

## **INFORMATION TO USERS**

**This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.**

**The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.**

**In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.**

**Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.**

**ProQuest Information and Learning  
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA  
800-521-0600**

**UMI<sup>®</sup>**



UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**ZIS-SR : UNE NOUVELLE PROTÉINE APPARENTÉE AUX PROTÉINES  
SR EST NÉCESSAIRE AU MAINTIEN DU PHÉNOTYPE ENDOCRINIEN**

par

**ROXANE DESJARDINS**

Département de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
maître ès sciences (M.Sc.)

Août 2000



**National Library  
of Canada**

**Acquisitions and  
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

**Bibliothèque nationale  
du Canada**

**Acquisitions et  
services bibliographiques**

**395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

**The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.**

**The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.**

**L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.**

**L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.**

0-612-74357-8

**Canada**

*Le connu est fini, l'inconnu infini; ce que nous comprenons n'est qu'un îlot perdu dans l'océan illimité de l'inexplicable. Et chaque génération se devra d'agrandir ce territoire.*

T.H. Huxley, 1887.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>iii</b>
<b>PUBLICATION ET COMMUNICATIONS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>xii</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>xiv</b>
 <b>INTRODUCTION</b>	
1.1 MISE EN CONTEXTE DE L'ÉTUDE.....	1
1.2 VOIE DE SÉCRÉTION CONSTITUTIVE ET RÉGULÉE .....	2
1.3 VÉSICULES DE TRANSPORT IMPLIQUÉES .....	4
1.4 TRIAGE DES PROTÉINES VERS LA VOIE DE SÉCRÉTION RÉGULÉE	
1.4.1 Deux modèles proposés pour le triage des protéines vers les granules de sécrétion. ....	6
1.4.2 L'aggrégation est essentielle au triage des protéines vers la voie régulée. ....	8
1.4.3 Le triage des protéines via l'interaction avec un récepteur potentiel...10	
1.4.4 Motif de liaison reconnu par un récepteur potentiel de triage. ....11	
1.4.5 Interactions avec les composantes membranaires du granule. ....13	
1.5 FORMATION DES GRANULES DE SÉCRÉTION À PARTIR DU TGN ..15	
1.5.1 Régulation de la biogénèse des granules de sécrétion .....	17
1.6 DERNIÈRE ÉTAPE : L'EXOCYTOSE .....	19

1.7 LES CARBOXYPEPTIDASES ET CARBOXYPEPTIDASES E .....	20
1.8 MODÈLE CELLULAIRE .....	23
1.9 BUT DE L'ÉTUDE .....	30

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

2.1 MATÉRIEL GÉNÉRAL .....	32
2.2 CULTURE CELLULAIRE DES DIFFÉRENTES LIGNÉES UTILISÉES ET TRANSFECTION .....	32
2.2.1 Culture des cellules AtT-20 .....	33
2.2.2 Culture de la lignée 6T3 .....	33
2.2.3 Transfection .....	34
2.2.4 Création de lignées stables .....	35
2.3 EXTRACTION D'ARN ET BUVARDAGE DE TYPE NORTHERN .....	37
2.3.1 Extraction d'ARN total .....	37
2.3.2 Dosage de l'ARN .....	38
2.3.3 Buvardage de type Northern .....	39
2.3.4 Préparation des ribosondes de Zis-SR .....	40
2.3.5 Hybridation de la membrane avec les sondes .....	40
2.4 AMPLIFICATION DE L'ADNc COMPLET DE ZIS-SR .....	41
2.4.1 RACE .....	41
2.4.2 Sous clonage dans le vecteur pCR®II-TOPO .....	45
2.4.3 Extraction de l'ADN plasmidique à petite et grande échelle.....	45
2.4.4 Séquençage des clones positifs .....	46
2.5 CLONAGE DU FRAGMENT DE ZIS-SR UTILISÉ POUR LA SYNTHÈSE D'UNE RIBOSONDE. ....	46

2.6 HYBRIDATION <i>IN SITU</i> .....	47
2.7 AMPLIFICATION ET SÉQUENÇAGE DE LA RÉGION SE PRODUISANT LE CHANGEMENT DANS LE CADRE DE LECTURE DANS LA SÉQUENCE DE ZIS-SR .....	48
2.7.1 Transcription inverse .....	48
2.7.2 Amplification par PCR du fragment .....	49
2.7.3 Séquençage .....	49
2.8 CONSTRUCTION DES FRAGMENTS ANTI-SENS ZIS-SR DANS VECTEUR D'EXPRESSION .....	50
2.8.1 Amplification par PCR des différents fragments .....	50
2.8.2 Sous-clonage dans les vecteurs pCRII-TOPO et pCDNA3.1 .....	52
2.9 IMMUNOFLUORESCENCE .....	53
2.10 EXPÉRIENCES DE SÉCRÉTION .....	54
2.10.1 Stimulation de la relâche du contenu de la voie régulée .....	54
2.10.2 Analyse des protéines par buvardage de type Western .....	55
2.11 MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE .....	56
<b>RÉSULTATS</b>	
3.1 RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES .....	58
3.1.1 Induction du gène GAP1-5A suite à une stimulation à l'AMPc .....	59
3.1.2 Distribution cellulaire et tissulaire de GAP1-5A .....	61
3.1.3 Localisation du gène GAP1-5A par hybridation <i>in situ</i> .....	63
3.2 CLONAGE ET SÉQUENCE DU GÈNE GAP1-5A .....	66
3.2.1 Résultat obtenu suite au clonage par RACE .....	66



3.2.2 Séquence complète du gène GAP1-5A .....	68
3.2.3 Homologie de séquences avec celle de GAP1-5A .....	71
3.2.4 Séquençage de la région où se produit le changement dans le cadre de lecture.....	73
3.2.5 Analyse de la séquence Zis-SR .....	75
<b>3.3 ÉTUDE DU GÈNE ZIS-SR PAR L'APPROCHE ANTI-SENS .....</b>	<b>79</b>
3.3.1 Oligonucléotides anti-sens .....	79
3.3.2 Expression du Zis-SR suite à l'expression des anti-sens par le vecteur d'expression pcDNA3.1 .....	81
3.3.3 Effet sur la carboxypeptidase E (CPE) chez la lignée clonale AtT-20/700AS #3 en immunofluorescence. ....	84
3.3.4 Expression de l'ARNm de la CPE et contenu cellulaire en CPE chez la lignée clonale AtT-20/700 AS #3. ....	86
3.3.5 Sécrétion de la CPE chez la lignée clonale AtT-20/700 AS #3 .....	88
3.3.6 Microscopie électronique sur les cellules AtT-20/700 AS #3. ....	91
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>93</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>110</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>113</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>115</b>

## **PUBLICATION ET COMMUNICATIONS**

### **PUBLICATION**

DESJARDINS R., BERGERON F., LANOUE E., DAY R. The 6T3 Cell Line Is A Unique Model Cell Line To Identify Genes Related To The Biogenesis Of Secretory Granules (en préparation)

### **COMMUNICATIONS**

F. BERGERON, R. DESJARDINS, R. DAY. Zis/GAP1-5A : A novel endocrine-related SR protein that is a potential candidate for the maintenance of the endocrine phenotype. Endocrine Society, Mai 1999, San Diego. Présentation par affichage.

R. DESJARDINS, F. BERGERON, R. DAY. The 6T3 Cell Line Is A Unique Model Cell Line To Identify Genes Related To The Biogenesis Of Secretory Granules. Gordon Research Conferences : Hormonal and Neural Peptide Biosynthesis, Juillet 2000, Colby Sawyer College, New London, New Hampshire. Présentation par affichage.

R. DESJARDINS, F. BERGERON, R. DAY. Zis/GAP1-5A: Une nouvelle protéine apparentée aux protéines SR est un candidat potentiel au maintien du phénotype endocrinien. Congrès du Club de Recherches Cliniques du Québec, Oct. 1999 Montebello, Qc. Présentation par affichage.

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b>	Schéma représentant les 2 voies de sécrétion, la voie régulée et la voie constitutive chez une cellule. ....	3
<b>Figure 2</b>	Modèles possibles pour le triage des protéines destinées vers les granules de sécrétion. ....	7
<b>Figure 3</b>	Les mécanismes possibles de triage des protéines de sécrétion régulée. ....	14
<b>Figure 4</b>	Modèle de formation des granules de sécrétion à partir de la membrane du TGN. ....	16
<b>Figure 5</b>	Schéma représentant la régulation de la formation des granules de sécrétion par les protéines $G_S$ et $G_{i/o}$ et par une phosphoprotéine. ....	18
<b>Figure 6</b>	Mécanisme d'exocytose du contenu des granules de sécrétion. ....	21
<b>Figure 7</b>	Induction de l'expression de la POMC suite à une stimulation des cellules 6T3 à l'AMPc. ....	26
<b>Figure 8</b>	Induction de la formation des granules de sécrétion suite à la stimulation des cellules 6T3 à l'AMPc. ....	27
<b>Figure 9</b>	Immunodétection par RIA de la $\beta$ -Endorphine relâchée suite à la stimulation au KCl des cellules 6T3 traitées à l'AMPc. ....	28
<b>Figure 10</b>	Activation de la transcription de gènes par AMPc. ....	29
<b>Figure 11</b>	Représentation schématique de l'amplification du gène Zis-SR par la méthode de RACE. ....	42
<b>Figure 12</b>	Clone Zis-SR dans pCRII-TOPO. ....	44

<b>Figure 13</b> Buvardage de type Northern montrant l'induction du gène Zis-SR par l'AMPc. ....	60
<b>Figure 14</b> Distribution tissulaire et cellulaire de Zis-SR. ....	62
<b>Figure 15</b> Distribution de l'ARNm de Zis-SR exprimé dans le cerveau de souris. ....	64
<b>Figure 16</b> Distribution neuronale de Zis-SR. ....	65
<b>Figure 17</b> Résultat obtenu suite au RACE (Rapid Amplification cDNA Ends). ....	67
<b>Figure 18</b> Séquence ADN/protéine de Zis-SR. ....	69
<b>Figure 19</b> Alignement de protéines homologues chez différentes espèces avec la séquence en protéine de Zis-SR. ....	72
<b>Figure 20</b> Séquence montrant le changement dans le cadre de lecture dans la région du domain SR chez l'humain, le rat et la souris. ....	74
<b>Figure 21</b> Alignement du motif en doigt de zinc de Zis-SR (mZis-1 et mZis-2) avec d'autres protéines ayant le même motif. ....	77
<b>Figure 22</b> Représentation schématique de différentes protéines ayant un domaine SR. ....	78
<b>Figure 23</b> Effets des anti-sens sur l'expression en ARNm du gène Zis-SR. ....	82
<b>Figure 24</b> Immunofluorescence montrant l'effet de l'anti-sens chez la lignée clonale 700 AS #3. ....	85
<b>Figure 25</b> Analyse de différentes lignées clonales anti-sens au niveau de l'expression l'ARNm de la CPE et au niveau de la protéine CPE. ....	87
<b>Figure 26</b> Buvardage de type Western sur la sécrétion de CPE chez les cellules AtT-20 et AtT-20/700 AS #3. ....	90

<b>Figure 27</b> Analyse ultrastructurale montrant la perte des granules de sécrétion chez la lignée anti-sens AtT-20/700 AS #3. ....	92
<b>Figure 28</b> Schéma représentant le rôle potentiel de Zis-SR. ....	106

**LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau I</b> Liste des oligonucléotides phosphorothioates utilisés lors de l'expérience anti-sens. ....	36
<b>Tableau II</b> Liste des oligonucléotides spécifiques pour l'amplification de l'ADNc complet du gène Zis-SR à partir d'une banque ADNc de cerveau de souris. ....	43
<b>Tableau III</b> Liste des oligonucléotides spécifiques pour l'amplification des fragments d'ADN du gène Zis-SR et $T_m$ . ....	51

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**ACTH** : adrénocorticotropique hormone

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**ADNc** : ADN complémentaire

**AMPc** : adénosine monophosphate cyclique

**ARF** : ADP-Ribosylation Factor

**ARN** : acide ribonucléique

**ARNm** : acide ribonucléique messenger

**BSA** : albumine sérique bovine

**CgA** : chromogranine A

**CgB** : chromogranine B

**CPE** : carboxypeptidase E

**DEPC** : diéthylpyrocarbonate

**DMEM** : Dulbecco's modified eagle medium

**DMSO** : Dimethylsulfoxyde

**DTT** :dithiothréitol

**FBS** : serum foetal bovin

**GDP** : guanosine diphosphate

**GEF** : Guanine nucleotide Exchange Factor

**GTP** : guanosine triphosphate

**JG** : juxta-glomérulaire

**KDa** : Kilodaltons

**Milieu LB : lennox L broth base**

**PA : acide phosphatidique**

**PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide**

**PAM : peptidyl-glycine- $\alpha$ -amidating monooxygénase**

**PBS : tampon phosphate salin**

**PCR : polymerase chain reaction**

**PLD : phospholipase D**

**POMC : proopiomélanocortine**

**RPM: révolution par minute**

**SDS : dodécylsulfate de sodium**

**SNAREs : SNAP Receptors**

**SPC2 : Subtilisine-like proprotéine convertase 2**

**SPC3 : Subtilisine-like proprotéine convertase 3**

**TGN : trans Golgi network**

**t-SNARE : target membrane receptor**

**v-SNARE : vesicle membrane receptor**

**Zis : Zinc finger splicing**



## RÉSUMÉ

### ZIS-SR : UNE NOUVELLE PROTÉINE APPARENTÉE AUX PROTÉINES SR EST NÉCESSAIRE AU MAINTIEN DU PHÉNOTYPE ENDOCRINIEN

**ROXANE DESJARDINS**

Département de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Quels sont les gènes impliqués dans la biogénèse des granules de sécrétion dans la voie de sécrétion régulée et est-ce-que ces facteurs impliqués sont importants pour le maintien du phénotype endocrinien? La lignée cellulaire 6T3 s'avère être un bon modèle pour l'identification de ces gènes. En effet, cette lignée cellulaire est déficiente dans sa voie de sécrétion régulée. Elle résulte de la fusion entre le myélôme de souris 4T001 et des cellules hypophysaires de souris, les cellules AtT-20, une lignée qui possède la voie de sécrétion régulée. Malgré le fait que ces cellules conservent plusieurs caractéristiques typiques des cellules endocriniennes, la lignée cellulaire 6T3 est déficiente à produire la proopiomélanocortine et ne possède pas de granules de sécrétion, un compartiment majeur pour emmagasiner les protéines destinées à la voie de sécrétion régulée. Par contre, ce phénotype endocrinien est rétabli suite à un traitement des cellules à l'AMPc pour une période de vingt-quatre heures. En utilisant l'approche du PCR différentiel à partir d'une banque d'ADNc de cerveau de souris, nous avons isolé un ADNc de 2,6 kpb régulé à la hausse par l'AMPc. Nous avons nommé cet ADNc GAP1-5A. Cependant, après l'obtention de la séquence complète de GAP1-5A, nous avons réalisé que GAP1-5A possède une homologie dans sa séquence en acides aminés avec d'autres protéines: la protéine Zis (Zinc finger Splicing) clonée chez le rat, l'humain et la souris en plus de la protéine C4SR retrouvée chez la grenouille. Nous avons renommé cet ADNc Zis-SR en tenant compte de ces protéines homologues déjà répertoriées. L'analyse de la séquence de Zis-SR suggère (1) deux motifs en doigt de zinc en N-terminal, responsable de la liaison des protéines aux acides nucléiques, (2) un signal de localisation nucléaire permettant de cibler la protéine au noyau et (3) une région riche en sérine et arginine en C-terminal, une caractéristique commune aux protéines impliquées dans l'épissage et aux protéines liant l'ARN. Des études de localisation tissulaire démontrent que Zis-SR est exprimé principalement dans les neurones du système nerveux central ainsi que dans divers tissus ayant des fonctions endocrines. Afin de déterminer l'implication de Zis-SR dans le maintien du phénotype endocrinien, nous avons créé une lignée avec un taux d'expression de Zis-SR réduit à 20% (AtT-20/700 AS #3) par une approche anti-sens. La carboxypeptidase E, une enzyme de maturation des neuropeptides localisée dans les granules de sécrétion, a été utilisée comme marqueur de la voie de sécrétion régulée. Nous avons remarqué une perte d'immunoréactivité à la CPE dans les extensions cellulaires en plus d'une diminution du contenu cellulaire en CPE due à une relâche constitutive de cette enzyme chez la lignée AtT-20/700 AS #3. Ces résultats confirment que Zis-SR, une protéine potentiellement impliquée dans l'épissage des pré-ARNm, serait importante dans la biogénèse des granules de sécrétion.

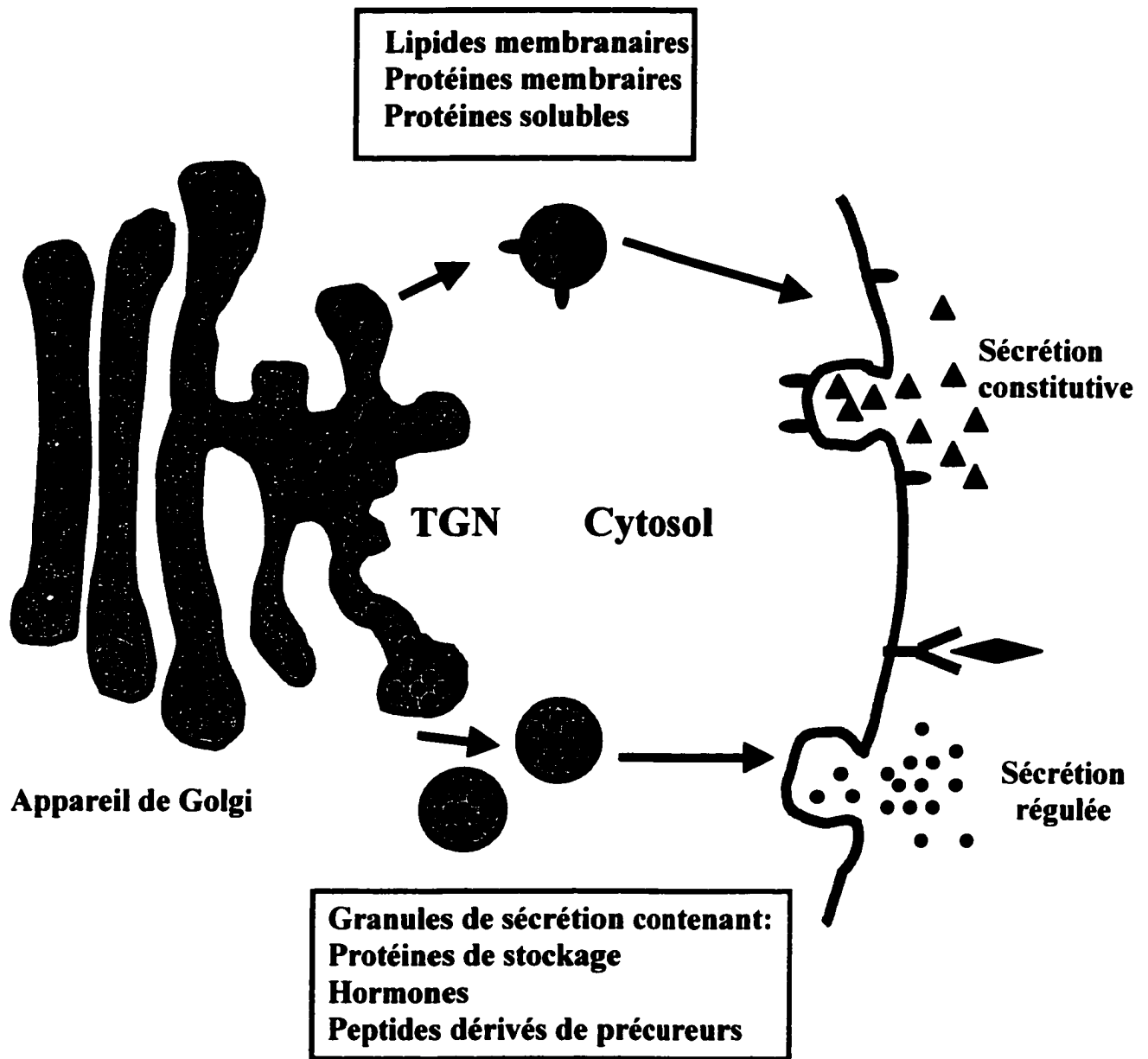
# **INTRODUCTION**

## **1.1 MISE EN CONTEXTE DE L'ÉTUDE**

Dans ce mémoire, je présente une étude basée sur un gène que nous avons cloné à partir d'un modèle cellulaire défectueux dans sa voie de sécrétion régulée, les cellules 6T3. Ces cellules ne possèdent pas de granules de sécrétion, un compartiment majeur pour le stockage de protéines dirigées vers la voie de sécrétion régulée. Cependant, ce phénotype peut être rétabli par une stimulation des cellules à l'AMPc. L'introduction de ce mémoire se divisera donc en 3 parties. D'abord, je traiterai de la voie de sécrétion régulée et de la biogénèse des granules de sécrétion chez les cellules endocrines puisqu'il s'agit du phénotype rétabli à la suite d'un traitement des cellules à l'AMPc. Ensuite, je décrirai la carboxypeptidase E (CPE), une enzyme de maturation des neuropeptides abondamment localisée au niveau des granules de sécrétion. Lors de mes études j'ai utilisé cette protéine comme marqueur de la voie de sécrétion régulée. Finalement, j'introduirai le modèle des cellules 6T3 qui nous a permis d'isoler un gène probablement impliqué dans la formation des granules de sécrétion.

## **1.2 VOIE DE SÉCRÉTION CONSTITUTIVE ET RÉGULÉE**

Toutes les cellules ont une voie de sécrétion par laquelle les protéines synthétisées seront relâchées dans leur environnement. La plupart des cellules sécrètent les protéines uniquement de façon constitutive. On peut penser aux cellules du foie, aux fibroblastes, aux cellules musculaires, aux lymphocytes (KELLY, 1985). Cependant, les cellules spécialisées comme les cellules endocrines, neuroendocrines ou exocrines possèdent une voie de sécrétion régulée en plus de la voie de sécrétion constitutive (figure 1). Chez ces cellules spécialisées, les 2 voies de sécrétion utilisent en commun la même machinerie cellulaire pour la synthèse et le transport des protéines jusqu'au réseau du trans-Golgi (TGN) (GRIFFITHS & SIMONS, 1986). À ce niveau, les protéines destinées à la voie régulée seront triées de celles qui seront sécrétées par la voie de sécrétion constitutive (BURGESS & KELLY, 1987) et ensuite emmagasinées dans leurs vésicules de sécrétion respectives. Ces 2 voies de sécrétion se distinguent sur plusieurs points. La voie de sécrétion régulée est caractérisée par une relâche des protéines suite à un signal externe comme par exemple une hormone liant son récepteur. Le matériel destiné à cette voie (hormones, neuropeptides, peptides) est emmagasiné et concentré dans des granules de sécrétion ce qui permet une relâche massive du contenu des granules à un moment précis (KELLY, 1985). Les granules de sécrétion sont ainsi accumulés dans le cytoplasme plusieurs heures ou plusieurs jours jusqu'à ce que la fusion du granule à la membrane soit déclenchée par un sécrétagogue spécifique. Pour sa part, la sécrétion par la voie constitutive se fait à un taux relativement constant dépendamment du taux de synthèse des protéines. Les vésicules de sécrétion contenant les protéines empruntant



**Figure 1. Schéma représentant les 2 voies de sécrétion, la voie régulée et la voie constitutive chez une cellule.**

Tirée de MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, Alberts *et al.*, 1994.

cette voie fusionnent dans un délai assez rapide à la membrane plasmique pour sécréter leur contenu (WIELAND *et al.*, 1987; KARRENBAUER *et al.*, 1990). Les protéines relâchées par cette voie sont des constituants membranaires, des lipides, des récepteurs etc. Ces protéines ne seront donc pas emmagasinées contrairement à celles qui seront sécrétées par la voie régulée (BURGESS & KELLY, 1987).

Il semble exister une autre voie en plus de ces 2 voies classiques de sécrétion. Une voie de sécrétion ressemblant à la voie constitutive (constitutive-like) a été décrite par le groupe de Arvan (ARVAN *et al.*, 1991). Il s'agit d'une voie par laquelle des protéines emmagasinées dans les granules de sécrétion sortiront pour suivre la voie de sécrétion constitutive. Un exemple de cette sécrétion «constitutive-like» serait la sécrétion du C-peptide, produit de la maturation de la pro-insuline en insuline mature. Il y aurait formation d'une vésicule de sécrétion constitutive à partir d'un granule de sécrétion immature durant sa maturation. Cette voie alternative de sécrétion constitutive est reliée au mécanisme de triage des protéines par rétention expliqué plus loin.

### **1.3 VÉSICULES DE TRANSPORT IMPLIQUÉES**

Les vésicules de transport impliquées dans chacune des voies de sécrétion diffèrent principalement au niveau de leur contenu. Par contre, chez certaines cellules qui possèdent la voie de sécrétion régulée, on remarque différents types de vésicules qui sont sous le contrôle d'un signal pour la relâche de leur contenu. Chez les cellules neuroendocrines par exemple, on peut distinguer deux populations différentes de

vésicules de sécrétion soit les vésicules synaptiques et les granules de sécrétion (DE CAMILLI & JAHN, 1990). Les vésicules synaptiques emmagasinent les neurotransmetteurs classiques tels que le glutamate, l'acétylcholine, l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), la glycine et les amines biogéniques. Ces vésicules n'emmagasinent pas de protéines solubles (KELLY, 1993). Après la relâche de leur contenu, il y a reformation des vésicules synaptiques à partir de la membrane et réemmagasinage des neurotransmetteurs à partir du pool cytoplasmique.

Pour leur part, les granules de sécrétion diffèrent des vésicules synaptiques par la nature de leur contenu. On les retrouve seulement au niveau des cellules neuroendocrines, endocrines et exocrines. Des analyses biochimiques montrent que les granules de sécrétion contiennent des neuropeptides (chez les cellules neuroendocriniennes), des hormones peptidiques, des catécholamines (chez les cellules chromaffines) et des protéines faisant partie de la famille des granines (HUTTNER *et al.*, 1991). De plus, on y retrouve des enzymes de maturation tels que les convertases SPC2 et SPC3. Ces enzymes spécifiques à la voie régulée (SEIDAH *et al.*, 1991; DAY *et al.*, 1992) clivent les précurseurs polypeptidiques pour générer des peptides bioactifs. D'autres enzymes de maturation tel la carboxypeptidase E (CPE) et la peptidyl-glycine- $\alpha$ -amidating monooxygénase (PAM) sont présentes dans les granules pour modifier les produits de maturation résultant du clivage par les convertases. En microscopie électronique, les granules de sécrétion se distinguent facilement par leur aspect dense dû à la concentration de protéines solubles (KELLY, 1993). Bien que peu d'informations soient connues sur la composition membranaire des granules de sécrétion, des protéines

H<sup>+</sup>-ATPases requises pour l'acidification du granule jouant un rôle dans la maturation du granule (APPS & PERCY, 1987), des protéines de ciblage et de fusion ainsi que des protéines de signalisation formeraient en partie la membrane du granule de sécrétion (TOOZE, 1998). Étant donné que les granules de sécrétion emmagasinent des protéines solubles nouvellement synthétisées, le recyclage du granule se fera au niveau du TGN là où se produit aussi le triage entre les protéines sécrétées par la voie constitutive de celles destinées à la voie de sécrétion régulée.

## **1.4 TRIAGE DES PROTÉINES VERS LA VOIE DE SÉCRÉTION RÉGULÉE**

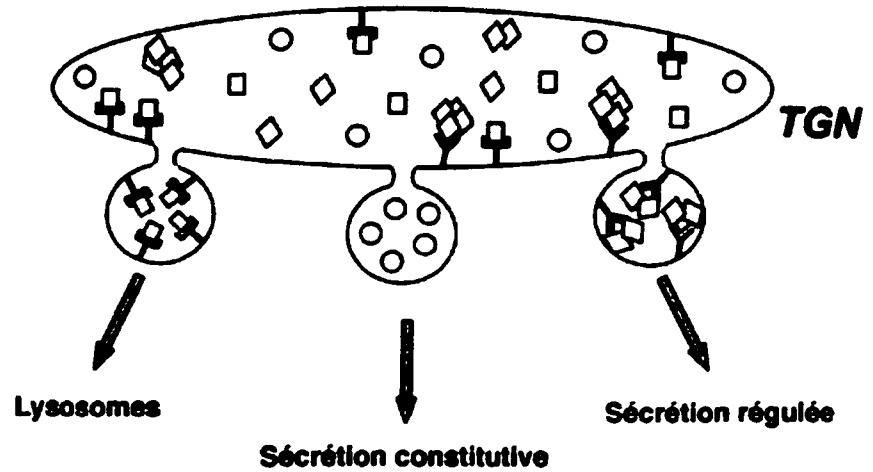
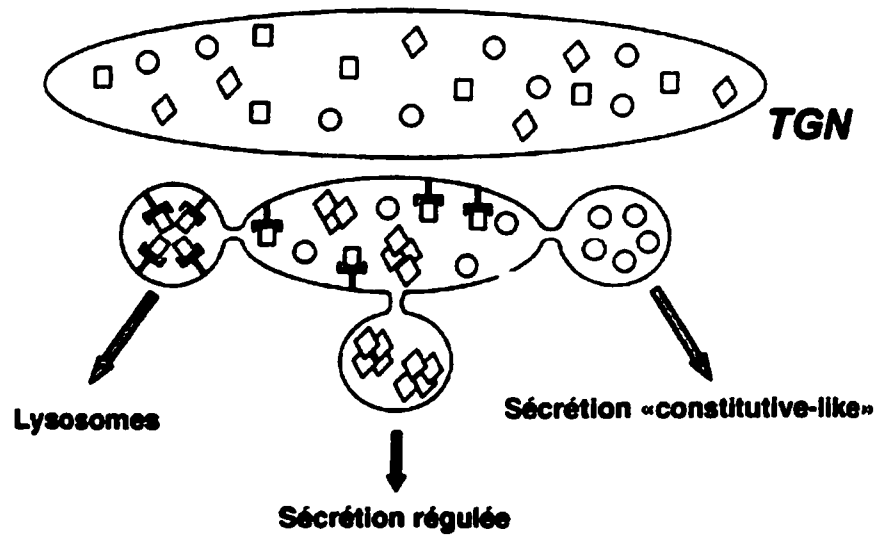
### **1.4.1 Deux modèles proposés pour le triage des protéines vers les granules de sécrétion.**

Les deux voies de sécrétion suivent le même chemin jusqu'au TGN. Rendues à ce compartiment, les protéines sont triées vers chacune de leur voie respective, soit la voie régulée ou la voie constitutive. Deux hypothèses proposées expliquent le triage des protéines vers leur voie distincte (figure 2): 1) le triage par rétention et 2) le triage avant l'entrée dans les vésicules de sécrétion (KULIAWAT & ARVAN, 1992; KULIAWAT & ARVAN, 1994). L'hypothèse du triage par rétention affirme que toutes les protéines de sécrétion sont emmagasinées dans un granule de sécrétion immature avant d'être triées vers leurs compartiments respectifs. Par exemple, par l'interaction avec les récepteurs à mannose-6-phosphate, les enzymes lysosomiales se dirigeront vers leur compartiment, le lysosome. Les protéines de sécrétion régulée seront sélectivement

**Figure 2. Modèles possibles pour le triage des protéines destinées vers les granules de sécrétion.** A) Triage avant l'entrée dans les vésicules de sécrétion. Dans le TGN, les récepteurs à mannose-6-phosphate lient enzymes lysosomiales (rectangles). Les protéines de sécrétion régulées (triangles) aggrègent dans le TGN et avec l'interaction d'un récepteur se dirigent vers les granules de sécrétion immatures. La sécrétion constitutive (cercles) se fait par défaut sans interaction avec un récepteur de triage. B) Triage par rétention. Toutes les protéines sont emmagasinées dans un granule de sécrétion immature avant d'être triées. Les enzymes lysosomiales sont triées par leur récepteur, les protéines de sécrétion sont retenues dans le granules par aggrégation et/ou par interaction avec un récepteur de triage alors que les protéines de sécrétion constitutive seront exclues du granule par sécrétion «constitutive-like».

Tirée de BLAZQUEZ & SHENNAN, 2000.



**A**    **Triage avant l'entrée dans les vésicules****B**    **Triage par rétention**

retenues dans le granule alors que les protéines destinées à la voie constitutive seront exclues de ce granule immature. Les produits de maturation protéolytique comme le C-peptide de l'insuline seront aussi exclus du granule de sécrétion pour emprunter la voie constitutive. À la toute fin de ce processus, le granule de sécrétion contiendra uniquement les protéines qui seront relâchées par la voie régulée. D'un autre côté, l'hypothèse du triage avant l'entrée dans les vésicules de sécrétion affirme que les protéines sont triées vers leurs vésicules respectives directement à la sortie du TGN. En formant des agrégats dans le TGN et/ou en s'associant avec un récepteur de triage (expliqué plus loin), les protéines de sécrétion régulée seront stockées dans des granules de sécrétion immatures. Les protéines sécrétées par la voie constitutive se retrouveront par défaut dans des vésicules de sécrétion constitutive.

#### **1.4.2 L'aggrégation est essentielle au triage des protéines vers la voie régulée**

Avec ces deux hypothèses différentes, on peut alors se demander par quel moyen les protéines dirigées vers la voie régulée seront triées. La condensation de matériel est une des différences majeures entre les voies de sécrétion régulée et constitutive (BURGESS & KELLY, 1987). L'aggrégation des protéines serait l'évènement initial du triage des protéines vers la voie régulée (ORCI *et al.*, 1987; TOOZE *et al.*, 1987). Les protéines destinées à la voie régulée auraient la capacité de former des agrégats lorsque leur concentration critique est atteinte. Il a été démontré que plusieurs protéines dirigées vers cette voie ont la propriété de former des agrégats. Les protéines faisant partie de la famille des granines, constituants majeurs des granules de sécrétion, comme la

chromogranine A (YOO & ALBANESI, 1990), chromogranine B (CHANAT & HUTTNER, 1991), la sécrétogranine II (GERDES *et al.*, 1989; CHANAT & HUTTNER, 1991), la convertase SPC2 (SHENNAN *et al.*, 1994), ainsi que la plupart des hormones hypophysaires (COLOMER *et al.*, 1996) aggrègent en milieu légèrement acide et en présence de calcium, conditions représentatives du TGN (DEMAUREX *et al.*, 1998). Pour leur part, les protéines de la voie constitutive ne s'agglomèrent pas dans les mêmes conditions. La formation d'aggrégats de protéines dirigées vers la voie de sécrétion régulée sélectionnerait celles-ci pour leur futur stockage dans les granules de sécrétion.

Les protéines faisant partie de la famille des granines (chromogranine/sécrétogranine) joueraient un rôle dans l'aggrégation sélective des protéines de sécrétion régulée (figure 3). Ces protéines sont associées à la voie de sécrétion régulée car elles sont stockées tout comme les précurseurs neuropeptidiques et les hormones peptidiques dans les granules de sécrétion. Bien que leurs fonctions ne sont pas très bien connues, il a été suggéré que ces protéines pourraient agir comme protéines «helper» (HUTTNER & NATORI, 1995) puisqu'elles sont capables de co-aggréger avec certaines hormones (HUTTNER *et al.*, 1991; GORR *et al.*, 1989). De plus, il a été démontré qu'une surexpression de la chromogranine B dans les AtT-20 permettrait d'augmenter le triage des précurseurs vers les granules de sécrétion (NATORI & HUTTNER, 1996).

Cependant, on retrouve dans la littérature des cas de triage de protéines vers la voie régulée qui ne nécessitent pas d'aggrégation (QUINN *et al.*, 1991). Ces observations portent à croire que l'aggrégation en elle-même n'est pas suffisante pour diriger les protéines de sécrétion vers la voie régulée. Le triage serait plutôt un processus actif et plus sélectif nécessitant la présence d'un motif de triage et l'interaction avec un récepteur. Des groupes ont donc focalisé leurs recherches sur d'autres modèles qui permettraient de mieux expliquer le triage des protéines vers les granules de sécrétion.

#### **1.4.3 Le triage des protéines via l'interaction avec un récepteur potentiel**

Un autre modèle pouvant expliquer le triage des protéines vers la voie de sécrétion régulée implique l'interaction des protéines dirigées vers cette voie avec un récepteur retrouvé dans la membrane du granule (figure 3). Cette protéine membranaire agirait comme récepteur en reconnaissant spécifiquement des protéines de sécrétion régulée pour ensuite les séquestrer dans le granule de sécrétion et ce, sans engendrer de signalisation intracellulaire. Dans le but de découvrir un récepteur potentiel pour le triage des protéines, différentes approches expérimentales sont utilisées: pour identifier une protéine membranaire liant les protéines de sécrétion régulée et pour identifier un motif de liaison impliqué dans l'interaction avec le récepteur. Il a été proposé que la carboxypeptidase E jouerait le rôle de récepteur de triage (COOL *et al.*, 1997). La forme membranaire de la CPE lierait la POMC et dirigerait ce précurseur vers la voie de sécrétion régulée. Par contre, ces observations sont controversées et sujettes à un

important débat sur l'identification de la CPE comme récepteur de triage (THIELE *et al.*, 1997).

Dans le même ordre d'idées, plusieurs protéines de sécrétion régulée tout comme la CPE peuvent s'associer étroitement à la membrane interne du granule de sécrétion. La chromogranine B par exemple est aussi retrouvée sous forme membranaire et est aussi capable de lier des protéines solubles destinées à la voie régulée (HUTTNER *et al.*, 1995). Le triage des protéines s'effectuerait peut-être par la liaison de protéines de sécrétion régulée aux protéines de sécrétion associées à la membrane du granule (figure 3). Étant donné l'énorme quantité de protéines qui seront emmagasinées dans le granules de sécrétion, l'hypothèse du triage des protéines de sécrétion régulée via un récepteur potentiel de triage pose un certain problème. Il est difficile d'envisager qu'un seul récepteur soit impliqué dans ce processus.

#### **1.4.4 Motif de liaison reconnu par un récepteur potentiel de triage**

L'hypothèse d'un récepteur potentiel impliqué dans le triage des protéines vers la voie régulée suppose qu'il existe un motif commun chez les protéines empruntant cette voie. Un motif commun en N-terminal est retrouvé chez plusieurs précurseurs polypeptidiques tels que la POMC, la pro-vasopressine, la pro-oxytocine, la pro-dynorphine et la pro-enképhaline (COOL *et al.*, 1995). Ce motif en N-terminal serait responsable de l'interaction de la POMC avec la forme membranaire de la CPE. De plus, la chromogranine B et la chromogranine A contiennent ce même motif. en N-terminal

(CHANAT *et al.*, 1993; THIELE & HUTTNER, 1998). Une boucle formée par des ponts disulfures en N-terminal serait le motif reconnu pour le triage de ces protéines via l'interaction avec un récepteur membranaire de triage. Ce motif formant une structure en tête d'épingle semble essentiel pour diriger certaines protéines vers les granules de sécrétion. La réduction des ponts disulfures chez la CgB par l'agent réducteur DTT ou une délétion d'une séquence spécifique en N-terminal chez la POMC et la CgB déroutent les protéines de sécrétion régulée vers la voie de sécrétion constitutive. En plus d'être un motif potentiel pour l'interaction avec un récepteur de triage, cette boucle aurait aussi une fonction dans l'interaction entre des monomères de protéines de sécrétion régulée facilitant ainsi leur aggrégation et leur triage vers les granules (THIELE & HUTTNER, 1998). Ce motif permettrait l'homodimérisation de la chromogranine A. Cependant, ce motif n'est pas présent dans toutes les protéines de sécrétion régulée. Les enzymes SPC2 et SPC3 et les pro-hormones comme la pro-rénine et la pro-somatostatine entre autre ne possèdent pas la boucle en N-terminal. Il a été suggéré qu'une séquence en C-terminal de SPC2 (CREEMERS *et al.*, 1996) et que les séquences RGD conservées dans la séquence de SPC3 (LUSSON *et al.*, 1997) pourraient agir comme signal de triage pour diriger ces enzymes dans la voie de sécrétion régulée. Il semble qu'il n'existe pas seulement un motif consensus pour cibler les protéines vers la voie de sécrétion régulée. Ceci implique qu'il doit y avoir plus d'un récepteurs de triage potentiel.

#### **1.4.5 Interactions avec les composants membranaires du granule.**

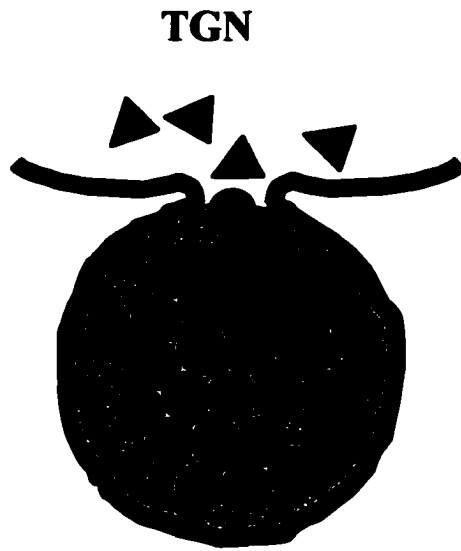
Il est clair que plusieurs protéines de sécrétion régulée (CgA, CgB, POMC, CPE, insuline, SPC2) peuvent exister sous forme membranaire dans le granule de sécrétion alors qu'en réalité ces protéines ne sont pas des protéines membranaires typiques. Les boucles en N-terminal et les domaines en C-terminal ne semblent pas les seuls responsables de l'association des ces protéines à la membrane. Alors comment ces protéines peuvent lier de façon stable la membrane du TGN pour former par la suite les granules de sécrétion immatures? Récemment, il a été démontré que les protéines de sécrétion régulée lieraient les lipides membranaires et que cette association serait requise le triage des protéines (DHANVANTARI & LOH, 2000) ainsi que pour la formation des granules de sécrétion immatures (WANG *et al.*, 2000) (figure 3).

Le triage des protéines vers la voie de sécrétion régulée n'est pas tout à fait élucidé jusqu'à présent. Il semble y avoir une multitude d'interactions protéines-protéines et récemment découvert des interactions protéines-lipides mises en jeu dans ce processus complexe par lequel les protéines de sécrétion régulée seront dirigées dans les granules de sécrétion. De plus, dépendamment du type cellulaire étudié, on remarque une hétérogénéité dans les mécanismes de triage. Les recherches sur les mécanismes de triage se poursuivent dans le but d'éclaircir certains aspects.

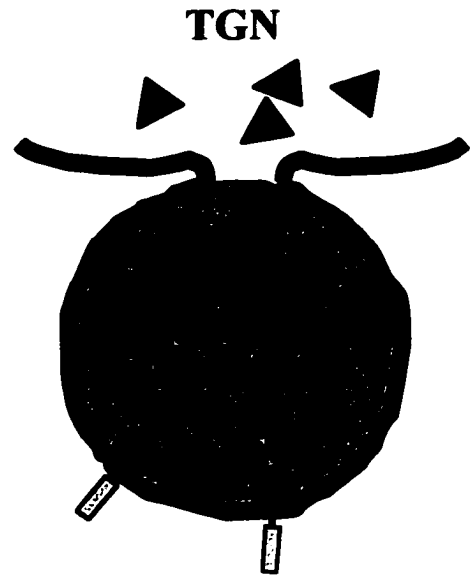
**Figure 3. Les mécanismes possibles de triage des protéines de sécrétion régulée.**

A) Co-aggrégation des protéines de sécrétion régulée seulement et exclusion des protéines de sécrétion constitutive. Ceci peut se faire avec l'aide des gangines. B) Interaction des protéines de sécrétion régulée avec des protéines membranaires du granule et/ou avec des protéines de sécrétion régulée associées à la membrane du granule. C) Reconnaissance des protéines de sécrétion régulée par un récepteur potentiel de triage. D) Interaction des protéines de sécrétion régulée avec des lipides membranaires du granule de sécrétion..

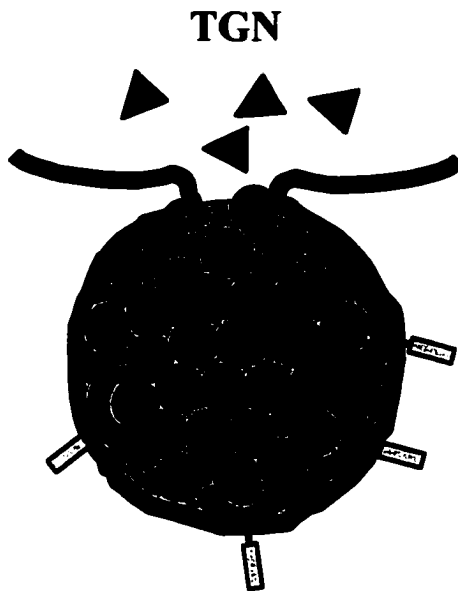




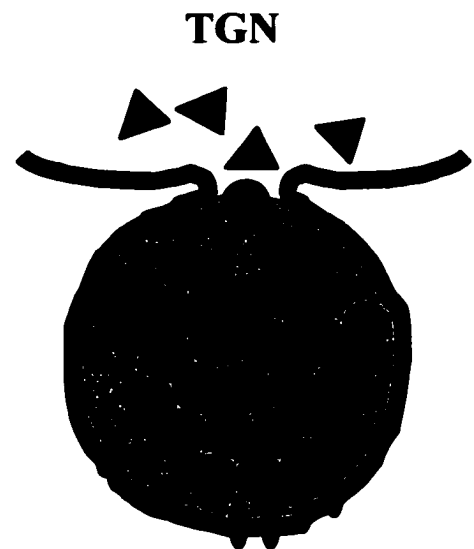
**A. Aggrégation des protéines de sécrétion régulée**



**B. Aggrégation des protéines avec des protéines membranaires**



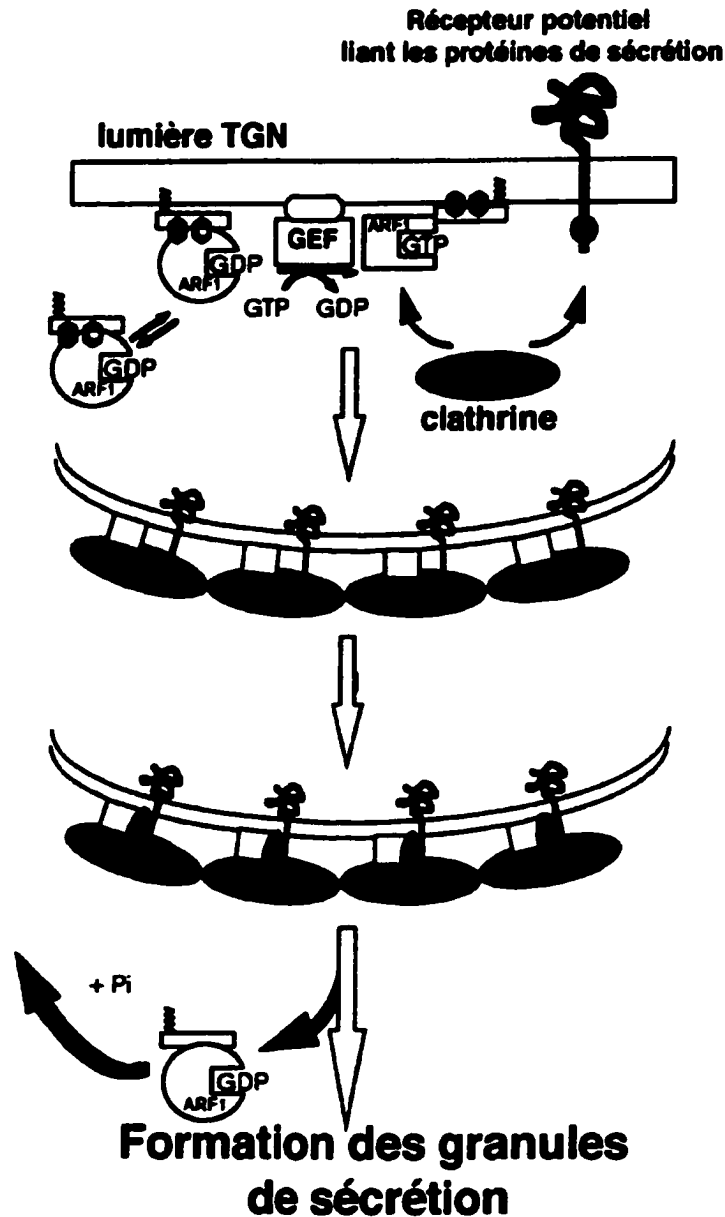
**C. Interaction avec des récepteurs membranaires du granule**



**D. Interaction avec des lipides membranaires**

## 1.5 FORMATION DES GRANULES DE SÉCRÉTION À PARTIR DU TGN

Peu d'informations sont connues sur la formation des granules de sécrétion à partir du TGN. Cependant, la reconstitution de systèmes *in vitro* a permis de savoir comment se déroulait le processus de vésiculation à partir du TGN (TOOZE & HUTTNER, 1990). La formation des granules est hautement dépendante de protéines cytosoliques et de l'ATP. Premièrement, les protéines ARF (ADP-Ribosylation Factor) seraient impliqués dans ce processus. Les ARFs sont de petites protéines (20 kDa) cytoplasmiques liant le GTP. On compte 6 différentes ARFs, la mieux caractérisée étant ARF1 (CHAVRIER & GOUD, 1999). Ces protéines sont inactives lorsqu'elles sont liées au GDP. Elles sont activées par la liaison du GTP suite à un échange de nucléotide catalysé par le GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor). ARF1 jouerait un rôle dans la vésiculation des granules de sécrétion immatures à partir de la membrane du TGN. Sa liaison au GTP induit un changement de conformation permettant ainsi la liaison de ARF1 à la membrane du TGN. ARF1 se lierait sur une portion membranaire de TGN qui aurait subi une déformation suite à l'aggrégation et/ou à la liaison à la membrane de protéines de sécrétion. La liaison de ARF1-GTP lié à la membrane du TGN recruterait les protéines de manteau. Il a été prouvé que la clathrine est présente sur la membrane des granules immatures via l'adaptateur AP-1 (DITTIE *et al.*, 1996). L'assemblage de la clathrine à la membrane du TGN provoque une déformation de la membrane et permet la séquestration du contenu de sécrétion à l'intérieur de cette membrane formant le granule de sécrétion immature (CHAVRIER & GOUD, 1999) (figure 4). ARF aurait aussi une influence sur l'activité de la phospholipase D (PLD) (BROWN *et al.*, 1993).



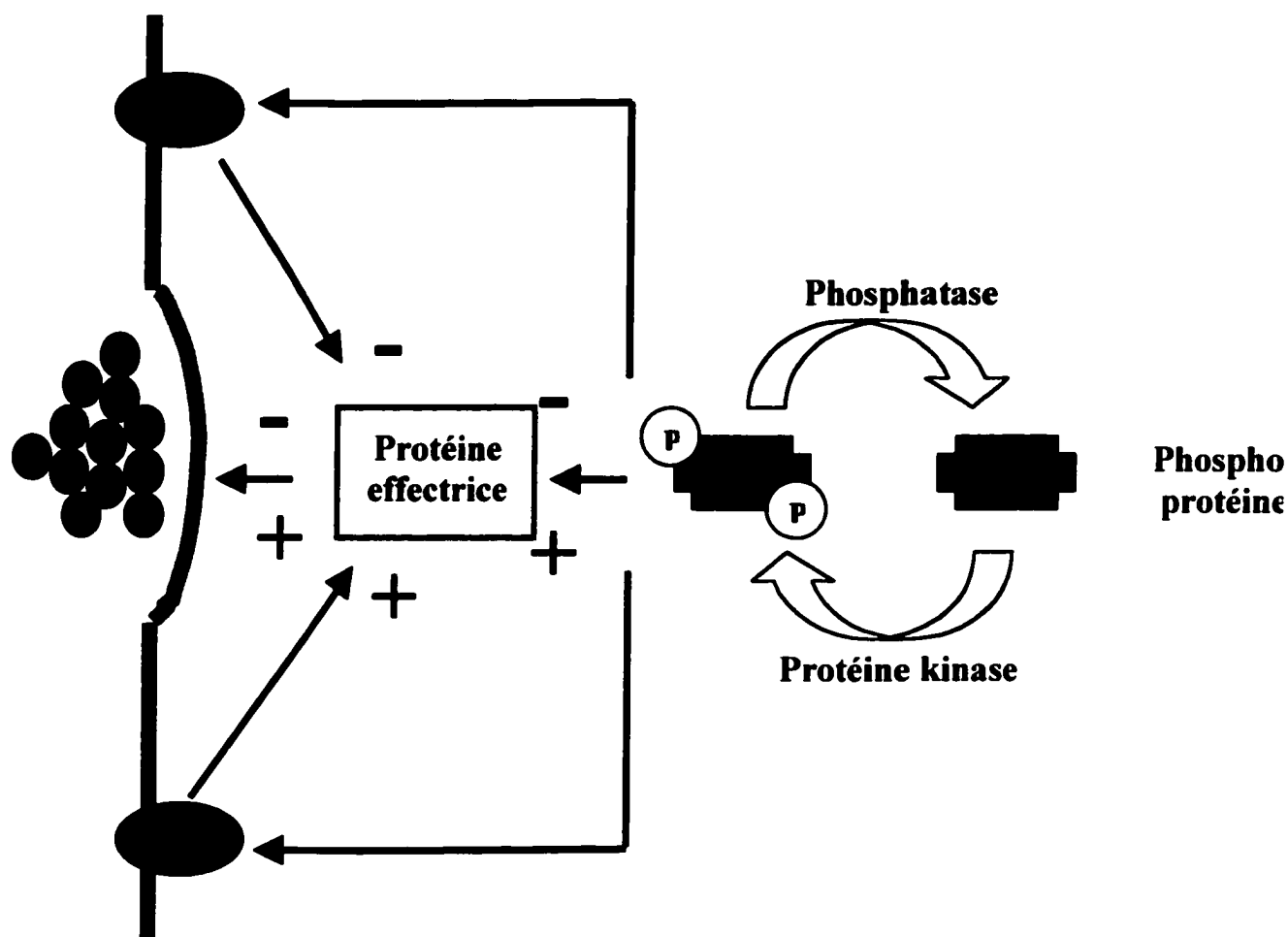
**Figure 4. Modèle de formation des granules de sécrétion à partir de la membrane du TGN.** Lorsque la protéine ARF lie le GTP suite à un échange de nucléotide par le GEF (Guanine nucleotide exchange factor), elle lie la membrane du TGN et permet le recrutement des protéines de manteau (clathrine). Il y aura vésiculation à partir de la membrane du TGN suite au recrutement de la clathrine et formation du granule de sécrétion immature. Tirée de CHAVRIER & GOUD, 1999.

Cette enzyme hydrolyse la phosphatidylcholine en acide phosphatidique (PA). L'activation de la phospholipase D par ARF stimulerait la formation des granules de sécrétion suite à l'augmentation de PA. Le PA pourrait agir comme second messenger pour induire la formation de granules de sécrétion ou modifierait la composition des lipides membranaires facilitant ainsi le recrutement des protéines de manteau (CHEN *et al.*, 1997; SIDDHANTA & SHIELDS, 1998).

Le granule de sécrétion immature subira une maturation impliquant la perte du manteau de clathrine et une acidification progressive de l'intérieur du granule par l'action de la pompe  $H^+$ -ATPases.

### **1.5.1 Régulation de la biogénèse des granules des sécrétion**

La biogénèse des granules de sécrétion semble être régulée par deux types de protéines régulatrices: 1) des protéines G hétérotrimériques de type  $G_{i/o}$  et  $G_s$  liées à la membrane du TGN et par 2) une phosphoprotéine cytosolique jusqu'à ce jour non-identifiée (figure 5). Les protéines G trimériques sont impliquées dans la transduction de signal. La plupart des protéines G sont liées à la membrane plasmique et sont couplées à des récepteurs transmembranaires. Elles transmettent le signal externe à des protéines effectrices intracellulaires qui engendreront une production de seconds messagers menant ensuite à une réponse cellulaire. Les protéines G liées à la membrane du TGN assumeraient la même fonction de transduction de signal de la lumière du TGN



**Figure 5. Schéma représentant la régulation de la formation des granules de sécrétion par les protéines  $G_S$  et  $G_{i/o}$  et par une phosphoprotéine.** La formation des granules de sécrétion est régulée à la hausse ou à la baisse suite à l'activation ou l'inhibition d'une protéine effectrice par une protéine de type  $G_S$  ou  $G_{i/o}$ . La phosphorylation d'une protéine cytosolique par une kinase bloque l'inhibition par  $G_{i/o}$  et augmente les effets de  $G_S$  résultant à la stimulation de la formation des granules de sécrétion. Tirée de BAUERFEIND *et al.*, 1994.

à une protéine effectrice permettant ainsi la régulation de la formation des granules de sécrétion. La protéine de type  $G_S$  favoriserait la formation de granules de sécrétion alors que la protéine de type  $G_{i/o}$  régulerait à la baisse ce processus (BAUERFEIND *et al.*, 1994). L'autre régulateur serait une phosphoprotéine cytosolique qui modulerait la régulation effectuée par les protéines G (OHASHI & HUTTNER, 1994). La phosphorylation de cette protéine sur ses résidus Ser/Thr antagoniserait l'inhibition de la formation de granules de sécrétion par  $G_{i/o}$ . Cette phosphoprotéine agirait soit en augmentant les effets médiés par la protéine  $G_S$  ou en inhibant les effets médiés par  $G_{i/o}$  résultant ainsi en un accroissement de la formation de granules.

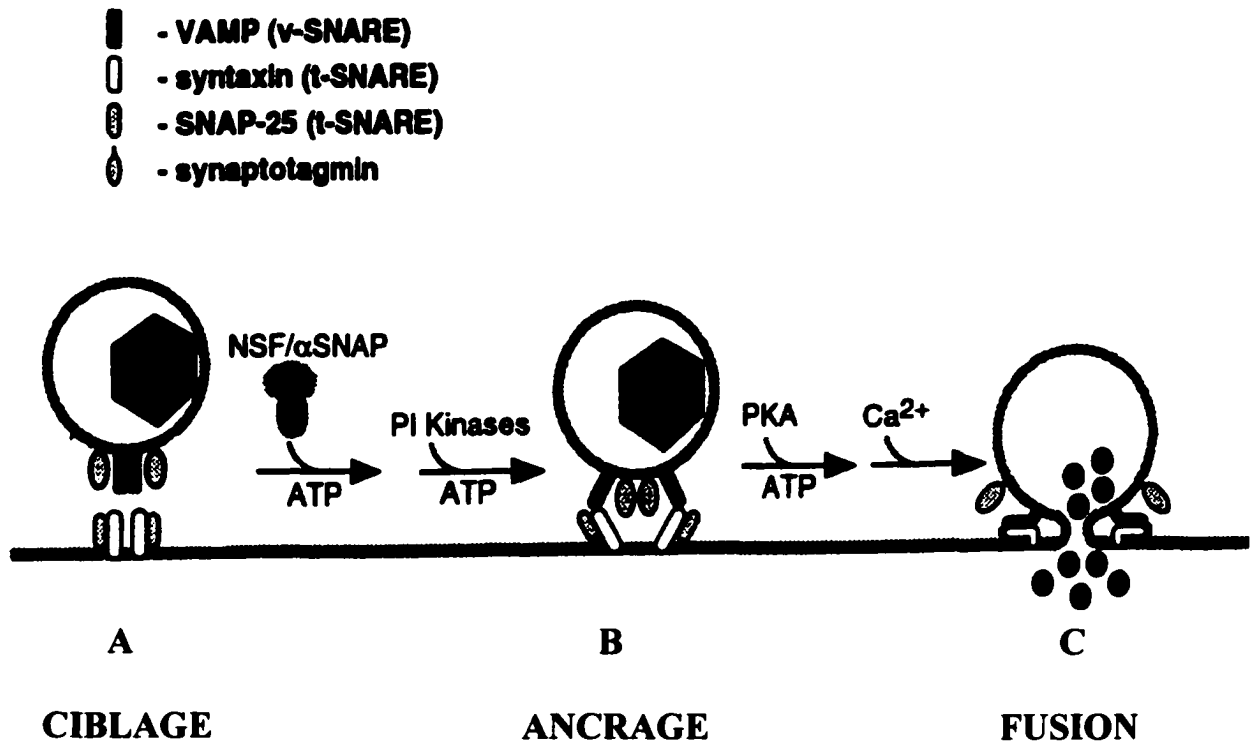
#### **1.6 DERNIÈRE ÉTAPE: L'EXOCYTOSE.**

Les granules de sécrétion maintenant formés, ils peuvent être emmagasinés dans la cellule pendant plusieurs heures ou plusieurs jours jusqu'à ce qu'un signal déclenche la fusion des granules à la membrane suivi de la relâche de leur contenu. L'exocytose du contenu des granules de sécrétion est contrôlée par la concentration de calcium dans le cytoplasme. La liaison d'une hormone à son récepteur active celui-ci pour déclencher une cascade de signalisation intracellulaire menant à une augmentation de la concentration calcique dans le cytoplasme. Cette élévation de calcium intracellulaire provoque la migration des granules à la membrane plasmique. Le ciblage et la fusion du granule à la membrane sont médiés par des protéines membranaires retrouvées sur la membrane plasmique elle-même et sur la membrane du granule (WEBER *et al.*, 1998). Ces protéines sont mieux connues sous le nom général de SNAREs. L'hypothèse des

SNAREs affirme que les protéines membranaires du granules (v-SNAREs) reconnaissent spécifiquement leurs protéines complémentaires sur la membrane plasmique (t-SNAREs) (SÖLLNER *et al.*, 1993). Il y a une variété de protéines membranaires du granule de sécrétion qui participeraient à l'exocytose (figure 6). Cependant, ces protéines membranaires varieraient selon les types cellulaires et les mécanismes de ciblage et de fusion par ces protéines ne sont pas complètement élucidés. La protéine VAMP1/2 (vesicule associated membrane protein ou synaptobrevine) une protéine membranaire (v-SNARE) du granule serait impliquée dans des interactions avec des protéines de la membrane plasmique comme la syntaxine et SNAP-25 (t-SNAREs) (EASOM, 2000). Ces protéines SNAREs entreraient aussi en interaction avec les synaptogamines, une famille de protéines liant le  $Ca^{+2}$  (GERONA *et al.*, 2000; DAVIS *et al.*, 1999). Suite à l'interaction entre ces protéines à la membrane plasmique, le complexe formé avec la présence de d'autres facteurs importants dans le processus d'exocytose (ATP, NSF/SNAP, protéines kinases) (EASOM, 2000) amèneront une situation favorable pour la fusion des membranes suivi de l'exocytose du contenu du granule (figure 6).

## **1.7 LES CARBOXYPEPTIDASES ET CARBOXYPEPTIDASE E**

Les carboxypeptidases sont des enzymes qui clivent des acides aminés en C-terminal des protéines et des peptides. On les appelle aussi métallocarboxypeptidases car leur clivage utilise un site actif sérine, cystéine ou zinc. Jusqu'à présent, 13 membres faisant partie de cette famille d'enzymes ont été découverts (REZNIK &



**Figure 6. Mécanisme d'exocytose du contenu des granules de sécrétion.**

A) Le granule de sécrétion reconnaît spécifiquement la membrane plasmique par les protéines SNAREs. B) Les protéines situées sur la membrane du granule et sur la membrane plasmique interagissent entre elles pour provoquer l'ancrage du granule de sécrétion à la membrane plasmique. C) Suite à l'interaction de ces protéines, en présence de  $Ca^{+2}$ , il y a fusion du granule à la membrane et exocytose du contenu.

Tirée de EASOM, 2000.



FRICKER, soumis). Les carboxypeptidases sont divisées en 2 sous-familles en fonction de leur homologie de séquences: les carboxypeptidases pancréatiques (CPA et CPB) impliquées dans la digestion d'aliments et les carboxypeptidases faisant partie de la sous-famille de la carboxypeptidase E (CPE, CPD, CPN, CPM, CPZ) (QUIAN *et al.*, 1999). Les enzymes reliées à cette sous-famille sont plus spécifiques et sont impliquées dans la biosynthèse de peptides et protéines. Pour éviter des clivages aléatoires pouvant causer des dommages cellulaires, les carboxypeptidases de cette sous-famille sont compartimentalisées (REZNIK & FRICKER, soumis).

La CPE est l'enzyme la plus étudiée dans cette sous-famille. Elle est aussi connue sous le nom de CPH ou convertase enképhaline. Cette enzyme de maturation est spécifique pour couper en C-terminal les résidus lysine et arginine des précurseurs peptidiques (FRICKER, 1988). La CPE est localisé principalement dans les cellules neuroendocrines jouant ainsi un rôle clé dans la maturation des neuropeptides. La maturation des peptides neuroendocriniens nécessite l'action d'une convertase pour le clivage du précurseur à des sites d'acides aminés basiques. Suite au clivage par la convertase, la carboxypeptidase E doit cliver en C-terminal les acides aminés basiques lysine et arginine ce qui confèrera l'activité biologique au neuropeptide. Vu que cette maturation protéolytique se fait dans la voie de sécrétion régulée, la CPE est localisée au niveau du granule de sécrétion. On la retrouve sous forme soluble à l'intérieur du granule. Cette forme soluble peut aussi être sécrétée (QIAN *et al.*, 1999) par la voie régulée de sécrétion. La CPE existe aussi sous forme membranaire dans le granule de sécrétion. Une hélice amphipatique en C-terminal de la protéine serait responsable de

l'association de la CPE à la membrane des granules (FRICKER *et al.*, 1990). Étant donné sa large distribution dans le système neuroendocrinien et sa localisation au niveau des granules de sécrétion, nous avons utilisé cette protéine comme marqueur de la voie de sécrétion régulée dans certaines de nos expériences.

### **1.8 MODÈLE CELLULAIRE 6T3**

Pour qu'il y ait une sécrétion régulée chez les cellules une multitude de protéines participent à l'existence et au bon fonctionnement de cette voie que ce soit pour le triage des protéines vers la voie régulée, pour la formation des granules de sécrétion, la régulation de la formation des granules de sécrétion et l'exocytose rendant l'étude de cette voie particulièrement complexe. L'utilisation de lignées mutantes dans leur processus de sécrétion dans des études précédentes ont permis d'élucider diverses étapes des voies de sécrétion d'une cellule. Les concepts connus sur la voie de sécrétion constitutive ont d'abord été découverts chez des levures mutantes dont la sécrétion peut être contrôlé par la température (NOVICK *et al.*, 1980; SCHEKMAN, 1985). L'étude des voies de sécrétion chez les cellules eucaryotiques par l'utilisation de lignées mutantes dans leur sécrétion est cependant plus difficile. Les mutations dans la voie de sécrétion constitutive sont souvent létales chez les cellules de mammifères étant donné que cette voie est impliquée dans le transport de protéines essentielles à la croissance cellulaire (protéines membranaires, lipides membranaires, récepteurs etc.). Par contre, des mutations non létales affectant la voie de sécrétion régulée chez des cellules eucaryotes (*Paramecium* et *Tétrahymena*) ont permis d'en connaître davantage sur les

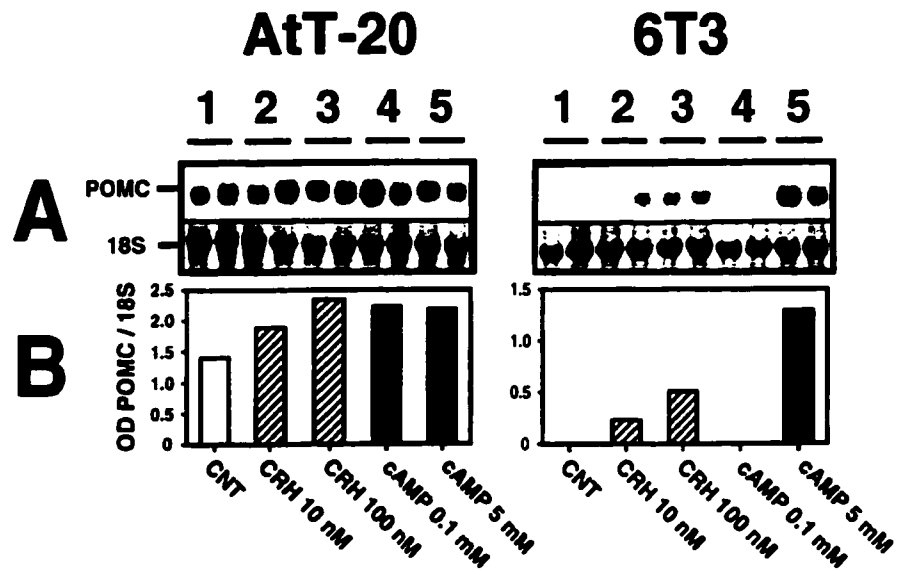
processus d'exocytose chez ces organismes eucaryotes (BONNEMAIN *et al.*, 1992; HADDAD & TURKEWITZ, 1997).

Une lignée cellulaire de mammifères ayant perdu la capacité de sécréter des protéines par la voie régulée a été décrite par Matsuuchi et Kelly (1991). Au départ, cette lignée a été nommée HYA.15.6.T.3 puis ensuite appelée 6T3 (DAY *et al.*, 1995). Cette lignée provient de la fusion entre un myélôme de souris 4TOO1 et les cellules AtT-20. Les cellules AtT-20 sont une lignée cellulaire provenant de l'hypophyse de souris et possède la voie de sécrétion régulée (MAINS & EIPPER, 1976) en plus de la voie de sécrétion constitutive. Ces cellules expriment et emmagasinent dans leurs granules de sécrétion plusieurs protéines comme la proopiomélanocortine (POMC) (BURGESS & KELLY, 1987), précurseur d'hormones hypophysaires telles l'ACTH,  $\beta$ -endorphine,  $\beta$ -LPH. De plus, la chromogranine B (CgB) (WEIDENMANN & HUTTNER, 1989), le 7B2 (VIEAU *et al.*, 1991) ainsi que les enzymes de maturation SPC3, SPC2 (SEIDAH *et al.*, 1990; DAY *et al.*, 1992), la CPE (FRICKER, 1988) et la PAM (EIPPER & MAINS, 1988) sont aussi exprimées et dirigées vers la voie de sécrétion régulée chez ces cellules. Le groupe qui a isolé la lignée 6T3 a d'abord remarqué que cette lignée diffère morphologiquement de la lignée initiale par leurs longues extensions cellulaires multiples émergeant d'un même corps cellulaire. De plus, par des études d'immunohistochimie, ils ont prouvé l'absence d'ACTH dans ces cellules. Aussi, ils ont observé par microscopie électronique que cette lignée ne possède pas de granules de sécrétion dans lesquels l'ACTH ne peut pas être stocké,

contrairement aux cellules AtT-20. La voie de sécrétion est évidemment affectée chez cette lignée cellulaire.

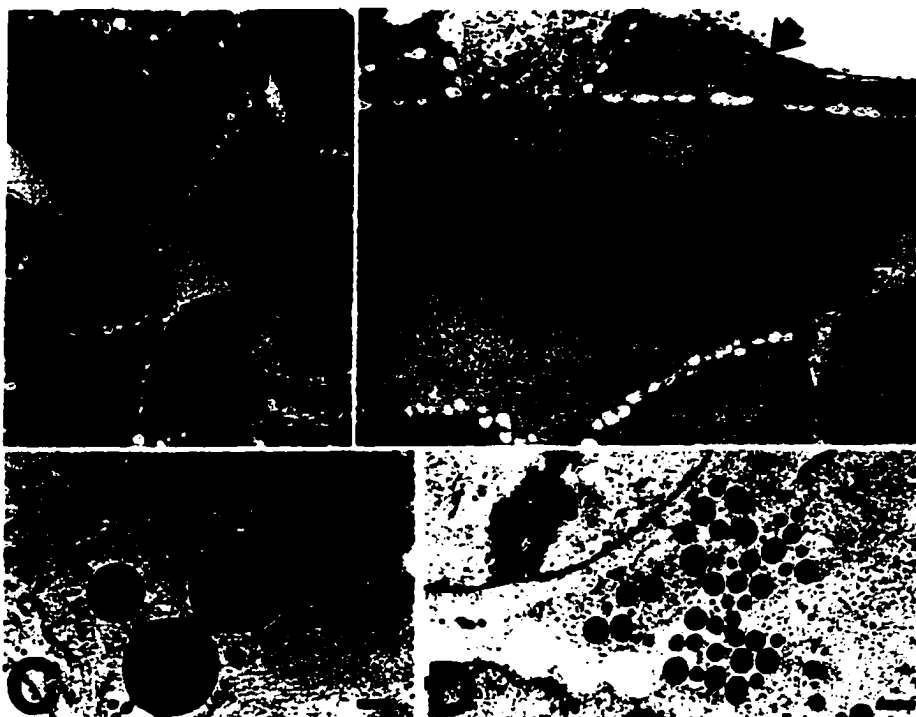
Suite à ces observations, le groupe de Day a poursuivi l'étude de cette lignée cellulaire en étudiant les interactions qu'ils pouvaient y avoir entre la voie de sécrétion régulée et les enzymes impliquées dans la maturation de précurseurs (DAY *et al.*, 1995). Ils ont démontré que l'expression de diverses enzymes de maturation (SPC2 et SPC3, CPE, PAM, furine) sont maintenues alors que l'expression de l'ARNm de la POMC et la CgB est nulle chez cette lignée cellulaire. Cependant, l'expression de la POMC est restaurée suite à la stimulation des cellules 6T3 pendant une période de 24 heures avec l'AMPc comme le montre la figure 7. De plus, une analyse ultrastructurale de ces cellules stimulées à l'AMPc démontre que ces cellules contiennent des granules de sécrétion dans lesquels la POMC peut être emmagasinée (figure 8). Afin de démontrer que la voie de sécrétion régulée était fonctionnelle chez les cellules ayant subi un traitement à l'AMPc, une brève stimulation par un agent dépolarisant a permis la relâche de façon régulée du matériel contenu dans les granules de sécrétion (figure 9). Ceci prouve alors que la voie de sécrétion régulée est restaurée suite à un traitement à l'AMPc. D'après ces résultats, la lignée cellulaire 6T3 s'avère être un excellent modèle pour l'étude de la voie régulée chez les cellules endocriniennes puisque l'AMPc reproduit le phénotype endocrinien chez cette lignée cellulaire défectueuse.

L'AMPc est un second messager produit à partir de la conversion de l'AMP par l'adénylate cyclase. L'AMPc permet l'activation de la transcription de gènes



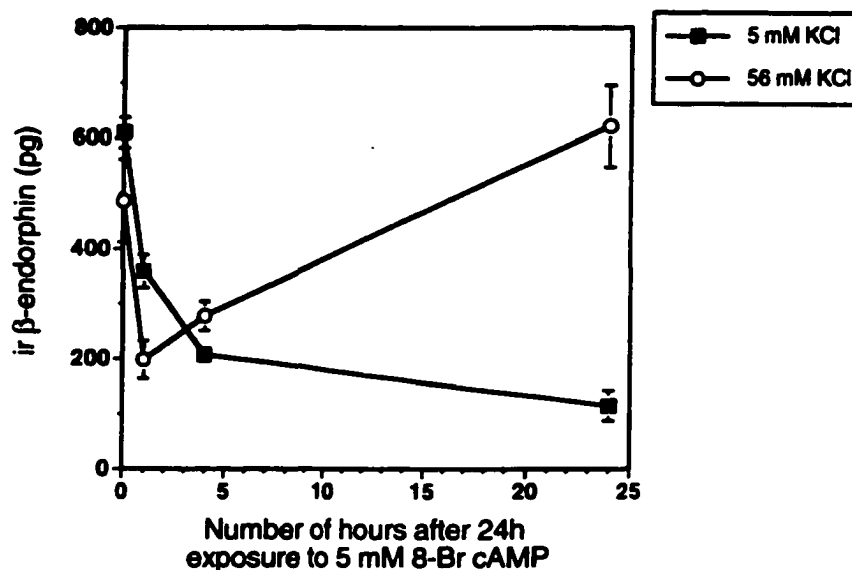
**Figure 7. Induction de la l'expression de la POMC suite à une stimulation des cellules 6T3 à l'AMPC.** Hybridation de type Northern montrant une augmentation dans l'expression de l'ARNm de la POMC (en duplicata pour chacune des conditions) suite à la stimulation des cellules avec l'AMPC ou le CRH.

Tirée de DAY *et al.*, 1995.



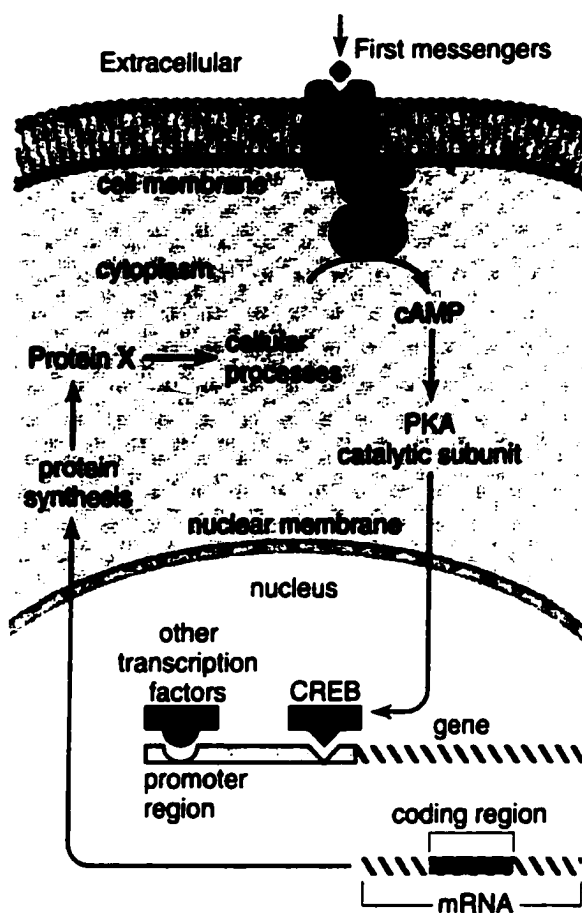
**Figure 8. Induction de la formation des granules de sécrétion suite à la stimulation des cellules 6T3 à l'AMPc. A) Cellules 6T3 non traitées à l'AMPc. B) C) et D) Analyse ultrastructurale des cellules 6T3 traitées pendant 24 heures à l'AMPc à divers grossissements.**

Tirée de DAY *et al.*, 1995.



**Figure 9. Immunodétection par RIA de la  $\beta$ -Endorphine relâchée suite à la stimulation au KCl des cellules 6T3 traitées à l'AMPC. Il y a une augmentation de la  $\beta$ -Endorphine relâchée dans le milieu suite à une dépolarisation brève des cellules au KCl (56 mM) prouvant que la voie régulée est fonctionnelle chez les cellules 6T3 ayant subi un traitement à l'AMPC.**

Tirée de DAY *et al.*, 1995.



**Figure 10. Activation de la transcription de gènes par AMPc.**

Tirée de NESTLER & GREENGARD. Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects. Fifth edition, 1993.



spécifiques définissant souvent le phénotype de la cellule. Ces gènes possèdent une région régulatrice dans leur séquence d'ADN répondant à l'AMPc (CRE pour cAMP Response Element). Cette séquence est reconnue par la protéine CREB (CRE binding protein). L'augmentation de l'AMPc dans la cellule active la protéine kinase A qui elle phosphorylera CREB. CREB phosphorylée peut ensuite se lier à sa séquence régulatrice (CRE) et activer la transcription de ces gènes (figure 10) (NESTER & GREENGARD, 1993). Avec le modèle cellulaire 6T3, l'AMPc ajouté pénètre dans les cellules et va produire l'activation de cette voie menant à la transcription de nouveaux gènes sous le contrôle du CRE.

## **1.9 BUT DE L'ÉTUDE**

Les cellules spécialisées comme les cellules endocrines qui possèdent la voie de sécrétion régulée en plus de la voie de sécrétion constitutive ont une série de gènes permettant l'existence et le bon fonctionnement de cette voie. En effet, d'après ce qu'on connaît de la voie de sécrétion régulée, beaucoup d'éléments interviennent dans les diverses étapes de la voie telles que le triage des protéines de sécrétion régulée, la formation des granules de sécrétion et l'exocytose du contenu granulaire. De plus, cette voie est sous le contrôle d'éléments régulateurs impliqués dans la régulation de la biogénèse des granules de sécrétion. Le but de cette étude est d'identifier des gènes qui contrôlent ou initient ce système de sécrétion relativement complexe à l'aide du modèle cellulaire 6T3. Cette lignée cellulaire, déficiente dans sa voie de sécrétion régulée, s'avère être un excellent modèle pour l'identification de gènes responsables de

**la différenciation des cellules endocrines puisqu'une stimulation à l'AMPC est capable de restorer le phénotype endocrinien chez ces cellules.**

# **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## **2.1 MATÉRIEL GÉNÉRAL**

Les milieux de culture, l'hygromycine, le G-418, la trypsine, le FBS utilisés pour la culture cellulaire proviennent de Gibco-BRL Life Technologies. L'inhibiteur de RNase sans DNase est produit par Proméga. Les enzymes de restriction, la T7 RNA polymérase, la Sp6 RNA polymérase, le kit de séquençage, et le kit ECL+ sont fournis par Amersham-Pharmacia Biotech. La T4 DNA ligase provient de USB. Le vecteur d'expression pcDNA3.1, le vecteur pCRII-TOPO ainsi que les cellules ultra-compétentes TOP 10 proviennent de Invitrogen. L'anticorps CPE C-Terminal est un don généreux du Dr. Loyd Fricker. L'anticorps anti-IgG couplé au FITC est acheté chez Sigma. Le matériel utilisé en microscopie électronique provient de la compagnie Electron Microscopy Sciences (CedarLane Laboratories Limited, Ont. Can.).

## **2.2 CULTURE CELLULAIRE DES DIFFÉRENTES LIGNÉES UTILISÉES ET TRANSFECTION**

### **2.2.1 Culture des cellules AtT-20**

La lignée cellulaire AtT-20 est une lignée provenant de cellules tumorales de l'hypophyse de souris. Les cellules furent cultivées dans du milieu DMEM (4,5 mg/L D-glucose) complet (10% v/v de FBS inactivé, 28 µg/ml gentamycine). Lors du passage des cellules, c'est-à-dire lorsque les cellules atteignent la confluence, les cellules sont lavées avec 4 ml de solution de PBS (0,9% saline contenant 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) et détachées du fond du pétri par digestion enzymatique à l'aide de 2 ml d'une solution de trypsine à une concentration finale de 0,05% dans une solution de Versène 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 mM EDTA). Les cellules sont incubées environ 5 min. à 37°C pour obtenir un détachement efficace du plat de pétri. Les cellules sont ensuite récoltées avec du milieu de culture et centrifugées à 1000 rpm pour une durée de 10 min. Elles sont ensuite diluées 1/4 dans du milieu de culture pour le réensemencement. Les cellules sont redistribuées dans des pétris pour culture 100 mm (Falcon) avec du milieu de culture complet frais. Les cellules sont maintenues à 37°C dans un mélange d'air à 100% d'humidité contenant 5% v/v de dioxyde de carbone.

### **2.2.2 Culture de la lignée 6T3**

La lignée cellulaire 6T3 provient de la fusion entre le myélôme de souris 4T001 et la lignée AtT-20 F2. Elles furent maintenues dans un milieu DMEM (4,5 mg/L D-glucose) supplémenté de 10% v/v de FBS inactivé, additionné de 28 µg/ml de gentamycine et de 250 µg/ml de G-418. La propagation des cellules se fait de la même façon que les cellules AtT-20. Pour obtenir une différenciation des cellules penchant

vers un phénotype endocrinien, les cellules 6T3 sont d'abord lavées au PBS et stimulées pendant 24 hres en ajoutant de la 8-Bromo-AMPC à une concentration finale de 5 mM au milieu de culture frais. Les cellules stimulées à l'AMPC sont ensuite récoltées et congelées sous forme de culot.

### **2.2.3 Transfections**

Lorsque les cellules eurent atteint 60-70% de confluence, celles-ci ont été lavées avec du milieu Opti-MEM™ Reduced Serum Media avant de procéder à la transfection selon la méthode utilisant la LipofectAMINE™. Pour un pétri de 100 mm, 5 µg d'ADN plasmidique et 20 µl de lipofectAMINE™ sont dilués séparément dans des tubes eppendorfs dans du milieu Opti-MEM jusqu'à obtenir un volume de 100 µl. La solution d'ADN est ensuite ajoutée goutte à goutte à la solution de lipofectAMINE™. Ceci est ensuite incubé 45 min. à la température de la pièce pour laisser le temps aux complexes ADN-liposomes de se former. Après l'incubation, 800 µl de milieu Opti-MEM est ajouté aux complexes et cette solution est par la suite ajoutée goutte à goutte aux pétris contenant préalablement 4 ml de milieu Opti-MEM. Après 6 hres d'incubation à 37°C, le milieu de transfection est enlevé et remplacé par 10 ml de milieu de culture complet. Vingt-quatre heures (24 hres) après la transfection, les cellules sont lavées au PBS. Quarante-huit heures (48 hres) après la transfection, la sélection des cellules transfectées commence en ajoutant l'hygromycine comme agent de sélection à une concentration de 250 µg/ml.

Nous avons mis au point la transfection à l'aide d'un oligo fluorescent afin d'optimiser la pénétration des oligonucléotides anti-sens à l'intérieur de la cellule. Cette mise au point s'est effectué en essayant diverses concentrations d'oligonucléotide fluorescent avec diverses quantités de lipofectAMINE™. L'efficacité de transfection a été évaluée par observations à l'aide d'un microscope à fluorescence. La condition optimale pour une efficacité de transfection d'environ 80% s'est avérée être une concentration de 5 µg pour les oligonucléotides avec une quantité de 10 µl de lipofectAMINE™. Les transfactions avec les oligonucléotides se sont faites de la même façon décrite plus haut. Les cellules étaient récoltées le lendemain de la transfection pour ensuite procéder à l'extraction d'ARN. Les oligos anti-sens utilisés dans l'expérience se trouvent dans le Tableau I.

#### **2.2.4 Création de lignées stables**

Après environ 1 semaine de sélection avec l'hygromycine, on peut voir une mort cellulaire des cellules n'ayant pas incorporé le vecteur. Par contre, il reste des cellules isolées ayant été transfectées avec succès. L'efficacité de la transfection varie entre 20-30%. Les cellules sont passées dans des pétris 150 mm à une dilution 1:3. La sélection se poursuit pendant 3-4 semaines ou jusqu'à ce qu'il soit possible d'aller piquer des colonies isolées de cellules. Ceci s'est effectué de deux façons dépendamment de la proximité de chacune des colonies. Lorsque les colonies de cellules étaient rapprochées, la méthode utilisée a été celle des anneaux de clonage. Cette méthode ardue consiste à entourer la colonie avec un anneau préalablement trempé dans de la graisse autoclavée

NOM	SÉQUENCE	POSITION
Z-0144	5' gatccagtcctccgctcact 3'	64-47
Z-0256	5' ttctgttccccagctt 3'	176-158
Z-0477	5' atcatattccccatcaga 3'	397-380
Z-0518	5' actgcttccccctgtat 3'	438-321
Z-2574	5' cttcttccctctgact 3'	495-477
Z-1600	5' agcttgttcccagttgtc 3'	2066-2049
Z-1872	5' attcatgtccctgtcagc 3'	2016-2199
Z-Z147	5' actgtgtcccttatata 3'	1519-1502
Z-2178	5' aaataattccctcacaat 3'	2207-2187

**Tableau I. Liste des oligonucléotides phosphorothioates utilisés lors de l'expérience anti-sens.** La position 1 correspond au premier nucléotide du codon d'initiation AUG.

afin d'éviter les fuites de milieu de culture autour de la colonie pour s'assurer d'isoler seulement les cellules d'une même colonie. La propagation de ces colonies se fait d'abord dans des plaques à 24 puits. Lorsque les cellules atteignent la confluence dans ces plaques, elles sont transférées dans des plaques à 12 puits et ainsi de suite jusqu'à avoir assez de cellules pour pouvoir en congeler ainsi que pour extraire l'ARN. Lorsque les colonies étaient distancées, le piquage des colonies s'effectuait en resuspendant les cellules avec 5-10 µl de trypsine-versène puis la propagation se faisait de la même façon décrite ci-haut.

## **2.3 EXTRACTION D'ARN ET BUVARDAGE DE TYPE NORTHERN**

### **2.3.1 Extraction d'ARN total**

L'ARN est extrait à partir de culot de cellules selon la méthode d'extraction au guanidium isothiocyanate suivie d'une précipitation au chlorure de lithium. Les culots sont resuspendus dans 300 µl de tampon GT (5M guanidine isothiocyanate, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 7,5, 8% mercaptoéthanol). Ils sont ensuite congelés rapidement dans l'azote liquide ou la glace sèche et décongelés à 37°C pendant 3 fois. À l'aide d'une seringue de 1 ml à laquelle on fixe une aiguille de 25G1/2, les cellules sont resuspendues une dizaine de fois de cette façon et par la suite, 1,1 ml de LiCl est ajouté aux tubes, vortexés et précipités toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les tubes sont centrifugés à 4°C à une vitesse de 13 000g pour une durée de 30 minutes. Les culots sont resuspendus dans un tampon PK (50 mM Tris pH 7,5, 5 mM EDTA, 0,5% SDS, 150



µg/ml protéinase K) et digérés à 43°C pendant 3 hres en vortexant à toutes les 15-20 min. Deux extractions au phénol/chloroforme/isoamyl alcool (50:50:1) sont effectuées avant de procéder à la précipitation de l'ARN en ajoutant 1/10 d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et 2,5 volumes d'éthanol 100%. Après la précipitation, les tubes sont centrifugés à 13 000g pour une période de 30 min. pour pouvoir former un culot d'ARN qui est ensuite séché et resuspendu dans un petit volume d'eau traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC).

### 2.3.2 Dosage de l'ARN

Après dosage par spectrométrie, la solution d'ARN est ajustée à une concentration de 1 µg/µl. Une unité d'absorbance d'ARN correspond à une concentration de 40 µg/ml. Le rapport D.O.<sub>260</sub>/D.O.<sub>280</sub> mesure l'absorbance maximale des acides nucléiques par rapport à l'absorbance maximale des protéines. Plus le ratio est élevé, moins il y a de protéines contaminantes. Un rapport de 2,0 correspond à une solution d'ARN pur, un rapport supérieur à 1,6 est jugé acceptable (SAMBROOCK *et al.*, 1989).

Exemple de calcul de dosage d'ARN:

Si on dose 2 µl de solution d'ARN dans 100 µl d'eau et qu'on obtient les valeurs suivantes de D.O. : D.O.<sub>260</sub> = 2,411 et D.O.<sub>280</sub> = 1,270, on obtient une concentration de 4,822 µg/µl d'ARN, avec un ratio acceptable de 1,9.

$$[\text{ARN}] = \text{D.O.}_{260} \times 1/\text{dilution} \times 40 \mu\text{g}/\mu\text{l} / 1 \text{ D.O.}_{260}$$

$$= 2,411 \times 2 \mu\text{l}/100\mu\text{l} \times 40 \mu\text{g}/\mu\text{l} / 1 \text{ D.O.}_{260} = 4,822 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

$$\text{Ratio} = \text{D.O.}_{260}/\text{D.O.}_{280} = 2,411/1,270 = 1,9 \text{ (acceptable)}$$

### 2.3.3 Buvardage de type Northern

On utilise 5 µg d'ARN ( de 1 à 10 µl de solution d'ARN) auquel on ajoute 10 µl de tampon d'échantillon (1 mL 10x Hepes EDTA (200 mM Hepes, 10 mM EDTA pH 7,8), 5 mL formamide, 1,6 mL 37% formaldéhyde) et 2 µl de tampon de chargement (50% glycérol, 0,5% bleu de bromophénol, 0,5% xylène cyanol). L'échantillon est chauffé 10 minutes à 65°C avant d'être chargé sur un gel d'agarose dénaturant (1,6% agarose, 6% formaldéhyde, 20 mM Hepes, 1 mM EDTA, pH 7.8. On procède à l'électrophorèse dans un tampon de migration (20 mM Hepes, 1 mM EDTA, 6% formaldéhyde) à 180 volts. L'électrophorèse est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol a migré à travers tout le gel. Le gel est ensuite lavé dans de l'eau DEPC pendant au moins une heure. L'ARN est transféré par capillarité sur une membrane Nytran N (Xymotech, Mt Royal, Qc), préalablement hydratée dans de l'eau DEPC. Le transfert se fait dans une solution de 10X SSC (1,5 M NaCl, 0,15 M citrate, pH 7,5) pendant 16-18 hres. Après le transfert, la membrane est séchée au four à 65°C puis l'ARN est fixé à la membrane à la lumière ultra-violet (UV à longueur d'onde longue) pendant 45 secondes et colorée à l'aide d'une solution de bleu de méthylène (0,02% p/v bleu de méthylène, 0,3 M acétate de sodium) jusqu'à ce que l'ARN ribosomal 28S et 18S soient visibles sur la membrane.

### **2.3.4 Préparation des ribosondes de Zis-SR**

Dans un eppendorf, on ajoute 8  $\mu\text{l}$  de [ $\alpha$ - $\text{P}_{32}$ ]UTP (0.17  $\mu\text{Ci}$ ), 1  $\mu\text{l}$  de DTT, 2  $\mu\text{l}$  de NTP-UTP (5 mM), 2  $\mu\text{l}$  de tampon de transcription 10 X (400 mM Tris pH 7,4, 60 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM DTT, 40 mM spermidine), 1  $\mu\text{l}$  d'inhibiteur de Rnase, 1  $\mu\text{l}$  de d'ARN polymérase T7, 1  $\mu\text{l}$  d'ADN linéarisé (mZis-SR 596pb/HindIII dans pcRII-TOPO), 4  $\mu\text{l}$  d'eau DEPC, pour un total de 20  $\mu\text{l}$ . On incube 2 hres à 37°C. Ensuite, on ajoute à l'eppendorf 5  $\mu\text{l}$  d'ARN de levure (5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 4  $\mu\text{l}$  de tampon de transcription 10 X, 1  $\mu\text{l}$  d'inhibiteur de RNase, 1  $\mu\text{l}$  DNase sans RNase, 19  $\mu\text{l}$  d'eau DEPC, pour un total de 50  $\mu\text{l}$ . Le tout est incubé à 37°C, 15 min. On ajoute 50  $\mu\text{l}$  d'eau DEPC pour compléter le volume à 100  $\mu\text{l}$ . On fait une extraction au phénol-chloroforme, et on précipite la sonde avec 10  $\mu\text{l}$  d'acétate de sodium 3 M, 250  $\mu\text{l}$  d'éthanol 100% et 2  $\mu\text{l}$  de glycogène. Le culot est resuspendu dans 100  $\mu\text{l}$  d'eau.

### **2.3.5 Hybridation de la membrane avec les différentes sondes**

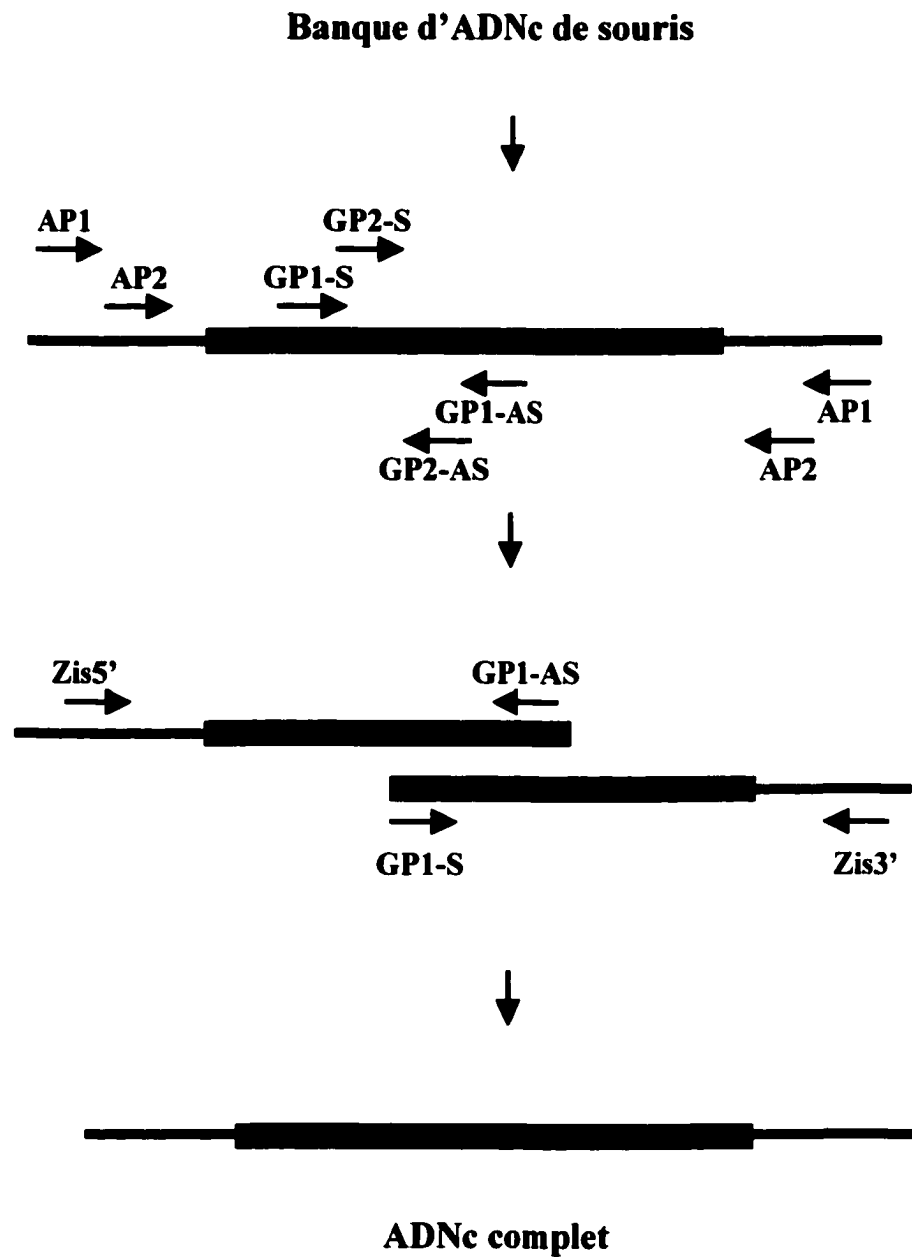
La membrane est préalablement décolorée à l'aide d'un tampon décolorant (1% p/v SDS, 1 mM EDTA) et préhybridée dans du tampon d'hybridation (5% SDS, 400 mM phosphate de sodium, 1 mM EDTA, 1 mg/ml BSA, 50% formamide), pendant 2 hres à 65°C. La sonde est ensuite ajoutée au tampon d'hybridation. La membrane est incubée avec la sonde à 60°C pendant 18 hres. On lave la membrane 1 1/2 hres avec du tampon de lavage (0,1% SDS, 0,1 X SSC, 1 mM EDTA) préalablement chauffé à 70°C. Par la suite, ce tampon est remplacé par du tampon de lavage frais utilisé pour procéder au

lavage encore pendant 2 hres à 70°C. La membrane est époncée avec un papier Whatman et exposée sous un film X-OMAT™AR (Eastern Kodak Co., Rochester, NY) 16 hres à -80°C.

## **2.4 AMPLIFICATION DE L'ADNc COMPLET DE ZIS-SR**

### **2.4.1 RACE**

La méthode utilisée, le RACE (Rapid Amplification cDNA Ends), pour procéder à l'amplification complète de l'ADNc complet du gène d'intérêt s'est faite en utilisant le kit Marathon™ cDNA Amplification kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) et ce à partir d'une banque ADNc de souris (Mouse Brain Marathon-Ready™cDNA) fournie par Clontech Laboratories. Les oligonucléotides utilisés pour le premier tour et le deuxième tour de PCR, soit l'amplification des extrémités 5' et 3', ont été dessinés à partir de la séquence obtenue suite au PCR différentiel (Differential Display PCR). En se basant sur la séquence des extrémités 5' et 3' amplifiées, deux autres amorces ont été dessinées pour pouvoir procéder à l'amplification de l'ADNc complet. Tous ces oligonucléotides ont été synthétisés par Gibco BRL Life Technologies. Les séquences de chacune des amorces utilisées se retrouvent dans le tableau II. Les réactions pour l'amplification des fragments ont été faites selon le protocole commercial de Clontech Laboratories.

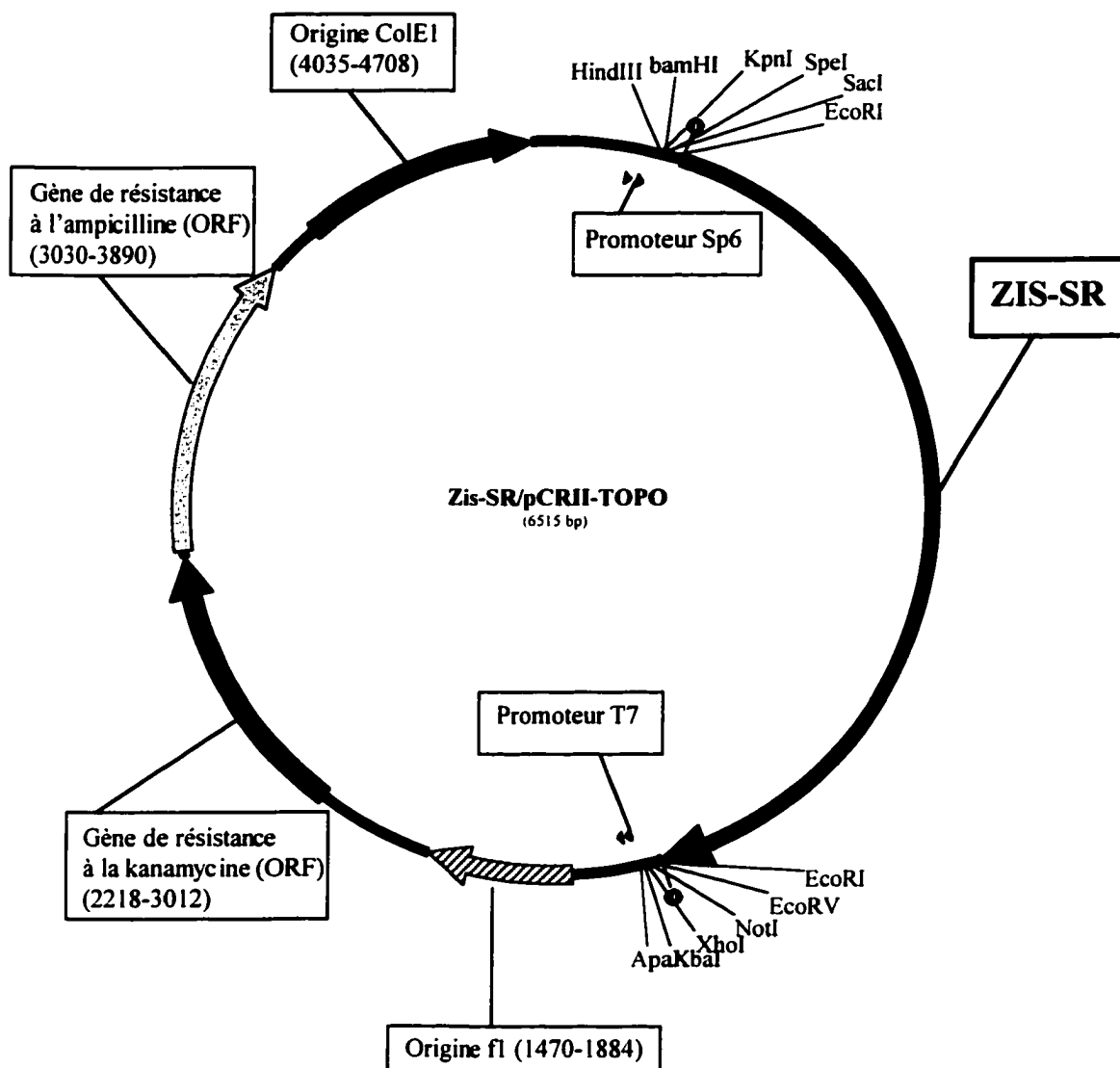


**Figure 11. Représentation schématique de l'amplification du gène Zis-SR par la méthode de RACE.**

	<b>NOM</b>	<b>SÉQUENCE</b>	<b>POSITION</b>
Oligo sens (1er tour)	GP1-S	5' aagaagctctccagttcgcagtcag 3'	715-742
Oligo sens (2 <sup>e</sup> tour)	GP2-S	5' cagagaacattccagatcccgtggttc 3'	757-783
Oligo sens ext.5'	ZIS5'	5' aggtctgctgctggcgtccaagatgc 3'	-22- +5
Oligo anti-sens (1er tour)	GP1-AS	5' gaaccacgggatctggaatgttctctg 3'	783-757
Oligo anti-sens (2 <sup>e</sup> tour)	GP2-AS	5' ctggactgcgaactggaagagcttctt 3'	742-715
Oligo anti-sens ext.3'	ZIS3'	5' ttgactcacggattttattacattg 3'	2615-2589

**TABLEAU II : Liste des oligonucléotides spécifiques pour l'amplification de l'ADNc complet du gène Zis-SR à partir d'une banque ADNc de cerveau de souris.**

La position 1 correspond au premier nucléotide du codon d'initiation AUG.



**Figure 12. Clone Zis-SR dans le vecteur pCRII-TOPO.**

### **2.4.2 Sous clonage dans le vecteur pCR®II-TOPO**

Les fragments amplifiés par PCR ont d'abord été purifiés sur gel préparatif et extrait du gel par la méthode d'électroélution décrite selon SAMBROOK *et al.* (1989). Les fragments sont ensuite sous-clonés dans le vecteur pCR®II-TOPO qui est ensuite transformé dans des bactéries ultra-compétentes TOP 10 (Invitrogen, E-U.), suivant le protocole du TOPO Cloning Kit (Invitrogen, E.-U.). On fait pousser les bactéries 16 hres sur un pétri LB (Gibco BRL) avec 0,1 mg/ml d'ampicilline, à 37°C. Les colonies qui ont poussé sur le pétri sont repiquées dans 2 mL de milieu LB (avec 0,1 mg/ml d'ampicilline) et sont incubées 16 hres à 37°C avec agitation.

### **2.4.3 Extraction de l'ADN plasmidique à petite et grande échelle**

Pour les extraction d'ADN à petite échelle, 1 ml de milieu LB est centrifugé à 13000 rpm, 2 min à 4°C. Le culot est resuspendu dans 100 µl de solution I (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8), on y ajoute 200 µl de solution II (0,2N NaOH, 1% SDS), on vortexe et on ajoute 200 µl de chloroforme. Les tubes sont inversés et incubés 1 min à température pièce. Cent-cinquante µl de solution III (29.4g CH<sub>3</sub>COOK, 5 ml HCOOH, compléter à 100 ml avec de l'eau) est ajouté à l'échantillon. On centrifuge à 13000 rpm, 5 min. à 4°C. La phase supérieure est précipitée dans 1 ml d'éthanol 100%, et centrifugée à 13000 rpm, 5 min à 4°C. Le culot est séché et resuspendu dans un volume d'eau approprié. L'ADN est dosé par spectrométrie. L'ADN est ensuite séquencé pour vérifier l'exactitude de la séquence. Pour les



préparations d'ADN plasmidique à grande échelle, l'extraction de l'ADN plasmidique se fait selon le protocole en utilisant le Kit Wizard (Proméga).

#### **2.4.4 Séquençage des clones positifs**

L'ADNc complet de Zis-SR a été séquençé par la compagnie Amplicon (Boston, E-U) pour l'obtention d'une séquence exacte. La méthode pour le séquençage des clones est expliquée plus loin.

### **2.5 CLONAGE DU FRAGMENT DE ZIS-SR UTILISÉ POUR LA SYNTHÈSE D'UNE RIBOSONDE.**

Un fragment de 596 pb a été amplifié à partir des oligos suivants: GP2-S (oligo sens) 5' cagagaacattccagatcccgtggttc 3' à la position 757-783 pb et RDF5 (oligo anti-sens) 5' ggcaaccctgtctctgt 3' à la position 1353-1335 pb. Ce fragment a été amplifié par PCR selon les conditions suivantes: 3 min. à 94°C, 20 cycles avec les températures suivantes: 1 min. à 94°C, 1 min. à 55°C, 1 min. à 72°C et 1 cycle de 10 min. à 72°C. Ce fragment a été sous-cloné dans le vecteur pcRII-TOPO montré à la figure 12.

Il faut connaître l'orientation de l'insert entré dans le vecteur et par la suite il faut procéder à la linéarisation du plasmide. Ceci permettra la synthèse de la ribosonde par l'ARN polymérase T7 ou Sp6 dépendamment de l'orientation du fragment sous-cloné. Le plasmide a été coupé avec l'enzyme XbaI pour pouvoir synthétiser une ribosonde par

l'ARN polymérase Sp6 avec l'orientation sens utilisée comme contrôle en hybridation *in situ*. Pour la synthèse de la ribosonde anti-sens utilisée dans les expériences d'hybridation de type Northern et d'hybridation *in situ*, le plasmide a été linéarisé par l'enzyme HindIII. La ribosonde sera synthétisée par l'ARN polymérase T7.

## **2.6 HYBRIDATION *IN SITU***

La sonde d'ARNc anti-sens radiomarquée au  $^{33}\text{P}$ -UTP a été générée à partir du plasmide pCRII-TOPO contenant le fragment de Zis-SR/600pb tel que décrit plus tôt dans la section 2.3.4 du Matériel et Méthodes. La sonde radioactive a été diluée pour obtenir  $33 \times 10^3$  dpm/ $\mu\text{l}$ . L'hybridation *in situ* s'est effectuée tel que décrit précédemment dans la littérature par Schäfer et Day (1994). Les tissus ont été prélevés rapidement des souris et congelés dans l'isopentane refroidi à  $-35^\circ\text{C}$ . Les tissus ont été conservés à  $-80^\circ\text{C}$  jusqu'à ce qu'ils soient cryosectionnés. Des sections de  $10 \mu\text{m}$  ont été coupées à l'aide d'un cryostat Reichert (Leica Microsystems, Depew, NY) et mises sur lames de verres enduites de poly-lysine. Les coupes de tissus ont été hybridées avec la ribosonde mZis-SR 596pb/pCRII-TOPO marquée  $^{33}\text{P}$ -UTP en présence de tampon d'hybridation (75% formamide, 10% dextran sulfate, 3 X SSC, 50 mM phosphate de sodium pH 7,4, 1X solution de Denhardt's, 0,1 mg/ml yeast ARNt) pendant 16 hres à  $55^\circ\text{C}$ . Par la suite, les lames sont traitées à la RNase A pour éliminer l'ARN non lié et lavées avec des solutions de SSC de concentrations décroissantes pour accroître la spécificité des sondes hybridées. Les coupes sont ensuite exposées sous un film (Kodak XAR) pour une période de 1 à 7 jours. Pour obtenir une localisation cellulaire, les lames

radio-actives sont trempées dans une émulsion radiographique (Kodak) et conservées pendant 1 mois à 4°C. Les autoradiogrammes sont ensuite développés par Kodak D-19 pendant 4 min. et fixés 4 min. dans une solution de thiosulfate de sodium 30%, colorés au crésyl violet puis clarifié dans du xylène avant d'être monté avec du Permount (Fischer Scientific). Comme contrôle négatif, des ribosondes d'ARN complémentaire sens (ayant la même longueur ainsi que la même spécificité) ont été synthétisées et marquées au <sup>33</sup>P-UTP puis hybridées de la même façon que les ribosondes anti-sens.

## **2.7 AMPLIFICATION ET SÉQUENÇAGE DE LA RÉGION SE PRODUISANT LE CHANGEMENT DANS LE CADRE DE LECTURE DANS LA SÉQUENCE DE ZIS-SR**

### **2.7.1 Transcription inverse**

À partir d'ARN préalablement extrait de cerveau de rat, souris, d'humain, une quantité de 5 µg a été pris pour procéder à la transcription inverse. À ce 5 µg, 1 µl d'oligo dT (500 µg/ml) a été ajouté et le volume a été complété à 12 µl avec de l'eau stérile. Ceci est mis 10 min. à 70°C puis 15 min. à 4°C et par la suite 4 µl de tampon «First Strand» 5X, 2 µl de DTT (0,1 M) et 1 µl de dNTP (10 mM) sont ajoutés à la réaction pour être incubé 2 min. à 42°C. L'enzyme Superscript (1 µl) est ajouté puis la transcription inverse se fait pendant 50 min. à 42°C et 15 min. à 70°C.

### **2.7.2 Amplification par PCR du fragment**

Un fragment de 349 pb a été amplifié avec les oligos suivants: RD1 (oligo sens) 5'aggacgaggatgaagatga3' position 535-552 pb et RDF6 (oligo anti-sens) 5'tcctcttctctgtctcttt3' position 881-867 pb. Le PCR a été effectué dans les conditions suivantes: 1 min. à 94°C, 25 cycles avec les températures suivantes: 1 min. à 94°C, 1 min. à 52°C, 2 min. à 72°C et 1 cycle de 10 min. à 72°C.

### **2.7.3 Séquençage**

La matrice dénaturée est préparée à partir de 5 à 10 µg d'ADN plasmidique, on complète le volume à 32 µl d'eau stérile. La dénaturation alcaline se fait avec 8 µl de NaOH 2 M (fraîchement préparé à partir de NaOH 10 N) en incubant 5 min. à T° pièce. La réaction est neutralisée avec 7 µl d'acétate de sodium 3 M et la matrice déaturée est précipitée à -80°C pendant 20 min. avec 120 µl d'éthanol 100% glacial. On centrifuge 15 min. à 13000 rpm à 4°C. Le culot est lavé avec de l'éthanol 70% et resuspendu dans 10 µl d'eau stérile. À ce 10 µl de plasmide dénaturé, 2 µl de tampon d'amorce et 2 µl d'oligonucléotides («Forward Primer» ou «Reverse Primer» (5µM) selon la réaction) sont ajoutés et incubé 5 min. à 65°C, 15 min. à 37°C et 5 min. à T° pièce. L'ADN est marqué avec 0,5 µl de dATP S35, 3 µl de tampon de marquage, 0,5 µl de polymérase T7 et 6 µl de tampon de dilution. Le tout est incubé 5 min. à température pièce. 2,5 µl de chaque solution didéoxy (A, C, G, T) est ensuite ajouté séparément au mélange réactionnel et incubé 5 min à 37°C. La réaction est arrêtée avec

4 µl de bleu de formamide. Les échantillons sont ensuite chargés sur le gel d'acrylamide 6% ayant été préalablement pré-migré pendant 45 min. On laisse migrer les échantillons jusqu'à ce que le colorant bleu soit à la base du gel. Le gel est transféré sur papier Whatman et séché à l'aide d'un séchoir à gel pour une durée de 1 hre à 80°C. Le gel est ensuite exposé toute la nuit sur un film (Kodak XAR).

## **2.8 CONSTRUCTION DES FRAGMENTS ANTI-SENS ZIS-SR DANS VECTEUR D'EXPRESSION**

### **2.8.1 Amplification par PCR des différents fragments**

Étant donné l'incertitude sur la longueur des fragments d'ARN anti-sens à utiliser pour un blocage efficace de l'expression du gène Zis-SR, des fragments de différentes tailles ont été amplifiés soit 400, 700, 1400 pb utilisant pCRII-TOPO/Zis-SR comme matrice. Les oligonucléotides utilisés pour l'amplification de chaque fragment sont montrés dans le Tableau III.

Le PCR s'est fait selon les conditions suivantes: 1 min. à 94°C, 25 cycles avec les températures suivantes: 15 sec. à 94°C, 30 sec. avec un gradient de température variant de 52,6°C à 70,6°C, 30 sec. à 72°C et 1 cycle de 10 min. à 72°C. Suite au PCR, l'ADN est purifié sur gel préparatif puis extrait du gel par électroélution.

	<b>OLIGO</b>	<b>NOM</b>	<b>SÉQUENCE</b>	<b>POSITION</b>	<b>T<sub>M</sub></b>
<b>400pb</b>	Sens	Zis5	5'aggtctgctgctggcgtccaagatgctc3'	-22- +5	55°C
	Anti-sens	RDF7	5' attcccatcagattctt 3'	392-378	
<b>700pb</b>	Sens	Zis5	5'aggtctgctgctggcgtccaagatgctc3'	-22- +5	70°C
	Anti-sens	GP2-AS	5'ctggactgcgaactggaagagcttctt3'	742-715	
<b>1400pb</b>	Sens	Zis5	5'aggtctgctgctggcgtccaagatgctc3'	-22- +5	55°C
	Anti-sens	RDF5	5' ggcaaccctgtctctgt 3'	1353-1335	

**TABLEAU III : Liste des oligonucléotides spécifiques pour l'amplification des fragments d'ADN du gène Zis-SR et T<sub>m</sub>. La position 1 correspond au premier nucléotide du codon d'initiation AUG.**

### **2.8.2 Sous-clonage dans les vecteurs pCRII-TOPO et pCDNA3.1**

Les fragments ont été sous-clonés dans le vecteur pCRII-TOPO (Invitrogen). Dans ce vecteur, les fragments peuvent être insérés dans les 2 directions soit l'orientation sens ou anti-sens. Pour ce faire, l'orientation des inserts a été vérifiée en effectuant des analyses de restriction en digérant avec une enzyme qui coupe une seule fois asymétriquement dans l'insert et le vecteur. Les clones ayant l'orientation anti-sens ont été sélectionnés et ainsi, les stratégies pour le sous-clonage dans le vecteur d'expression pCDNA3.1 (Invitrogen) ont été élaborées. Pour les constructions anti-sens de 400, 700 et 1400 pb, les vecteurs pCDNA3.1 et pCRII-TOPO ont été digérés avec les enzymes BamHI et XhoI (Pharmacia). Le vecteur d'expression pCDNA3.1 a ensuite été déphosphorylé pour empêcher qu'il se referme sur lui-même en incubant à 37°C pendant 1 h avec 5 µl phosphatase alcaline (Pharmacia). Une extraction au phénol/chloroforme est effectuée avant de purifier le vecteur sur gel préparatif. Les fragments anti-sens sortis du vecteur pCRII-TOPO ont aussi été purifiés sur gel préparatif avant de procéder à la ligation dans le vecteur d'expression. De plus, une autre construction a été faite soit le Zis-SR complet mais orienté de façon anti-sens dans le vecteur d'expression pCDNA3.1. Le plasmide pCRII-TOPO/Zis-SR ainsi que le vecteur pCDNA3.1 ont été digérés avec l'enzyme BstXI (Pharmacia). Pour chacune des constructions, les stratégies de clonage avaient été pensées de façon à ce que les inserts entrent dans l'orientation voulue. Les fragments de 400, 700, 1400 pb et le Zis-SR complet ont été ligués dans le vecteur d'expression par la T4 DNA ligase (Pharmacia). Différents ratios vecteur:insert ont été testés soit 1:1, 1:3 et 3:1 en présence de 1 µl tampon de ligation 10X et un

volume d'eau pour compléter les réactions à un volume de 10 µl total. L'eau et les volumes d'insert et de plasmide ont été préalablement incubé 5 min. à 45°C avant l'ajout du tampon de ligation et de la ligase. La ligation s'est effectuée toute la nuit à 14°C. Le lendemain, il y a eu transformation des produits de ligation dans les cellules TOP 10 comme décrit dans la section 2.4.2 du Matériel et Méthodes. Par la suite, il y a eu analyse par enzymes de restriction pour la vérification des clones positifs ainsi que séquençage des clones positifs. Chacune de ces constructions plasmidiques a été produite à grande échelle et purifiée par «midi-prep» Wizard (Proméga) et utilisée pour les transfections.

## **2.9 IMMUNOFLUORESCENCE**

Les cellules AtT-20 sontensemencés au nombre de 50 000 par chambre sur une lame de verre pour culture à chambres amovibles (FALCON® Culture Slides, Becton Dickinson). Après 2 jours, lorsque les cellules sont bien adhérees et qu'elles ont eu le temps de se diviser, les cellules sont lavées 3X au (0,9% saline contenant 2,7 mM KCl, 4,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) et ensuite elles sont fixées avec une solution de paraformaldéhyde 4% p/v dans du PBS (50 mM phosphate de sodium, 150 mM chlorure de sodium, pH 7,4) pendant une période de 30 minutes. Suite à la fixation, elles sont lavées 3 X au PBS puis perméabilisées et bloquées pendant 1 heure à température pièce avec une solution de 0,1% Triton X-100 et 2 mg/ml BSA dans du PBS. Les cellules sont ensuite lavées 3X au PBS 0,1% Triton et mises en présence de l'anticorps primaire. L'anticorps utilisé est dirigé contre la portion C-terminale de la carboxypeptidase E



(CPE) (Anti-CPE). Cet anticorps est utilisé à une dilution 1/1000 dans du PBS 0,1% Triton. Les cellules sont incubées soit 2 hres à température pièce ou toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire. Par la suite, 3 lavages de 5 min. avec du PBS 0,1% Triton sont effectués puis les complexes antigène-anticorps sont révélés à l'aide d'un anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé au FITC (Sigma) utilisant une dilution 1/160 pendant 1 hre à température pièce. Pour l'observation, les lames sont montées avec une solution «antifade» (2,5% DABCO, 200 mM Tris-HCl pH 8,6, 90% glycérol).

## **2.10 EXPÉRIENCES DE SÉCRÉTION**

### **2.10.1 Stimulation de la relâche du contenu de la voie régulée**

Lorsque les cellules ont atteint la confluence dans un pétri de 100 mm, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS (0,9% saline contenant 2,7 mM KCl, 4,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Pour stimuler la relâche du contenu des granules de sécrétion, les cellules sont mises en présence de 4 ml d'une solution physiologique de Krebs (117,5 mM NaCl, 56 mM KCl, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5,5 mM glucose) pendant 30 minutes. Il est à noter que la concentration de KCl (56 mM) provoque la dépolarisation des cellules pour ainsi déclencher l'exocytose des granules de sécrétion. Comme contrôle, des cellules sont mises en présence de 4 ml d'une solution physiologique de Krebs ayant 4,7 mM KCl. Après l'incubation de 30 min. à 37°C 5% CO<sub>2</sub>, la solution est récoltée. Par la suite, les

protéines sont concentrés à l'aide d'un Centricon YM-10, poids d'exclusion de 10 000 Daltons (Millipore).

### **2.10.2 Analyse des protéines par buvardage de type Western**

#### **Extraction des protéines**

Les cellules sont resuspendues dans du tampon d'extraction contenant les inhibiteurs de protéases (50 mM Tris HCl, 2,5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,02% sodium azide, 2 µg/ml leupeptine, 2 µg/ml aprotinine, 2 mM β-mercaptoethanol, 100 µg/ml A-PMSF, 100 µM pepstatine). Le volume dans lequel les cellules sont resuspendues variait entre 300 et 500 µl dépendamment de la grosseur du culot de cellules. Après resuspension des cellules, celles-ci sont congelées/dégelées 3 fois et ensuite passées à travers une seringue pour compléter la lyse. Elles sont ensuite centrifugées à 13000 rpm, 30 min. à 4°C. Le surnageant est conservé et dosé par dosage Bradford.

#### **Buvardage de type western**

Les protéines sont résolues sur un gel de SDS-PAGE 10% dans un tampon de migration (250 mM glycine, 25 mM Tris Base, 0,1% SDS), puis transférées sur une membrane Hybond P PVDF (Amersham) par électrophorèse à 4°C, pendant 1hre à 100 volts, dans un tampon de transfert (250 mM glycine, 25 mM Tris Base, 20% méthanol).

La détection se fait par chémiluminescence avec le système ECL+, selon le protocole du manufacturier (Amersham). Pour la détection de la CPE, l'anticorps dirigé contre la partie C-terminale est utilisé à une dilution de 1/20000. Le deuxième anticorps anti-IgG de lapin (Amersham) est utilisé à une dilution de 1 :1500. La membrane est exposée sous un film X-OMAT™AR (Eastern Kodak Co., Rochester, NY).

## **2.11 MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE**

Les cellules sont centrifugées à 2500 rpm pendant 3 min. afin d'obtenir des culots pour procéder à la fixation. Les cellules sont par la suite remises en suspension et fixées dans un mélange 1/1 (v/v) de glutaraldéhyde 5% (p/v) préparée dans du tampon cacodylate de sodium (0,1 M pH 7,4) et du tampon Krebs-Hepes pendant 20 min. à 25°C. Les cellules sont centrifugées 3 min. à 2500 rpm puis resuspendues dans de la glutaraldéhyde 2.5% (p/v) préparée dans du tampon cacodylate de sodium (0,1 M pH 7,4). La fixation se fait pendant 30 min. à 25°C. Les cellules sont centrifugées 3 min. et resuspendues dans du tampon cacodylate (0,2 M pH 7,4 à 4°C). Les cellules sont ensuite centrifugées 3 min. à 5000 rpm pour former un culot solide. Une solution de tétr oxyde d'osmium 1% (p/v) préparée dans du tampon cacodylate de sodium (0,1 M pH 7,4 à 4°C) est ajoutée au culot pour une période de 5 min. La solution est enlevée et remplacée par de la solution fraîche de tétr oxyde d'osmium 1% et fixer les cellules dans cette solution pendant 1 hre à 4°C. Les cellules sont ensuite centrifugées 3 min. à 5000 rpm pour reformer des culots. Ceux-ci sont resuspendus délicatement (afin de briser les culots) dans une solution d'acétate d'uranyl 0,25% dans une solution d'acétate de

sodium 2% pH 6,3. Elles sont incubées dans cette solution pendant 45 min. à 4°C. Les fragments de culots sont rincés toute la nuit à 4°C avec une solution d'acétate d'uranyl 0,25% dans de l'eau pH 6,3. Le lendemain les fragments sont suspendus 5 minutes dans chacune des solutions d'acétone 30, 50, 70, 80, 90 et 100% à 4°C pour déshydrater les fragments de cellules. Après, ces fragments sont déshydratés 2 fois pendant 20 min. dans de l'acétone 100% à température de la pièce. Les fragments sont ensuite placés dans un mélange épon-oxyde à propylène 1/1 1 hre à 25°C, transférés dans un mélange épon-oxyde 4/1 pour toute la nuit. Le lendemain, les fragments sont rincés 3 fois dans de l'épon pur. Après le rinçage, les fragments sont inclus dans de l'épon pur et polymérisés pendant 48 hres à 60°C. Des coupes sont faites à l'aide d'un microtome, elles sont colorées avec de l'uranyl acétate 1% et citrate de plomb 6% pH 10 et finalement observées sous microscope électronique.

# RÉSULTATS

## 3.1 RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

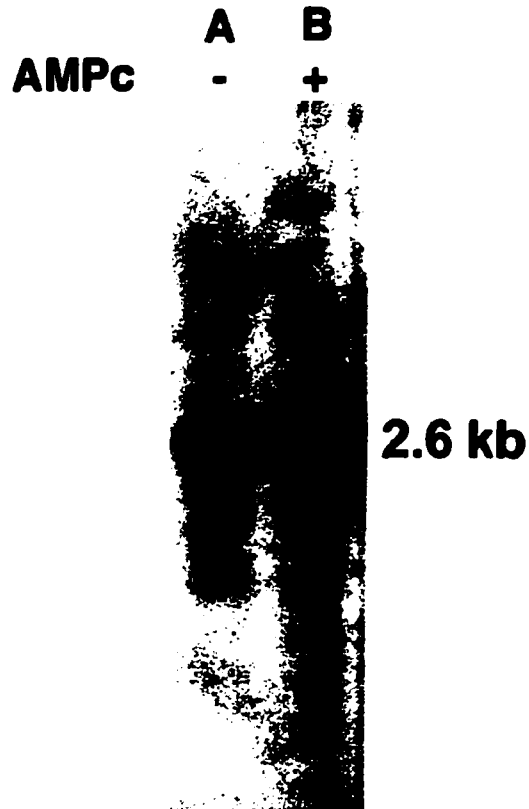
Pour identifier des gènes pouvant être impliqués dans la différenciation de cellules endocriniennes ou des gènes impliqués soit directement ou indirectement dans le mécanisme de formation de granules de sécrétion, l'approche du PCR différentiel a été utilisée. Cette approche permet l'identification et ainsi le clonage de gènes qui sont exprimés de façon différentielle dans une cellule. Ainsi, dans le modèle cellulaire utilisé, soit les cellules 6T3, on peut distinguer des différences dans le niveau d'expression des gènes, soit à la hausse ou à la baisse, suite à une stimulation des cellules avec l'AMPc. Cependant, ce ne sont pas tous les gènes qui subissent une variation au niveau de leur expression. Ce qui nous intéressait dans cette étude s'avérait à être des gènes dont l'expression était augmentée suite à la stimulation à l'AMPc. Un ADNc a été isolé avec cette approche effectuée par Dr Robert Day, puis il a procédé à une caractérisation préliminaire de ce gène. La technicienne Xue-Wen Yuan a effectué la distribution cellulaire et tissulaire de GAP1-5A alors que Édith Lanoue est responsable des résultats obtenus sur la localisation de GAP1-5A par hybridation *in situ*.

Ce fragment d'ADNc a été nommé GAP1-5A. **G** pour le nucléotide compris dans oligo dT dégénéré. **AP1** provient de l'amorce aléatoire utilisé pour le PCR différentiel. **5A** correspond au numéro du clone isolé.

### **3.1.1 Induction du gène GAP1-5A suite à une stimulation à l'AMPc**

Dans le modèle cellulaire 6T3, nous pouvons induire la formation de granules de sécrétion par l'AMPc. Pour induire ce changement de phénotype, une multitude de gènes se trouvent à être exprimés à la hausse ou à la baisse. Par PCR différentiel, un fragment d'ADNc a été isolé suite à la stimulation des cellules à l'AMPc. Ce fragment d'ADNc, nommé GAP1-5A, était régulé à la hausse suite au traitement à l'AMPc. Cependant, il se peut qu'avec cette technique on isole des fragments d'ADNc qui ne sont pas exprimés différenciellement dans la cellule, ce sont des artéfacts. Pour s'assurer que le fragment GAP1-5A était exprimé à la hausse suite à la stimulation des cellules à l'AMPc, nous avons regardé l'induction de ce gène par buvardage de type Northern. De plus, l'hybridation d'une sonde spécifique à ce gène permettra de connaître sa taille.

La figure 13 montre un buvardage de type Northern démontrant l'induction du gène GAP1-5A chez les cellules 6T3 traitées au 8-bromo-AMPc pendant 24 heures. Ceci a été mis en évidence en hybridant les ARNm totaux des cellules 6T3 non traitées et traitées avec une sonde d'ARNc synthétisée à partir du fragment d'ADNc GAP1-5A marquée au <sup>32</sup>P-UTP. La membrane a été préalablement colorée au bleu de bromophénol afin de s'assurer de la quantité équivalente d'ARN (5µg) dans chaque puit.



**Figure 13. Buvardage de type Northern montrant l'induction du gène Zis-SR par l'AMPc.** Les cellules 6T3 ont été traitées au 8-bromo-AMPc pendant 24 heures. L'ARNm total des cellules 6T3 non-stimulées (A) et stimulées (B) a été hybridé avec une sonde ARNc de Zis-SR de 596pb marquée au  $^{32}\text{P}$ -UTP. La membrane a été préalablement colorée au bleu de bromophénol afin de s'assurer de la quantité équivalente d'ARN (5 $\mu\text{g}$ ) dans chaque puit.

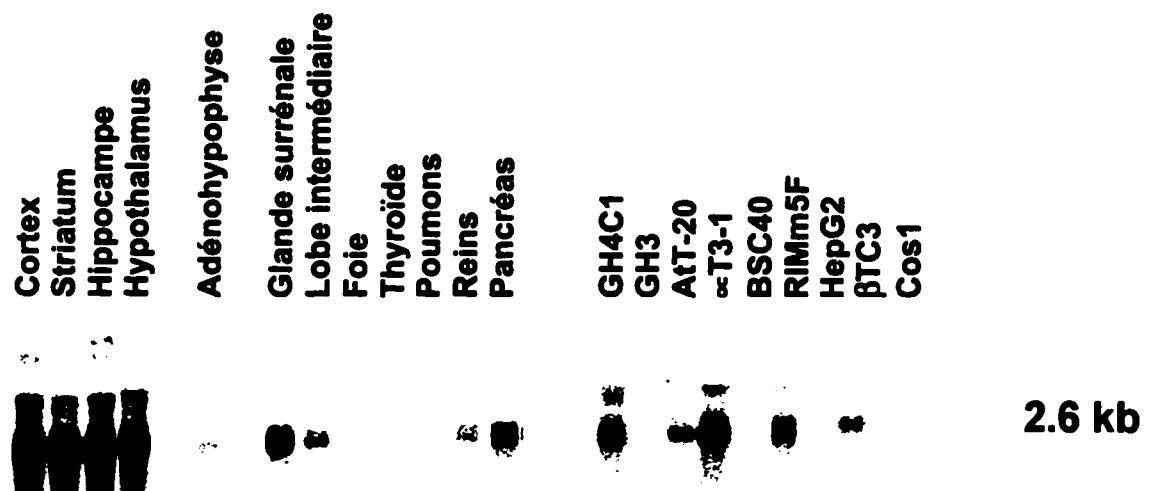
Le signal obtenu par la sonde nous a permis de déterminer la taille de l'ARN transcrit à partir du gène GAP1-5A. Cet ARN possède une taille d'environ 2.6kb.

### **3.1.2 Distribution cellulaire et tissulaire de GAP1-5A**

Étant donné que le gène identifié par PCR différentiel est exprimé à la hausse suite à la stimulation de cellules à l'AMPc et qu'avec une telle stimulation nous remarquons l'apparition de granules de sécrétion chez les cellules 6T3, nous avons voulu savoir au niveau de quels tissus ce gène était exprimé. Est-ce au niveau de tissus ayant des fonctions endocrines? En connaissant ainsi la distribution de l'expression du gène, nous pouvons être plus certain quant à la corrélation entre la surexpression de cet ADNc par l'AMPc et la formation de granules de sécrétion chez les cellules 6T3.

La figure 14 nous indique, par hybridation de type Northern, que GAP1-5A est fortement exprimé au niveau du système nerveux central (SNC) mais aussi retrouvé plus faiblement au niveau de d'autres tissus endocriniens tels que la glande surrénale, le pancréas et le rein. Nous avons aussi regardé l'expression de GAP1-5A dans diverses lignées cellulaires endocrines et non endocrines. Les lignées cellulaires utilisées sont: GH4C1 et GH3 (cellules somatotrophes provenant de l'hypophyse de rat), AtT-20 (cellules corticotrophes provenant de l'hypophyse de souris), RiMm5F (cellules produisant l'insuline dérivées d'un insulinome de rat), BSC40 (lignée cellulaire épithéliale de rein du singe vert africain ayant une voie de sécrétion constitutive seulement), Cos-1 (lignée cellulaire de rein du singe vert africain),  $\beta$ TC-3 (cellules





**Figure 14. Distribution tissulaire et cellulaire de Zis-SR.**

Buvarde de type Northern montrant la distribution tissulaire chez le rat de Zis-SR ainsi que la distribution cellulaire dans différentes lignées endocrines et non-endocrines de Zis-SR. L'ARNm total extrait des tissus et des diverses lignées cellulaires a été hybridé avec une sonde d'ARNc de Zis-SR marquée au  $^{32}\text{P}$ -UTP. La membrane a préalablement été colorée au bleu de bromophénol afin de s'assurer de la quantité équivalente d'ARN (5 $\mu\text{g}$ ) dans chaque puit.

provenant d'insulinome de souris), Hep G2 (hépatocytes provenant d'un carcinome humain),  $\alpha$ T3-1 (cellules gonadotrophes de souris). Sur la figure 14 l'hybridation de type Northern avec une sonde spécifique dirigée contre le gène GAP1-5A, nous montre que la distribution cellulaire se situe principalement au niveau de lignées cellulaires de type endocrine telles les lignées GH4C1, AtT-20,  $\alpha$ T3-1, RIMm5F et  $\beta$ TC-3. Il est surprenant de remarquer que la lignée cellulaire GH4C1 exprime une forte quantité de GAP1-5A comparativement à la lignée GH3 puisque ce sont 2 lignées somatotrophes de l'hypophyse de rat. Cependant, la lignée cellulaire GH4C1, un sous-clone de la lignée GH3, diffère au niveau de sa voie de sécrétion régulée (GORR, 1996).

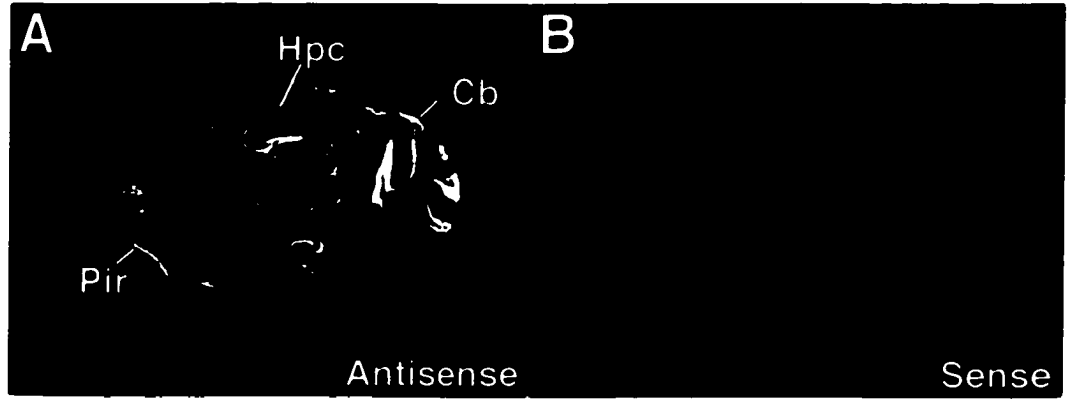
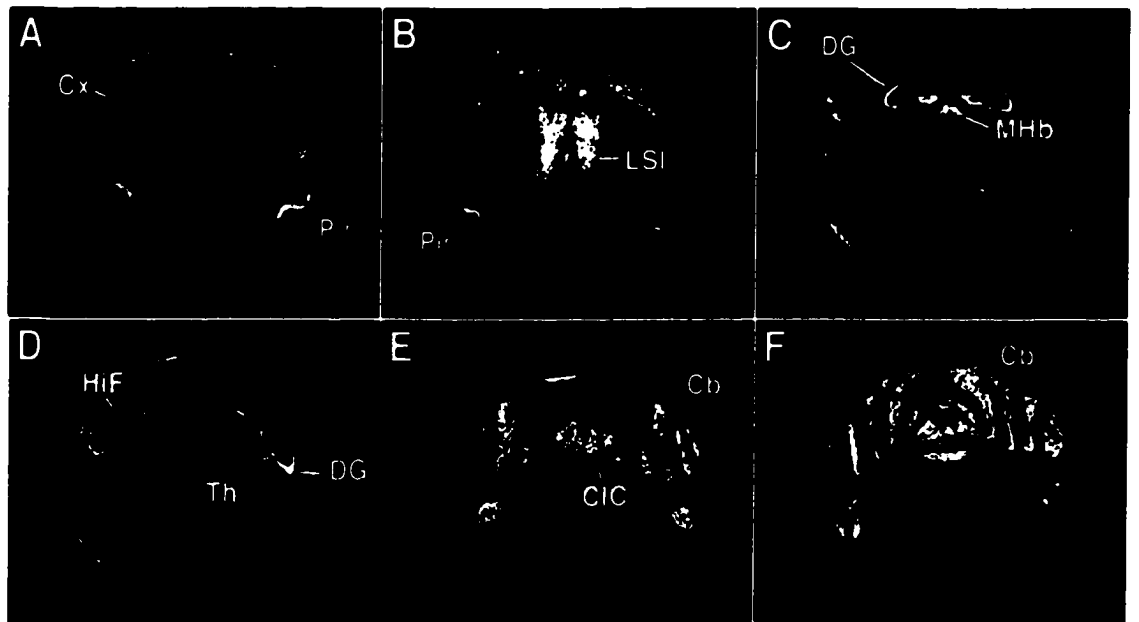
### **3.1.3 Localisation du gène GAP1-5A par hybridation *in situ***

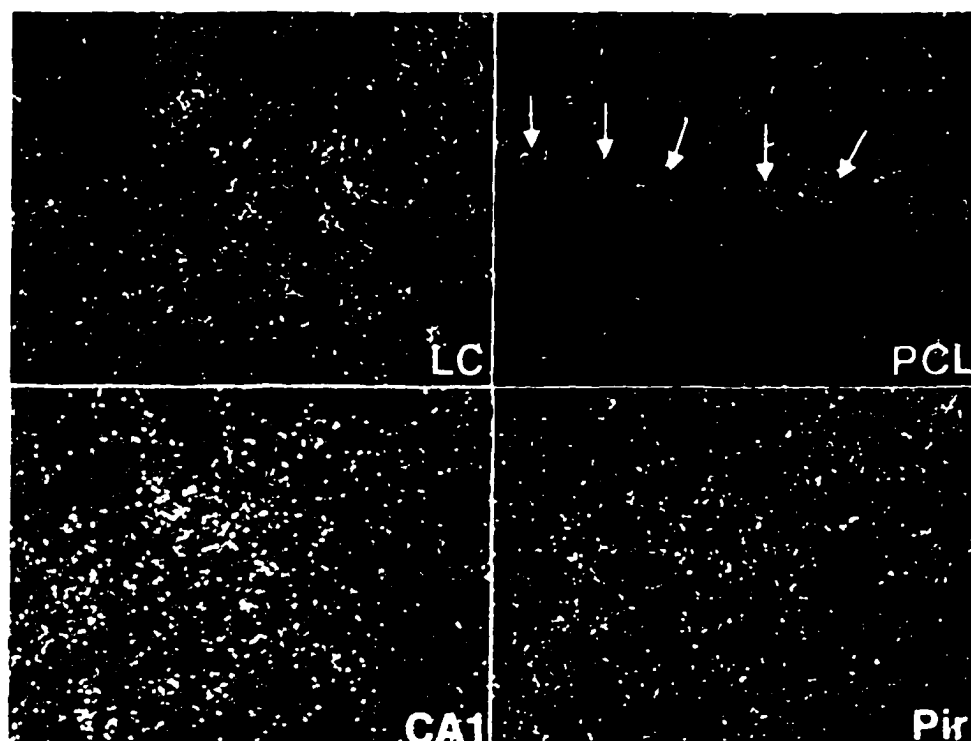
Les résultats précédents sur la distribution cellulaire et tissulaire de ce fragment isolé par PCR différentiel montrent une distribution à tendance neuroendocrine et endocrine. En effet, l'hybridation de type Northern à la figure 14 indique que ce gène est fortement exprimé dans diverses régions du cerveau. Afin poursuivre l'étude sur la distribution du gène GAP1-5A, nous avons localisé l'expression de ce gène par hybridation *in situ*. Par la synthèse d'une ribosonde synthétisée à partir du fragment isolé de GAP1-5A, l'hybridation *in situ* permettra de distinguer les régions dans lequel l'ARNm de GAP1-5A sera exprimé. Nous avons vérifié cette expression dans le cerveau de souris.

**Figure 15. Distribution de l'ARNm de Zis-SR exprimé dans le cerveau de souris.**

A) Coupe sagittale montrant la distribution par autoradiographie de Zis-SR dans le cerveau de souris. (A) Une sonde d'ARNc anti-sens marquée au  $^{33}\text{P}$  a été utilisée pour la détection de l'expression de Zis-SR dans le cerveau. (B) Coupe contrôle hybridée avec une sonde ARNc sens ne montrant pas de marquage positif. Abréviations: Cb, cerebellum (cervelet); Hpc, hippocampe; Pir, cortex piriforme.

B) Hybridation *in situ* montrant la distribution de l'ARNm de Zis-SR sur des coupes transversales de diverses régions du cerveau de souris. Abréviations: Cx, cortex; Pir, cortex piriforme; LSI, lateral septal nucleus; DG, dentate gyrus; MHb, medial habenular nucleus; HiF, fissure hippocampale; Th, thalamus; Cb, cerebellum (cervelet); CIC, colliculus.

**A)****B)**



**Figure 16. Distribution neuronale de Zis-SR.**

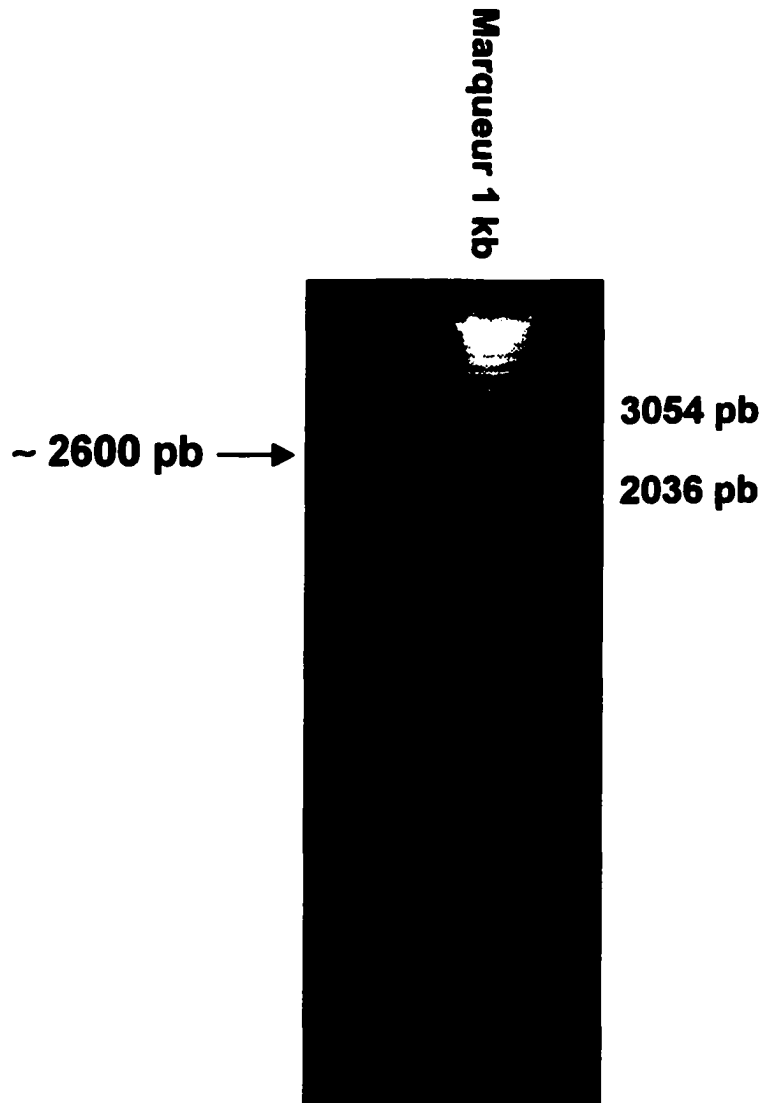
Coupe montrant la localisation cellulaire de Zis-SR dans diverses régions du cerveau de souris. Les coupes de tissus ont été trempées dans une émulsion radiographique pour pouvoir obtenir une résolution au niveau cellulaire. Les flèches montrent un exemple de neurones marqués. Les neurones ont été identifiés à l'aide d'une coloration au cresyl violet. Le grossissement est de 400X. Abréviations: LC, locus coeruleus; PCL, Purkinje cell layer; CA1, hippocampe; Pir, cortex piriforme.

Comme le démontre la figure 15, nous remarquons que l'ARNm de GAP1-5A est exprimé dans plusieurs régions du cerveau entre autre au niveau du cortex, du cortex piriforme, du cervelet, de l'hippocampe. De plus, nous pouvons aussi détecter un marquage au niveau neuronal prouvé par la figure 16. Le marquage est représenté par les points blancs. La coloration au crésyl violet permet de discriminer les neurones des cellules gliales. Cette coloration a été adaptée à l'hybridation *in situ* selon le protocole de Schäfer et Day (1994). Par le fait même, ce qui n'est pas coloré en violet sur ces coupes représente les cellules gliales (couleur brune) alors que les neurones sont visualisées par les structures violets. Par ces études de distribution, nous pouvons conclure que le gène GAP1-5A a une expression principalement neuroendocrinienne et endocrinienne ce qui rend ce gène intéressant pour la poursuite de cette étude.

## **3.2 CLONAGE ET SÉQUENCE DU GÈNE GAP1-5A**

### **3.2.1 Résultat obtenu suite au clonage par RACE**

À ce stade de l'étude, par la distribution de l'expression de GAP1-5A, nous pouvions déduire une forte corrélation entre la surexpression de ce gène isolé par PCR différentiel et la formation de granules de sécrétion chez les cellules 6T3 à la suite d'une stimulation à l'AMPc. Cependant, les résultats obtenus jusqu'à présent sur ce gène découlait uniquement du fragment de l'ADNc isolé suite au PCR différentiel. Pour poursuivre l'étude de ce gène, il était primordial pour nous de cloner ce gène afin d'obtenir la séquence complète en nucléotides.



**Figure 17. Résultat obtenu suite au RACE (Rapid Amplification cDNA Ends).**

Le produit obtenu après avoir complété le RACE PCR a été migré sur gel d'agarose 0,8% coloré au bromure d'éthidium.

Nous avons procédé au clonage par la méthode du RACE. Par cette méthode, nous pouvons amplifier le gène d'intérêt d'une banque d'ADNc de souris avec des amorces spécifiques synthétisées préalablement à partir de la séquence déjà connue du fragment de GAP1-5A obtenu par PCR différentiel. Un schéma explicatif de la méthode se retrouve dans la section Matériel et Méthode à la figure 11. Suite au RACE, nous avons obtenu une bande d'environ 2600 pb comme nous le montre la figure 17. La taille de l'ADNc correspond bien à celle identifiée auparavant par buvardage de type Northern (voir figure 13).

### **3.2.2 Séquence complète du gène GAP1-5A**

Suite à la méthode du RACE, nous obtenions l'ADNc complet du gène GAP1-5A. Après purification sur gel préparatif, nous avons cloné cet ADNc dans le vecteur pcRII-TOPO puis nous avons fait séquencer ce gène par la compagnie Amplicon. La séquence en nucléotides nous permettra de déduire la séquence de la protéine. En connaissant la séquence en acides aminés, il nous sera possible de déterminer approximativement la fonction de cette protéine par la présence de motif ou domaine particulier. De plus, nous allons pouvoir déterminer si le gène GAP1-5A a des homologies avec d'autres gènes déjà clonés auparavant. Par l'analyse de la séquence nous aurons plusieurs informations qui nous permettront de déterminer si ce gène peut être impliqué au niveau de la formation de granules de sécrétion dans la cellule.



aggtctgctgctggcgtccaag

**ATG** TCG ACC AAG AAT TTC CGA GTC AGT GAC GGG GAC TGG ATC TGC CCT GAC AAG AAG TGT  
 met ser thr lys asn phe arg val ser asp gly asp trp ile cys pro asp lys lys cys

GGA AAT GTA AAC TTT GCT AGG AGA ACC AGC TGT AAC AGA TGT GGT CGA GAA AAG ACA ACT  
gly asn val asn phe ala arg arg thr ser cys asn arg cys gly arg glu lys thr thr

GAG GCC AAG ATG ATG AAA GCT GGG GGA ACA GAA ATA GGA AAG ACA CTG GCA GAG AAG AGC  
 glu ala lys met met lys ala gly gly thr glu ile gly lys thr leu ala glu lys ser

CGG GGC TTA TTT AGT GCC AAT GAT TGG CAA TGC AAA ACT TGC AGT AAT GTG AAT TGG GCT  
 arg gly leu phe ser ala asn asp trp gln cys lys thr cys ser asn val asn trp ala

AGA AGA TCA GAG TGT AAC ATG TGT AAT ACT CCA AAG TAT GCT AAA TTA GAA GAA AGA ACA  
arg arg ser glu cys asn met cys asn thr pro lys tyr ala lys leu glu glu arg thr

GGA TAT GGA GGT GGT TTT AAT GAA AGA GAG AAT GTT GAA TAC ATA GAA AGA GAA GAA TCT  
 gly tyr gly gly gly phe asn glu arg glu asn val glu tyr ile glu arg glu glu ser

GAT GGG GAA TAT GAT GAG TTT GGA CGT AAA AAG AAA AAA TAC AGG GGG AAA GCA GTT GGC  
 asp gly glu tyr asp glu phe gly arg lys lys lys lys tyr arg gly lys ala val gly

CCT GCA TCT ATA TTA AAG GAA GTT GAA GAT AAA GAG TCA GAG GGA GAA GAA GAG GAT GAG  
 pro ala ser ile leu lys glu val glu asp lys glu ser glu gly glu glu glu asp glu

GAT GAA GAT CTA TCT AAG TAT AAG CTA GAT GAG GAC GAG GAT GAA GAT GAT GCT GAT CTC  
 asp glu asp leu ser lys tyr lys leu asp glu asp glu asp glu asp asp ala asp leu

TCA AAA TAT AAT CTT GAT GCC AGC GAA GAA GAA GAT AGT AAC AAA AAG AAA AGC AAT AGG  
 ser lys tyr asn leu asp ala ser glu glu glu asp ser asn lys lys lys ser asn arg

CGG AGC CGC TCA AAG TCA CGA TCG TCT CAC TCA AGG TCT TCA TCA CGC TCA TCC TCC CCC  
arg ser arg ser lys ser arg ser ser his ser arg ser ser ser arg ser ser ser pro

TCA AGT TCA AGG TCC AGG TCC AGG TCC CGT TCA AGA AGC TCT TCC AGT TCG CAG TCC AGG  
ser ser ser arg ser arg ser arg ser arg ser ser ser ser ser gln ser arg

TCT CAC TCC GGT TCC AGA GAA CAT TCC AGA TCC CGT GGT TCG AAA TCA AGA TCC AGC TCC  
ser his ser gly ser arg glu his ser arg ser arg gly ser lys ser arg ser ser ser

AGG TCC CAC AGG GGC TCT TCT TCC CCA AGA AAA AGA TCT TAT TCG AGT TCT TCG TCA TCT  
arg ser his arg gly ser ser ser pro arg lys arg ser tyr ser ser ser ser ser ser

CCT GAA AGA GAC AGG AAG AGG AGT CGC TCT AGA CCT TCT TCA CCA GCT GTT CGC AAA AAA  
pro glu arg asp arg lys arg ser arg ser arg pro ser ser pro ala val arg lys lys

AGA CGA ACG AGA TCA CGG TCA CCC GAA AGG CAC CAC AGG TCG TCC TCC GGA TCA ACA CAT  
arg arg thr arg ser arg ser pro glu arg his his arg ser ser ser gly ser thr his

TCT GGT TCC CGT TCA AGT TCA AAA AAG AAA **TAA**  
ser gly ser arg ser ser ser lys lys lys

tgtattaaatttacatctttaaaaaacattgagtagcagtgcatgaagcatatTTTTtaggaagttgatgtctcatttg  
 gtcagaagtactacatctgctagtagaggtgcatgcctttattgctttcAAAaacaatacaactggtttatttggta  
 actgaaagtaaattgcattttaagccatatactgttcccagataaatgctctgttcattattacaaccatttgcttc  
 atttaaaacatcctagcaataacagagtacttttgttccctactttaaatccttgccttttctatttctaaatgttcta  
 ttgacagagacagggttgctgggcttgctggacttcagacacatgggcaaagctaataagctagttggaattaccaa  
 tttatgttcatatggggttagtagtcaacctggttatgttatttacctctgccagtaatttcttaccagcagttaacta  
 cgttgcaaagctgacaactgggaacaagctgagggtgccttagaatcattgtctcttaacagctttacacctcttaag

caagaggattgtagaaattatagaagaaaaagggttaatcacatcatttcagaatgtttctcaaagttaagaaatgagg  
 atatccttttaccaaatcctagttaccaaattgtacttgatcgataaaggatttttaaaaaaggctaaatcatagtt  
 aatgagcaaatgagaagcgttttgaaacctgttctcagtgaggctgacagggacatgaatttaagtgaacattt  
 gccttgatgtctgatttgaacattgcagatacctaagtaacagaagaattcttatttctgcacaatttaagcaaaa  
 tcattttctccacatctgaaaaagaaaaccataggcttaaaatgctttggagttttatttctcaattaaaatctg  
 gtcacttgagatccattttgttctctggtttaaaggttaaagggttctcttaacagtctcttcagcagcaaaagcaa  
 ggtaagtataaagggacaacagttgtgctggggctccttgtaggggaattatatttctctgttctcctttagtattg  
 tctgctgcagtttaataagtaaaccttctaagatggttagtagacagatcaaacaaaatgttttattttaaagtga  
 gtgttctctctcaactgatctaaagatgaaaaaaaagtatcgtacgtagaaatattttggtaataattttacaagct  
 ttcctgtgtttttgtctattttccttgctgcatttactgtaggtgcacacgaactcttactctcttgaattgtg  
 cctcagacttctcgaagtcgacttctgagttgccagatctctagatccaacgtgttagccttggtttgttttgt  
 gcttctgtattttaaacttgaactgtactaggcaaatgcaagattataaatttagctaataggagtttacaacagtt  
 cagatgattatgatttgattggtttaaattgagctgtactagttcatttcataaggaaatgatactgtagacaaatgta  
**aataaaa**ccgtagtcaaaa

### Figure 18. Séquence ADN/protéine de Zis-SR

Les séquences nucléotidiques des extrémités 5' et 3' non codantes sont illustrées en lettre minuscule. À la fin de l'extrémité 3' non codante, le signal de poly-adénylation est montré en caractère gras souligné. Le codon de départ ainsi que le codon de terminaison sont en caractère gras. La partie soulignée en pointillé montre les motifs en doigt de zinc alors que la région soulignée d'un trait plein correspond au domaine SR de la protéine Zis-SR.

À la figure 18 nous pouvons voir la séquence complète en nucléotides. Cette séquence comprend 2615 nucléotides. La portion correspondante au fragment de l'ADNc GAP1-5A se retrouve telle que prévue dans la séquence complète en nucléotides que nous avons obtenue. Cette séquence qui sera transcrite en ARN donne un cadre de lecture ouvert correspondant à la séquence de 330 acides aminés montrée sur cette même figure.

### **3.2.3 Homologie de séquences avec celle de GAP1-5A**

Une fois la séquence de GAP1-5A obtenue, nous avons fait une recherche sur la banque de données GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) pour savoir s'il y avait des protéines homologues dont les séquences avaient déjà été clonées et repertoriées sur cette banque de donnée. Comme nous pouvons le voir à la figure 19, la séquence de GAP1-5A est semblable à la protéine Zis pour Zinc Finger Splicing retrouvée chez l'humain et le rat ainsi qu'à une autre protéine retrouvée chez la souris, ZFP265. Aussi, GAP1-5A a une homologie avec la protéine C4SR retrouvée chez la grenouille. Nous observons que les doigts de zinc sont conservés chez les 4 espèces ainsi que le signal de localisation nucléaire. Par contre, nous constatons une différence au niveau du domaine SR. La séquence de GAP1-5A que nous avons se trouve à avoir une plus forte homologie avec celle de grenouille. Nous remarquons que la région SR se poursuit jusqu'à la fin de la portion C-terminale de la protéine tout comme la séquence de C4SR alors que chez les séquences de Zis de rat et d'humain et ZFP265, la région SR se termine plus tôt. Effectivement, en regardant la séquence en nucléotides, nous nous

**Figure 19. Alignement de protéines homologues chez différentes espèces avec la séquence en protéine de Zis-SR.** mZfp265 est une protéine homologue retrouvée chez la souris (numéro d'accèsion GenBank AAF04474), hZis1 et hZis2 sont des protéines homologues retrouvées chez l'humain (GenBank AAD09746 et AAD09747), rZis (GenBank AAC02295) est l'homologue chez le rat, C4SR est une protéine homologue retrouvée chez la grenouille (GenBank CAA65321).

mZfp265 MSTKNFRVSDGDWICPDKKCGNVNFARRTSCNRCGREKTTEAKMMKAGGTEIGKTLAEKS  
 hZis1 MSTKNFRVSDGDWICPDKKCGNVNFARRTSCNRCGREKTTEAKMMKAGGTEIGKTLAEKS  
 rZis MSTKNFRVSDGDWICPDKKCGNVNFARRTSCNRCGREKTTEAKMMKAGGTEIGKTLAEKS  
 hZis2 MSTKNFRVSDGDWICPDKKCGNVNFARRTSCNRCGREKTTEAKMMKAGGTEIGKTLAEKS  
 hZpf265 MSTKNFRVSDGDWICPDKKCGNVNFARRTSCNRCGREKTTEAKMMKAGGTEIGKTLAEKS  
**mZis-SR MSTKNFRVSDGDWICPDKKCGNVNFARRTSCNRCGREKTTEAKMMKAGGTEIGKTLAEKS**  
 C4SR MSTKNFRVSDGDWICSDKKCGNVNFARRTSCNRCGREKTTEAKMMKAGGTEIGKTLAEKS  
 \*\*\*\*\* . \*\*\*\*\*

mZfp265 RGLFSANDWQCKTCSNVNWARRSECDCMNTPKYAKLEERTGYGGGFNERESVEYIEREES  
 hZis1 RGLFSANDWQCKTCSNVNWARRSECDCMNTPKYAKLEERTGYGGGFNERENVEYIEREES  
 rZis RGLFSANDWQCKTCSNVNWARRSECDCMNTPKYAKLEERTGYGGGFNERENVEYIEREES  
 hZis2 RGLFSANDWQCKTCSNVNWARRSECDCMNTPKYAKLEERTGYGGGFNERENVEYIEREES  
 hZpf265 RGLFSANDWQCKTCSNVNWARRSECDCMNTPKYAKLEERTGYGGGFNERENVEYIEREES  
**mZis-SR RGLFSANDWQCKTCSNVNWARRSECDCMNTPKYAKLEERTGYGGGFNERENVEYIEREES**  
 C4SR RGLFSANDWQCKTCGNVNWARRSECDCMNTPKYAKLEERTGYGGGFNERENVEYIERDES  
 \*\*\*\*\* . \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* . \*\*\*\*\*:\*

mZfp265 DGEYDEFGRKKKKYRGA VGPASILKEVEDKESEGE EDE-DEDLSKYKLEDE-DE-DE  
 hZis1 DGEYDEFGRKKKKYRGA VGPASILKEVEDKESEGE EDE-DEDLSKYKLEDE-DE-DE  
 rZis DGEYDEFGRKKKKYRGA VGPASILKEVEDKESEGE EDE-DEDLSKYKLEDE-DE-DE  
 hZis2 DGEYDEFGRKKKKYRGA VGPASILKEVEDKESEGE EDE-DEDLSKYKLEDE-DE-DE  
 hZpf265 DGEYDEFGRKKKKYRGA VGPASILKEVEDKESEGE EDE-DEDLSKYKLEDE-DE-DE  
**mZis-SR DGEYDEFGRKKKKYRGA VGPASILKEVEDKESEGE EDE-DEDLSKYKLEDE-DE-DE**  
 C4SR DGEYDEFGRKKKKYRGPVAPKSVSKGDE-KEGEAE EEEEDQDLSKYKLDDEEERKDE  
 \*\*\*\*\* . \* \* \* : \* \* \* . \* . \* . \* : \* \* : \* \* : \* \* \* \* \* \* \* \*

mZfp265 -----DDADLSKYNLDA SE EEDSNKKKSNRRSRSKSRSSHRSRSSRSPSSSRSR  
 hZis1 -----DDADLSKYNLDA SE EEDSNKKKSNRRSRSKSRSSHRSRSSRSPSSSRSR  
 rZis -----DDADLSKYNLDA SE EEDSNKKKSNRRSRSKSRSSHRSRSSRSPSSSRSR  
 hZis2 -----DDADLSKYNLDA SE EEDSNKKKSNRRSRSKSRSSHRSRSSRSPSSSRSR  
 hZpf265 -----DDADLSKYNLDA SE EEDSNKKKSNRRSRSKSRSSHRSRSSRSPSSSRSR  
**mZis-SR -----DDADLSKYNLDA SE EEDSNKKKSNRRSRSKSRSSHRSRSSRSPSSSRSR**  
 C4SR EDDDDDEEEDDGLSKYNLASEDEDDSKNKKSTRSSRSKSRSSHRSRSSRSPSSSRSR  
 \*\* . \*\*\*\*\* : . \* : \* : \* : \* . \* \*\*\*\*\* \* : : \* \* \* \*

mZfp265 SRSRSRSSSSSQSRSHSGSREHSRSGSKSRSSSRST-GALLPQEKDLI--RVLRHLLKE  
 hZis1 SRSRSRSSSSSQSRSRSSSRERSRSGSKSRSSSRST-GALLPHEKDLI--QVHLLLRLG  
 rZis SRSRSRSSSSSQSRSHSGSREHSRSGSKSRSSSRST-GALLPQEKDLT--RVLHLLKE  
 hZis2 SRSRSRSSSSSQSRSRSSSRERSRSGSKSRSSSRST-GALLPHEKDLI--QVHLLLRLG  
 hZpf265 SRSRSRSSSSSQSRSRSSSRERSRSGSKSRSSSRST-GALLPHEKDLI--QVHLLLRLG  
**mZis-SR SRSRSRSSSSSQSRSHSGSREHSRSGSKSRSSSRSHRGSSSPKRYSY--SSSSSPERD**  
 C4SR SRSRSRSSSSSKS----SSRGHSRSPGSKSRSSSRSHRGSSSPKRYSYSSRSSSSPERG  
 \*\*\*\*\* : \* . \* : \* \* \* \*\*\*\*\* \* : \* : \* . :

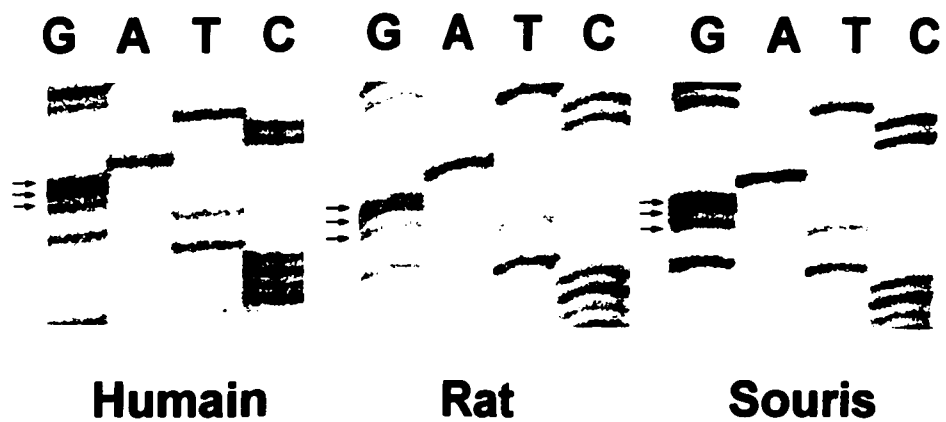
mZfp265 TGRGVALDLLHQLFAKKDERD---HGHPKGTTRPPDQPI LVPVQV-----  
 hZis1 TEREVVLDDLHLVI AKKDEQD---HGHPKDATGHHLDPILV PVQVQKRNNVLKFTS  
 rZis TGRGVALDLLHQLFAKKDERD---HGHPKGTTRGLRINPFWF PFKKEIMY----  
 hZis2 TEREVVLDDLHLVI AKKDEQD---HGHPKAR-----  
 hZpf265 TEREVVLDDLHLVI AKKDEQD---HGHPKAR-----  
**mZis-SR RKRSRSRSSPAVKKKSRSRSSSRHRS SSGS--THSGSRSSSKK--**  
 C4SR KRSRSRSSS-GDKKSRSRSSSRHRS SSGS--SHSGSRSSSKKON-----  
 \* : : . :

sommes rendus compte que les séquences publiées chez le rat, l'humain et la souris avaient 1 nucléotide en moins à la position 809. Par conséquent, le cadre de lecture est changé au niveau de la région SR chez ces espèces.

En regardant les séquences homologues à celle de GAP1-5A, nous avons décidé de changer l'appellation du gène que nous avons cloné. Dorénavant, le gène GAP1-5A se nommera Zis-SR. «Zis» est dû à l'homologie entre notre séquence et celles de Zis de rat et d'humain déjà répertoriées. Alors que «SR» provient de la différence dans la région SR en C-terminal de la protéine. La région SR de la protéine que nous avons se trouve à être plus longue que celles retrouvée chez le Zis de rat, d'humain et que ZFP265 chez la souris.

#### **3.2.4 Séquençage de la région où se produit le changement dans le cadre de lecture**

Les séquences de Zis chez le rat et l'humain ainsi que la séquence de ZFP265 chez la souris sont identiques alors que nous avons une séquence murine qui s'apparente plus à la séquence de C4SR chez la grenouille. Étant donné cette différence, nous voulions être certain de la séquence que nous avons obtenue. Pour ce faire, nous avons amplifié par PCR la région où le changement dans le cadre de lecture se produisait chez l'humain et la souris et procédé au séquençage de cette région.



**Figure 20. Séquence montrant le changement dans le cadre de lecture dans la région du domain SR chez l'humain, le rat et la souris.**

La région entre 535pb-884pb du gène Zis-SR a été amplifiée par PCR puis sous-clonée dans le vecteur pcRII-TOPO. Le séquençage de ce fragment s'est fait selon le protocole décrit dans la section Méthodes.

La figure 20, nous montre la séquence en nucléotides de cette région chez le rat, l'humain et la souris. Nous pouvons voir que les séquences chez ces 3 espèces sont identiques (CCCCTGTGGGACCT). Le nucléotide omis dans la séquence publiée chez le rat et l'humain est donc présent dans la séquence amplifiée par PCR.

### **3.2.5 Analyse de la séquence Zis-SR**

En N-terminal, nous remarquons dans la séquence la présence de 2 motifs en doigt de zinc. On retrouve ce domaine chez plusieurs protéines dont des facteurs de transcription, des récepteurs d'hormones, etc... Ce domaine serait responsable de la liaison de protéines aux acides nucléiques. Le motif particulier retrouvé dans la protéine GAP1-5A est aussi retrouvé chez différentes protéines répertoriées dans le GeneBank. La figure 21 montre une série de différentes protéines ayant la même séquence consensus (D W X C X<sub>4</sub> C X<sub>n</sub> N X<sub>6</sub> C X<sub>2</sub> C) du motif en doigt de zinc que la protéine GAP1-5A. Cette séquence consensus rassemblerait une nouvelle famille de protéines ayant possiblement comme rôle de lier les acides nucléiques.

La protéine GAP1-5A comporte aussi une région riche en sérine et en arginine (domaine SR) dans sa portion C-terminale. Cette région est une caractéristique principale des protéines impliquées dans l'épissage des pré-ARN messagers. En comparant différentes protéines impliquées dans l'épissage (figure 22), nous pouvons dire que GAP1-5A s'apparente à ces protéines de par sa région SR. Par contre, elle



diffère de ces protéines par ses domaines de liaison aux acides nucléiques. GAP1-5A possède 2 motifs en doigt de zinc à la place des motifs RRM (Recognition RNA Motif).

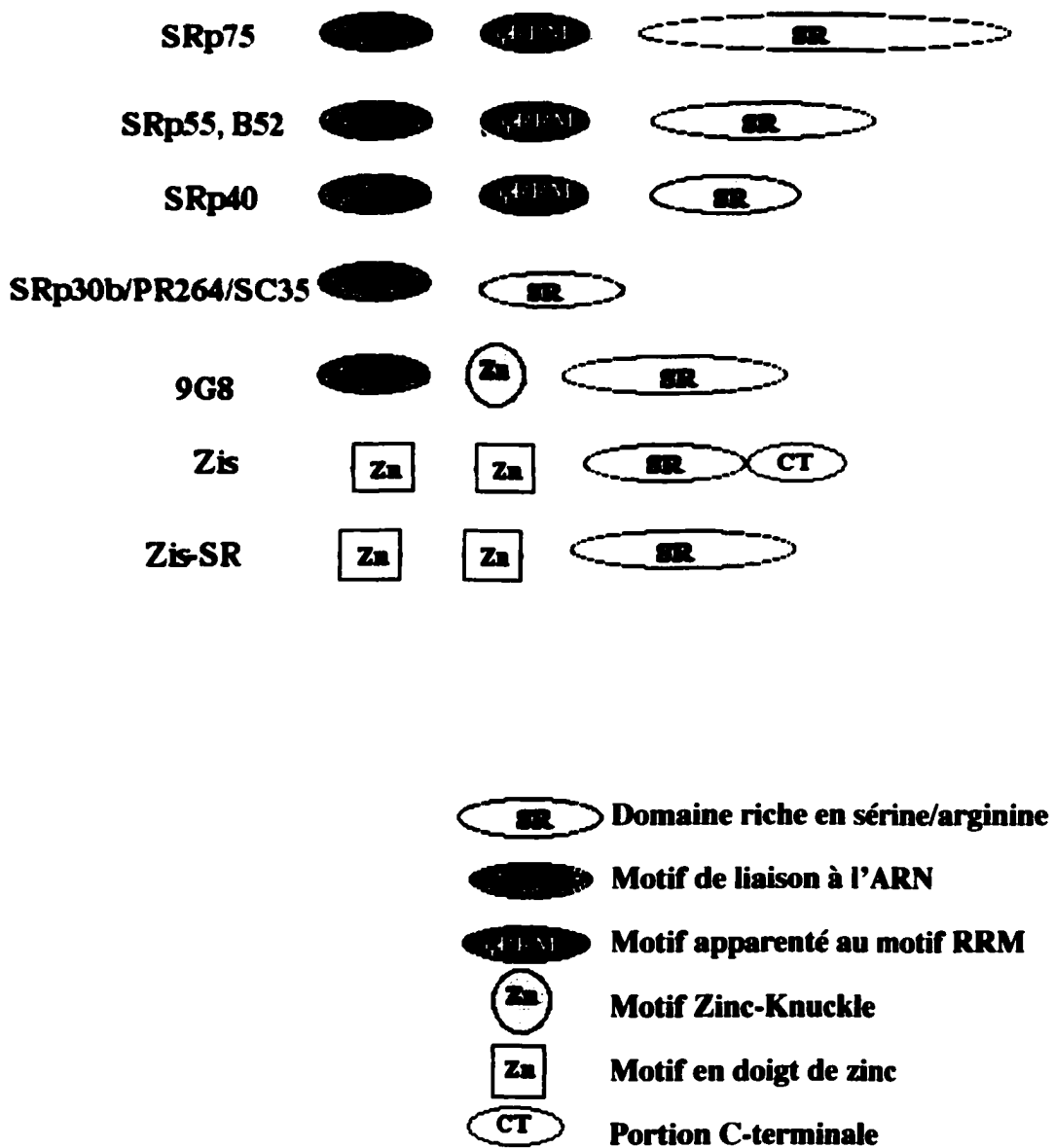
De plus, nous pouvons voir à la figure 18 que la protéine GAP1-5A possède aussi un signal de localisation nucléaire montré dans l'encadré. Cette séquence signal est composée de plusieurs acides aminés basiques et permet de diriger la protéine nouvellement synthétisée vers le noyau. La protéine GAP1-5A pourrait exercer un rôle au niveau du noyau cellulaire. Cependant, nous n'avons pas effectué d'expériences d'immunofluorescence pour prouver la localisation de GAP1-5A au niveau nucléaire.

En analysant les motifs et domaines particuliers retrouvés dans la séquence que nous avons cloné et en comparant l'homologie de cette séquence avec celles de d'autres espèces, nous pouvons donner un rôle potentiel à la protéine Zis-SR. Cette protéine pourrait être impliquée dans l'épissage des pré-ARNm car elle possède une région SR qui est une caractéristique commune des protéines d'épissage. De plus, les 2 motifs en doigts de zinc de cette protéine permettrait l'interaction avec l'ARN. Ces motifs particuliers retrouvés chez certaines protéines (comme des facteurs de transcription) sont reconnus pour être responsable de la liaison de celles-ci aux acides nucléiques. Aussi, la présence d'un signal de localisation nucléaire peut indiquer que la protéine Zis-SR a un rôle au niveau nucléaire.

<b>A thal -1</b>	- MGDGR	EGDWE	CLG --	CRNRNYA	FRSFC	NRK	CKQR
<b>A thal -2</b>	SKWLPR	IGDWI	CTG --	CTNNNYA	SREK	CKK	CGQSK
<b>C 4SR -2</b>	SRGLFS	ANDWQ	CKT --	CGNVN	WARRSE	CNMC	NTPK
<b>mZis -2</b>	SRGLFS	ANDWQ	CKT --	CSNVN	WARRSE	CNMC	NTPK
<b>Spombehyp -1</b>	SKNRPR	PGDWN	CPM --	CGFSN	FQRRTS	CFRC	SFPG
<b>ARP -1</b>	SKNKPR	PGDWN	CPS --	CGFSN	FQRRTA	CFRC	SFPA
<b>C 4SR -1</b>	KNFRVSD	GDWIC	SDKK	CGNVN	FARRTS	CNRC	G---
<b>mZis -1</b>	KNFRVSD	GDWIC	PDKK	CGNVN	FARRTS	CNRC	GR--
<b>EWS</b>	GNVQHRA	GDWQC	PNPG	CGNQNF	AWRTEC	CNQ	CKA--
<b>Spombehyp -2</b>	GNVPRFA	GDWKC	GSEG	CGYHNF	AKNVC	CLRC	GGA--
<b>ARP -2</b>	SNMPRFA	GDWKC	ST--	CTYHNF	AKNVV	CLRC	GQPK

**Figure 21. Alignement du motif en doigt de zinc de Zis-SR (mZis-1 et mZis-2) avec d'autres protéines ayant le même motif.**

Le motif consensus DWXCX<sub>4</sub>CX<sub>n</sub>NX<sub>6</sub>CX<sub>2</sub>C est retrouvé chez des protéines répertoriées sur le GenBank. Athal-1 et Athal-2 sont des protéines hypothétiques retrouvés chez *Arabidopsis thaliana* (GenBank AC003952). C4SR-1 et C4SR-2 sont des protéines liant l'ARN chez *Xenopus leavis* (GenBank X96469). Spombehyp-1 et -2 sont des protéines hypothétiques retrouvées chez *Schizosaccharomyces pombe* (GenBank Z98597). ARP-1 et ARP-2 sont des protéines hypothétiques chez *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank Z67750). EWS est une onco-protéine humaine (GenBank X79233)



**Figure 22. Représentation schématique de différentes protéines ayant un domaine SR.** Tirée de CHABOT, 1996.

### **3.3 ÉTUDE DU GÈNE ZIS-SR PAR L'APPROCHE ANTI-SENS**

La formation des granules de sécrétion dans la cellule est un processus hautement régulé et comporte plusieurs événements comme entre autre la synthèse de nouvelles protéines. La séquence de la protéine Zis-SR suggère que cette protéine est impliquée dans l'épissage des ARN. Il se peut donc que Zis-SR fasse partie de la cascade d'évènements menant à la formation des granules. Dans le but de déterminer la fonction du gène Zis-SR nous avons opté pour l'approche anti-sens. Cette approche consiste à diminuer le taux de synthèse d'une protéine spécifique en bloquant son ARNm. L'ARN anti-sens s'appariera avec son ARN complémentaire pour former un complexe diminuant ainsi le niveau d'ARNm dans la cellule. Si nous ciblons le codon d'initiation avec une séquence anti-sens, les ribosomes ne pourraient plus se lier évitant ainsi la traduction. Pour exprimer l'anti-sens deux méthodes sont utilisées: 1) en utilisant des oligonucléotides anti-sens d'habituellement 15-20 mer. 2) en clonant la séquence ADNc dans l'orientation anti-sens dans un système d'expression.

#### **3.3.1 Oligonucléotides anti-sens**

L'approche anti-sens avec l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens s'avèrait être la méthode la plus rapide pour bloquer l'expression du Zis-SR. Étant donné que nous connaissions déjà la séquence complète, il ne restait qu'à faire synthétiser une série d'oligonucléotides anti-sens (voir tableau I, p. 36) et de procéder à la transfection de ces oligos dans les cellules. Les oligonucléotides ne sont pas très stables en culture donc

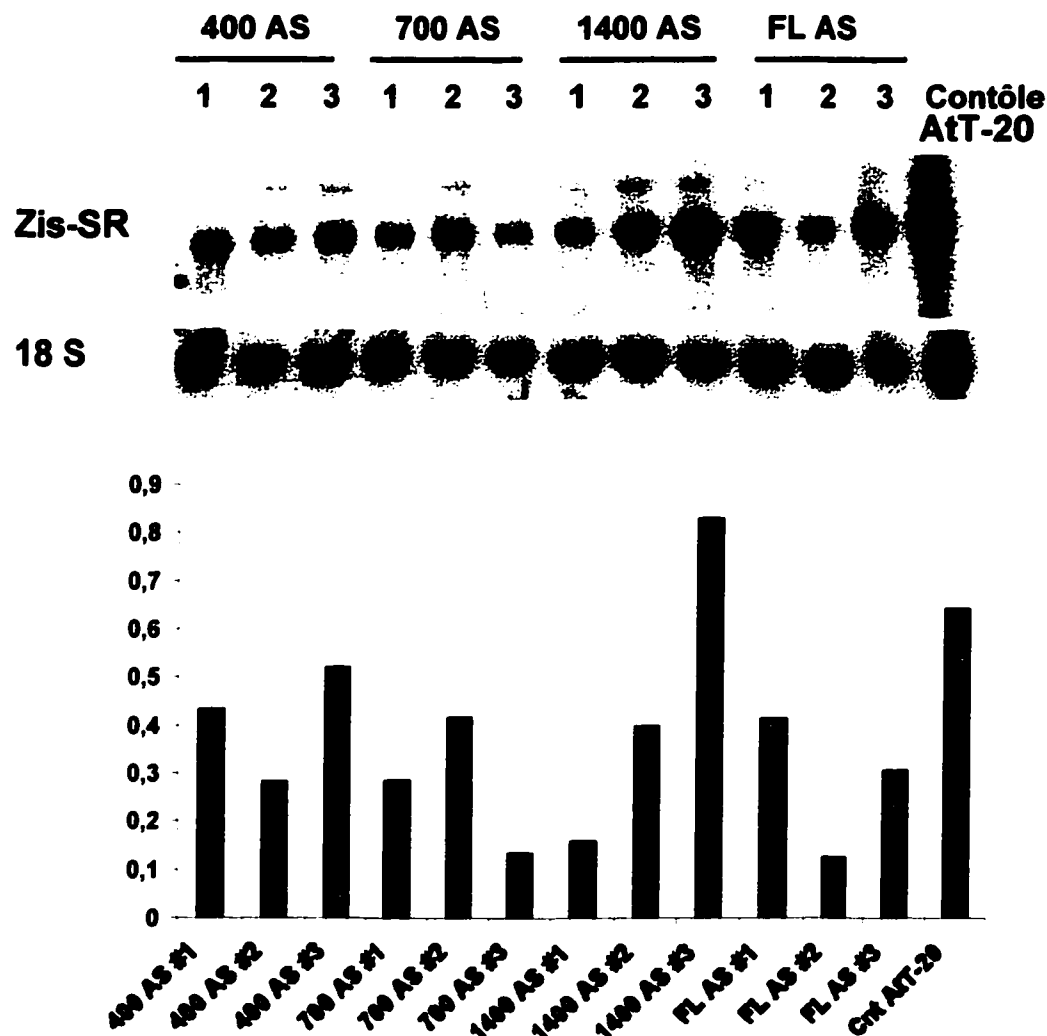
nous avons fait synthétisé des oligos modifiés chimiquement, nommés phosphorothionates. Ces oligos sont plus stables en milieu de culture et pénètrent dans la cellule plus rapidement (MAINS, 1995).

Après transfection des oligos avec la lipofectAMINE™, l'ARN total des cellules a été extrait pour détecter par buvardage de type Northern l'expression du Zis-SR. Cependant, après avoir répété l'expérience plusieurs fois, nous n'avons pas réussi à obtenir des résultats reproductibles (résultats non montrés). À chaque expérience, les cellules ont été transfectées en duplicatas avec les 9 oligos anti-sens. En faisant le dosage de l'expression du Zis-SR par densitométrie, il y avait une grande variabilité entre les duplicatas pour chacun des oligos. De plus, d'une expérience à l'autre, les résultats d'expression du Zis-SR étaient différents et ce en comparant avec le même oligo. Parfois, il était même difficile d'observer une diminution de l'expression de Zis-SR pour une même transfection malgré le fait que les conditions de transfection avaient été optimisées. Par cette méthode, lorsque les résultats s'avéraient reproductibles, une diminution de l'expression de l'ARNm de 20-30% a été le meilleur rendement obtenu. Étant donné la difficulté à obtenir des résultats reproductibles et la faible diminution de l'expression de l'ARN par cette méthode, nous nous sommes dirigés vers une autre méthode, celle d'exprimer l'anti-sens à l'aide d'un vecteur d'expression.

### **3.3.2 Expression du Zis-SR suite à l'expression des anti-sens par le vecteur d'expression pcDNA3.1**

L'expression d'anti-sens par un système d'expression comporte un avantage important: il permet de créer des lignées cellulaires stables utilisées pour une série d'expériences afin d'étudier les effets de l'anti-sens chez la cellule. Par contre, cette méthode est plus longue car elle exige la sélection des lignées clonales. De plus, il faut procéder au criblage de ces lignées stables pour l'obtention d'une lignée avec la meilleure diminution dans le taux d'expression du gène d'intérêt. Nous avons donc sous-cloné dans l'orientation anti-sens différents fragments dans le vecteur d'expression pcDNA3.1. Par la suite, il s'agissait de transfecter ce vecteur dans les cellules AtT-20 et 6T3 jusqu'à l'obtention de lignées stables.

La figure 23 nous montre un buvardage de type Northern réalisé avec une sonde d'ARNc radioactive contre Zis-SR pour ainsi détecter la diminution de l'expression de ce gène chez différentes lignées clonales de cellules AtT-20. Une sonde d'ARNc radioactive dirigée contre l'ARN ribosomal 18S a aussi été hybridée sur la même membrane afin de comparer la quantité d'ARN mise sur gel pour chacun des échantillons. Nous pouvons ensuite analyser par densitométrie le niveau d'expression du Zis-SR en tenant compte de la quantité d'ARN mis sur gel. Le graphique sur cette figure représente l'expression du Zis-SR chez les différentes lignées clonales normalisée avec le 18 S. Nous remarquons que la plupart des clones ont une expression de Zis-SR diminué suite à l'expression des anti-sens en comparant avec le contrôle, soit les cellules



**Figure 23. Effets des anti-sens sur l'expression en ARNm du gène Zis-SR.**

Buvardage de type Northern réalisé avec une sonde d'ARNc marquée au  $^{32}\text{P}$ -UTP dirigée contre Zis-SR. Une sonde d'ARNc radioactive dirigée contre l'ARN ribosomal 18S a aussi été hybridée sur la même membrane. Le graphique sur cette figure représente l'expression du Zis-SR chez les différentes lignées clonales normalisé avec le 18S. Ceci a été effectué par densitométrie à l'aide du programme Scion Image 1.62A.

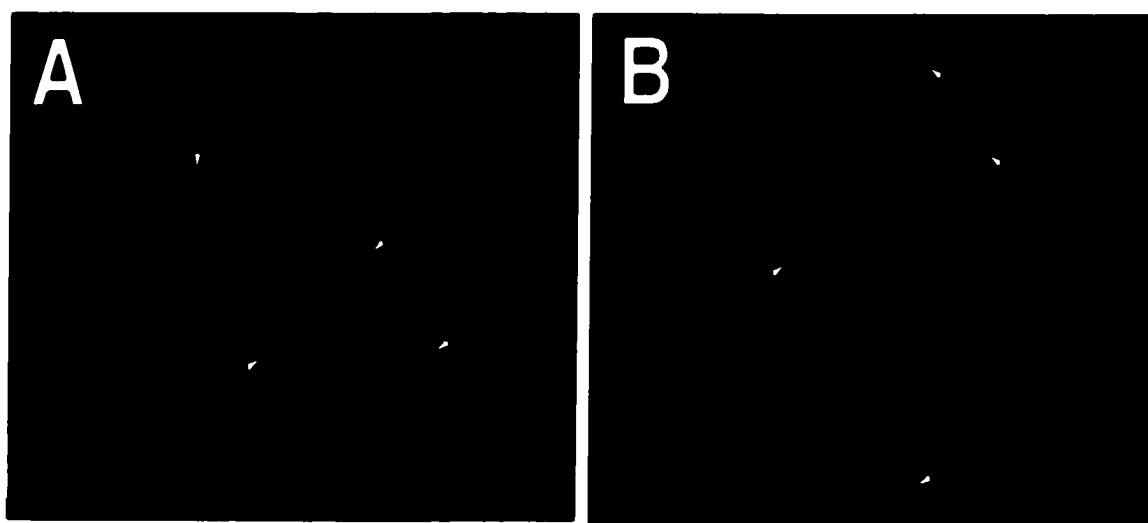
AtT-20 non transfectées. Les lignées clonales qui ont particulièrement attiré notre attention ont été la lignée #3 transfecté avec la construction de 700pb (700 AS #3), la lignée #1 transfecté avec la construction de 1400pb (1400 AS #1). Nous constatons qu'avec la lignée 700 AS #3, l'expression du Zis-SR est descendu à environ 20% par rapport au contrôle (100%). La lignée 1400 AS #1 exprime aussi le Zis-SR à approximativement 22%. L'expression de l'ARN a donc chuté d'environ 80% chez ces 2 lignées clonales. La lignée clonale #2 exprimant l'anti-sens du gène complet (FL AS #2) dénote aussi une expression diminuée de 80%. La variation dans le niveau d'expression de Zis-SR chez les 3 clones de chaque transfection pourrait provenir du nombre variable de copies de vecteur incorporé dans les cellules transfectées. Puisque que l'ARN double-brin dans une cellule déclenche la réponse à l'interféron et que cette réponse affecte l'expression des gènes de façon générale, il est bon de vérifier l'expression d'un autre gène. Ceci permet d'éliminer la possibilité que l'effet observé ne soit que clonal. La figure 25 montre que le niveau d'expression de la CPE reste inchangé chez les lignées 700 AS #1, 700 AS #3 et 1400 AS #1. Comme il est difficile d'obtenir une expression diminuée à 100% avec cette approche, nous avons donc poursuivi l'étude dans le but d'investiguer la fonction du gène Zis-SR avec les lignées clonales suivantes: 700 AS #3, 1400 AS #1.



### **3.3.3 Effet sur la carboxypeptidase E (CPE) chez la lignée clonale AtT-20/700 AS #3 en immunofluorescence.**

Après avoir détecté une diminution de l'expression de l'ARN du gène Zis-SR chez certaines lignées clonales (AtT-20/700 AS #3, AtT-20/1400 AS #1), nous voulions déterminer si une telle diminution affectait la formation des granules de sécrétion chez la cellule AtT-20. Nous avons donc testé plusieurs marqueurs caractéristiques de la voie de sécrétion régulée par immunofluorescence sur la lignée clonale 700 AS #3. Dépendamment de la qualité des anticorps, de la sensibilité de la détection de ces anticorps, de la maturation de la protéine vers laquelle l'anticorps est dirigé, de la compartimentalisation de la protéine, on ne peut comparer de façon égale les différents marqueurs utilisés. Les marqueurs utilisés ont été la  $\beta$ -endorphine et l'ACTH qui sont des produits de maturation de la POMC localisés dans les granules de sécrétion, les convertases SPC3 et SPC2 retrouvées principalement dans la voie de sécrétion régulée, ainsi que la chromogranine A et chromogranine B, protéines de la famille des granines faisant partie de la composition des granules de sécrétion. Le marqueur qui a attiré plus particulièrement notre attention a été l'anticorps dirigé contre la CPE, une enzyme de maturation retrouvé dans les granules de sécrétion.

La figure 24 nous montre une immunofluorescence faite sur les cellules AtT-20 (A) et les cellules de la lignée AtT-20/700 AS #3 (B) utilisant la CPE comme anticorps primaire. Cet anticorps est dirigé contre la portion C-terminale de la protéine. La CPE a été visualisée à l'aide d'un anticorps anti-IgG de lapin couplé au FITC. Nous



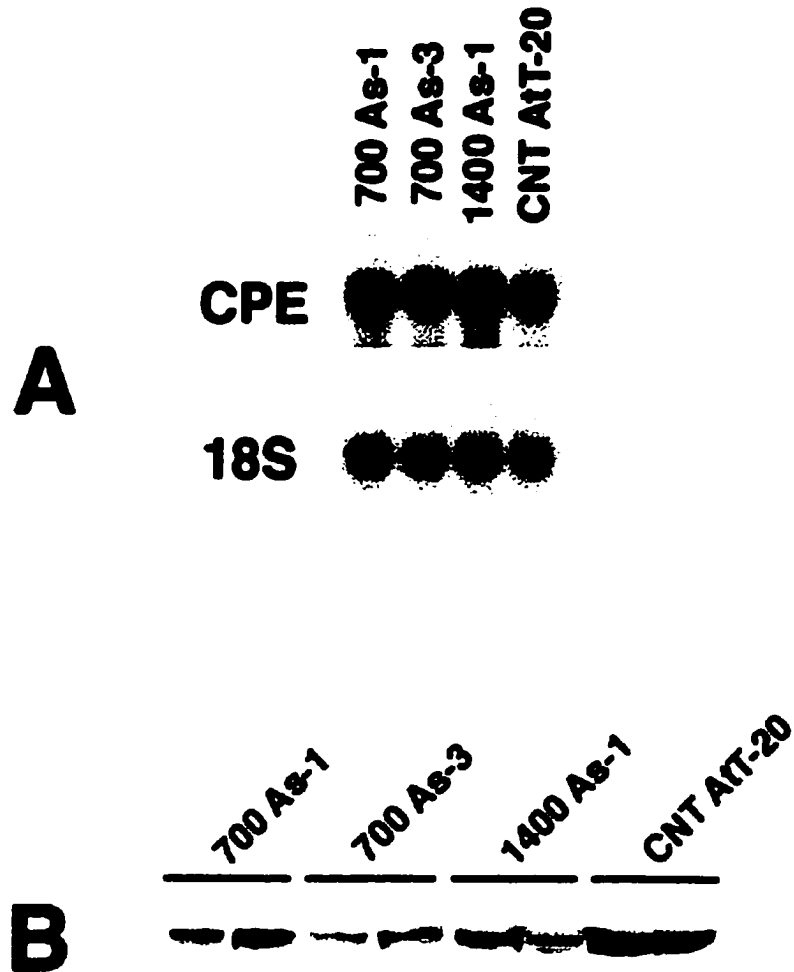
**Figure 24. Immunofluorescence montrant l'effet de l'anti-sens chez la lignée clonale 700 AS #3.**

Ceci a été fait sur les cellules AtT-20 (A) et les cellules de la lignée AtT-20/700AS #3 (B) utilisant l'anticorps primaire anti-CPE. Cet anticorps est dirigé contre la portion C-terminale de la protéine. La détection de l'anticorps primaire s'est fait à l'aide d'un anticorps anti-IgG de lapin couplé au FITC. Les flèches blanches en (A) montrent le marquage de la CPE au niveau des extensions cellulaires. En (B), chez la lignée 700AS #3, nous ne pouvons pas détecter de marquage dans ces extensions.

remarquons que chez la lignée AtT-20 nous obtenons un marquage de la CPE concentré plus particulièrement aux extrémités de la cellule. Par contre, chez la lignée clonale 700 AS #3, nous n'obtenons plus ce marquage au niveau des extensions cellulaires. L'anti-sens exprimé a donc eu un effet significatif sur la CPE, probablement au niveau des granules de sécrétion. Nous avons aussi obtenu des résultats comparables à ceux obtenus avec la CPE avec d'autres marqueurs comme la  $\beta$ -Endorphine, la chromogranine B et SPC3 (résultats non montrés).

### **3.3.4 Expression de l'ARNm de la CPE et contenu cellulaire en CPE chez la lignée clonale AtT-20/700 AS #3**

Suite à la baisse d'immunoréactivité à la CPE chez la lignée clonale AtT-20/700 AS #3, nous voulions vérifier s'il y avait des changements au niveau de l'expression de l'ARNm de la CPE et au niveau du contenu cellulaire de la protéine CPE chez la lignée clonale AtT-20/700 AS #3 mais aussi chez les lignées 700 AS #1 et 1400 AS #1 à titre de comparaison. Le buvardage de type Northern en A à la figure 25 nous indique que le niveau d'ARNm de la CPE est le même chez les cellules AtT-20 utilisées comme contrôle que chez les cellules des différentes lignées clonales anti-sens. Donc, l'anti-sens de Zis-SR n'affecte pas le niveau d'expression d'ARNm de la CPE. Par contre, en B de cette même figure, nous pouvons détecter une diminution dans le contenu cellulaire en CPE chez ces différentes lignées clonales anti-sens comme nous le montre le buvardage de type Western. Cette diminution est plus marquée chez la lignée clonale



**Figure 25. Analyse de différentes lignées clonales anti-sens au niveau de l'expression l'ARNm de la CPE et au niveau de la protéine CPE.**

En A, buvardage de type Northern montrant l'expression de l'ARNm de la CPE chez différentes lignées clonales AtT-20 anti-sens (700 AS #3, 700 AS #1 et 1400 AS #1). Le contrôle dans cette expérience est l'ARN extrait des cellules AtT-20. La membrane a aussi été hybridée avec la sonde d'ARNc 18S marquée au  $^{32}\text{P}$ -UTP. En B, buvardage de type Western montrant le contenu cellulaire en CPE chez les mêmes lignées clonales AtT-20 (en duplicata).

AtT-20/700 AS #3. Ce résultat semble concorder avec le résultat obtenu en immunofluorescence (figure 24).

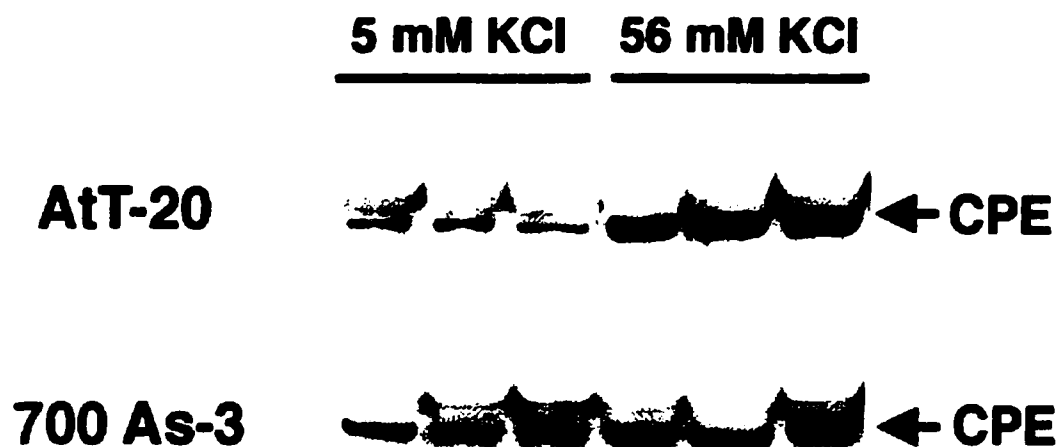
Il est un peu surprenant de voir que le niveau d'ARNm est le même chez les lignées clonales anti-sens alors que le contenu en CPE est diminué chez ces mêmes lignées. En immunofluorescence, avec la lignée clonale AtT-20/700 AS #3, il semblait tout de même y avoir un marquage périnucléaire important avec l'anticorps CPE alors que les extensions cellulaires ne montraient peu ou pas de marquage. Ceci peut indiquer que le transport, la stabilité, le stockage ou la relâche de la CPE semble être défectueux.

### **3.3.5 Sécrétion de la CPE chez la lignée clonale AtT-20/700 AS #3**

Jusqu'à présent, les résultats obtenus avec les lignées clonales anti-sens indiquent que l'expression de l'anti-sens de Zis-SR semble avoir un effet important sur la CPE. En effet, nous remarquons une diminution du contenu cellulaire en CPE chez la lignée clonale anti-sens. La CPE étant une protéine importante du granule de sécrétion, ceci suggère que la voie de sécrétion régulée chez la lignée cellulaire AtT-20/700 AS #3 est peut-être défectueuse. Nous avons donc regardé ce qui se passait au niveau de la sécrétion de cette carboxypeptidase suite à une stimulation de 30 minutes des cellules avec du KCl à une concentration de 56 mM. Ce traitement provoque une dépolarisation des cellules permettant ainsi la fusion des granules de sécrétion à la membrane pour relâcher leur contenu. De plus, par cette brève dépolarisation avec le KCl seulement le matériel stocké dans les granules sera relâché. Cette expérience permet de distinguer si

la CPE sera relâchée de façon régulée ou constitutive chez la lignée clonale anti-sens AtT-20/700 AS #3.

La figure 26 montre un buvardage de type Western réalisé avec l'anticorps anti-CPE sur les milieux récoltés (en triplicata) contenant les protéines sécrétées suite à la stimulation des cellules au KCl. Chez les cellules AtT-20, nous constatons que la sécrétion de la CPE s'effectue par la voie régulée car suite à la stimulation au KCl (56 mM) il y a une forte relâche de CPE. Cependant, il y a tout de même une relâche de CPE chez les cellules n'ayant pas été stimulée au KCl (5 mM). Ceci nous porte à croire qu'il y a néanmoins un taux basal de relâche de la CPE par la voie de sécrétion constitutive. Par contre, chez la lignée clonale AtT-20/700 AS #3 la sécrétion se comporte différemment. Sans stimulation au KCl il y a tout de même une quantité assez importante de CPE qui est sécrétée dans le milieu de culture comparativement aux cellules AtT-20. Lorsque les cellules sont mises en présence de la solution de Krebs avec une concentration de 56 mM KCl, il n'y a pas d'augmentation significative de CPE relâché dans le milieu. La voie de sécrétion régulée chez cette lignée clonale semble défectueuse puisque la quantité sécrétée est pratiquement égale sans stimulation ou avec stimulation. Cette expérience semble démontrer que la voie constitutive est majoritairement empruntée chez la lignée clonale AtT-20/700 AS #3.



**Figure 26. Buvarbage de type Western sur la sécrétion de CPE chez les cellules AtT-20 et AtT-20/700 AS #3.**

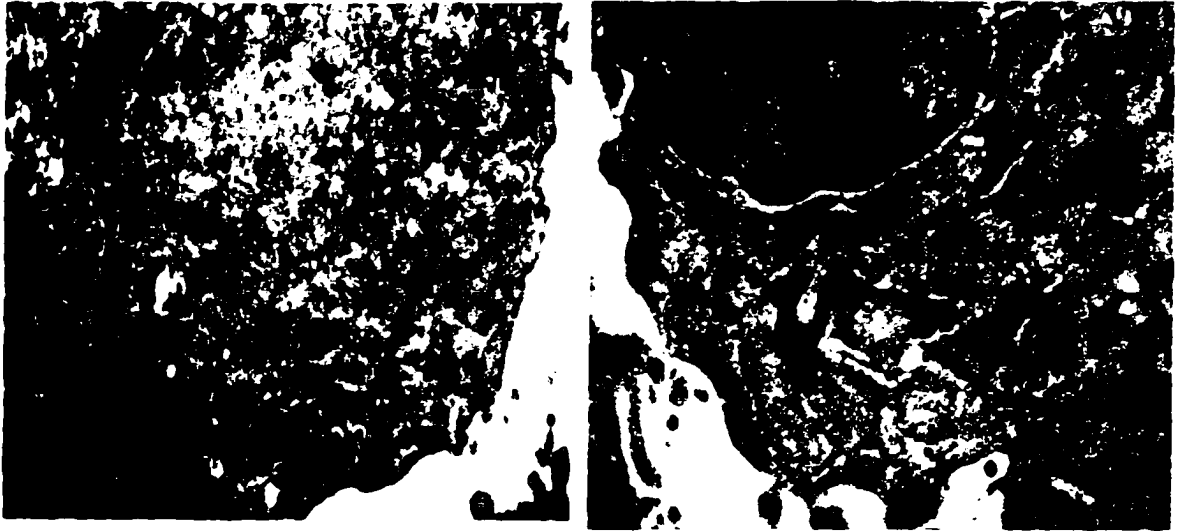
Les cellules AtT-20 et AtT-20/700 AS #3 (environ  $1 \times 10^6$  cellules/ml) ont été incubées pendant 30 minutes avec une solution de Krebs contenant soit 5 mM KCl (contrôle) ou 56 mM KCl (conditions dépolarisantes). Le milieu récolté a été passé sur Centricon afin de concentrer les protéines. Les protéines ont été séparées par SDS PAGE 10% puis transférées sur membrane pour être immunodétectées avec l'anticorps anti-CPE et révélées par chemiluminescence. L'expérience a été faite en triplicata.

### **3.3.6 Microscopie électronique sur les cellules AtT-20/700 AS #3**

Suite à une stimulation des cellules avec l'AMPc, nous pouvons voir une induction des granules de sécrétion chez les cellules 6T3. De plus, il a été prouvé que le gène Zis-SR est surexprimé suite à ce traitement comme démontré à la figure 13. De plus, avec la lignée clonale anti-sens AtT-20/700 AS #3, nous avons obtenu des résultats indiquant que la CPE semblait être affectée tel que démontré par immunofluorescence, par buvardage de type Western et par les expériences de sécrétion. Sachant que la CPE est une protéine retrouvée dans les granules de sécrétion, nous nous sommes posés la question à savoir si la lignée cellulaire AtT-20/700 AS #3 produisait toujours des granules de sécrétion. Pour répondre à cette question, nous avons regardé au niveau de l'ultrastructure de la cellule par microscopie électronique.

La figure 27 montre des photos de cellules AtT-20 (A) et AtT-20/700 AS #3 (B) en microscopie électronique. Nous remarquons la présence de granules de sécrétion (pointés par les flèches) dans le cytoplasme des cellules AtT-20. Ces structures se distinguent facilement par leur aspect dense. De plus les granules se retrouvent en bordure de la membrane cellulaire. Chez la lignée AtT-20/700 AS #3, nous réussissons à trouver quelques granules de sécrétion dans la cellule mais dans un nombre beaucoup plus restreint que chez la lignée cellulaire AtT-20. Il semble donc que l'anti-sens du gène Zis-SR peut bloquer partiellement la formation de granules de sécrétion chez les cellules AtT-20.





**Figure 27. Analyse ultrastructurale montrant la perte des granules de sécrétion chez la lignée anti-sens AtT-20/700 AS #3.**

A) Photographie montrant la lignée cellulaire AtT-20. B) Photographie montrant la lignée clonale anti-sens AtT-20/700 AS #3.

## **DISCUSSION**

Les cellules spécialisées telles que les cellules endocrines possèdent une voie de sécrétion régulée se distinguant par la relâche des protéines emmagasinées dans des granules de sécrétion à la suite d'une stimulation de ces cellules par un sécrétagogue spécifique. Cependant, les cellules qui ont cette voie régulée de sécrétion utilisent aussi une autre voie de sécrétion par laquelle les protéines essentielles à la survie et à la croissance cellulaire seront transportées jusqu'à leur cibles respectives. Il s'agit de la voie de sécrétion constitutive (KELLY, 1985). Cette voie de sécrétion est commune à la plupart des cellules suggérant ainsi que la voie de sécrétion constitutive est un «caractère de base» chez ces cellules. Or, lorsque les cellules se différencient en cellules endocrines, elles acquièrent la voie de sécrétion régulée tout en conservant la voie constitutive. On peut alors penser qu'une «cassette» de gènes serait responsable de ce phénotype restreint à certains types cellulaires seulement comme les cellules endocrines, exocrines ou neuroendocrines. Cette «cassette» contiendrait des gènes permettant le triage des protéines vers leur voie respective, des gènes impliqués dans la biogénèse des granules de sécrétion ainsi que dans le processus d'exocytose. À un niveau supérieur, des gènes permettraient la mise en marche ainsi que la régulation de cette voie de sécrétion. Ces «gènes maîtres» seraient nécessaires pour maintenir le phénotype endocrinien des cellules. Afin d'identifier ces gènes, nous avons utilisé un modèle cellulaire eucaryote défectueux dans sa voie de sécrétion régulée, la lignée cellulaire

6T3. Malgré le fait que ces cellules gardent plusieurs caractéristiques des cellules endocrines (l'expression de certains marqueurs endocriniens tels que SPC2, SPC3, CPE, PAM), cette lignée cellulaire est déficiente à produire et à emmagasiner dans leurs granules de sécrétion la proopiomélanocortine (POMC). Cependant, ce phénotype endocrinien est rétabli suite à une stimulation des cellules à l'AMPc. Des études précédentes ont démontré que la voie de sécrétion régulée restaurée par l'AMPc est fonctionnelle (DAY *et al.*, 1995). Ce modèle s'avère être un excellent outil pour l'identification de gènes responsables de la différenciation des cellules endocrines.

La caractérisation de la régulation de l'expression génique chez les cellules eucaryotes est essentielle pour étudier la différenciation et la croissance cellulaire. La modification à la hausse ou à la baisse dans le niveau d'expression de plusieurs gènes par l'AMPc permet de rétablir la voie de sécrétion régulée chez les cellules 6T3. Avec l'approche du PCR différentiel (LIANG & PARDEE, 1992), il est possible d'identifier des gènes exprimés de façon différentielle suite au traitement des cellules à l'AMPc. À l'aide de cette approche, nous avons isolé un ADNc de 2.6 kpb exprimé à la hausse dans les cellules 6T3 suite à un traitement à l'AMPc. Comme mentionné dans la section Résultats, le PCR différentiel a d'abord permis d'isoler un fragment de cet ADNc que nous avons nommé GAP1-5A. À partir de ce fragment, nous avons procédé à un criblage préliminaire par des études de distribution tissulaire et cellulaire afin de s'assurer que ce gène pouvait avoir une implication dans le phénotype endocrinien. Puis, l'obtention de la séquence complète à partir d'une banque d'ADNc de cerveau de souris nous a permis de constater que GAP1-5A avait une homologie avec d'autres

ADNc nommés Zis (Zinc-finger Splicing) déjà répertoriés dans la banque de données GenBank (discuté plus loin). Cependant, la séquence que nous obtenions différait dans la portion C-terminale de la protéine prolongeant une région connue comme une région riche en sérine et en arginine (SR). Nous avons donc changé l'appellation de GAP1-5A pour nommé l'ADNc que nous avons cloné par Zis-SR.

Avant d'associer le rétablissement de la voie de sécrétion régulée avec l'augmentation dans le niveau d'expression de ce gène, il était important de connaître sa distribution cellulaire et tissulaire. En effet, si l'expression de Zis-SR est élevée et strictement retrouvée dans des tissus ou des cellules n'ayant aucune fonction endocrine, il serait difficile d'établir une corrélation entre le rétablissement du phénotype endocrinien et l'expression de ce gène. L'analyse de type Northern ainsi que la localisation *in situ* indiquent que le gène Zis-SR est fortement exprimé dans diverses régions du cerveau plus précisément au niveau des cellules neuronales. En plus de sa forte distribution dans les neurones du système nerveux central, Zis-SR se retrouve aussi exprimé dans des tissus endocriniens comme le pancréas, le rein, la glande surrénale et dans plusieurs lignées cellulaires de type endocrines. Cependant, il se peut que l'expression de Zis-SR ne soit pas exclusive aux tissus endocriens et que dans des tissus non-endocriens (le poumon par exemple), certaines cellules apparentées aux cellules endocriniennes (cellules neuroendocrines de l'épithélium bronchique) expriment Zis-SR. L'expression de ce gène pourrait avoir une autre fonction chez ces cellules. La conclusion quant aux études de distribution cellulaire et tissulaire nous indique que Zis-SR a une tendance neuroendocrinienne et endocrinienne. Ces études de distribution

cellulaire et tissulaire étaient une des premières étapes de criblage à savoir si Zis-SR pouvait être impliqué dans la formation des granules de sécrétion. La distribution de l'expression de Zis-SR au niveau endocrinien et neuroendocrinien nous a incité à approfondir l'étude de ce gène. Puisque ces études de distribution se sont faites à l'aide d'une sonde correspondant au fragment isolé par PCR différentiel, nous avons isolé et cloné la séquence complète de cet ADNc.

La séquence en nucléotides de Zis-SR donne un cadre de lecture ouvert correspondant à une séquence de 330 acides aminés. Nous pouvons estimer la masse moléculaire de la protéine à environ 37 kDa. Cette protéine contient des motifs particuliers suggérant que Zis-SR pourrait être impliqué dans des interactions avec des acides nucléiques. En effet, la protéine contient 2 motifs en doigt de zinc en N-terminal, un signal de localisation nucléaire et une région riche en sérine et arginine en C-terminal de la protéine (domaine RS).

En recherchant sur la banque de données GenBank, nous nous sommes rendus compte qu'un groupe avait déjà isolé un ADNc homologue à partir des cellules juxta-glomérulaires chez le rat nommé Zis pour Zinc finger Splicing (KARGINOVA *et al.*, 1997). Les cellules juxta-glomérulaires sont des cellules rénales spécialisées dans la synthèse et la relâche de rénine, une hormone clé dans le système rénine-angiotensine. Par la suite, un groupe a cloné une séquence humaine homologue à partir d'une banque d'ADNc de cerveau fétal (hZis1 et hZis2) (NAKANO *et al.*, 1998) puis un autre groupe a identifié une séquence semblable chez la souris (ZFP265) par reverse transcriptase sur

de l'ARN provenant de rein de souris (ADAMS *et al.*, 2000). De plus, nous avons constaté que Zis-SR avait aussi une forte homologie avec la protéine C4SR chez *Xenopus leavis*. Chez chacune de ces espèces, nous remarquons une forte homologie avec Zis-SR dans la portion N-terminale de la protéine. Par contre, en C-terminal, nous constatons que Zis-SR diffère des séquences chez le rat, la souris et l'humain clonées par les autres groupes. Un nucléotide de plus dans la séquence de Zis-SR est responsable de cette divergence. En effet, une cytosine de plus provoque un changement dans le cadre de lecture de la protéine et prolonge ainsi le domaine riche en sérines et arginines jusqu'à la fin de la portion C-terminale, tout comme la protéine C4SR retrouvée chez la grenouille. D'après la phylogénie des espèces, il est étrange d'obtenir une séquence murine ayant une plus forte homologie avec la grenouille plutôt qu'avec les autres espèces de mammifères. Nous avons 2 explications possibles quant à cette différence entre Zis-SR et les autres séquences retrouvées chez le rat, la souris et l'humain. D'abord, il se peut que les 3 séquences publiées contiennent la même erreur dans la séquence en nucléotides. En effet, nous avons séquencé cette région où se produisait le changement dans le cadre de lecture chez le rat et l'humain pour se rendre compte que la séquence murine de Zis-SR était identique à ces séquences par la présence de la cytosine en position 809. La compression de 2 nucléotides cytosine est fort probablement la source de cette erreur dans les séquences clonées par ces autres groupes. En effet, en ajoutant le nucléotide cytosine à la position 809 dans ces séquences, la similarité avec Zis-SR est rétablie complètement. Cependant, si les séquences publiées chez le rat, l'humain et la souris sont exactes, il se peut que cette protéine comporte différentes isoformes: une forme ayant une région SR courte et une autre forme avec une région SR

se poursuivant jusqu'à la fin de la portion C-terminale de la protéine tout comme C4SR. Ces 2 isoformes pourraient être générés par un épissage différent de l'ARN. On peut penser que ces isoformes pourraient avoir des fonctions différentes dépendamment de la longueur de leur domaine SR en C-terminal. De plus, il pourrait y avoir une spécificité tissulaire dans l'expression de ces différentes isoformes.

Les motifs en doigt de zinc sont largement retrouvés chez plusieurs protéines interagissant avec les acides nucléiques ou avec d'autres protéines. On remarque une certaine spécificité dans la séquence du motif en doigt de zinc de la protéine pour sa liaison à l'ADN, l'ARN ou à une autre protéine. Entre autre, le motif en doigt de zinc Cys2-His2 est le motif de liaison à l'ADN le plus communément retrouvé chez les facteurs de transcription eucaryotes (SHI & BERG, 1995; WOLFE *et al.*, 2000). La séquence correspondant au motif en doigt de zinc de la protéine Zis-SR (D W X C X<sub>4</sub> C X<sub>n</sub> N X<sub>6</sub> C X<sub>2</sub> C) est aussi commune à une série de protéines (figure 22). La protéine C4SR chez *Xenopus laevis*, une protéine reconnue pour lier l'ARN (LADOMERY *et al.*, 2000), possède ce même motif.. Ce nouveau consensus (DW)C<sub>4</sub> de motif en doigt de zinc regrouperait des protéines possiblement impliquées dans la liaison avec l'ARN. Par contre, il reste à démontrer si ce motif est exclusif pour la liaison à l'ARN seulement.

Le domaine RS est une caractéristique principale des protéines d'épissage (ZHALER *et al.*, 1992). En plus des protéines SR jouant un rôle dans l'épissage et dans la régulation de l'épissage des pré-ARNm, d'autres protéines avec un domaine SR aurait des fonctions dans la machinerie transcriptionnelle, dans la maturation de l'extrémité 3'

et dans le transport des ARN (BLENCOWE *et al.*, 1999). Ce domaine riche en sérine-arginine serait impliqué dans des interactions protéine-protéine. L'état de phosphorylation des domaines SR est important dans ces interactions protéine-protéine ainsi que dans la liaison à l'ARN (XIAO & MANLEY, 1997; YEAKLEY *et al.*, 1999). Zis-SR possède une région SR en C-terminal. Cependant, lorsque nous comparons Zis-SR avec d'autres protéines SR ayant des fonctions dans l'épissage des ARN (figure 22), nous constatons que la protéine Zis-SR diffère par son motif de liaison à l'ARN. Les protéines représentées à la figure 23 contiennent des motifs RRM (RNA Recognition Motif) connu pour leur rôle dans la liaison à l'ARN. Nous ne pouvons pas exclure Zis-SR dans ce groupe de protéines mais Zis-SR pourrait lier l'ARN par ses 2 motifs en doigt de zinc. La présence d'un signal de localisation nucléaire situé près des domaines de liaison aux acides nucléiques est une caractéristique typique des protéines ayant comme cible des substrats nucléaires. En considérant les motifs retrouvés dans la séquence de Zis-SR, nous pourrions supposer que cette protéine aurait un rôle dans l'épissage des pré-ARNm ou même dans la maturation de l'extrémité 3' ou dans le transport des ARNms.

Un autre rôle potentiel de Zis-SR serait son implication dans le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. Les doigts de zinc de la protéine Zis-SR pourraient lier l'ADN dans une région promotrice. Puisque certaines protéines SR peuvent lier le domaine CTD phosphorylé de l'ARN polymérase II (YURYEV *et al.*, 1996), la protéine Zis-SR pourrait, suite à sa liaison à l'ADN, permettre le recrutement de la machinerie de transcription à un promoteur spécifique. De plus, des évidences démontrent qu'il existe



un couplage entre la transcription et l'épissage (McCRACKEN *et al.*, 1997). Puisque les protéines SR ont un rôle bien déterminé dans l'épissage, la protéine Zis-SR pourrait être impliquée dans la régulation de l'épissage et ainsi, effectuer un lien entre ces deux mécanismes.

Pour déterminer si Zis-SR pouvait avoir un rôle dans la formation des granules de sécrétion, nous avons utilisé l'approche anti-sens. Cette approche consiste à bloquer la synthèse d'une protéine spécifique en introduisant dans les cellules l'ARN complémentaire à la séquence codante (MAINS, 1995). Nous avons d'abord essayé de bloquer l'expression de Zis-SR par l'introduction d'oligonucléotides anti-sens dans la cellule. L'avantage de cette méthode réside dans sa simplicité et sa rapidité une fois la séquence en nucléotides établie. Cependant, l'utilisation d'oligonucléotides dans l'approche anti-sens comportent des désavantages puisqu'il faut utiliser des concentrations élevées d'oligonucléotides de l'ordre de 10 à 100  $\mu\text{M}$  et que souvent, les oligonucléotides synthétiques sont instables en culture. Pour contrer la dégradation, nous avons utilisé des oligonucléotides modifiés chimiquement. Nous n'avons pas réussi à obtenir une diminution significative dans l'expression de Zis-SR par cette méthode. Ceci est peut être dû au fait que les oligonucléotides synthétiques modifiés chimiquement peuvent avoir une efficacité moindre dans la réduction de la synthèse d'ARNm cibles (TOULME, 1992; TIDD, 1992). Vu que cette méthode s'est avérée inefficace dans notre cas, nous nous sommes tournés vers la méthode d'expression de l'anti-sens par un système d'expression. De cette façon, nous avons réussi à créer une lignée stable chez les cellules AtT-20 ayant une expression de Zis-SR réduite à 20%. La

création de lignée stable constitue un des avantages majeurs de cette technique. Par contre, cette méthode est plus ardue puisqu'il faut sélectionner plusieurs lignées clonales afin d'obtenir un taux d'expression minimal du gène d'intérêt. De plus, l'intégration du vecteur d'expression dans la cellule peut avoir des conséquences sur l'expression de d'autres ARN. Dans notre cas, après le criblage des différentes lignées clonales, nous n'avons cependant pas réussi à obtenir un niveau d'expression de Zis-SR nul. Une autre technique récemment décrite dans la littérature semble avoir une efficacité supérieure, la dégradation d'ARN cibles par le ribozyme delta, un ARN catalytique (ROY *et al.*, 1999; KATO *et al.*, 2001). Cette technique consiste à insérer des séquences spécifiques correspondant à l'ARNm codant pour la protéine d'intérêt chez le ribozyme delta. Par la reconnaissance de ces courtes séquences, le ribozyme exercera son effet catalytique pour détruire ces ARNm bloquant ainsi la synthèse de la protéine. Des travaux sont en cours dans notre laboratoire pour tester la puissance de cette technique dans la création de lignées déficientes dans l'expression de certains gènes.

Par immunofluorescence et par des études de sécrétion, nous avons regardé les conséquences sur la voie de sécrétion régulée chez la lignée cellulaire AtT-20 ayant subi une diminution de 80 % dans le taux d'expression de Zis-SR (AtT-20/700 AS #3). La carboxypeptidase E, abondamment retrouvée dans les granules de sécrétion, nous a servi de marqueur spécifique à la voie de sécrétion régulée lors de ces expériences. Les résultats obtenus avec cette lignée clonale anti-sens nous ont permis d'associer l'expression de Zis-SR avec la formation de granules de sécrétion. En effet, la perte d'immunoréactivité à la CPE au niveau des extensions cellulaires ainsi que la sécrétion

importante de cette enzyme sans qu'il y ait dépolarisation des cellules nous indiquent que la voie de sécrétion régulée est déficiente chez la lignée cellulaire AtT-20/700 AS #3 comparativement à la lignée cellulaire AtT-20 qui possède un phénotype endocrinien normal. Suite à ces résultats, nous pourrions croire que la diminution de Zis-SR aurait un effet sur la CPE elle-même. Cependant, l'expression en ARNm de la CPE reste inchangé chez les lignées anti-sens. Nous pouvons penser que la diminution dans l'expression du gène Zis-SR affecterait un élément impliqué dans la formation des granules de sécrétion puisque qu'il ne semble pas ou pratiquement pas y avoir de stockage de la CPE au niveau des granules de sécrétion tel que démontré par immunofluorescence. Le contenu cellulaire en CPE diminué chez la lignée clonale anti-sens semble être confirmé par le fait que la CPE est sécrété de façon constitutive chez la lignée cellulaire AtT-20/700 AS #3. De plus, les analyses ultra-structurales chez la lignée cellulaire anti-sens semblent démontrer que cette lignée ne contient pas autant de granules de sécrétion que les cellules AtT-20. Par microscopie électronique il est facile de distinguer les granules de sécrétion par leurs structures denses particulières. Peut être que les granules de sécrétion sont toujours formés chez la lignée anti-sens mais que le stockage des protéines de sécrétion régulée ne se fait tout simplement pas. Par conséquent, nous ne pouvons distinguer ces structures comme étant des granules de sécrétion. Pour étudier cette hypothèse, il faudrait vérifier par immunocytochimie en microscopie électronique en utilisant un marqueur spécifique à la membrane du granule de sécrétion. La création d'une autre lignée anti-sens chez la lignée cellulaire  $\beta$ -TC3, des cellules  $\beta$  du pancréas, nous permettra de confirmer si la formation des granules de sécrétion est vraiment dépendante de la diminution de l'expression de Zis-SR. Les

expériences d'immunofluorescence et de sécrétion que nous avons établi pour la vérification du phénotype endocrinien nous seront utiles avec cette lignée  $\beta$ -TC3 anti-sens.

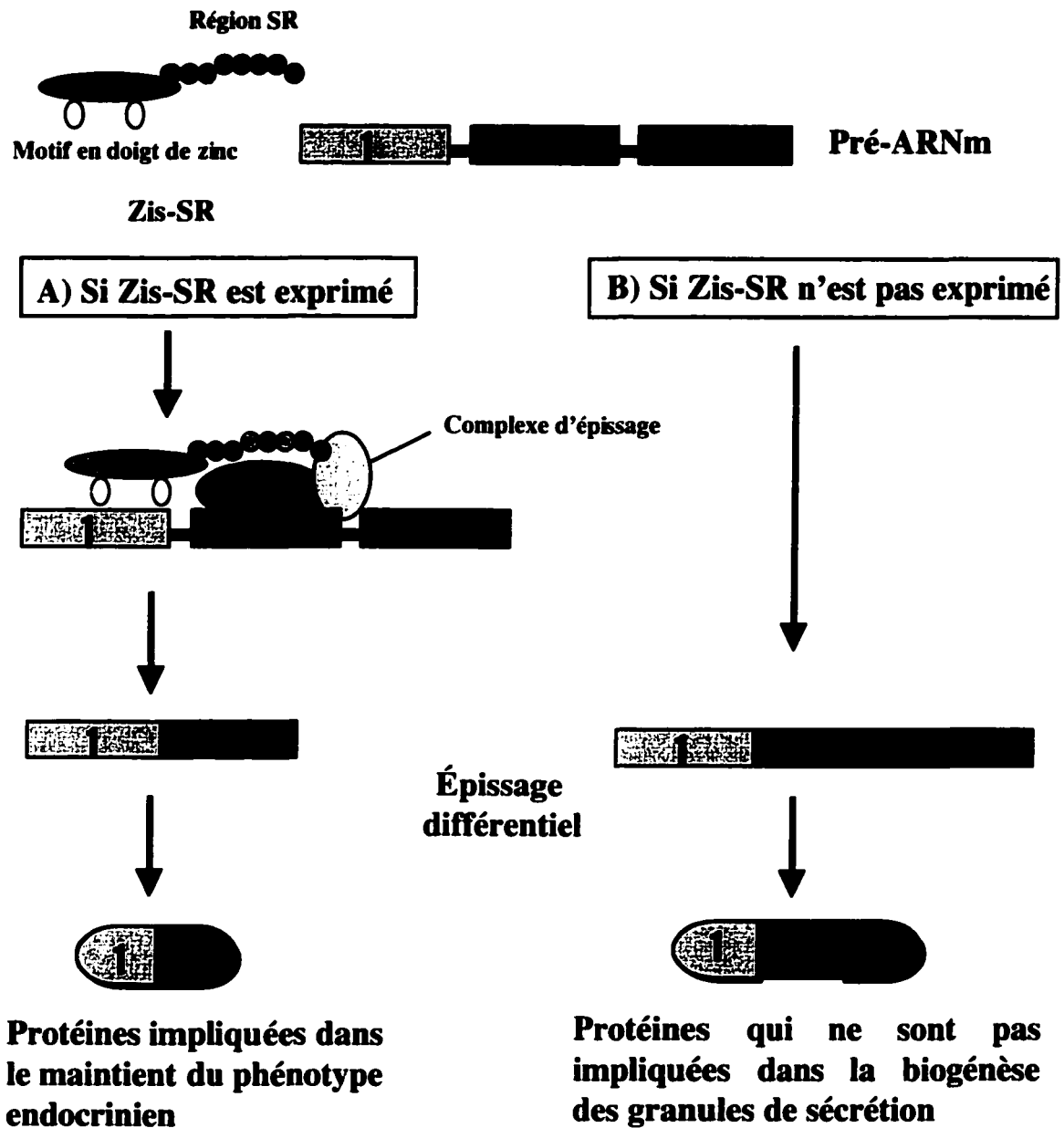
L'expression de Zis-SR pourrait donc être importante dans le maintien du phénotype endocrinien. Ces résultats semblent être en accord avec la fonction potentielle de ce gène décrite par le groupe qui a d'abord cloné le rZis à partir des cellules juxta-glomérulaires (JG) de rat. Ils supposent que Zis jouerait un rôle dans le stade développemental des cellules JG en induisant la différenciation de ces cellules (KARGINOVA *et al.*, 1997). Ils ont remarqué que l'expression de Zis variait en fonction de la capacité des cellules à produire et à relâcher la rénine. En effet, les cellules qui se dédifférencient c'est-à-dire qui perdent la capacité de synthétiser et de relâcher la rénine, n'expriment pas rZis. Nos études d'anti-sens suggèrent que Zis-SR est impliqué dans la différenciation des cellules.

Mais comment un facteur comme Zis-SR pourrait-il être impliqué dans la biogénèse des granules de sécrétion? L'épissage alternatif permet la régulation de l'expression des gènes et la génération de différentes isoformes à partir d'un même précurseur d'ARNm. Il s'agit d'un processus complexe qui sélectionne différentes combinaisons de sites d'épissage dans un même précurseur d'ARNm (CHABOT, 1996). Depuis les dernières années, la découverte des gènes subissant un épissage alternatif ne cesse d'augmenter laissant croire que ce type d'épissage aurait des fonctions dans la régulation de l'expression des gènes à un niveau post-transcriptionnel (SMITH *et al.*, 1989). L'expression des gènes serait contrôlée de façon qualitative, par la génération de

diverses isoformes, ou quantitativement en exerçant un contrôle «on/off» sur l'expression de certains gènes par l'introduction prématurée de codon de terminaison (SMITH & VALCARCEL, 2000). Il existe plusieurs cas d'épissage alternatif d'ARN précurseur menant à des protéines ayant différentes fonctions ou différentes localisations qui ont été décrits dans la littérature. Par exemple, l'épissage alternatif des molécules d'adhésion cellulaire neuronales (NCAMs) génère différentes formes, soit des formes sécrétées ou des formes membranaires (CUNNINGHAM *et al.*, 1987). Les NCAMs sont des glycoprotéines impliquées dans les interactions cellulaires dans le système nerveux et dans les muscles squelettiques. Elles auraient un rôle majeur dans le développement du système nerveux. Les formes multiples de ces molécules d'adhésion produites par épissage alternatif possèderaient différentes fonctions dans la formation du système nerveux. Ce cas illustre bien le rôle de l'épissage alternatif dans l'expression finale des phénotypes différenciés permettant à la cellule d'exercer sa fonction particulière. La voie conduisant à la différenciation sexuelle chez la *Drosophile* est un exemple impliquant l'épissage alternatif comme mécanisme de contrôle développemental. Un des premiers gènes (*sxl*) impliqués dans cette cascade d'évènements est épissé de façon à produire un contrôle «on/off» sur l'expression de gènes impliqués plus loin dans cette voie de différenciation (SMITH *et al.*, 1989; LOPEZ, 1998). En effet, ce gène comprend un codon de terminaison dans l'exon 3 du pré-ARNm. Chez la *Drosophile* de type femelle, l'épissage se fait de façon à ce que l'exon 3 ne soit pas inclus ce qui mène à la formation de la protéine fonctionnelle SXL (CHABOT, 1996). Par la suite, cette protéine régulera l'épissage d'un autre gène impliqué dans la cascade.

Une vaste majorité des pré-ARNm transcrits dans une cellule possèdent des sites d'épissage multiples. Étant donné que plusieurs ARNm différents sont produits à partir d'un même transcrit et que ceux-ci coderont pour des protéines ayant des fonctions précises, l'épissage alternatif doit être hautement régulé de manière histo-spécifique ou en fonction du stade de développement ou de différenciation. Les protéines SR sont une famille de facteurs d'épissage qui joueraient un rôle important dans l'épissage alternatif (MANLEY & TACKE, 1996; ZAHLER *et al.*, 1992). En plus de leurs rôles essentiels dans l'épissage constitutif, les protéines SR régulent la sélection de sites distincts lors de l'épissage alternatif d'un pré-ARNm. La distribution de certaines protéines SR varie selon le type cellulaire donc on peut penser que ces protéines exercent leur fonction régulatrice d'épissage de façon histo-spécifique contribuant ainsi à donner le phénotype final des cellules.

Les connaissances sur l'épissage alternatif nous ont permis d'élaborer un rôle potentiel de Zis-SR dans la biogénèse des granules de sécrétion. Ce rôle est illustré à la figure 28. Dépendamment de son niveau d'expression, Zis-SR jouerait un rôle dans l'épissage des ARNm en régulant la sélection des sites d'épissage dans ce précurseur. Au cours de la formation du complexe multi-protéique caractéristique à l'épissage des pré-ARNm, il y aurait recrutement de Zis-SR à ce complexe. Par ses motifs en doigt de zinc, Zis-SR lierait le précurseur d'ARNm à un endroit à proximité du site d'épissage sélectionné. L'interaction de Zis-SR avec les protéines d'épissage dépendrait de l'état de phosphorylation de son domaine riche en sérine-arginine. Il a été démontré que la phosphorylation des domaines SR des protéines est nécessaire au début de la formation



**Figure 28. Schéma représentant le rôle potentiel de Zis-SR.** Selon le niveau d'expression de Zis-SR, il y a épissage différentiel d'un même ARN précurseur dans une cellule. Zis-SR se lie au pré-ARNm par ses motifs en doigts de zinc. Il y aura recrutement de d'autres protéines SR et des protéines d'épissage pour la formation d'un complexe d'épissage dépendamment de l'état de phosphorylation de la région SR (cercles pâles).

du complexe d'épissage (XIAO & MANLEY, 1997, 1998). Des phosphatases seraient aussi impliquées dans la formation de ce complexe et joueraient aussi un rôle dans l'activation du clivage du précurseur d'ARNm (MERMOUD *et al.*, 1994; MURRAY *et al.*, 1999). D'autres protéines SR pourraient aussi être impliquées dans des interactions avec Zis-SR. Une fois que le complexe d'épissage est assemblé il peut exercer son action catalytique en enlevant les introns sélectionnés. L'ARNm produit par cet épissage code pour une protéine ayant un rôle dans la différenciation des cellules en cellules endocrines. Cette protéine pourrait être un des éléments nécessaires à la régulation de la formation des granules de sécrétion. Chez la drosophile par exemple, l'étape finale d'épissage alternatif menant à la différenciation du sexe produit des facteurs de transcription distincts chez la femelle (DSX<sup>F</sup>) de chez le mâle (DSX<sup>M</sup>). Ces protéines établiront le patron d'expression approprié pour les caractères sexuels de la drosophile (LOPEZ, 1998). Comme dans cet exemple, Zis-SR pourrait diriger l'épissage alternatif d'un gène codant pour un élément régulateur aussi important qu'un facteur de transcription. Par la suite, ce facteur de transcription établirait l'expression d'un gène essentiel au déclenchement de la mise en place de la voie de sécrétion régulée. D'un autre côté, si Zis-SR n'est pas exprimé ou faiblement exprimé, l'épissage du pré-ARNm se fait de façon constitutive menant ainsi à la formation d'une autre protéine qui elle ne déclenche pas ce processus de différenciation cellulaire. Cet épissage différentiel se produirait de manière spécifique chez différents tissus selon le niveau d'expression de Zis-SR ainsi que l'expression de d'autres protéines SR et de facteurs d'épissage comme les snRNP et les protéines hnRNP (SMITH & VALCARCEL, 2000). Jusqu'à ce jour, nous n'avons pas déterminé l'ARN précurseur cible sur lequel Zis-SR exercerait sa



fonction dans la sélection de sites d'épissage. Cependant, nous pensons que Zis-SR régulerait la maturation d'ARN codant pour des protéines ayant des fonctions régulatrices sur le phénotype endocrinien. Certains gènes impliqués dans la voie de sécrétion régulée peuvent subir un épissage alternatif. La phospholipase D, impliquée dans la granulogénèse, peut être épissée de façon à produire diverses isoformes. Ces isoformes pourraient avoir un rôle dans la formation des granules de sécrétion. Une fois que la ou les cibles de Zis-SR seront déterminées, il serait intéressant d'étudier la phosphorylation du domaine SR de la protéine Zis-SR. La phosphorylation de ce domaine serait peut-être un mécanisme de régulation dans l'épissage alternatif des pré-ARNm cibles de Zis-SR.

Nos études suggèrent que le gène Zis-SR fait partie de la «cassette» de gènes responsables du phénotype endocrinien. De plus, il est possiblement un des «gènes maîtres» impliqué dans la différenciation des cellules pour l'acquisition de ce phénotype. Zis-SR n'est certainement pas le seul gène impliqué dans la différenciation des cellules endocrines. La lignée cellulaire 6T3 s'est avérée être un excellent modèle pour identifier ce gène comme un des gènes responsable dans le phénotype endocrinien. D'autres techniques peuvent être utilisées pour identifier d'autres gènes exprimés différemment dans une cellule. Une technologie récente utilisant des micro-puces d'ADN s'avère être une méthode ultra-sensible et hautement performante pour identifier les profils d'expression des gènes (YOUNG, 2000). Ces micro-puces contiennent tous les ADNc synthétisés à partir d'ARN poly A d'une cellule. Par hybridation de cette

micro-puce d'ADN avec différentes sondes, il est possible de distinguer les ADNc dont l'expression est augmentée ou diminuée.

La recherche dans le but d'identifier les gènes clés dans le phénotype endocrinien a une application pharmacologique bien précise. Il est possible d'induire la différenciation cellulaire chez certains types de cellules en ajoutant à ces cellules des agents chimiques (DMSO, acide rétinoïque), des facteurs de croissance ou en contrôlant les conditions de culture. Cependant, il est difficile de contrôler le phénotype final de ces cellules puisque ces cellules totipotentes ont la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires comme en cellules fibroblastiques, musculaires, nerveuses, en cellules gliales. L'identification des gènes responsables du phénotype endocrinien nous permettrait d'exercer un contrôle sur la différenciation de cellules embryonnaires en cellules endocrines. En connaissant les gènes déterminant ce phénotype, nous pourrions cloner ces gènes dans une cellule non différenciée ou dans des cellules souches. Ainsi, ces cellules acquerraient le phénotype endocrinien et pourraient être utilisées dans des thérapies de remplacement de cellules endocrines défectueuses. Cette thérapie pourrait être utilisée dans certaines pathologies comme le diabète de type 1 ou certaines maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson ou l'Alzheimer.

## CONCLUSION

À l'aide du modèle cellulaire 6T3, nous avons isolé un ADNc de 2.6 kpb régulé à la hausse par l'AMPc que nous avons nommé Zis-SR. Ce modèle cellulaire s'avère être un excellent outil pour l'étude de gènes impliqués dans le phénotype endocrinien des cellules. En effet, les cellules 6T3 ne produisent pas de granules de sécrétion dans lesquels les protéines de sécrétion régulée sont emmagasinés. Leur voie de sécrétion régulée est donc altérée. Cependant, ce phénotype est rétabli par un traitement des cellules 6T3 à l'AMPc pour une période de 24 heures. La distribution cellulaire et tissulaire de Zis-SR est principalement neuroendocrine et endocrine ce qui nous a permis d'associer l'implication de ce gène avec le rétablissement de la voie de sécrétion régulée, entre autre avec la formation des granules de sécrétion.

La séquence en acides aminés de Zis-SR démontre que cette séquence est conservée chez différentes espèces. En effet, Zis-SR est une protéine homologue à la protéine Zis retrouvée chez le rat, l'humain ainsi qu'à la protéine ZFP265 de souris. Cependant, l'homologie de séquence dans la portion C-terminale de Zis-SR n'est pas conservée avec les séquences des autres protéines mais conserve tout de même une forte homologie avec la protéine C4SR de *Xenopus leavis*. La séquence comporte des motifs particuliers nous laissant croire que Zis-SR pourrait jouer un rôle dans l'épissage des pré-ARNm. En effet, la protéine contient deux motifs en doigt de zinc possiblement impliqués dans la

liaison à l'ARN. La séquence consensus de ces motifs en doigt de zinc regrouperait une nouvelle famille de protéines liant l'ARN. De plus, la portion C-terminale de la protéine Zis-SR possède une région riche en sérine et en arginine, une des caractéristiques principale d'une famille de protéine, les protéines SR. Ces protéines sont connues pour leur rôle dans l'épissage ainsi que dans l'épissage alternatif des pré-ARNm. Un motif de localisation nucléaire est aussi présent dans la séquence ce qui confirme que Zis-SR pourrait être impliqué dans l'épissage.

Nous avons produit une lignée cellulaire anti-sens pour le gène Zis-SR (AtT-20/700 AS #3) afin de déterminer si le blocage dans l'expression de ce gène aurait une conséquence sur la formation des granules de sécrétion chez des cellules qui possèdent une voie de sécrétion régulée. Par des études d'immunofluorescence et de sécrétion en utilisant la CPE comme marqueur de la voie de sécrétion régulée, nous avons démontré qu'une diminution de l'expression de ce gène affectait la biogénèse des granules de sécrétion. Ces résultats nous ont permis de confirmer l'implication de Zis-SR dans le maintien du phénotype endocrinien.

À la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que Zis-SR, apparentée aux protéines SR, jouerait un rôle dans l'épissage des pré-ARNm, plus particulièrement dans l'épissage alternatif de ces pré-ARNm. Cette forme d'épissage permet la régulation de l'expression des gènes et la génération de différentes isoformes à partir d'un même précurseur d'ARNm. Bien que les ARN précurseurs cibles de Zis-SR ne sont pas encore

connus, Zis-SR régulerait la maturation d'ARN codant pour des protéines ayant des fonctions régulatrices sur le phénotype endocrinien.

Bien que plusieurs gènes sont responsables du phénotype endocrinien, cette étude s'avère extrêmement intéressante d'un point de vue pharmacologique. L'identification et la caractérisation de gènes clés dans la différenciation et le maintien du phénotype endocrinien est un des premiers pas vers une thérapie de remplacement de cellules endocrines défectueuses pour le traitement de certaines maladies telles que le diabète de type 1 ou certaines maladies neurodégénératives.

## REMERCIEMENTS

Je désire premièrement remercier le Dr Robert Day pour m'avoir permis de réaliser mes études de maîtrise dans son laboratoire. Je le remercie de m'avoir donné un projet des plus intéressants qui m'a permis de développer un esprit scientifique. Son soutien, sa disponibilité ainsi que sa confiance ont été grandement appréciés tout le long de mon projet de recherche. Il a su cultiver mon intérêt pour ce projet de recherche jusqu'à la toute fin par les discussions scientifiques, sa rigueur scientifique ainsi que la richesse de ses idées.

Je tiens également à remercier les gens qui ont participé à ce projet de recherche. Merci à Édith Lanoue pour les travaux d'hybridation *in situ.*, à François Bergeron qui m'a aidé au début de ma maîtrise pour le clonage de Zis-SR, à la technicienne Xue Wen Yuan pour son aide précieuse pour les hybridations de type Northern et son aide technique. Je tiens aussi à remercier Dr Pierre Magny pour sa grande disponibilité et sa participation au projet pour la microscopie électronique, en plus de Denis Martel, le technicien en microscopie électronique. Merci à tous mes collègues de laboratoire avec qui j'ai eu du plaisir à travailler au cours de ces dernières années. Plus particulièrement merci à ma collègue de labo et amie de longue date Maud Jonnaert. Nos nombreuses conversations scientifiques, philosophiques ou comiques, arrosées ou non, et ses nombreux encouragements m'ont permis de passer des années inoubliables.

De plus, je voudrais également remercier mes parents Louise et Gilles ainsi que mes soeurs Mariève et Joëlle qui m'ont encouragé pendant tout le long de mes études graduées. Un merci tout spécial à mon copain Jean-Philippe pour sa bonne humeur, son réconfort, sa patience et son amour.

Enfin, je tiens à remercier le Dr Klaus Klarskov, du département de pharmacologie et le Dr Benoit Chabot, du département de microbiologie et infectiologie, pour avoir accepté de réviser et d'évaluer ce mémoire.

## **BIBLIOGRAPHIE**

**ADAMS D.J., VAN DER WEYDEN L., KOVACIC A., LOVICU F.J., COPELAND N.G., GILBERT D.J., JENKINS N.A., IOANNOU P.A., MORRIS B.J. (2000)**  
Chromosome localization and characterization of the mouse and human zinc finger protein 265 gene. *Cytogenet. Cell. Genet.* **88**: 68-73.

**ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF D., ROBERTS K., WATSON J.D. (1994)**  
Molecular Biology of the cell. Troisième édition. Garland Publishing, Inc. New York. N.Y.

**APPS, D.K., PERCY J.M. (1987)** The H<sup>+</sup>-translocating ATPase of chromaffin granule membranes. *Ann N Y Acad Sci.* **493**: 178-88.

**ARVAN P., KULIAWAT R., PRABAKARAN D., ZAVACKI A.M., ELAHI D., WANG S., PILKEY D. (1991)** Protein discharge from immature secretory granules displays both regulated and constitutive characteristics. *J Biol Chem.* **266**: 14171-14174.



- BAUERFEIND R., OHASHI M., HUTTNER W.B. (1994) Biogenesis of secretory granules and synaptic vesicles. Facts and hypotheses. *Ann. N Y Acad. Sci.* **733**: 233-44.
- BLENCOWE B.J., BOWMAN J.A., MCCRACKEN S., ROSONINA E. (1999) SR-related proteins and the processing of messenger RNA precursors. *Biochem. Cell Biol.* **77**: 277-91.
- BONNEMAIN H., GULIK-KRZYWICKI T., GRANDCHAMP C., COHEN J. (1992) Interactions between genes involved in exocytotic membrane fusion in paramecium. *Genetics.* **130**: 461-70.
- BROWN H.A., GUTOWSKI S., MOOMAW C.R., SLAUGHTER C., STERNWEIS P.C. (1993) ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* **75**: 1137-44.
- BURGESS T.L., KELLY R.B. (1987) Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* **3**: 243-293.
- CHABOT B. (1996) Directing alternative splicing: cast and scenarios. *Trends Genet.* **12**: 472-8.

- CHANAT E., HUTTNER W.B. (1991) Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. *J. Cell. Biol.* **115**: 1505-19.
- CHANAT E., WEISS U., HUTTNER W.B., TOOZE S.A. (1993) Reduction of the disulfide bond of chromogranin B (secretogranin I) in the trans-Golgi network causes its missorting to the constitutive secretory pathways. *EMBO J.* **12**: 2159-68.
- CHAVRIER P., GOUD B. (1999) The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**: 466-75.
- CHEN Y.G., SIDDHANTA A., AUSTIN C.D., HAMMOND S.M., SUNG T.C., FROHMAN M.A., MORRIS A.J., SHIELDS D. (1997) Phospholipase D stimulates release of nascent secretory vesicles from the trans-Golgi network. *J. Cell. Biol.* **138**: 495-504.
- COLOMER V., KICSKA G.A., RINDLER M.J. (1996) Secretory granule content proteins and the luminal domains of granule membrane proteins aggregate in vitro at mildly acidic pH. *J. Biol. Chem.* **271**: 48-55.

COOL D.R., FENGER M., SNELL C.R., LOH Y.P. (1995) Identification of the sorting signal motif within pro-opiomelanocortin for the regulated secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **270**: 8723-9.

COOL D.R., NORMANT E., SHEN F., CHEN H.C., PANNELL L., ZHANG Y., LOH Y.P. (1997) Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe(fat) mice. *Cell* **88**: 73-83.

CREEMERS J.W., USAC E.F., BRIGHT N.A., VAN DE LOO J.W., JANSEN E., VAN DE VEN W.J., HUTTON J.C. (1996) Identification of a transferable sorting domain for the regulated pathway in the prohormone convertase PC2. *J. Biol. Chem.* **271**: 25284-91.

CUNNINGHAM B.A., HEMPERLY J.J., MURRAY B.A., PREDIGER E.A., BRACKENBURY R., EDELMAN G.M. (1987) Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* **236**: 799-806.

DAVIS A.F., BAI J., FASSHAUER D., WOLOWICK M.J., LEWIS J.L., CHAPMAN E.R. (1999) Kinetics of synaptotagmin responses to Ca<sup>2+</sup> and assembly with the core SNARE complex onto membranes. *Neuron* **24**: 363-76.

DAY R., BENJANNET S., MATSUUCHI L., KELLY R.B., MARCINKIEWICZ M., CHRETIEN M., SEIDAH N.G. (1995) Maintained PC1 and PC2 expression in the AtT-20 variant cell line 6T3 lacking regulated secretion and POMC: restored POMC expression and regulated secretion after cAMP treatment. *DNA Cell. Biol.* **14**: 175-88.

DAY R., SCHÄFER M.K.-H., WATSON S.J., CHRÉTIEN M., SEIDAH N.G. (1992) Distribution and regulation of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the rat pituitary. *Mol. Endocrinol.* **6**: 485-497.

DE CAMILLI P., JAHN R. (1990) Pathways to regulated exocytosis in neurons. *Annu. Rev. Physiol.* **52**: 625-645.

DEMAUREX N., FURUYA W., D'SOUZA S., BONIFACINO J.S., GRINSTEIN S. (1998) Mechanism of acidification of the trans-Golgi network (TGN). In situ measurements of pH using retrieval of TGN38 and furin from the cell surface. *J. Biol. Chem.* **273**: 2044-51.

DHANVANTARI S., LOH Y.P. (2000) Lipid raft association of carboxypeptidase E is necessary for its function as a regulated secretory pathway sorting receptor. *J. Biol. Chem.* **275**: 29887-93.

DITTIE A.S., HAJIBAGHERI N., TOOZE S.A. (1996) The AP-1 adaptor complex binds to immature secretory granules from PC12 cells, and is regulated by ADP-ribosylation factor. *J. Cell. Biol.* **132**: 523-36.

EASOM R.A. (2000) asom RA. Beta-granule transport and exocytosis. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **11**: 253-66.

EIPPER B.A., MAINS R.E. (1988) Peptide alpha-amidation. *Annu. Rev. Physiol.* **50**: 333-44.

FRICKER L.D. (1988) Carboxypeptidase E. *Annu. Rev. Physiol.* **50**: 309-21.

FRICKER L.D., DAS B., ANGELETTI R.H. (1990) Identification of the pH-dependent membrane anchor of carboxypeptidase E (EC 3.4.17.10). *J. Biol. Chem.* **265**: 2476-82.

GERDES H.H., ROSA P., PHILLIPS E., BAEUERLE P.A., FRANK R., ARGOS P., HUTTNER W.B. (1989) The primary structure of human secretogranin II, a widespread tyrosine-sulfated secretory granule protein that exhibits low pH- and calcium-induced aggregation. *J. Biol. Chem.* **264**: 12009-15.

GERONA R.R., LARSEN E.C., KOWALCHYK J.A., MARTIN T.F. (2000) The C terminus of SNAP25 is essential for Ca(2+)-dependent binding of synaptotagmin to SNARE complexes. *J. Biol. Chem.* **275**: 6328-36.

GORR S-U. (1996) Differential storage of prolactin, granins (chromogranin B and secretogranin II) and constitutive secretory markers in rat pituitary GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> cells. *J. Biol. Chem.* **271**: 3575-3580.

GORR S-U., SHIOI J., COHN D.V. (1989) Interaction of calcium with porcine adrenal chromogranin A (secretory protein-I) and chromogranin B (secretogranin I). *Am. J. Physiol.* **257**: E247-54.

GRIFFITHS G., SIMONS K. (1986) The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* **234**: 438-443.

HADDAD A., TURKEWITZ A.P. (1997) Analysis of exocytosis mutants indicates close coupling between regulated secretion and transcription activation in *Tetrahymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**: 10675-80.

HALBAN, P.A., IRMINGER J-C. (1994) Sorting and processing of secretory proteins. *Biochem. J.* **299**: 1-18.

- HUTTNER W.B., GERDES H.H., ROSA P. (1991) The granin (chromogranin/secretogranin) family. *Trends Biochem Sci.* **16**: 27-30.
- HUTTNER W.B., NATORI S. (1995) Regulated secretion. Helper proteins for neuroendocrine secretion. *Curr. Biol.* **5**: 242-5.
- HUTTNER W.B., OHASHI M., KEHLENBACH R.H., BARR F.A., BAUERFEIND R., BRAUNLING O., CORBEIL D., HANNAH M., PASOLLI H.A., SCHMIDT A. (1995) Biogenesis of neurosecretory vesicles. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **60**: 315-27.
- KARGINOVA E.A., PENTZ E.S., KAZAKOVA I.G., NORWOOD V.F., CAREY R.M., GOMEZ R.A. (1997) Zis: a developmentally regulated gene expressed in juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol.* **273**: F731-8.
- KARRENBAUER A., JECKEL D., JUST W., BIRK R., SCHMIDT R.R., ROTHMAN J.E., WIELAND F.T. (1990) The rate of bulk flow from the Golgi to the plasma membrane. *Cell* **63**: 259-67.
- KATO Y., KUWABARA T., WARASHINA M., TODA H., TAIRA K. (2001) Relationships between the activities in vitro and in vivo of various kinds of ribozyme and their intracellular localization in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 15378-85.

- KELLY R.B. (1993) Storage and release of neurotransmitters. *Cell* **72**: 43-53.
- KELLY, R.B. (1985) Pathways of the protein secretion in eucaryotes. *Science* **230**: 25-31.
- KULIAWAT R., ARVAN P. (1992) Protein targeting via the "constitutive-like" secretory pathway in isolated pancreatic islets: passive sorting in the immature granule compartment. *J Cell Biol.* **118**: 521-9.
- KULIAWAT R., ARVAN P. (1994) Distinct molecular mechanisms for protein sorting within immature secretory granules of pancreatic beta-cells. *J Cell Biol.* **126**: 77-86.
- LADOMERY M., MARSHALL R., ARIF L., SOMMERVILLE J. (2000) C4SR, a novel zinc-finger protein with SR-repeats, is expressed during early development of *Xenopus*. *Gene* **256**: 293-302.
- LIANG P., PARDEE A.B. (1992) Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**: 967-71.
- LOPEZ A.J. (1998) Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annu. Rev. Genet.* **32**: 279-305.



LUSSON J., BENJANNET S., HAMELIN J., SAVARIA D., CHRETIEN M., SEIDAH N.G. (1997) The integrity of the RRGDL sequence of the proprotein convertase PC1 is critical for its zymogen and C-terminal processing and for its cellular trafficking. *Biochem. J.* **326**: 737-44.

MAINS R.E. Use of antisense RNA to block peptide-processing enzyme expression. Dans A. Ian Smith (Ed): *Methods in neurosciences. Peptidase and neuropeptide processing.* Academic Press, Californie. (1995) p.109-121.

MAINS R.E., EIPPER B.A. (1976) Biosynthesis of adrenocorticotrophic hormone in mouse pituitary tumor cells. *J. Biol. Chem.* **251**: 4115-20.

MANLEY J.L., TACKE R. (1996) SR proteins and splicing control. *Genes Dev.* **10**: 1569-79.

MATSUUCHI L., KELLY R.B. (1991) Constitutive and basal secretion from the endocrine cell line, AtT-20. *J. Cell. Biol.* **112**: 843-52.

McCRACKEN S., FONG N., YANKULOV K., BALLANTYNE S., PAN G., GREENBLATT J., PATTERSON S.D., WICKENS M., BENTLEY D.L. (1997) The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* **23**: 357-61.

MERMOUD J.E., COHEN P.T., LAMOND A.I. (1994) Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism. *EMBO J.* **13**: 5679-88.

MURRAY M.V., KOBAYASHI R., KRAINER A.R. (1999) The type 2C Ser/Thr phosphatase PP2C gamma is a pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev.* **13**: 87-97.

NAKANO M., YOSHIURA K., OIKAWA M., MIYOSHI O., YAMADA K., KONDO S., MIWA N., SOEDA E., JINNO Y., FUJII T., NIIKAWA N. (1998) Identification, characterization and mapping of the human ZIS (zinc-finger, splicing) gene. *Gene* **225**: 59-65.

NATORI S., HUTTNER W.B. (1996) Chromogranin B (secretogranin I) promotes sorting to the regulated secretory pathway of processing intermediates derived from a peptide hormone precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 4431-6.

NESTLER E.J., GREENGARD P. Protein phosphorylation and the regulation of neuronal function. Dans Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Molinoff P.B (Eds): *Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects.* Fifth edition. Raven Press, N.Y. (1993) p.469-70.

NOVICK P., FIELD C., SCHEKMAN R. (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21**: 205-15.

OHASHI M., HUTTNER W.B. (1994) An elevation of cytosolic protein phosphorylation modulates trimeric G-protein regulation of secretory vesicle formation from the trans-Golgi network. *J. Biol. Chem.* **269**: 24897-905.

ORCI L., Ravazzola M., Amherdt M., Perrelet A., Powell S.K., Quinn D.L., Moore H.P. (1987) The trans-most cisternae of the Golgi complex: a compartment for sorting of secretory and plasma membrane proteins. *Cell* **51**: 1039-51.

QIAN Y., VARLAMOV O., FRICKER L.D. (1999) Glu300 of rat carboxypeptidase E is essential for enzymatic activity but not substrate binding or routing to the regulated secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **274**: 11582-6.

QUINN D., ORCI L., RAVAZZOLA M., MOORE H.P. (1991) Intracellular transport and sorting of mutant human proinsulins that fail to form hexamers. *J. Cell. Biol.* **113**: 987-96.

REZNIK S.E. & FRICKER L.D., soumis

ROY G., ANANVORANICH S., PERREAULT J.P. (1999) Delta ribozyme has the ability to cleave in transan mRNA. *Nucleic Acids Res.* **27**: 942-8.

SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manuel.* Second edition. Cold Spring Harbor laboratory press, New York, N.Y.

SCHÄFER, M.K.H., DAY, R. (1994) In situ hybridization techniques to study processing enzyme expression at the cellular level. *Methods, Enzymol.* **23**: 16-44.

SCHEKMAN R. (1985) Protein localization and membrane traffic in yeast. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **1**: 115-43.

SEIDAH N.G., MARCINKIEWICZ M., BENJANNET S., GASPAR L., BEAUBIEN G. MATTEI M.G., LAZURE C., MBIKAY M., CHRÉTIEN M. (1991) Cloning and primary sequence of a mouse candidate pro-hormone convertase PC1 homologous to PC2, furin and Kex 2: Distinct chromosomal localization and mRNA distribution in brain and pituitary as compared to PC2. *Mol. Endocrinol.* **5**: 111-122.

SHENNAN K.I., TAYLOR N.A., DOCHERTY K. (1994) Calcium- and pH-dependent aggregation and membrane association of the precursor of the prohormone convertase PC2. *J. Biol. Chem.* **269**: 18646-50.

- SHI Y., BERG J.M. (1995) Specific DNA-RNA hybrid binding by zinc finger proteins. *Science*. **268**: 282-4.
- SIDDHANTA A., SHIELDS D. (1998) Secretory vesicle budding from the trans-Golgi network is mediated by phosphatidic acid levels. *J. Biol. Chem.* **273**: 17995-8.
- SMITH C.W., PATTON J.G., NADAL-GINARD B. (1989) Alternative splicing in the control of gene expression. *Annu. Rev. Genet.* **23**: 527-77.
- SMITH C.W., VALCARCEL J. (2000) Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 381-8.
- SOLLNER T., WHITEHEART S.W., BRUNNER M., ERDJUMENT-BROMAGE H., GEROMANOS S., TEMPST P., ROTHMAN J.E. (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*. **362**: 318-24.
- THIELE C., GERDES H.H., HUTTNER W.B. (1997) Protein secretion: puzzling receptors. *Curr. Biol.* **7**: R496-500.
- THIELE C., HUTTNER W.B. (1998) The disulfide-bonded loop of chromogranins, which is essential for sorting to secretory granules, mediates homodimerization. *J. Biol. Chem.* **273**: 1223-31.

TIDD D.M. Dans J.A.H. Murray (Ed): Antisense RNA and DNA. Wiley. N.Y. (1992)  
p. 227

TOOZE J., TOOZE S.A., FULLER S.D. (1987) Sorting of progeny coronavirus from condensed secretory proteins at the exit from the trans-Golgi network of AtT20 cells. *J. Cell. Biol.* **105**: 1215-26.

TOOZE S.A., HUTTNER W.B. (1990) Cell-free protein sorting to the regulated and constitutive secretory pathways. *Cell* **60**: 837-47.

TOOZE, S.A. (1991) Biogenesis of secretory granules. Implications arising from the immature secretory granule in the regulated pathway of secretion. *FEBS Lett.* **285**: 220-224.

TOOZE, S.A. (1998) Biogenesis of secretory granules in the *trans*-Golgi network of neuroendocrine and endocrine cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1404**: 231-244.

TOULME J.J. Dans J.A.H. Murray (Ed): Antisense RNA and DNA. Wiley. N.Y. (1992) p. 175.

VIEAU D, ROJAS-MIRANDA A., VERLEY J.M., LENNE F., BERTAGNA X (1991)  
The secretory granule peptides 7B2 and CCB are sensitive biochemical markers of neuro-endocrine bronchial tumours in man. *Clin. Endocrinol.* **35**: 319-25.

- WANG Y., THIELE C., HUTTNER W.B. (2000) Cholesterol is required for the formation of regulated and constitutive secretory vesicles from the trans-Golgi network. *Traffic* **1**: 952-62.
- WEBER T., ZEMELMAN B.V., MCNEW J.A., WESTERMANN B., GMACHL M., PARLATI F., SOLLNER T.H., ROTHMAN J.E. (1998) SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**: 759-72.
- WIEDENMANN B., HUTTNER W.B. (1989) Synaptophysin and chromogranins/secretogranins--widespread constituents of distinct types of neuroendocrine vesicles and new tools in tumor diagnosis. *Virchows Arch. B Cell. Pathol.* **58**: 95-121.
- WIELAND F.T., GLEASON M.L., SERAFINI T.A., ROTHMAN J.E. (1987) The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *Cell* **50**: 289-300.
- WOLFE S.A., NEKLUDOVA L., PABO C.O. (2000) DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**: 183-212.
- XIAO S.H., MANLEY J.L. (1998) Phosphorylation-dephosphorylation differentially affects activities of splicing factor ASF/SF2. *EMBO J.* **17**: 6359-67.

XIAO S.H., MANLEY J.L. (1997) Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes Dev.* **11**: 334-44.

YEAKLEY J.M., TRONCHERE H., OLESEN J., DYCK J.A., WANG H.Y., FU X.D. (1999) Phosphorylation regulates in vivo interaction and molecular targeting of serine/arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *J. Cell Biol.* **145**: 447-55.

YOO S.H., ALBANESI J.P. (1990) Ca<sup>2+</sup>-induced conformational change and aggregation of chromogranin A. *J. Biol. Chem.* **265**: 14414-21.

YOUNG R.A. (2000) Biomedical discovery with DNA arrays. *Cell.* **102**: 9-15.

YURYEV A., PATTURAJAN M., LITINGTUNG Y., JOSHI R.V., GENTILE C., GEBARA M., CORDEN J.L. (1996) The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II interacts with a novel set of serine/arginine-rich proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **93**: 6975-80.

ZAHLER A.M., LANE W.S., STOLK J.A., ROTH M.B. (1992) SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev.* **6**: 837-47.