

Signaux moléculaires de tri des protéines dans les cellules épithéliales : implication du domaine transmembranaire et des processus de maturation post-traductionnels

par Tounsia Ait Slimane, Christelle Lenoir, Catherine Sapin, Michèle Maurice & Germain Trugnan

CJF-INSERM 96-07, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, Faculté de Médecine Saint-Antoine, 27, rue de Chaligny, 75012 Paris

Reçu le 15 avril 1999

RÉSUMÉ

Le tri des protéines dans les cellules épithéliales représente le processus fondamental de la mise en place et du maintien de la polarité fonctionnelle des cellules épithéliales. Des processus nombreux et interdépendants sont mis en œuvre pour réaliser ces étapes spécialisées du trafic intracellulaire. Les dernières données de la littérature sur les composantes de ces voies de trafic seront présentées et discutées dans la première partie de cet article. Les signaux portés par les protéines pour spécifier leur destination représentent l'un des éléments majeurs de l'adressage. Les signaux basolatéraux sont pour l'essentiel connus et relativement univoques, alors que les signaux apicaux sont quant à eux discutés et multiples en terme de nature moléculaire. Le cas des signaux portés par la dipeptidyl peptidase IV (DPP

IV/CD26) est particulièrement intéressant à aborder, car cette protéine rejoint le pôle apical des cellules épithéliales selon des voies qui varient avec le type cellulaire considéré. Ces voies de trafic variables et complexes qui conduisent à des localisations temporaires de la DPP IV autres que la bordure en brosse apicale sont associées à des fonctions diverses : digestion enzymatique, liaison de protéines circulantes, interaction avec la matrice extracellulaire. Nous avons entrepris l'étude de ces signaux et nous décrivons ici le rôle potentiel de la glycosylation et celui du domaine transmembranaire dans l'adressage apical de la DPP IV, en insistant sur les capacités des différentes machineries cellulaires à interpréter ces signaux.

SUMMARY Molecular signals involved in protein sorting in epithelial cells : involvement of the transmembrane domain and of posttranslational processes

Protein sorting in epithelial cells is the major event that drive the onset and the maintenance of the functional cell polarity. A lot of interdependent steps are involved in protein sorting and targeting. Recent data describing the last results obtained in this field will be reviewed in the first part of this article. Molecular signals harbored by proteins to specify their destination are thought to be the driven force to sort given protein in a given pathway. The basolateral targeting signals so far identified are known for several years and are of the same nature, whereas apical targeting signals are still discussed and are of diverse molecular nature. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) targeting signals have not been described

so far and it will be interesting to study these signals, since the protein reach the apical membrane of epithelial cells through different pathways that strongly depend on the cell type considered. These different pathways result in DPP IV membrane localizations that may explain the multifunctional properties of DPP IV such as enzymatic digestion, interaction with extracellular matrix proteins, capture and transport of circulating proteins. We have undertaken the study of DPP IV molecular targeting signals and we will described here how the transmembrane domain and the glycosylation of the ectodomain may be involved in DPP IV apical targeting, with a special reference to the cell type specificity.



INTRODUCTION

L'adressage des protéines dans les cellules épithéliales est le processus fondamental qui permet la mise en place puis le maintien de leur polarité. Cette polarité est indispensable à la réalisation de la plupart des fonctions spécialisées de ces cellules : fonctions de protection, fonctions de transport. Il s'agit, en effet, de permettre à une protéine donnée d'être insérée soit dans la membrane apicale, c'est-à-dire vers le pôle qui est, en général, en contact avec l'extérieur (la lumière intestinale, la bile, l'urine etc...), ou dans la membrane basolatérale qui est tournée vers l'intérieur c'est-à-dire le compartiment vasculaire. Parallèlement les protéines sécrétoires peuvent être sécrétées de manière polarisée pour jouer leur rôle dans l'un des deux compartiments, luminal ou séreux.

L'arrivée d'une protéine structurale ou fonctionnelle dans un compartiment de la membrane plasmique est l'aboutissement d'un cheminement complexe. Pour les protéines transmembranaires ou sécrétoires, la route commence dans le réticulum endoplasmique rugueux après synthèse sur les ribosomes et entrée dans la lumière du réticulum. Les protéines vont ensuite suivre la voie d'exocytose à travers les différentes citernes de l'appareil de Golgi, puis, du réseau trans golgien. A ce niveau, et dans certains types cellulaires dont les cellules MDCK d'origine rénale, les protéines vont subir un premier tri qui va permettre de sélectionner les protéines allant soit vers la membrane apicale, soit vers la membrane basolatérale, soit vers les lysosomes, soit dans la voie de sécrétion régulée. Dans d'autres types cellulaires, ce tri est complété par un second tri, au niveau de la membrane basolatérale, qui va permettre à certaines protéines d'être réadressées vers le pôle apical. C'est probablement la situation observée dans les cellules de type Caco-2. Enfin il existe des situations dans lesquelles le tri semble être exclusivement opéré au niveau de la membrane basolatérale puisque la quasi-totalité des protéines des membranes plasmiques y sont adressées puis le cas échéant triées vers le domaine apical. Ce dernier schéma décrit la situation observée dans les hépatocytes.

L'HYPOTHÈSE DES SIGNAUX

Quelle que soit la route empruntée, il est nécessaire de faire l'hypothèse que ces différentes voies sont basées (a) sur l'existence de signaux portés par chaque protéine et (b) sur les interactions de ces signaux avec des machineries cellulaires complexes de tri.

Un certain nombre de signaux moléculaires ont été identifiés et en particulier il est maintenant admis qu'une tyrosine et/ou un signal dileucine (ou valine-leucine) placés dans un environnement donné et dans la queue cytoplasmique de la protéine considérée, constituent un signal fort d'adressage basolatéral (35). Encore faut-il tenir compte de la position de ce signal par rapport à la membrane et il a été montré que le signal n'était plus correctement interprété lorsque sa position par rapport à la membrane change (37).

Par contre la situation reste moins claire en ce qui concerne les signaux apicaux bien qu'un nombre relativement important de travaux y aient été consacrés durant ces dernières années. Il semble acquis que la présence d'une « ancre glycosyl-phosphatidylinositol » (GPI), représente un signal d'adressage apical. Ce motif est branché de manière co-translationnelle sur une séquence consensus C-terminale des protéines concernées et conduit à la ségrégation de ces protéines vers les voies d'adressage apical dans la plupart des types cellulaires concernés (27). Cependant, il a été montré que cette conclusion n'était pas univoque : dans au moins un type cellulaire épithélial polarisé, les cellules FRT thyroïdiennes, la majorité des protéines GPI est retrouvée à la membrane basolatérale (53). D'autres travaux plus récents ont suggéré que les glycanes pourraient se comporter comme des signaux d'adressage apicaux. Un certain nombre d'études ont en effet montré que des protéines non glycosylées sur lesquelles était greffé un ou plusieurs sites de N-glycosylation présentaient un adressage progressivement plus apical au fur et à mesure que les glycanes étaient ajoutés (15). A l'inverse, d'autres études ont visé la suppression de sites de N-glycosylation soit par mutagenèse dirigée des sites consensus de glycosylation (17) soit par utilisation de drogues bloquant la glycosylation (tunicamycine, par exemple). Ces études ont montré que la déglycosylation de certaines protéines réduisait leur expression apicale (36). Cette conclusion ne peut cependant être généralisée puisque la déglycosylation d'autres protéines conduit non pas à un défaut d'adressage mais à une dégradation précoce de la protéine qui n'atteint pas sa conformation stable. D'autres études encore plus récentes suggèrent que la O-glycosylation, elle aussi pourrait jouer un rôle dans l'adressage apical. Ainsi, il a été montré que le récepteur humain des neurotrophines (hNGF-R) n'était plus correctement adressé soit lorsqu'on supprimait la totalité de la séquence portant les sites de O-glycosylation, soit lorsqu'on mutait un à un les sites de O-glycosylation potentiels (38, 51). Cet ensemble de résultats concernant la glycosylation a conduit à l'hypothèse selon laquelle des lectines spécifiques pourraient guider les protéines vers la voie apicale (16). Une autre piste concerne la découverte du rôle potentiel des domaines transmembranaires d'un certain nombre de protéines dans leur adressage apical. Les études qui ont été consacrées à ce sujet concernent essentiellement des protéines virales exprimées dans des cellules polarisées après infection ou transfection (22, 19). Les hypothèses qui sont avancées pour rendre compte de ces observations restent contradictoires. Certains auteurs suggèrent qu'il pourrait s'agir d'interactions préférentielles de ces domaines transmembranaires avec des microdomaines lipidiques enrichis en cholestérol et en sphingolipides, appelés rafts (42). A l'appui de cette hypothèse, les auteurs montrent que seules des mutations concernant la partie du domaine transmembranaire en contact avec le feuillet externe de la bicouche membranaire sont capables de modifier l'adressage apical de la protéine.

D'autres travaux suggèrent enfin que la queue cyto-

plasmique des protéines pourrait posséder un signal apical. Ces derniers travaux, basés sur l'étude détaillée de la rhodopsine (7), montrent que la suppression de la queue cytoplasmique de cette protéine induit une délocalisation sur l'ensemble de la membrane et qu'à l'inverse, une construction contenant une trentaine d'acides aminés de la queue cytoplasmique de la rhodopsine suffisait à adresser vers le pôle apical une protéine normalement non polarisée.

Cette multiplicité des signaux apicaux, comparée à la grande simplicité des signaux basolatéraux, traduit probablement le caractère pluriel des membranes apicales qui diffèrent très fortement selon le tissu et le type cellulaire considéré. La caractérisation des signaux apicaux et de leurs partenaires moléculaires dans les cellules reste donc un axe de recherche très actif.

LES SPÉCIFICITÉS DES MACHINERIES DE TRAFIC ET DE TRI

Les connaissances sur les composantes moléculaires de la machinerie de tri ont considérablement progressé au cours des dernières années. Les spécificités apicales de cette machinerie ont fait l'objet d'articles récents (12, 29) mais restent à caractériser de manière plus fine. La spécificité des machineries de trafic est assurée par plusieurs familles de molécules : les SNAREs, les protéines de manteau et assimilées (COP, clathrine, cavéolines), les adaptateurs (AP) et les petites protéines G rab. De nombreux couples de t- et v-SNAREs ont été identifiés pour la plupart des étapes de trafic entre les différents compartiments de la voie de sécrétion (exocytose) et d'endocytose (41). La démonstration de l'implication de ces protéines dans une « machinerie minimale » a été réalisée (49). La localisation et le rôle des protéines de manteau et des adaptateurs ont été largement étudiées (26), et de nouvelles espèces ont été découvertes (11). Au cours des toutes dernières années, il a été possible de caractériser de nombreuses protéines impliquées dans l'activation et le contrôle de l'activité des protéines rab dans diverses étapes du trafic (33). La connexion entre cette mécanique particulière et le cytosquelette est maintenant réalisée grâce à la découverte de moteurs moléculaires particuliers qui relient les protéines rab et les microtubules.

Dans cet édifice moléculaire complexe, de nombreux points restent obscurs en ce qui concerne les étapes spécifiques du tri polarisé des protéines. Un couple de protéines t-SNARE (Syntaxin 3, SNAP 23) a été identifié du côté apical où il participe au contrôle de la fusion spécifique avec la membrane apicale (12, 29). Le partenaire v-SNARE semble avoir été identifié très récemment (24). En ce qui concerne les protéines de manteau, il n'existe pas de données claires sur leur distribution polarisée ou sur leur participation différentielle au trafic polarisé. Cependant des travaux récents indiquent que les cavéolines participent très activement au tri polarisé (44). Ces protéines sont capables de recruter des assemblages lipi-

diques de composition particulière (43) qui peuvent participer à des structures localisées soit au pôle basolatéral des cellules (cavéoles), soit au pôle apical (rafts). Les mécanismes par lesquels cette ségrégation participe effectivement au tri des protéines restent obscurs. En ce qui concerne les protéines rab, des travaux très récents suggèrent que rab 11, 17 et 25 pourraient être impliquées dans la voie apicale et/ou dans la transcytose basolatérale apicale (5, 6, 18, 20). Une intégration semble être réalisée entre la nature des vésicules spécifiques du pôle apical et la présence de protéines impliquées dans la machinerie de fusion puisque les SNAREs apicales ont été récemment localisées sur les rafts (24).

ÉTUDE DU TRAFIC D'UNE HYDROLASE PARTICULIÈRE, LA DPP IV

La dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) est une enzyme initialement décrite dans les bordures en brosse rénales et intestinales (21). A la suite du clonage de son ADNc (9, 32), il est apparu que cette protéine était en fait ubiquitaire (45) et était activement impliquée dans de très nombreuses fonctions liées ou non à son activité enzymatique (46). En clivant des liaisons X-pro en position N-terminale sur de nombreux substrats, dont les cytokines et des facteurs de croissance, la DPP IV semble impliquée dans le contrôle de processus de prolifération et de différenciation. Elle participe également au clivage d'un récepteur de chémokine, CCR4, et à ce titre au contrôle de l'entrée de HIV dans de nombreuses cellules (40). Par ailleurs la DPP IV est la protéine de liaison de l'ADA et interagit avec le transport et l'expression de surface de cette protéine (14), sans que ces fonctions dépendent de l'activité enzymatique. De même, la DPP IV est impliquée dans l'adhésion cellulaire sur la matrice extracellulaire, grâce à une interaction avec le collagène (28). Ces nombreuses fonctions imposent à la DPP IV d'être localisée de manière strictement contrôlée mais aussi dynamique dans les différents compartiments subcellulaires et membranaires. C'est pourquoi l'étude de son trafic et de ses signaux revêt un grand intérêt.

Selon les tissus et les types cellulaires considérés, la DPP IV suit des voies de trafic variées. En ce qui concerne les cellules épithéliales polarisées, la protéine est localisée sur le pôle apical des cellules mais elle y arrive par des voies de trafic direct, indirect ou mixte. Dans les cellules MDCK d'origine rénale, la DPP IV suit pour l'essentiel une voie directe du réseau trans-golgien (TGN) vers la membrane apicale (4, 31). Dans les cellules hépatiques, la DPP IV est adressée en totalité au pôle basolatéral et rejoint le pôle apical par transcytose (3). Dans les cellules Caco-2, d'origine intestinale, le trafic de la protéine est mixte avec environ 30-40 % de la protéine arrivant au pôle apical par voie directe le reste par transcytose (2, 25, 34). L'analyse plus détaillée de la situation indique cependant qu'il ne faut pas caricaturer ces caractéristiques de trafic. Ainsi, dans une autre lignée d'origine rénale, LLCPK-1, la DPP IV suit

la même voie que dans les cellules Caco-2 intestinales (30). Dans les cellules thyroïdiennes FRT, le trafic dépend de l'état de polarisation cellulaire : transcytose sur cellules jeunes et adressage direct sur cellules fortement polarisées (52). Une telle variabilité des voies de trafic rend compte non seulement de la diversité des machineries cellulaires de tri, mais aussi de la complexité des signaux portés par la DPP IV. Si les voies de trafic portées par la DPP IV sont relativement bien étudiées, les signaux sont restés longtemps obscurs. La transfection d'une forme soluble de DPP IV rendue sécrétoire par délétion de ses domaines cytoplasmique et transmembranaire a été réalisée dans des cellules MDCK (50). Cette étude a démontré que la sécrétion de cette protéine est très majoritairement apicale. Ce résultat est à rapprocher des données obtenues après transfection dans MDCK d'autres formes solubles d'hydrolases de la bordure en brosse (8, 39, 48) et sur l'étude d'autres protéines sécrétoires endogènes (1,47). Ce résultat indique donc que l'ectodomaine possède un signal apical, sans que ce signal ait été plus clairement identifié en terme moléculaire. Dans le même temps, il a été suggéré que la N- ou la O-glycosylation des protéines pourrait être un signal apical (voir ci-dessus). C'est pourquoi nous avons émis l'hypothèse que la glycosylation de l'ectodomaine de la DPP IV pourrait être le ou l'un des signaux de son adressage apical.

LA GLYCOSYLATION DE LA DPP IV ET SON ADRESSAGE APICAL

Pour aborder la question du rôle de la glycosylation dans l'adressage de la DPP IV dans les cellules polarisées nous avons produit des clones stables de cellules MDCK exprimant une forme soluble de DPP IV murine. Ce choix d'espèce vient du fait que nous disposons d'anticorps monoclonaux dirigés contre la DPP IV murine qui ne croisent pas avec la DPP IV humaine ou canine. Nous avons vérifié que ces clones stables sécrétaient la DPP IV du côté apical comme montré préalablement avec la forme soluble de DPP IV de Rat. Nous avons ensuite traité ces cellules par deux drogues agissant sur la glycosylation des protéines, la tunicamycine (TM) et le benzyl-N-acétyl-galactosamine (BGN). Ces deux composés ont produit des résultats très différents.

En résumé, la tunicamycine, inhibiteur puissant de la première étape de la N-glycosylation, bloque la sécrétion de la quasi-totalité de la DPP IV néosynthétisée. Ceci est dû à une dégradation précoce de la protéine, consécutive à son passage dans les systèmes de contrôle de qualité du RER. La non-glycosylation de la protéine ne doit pas lui permettre d'atteindre une conformation compatibles avec sa progression dans la voie de sécrétion. Une petite fraction de la protéine échappe à l'effet inhibiteur de la tunicamycine et est sécrétée tout à fait normalement, confirmant l'interprétation ci-dessus. Il est à noter que le groupe de Reutter a montré lui aussi, dans les cellules CHO, que la N-glycosylation de la DPP IV était néces-

saire à son bon repliement et plus particulièrement, qu'un seul site de glycosylation chez le Rat était critique (13). Nous avons également montré que la DPP IV est une protéine sensible à sa conformation pour les étapes précoces de sa sécrétion (10). Cette propriété fait qu'il n'a pas été possible de conclure quant au rôle de la N-glycosylation dans le trafic de cette protéine.

En ce qui concerne le BGN, la situation est totalement différente. Cette drogue a pour effet de diminuer la quantité de protéine néosynthétisée qui est sécrétée du côté apical et d'augmenter de manière parallèle l'arrivée basolatérale de la DPP IV soluble. Une analyse détaillée des modifications induites par le BGN montre que la protéine synthétisée sous BGN migre plus rapidement que le témoin. Ce décalage est dû à la glycosylation puisque, après digestion par endo H et endo F, la protéine a la même taille apparente dans les deux cellules témoins et traitées. Le traitement par la neuraminidase montre de plus que la DPP IV soluble est sialylée dans les cellules témoins et désialylée dans les cellules traitées par le BGN. Il n'est pas encore possible de savoir si ces modifications de la glycosylation concerne les N- et/ou les O-glycanes. Le BGN en effet a été décrit comme une drogue affectant les O-glycanes mais, d'un autre côté, la DPP IV n'est pas connue pour posséder des sites de O-glycosylation. Des expériences complémentaires devront tenter de préciser ce point. Quoi qu'il en soit, ce résultat suggère fortement que le rôle de la glycosylation dans l'adressage ne serait pas seulement lié à la présence de chaînes glycaniques mais dépendrait aussi de la nature des sucres concernés. Au total ce résultat est en faveur de l'existence d'un signal d'adressage apical présent sur l'ectodomaine de la DPP IV et associé à sa glycosylation.

Dans les cellules Caco-2, l'utilisation du BGN conduit approximativement au même résultat. La modification de la glycosylation périphérique de l'ectodomaine de la DPP IV conduit à une sécrétion basolatérale accrue et à la diminution de la sécrétion apicale. Il est donc clair que les glycanes participent au contrôle de l'adressage apical de cette protéine. Il est cependant intéressant de noter que, dans le cas des cellules Caco-2, l'ectodomaine est principalement sécrété du côté basolatéral, même en présence de chaînes glycaniques normales. Ceci signifie que 1) la présence de glycanes sur l'ectodomaine ne peut expliquer, à elle seule, l'adressage de la DPP IV vers le pôle apical ; 2) l'arrivée apicale de la DPP IV dans les cellules Caco-2, dépend d'un autre signal qui pourrait être porté par le domaine transmembranaire de la protéine.

Des expériences en cours tentent de démontrer ce point en étudiant le devenir de constructions de protéines chimériques après transfection stable dans les cellules Caco-2 et MDCK. Les premiers résultats concernent des chimères contenant des fragments de la région transmembranaire de la DPP5 IV et une protéine rapporteur : la GFP. Ces expériences indiquent que la région transmembranaire de la DPP IV contient une information de criblage apical qui est elle aussi interprétée de manière différente selon le type cellulaire. Il reste à préciser si cette région transmembranaire peut promouvoir à elle seule une transcytose ou bien Si elle assure un adressage

direct du lieu de tri vers la membrane apicale. L'utilisation de la GFP et les possibilités de quantification ouvertes par cette technique sont prometteuses.

CONCLUSION

Des progrès considérables ont été effectués au cours des dernières années pour l'identification des signaux impliqués dans l'adressage polarisé des protéines. En particulier la notion de signal moléculaire est maintenant reconnue et de nombreuses protéines ont été étudiées et identifiées comme porteuses d'un signal basolatéral. La signalisation du trafic apical reste encore discutée mais commence à être disséquée au niveau moléculaire. En particulier, la machinerie apicale des cellules MDCK semble reposer sur l'existence de protéines SNAREs particulières et sur l'existence de microdomaines membranaires particuliers, les « rafts ». La variabilité des modalités d'adressage apical est probablement liée à la multiplicité et à la spécificité fonctionnelle de chaque épithélium. De plus, si les protéines de la machinerie de tri et de trafic sont communes aux différents épithéliums, il n'existe aucune donnée sur l'association de ces protéines avec les structures vésiculaires dans le contexte des différents épithéliums. Ainsi, l'immense majorité des études menées jusqu'ici utilise le modèle cellulaire MDCK dont on sait qu'il ne correspond pas à la situation rencontrée dans l'épithélium intestinal ou thyroïdien ou hépatique, voire à la situation rencontrée dans le rein. Ce constat doit conduire à développer des études qui concerneront les interactions entre les signaux d'adressage des protéines et les machineries de tri en prenant en compte la diversité des cellules épithéliales.

BIBLIOGRAPHIE

- Appel D. & Koch-Brandt C., Sorting of a secretory protein (gp80) to the apical surface of Caco-2 cells. *J. Cell Sci.*, 1994, Feb.; 107 (P12), 553-559.
- Baricault L., Fransen J. A. M., Garcia M., Sapin C., Codogno P., Ginsel L. A. & Trugnan G., Rapid sequestration of DPP IV/CD26 and other cell surface proteins in an autophagic-like compartment in Caco-2 cells treated with forskolin. *J. Cell Sci.*, 1995, 108, 2109-2121.
- Bartles J. R., Fetacci H. M., Stieger B. & Hubbard A. L., Biogenesis of the rat hepatocyte plasma membrane *in vivo* : comparison of the pathways taken by apical and basolateral proteins using subcellular fractionation. *J. Cell Biol.*, 1987, 105, 1241-1251.
- Casanova J. E., Mishumi Y., Ikehara Y., Hubbard A. L. & Mostov K. F., Direct apical sorting of rat liver dipeptidyl-peptidase-IV expressed in Madin-Darby Canine Kidney cells. *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 24428-24432.
- Casanova J. E., Wang X., Kumar R., Bhartur S. G., Navarre J., Woodrum J. E., Altschuler Y., Ray G. S. & Goldenring J. R., Association of Rab25 and Rab11a with the apical recycling system of polarized Madin-Darby canine kidneys cells. *Moll. Biol. Cell.*, 1999, 10 (1), 47-61.
- Chen W., Feng Y., Chen D., Wandinger-Ness A., Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Mol. Biol. Cell.*, 1998 (11), 3241-3247.
- Chuang J. Z. & Sung C. H., The cytoplasmic tail of Rhodopsin acts as a novel apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.*, 1998, 142, 1245-1256.
- Corbeil D., Boileau G., Lemay G. & Crine P., Expression and polarized apical secretion in Madin-Darby Canine Kidney cells of a recombinant soluble form of Neutral endopeptidase lacking the cytosolic and transmembrane domains. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 2798-2801.
- Darmoul D., Lacasa M., Baricault L., Marguet D., Sapin C., Trotot P., Barbat A. & Trugnan G., Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) gene expression in enterocyte-like colon cancer cell lines HT-29 and Caco-2 cloning of the complete human coding sequence and changes of dipeptidyl peptidase IV mRNA levels during cell differentiation. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 4824-4833.
- David F., Baricault L., Sapin C., Gallet X., Marguet D., Thomas-Soumarmon A. & Trugnan G., Reduced cell surface expression of a mutated Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV/CD26) correlates with the generation of a β strand in its C-terminal domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996, 222, 833-838.
- Dell'Angelica E. C., Mullins C. & Bonifacio J. S., AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274 (11), 7278-7285.
- Delgrossi M. H., Breuza L., Mirre C., Chavrier P. & Le Bivic A., Human syntaxin 3 is localized apically in human intestinal cells. *J. Cell. Sci.*, 1997, 110, 2207-2214.
- Fan H., Meng W., Kilian C., Grams S. & Reutter W., Domain-specific N-glycosylation of the membrane glycoprotein dipeptidylpeptidase IV (CD26) influences its subcellular trafficking, biological stability, enzyme activity and protein folding. *Eur. J. Biochem.*, 1997, 246 (1), 243-251.
- Franco R., Valenzuela A., Lluís C. & Blanco J., Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunol. Rev.*, 1998, 161, 27-42.
- Fiedler K. & Simons K., The role of N-glycans in the secretory pathway. *Cell*, 1995, 81, 309-312.
- Fiedler K. & Simons K., Characterization of VIP36, and animal lectin homologous to leguminous lectins. *J. Cells Sci.*, 1996, 109, 271-276.
- Gut A., Kappeler F., Hyka N., Balda M. S., Hauri H. P. & Matter K., Carbohydrate-mediated Golgi to cell surface transport and apical targeting of membrane proteins. *EMBO J.*, 1998, 17, 1919-1929.
- Hansen G. H., Niels-Christiansen L. L., Immerdal I., Hunziker W., Kenny A. J. & Danielsen E. M., Transcytosis of immunoglobulin A in the mouse enterocyte occurs through glycolipid rab17 and rab17-containing compartments. *Gastroenterology*, 1999, 116 (3), 610-622.
- Huang X. F., Compans R. W., Chen S., Lamb R. A. & Arvan P., Polarized apical targeting directed by the signal/anchor region of simian virus 5 hemagglutinin-neuraminidase. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 27598-27604.
- Hunziker W. & Peters P. J., Rab17 localizes to recycling endosomes and regulates receptor-mediated transcytosis in epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 1998, Jun 19; 273 (25), 15734-15741.
- Kenny A. J. & Maroux S., Topology of microvillar membrane hydrolases of kidney and intestine. *Physiol. Rev.*, 1982, 62, 91-128.
- Kundu A., Avalos R. T., Sanderson C. M. & Naya, D. P., Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J. Virol.*, 1996, 70, 6508-6515.
- Lafont F., Lecat S., Verkade P. & Simons K., Annexin XIIIb associates with lipid microdomains to function in apical delivery. *J. Cell Biol.*, 1998, 142, 1413-1427.

24. Lafont F., Verkade P., Galli T., Wimmer C., Louvard D. & Simons K., Rafi association of SNAP receptors acting in apical trafficking in Madin-Darby canine kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96 (7), 3734-3738.
25. Le Bivic A., Quaroni A., Nichol, B. & Rodriguez-Boulan E., Biogenetic pathways of plasma membrane proteins in Caco-2, a human intestinal epithelial cell line. *J. Cell Biol.*, 1990, 111, 1351-1361.
26. Le Borgne R. & Hoflack B, Mechanisms of protein sorting and coat assembly : insights from the clathrin-coated vesicle pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1998, 4, 499-503.
27. Lisanti M. P., Le Bivic A., Sargiacomo M. & Rodriguez-Boulan E., Steady-state distribution and biogenesis of endogenous Madin-Darby canine kidney glycoproteins evidence for intracellular sorting and polarized celi surface delivery. *J. Cell Biol.*, 1989, 109, 2117-2127.
28. Loster K., Zeilinger K., Schuppan D. & Reutter W., The cysteine-rich region of dipeptidyl peptidase IV (CD 26) is the collagen-binding site. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1995, 217 (1), 341-348.
29. Low S. H., Chapin S.J., Weimbs T., Komuves L. G., Bennett M. K. & Mostov K. E., Differential localization of syntaxin isoforms in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol. Biol. Cell*, 1996, 7, 2007-2018.
30. Low S. H., Wong S. H., Tang B. L. & Hong W. Involvement of both vectorial and transcytotic pathways in the preferential apical cell surface localization of rat dipeptidyl peptidase IV in transfected LLC-PKI cells. *J. Biol. Chem.*, 1991a, 266, 19710-19716.
31. Low S. H., Wong S. H., Tang B. L., Subramaniam V. N. & Hong W., Apical celi surface expression of rat dipeptidyl peptidase-IV in transfected Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.*, 1991b, 266, 13391-13396.
32. Marguet D., Bernard A. M., Vivier I., Darmoul D., Naquet, P. and Pierres, M. cDNA cloning for mouse thymocyte-activating molecule. A multifunctional ecto dipeptidyl peptidase IV (CD26) included in a subgroup of serine proteases. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 2200-2208.
33. Martinez O. & Goud B. Rab proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1998, Aug. 14, 1404 (12) : 101-12
34. Matter K., Brauchbar M., Bucher K. & Hauri H. P., Sorting of endogenous plasma membrane proteins occurs from two sites in cultured human intestinal epithelial cells (Caco-2). *Cell*, 1990, 60, 429-437.
35. Matter K., Yamamoto E. M. & Mellman I., Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J. Cell Biol.*, 1994, 126, 991-1004.
36. Miura S., Erickson R. H., Song I. S. & Kim Y. S., *In vivo* effect of tunicamycin on the expression of rat small intestinal brush border membrane glycoproteins and glycoenzymes. *Biochem. Pharmacol.*, 1988, Nov. 1, 37 (21), 4081-4088.
37. Monlauzeur L., Rajasekaran A., Chao M., Rodriguez-Boulan E. & Le Bivic A., A cytoplasmic tyrosine is essential for the basolateral localization of mutants of the human nerve growth factor receptor in Madin-Darby canine kidney celis. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270 (20), 12219-12225.
38. Monlauzeur L., Breuza L. & Le Bivic A., Putative O-glycosylation sites and a membrane anchor are necessary for apical delivery of the human neurotrophin receptor in Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 30263-30270.
39. Mostov K. E., Breitfeld P. & Harris J. M., An anchor-minus form of the polymeric immunoglobulin receptor is secreted predominantly apically in Madin-Darby Canine Kidney cells. *J. Cell Biol.*, 1987, 105, 2031-2036.
40. Proost P., De Meester I., Schols D., Struyf S., Lambeir A. M., Wuyts A., Opdenakker G., De Clercq E., Scharpe S. & Van Damme J., Amino-terminal truncation of chemokines by CD26/dipeptidyl-peptidase IV. Conversion of RANTES into a potent inhibitor of monocyte chemotaxis and HIV-1-infection. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273 (13), 7222-7227.
41. Rothman J. E. & Wieland F. T., Protein sorting by transport vesicles. *Science*, 1996, 272 (5259), 227-234.
42. Scheiffele P., Roth M.G. & Simons, K., Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *EMBO J.*, 1997, 16, 5501-5508.
43. Scheiffele P., Verkade P., Fra AM, Virta, H, Simons, K, Ikonen E. Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells. *J. Cell Biol.*, 1998, 140 (4), 795-806.
44. Simons K. & Ikonen E., Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 1997, 387, 569-572.
45. Trugnan G., Baricault L., David F., Garcia C. & Sapin C., Control of dipeptidyl peptidase JVICD26 cell surface expression in intestinal cells. In DPP IV-CD26, Fleischer ed., R. Landes Company, Austin, USA, 1995, 79-89 A.
46. Trugnan G., Baricault L., Ait-Slimane T., David F. & Sapin C., Dipeptidyl peptidase-IV (DPP IV/CD26) : biochemistry and control of celi surface expression. In Kenny A. J. & Boustead C. M. (eds), *Cell surface peptidases*. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford UK, 1997, pp. 203-217.
47. Urban J., Parczyk K., Leutz A., Kayne M. & Kondor-Koch C., Constitutive apical secretion of an 80-kD sulfated glycoprotein complex in the polarized epithial Madin-Darby canine kidney cell line. *J. Cell Biol.*, 1987, 105, 2735-2743.
48. Vogel L. K., Norén O. & Sjöström H., The apical sorting signal on human aminopeptidase-N is not located in the stalk but in the catalytic head group. *FEBS Lett.*, 1992a, 308, 14-17.
49. Weber T., Zemelman B. V., McNew J. A., Westermann B., Gmachl M., Parlati F., Sollner T. H. & Rothman J. E., SNAREpins : minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, 1998, 92 (6), 759-772.
50. Weisz O. A., Machamer C. E. & Hubbard A. L., Rat liver dipeptidylpeptidase IV contains competing apical and basolateral targeting information. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 22282-22288.
51. Yeaman C., Legail A. H., Baldwin A. N., Monlauzeur L., Le Bivic A. & Rodriguez-Boulan E., The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.*, 1997, 139, 929-940.
52. Zurzolo C., Le Bivic A., Quaroni A., Nitsch L., Rodriguez-Boulan E., Modulation of transcytotic and direct targeting pathways in a polarized thyroid cell line. *EMBO J.*, 1992, Jun, 11 (6), 2337-2344.
53. Zurzolo C., Lisanti M. P., Caras I. W., Nitsch L. & Rodriguez-Boulan E., Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins are preferentially targeted to the basolateral surface in Fischer rat thyroid épithélial cells. *J. Cell Biol.*, 1993, 121, 1031-1039.