chased for various times in Ham-F12 medium, 10% FBS supplemented with 5 mM Met and 5 mM Cys. Immunoprecipitation was performed using mAb47 (A, B, and C) or mAb15 (A, B and D). Samples were separated by SDS-PAGE analysis, and the radioactivity was detected and quantified using a phosphorimager device. This figure gives the results of an experiment that is representative of three identical experiments performed.

**Figure 3.** Cell surface expression of hTPO in cells overexpressing BiP. Cells were incubated in DMEM without Met and Cys and supplemented with 10% FBS and 10mM sodium butyrate, and then radiolabeled for 48 h with 35S-(Met + Cys). Cells monolayers were then incubated with NHS-SS-biotin as described in Materials and Methods, and after an extraction step the hTPO was immunoprecipitated with mAb15 + mAb47. Intracellular and cell surface hTPO were separated with avidin agarose. Samples were analyzed by



performing SDS-PAGE and the bands corresponding to hTPO were quantified with a phosphorimager device. Parental cell line (white bars); cells overexpressing BiP (black bars). Values are means $\pm$ SEM of three different experiments.

**Figure 4.** Processing of hTPO in the presence of DTT in cells overexpressing BiP or parental cells. A cell line overexpressing BiP (BiP-CHO cells; Fig. 2B; ●) and the parent cell line (DUKX cells; Fig. 2A; ○) were transfected with hTPO-pcDNA3. After 48 h, pulse-chase analysis was performed. Cells were preincubated for 2 h in Met- and Cys-free medium supplemented with 10% dialyzed FBS, 10 mM sodium butyrate and 10 mM DTT, and then pulsed for 30 min in the same culture medium supplemented with 66 $\mu$ Ci of 35S-(Met+Cys)/ml. After the pulse, cells were chased for various times in Ham-F12 medium, 10% FBS supplemented with 5 mM Met and 5 mM Cys. Immunoprecipitation was performed using mAb47 (A, B, and C) or mAb15 (A, B and D). Samples were separated by SDS-PAGE analysis, and the radioactivity was detected and quantified using a phosphorimager device. This figure gives the results of an experiment that is representative of three identical experiments performed.

**Figure 5.** Effects of wild-type BiP and ATPase mutant BiP-G37T overexpression on hTPO folding. Stable CHO-TPO cells were transiently transfected with the BiP-WT-pMT plasmid (A; B; C, D, E: ◇), the BiP-T37G-pMT plasmid (A; B; C, D, E: ○) or the empty vector (A; B; C, D, E: □). Western blot analysis was performed on cell lysates with a specific anti-BiP antibody (A). As expected, this antibody recognized the endogenous (lane 1) and transfected BiP wild-type (lane 2) giving a specific band under the 80kDa marker band. As previously described, the BiP-T37G mutant was taken to be one molecular weight higher, based on the difference in N-glycosylation (lane 3). 48 H after the transfection step, pulse chase experiments were performed (B). Briefly, sodium butyrate-preincubated cells placed in the Met- and Cys-depleted medium were pulse labeled for 30 min with 66 uCi of 35S-(Met/Cys)/ml. After the pulse and PBS washing, cells were chased in HAM-F12 medium supplemented with Met and Cys for various times. Immunoprecipitation of cell extracts was performed using mAb47 (B, upper panel; C and D) or mAb15 (B,

lower panel; C and E). Samples were then separated by SDS-PAGE and the radioactivity was detected (B) and quantified (C, D, E) with a phosphorImager device. This figure gives the results of an experiment that is representative of three identical experiments performed.

**Figure 6.** Overexpression of CNX and Erp57 in hTPO-CHO cells. hTPO-CHO cells were transiently transfected with CNX-Ap<sup>r</sup>M8 (A, lanes 2, and 3) and ERp57-pBK-CMV (B, lane 2) plasmids, or empty plasmids (A, lane 1; B, lane 1) using lipofectAMINE PLUS reagent according to the manufacturer's instructions. After 48 h, cells were scraped off and after an extraction step, samples were run on SDS/PAGE. After performing Western blotting, the PVDF membranes were incubated with a CNX- or an ERp57-rabbit polyclonal antibody. After being washed the membranes were incubated with a monoclonal anti-rabbit peroxidase conjugated immunoglobulin. The signal was developed using Super Signal West Dura (Pierce).

**Figure 7.** Effects of CNX and Erp57 overexpression on hTPO folding and stability. hTPO-CHO cells were transiently transfected with either ERp57-pBK-CMV and CNX-Ap<sup>r</sup>M8 plasmids (●) or empty plasmids (○) using lipofectAMINE PLUS reagent according to the manufacturer's instructions. After 48 h, pulse-chase analysis was performed. Cell were preincubated for 2 h in Met- and Cys-free medium supplemented with 10% dialyzed FBS and 10 mM sodium butyrate, and then pulsed for 30 min in the same culture medium supplemented with 66  $\mu$ Ci/ml of 35S-(Met+Cys). After the pulse, cells were chased for various times in Ham-F12 medium, 10% FBS supplemented with 5 mM Met and 5 mM Cys. Immunoprecipitation was performed using mAb47 (A, C, and E) or mAb15 (B, D and F). Samples were separated by performing SDS-PAGE analysis, and the radioactivity was detected and quantified using a phosphorimager device. This figure gives the results of an experiment that is representative of three identical experiments performed.

**Figure 8.** BiP-binding site prediction at the amino-terminal end of hTPO. The BiP score algorithm was applied to the first 200 residues in the hTPO. The score was calculated for each of the eight amino acids and assigned to the fourth residue of the octapeptide. The potential BiP-binding sites were found in the 6 to 10 range (shade box) and the amino-acid positions of highly predictive sites are indicated with arrows. The first potential N-glycosylation site in the hTPO was noted in the Asn129 position. Negative values correspond to unlikely BiP-binding site sequences.

**Figure 9.** Effects of adding of potential N-glycosylation sites on the folding of hTPO. The consensus sequence for added potential N-glycosylation sites in positions 35 (hTPO-NG35) or 61 (hTPO-NG61) were obtained by performing directed mutagenesis. CHO cells were transiently transfected using hTPO-, hTPO-NG35- or hTPO-NG61-pcDNA3 and after 48h, cells were incubated in DMEM without Met and Cys and supplemented with 10% FBS and 10mM sodium butyrate and then radiolabeled with <sup>35</sup>S-(Met+Cys). (A) Cells were radiolabeled for 5 h, then extracted and immunoprecipitation was performed using mAb 47 alone (A, lanes 1, 4, 7), mAb15 alone (A, lanes 2, 5, 8) or mAb47 and mAb15 (A, lanes 3, 6, 9). (B) Cells were radiolabeled for 5 h or 16 h and then incubated with NHS-SS-biotin as described in Materials and Methods, and after an extraction step the hTPO was immunoprecipitated with mAb15 + mAb47. Intracellular and cell surface hTPO were separated with avidin agarose; hTPO (lanes 1, 4, 7, 10), NG35 (lanes 2, 5, 8, 11), NG61 (lanes 3, 6, 9, 12). Samples were analyzed by performing SDS-PAGE analysis and the bands corresponding to hTPO were quantified with a phosphorimager device. (C) Percentage of <sup>35</sup>S-hTPO immunoprecipitated with mAb47 (dotted bar) and with mAb15 (white bar). (D) Percentage of <sup>35</sup>S-hTPO intracellular or cell surface hTPO (Control, white bar; NG35, dotted bar; NG61, hatched bar). Values are means±SEM of three different experiments.

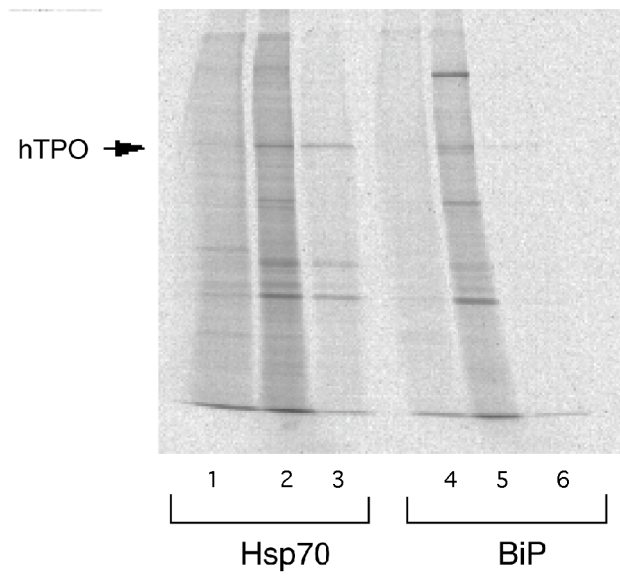


Fig. 1

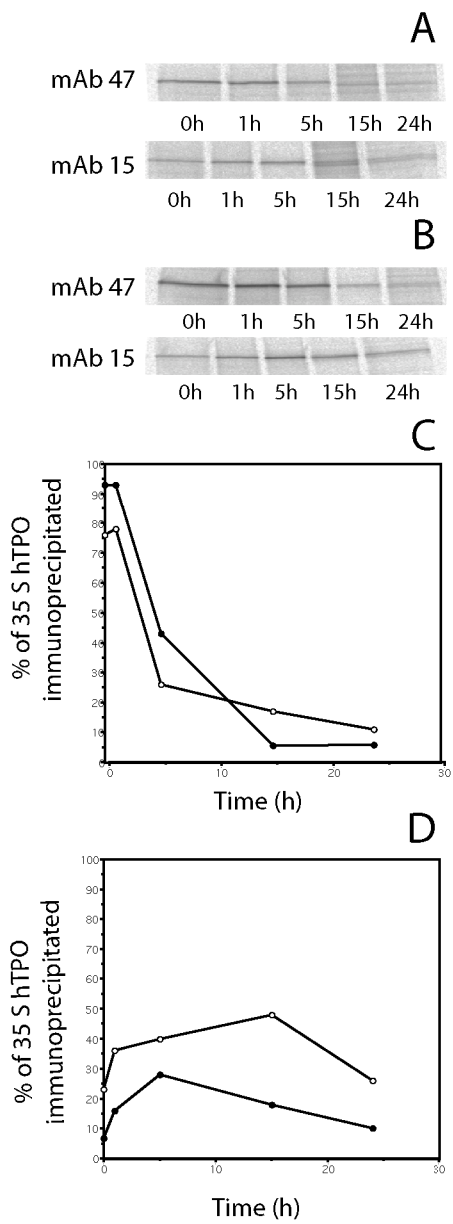


Fig.2

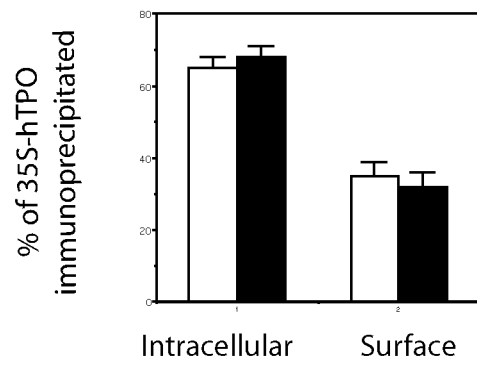


Fig.3

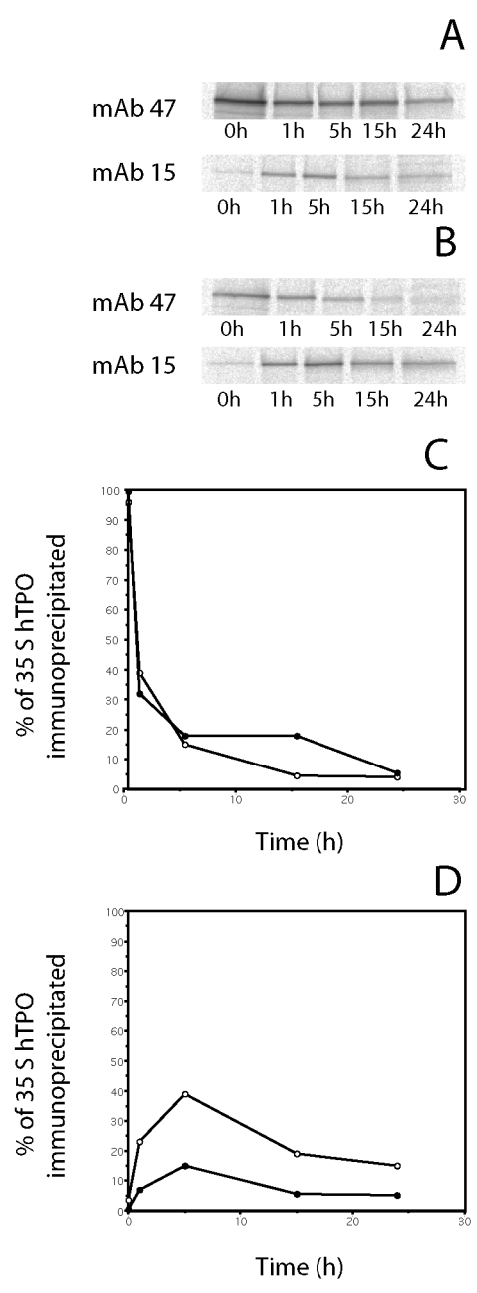


Fig.4

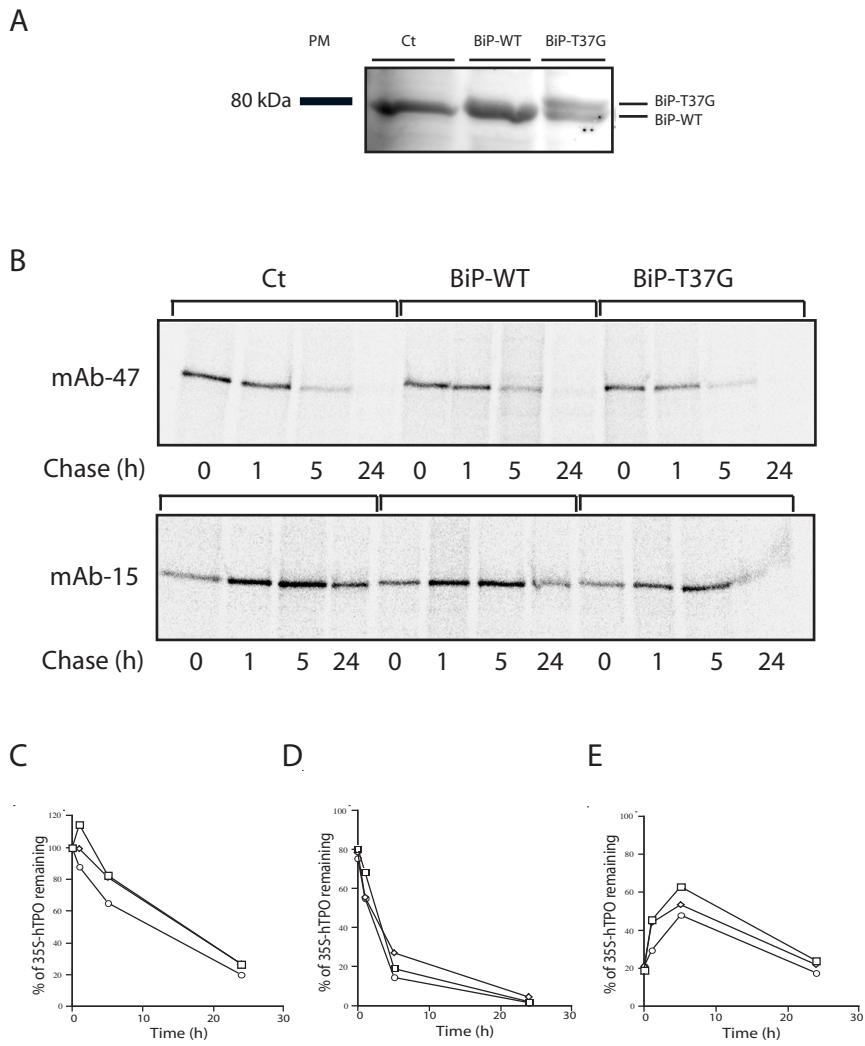


Fig.5



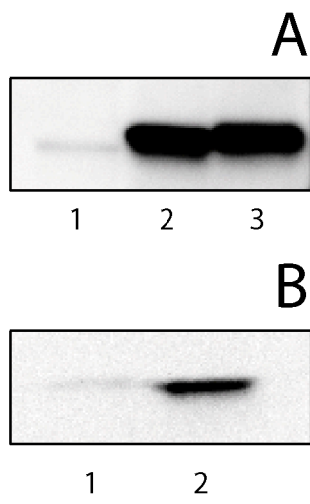


Fig.6

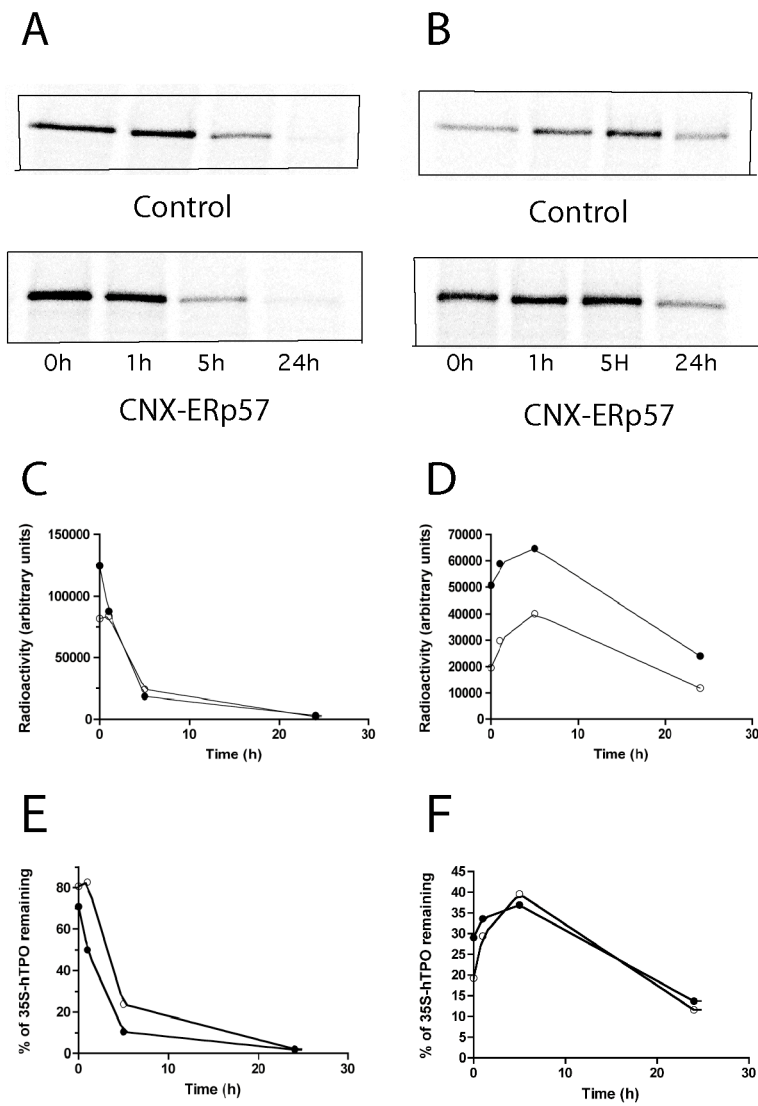


Fig.7

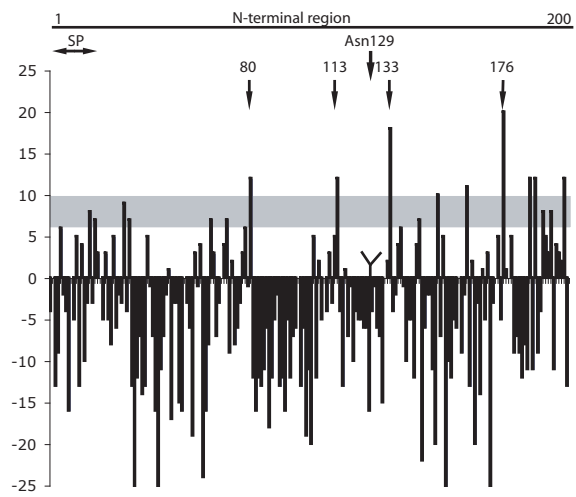


Fig.8

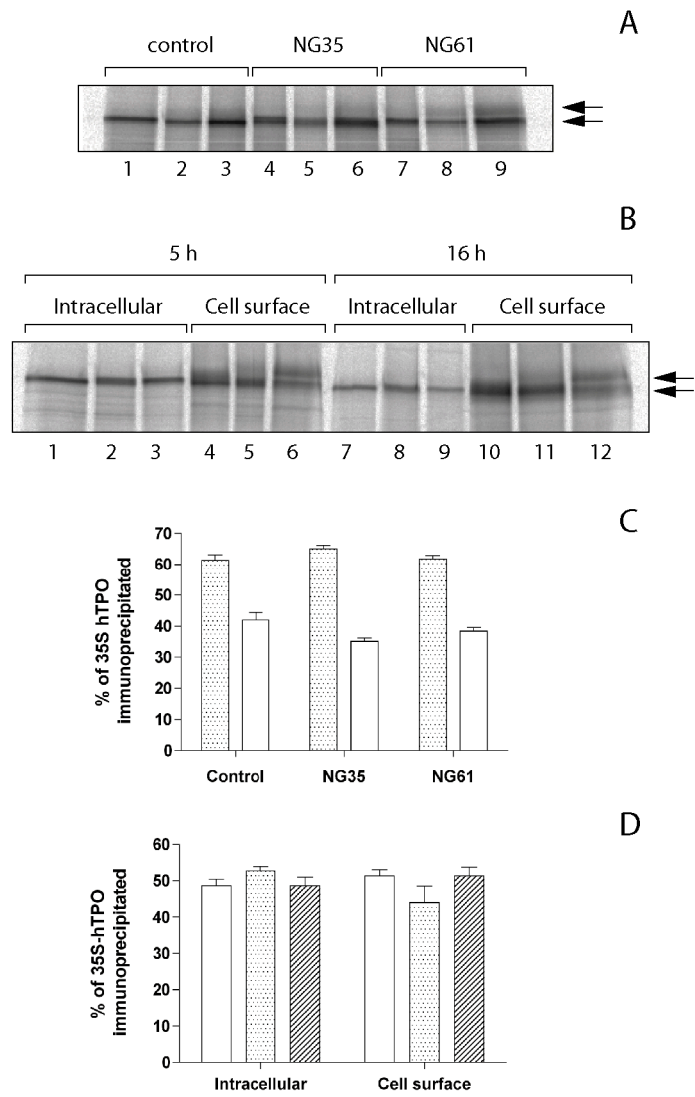


Fig.9

**ARTICLE (IV)*****conclusion***

Les protéines chaperons CNX et BiP interviennent au niveau du CQ du RE. Suivant la protéine considérée, elles peuvent aider au repliement correct ou être impliquées dans la dégradation de cette dernière. De plus elles peuvent agir de manière séquentielle ou entrer en compétition durant le CQ.

Dans ce quatrième article, nous montrons une augmentation significative de la dégradation des formes immunoprécipitées par le mAb15 dans les cellules surexprimant la protéine BiP d'un facteur 5 (cellules CHO-BiP). De plus, à l'inverse de cellules ne surexprimant pas BiP, les CHO-BiP ne sont pas capables de rétablir le taux de TPO correctement repliées lorsqu'elles sont préalablement traitées avec le DTT, un agent réducteur réversible. De même, exprimées en présence d'un mutant de BiP séquestrant les protéines fixées, les formes partiellement repliées de la TPO sont dégradées de manière plus importante. Ces résultats suggèrent donc que la protéine BiP intervient dans le processus de dégradation plutôt que dans le repliement de la TPO.

Dans le but d'augmenter l'efficacité de repliement de la TPO exprimée dans les cellules CHO, nous avons surexprimée la protéine disulfure isomérase ERp57, avec son partenaire chaperon, la CNX, dans les cellules CHO-TPO. Nous montrons que l'augmentation de la quantité d'ERp57 n'augmente pas la proportion des formes correctement repliées de la TPO. Ceci suggère donc que d'autres protéines chaperons et/ou catalyseurs de repliement interviennent dans le processus de repliement correct de la TPO.

La compétition entre la CNX et BiP pour la fixation implique la position du premier site de N-glycosylation présent sur la partie amino-terminale des glycoprotéines. Dans le cas de la TPO, l'ajout de sites de glycosylation dans les 50 premiers résidus de la TPO ne permet pas de favoriser la reconnaissance par la CNX et donc un meilleur repliement de la protéine.

Ces résultats suggèrent que la position du premier site de glycosylation n'est pas cruciale dans le cas de la TPO pour la compétition pour la fixation de la CNX et de BiP et que d'autres partenaires moléculaires de la CNX et de BiP interviennent probablement dans la maturation de la TPO pour l'orienter vers la voie conduisant au repliement correct ou celle aboutissant à la dégradation.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

### I. Recherche des différents transcrits issus de l'épissage alternatif de la thyroperoxydase humaine.

La TPO présente après purification et électrophorèse dénaturante de multiples isoformes protéiques. Les travaux réalisés précédemment pour expliquer cette hétérogénéité protéique ont démontré l'existence de modifications post-transcriptionnelles, par épissage alternatif des précurseurs des ARN messagers de la TPO, ainsi que de modifications post-traductionnelles par glycosylation.

Nous avons dans un premier ensemble de travaux recherché l'existence de transcrits alternatifs non encore identifiés, en réalisant des expériences de transcription inverse suivies de PCR, avec des primers spécifiques de la TPO. Nous avons ainsi mis en évidence deux nouveaux transcrits délétés de l'exon 14, nommé TPO-4 et de l'exon 8, appelé TPO-5. Par la suite, dans le but d'estimer l'expression relative des divers transcrits identifiés jusqu'à ce jour dans la population totale des messagers de la TPO, nous avons réalisé des expériences de RT-PCR semi quantitative. Nous avons montré que la délétion de l'exon 10 (TPO-2) est retrouvée dans 35 % des ARNm de la TPO, celle de l'exon 16 (TPO-3) dans 36 %, celle de l'exon 14 (TPO-4) dans 32 % et au alentour de 10 % pour la délétion de l'exon 8 (TPO-5). Il apparaît ainsi, que la somme des pourcentages obtenus pour la TPO-2, la TPO-3, la TPO-4 et la TPO-5 est supérieure à 100 %. Ceci nous a laissé penser que des transcrits épissés d'une combinaison des exons 8, 10, 14 et 16 étaient également présents dans la thyroïde. Trois d'entre eux ont été caractérisés, la TPO-2/3 délétée des exons 10 et 16, la TPO-2/4 dépourvue des exons 10 et 14 ainsi que la TPO-5 délétée de 5 exons, le 10, 12, 13, 14 et 16 (Fig. 35).

Les deux variants mono-épissés, la TPO-4 et la TPO-5 clonés dans un vecteur d'expression et transfectés dans les cellules CHO, montrent des caractéristiques biochimiques et fonctionnelles différentes de la TPO-1. En effet, bien que correctement repliée et active, la TPO-4 possède une demi-vie et une expression en surface plus réduites, quant à la TPO-5, elle est rapidement dégradée et sans activité enzymatique détectable.

Ainsi, nous avons élargi le nombre de variants d'ARNm de la TPO à neuf en considérant la TPO-2 et la TPO-3 issues de l'épissage alternatif déjà identifiées ainsi que les deux variants nommés TPO-I et TPO-II issus d'une importante délétion en aval de l'exon 6 identifiés par l'équipe de Rapoport (Nagayama et coll, 1990).

De plus nous avons montré l'existence de formes multi-épissées des exons 10, 14 et 16 de la TPO ainsi que la TPO-6. Bien que nous n'ayons pas mis en évidence l'existence des variants épissés des trois exons majoritairement délétés de la TPO, 10, 14 et 16 dans un même variant ni recherché les variants multi-épissés de l'exon 8, ces populations pourraient cependant exister dans la thyroïde. Ces ARN messagers pourraient être produits à un pourcentage très faible ou être instables et donc rapidement dégradés. En effet, dans notre étude nous avons également obtenu des variations des résultats suivant les primers utilisés lors de la transcription inverse : des oligonucléotides dTs ciblant spécifiquement les queues de poly-adénosines présentent à l'extrémité de 3' des ARN messagers, ou des oligonucléotides reconnaissant des séquences aléatoires ou spécifiques sur les ARNs. Ces données suggèrent des différences dans la longueur de ces queues poly(A) d'un variant d'épissage à l'autre et donc probablement une différence dans la stabilité et la susceptibilité à la dégradation des différents variants. Ceci pourrait faire l'objet d'une recherche future.

De plus les données rassemblées dans la première publication, révèlent des résultats intéressants sur les propriétés biochimiques et enzymatiques de la TPO-4 et de la TPO-5. En effet, la TPO-4 enzymatiquement active, pourrait intervenir dans la biosynthèse des HT au même titre que la TPO-1. Elles dévoilent également l'importance du large exon 8 porteur de deux sites de glycosylation ainsi que des résidus potentiellement impliqués dans l'activité enzymatique de la TPO, dans le mécanisme de repliement et/ou dans la stabilité de la TPO. Enfin, les données issues de l'étude de l'immunoréactivité de la TPO-4 confirment le caractère non immunodominant du domaine similaire à la protéine du complément C4b, codé par l'exon 14.

Les formes multi-épissées et les autres variants issus de l'épissage alternatif de la TPO pourraient donc comme la TPO-2, la TPO-3, la TPO-4 et la TPO-5, après traduction en protéines, présenter des fonctionnalités similaires ou différentes de celles de la TPO-1 et donc jouer un rôle dans la synthèse des hormones thyroïdiennes.

## **II. L'épissage alternatif de la thyroperoxydase dans les cancers thyroïdiens**

Le mécanisme d'épissage alternatif de précurseurs des messagers est dérégulé dans les pathologies cancéreuses. La thyroïde présente d'une part de nombreux cancers de types différents, à l'évolution variable et d'autre part des phénomènes d'épissage alternatif de nombreux gènes dont la TPO.

Nous avons entrepris d'étudier la variation de l'expression des différents transcrits de la TPO dans chacun des types de cancers thyroïdiens par rapport à des tissus thyroïdiens sains en nous focalisant sur les transcrits de la TPO-2, la TPO-3 et de la TPO-4.

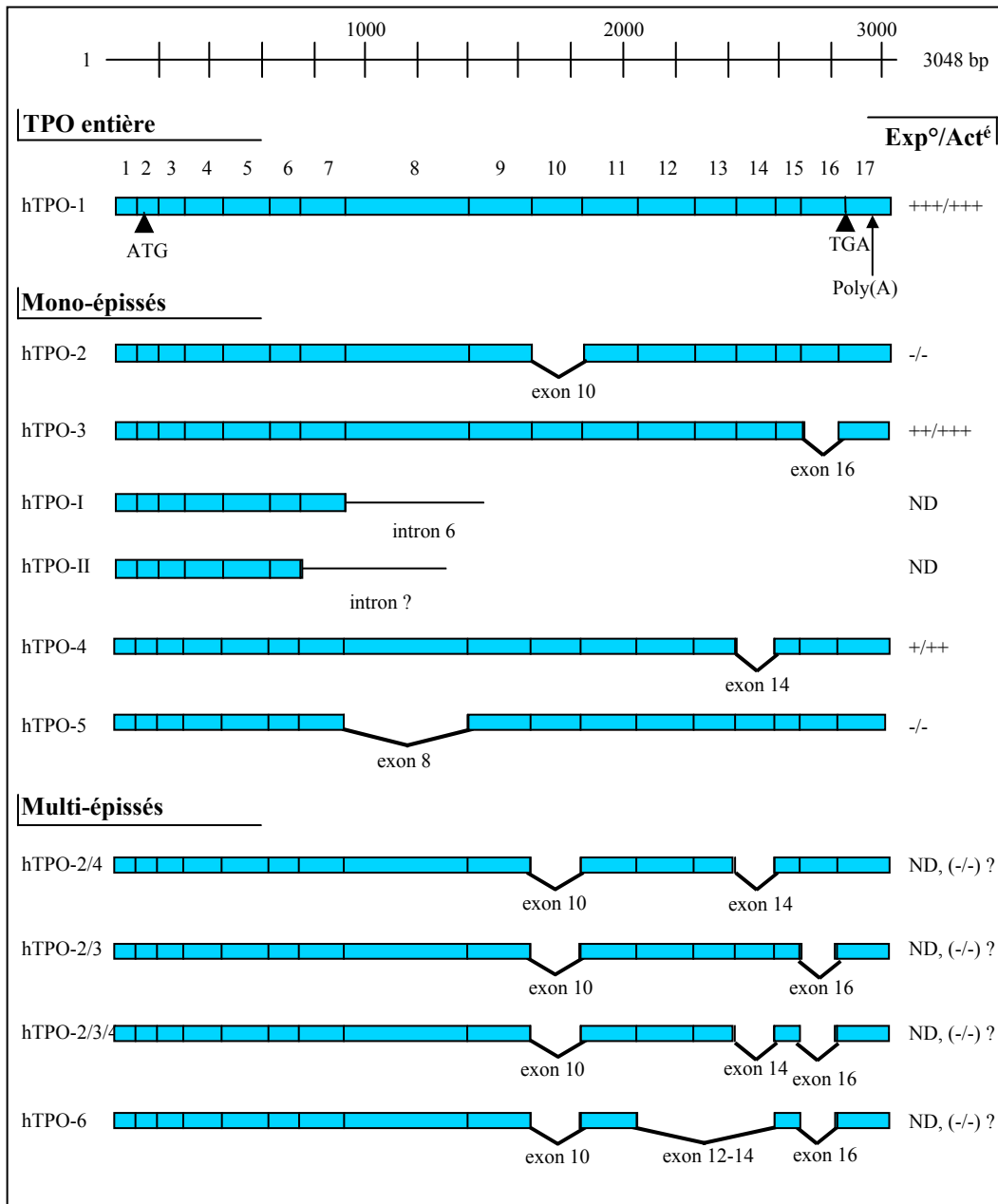
Nous avons remarqué la diminution globale de la quantité totale des ARN messagers de la TPO associée à une augmentation des événements d'épissage alternatif dans les tissus issus de cancers thyroïdiens papillaires et variants vésiculaires ainsi que de cancers vésiculaires plus ou moins invasifs, en comparaison avec des tissus sains.

En effet, la délétion de l'exon 10 et de l'exon 16 est fortement augmentée dans tous les cancers thyroïdiens en particulier pour les cancers papillaires et leurs variants vésiculaires. Dans le cas de l'exon 14 l'augmentation des transcrits délétés dans les cancers est moins marquée que pour les exons 10 et 16 à l'exception des variants vésiculaires des cancers papillaires. De plus il faut noter l'existence d'une hétérogénéité importante des résultats obtenus pour un même type de tumeur. En effet, les cancers vésiculaires fortement invasifs présentent, pour l'ensemble des transcrits, des variations importantes d'un échantillon à l'autre et les variants vésiculaires des cancers papillaires, à un moindre niveau, pour les transcrits de la TPO-2 et de la TPO-4.

Ces travaux fournissent de nombreuses informations et perspectives expérimentales. D'une part, les données rassemblées dans cette étude ont mis en avant le caractère très hétérogène d'un type de cancer thyroïdien, au regard des transcrits de la TPO qu'il exprime et donc probablement par rapport à la fonctionnalité même de la thyroïde associé à un type de cancer thyroïdien donné. D'autre part, les pourcentages d'augmentation des événements d'épissage des exons 10, 14 et 16 sont différents pour un type de cancer donné et pour un exon donné. Ces résultats suggèrent donc que les facteurs intervenant dans l'épissage de ces trois exons sont probablement différents et que les mécanismes de dérégulation de l'épissage varient d'un type de cancer à l'autre.

Les protéines SR étant les principaux facteurs régulant l'épissage alternatif de nombreuses protéines et des cibles reconnues lors de l'apparition et la progression des tumeurs, il serait intéressant de rechercher les protéines SR impliquées dans l'épissage des différents exons de la TPO et d'étudier leurs variations d'expression dans les différents types de cancers thyroïdiens. Ces recherches pourraient permettre d'identifier de nouveaux marqueurs tumoraux et de distinguer des sous-populations des types de cancers thyroïdiens utiles pour un diagnostic clinique précoce.





**Fig 35. Représentation des variants mono et multi-épissés par épissage alternatif du précurseur de l'ARN messager de la TPO.**

Les différents variants de la TPO issus de l'épissage alternatif du précurseur sont représentés avec la ou les séquences des exons dont ils sont délétés. Pour chacun d'entre eux le niveau d'expression (Exp°) et d'activité (Acté) mesurés, après transfection de leur ADNc dans les cellules CHO, sont donnés par rapport à ceux de la TPO-1. Pour les transcrits multi-épissés, n'ayant pas fait l'objet de ces expériences (ND), les indications d'expression et d'activité sont des hypothèses issues des résultats obtenus pour les mono-épissés des mêmes exons.

### III. Le clivage du propeptide dans les cellules CHO et dans la thyroïde.

En plus des modifications post-transcriptionnelles discutées dans les paragraphes précédents, la TPO subit des modifications post-traductionnelles par fixation des motifs glycaniques et d'un groupement prosthétique. Ces dernières influencent le processus de maturation en intervenant directement ou indirectement dans le contrôle de qualité de la cellule. Dans la thyroïde comme dans notre modèle cellulaire, la lignée CHO exprimant de manière stable la TPO-1 sauvage, la protéine immunoprécipitée présente après déglycosylation et électrophorèse dénaturante des bandes de PM apparent différent. Ceci nous a laissé penser qu'en plus de la variation induite par l'épissage alternatif, dans la thyroïde, et par la glycosylation, dans la thyroïde et les CHO, un clivage au niveau de la chaîne polypeptidique pouvait intervenir. Ce processus de clivage endoprotéolytique survient en effet pour de nombreux précurseurs protéiques synthétisés au niveau de la voie de sécrétion. Ce clivage intervient en général dans la partie N-terminale des protéines et définit un propeptide qui peut alors jouer un rôle dans le repliement, le trafic intracellulaire, la dégradation ou l'activité de ces protéines.

A l'aide d'inhibiteurs de glycosylation et de mutants de la TPO dépourvus de la partie amino-terminale, nous avons ainsi montré dans notre troisième article, que la TPO exprimée dans les CHO subit des clivages endoprotéolytiques à l'extrémité de sa partie amino-terminale.

Un ou plusieurs membres de la famille des convertases de type furine semble(nt) être impliqué(s) dans ce processus. La mutation des sites potentiels de clivage par ces endoprotéases a identifié l'un des sites au niveau de l'arginine 65 de la TPO. Cependant, le maintien des clivages dans des cellules déficientes en furine (cellules RPE-40), infirme l'implication de cette dernière dans les clivages de la TPO exprimée dans les cellules CHO.

Bien que les clivages endoprotéolytiques observés dans les CHO soient également retrouvés dans des cellules thyroïdiennes de rat, les PPC13, le processus de clivage subit par la TPO dans la thyroïde humaine est différent. En effet, il intervient vraisemblablement dans le compartiment du RE et en aval de la troisième séquence potentiellement envisagée pour expliquer les clivages dans les CHO, au niveau de la séquence KR<sup>103</sup>KVNLK<sup>108</sup>.

Cependant, SKI-1 ou un autre membre de la famille des convertases actives au niveau du RE et opérant au niveau de motifs présentant une leucine en position 1 et une arginine en position 4, pourrait être impliqué dans le clivage de la TPO dans les thyroïdes humaines ainsi que dans le clivage de la séquence R<sup>65</sup>GIL<sup>68</sup>, dont la mutation de l'arg65 abolit un des clivages de la TPO exprimée dans les cellules CHO.

Le propeptide défini jusqu'à la Lys108 est indispensable au repliement correct de la TPO. Transfectée dans les CHO, la TPO, déléetée du propeptide, n'acquiert plus sa conformation correcte. Le propeptide qui joue donc un rôle de protéine chaperon en aidant vraisemblablement au repliement de la TPO n'agit cependant pas lorsqu'il est ajouté en tant que peptide indépendant comme certains propeptides le font. Le clivage de la proséquence n'est pas nécessaire à son transport à travers la voie de sécrétion et semble diminuer sensiblement l'activité enzymatique de la TPO exprimée en surface cellulaire.

A partir de ces travaux, d'autres études seront nécessaires pour identifier les séquences responsables, dans les CHO, des clivages donnant naissance aux populations de TPO de 94 kDa et de 92 kDa. Pour cela, la purification d'une certaine quantité de ces populations après électrophorèse dénaturante permettra de réaliser le séquençage N-terminale et d'établir la séquence de clivage conduisant aux différentes populations de TPO maturées dans les cellules CHO. De plus, le séquençage de la partie N-terminale de thyroperoxydases d'espèces différentes pourra amener des informations supplémentaires intéressantes.

Puis, l'identification du (des) membre(s) de la famille des convertases impliqué(s) pourra être réalisé en utilisant des inhibiteurs spécifiques des différentes convertases déjà identifiées. De même, l'endoprotéase qui clive la TPO dans le RE de la glande thyroïde pourra faire l'objet d'une approche utilisant par exemple des cultures primaires de thyrocytes transfectées avec les proséquences inhibitrices des différentes protéases convertases et testées pour le clivage de la TPO *in vivo*.

#### **IV. Mise en évidence des isoformes de la thyroperoxydase exprimées dans la thyroïde**

L'ensemble des données obtenues dans nos publications sur les modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles montre qu'il serait intéressant de rechercher les isoformes protéiques de la TPO réellement exprimées dans les tissus thyroïdiens.

En effet, avec les cinq nouveaux variants d'épissage alternatif mis en évidence, on compte à présent 10 variants de transcription et probablement d'autres issus de multiples épissages non identifiés, susceptibles d'être traduits ou non au niveau de la thyroïde.

En effet, les travaux précédents réalisés sur l'expression protéique des transcrits TPO-2 et TPO-3 et nos plus récentes études sur celle de la TPO-4 et TPO-5 démontrent que ces variants sont traduits en protéines. Cependant, il apparaît que le repliement, la stabilité et l'activité enzymatique de ces isoformes de la TPO sont différents d'un variant à l'autre. En effet, tandis que la TPO-3 et une partie de la TPO-4 se replient correctement et acquièrent une activité enzymatique de manière similaire à la TPO-1, la TPO-2, rapidement dégradée et la TPO-5, maintenue dans une conformation incorrecte, ne présentent quant à elles aucune activité enzymatique de surface.

Ainsi, les modifications post-transcriptionnelles couplées aux variations post-traductionnelles subies par la TPO dans la thyroïde expliquent l'hétérogénéité protéique de la TPO. Dans un second temps, il serait également intéressant d'étudier cette hétérogénéité dans des conditions pathologiques.

Pour répondre à cette question il est envisagé de réaliser dans un premier temps, l'électrophorèse bidimensionnelle de TPO purifiée à partir de glande de Basedow, afin de séparer en fonction de leur point isoélectrique et de leur poids moléculaire les isoformes produites. Par cette technique, nous pourrions estimer, d'une part, le nombre d'isoformes exprimés et d'autre part, en mettant en corrélation les PM apparents obtenus et les PM théoriques de chaque variant, de déterminer l'expression des différentes isoformes.

Dans un second temps, l'analyse en spectrométrie de masse des différents spots sélectionnés, pourra confirmer l'expression des différents variants et aider à l'identification de nouvelles isoformes. Après identification, cette étude pourra être étendue à d'autres tissus thyroïdiens de patients atteints de pathologies cancéreuses ou auto immunes, afin de quantifier la variation de la proportion des diverses isoformes d'une condition pathologique à l'autre. Cette étude pourrait apporter des informations sur des variations éventuelles du profil d'expression de certaines isoformes de la TPO dans les tissus thyroïdiens pathologiques et donc associer certaines d'entre elles à la dérégulation des fonctions thyroïdiennes caractérisée par des hypo et des hyperthyroïdies.

## **V. Recherche et étude du rôle des partenaires moléculaires du RE intervenant dans le contrôle de qualité de la thyroperoxydase humaine.**

Dès les premiers travaux réalisés dans notre groupe sur la TPO, il est apparu que le processus conduisant à la biosynthèse de TPO active au niveau de la membrane plasmique de cellules CHO, était relativement complexe. Il devait mettre en jeu de nombreux facteurs du RE, notamment les protéines chaperons et autres catalyseurs du repliement, pour garantir le repliement correct de la TPO et la dégradation des formes aberrantes, afin de satisfaire le contrôle de qualité de la cellule.

Ainsi, la CNX et la CRT sont impliquées dans les étapes précoces du repliement des TPO transloquées dans la lumière du RE. L'interaction de ces protéines chaperons avec la TPO dépend de sa N-glycosylation (Fayadat et coll, 2000a). Ces travaux ont également démontrés l'existence de mécanismes de dégradation alternatifs suivant l'état de repliement de la TPO (Fayadat et coll, 2000b).

Dans le but de poursuivre ces travaux, nous avons donc entrepris de rechercher les autres partenaires moléculaires intervenant dans les mécanismes de repliement et de dégradation de la TPO.

La protéine BiP est largement impliquée dans le contrôle de qualité des protéines du RE, pour lesquelles, elle peut avoir un effet positif ou négatif sur le repliement. Il a été montré que BiP et CNX peuvent agir de manière séquentielle (Molinari et coll, 2000) mais également entrer en compétition (Hammond et coll, 1994) durant le repliement des (glyco)protéines. La fixation des protéines chaperons aux (glyco)protéines en cours de repliement, est un mécanisme transitoire soumis à des cycles d'interaction répétés dépendant des motifs glycaniques pour la CNX ou de l'hydrolyse de l'ATP pour BiP.

Nous montrons dans notre étude que BiP a un effet négatif sur le repliement de la TPO. En effet, une surexpression de la protéine BiP entraîne une dégradation accrue des formes partiellement repliées de la TPO (formes 15+). Nous montrons par ailleurs que la surexpression de mutants de BiP séquestrant les protéines fixées (mutant BiP-G37T) entraîne également une dégradation accrue des formes 15+. Ceci suggère donc qu'à l'inverse de l'effet protecteur de la CNX, l'interaction avec la protéine BiP conduit les TPO néosynthétisées vers la dégradation. L'équipe de Molinari a montré que les déterminants responsables de l'interaction avec la CNX et la protéine BiP mettent en jeu la position du premier site de N-glycosylation au niveau de l'extrémité N-terminale des protéines (Molinari et coll, 2000).

Nous savons que l'interaction et l'action de la CNX sur la TPO est dépendante de la présence de tels motifs (Fayadat et coll, 2000). Cependant, l'ajout d'un site de N-glycosylation dans les 50 premiers résidus de la TPO pour favoriser l'interaction avec la CNX, n'induit pas l'augmentation de la proportion des formes correctement repliées.

Nous montrons également que la protéine isomérase ERp57 agissant en association avec la CNX lors du repliement des protéines n'est pas le facteur limitant dans les cellules CHO pour le repliement de la TPO.

Pris ensemble ces données suggèrent que l'interaction de la CNX au niveau des motifs glycaniques de la TPO masque directement ou indirectement, des sites de fixation à la protéine BiP. Ainsi, le taux d'expression ou la disponibilité des protéines chaperons CNX ou BiP pourraient déterminer le devenir de la TPO en favorisant son repliement et sa stabilité ou en déclenchant sa dégradation.

La TPO a, par ailleurs, été une des premières protéines pour laquelle on a démontré des mécanismes de dégradation alternatifs suivant son état de repliement. En effet, les formes 47+ sont dégradées par le protéasome tandis que les formes 15+ subissent un mécanisme de dégradation indépendant du protéasome, faisant intervenir des protéases du RE (Fayadat et coll, 2000). Dernièrement, la mannosidase I du RE, responsable du clivage d'un mannose terminal des oligosaccharides et une lectine du RE, EDEM reconnaissant les motifs N-glycaniques ne possédant que 8 résidus de mannoses (Man8-GINac2), ont été impliqués dans l'adressage des glycoprotéines du RE au système de dégradation par le protéasome. Des travaux préliminaires réalisés dans le groupe et non publiés, montrent que la dégradation des formes incorrectement repliées de la TPO ne requiert ni l'exposition de motifs Man8-GINac2 ni l'action de EDEM, par contre, comme pour la carboxypeptidase Y (Mancini et coll, 2003), la dégradation des formes partiellement repliées de la TPO est fortement ralentie lorsqu'on inhibe l'action de la mannosidase I du RE par la kifunensine. Ceci, suggère que les motifs glycaniques sont déterminants pour la voie de dégradation des formes 15+ par les protéases du RE mais que cette voie pourrait impliquer la reconnaissance des molécules de TPO à dégrader par un membre des lectines autre qu'EDEM.

Ces travaux ont éclairé davantage notre connaissance du processus de maturation et de dégradation de la TPO. Cependant, il apparaît clairement que l'implication d'autres protéines chaperons ou catalyseurs de repliement reste à déterminer.

## **VI. Etude du rôle respectif des 4 sites potentiels de glycosylation de la thyroperoxydase.**

La TPO possède quatre sites potentiels de glycosylation au niveau des résidus d'asparagine, tous localisés dans la première moitié de sa partie extracellulaire.

Nous savons que la glycosylation de la TPO intervient dans le processus de repliement correct de la TPO en interagissant notamment avec la CNX et la CRT via ses motifs oligosaccharidiques et dans la stabilité de la protéine *in vitro*.

Bien que nous suggérions fortement que les quatre sites potentiels soient glycosylés, nous n'en avons pas la preuve et nous ne connaissons pas l'implication relative de chacun d'entre eux dans le processus de repliement et de trafic intracellulaire de la protéine.

En effet, les quatre motifs glycaniques pourraient comme pour la protéine HA (Hebert et coll, 1997) ou la protéine de fusion du virus Sendai (Tamura et coll, 2001), intervenir de manière différente dans l'interaction avec la CNX et la CRT ou avec d'autres facteurs interagissant de manière indépendante des glycanes, en assurant l'établissement ou le maintien d'une structure intermédiaire qui présenterait les déterminants spécifiques pour la fixation de BiP ou des PDI.

Pour répondre à ces questions nous envisageons de construire les mutants de ces sites de glycosylation en ne gardant qu'un seul site potentiellement porteur d'un sucre ou des combinaisons d'entre eux. Le repliement et la dégradation de ces mutants seront testés après marquage métabolique « en pulse-chase » en comparaison de la TPO-1 sauvage.

Des résultats préliminaires ont été obtenus dans notre groupe, après la mutation ponctuelle des deuxième et troisième sites de glycosylation de la TPO, TPO $\Delta$ NG2 et TPO $\Delta$ NG3. Ces mutants ont alors été transfectés dans les cellules CHO et marqués avec de la 35S-méthionine pendant 16h. Les résultats montrent que les deux sites sont vraisemblablement glycosylés. Par contre ils ne semblent pas jouer le même rôle. En effet, tandis que le ratio des formes incorrectement repliées (immunoprécipitées avec le mAb47) sur celle des formes correctement repliées (immunoprécipitées avec le mAb15) de la TPO $\Delta$ NG2 est similaire à celui de la TPO-1 sauvage, celui de la TPO $\Delta$ NG3 est augmenté. Ainsi le troisième site potentiel de N-glycosylation pourrait jouer un rôle dans le repliement de la TPO.

En parallèle, l'interaction de ces mutants avec les différentes protéines chaperons du RE, CNX, CRT, BiP, ER57, PDI, grp94, étudiée par immunoprécipitation, nous indiquera le(s) site(s) de glycosylation intervenant dans la fixation de ces protéines à la TPO néosynthétisée et en cours de repliement.

De manière intéressante, les mêmes études de co-immunoprécipitation pourront être menées à partir des deux variants d'épissage alternatif de la TPO, la TPO-2 et la TPO-5, délétée respectivement des exons 10 et 8. En effet, l'exon 8 porte les sites 2 et 3 de glycosylation et l'exon 10, le quatrième. La TPO-2 et la TPO-5, présentent toutes les deux un faible taux de repliement et sont rapidement dégradées tandis que les autres variants de la TPO délétés d'exons ne portant pas de sites de glycosylation protéique, comme la TPO-3 et la TPO-4, sont correctement maturés et actifs. Ceci suggère une forte influence des séquences, et notamment des sites de glycosylation, codées par les exons 8 et 10, dans les processus de maturation et de dégradation de la TPO probablement via l'interaction avec des facteurs du contrôle de qualité. Il sera alors possible de confirmer le rôle respectif des sites de glycosylation et de discriminer le rôle joué par les séquences de ces exons indépendamment des sites de glycosylation qu'ils comportent.

## **VII. Identification des protéases du RE impliquées dans la dégradation de la thyroperoxydase.**

Le processus de dégradation des formes partiellement ou correctement repliées de la TPO retenue au niveau du RE, fait intervenir un processus indépendant du protéasome, habituellement impliqué dans la dégradation des protéines de la voie de sécrétion après leur rétrotranslocation à travers la membrane du RE. Les travaux réalisés dans notre équipe ont mis en évidence l'implication de protéases à sérine et cystéine de la membrane du RE dans la dégradation de la TPO partiellement repliée, immunoprécipitée avec les mAb15 (Fayadat et coll, 2000).

Certaines autres protéines de la voie de sécrétion sont, en effet, soumises à des voies de dégradation différentes suivant leur état de repliement ou leur niveau de glycosylation. Les mutants du CFTR (Jensen et coll, 1995), la glycoprotéine P (Loo et coll, 1998a) ou la SCD impliquée dans le métabolisme des lipides (Heinemann et coll, 2003) peuvent être dégradés par des protéases résidente du RE.



L'étude menée sur la SCD, a conduit à la purification et à la caractérisation partielle d'une protéase du RE présentant une activité protéolytique à l'encontre de la SCD (Heinemann et coll, 2003). Cette protéase membranaire de 90 kDa exprimée au niveau des membranes du RE, vraisemblablement composée de plusieurs peptides et soumise à un processus de maturation endoprotéolytique complexe, est similaire au plasminogène (Heinemann et coll, 2003b).

Elle présente en effet, un profil d'inhibition par le DTT, la leupeptine et la bdelline, un inhibiteur de plasmine (Heinemann et coll, 2003b). De manière intéressante, cette dernière est capable de dégrader une autre protéine du RE, la protéine ApoB impliquée, comme la SCD, dans le métabolisme des lipides au niveau des cellules hépatiques, et soumise elle aussi à un mécanisme de dégradation indépendant du protéasome (Zhang et coll, 2003; Heinemann et coll, 2003).

Il serait donc intéressant dans un premier temps de tester dans le cas de la TPO, si une protéase similaire à la plasmine est responsable de la dégradation des TPO partiellement repliées et exprimées dans les cellules CHO, en utilisant des inhibiteurs de la plasmine. Puis, à terme il serait alors intéressant de caractériser la protéase membranaire exprimée au niveau des membranes du RE des thyrocytes humains, responsable de la dégradation de la TPO au niveau du RE. Pour cela, différentes étapes d'extraction, de solubilisation et de purification des protéines membranaires issues de préparations de microsomes de thyroïdes humaines seront nécessaires.

En conclusion, la TPO est un modèle particulièrement intéressant pour étudier les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle qui modulent la biosynthèse des protéines.

L'ensemble des résultats exposés dans cette thèse apporte d'une part de nouvelles données expliquant l'hétérogénéité protéique de la TPO et d'autre part identifie les partenaires moléculaires, et le rôle de ces derniers, qui interviennent dans le contrôle de qualité de la thyroperoxydase humaine.

Les nombreuses problématiques qui restent à explorer pour élucider les différentes étapes de la maturation, du trafic intracellulaire et de la dégradation de la thyroperoxydase humaine permettront de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la biosynthèse des protéines de la voie de sécrétion.

## BIBLIOGRAPHIE

### A

- Abramowicz, M. J., G. Vassart, and D. Christophe. 1992.** Functional study of the human thyroid peroxidase gene promoter. *Eur J Biochem* 203: 467-73.
- Ali Eldib, A. M., T. Ono, M. Shimono, M. Kaneko, K. Nakagawa, R. Tanaka, Y. Noguchi, and E. Nakayama. 2004.** Immunoscreening of a cDNA library from a lung cancer cell line using autologous patient serum: Identification of XAGE-1b as a dominant antigen and its immunogenicity in lung adenocarcinoma. *Int J Cancer* 108: 558-63.
- Allen, S., and N. J. Bulleid. 1997.** Calnexin and calreticulin bind to enzymically active tissue-type plasminogen activator during biosynthesis and are not required for folding to the native conformation. *Biochem J* 328 ( Pt 1): 113-9.
- Alquier, C., J. Ruf, A. M. Athouel-Haon, and P. Carayon. 1989.** Immunocytochemical study of localization and traffic of thyroid peroxidase/microsomal antigen. *Autoimmunity* 3: 113-23.
- Anderson, E. D., L. Thomas, J. S. Hayflick, and G. Thomas. 1993.** Inhibition of HIV-1 gp160-dependent membrane fusion by a furin-directed alpha 1-antitrypsin variant. *J Biol Chem* 268: 24887-91.
- Anderson, E. D., J. K. VanSlyke, C. D. Thulin, F. Jean, and G. Thomas. 1997.** Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage. *Embo J* 16: 1508-18.
- Andersson, E., L. Hellman, U. Gullberg, and I. Olsson. 1998.** The role of the propeptide for processing and sorting of human myeloperoxidase. *J Biol Chem* 273: 4747-53.
- Argon, Y., and B. B. Simen. 1999.** GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties. *Semin Cell Dev Biol* 10: 495-505.
- Aza-Blanc, P., R. Di Lauro, and P. Santisteban. 1993.** Identification of a cis-regulatory element and a thyroid-specific nuclear factor mediating the hormonal regulation of rat thyroid peroxidase promoter activity. *Mol Endocrinol* 7: 1297-306.

### B

- Baker, J. R., P. Arscott, and J. Johnson. 1994.** An analysis of the structure and antigenicity of different forms of human thyroid peroxidase. *Thyroid* 4: 173-8.
- Banga, J. P., D. Mahadevan, G. J. Barton, B. J. Sutton, J. W. Saldanha, E. Odell, and A. M. McGregor. 1990.** Prediction of domain organisation and secondary structure of thyroid peroxidase, a human autoantigen involved in destructive thyroiditis. *FEBS Lett* 266: 133-41.
- Bass, J., G. Chiu, Y. Argon, and D. F. Steiner. 1998.** Folding of insulin receptor monomers is facilitated by the molecular chaperones calnexin and calreticulin and impaired by rapid dimerization. *J Cell Biol* 141: 637-46.
- Bassi, D. E., H. Mahloogi, and A. J. Klein-Szanto. 2000.** The proprotein convertases furin and PACE4 play a significant role in tumor progression. *Mol Carcinog* 28: 63-9.
- Baudry, N., P. J. Lejeune, F. Delom, L. Vinet, P. Carayon, and B. Mallet. 1998.** Role of multimerized porcine thyroglobulin in iodine storage. *Biochem Biophys Res Commun* 242: 292-6.
- Bauskin, A. R., H. P. Zhang, W. D. Fairlie, X. Y. He, P. K. Russell, A. G. Moore, D. A. Brown, K. K. Stanley, and S. N. Breit. 2000.** The propeptide of macrophage inhibitory cytokine (MIC-1), a TGF-beta superfamily member, acts as a quality control determinant for correctly folded MIC-1. *Embo J* 19: 2212-20.
- Beggah, A., P. Mathews, P. Beguin, and K. Geering. 1996.** Degradation and endoplasmic reticulum retention of unassembled alpha- and beta-subunits of Na,K-ATPase correlate with interaction of BiP. *J Biol Chem* 271: 20895-902.
- Bening, U., R. Castino, N. Harth, C. Isidoro, and A. Hasilik. 1998.** Lysosomal segregation of a mannose-rich glycoprotein imparted by the prosequence of myeloperoxidase. *J Cell Biochem* 71: 158-68.
- Benjannet, S., N. Rondeau, R. Day, M. Chretien, and N. G. Seidah. 1991.** PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 3564-8.
- Benjannet, S., D. Savaria, M. Chretien, and N. G. Seidah. 1995.** 7B2 is a specific intracellular binding protein of the prohormone convertase PC2. *J Neurochem* 64: 2303-11.
- Benjannet, S., D. Savaria, A. Laslop, J. S. Munzer, M. Chretien, M. Marcinkiewicz, and N. G. Seidah. 1997.** Alpha1-antitrypsin Portland inhibits processing of precursors mediated by proprotein convertases primarily within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem* 272: 26210-8.
- Benjannet, S., A. M. Mamarbachi, J. Hamelin, D. Savaria, J. S. Munzer, M. Chretien, and N. G. Seidah. 1998.** Residues unique to the pro-hormone convertase PC2 modulate its autoactivation, binding to 7B2 and enzymatic activity. *FEBS Lett* 428: 37-42.
- Berndorfer, U., H. Wilms, and V. Herzog. 1996.** Multimerization of thyroglobulin (TG) during extracellular storage: isolation of highly cross-linked TG from human thyroids. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 1918-26.

**Bernier-Valentin, F., Z. Kostrouch, R. Rabilloud, Y. Munari-Silem, and B. Rousset. 1990.** Coated vesicles from thyroid cells carry iodinated thyroglobulin molecules. First indication for an internalization of the thyroid prohormone via a mechanism of receptor-mediated endocytosis. *J Biol Chem* 265: 17373-80.

**Bertaux, F., M. Noel, Y. Malthiery, and P. Fragu. 1991.** Demonstration of a heterogeneous transcription pattern of thyroglobulin mRNA in human thyroid tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 178: 586-92.

**Beyer, W. R., D. Popplau, W. Garten, D. von Laer, and O. Lenz. 2003.** Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P. *J Virol* 77: 2866-72.

**Bjorkman, U., and R. Ekholm. 1988.** Accelerated exocytosis and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in isolated thyroid follicles enhance protein iodination. *Endocrinology* 122: 488-94.

**Black, D. L. 2003.** Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72: 291-336.

**Blond-Elguindi, S., S. E. Cwirla, W. J. Dower, R. J. Lipshutz, S. R. Sprang, J. F. Sambrook, and M. J. Gething. 1993.** Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell* 75: 717-28.

**Bottomley, M. J., M. R. Batten, R. A. Lumb, and N. J. Bulleid. 2001.** Quality control in the endoplasmic reticulum: PDI mediates the ER retention of unassembled procollagen C-propeptides. *Curr Biol* 11: 1114-8.

**Bourdi, M., D. Demady, J. L. Martin, S. K. Jabbour, B. M. Martin, J. W. George, and L. R. Pohl. 1995.** cDNA cloning and baculovirus expression of the human liver endoplasmic reticulum P58: characterization as a protein disulfide isomerase isoform, but not as a protease or a carnitine acyltransferase. *Arch Biochem Biophys* 323: 397-403.

**Braakman, I., J. Helenius, and A. Helenius. 1992.** Manipulating disulfide bond formation and protein folding in the endoplasmic reticulum. *Embo J* 11: 1717-22.

**Brakch, N., A. S. Galanopoulou, Y. C. Patel, G. Boileau, and N. G. Seidah. 1995.** Comparative proteolytic processing of rat prosomatostatin by the convertases PC1, PC2, furin, PACE4 and PC5 in constitutive and regulated secretory pathways. *FEBS Lett* 362: 143-6.

**Brix, K., P. Lemansky, and V. Herzog. 1996.** Evidence for extracellularly acting cathepsins mediating thyroid hormone liberation in thyroid epithelial cells. *Endocrinology* 137: 1963-74.

**Brodsky, J. L., E. D. Werner, M. E. Dubas, J. L. Goeckeler, K. B. Kruse, and A. A. McCracken. 1999.** The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. *J Biol Chem* 274: 3453-60.

**Bukau, B., and A. L. Horwich. 1998.** The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92: 351-66.

**Bulow, E., W. M. Nauseef, M. Goedken, S. McCormick, J. Calafat, U. Gullberg, and I. Olsson. 2002.** Sorting for storage in myeloid cells of nonmyeloid proteins and chimeras with the propeptide of myeloperoxidase precursor. *J Leukoc Biol* 71: 279-88.

## C

**Cabral, C. M., P. Choudhury, Y. Liu, and R. N. Sifers. 2000.** Processing by endoplasmic reticulum mannosidases partitions a secretion-impaired glycoprotein into distinct disposal pathways. *J Biol Chem* 275: 25015-22.

**Cabral, C. M., Y. Liu, K. W. Moremen, and R. N. Sifers. 2002.** Organizational diversity among distinct glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation programs. *Mol Biol Cell* 13: 2639-50.

**Caldwell, S. R., K. J. Hill, and A. A. Cooper. 2001.** Degradation of endoplasmic reticulum (ER) quality control substrates requires transport between the ER and Golgi. *J Biol Chem* 276: 23296-303.

**Cals, M. M., P. Maillart, G. Brignon, P. Anglade, and B. R. Dumas. 1991.** Primary structure of bovine lactoperoxidase, a fourth member of a mammalian heme peroxidase family. *Eur J Biochem* 198: 733-9.

**Cannon, K. S., D. N. Hebert, and A. Helenius. 1996.** Glycan-dependent and -independent association of vesicular stomatitis virus G protein with calnexin. *J Biol Chem* 271: 14280-4.

**Cetani, F., S. Costagliola, M. Tonacchera, V. Panneels, G. Vassart, and M. Ludgate. 1995.** The thyroperoxidase doublet is not produced by alternative splicing. *Mol Cell Endocrinol* 115: 125-32.

**Cheng, D., P. J. Espenshade, C. A. Slaughter, J. C. Jaen, M. S. Brown, and J. L. Goldstein. 1999.** Secreted site-1 protease cleaves peptides corresponding to luminal loop of sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* 274: 22805-12.

**Cheng, M., P. H. Watson, J. A. Paterson, N. Seidah, M. Chretien, and R. P. Shiu. 1997.** Pro-protein convertase gene expression in human breast cancer. *Int J Cancer* 71: 966-71.

**Chillaron, J., and I. G. Haas. 2000.** Dissociation from BiP and retrotranslocation of unassembled immunoglobulin light chains are tightly coupled to proteasome activity. *Mol Biol Cell* 11: 217-26.

**Conner, G. E. 1992.** The role of the cathepsin D propeptide in sorting to the lysosome. *J Biol Chem* 267: 21738-45.

**Consiglio, E., S. Shifrin, Z. Yavin, F. S. Ambesi-Impiombato, J. E. Rall, G. Salvatore, and L. D. Kohn. 1981.** Thyroglobulin interactions with thyroid membranes. Relationship between receptor recognition of N-acetylglucosamine residues and the iodine content of thyroglobulin preparations. *J Biol Chem* 256: 10592-9.

**Conticello, S. G., N. D. Kowalsman, C. Jacobsen, G. Yudkovsky, K. Sato, Z. Elazar, C. M. Petersen, A. Aronheim, and M. Fainzilber. 2003.** The prodomain of a secreted hydrophobic mini-protein facilitates its export from the endoplasmic reticulum by hitchhiking on sorting receptors. *J Biol Chem* 278: 26311-4.

**Cotner, T., and D. Pious. 1995.** HLA-DR beta chains enter into an aggregated complex containing GRP-78/BiP prior to their degradation by the pre-Golgi degradative pathway. *J Biol Chem* 270: 2379-86.

**Creemers, J. W., J. W. van de Loo, E. Plets, L. M. Hendershot, and W. J. Van De Ven. 2000.** Binding of BiP to the processing enzyme lymphoma proprotein convertase prevents aggregation, but slows down maturation. *J Biol Chem* 275: 38842-7.

**Cui, Y., F. Jean, G. Thomas, and J. L. Christian. 1998.** BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *Embo J* 17: 4735-43.

**Cui, Y., R. Hackenmiller, L. Berg, F. Jean, T. Nakayama, G. Thomas, and J. L. Christian. 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: 2797-802.

**Cunningham, E. L., S. S. Jaswal, J. L. Sohl, and D. A. Agard. 1999.** Kinetic stability as a mechanism for protease longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11008-14.

**Czarnocka, B., J. Ruf, M. Ferrand, P. Carayon, and S. Lissitzky. 1985.** Purification of the human thyroid peroxidase and its identification as the microsomal antigen involved in autoimmune thyroid diseases. *FEBS Lett* 190: 147-52.

## D

**Daggett, V., and A. R. Fersht. 2003.** Is there a unifying mechanism for protein folding? *Trends Biochem Sci* 28: 18-25.

**Dai, G., O. Levy, and N. Carrasco. 1996.** Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 379: 458-60.

**Daniels, R., B. Kurowski, A. E. Johnson, and D. N. Hebert. 2003.** N-linked glycans direct the cotranslational folding pathway of influenza hemagglutinin. *Mol Cell* 11: 79-90.

**Danilczyk, U. G., and D. B. Williams. 2001.** The lectin chaperone calnexin utilizes polypeptide-based interactions to associate with many of its substrates in vivo. *J Biol Chem* 276: 25532-40.

**Day, R., M. K. Schafer, W. E. Cullinan, S. J. Watson, M. Chretien, and N. G. Seidah. 1993.** Region specific expression of furin mRNA in the rat brain. *Neurosci Lett* 149: 27-30.

**De Deken, X., D. Wang, M. C. Many, S. Costagliola, F. Libert, G. Vassart, J. E. Dumont, and F. Miot. 2000.** Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem* 275: 23227-33.

**De Deken, X., D. Wang, J. E. Dumont, and F. Miot. 2002.** Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating system. *Exp Cell Res* 273: 187-96.

**Decroly, E., S. Wouters, C. Di Bello, C. Lazure, J. M. Ruyschaert, and N. G. Seidah. 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: 30442-50.

**Degnin, C., F. Jean, G. Thomas, and J. L. Christian. 2004.** Cleavages within the prodomain direct intracellular trafficking and degradation of mature bone morphogenetic protein-4. *Mol Biol Cell* 15: 5012-20.

**DePillis, G. D., S. Ozaki, J. M. Kuo, D. A. Maltby, and P. R. Ortiz de Montellano. 1997.** Autocatalytic processing of heme by lactoperoxidase produces the native protein-bound prosthetic group. *J Biol Chem* 272: 8857-60.

**Dohan, O., and N. Carrasco. 2003.** Advances in Na<sup>(+)</sup>/I<sup>(-)</sup> symporter (NIS) research in the thyroid and beyond. *Mol Cell Endocrinol* 213: 59-70.

**Dohan, O., A. De la Vieja, V. Paroder, C. Riedel, M. Artani, M. Reed, C. S. Ginter, and N. Carrasco. 2003.** The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev* 24: 48-77.

**Dong, W., M. Marcinkiewicz, D. Vieau, M. Chretien, N. G. Seidah, and R. Day. 1995.** Distinct mRNA expression of the highly homologous convertases PC5 and PACE4 in the rat brain and pituitary. *J Neurosci* 15: 1778-96.

**Dunn, A. D., and J. T. Dunn. 1982.** Thyroglobulin degradation by thyroidal proteases: action of thiol endopeptidases in vitro. *Endocrinology* 111: 290-8.

**Dunn, A. D., H. E. Crutchfield, and J. T. Dunn. 1991.** Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. Major sites of cleavage by cathepsins B, D, and L. *J Biol Chem* 266: 20198-204.

**Dunn, A. D., H. E. Myers, and J. T. Dunn. 1996.** The combined action of two thyroidal proteases releases T4 from the dominant hormone-forming site of thyroglobulin. *Endocrinology* 137: 3279-85.

**Dunn, A. D., C. M. Corsi, H. E. Myers, and J. T. Dunn. 1998.** Tyrosine 130 is an important outer ring donor for thyroxine formation in thyroglobulin. *J Biol Chem* 273: 25223-9.

- Dunn, J. T., and A. D. Dunn. 1999.** The importance of thyroglobulin structure for thyroid hormone biosynthesis. *Biochimie* 81: 505-9.
- Dupuy, C., A. Virion, R. Ohayon, J. Kaniewski, D. Deme, and J. Pommier. 1991.** Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane. *J Biol Chem* 266: 3739-43.
- Dupuy, C., R. Ohayon, A. Valent, M. S. Noel-Hudson, D. Deme, and A. Virion. 1999.** Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *J Biol Chem* 274: 37265-9.

## E

- Eder, J., M. Rheinnecker, and A. R. Fersht. 1993.** Folding of subtilisin BPN': characterization of a folding intermediate. *Biochemistry* 32: 18-26.
- Ekholm, R., and U. Bjorkman. 1984.** Localization of iodine binding in the thyroid gland in vitro. *Endocrinology* 115: 1558-67.
- Elagoz, A., S. Benjannet, A. Mammabassi, L. Wickham, and N. G. Seidah. 2002.** Biosynthesis and cellular trafficking of the convertase SKI-1/SIP: ectodomain shedding requires SKI-1 activity. *J Biol Chem* 277: 11265-75.
- Elisei, R., G. Vassart, and M. Ludgate. 1991.** Demonstration of the existence of the alternatively spliced form of thyroid peroxidase in normal thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 700-2.
- Ellgaard, L., and A. Helenius. 2001.** ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol* 13: 431-7.
- Ellgaard, L., and A. Helenius. 2003.** Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 181-91.
- Elliott, J. G., J. D. Oliver, and S. High. 1997.** The thiol-dependent reductase ERp57 interacts specifically with N-glycosylated integral membrane proteins. *J Biol Chem* 272: 13849-55.
- Eriksson, K. K., R. Vago, V. Calanca, C. Galli, P. Paganetti, and M. Molinari. 2004.** EDEM contributes to maintenance of protein folding efficiency and secretory capacity. *J Biol Chem*.
- Ermak, G., G. Gerasimov, K. Troshina, T. Jennings, L. Robinson, J. S. Ross, and J. Figge. 1995.** Deregulated alternative splicing of CD44 messenger RNA transcripts in neoplastic and nonneoplastic lesions of the human thyroid. *Cancer Res* 55: 4594-8.
- Eskandari, S., D. D. Loo, G. Dai, O. Levy, E. M. Wright, and N. Carrasco. 1997.** Thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *J Biol Chem* 272: 27230-8.
- Esposito, C., S. Miccadei, A. Saiardi, and D. Civitareale. 1998.** PAX 8 activates the enhancer of the human thyroperoxidase gene. *Biochem J* 331 ( Pt 1): 37-40.
- Everett, L. A., B. Glaser, J. C. Beck, J. R. Idol, A. Buchs, M. Heyman, F. Adawi, E. Hazani, E. Nassir, A. D. Baxevanis, V. C. Sheffield, and E. D. Green. 1997.** Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet* 17: 411-22.

## F

- Fairlie, W. D., H. P. Zhang, W. M. Wu, S. L. Pankhurst, A. R. Bauskin, P. K. Russell, P. K. Brown, and S. N. Breit. 2001.** The propeptide of the transforming growth factor-beta superfamily member, macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1), is a multifunctional domain that can facilitate protein folding and secretion. *J Biol Chem* 276: 16911-8.
- Fang, S., M. Ferrone, C. Yang, J. P. Jensen, S. Tiwari, and A. M. Weissman. 2001.** The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14422-7.
- Farinha, C. M., and M. D. Amaral. 2005.** Most F508del-CFTR is targeted to degradation at an early folding checkpoint and independently of calnexin. *Mol Cell Biol* 25: 5242-52.
- Farmery, M. R., S. Allen, A. J. Allen, and N. J. Bulleid. 2000.** The role of ERp57 in disulfide bond formation during the assembly of major histocompatibility complex class I in a synchronized semipermeabilized cell translation system. *J Biol Chem* 275: 14933-8.
- Faustino, N. A., and T. A. Cooper. 2003.** Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* 17: 419-37.
- Fayadat, L., P. Niccoli-Sire, J. Lanet, and J. L. Franc. 1998.** Human thyroperoxidase is largely retained and rapidly degraded in the endoplasmic reticulum. Its N-glycans are required for folding and intracellular trafficking. *Endocrinology* 139: 4277-85.
- Fayadat, L., P. Niccoli-Sire, J. Lanet, and J. L. Franc. 1999.** Role of heme in intracellular trafficking of thyroperoxidase and involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated at the apical surface of thyroid cells in autocatalytic covalent heme binding. *J Biol Chem* 274: 10533-8.
- Fayadat, L., S. Siffroi-Fernandez, J. Lanet, and J. L. Franc. 2000a.** Degradation of human thyroperoxidase in the endoplasmic reticulum involves two different pathways depending on the folding state of the protein. *J Biol Chem* 275: 15948-54.

- Fayadat, L., S. Sifroi-Fernandez, J. Lanet, and J. L. Franc. 2000b.** Calnexin and calreticulin binding to human thyroperoxidase is required for its first folding step(s) but is not sufficient to promote efficient cell surface expression. *Endocrinology* 141: 959-66.
- Fersht, A. R. 1995.** Optimization of rates of protein folding: the nucleation-condensation mechanism and its implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10869-73.
- Fiedler, T. J., C. A. Davey, and R. E. Fenna. 2000.** X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 Å resolution. *J Biol Chem* 275: 11964-71.
- Finke, R., P. Seto, J. Ruf, P. Carayon, and B. Rapoport. 1991.** Determination at the molecular level of a B-cell epitope on thyroid peroxidase likely to be associated with autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 73: 919-21.
- Fluge, O., D. R. Haugen, L. A. Akslen, A. Marstad, M. Santoro, A. Fusco, J. E. Varhaug, and J. R. Lillehaug. 2001.** Expression and alternative splicing of c-ret RNA in papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 20: 885-92.
- Fortenberry, S. C., and J. M. Chirgwin. 1995.** The propeptide is nonessential for the expression of human cathepsin D. *J Biol Chem* 270: 9778-82.
- Foti, D., J. Gestautas, and B. Rapoport. 1990a.** Studies on the functional activity of the promoter for the human thyroid peroxidase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 168: 281-7.
- Foti, D., and B. Rapoport. 1990b.** Carbohydrate moieties in recombinant human thyroid peroxidase: role in recognition by antithyroid peroxidase antibodies in Hashimoto's thyroiditis. *Endocrinology* 126: 2983-8.
- Frenkel, Z., M. Shenkman, M. Kondratyev, and G. Z. Lederkremer. 2004.** Separate roles and different routing of calnexin and ERp57 in endoplasmic reticulum quality control revealed by interactions with asialoglycoprotein receptor chains. *Mol Biol Cell* 15: 2133-42.
- Fu, X., M. Inouye, and U. Shinde. 2000.** Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone. The inhibitory and chaperone functions of the subtilisin propeptide are not obligatorily linked. *J Biol Chem* 275: 16871-8.
- Fugere, M., and R. Day. 2002.** Inhibitors of the subtilase-like pro-protein convertases (SPCs). *Curr Pharm Des* 8: 549-62.
- Fugere, M., P. C. Limperis, V. Beaulieu-Audy, F. Gagnon, P. Lavigne, K. Klarskov, R. Leduc, and R. Day. 2002.** Inhibitory potency and specificity of subtilase-like pro-protein convertase (SPC) prodomains. *J Biol Chem* 277: 7648-56.

## G

- Gardas, A., A. Lewartowska, B. J. Sutton, Z. Pasiaka, A. M. McGregor, and J. P. Banga. 1997.** Human thyroid peroxidase (TPO) isoforms, TPO-1 and TPO-2: analysis of protein expression in Graves' thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3752-7.
- Gaut, J. R., and L. M. Hendershot. 1993.** Mutations within the nucleotide binding site of immunoglobulin-binding protein inhibit ATPase activity and interfere with release of immunoglobulin heavy chain. *J Biol Chem* 268: 7248-55.
- Gavaret, J. M., H. J. Cahnmann, and J. Nunez. 1981.** Thyroid hormone synthesis in thyroglobulin. The mechanism of the coupling reaction. *J Biol Chem* 256: 9167-73.
- Gentile, F., P. Ferranti, G. Mamone, A. Malorni, and G. Salvatore. 1997.** Identification of hormonogenic tyrosines in fragment 1218-1591 of bovine thyroglobulin by mass spectrometry. Hormonogenic acceptor TYR-12donor TYR-1375. *J Biol Chem* 272: 639-46.
- Gerard, A. C., J. F. Denef, I. M. Colin, and M. F. van den Hove. 2004.** Evidence for processing of compact insoluble thyroglobulin globules in relation with follicular cell functional activity in the human and the mouse thyroid. *Eur J Endocrinol* 150: 73-80.
- Gething, M. J., and J. Sambrook. 1992.** Protein folding in the cell. *Nature* 355: 33-45.
- Gething, M. J. 1999.** Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* 10: 465-72.
- Gillece, P., J. M. Luz, W. J. Lennarz, F. J. de La Cruz, and K. Romisch. 1999.** Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. *J Cell Biol* 147: 1443-56.
- Giraud, A., J. L. Franc, Y. Long, and J. Ruf. 1992.** Effects of deglycosylation of human thyroperoxidase on its enzymatic activity and immunoreactivity. *J Endocrinol* 132: 317-23.
- Glick, B. S. 2000.** Organization of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* 12: 450-6.
- Gnann, A., J. R. Riordan, and D. H. Wolf. 2004.** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator degradation depends on the lectins Htm1p/EDEM and the Cdc48 protein complex in yeast. *Mol Biol Cell* 15: 4125-35.
- Gonzales, P. E., A. Solomon, A. B. Miller, M. A. Leesnitzer, I. Sagi, and M. E. Milla. 2004.** Inhibition of the tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme by its pro domain. *J Biol Chem* 279: 31638-45.

- Gordon, V. M., and S. H. Leppla. 1994.** Proteolytic activation of bacterial toxins: role of bacterial and host cell proteases. *Infect Immun* 62: 333-40.
- Grabowski, P. J., and D. L. Black. 2001.** Alternative RNA splicing in the nervous system. *Prog Neurobiol* 65: 289-308.
- Gray, A. M., and A. J. Mason. 1990.** Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* 247: 1328-30.
- Groves, M. R., M. A. Taylor, M. Scott, N. J. Cummings, R. W. Pickersgill, and J. A. Jenkins. 1996.** The prosequence of procaricain forms an alpha-helical domain that prevents access to the substrate-binding cleft. *Structure* 4: 1193-203.
- Gu, J., T. Daa, K. Kashima, S. Yokoyama, I. Nakayama, and S. Noguchi. 1998.** Expression of splice variants of CD44 in thyroid neoplasms derived from follicular cells. *Pathol Int* 48: 184-90.
- Guo, J., S. M. McLachlan, S. Hutchison, and B. Rapoport. 1998.** The greater glycan content of recombinant human thyroid peroxidase of mammalian than of insect cell origin facilitates purification to homogeneity of enzymatically protein remaining soluble at high concentration. *Endocrinology* 139: 999-1005.

## H

- Hallenberger, S., V. Bosch, H. Angliker, E. Shaw, H. D. Klenk, and W. Garten. 1992.** Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* 360: 358-61.
- Hallenberger, S., M. Moulard, M. Sordel, H. D. Klenk, and W. Garten. 1997.** The role of eukaryotic subtilisin-like endoproteases for the activation of human immunodeficiency virus glycoproteins in natural host cells. *J Virol* 71: 1036-45.
- Hamada, N., C. Grimm, H. Mori, and L. J. DeGroot. 1985.** Identification of a thyroid microsomal antigen by Western blot and immunoprecipitation. *J Clin Endocrinol Metab* 61: 120-8.
- Hammond, C., I. Braakman, and A. Helenius. 1994.** Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 913-7.
- Hampton, R. Y. 2002.** ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol* 14: 476-82.
- Hanamura, A., J. F. Caceres, A. Mayeda, B. R. Franza, Jr., and A. R. Krainer. 1998.** Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors. *Rna* 4: 430-44.
- Hata, J., S. Yamashita, S. Yagihashi, H. Kato, S. Kabeno, K. Hirai, K. Kuma, S. Kimura, K. Umeki, T. Kotani, and et al. 1989.** Stable high level expression of human thyroid peroxidase in cultured Chinese hamster ovary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164: 1268-73.
- Hatsuzawa, K., M. Nagahama, S. Takahashi, K. Takada, K. Murakami, and K. Nakayama. 1992.** Purification and characterization of furin, a Kex2-like processing endoprotease, produced in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 267: 16094-9.
- Hebert, D. N., B. Foellmer, and A. Helenius. 1995.** Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* 81: 425-33.
- Hebert, D. N., J. X. Zhang, W. Chen, B. Foellmer, and A. Helenius. 1997.** The number and location of glycans on influenza hemagglutinin determine folding and association with calnexin and calreticulin. *J Cell Biol* 139: 613-23.
- Heinemann, F. S., G. Korza, and J. Ozols. 2003a.** A plasminogen-like protein selectively degrades stearoyl-CoA desaturase in liver microsomes. *J Biol Chem* 278: 42966-75.
- Heinemann, F. S., H. Mziaut, G. Korza, and J. Ozols. 2003b.** A microsomal endopeptidase from liver that preferentially degrades stearoyl-CoA desaturase. *Biochemistry* 42: 6929-37.
- Heinemann, F. S., and J. Ozols. 2003c.** Stearoyl-CoA desaturase, a short-lived protein of endoplasmic reticulum with multiple control mechanisms. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 68: 123-33.
- Helenius, A., and M. Aebi. 2001.** Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291: 2364-9.
- Helenius, J., and M. Aebi. 2002.** Transmembrane movement of dolichol linked carbohydrates during N-glycoprotein biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol* 13: 171-8.
- Helenius, A., and M. Aebi. 2004.** Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73: 1019-49.
- Hellman, R., M. Vanhove, A. Lejeune, F. J. Stevens, and L. M. Hendershot. 1999.** The in vivo association of BiP with newly synthesized proteins is dependent on the rate and stability of folding and not simply on the presence of sequences that can bind to BiP. *J Cell Biol* 144: 21-30.
- Hendershot, L. M. 1990.** Immunoglobulin heavy chain and binding protein complexes are dissociated in vivo by light chain addition. *J Cell Biol* 111: 829-37.
- Hendershot, L., J. Wei, J. Gaut, J. Melnick, S. Aviel, and Y. Argon. 1996.** Inhibition of immunoglobulin folding and secretion by dominant negative BiP ATPase mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5269-74.

**Hendy, G. N., H. P. Bennett, B. F. Gibbs, C. Lazure, R. Day, and N. G. Seidah. 1995.** Parathyroid hormone is preferentially cleaved to parathyroid hormone by the prohormone convertase furin. A mass spectrometric study. *J Biol Chem* 270: 9517-25.

**Horibe, T., M. Gomi, D. Iguchi, H. Ito, Y. Kitamura, T. Masuoka, I. Tsujimoto, T. Kimura, and M. Kikuchi. 2004.** Different contributions of the three CXXC motifs of human protein-disulfide isomerase-related protein to isomerase activity and oxidative refolding. *J Biol Chem* 279: 4604-11.

**Hosokawa, N., I. Wada, K. Hasegawa, T. Yorihuzi, L. O. Tremblay, A. Herscovics, and K. Nagata. 2001.** A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep* 2: 415-22.

**Hosokawa, N., L. O. Tremblay, Z. You, A. Herscovics, I. Wada, and K. Nagata. 2003.** Enhancement of endoplasmic reticulum (ER) degradation of misfolded Null Hong Kong alpha1-antitrypsin by human ER mannosidase I. *J Biol Chem* 278: 26287-94.

**Hosoya, T., H. Yoshimura, N. Naito, N. Suzuki, K. Sato, and J. Takamatsu. 1994.** Isolation of thyroid peroxidase from patients with Graves' disease and comparison with animal peroxidases. *Int J Biochem* 26: 351-65.

**Huang, Y., M. Prasad, W. J. Lemon, H. Hampel, F. A. Wright, K. Kornacker, V. LiVolsi, W. Frankel, R. T. Kloos, C. Eng, N. S. Pellegata, and A. de la Chapelle. 2001.** Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15044-9.

## I

**Ihara, Y., M. F. Cohen-Doyle, Y. Saito, and D. B. Williams. 1999.** Calnexin discriminates between protein conformational states and functions as a molecular chaperone in vitro. *Mol Cell* 4: 331-41.

**Immormino, R. M., D. E. Dollins, P. L. Shaffer, K. L. Soldano, M. A. Walker, and D. T. Gewirth. 2004.** Ligand-induced conformational shift in the N-terminal domain of GRP94, an Hsp90 chaperone. *J Biol Chem* 279: 46162-71.

**Inocencio, N. M., J. F. Sucic, J. M. Moehring, M. J. Spence, and T. J. Moehring. 1997.** Endoprotease activities other than furin and PACE4 with a role in processing of HIV-I gp160 glycoproteins in CHO-K1 cells. *J Biol Chem* 272: 1344-8.

**Isozaki, O., L. D. Kohn, C. A. Kozak, and S. Kimura. 1989.** Thyroid peroxidase: rat cDNA sequence, chromosomal localization in mouse, and regulation of gene expression by comparison to thyroglobulin in rat FRTL-5 cells. *Mol Endocrinol* 3: 1681-92.

**Itin, C., M. Foguet, F. Kappeler, J. Klumperman, and H. P. Hauri. 1995.** Recycling of the endoplasmic reticulum/Golgi intermediate compartment protein ERGIC-53 in the secretory pathway. *Biochem Soc Trans* 23: 541-4.

## J

**Jacob, R., K. Peters, and H. Y. Naim. 2002.** The prosequence of human lactase-phlorizin hydrolase modulates the folding of the mature enzyme. *J Biol Chem* 277: 8217-25.

**Jakob, C. A., D. Bodmer, U. Spirig, P. Battig, A. Marcil, D. Dignard, J. J. Bergeron, D. Y. Thomas, and M. Aebi. 2001.** Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast. *EMBO Rep* 2: 423-30.

**Janse, D. M., B. Crosas, D. Finley, and G. M. Church. 2004.** Localization to the proteasome is sufficient for degradation. *J Biol Chem* 279: 21415-20.

**Jensen, T. J., M. A. Loo, S. Pind, D. B. Williams, A. L. Goldberg, and J. R. Riordan. 1995.** Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* 83: 129-35.

**Jin, L., E. Kulig, X. Qian, B. W. Scheithauer, W. F. Young, Jr., D. H. Davis, N. G. Seidah, M. Chretien, and R. V. Lloyd. 1999.** Distribution and regulation of proconvertases PC1 and PC2 in human pituitary adenomas. *Pituitary* 1: 187-95.

**Jin, W., W. Bi, E. S. Huang, and G. J. Cote. 1999.** Glioblastoma cell-specific expression of fibroblast growth factor receptor-1beta requires an intronic repressor of RNA splicing. *Cancer Res* 59: 316-9.

## K

**Kaji, E. H., and H. F. Lodish. 1993.** In vitro unfolding of retinol-binding protein by dithiothreitol. Endoplasmic reticulum-associated factors. *J Biol Chem* 268: 22195-202.

**Kalnina, Z., P. Zayakin, K. Silina, and A. Line. 2005.** Alterations of pre-mRNA splicing in cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 42: 342-57.

**Kamhi-Nesher, S., M. Shenkman, S. Tolchinsky, S. V. Fromm, R. Ehrlich, and G. Z. Lederkremer. 2001.** A novel quality control compartment derived from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 12: 1711-23.

**Kang, S. J., and P. Cresswell. 2002.** Calnexin, calreticulin, and ERp57 cooperate in disulfide bond formation in human CD1d heavy chain. *J Biol Chem* 277: 44838-44.



- Kang, T., H. Nagase, and D. Pei. 2002.** Activation of membrane-type matrix metalloproteinase 3 zymogen by the proprotein convertase furin in the trans-Golgi network. *Cancer Res* 62: 675-81.
- Kapoor, M., H. Srinivas, E. Kandiah, E. Gemma, L. Ellgaard, S. Oscarson, A. Helenius, and A. Surlia. 2003.** Interactions of substrate with calreticulin, an endoplasmic reticulum chaperone. *J Biol Chem* 278: 6194-200.
- Katsumi, A., T. Senda, Y. Yamashita, T. Yamazaki, M. Hamaguchi, T. Kojima, S. Kobayashi, and H. Saito. 1996.** Protein C Nagoya, an elongated mutant of protein C, is retained within the endoplasmic reticulum and is associated with GRP78 and GRP94. *Blood* 87: 4164-75.
- Kaufman, K. D., B. Rapoport, P. Seto, G. D. Chazenbalk, and R. P. Magnusson. 1989.** Generation of recombinant, enzymatically active human thyroid peroxidase and its recognition by antibodies in the sera of patients with Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Invest* 84: 394-403.
- Kikkawa, F., F. J. Gonzalez, and S. Kimura. 1990.** Characterization of a thyroid-specific enhancer located 5.5 kilobase pairs upstream of the human thyroid peroxidase gene. *Mol Cell Biol* 10: 6216-24.
- Kim, P. S., and P. Arvan. 1991.** Folding and assembly of newly synthesized thyroglobulin occurs in a pre-Golgi compartment. *J Biol Chem* 266: 12412-8.
- Kim, P. S., D. Bole, and P. Arvan. 1992.** Transient aggregation of nascent thyroglobulin in the endoplasmic reticulum: relationship to the molecular chaperone, BiP. *J Cell Biol* 118: 541-9.
- Kim, P. S., K. R. Kim, and P. Arvan. 1993.** Disulfide-linked aggregation of thyroglobulin normally occurs during nascent protein folding. *Am J Physiol* 265: C704-11.
- Kim, P. S., and P. Arvan. 1995.** Calnexin and BiP act as sequential molecular chaperones during thyroglobulin folding in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 128: 29-38.
- Kimata, Y., Y. I. Kimata, Y. Shimizu, H. Abe, I. C. Farcasanu, M. Takeuchi, M. D. Rose, and K. Kohno. 2003.** Genetic evidence for a role of BiP/Kar2 that regulates Ire1 in response to accumulation of unfolded proteins. *Mol Biol Cell* 14: 2559-69.
- Kimura, S., T. Kotani, O. W. McBride, K. Umeki, K. Hirai, T. Nakayama, and S. Ohtaki. 1987.** Human thyroid peroxidase: complete cDNA and protein sequence, chromosome mapping, and identification of two alternately spliced mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 5555-9.
- Kimura, S., and M. Ikeda-Saito. 1988.** Human myeloperoxidase and thyroid peroxidase, two enzymes with separate and distinct physiological functions, are evolutionarily related members of the same gene family. *Proteins* 3: 113-20.
- Kimura, S., Y. S. Hong, T. Kotani, S. Ohtaki, and F. Kikkawa. 1989.** Structure of the human thyroid peroxidase gene: comparison and relationship to the human myeloperoxidase gene. *Biochemistry* 28: 4481-9.
- Kimura, T., H. Ishizuka, A. Yoshida, M. Morii, N. Takeguchi, and S. Asano. 2003.** Quantity and quality control of gastric proton pump in the endoplasmic reticulum by ubiquitin/proteasome system. *Biochemistry* 42: 4771-9.
- Kitahori, Y., M. Cho, N. Konishi, M. Ohshima, E. Matsui, T. Ohnishi, S. Imai, and Y. Hiasa. 1998.** Overexpression of CD44 variant transcripts in rat transplantable thyroid carcinoma lines demonstrating lung metastasis. *Int J Oncol* 13: 505-11.
- Klein, M., I. Gestmann, U. Berndorfer, A. Schmitz, and V. Herzog. 2000.** The thioredoxin boxes of thyroglobulin: possible implications for intermolecular disulfide bond formation in the follicle lumen. *Biol Chem* 381: 593-601.
- Klimpel, K. R., S. S. Molloy, G. Thomas, and S. H. Leppla. 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: 10277-81.
- Knittler, M. R., and I. G. Haas. 1992.** Interaction of BiP with newly synthesized immunoglobulin light chain molecules: cycles of sequential binding and release. *Embo J* 11: 1573-81.
- Kostova, Z., and D. H. Wolf. 2003.** For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *Embo J* 22: 2309-17.
- Kostrouch, Z., F. Bernier-Valentin, Y. Munari-Silem, F. Rajas, R. Rabilloud, and B. Rousset. 1993.** Thyroglobulin molecules internalized by thyrocytes are sorted in early endosomes and partially recycled back to the follicular lumen. *Endocrinology* 132: 2645-53.
- Kriventseva, E. V., I. Koch, R. Apweiler, M. Vingron, P. Bork, M. S. Gelfand, and S. Sunyaev. 2003.** Increase of functional diversity by alternative splicing. *Trends Genet* 19: 124-8.
- Kuliawat, R., M. P. Lisanti, and P. Arvan. 1995.** Polarized distribution and delivery of plasma membrane proteins in thyroid follicular epithelial cells. *J Biol Chem* 270: 2478-82.
- Kuliawat, R., J. Ramos-Castaneda, Y. Liu, and P. Arvan. 2005.** Intracellular trafficking of thyroid peroxidase to the cell surface. *J Biol Chem* 280: 27713-8.
- Kurabuchi, S., and S. Tanaka. 2002.** Immunocytochemical localization of prohormone convertases PC1 and PC2 in the mouse thyroid gland and respiratory tract. *J Histochem Cytochem* 50: 903-9.

## L

- Lacroix, L., T. Pourcher, C. Magnon, N. Bellon, M. Talbot, T. Intaraphairot, B. Caillou, M. Schlumberger, and J. M. Bidart. 2004.** Expression of the apical iodide transporter in human thyroid tissues: a comparison study with other iodide transporters. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 1423-8.
- Lamas, L., P. C. Anderson, J. W. Fox, and J. T. Dunn. 1989.** Consensus sequences for early iodination and hormonogenesis in human thyroglobulin. *J Biol Chem* 264: 13541-5.
- Lareau, L. F., R. E. Green, R. S. Bhatnagar, and S. E. Brenner. 2004.** The evolving roles of alternative splicing. *Curr Opin Struct Biol* 14: 273-82.
- Lazar, V., J. M. Bidart, B. Caillou, C. Mahe, L. Lacroix, S. Filetti, and M. Schlumberger. 1999.** Expression of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene in human thyroid tumors: a comparison study with other thyroid-specific genes. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 3228-34.
- Lazzereschi, D., F. Nardi, A. Turco, L. Ottini, C. D'Amico, R. Mariani-Costantini, A. Gulino, and A. Coppa. 2005.** A complex pattern of mutations and abnormal splicing of Smad4 is present in thyroid tumours. *Oncogene*.
- Le Fur, N., S. R. Kelsall, W. K. Silvers, and B. Mintz. 1997.** Selective increase in specific alternative splice variants of tyrosinase in murine melanomas: a projected basis for immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5332-7.
- Le Fur, N., S. R. Kelsall, W. K. Silvers, and B. Mintz. 1997.** Selective increase in specific alternative splice variants of tyrosinase in murine melanomas: a projected basis for immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5332-7.
- Leach, M. R., M. F. Cohen-Doyle, D. Y. Thomas, and D. B. Williams. 2002.** Localization of the lectin, ERp57 binding, and polypeptide binding sites of calnexin and calreticulin. *J Biol Chem* 277: 29686-97.
- Lee, R., P. Kermani, K. K. Teng, and B. L. Hempstead. 2001.** Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294: 1945-8.
- Lee, Y. K., J. W. Brewer, R. Hellman, and L. M. Hendershot. 1999.** BiP and immunoglobulin light chain cooperate to control the folding of heavy chain and ensure the fidelity of immunoglobulin assembly. *Mol Biol Cell* 10: 2209-19.
- Lenz, O., J. ter Meulen, H. D. Klenk, N. G. Seidah, and W. Garten. 2001.** The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12701-5.
- Leonard, J. D., F. Lin, and M. E. Milla. 2004.** Chaperone-like properties of the prodomain of TACE and the functional role of its cysteine switch. *Biochem J*.
- Levy, O., G. Dai, C. Riedel, C. S. Ginter, E. M. Paul, A. N. Lebowitz, and N. Carrasco. 1997.** Characterization of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter with an anti-COOH terminus antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5568-73.
- Levy, O., A. De la Vieja, and N. Carrasco. 1998.** The Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS): recent advances. *J Bioenerg Biomembr* 30: 195-206.
- Liao, W., B. H. Chang, M. Mancini, and L. Chan. 2003.** Ubiquitin-dependent and -independent proteasomal degradation of apoB associated with endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, respectively, in HepG2 cells. *J Cell Biochem* 89: 1019-29.
- Libert, F., J. Ruel, M. Ludgate, S. Swillens, N. Alexander, G. Vassart, and C. Dinsart. 1987a.** Complete nucleotide sequence of the human thyroperoxidase-microsomal antigen cDNA. *Nucleic Acids Res* 15: 6735.
- Libert, F., J. Ruel, M. Ludgate, S. Swillens, N. Alexander, G. Vassart, and C. Dinsart. 1987b.** Thyroperoxidase, an auto-antigen with a mosaic structure made of nuclear and mitochondrial gene modules. *Embo J* 6: 4193-6.
- Lisi, S., A. Pinchera, R. T. McCluskey, T. E. Willnow, S. Refetoff, C. Marcocci, P. Vitti, F. Menconi, L. Grasso, F. Luchetti, A. B. Collins, and M. Marino. 2003.** Preferential megalin-mediated transcytosis of low-hormonogenic thyroglobulin: a control mechanism for thyroid hormone release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14858-63.
- Lodish, H. F., and N. Kong. 1993.** The secretory pathway is normal in dithiothreitol-treated cells, but disulfide-bonded proteins are reduced and reversibly retained in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 268: 20598-605.
- Long, Y., J. L. Franc, J. Kaniewski, J. Lanet, and A. Giraud. 1991.** Effect of N-glycan removal on the enzymatic activity of porcine thyroid peroxidase. *Eur J Biochem* 202: 501-5.
- Loo, M. A., T. J. Jensen, L. Cui, Y. Hou, X. B. Chang, and J. R. Riordan. 1998b.** Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *Embo J* 17: 6879-87.
- Loo, T. W., and D. M. Clarke. 1998a.** Quality control by proteases in the endoplasmic reticulum. Removal of a protease-sensitive site enhances expression of human P-glycoprotein. *J Biol Chem* 273: 32373-6.
- Lorenzo, M. J., C. Eng, L. M. Mulligan, T. J. Stonehouse, C. S. Healey, B. A. Ponder, and D. P. Smith. 1995.** Multiple mRNA isoforms of the human RET proto-oncogene generated by alternate splicing. *Oncogene* 10: 1377-83.

## M

- Ma, Y., and L. M. Hendershot. 2004.** ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat* 28: 51-65.
- Magnusson, R. P., J. Gestautas, A. Taurog, and B. Rapoport. 1987.** Molecular cloning of the structural gene for porcine thyroid peroxidase. *J Biol Chem* 262: 13885-8.
- Magro, G., M. Schiappacassi, D. Perissinotto, A. Corsaro, C. Borghese, A. Belfiore, A. Colombatti, S. Grasso, C. Botti, E. Bombardieri, and R. Perris. 2003.** Differential expression of mucins 1-6 in papillary thyroid carcinoma: evidence for transformation-dependent post-translational modifications of MUC1 in situ. *J Pathol* 200: 357-69.
- Mains, R. E., C. A. Berard, J. B. Denault, A. Zhou, R. C. Johnson, and R. Leduc. 1997.** PACE4: a subtilisin-like endoprotease with unique properties. *Biochem J* 321 ( Pt 3): 587-93.
- Mancini, R., M. Aebi, and A. Helenius. 2003.** Multiple endoplasmic reticulum-associated pathways degrade mutant yeast carboxypeptidase Y in mammalian cells. *J Biol Chem* 278: 46895-905.
- Maquat, L. E. 2004.** Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 89-99.
- Marino, M., J. A. Friedlander, R. T. McCluskey, and D. Andrews. 1999.** Identification of a heparin-binding region of rat thyroglobulin involved in megalin binding. *J Biol Chem* 274: 30377-86.
- Marino, M., D. Andrews, and R. T. McCluskey. 2000a.** Binding of rat thyroglobulin to heparan sulfate proteoglycans. *Thyroid* 10: 551-9.
- Marino, M., G. Zheng, L. Chiovato, A. Pinchera, D. Brown, D. Andrews, and R. T. McCluskey. 2000b.** Role of megalin (gp330) in transcytosis of thyroglobulin by thyroid cells. A novel function in the control of thyroid hormone release. *J Biol Chem* 275: 7125-37.
- Marriq, C., P. J. Lejeune, N. Venot, and L. Vinet. 1991.** Hormone formation in the isolated fragment 1-171 of human thyroglobulin involves the couple tyrosine 5 and tyrosine 130. *Mol Cell Endocrinol* 81: 155-64.
- Masini-Repiso, A. M., M. Bonaterra, L. Spitale, M. Di Fulvio, M. I. Bonino, A. H. Coleoni, and E. Orgnero-Gaisan. 2004.** Ultrastructural localization of thyroid peroxidase, hydrogen peroxide-generating sites, and monoamine oxidase in benign and malignant thyroid diseases. *Hum Pathol* 35: 436-46.
- Mayer, M., U. Kies, R. Kammermeier, and J. Buchner. 2000.** BiP and PDI cooperate in the oxidative folding of antibodies in vitro. *J Biol Chem* 275: 29421-5.
- Mayer, M., J. Reinstein, and J. Buchner. 2003.** Modulation of the ATPase cycle of BiP by peptides and proteins. *J Mol Biol* 330: 137-44.
- Mbikay, M., N. G. Seidah, and M. Chretien. 2001.** Neuroendocrine secretory protein 7B2: structure, expression and functions. *Biochem J* 357: 329-42.
- McCracken, A. A., and J. L. Brodsky. 1996.** Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J Cell Biol* 132: 291-8.
- McCracken, A. A., and J. L. Brodsky. 2003.** Evolving questions and paradigm shifts in endoplasmic-reticulum-associated degradation (ERAD). *Bioessays* 25: 868-77.
- McLaughlin, S. H., and N. J. Bulleid. 1998.** Thiol-independent interaction of protein disulphide isomerase with type X collagen during intra-cellular folding and assembly. *Biochem J* 331 ( Pt 3): 793-800.
- Melnick, J., S. Aviel, and Y. Argon. 1992.** The endoplasmic reticulum stress protein GRP94, in addition to BiP, associates with unassembled immunoglobulin chains. *J Biol Chem* 267: 21303-6.
- Melnick, J., J. L. Dul, and Y. Argon. 1994.** Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature* 370: 373-5.
- Mezgrhani, H., H. Mziaut, J. Courageot, R. Oughideni, P. Bastiani, and R. Miquelis. 1997.** Identification of the membrane receptor binding domain of thyroglobulin. Insights into quality control of thyroglobulin biosynthesis. *J Biol Chem* 272: 23340-6.
- Mezgrhani, A., J. Courageot, J. C. Mani, M. Pugnieri, P. Bastiani, and R. Miquelis. 2000.** Protein-disulfide isomerase (PDI) in FRTL5 cells. pH-dependent thyroglobulin/PDI interactions determine a novel PDI function in the post-endoplasmic reticulum of thyrocytes. *J Biol Chem* 275: 1920-9.
- Miquelis, R., C. Alquier, and M. Monsigny. 1987.** The N-acetylglucosamine-specific receptor of the thyroid. Binding characteristics, partial characterization, and potential role. *J Biol Chem* 262: 15291-8.
- Miquelis, R., J. Courageot, A. Jacq, O. Blanck, C. Perrin, and P. Bastiani. 1993.** Intracellular routing of GLcNAc-bearing molecules in thyrocytes: selective recycling through the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 123: 1695-706.
- Molina, F., B. Pau, and C. Granier. 1996.** The type-1 repeats of thyroglobulin regulate thyroglobulin degradation and T3, T4 release in thyrocytes. *FEBS Lett* 391: 229-31.
- Molinari, M., and A. Helenius. 2000.** Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science* 288: 331-3.

**Molinari, M., C. Galli, V. Piccaluga, M. Pieren, and P. Paganetti. 2002.** Sequential assistance of molecular chaperones and transient formation of covalent complexes during protein degradation from the ER. *J Cell Biol* 158: 247-57.

**Molinari, M., V. Calanca, C. Galli, P. Lucca, and V. Calanca. 2003.** Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. *Science* 299: 1397-400.

**Molloy, S. S., P. A. Bresnahan, S. H. Leppla, K. R. Klimpel, and G. Thomas. 1992.** Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J Biol Chem* 267: 16396-402.

**Molloy, S. S., E. D. Anderson, F. Jean, and G. Thomas. 1999.** Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol* 9: 28-35.

**Montuori, N., F. Pacifico, S. Mellone, D. Liguoro, B. Di Jeso, S. Formisano, F. Gentile, and E. Consiglio. 2000.** The rat asialoglycoprotein receptor binds the amino-terminal domain of thyroglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* 268: 42-6.

**Morgunova, E., A. Tuuttila, U. Bergmann, M. Isupov, Y. Lindqvist, G. Schneider, and K. Tryggvason. 1999.** Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *Science* 284: 1667-70.

**Morishita, K., N. Kubota, S. Asano, Y. Kaziro, and S. Nagata. 1987.** Molecular cloning and characterization of cDNA for human myeloperoxidase. *J Biol Chem* 262: 3844-51.

**Mouchantaf, R., H. L. Watt, T. Sulea, N. G. Seidah, H. Alturaihi, Y. C. Patel, and U. Kumar. 2004.** Prosomatostatin is proteolytically processed at the amino terminal segment by subtilase SKI-1. *Regul Pept* 120: 133-40.

**Moulard, M., and E. Decroly. 2000.** Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *Biochim Biophys Acta* 1469: 121-32.

**Mowla, S. J., S. Pareek, H. F. Farhadi, K. Petrecca, J. P. Fawcett, N. G. Seidah, S. J. Morris, W. S. Sossin, and R. A. Murphy. 1999.** Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *J Neurosci* 19: 2069-80.

**Mowla, S. J., H. F. Farhadi, S. Pareek, J. K. Atwal, S. J. Morris, N. G. Seidah, and R. A. Murphy. 2001.** Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* 276: 12660-6.

**Muller, L., X. Zhu, and I. Lindberg. 1997.** Mechanism of the facilitation of PC2 maturation by 7B2: involvement in ProPC2 transport and activation but not folding. *J Cell Biol* 139: 625-38.

**Munzer, J. S., A. Basak, M. Zhong, A. Mamarbachi, J. Hamelin, D. Savaria, C. Lazure, G. N. Hendy, S. Benjannet, M. Chretien, and N. G. Seidah. 1997.** In vitro characterization of the novel proprotein convertase PC7. *J Biol Chem* 272: 19672-81.

**Muresan, Z., and P. Arvan. 1997.** Thyroglobulin transport along the secretory pathway. Investigation of the role of molecular chaperone, GRP94, in protein export from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 272: 26095-102.

## N

**Nagase, H., and J. F. Woessner, Jr. 1999.** Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274: 21491-4.

**Nagayama, Y., P. Seto, and B. Rapoport. 1990.** Characterization, by molecular cloning, of smaller forms of thyroid peroxidase messenger ribonucleic acid in human thyroid cells as alternatively spliced transcripts. *J Clin Endocrinol Metab* 71: 384-90.

**Nakamura, Y., S. Oghihara, and S. Ohtaki. 1987.** Activation by ATP of calcium-dependent NADPH-oxidase generating hydrogen peroxide in thyroid plasma membranes. *J Biochem (Tokyo)* 102: 1121-32.

**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): 625-35.

**Naureckiene, S., L. Ma, K. Sreekumar, U. Purandare, C. F. Lo, Y. Huang, L. W. Chiang, J. M. Grenier, B. A. Ozenberger, J. S. Jacobsen, J. D. Kennedy, P. S. DiStefano, A. Wood, and B. Bingham. 2003.** Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K. *Arch Biochem Biophys* 420: 55-67.

**Nauseef, W. M., S. J. McCormick, and M. Goedken. 1998.** Coordinated participation of calreticulin and calnexin in the biosynthesis of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 273: 7107-11.

**Negroiu, G., R. A. Dwek, and S. M. Petrescu. 2003.** The inhibition of early N-glycan processing targets TRP-2 to degradation in B16 melanoma cells. *J Biol Chem* 278: 27035-42.

**Ng, D. T., and P. Walter. 1994.** Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 6: 510-6.

**Niccoli, P., L. Fayadat, V. Panneels, J. Lanet, and J. L. Franc. 1997.** Human thyroperoxidase in its alternatively spliced form (TPO2) is enzymatically inactive and exhibits changes in intracellular processing and trafficking. *J Biol Chem* 272: 29487-92.

- Niccoli-Sire, P., L. Fayadat, S. Siffroi-Fernandez, Y. Malthierry, and J. L. Franc. 2001.** Alternatively spliced form of human thyroperoxidase, TPOzanelli: activity, intracellular trafficking, and role in hormonogenesis. *Biochemistry* 40: 2572-9.
- Nishikawa, S. I., S. W. Fewell, Y. Kato, J. L. Brodsky, and T. Endo. 2001.** Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. *J Cell Biol* 153: 1061-70.
- Nissim-Rafinia, M., and B. Kerem. 2002.** Splicing regulation as a potential genetic modifier. *Trends Genet* 18: 123-7.
- Norton, P. A. 1994.** Alternative pre-mRNA splicing: factors involved in splice site selection. *J Cell Sci* 107: 1-7.

## O

- Oda, Y., N. Hosokawa, I. Wada, and K. Nagata. 2003.** EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science* 299: 1394-7.
- Ohtaki, S., H. Nakagawa, M. Nakamura, and I. Yamazaki. 1982.** One- and two-electron oxidations of tyrosine, monoiodotyrosine, and diiodotyrosine catalyzed by hog thyroid peroxidase. *J Biol Chem* 257: 13398-403.
- Oliver, J. D., F. J. van der Wal, N. J. Bulleid, and S. High. 1997.** Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins. *Science* 275: 86-8.
- Oliver, J. D., H. L. Roderick, D. H. Llewellyn, and S. High. 1999.** ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol Biol Cell* 10: 2573-82.
- Olsson, I., E. Bulow, and M. Hansson. 2004.** Biosynthesis and sorting of myeloperoxidase in hematopoietic cells. *Jpn J Infect Dis* 57: S13-4.
- Otsu, M., R. Urade, M. Kito, F. Omura, and M. Kikuchi. 1995.** A possible role of ER-60 protease in the degradation of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 270: 14958-61.

## P

- Pandhare, J., and V. Deshpande. 2004.** Both chaperone and isomerase functions of protein disulfide isomerase are essential for acceleration of the oxidative refolding and reactivation of dimeric alkaline protease inhibitor. *Protein Sci* 13: 2493-501.
- Park, Y. N., and P. Arvan. 2004.** The acetylcholinesterase homology region is essential for normal conformational maturation and secretion of thyroglobulin. *J Biol Chem* 279: 17085-9.
- Paulsson, K., and P. Wang. 2003.** Chaperones and folding of MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1641: 1-12.
- Pelham, H. R. 1990.** The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* 15: 483-6.
- Pfeffer, S. R., and J. E. Rothman. 1987.** Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu Rev Biochem* 56: 829-52.
- Phillips, M. A., and W. J. Rutter. 1996.** Role of the prodomain in folding and secretion of rat pancreatic carboxypeptidase A1. *Biochemistry* 35: 6771-6.
- Pirneskoski, A., P. Klappa, M. Lobell, R. A. Williamson, L. Byrne, H. I. Alanen, K. E. Salo, K. I. Kivirikko, R. B. Freedman, and L. W. Ruddock. 2004.** Molecular characterization of the principal substrate binding site of the ubiquitous folding catalyst protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 279: 10374-81.
- Popescu, C. I., C. Paduraru, R. A. Dwek, and S. M. Petrescu. 2005.** Soluble tyrosinase is an endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation substrate retained in the ER by calreticulin and BiP/GRP78 and not calnexin. *J Biol Chem* 280: 13833-40.
- Porra, V., F. Bernier-Valentin, S. Trouttet-Masson, N. Berger-Dutrieux, J. L. Peix, A. Perrin, S. Selmi-Ruby, and B. Rousset. 2002.** Characterization and semiquantitative analyses of pendrin expressed in normal and tumoral human thyroid tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1700-7.
- Portmann, L., N. Hamada, G. Heinrich, and L. J. DeGroot. 1985.** Anti-thyroid peroxidase antibody in patients with autoimmune thyroid disease: possible identity with anti-microsomal antibody. *J Clin Endocrinol Metab* 61: 1001-3.
- Pullikotil, P., M. Vincent, S. T. Nichol, and N. G. Seidah. 2004.** Development of protein-based inhibitors of the proprotein of convertase SKI-1/S1P: processing of SREBP-2, ATF6, and a viral glycoprotein. *J Biol Chem* 279: 17338-47.

## Q

- Qiu, W., R. Kohen-Avramoglu, F. Rashid-Kolvear, C. S. Au, T. M. Chong, G. F. Lewis, D. K. Trinh, R. C. Austin, R. Urade, and K. Adeli. 2004.** Overexpression of the endoplasmic reticulum 60 protein ER-60 downregulates apoB100 secretion by inducing its intracellular degradation via a nonproteasomal pathway: evidence for an ER-60-mediated and pCMB-sensitive intracellular degradative pathway. *Biochemistry* 43: 4819

**R**

**Radcliffe, C. M., G. Diedrich, D. J. Harvey, R. A. Dwek, P. Cresswell, and P. M. Rudd. 2002.** Identification of specific glycoforms of major histocompatibility complex class I heavy chains suggests that class I peptide loading is an adaptation of the quality control pathway [EMBO J. 21\(18\):4641-4649](https://doi.org/10.1093/emboj/cdk1827). doi: 10.1093/emboj/cdk1827

**Ramos, C., J.**



## T

- Takagi, H., and M. Takahashi. 2003.** A new approach for alteration of protease functions: pro-sequence engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 1-9.
- Takahashi, S., T. Nakagawa, K. Kasai, T. Banno, S. J. Duguay, W. J. Van de Ven, K. Murakami, and K. Nakayama. 1995.** A second mutant allele of furin in the processing-incompetent cell line, LoVo. Evidence for involvement of the homo B domain in autocatalytic activation. *J Biol Chem* 270: 26565-9.
- Tamura, T., T. Yamashita, H. Segawa, and H. Taira. 2002.** N-linked oligosaccharide chains of Sendai virus fusion protein determine the interaction with endoplasmic reticulum molecular chaperones. *FEBS Lett* 513: 153-8.
- Tanaka, S. 2003.** Comparative aspects of intracellular proteolytic processing of peptide hormone precursors: studies of proopiomelanocortin processing. *Zool Sci* 20: 1183-98.
- Tatu, U., and A. Helenius. 1997.** Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 136: 555-65.
- Taugog, A. 1970.** Thyroid peroxidase and thyroxine biosynthesis. *Recent Prog Horm Res* 26: 189-247.
- Taugog, A., M. L. Dorris, N. Yokoyama, and C. Slaughter. 1990.** Purification and characterization of a large, tryptic fragment of human thyroid peroxidase with high catalytic activity. *Arch Biochem Biophys* 278: 333-41.
- Taugog, A., M. L. Dorris, and D. R. Doerge. 1996.** Mechanism of simultaneous iodination and coupling catalyzed by thyroid peroxidase. *Arch Biochem Biophys* 330: 24-32.
- Taugog, A. 1999.** Molecular evolution of thyroid peroxidase. *Biochimie* 81: 557-62.
- Taxis, C., R. Hitt, S. H. Park, P. M. Deak, Z. Kostova, and D. H. Wolf. 2003.** Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of ERAD. *J Biol Chem* 278: 35903-13.
- Teckman, J. H., J. Burrows, T. Hidvegi, B. Schmidt, P. D. Hale, and D. H. Perlmutter. 2001.** The proteasome participates in degradation of mutant alpha 1-antitrypsin Z in the endoplasmic reticulum of hepatoma-derived hepatocytes. *J Biol Chem* 276: 44865-72.
- Tepel, C., D. Bromme, V. Herzog, and K. Brix. 2000.** Cathepsin K in thyroid epithelial cells: sequence, localization and possible function in extracellular proteolysis of thyroglobulin. *J Cell Sci* 113 Pt 24: 4487-98.
- Thibault, V., O. Blanck, J. Courageot, C. Pachetti, C. Perrin, A. de Mascarel, and R. Miquelis. 1993.** The N-acetylglucosamine-specific receptor of the thyroid: purification, further characterization, and expression patterns on normal and pathological glands. *Endocrinology* 132: 468-76.
- Thomsen, A. R., L. Sottrup-Jensen, G. J. Gleich, and C. Oxvig. 2000.** The status of half-cystine residues and locations of N-glycosylated asparagine residues in human eosinophil peroxidase. *Arch Biochem Biophys* 379: 147-52.
- Tian, R., S. J. Li, D. L. Wang, Z. Zhao, Y. Liu, and R. Q. He. 2004.** The acidic C-terminal domain stabilizes the chaperone function of protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 279: 48830-5.
- Toure, B. B., J. S. Munzer, A. Basak, S. Benjannet, J. Rochemont, C. Lazure, M. Chretien, and N. G. Seidah. 2000.** Biosynthesis and enzymatic characterization of human SKI-1/S1P and the processing of its inhibitory prosegment. *J Biol Chem* 275: 2349-58.
- Toyoda, N., M. Nishikawa, Y. Mori, M. Yoshimura, H. Masaki, A. Gondou, T. Yonemoto, and M. Inada. 1992.** Identification of a 27-kilodalton protein with the properties of type I iodothyronine 5'-deiodinase in human thyroid gland. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 533-8.
- Trombetta, E. S., and A. J. Parodi. 2003.** Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 649-76.
- Turner, G. C., and A. Varshavsky. 2000.** Detecting and measuring cotranslational protein degradation in vivo. *Science* 289: 2117-20.

## U

- Umeki, K., T. Tanaka, I. Yamamoto, Y. Aratake, T. Kotani, F. Sakamoto, S. Noguchi, and S. Ohtaki. 1996.** Differential expression of dipeptidyl peptidase IV (CD26) and thyroid peroxidase in neoplastic thyroid tissues. *Endocr J* 43: 53-60.
- Urade, R., and M. Kito. 1992.** Inhibition by acidic phospholipids of protein degradation by ER-60 protease, a novel cysteine protease, of endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 312: 83-6.
- Urade, R., H. Okudo, H. Kato, T. Moriyama, and Y. Arakaki. 2004.** ER-60 domains responsible for interaction with calnexin and calreticulin. *Biochemistry* 43: 8858-68.
- Uversky, V. N., and A. L. Fink. 2002.** The chicken-egg scenario of protein folding revisited. *FEBS Lett* 515: 79-83.



## V

- van de Graaf, S. A., C. Ris-Stalpers, E. Pauws, F. M. Mendive, H. M. Targovnik, and J. J. de Vijlder. 2001.** Up to date with human thyroglobulin. *J Endocrinol* 170: 307-21.
- Vashist, S., W. Kim, W. J. Belden, E. D. Spear, C. Barlowe, and D. T. Ng. 2001.** Distinct retrieval and retention mechanisms are required for the quality control of endoplasmic reticulum protein folding. *J Cell Biol* 155: 355-68.
- Vashist, S., and D. T. Ng. 2004.** Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol* 165: 41-52.
- Vassilakos, A., M. F. Cohen-Doyle, P. A. Peterson, M. R. Jackson, and D. B. Williams. 1996.** The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules. *Embo J* 15: 1495-506.
- Venables, J. P. 2004.** Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Res* 64: 7647-54.
- Vey, M., W. Schafer, S. Berghofer, H. D. Klenk, and W. Garten. 1994.** Maturation of the trans-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation. *J Cell Biol* 127: 1829-42.
- Vidricaire, G., J. B. Denault, and R. Leduc. 1993.** Characterization of a secreted form of human furin endoprotease. *Biochem Biophys Res Commun* 195: 1011-8.

## W

- Wang, P., M. Tortorella, K. England, A. M. Malfait, G. Thomas, E. C. Arner, and D. Pei. 2004.** Proprotein convertase furin interacts with and cleaves pro-ADAMTS4 (Aggrecanase-1) in the trans-Golgi network. *J Biol Chem* 279: 15434-40.
- Wang, R. F., E. Appella, Y. Kawakami, X. Kang, and S. A. Rosenberg. 1996.** Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 184: 2207-16.
- Wang, T., and D. N. Hebert. 2003.** EDEM an ER quality control receptor. *Nat Struct Biol* 10: 319-21.
- Wang, X., and D. Pei. 2001.** Shedding of membrane type matrix metalloproteinase 5 by a furin-type convertase: a potential mechanism for down-regulation. *J Biol Chem* 276: 35953-60.
- Ware, F. E., A. Vassilakos, P. A. Peterson, M. R. Jackson, M. A. Lehrman, and D. B. Williams. 1995.** The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J Biol Chem* 270: 4697-704.
- Wassenberg, J. J., R. C. Reed, and C. V. Nicchitta. 2000.** Ligand interactions in the adenosine nucleotide-binding domain of the Hsp90 chaperone, GRP94. II. Ligand-mediated activation of GRP94 molecular chaperone and peptide binding activity. *J Biol Chem* 275: 22806-14.
- Watanabe, S., S. Murata, H. Kumura, S. Nakamura, A. Bollen, N. Moguilevsky, and K. Shimazaki. 2000.** Bovine lactoperoxidase and its recombinant: comparison of structure and some biochemical properties. *Biochem Biophys Res Commun* 274: 756-61.
- Watson, L. M., A. K. Chan, L. R. Berry, J. Li, S. K. Sood, J. G. Dickhout, L. Xu, G. H. Werstuck, L. Bajzar, H. J. Klamut, and R. C. Austin. 2003.** Overexpression of the 78-kDa glucose-regulated protein/immunoglobulin-binding protein (GRP78/BiP) inhibits tissue factor procoagulant activity. *J Biol Chem* 278: 17438-47.
- Wearsch, P. A., C. A. Jakob, A. Vallin, R. A. Dwek, P. M. Rudd, and P. Cresswell. 2004.** Major histocompatibility complex class I molecules expressed with monoglucosylated N-linked glycans bind calreticulin independently of their assembly status. *J Biol Chem* 279: 25112-21.
- Wei, J., J. R. Gaut, and L. M. Hendershot. 1995.** In vitro dissociation of BiP-peptide complexes requires a conformational change in BiP after ATP binding but does not require ATP hydrolysis. *J Biol Chem* 270: 26677-82.
- Wetmore, D. R., and K. D. Hardman. 1996.** Roles of the propeptide and metal ions in the folding and stability of the catalytic domain of stromelysin (matrix metalloproteinase 3). *Biochemistry* 35: 6549-58.
- Whiteley, E. M., T. A. Hsu, and M. J. Betenbaugh. 1997.** Thioredoxin domain non-equivalence and anti-chaperone activity of protein disulfide isomerase mutants in vivo. *J Biol Chem* 272: 22556-63.
- Wilkinson, B., and H. F. Gilbert. 2004.** Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta* 1699: 35-44.
- Wilson, C. M., M. R. Farmery, and N. J. Bulleid. 2000.** Pivotal role of calnexin and mannanose trimming in regulating the endoplasmic reticulum-associated degradation of major histocompatibility complex class I heavy chain. *J Biol Chem* 275: 21224-32.
- Winther, J. R., T. H. Stevens, and M. C. Kielland-Brandt. 1991.** Yeast carboxypeptidase Y requires glycosylation for efficient intracellular transport, but not for vacuolar sorting, in vivo stability, or activity. *Eur J Biochem* 197: 681-9.
- Wu, Y., M. T. Swulius, K. W. Moremen, and R. N. Sifers. 2003.** Elucidation of the molecular logic by which misfolded alpha 1-antitrypsin is preferentially selected for degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8229-34.

**X**

**Xiao, S., M. L. Dorris, A. B. Rawitch, and A. Taurog. 1996.** Selectivity in tyrosyl iodination sites in human thyroglobulin. *Arch Biochem Biophys* 334: 284-94.

**Y**

**Yana, I., and S. J. Weiss. 2000.** Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol Biol Cell* 11: 2387-401.

**Yang, M., S. Omura, J. S. Bonifacino, and A. M. Weissman. 1998.** Novel aspects of degradation of T cell receptor subunits from the endoplasmic reticulum (ER) in T cells: importance of oligosaccharide processing, ubiquitination, and proteasome-dependent removal from ER membranes. *J Exp Med* 187: 835-46.

**Yang, S. X., H. G. Pollock, and A. B. Rawitch. 1996.** Glycosylation in human thyroglobulin: location of the N-linked oligosaccharide units and comparison with bovine thyroglobulin. *Arch Biochem Biophys* 327: 61-70.

**Yokoyama, N., and A. Taurog. 1988.** Porcine thyroid peroxidase: relationship between the native enzyme and an active, highly purified tryptic fragment. *Mol Endocrinol* 2: 838-44.

**Yokoyama, N., A. Taurog, and G. G. Klee. 1989.** Thyroid peroxidase and thyroid microsomal autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 68: 766-73.

**Yoshida, Y. 2003.** A novel role for N-glycans in the ERAD system. *J Biochem (Tokyo)* 134: 183-90.

**Z**

**Zanelli, E., M. Henry, B. Charvet, and Y. Malthiery. 1990.** Evidence for an alternate splicing in the thyroperoxidase messenger from patients with Graves' disease. *Biochem Biophys Res Commun* 170: 735-41.

**Zapun, A., C. A. Jakob, D. Y. Thomas, and J. J. Bergeron. 1999.** Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum. *Structure Fold Des* 7: R173-82.

**Zeng, J., and R. E. Fenna. 1992.** X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. *J Mol Biol* 226: 185-207.

**Zhang, J., and H. Herscovitz. 2003.** Nascent lipidated apolipoprotein B is transported to the Golgi as an incompletely folded intermediate as probed by its association with network of endoplasmic reticulum molecular chaperones, GRP94, ERp72, BiP, calreticulin, and cyclophilin B. *J Biol Chem* 278: 7459-68.

**Zhang, X., and P. Arvan. 2000.** Cell type-dependent differences in thyroid peroxidase cell surface expression. *J Biol Chem* 275: 31946-53.

**Zhang, Y., G. Nijbroek, M. L. Sullivan, A. A. McCracken, S. C. Watkins, S. Michaelis, and J. L. Brodsky. 2001.** Hsp70 molecular chaperone facilitates endoplasmic reticulum-associated protein degradation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in yeast. *Mol Biol Cell* 12: 1303-14.

**Zheng, G., D. R. Bachinsky, I. Stamenkovic, D. K. Strickland, D. Brown, G. Andres, and R. T. McCluskey. 1994.** Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, gp330 and LRP/alpha 2MR, and the receptor-associated protein (RAP). *J Histochem Cytochem* 42: 531-42.

**Zhong, M., J. S. Munzer, A. Basak, S. Benjannet, S. J. Mowla, E. Decroly, M. Chretien, and N. G. Seidah. 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: 33913-20.

**Zhou, A., and R. E. Mains. 1994.** Endoproteolytic processing of proopiomelanocortin and prohormone convertases 1 and 2 in neuroendocrine cells overexpressing prohormone convertases 1 or 2. *J Biol Chem* 269: 17440-7.

**Zhou, A., G. Webb, X. Zhu, and D. F. Steiner. 1999.** Proteolytic processing in the secretory pathway. *J Biol Chem* 274: 20745-8.

**Zimmer, K. P., G. F. Scheumann, J. Bramswig, W. Bocker, E. Harms, and K. W. Schmid. 1997.** Ultrastructural localization of IgG and TPO in autoimmune thyrocytes referring to the transcytosis of IgG and the antigen presentation of TPO. *Histochem Cell Biol* 107: 115-20.

**Zimmer, G., L. Budz, and G. Herrler. 2001.** Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. *J Biol Chem* 276: 31642-50.

**Zuber, C., M. J. Spiro, B. Guhl, R. G. Spiro, and J. Roth. 2000.** Golgi apparatus immunolocalization of endomannosidase suggests post-endoplasmic reticulum glucose trimming: implications for quality control. *Mol Biol Cell* 11: 4227-40.

**Zuber, C., J. Y. Fan, B. Guhl, A. Parodi, J. H. Fessler, C. Parker, and J. Roth. 2001.** Immunolocalization of UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase indicates involvement of pre-Golgi intermediates in protein quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10710-5.