Journal de la Société de Biologie, 193 (2), 139-145 (1999)

Mécanismes de l'adressage polarisé du récepteur de la FSH

par Isabelle Beau, Marie-Thérèse Groyer-Picard, André Le Bivic, Edwin Milgrom & Micheline Misrahi

INSERM Unité 135, Hormones, Gènes et Reproduction, Hopital de Bicêtre,3ème niveau, 78, rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre.

Reçu le 11 février 1999

RÉSUMÉ

Les récepteurs des gonadotrophines et de la TSH appartiennent à un sous-groupe de récepteurs couplés aux protéines G qui présentent des particularités dans leur trafic cellulaire : les récepteurs de la TSH et de la FSH ont une distribution cellulaire polarisée basolatérale au niveau des cellules thyroïdiennes et des cellules de Sertoli respectivement. Par contre, le récepteur de la LH est exprimé de façon circonférentielle au niveau des cellules cibles gonadiques. Pour comprendre cette différence de propriété nous avons exprimé ces récepteurs dans un modèle de cellules épithéliales polarisées : les cellules MDCK.

Nous avons ainsi montré que les trois récepteurs adoptent dans ces cellules une localisation basolatérale. Ils contiennent donc tous un signal de localisation basolatérale. Les récepteurs des gonadotrophines subissent de plus une transcytose partielle qui n'est pas observée pour le récepteur de la TSH. Nous avons montré que les protéines G hétérotrimériques jouent un rôle dans ce mécanisme de transcytose. Cet effet ne nécessite pas une activation de l'adénylate cyclase et implique une population intracellulaire de protéines G différentes de celle qui intervient dans la transduction du signal.

Nous avons ensuite identifié la nature du signal d'adressage basolatéral du récepteur de la FSH par mutagenèse dirigée. Nous avons montré de façon inattendue qu'il est localisé dans la partie distale du domaine intracellulaire qui diverge entre les trois récepteurs. Il comprend 14 acides aminés et est essentiellement dépendant pour son activité d'une tyrosine et d'une leucine. Nous avons montré que ce signal est indépendant du signal d'endocytose du récepteur. Ce signal est autonome et transférable à une autre protéine membranaire apicale, le récepteur du NGF qu'il convertit en partie en une protéine basolatérale.

Il s'agit du premier signal d'adressage basolatéral caractérisé pour un récepteur couplé aux protéines G et plus généralement pour un récepteur hormonal.

SUMMARY **Mechanisms of the polarized targeting of the FSH receptor**

Gonadotropin and TSH receptors belong to a subgroup of G protein-coupled receptors. TSH and FSH receptor present a particular intracellular traffic : they present a polarized basolateral expression in thyroid follicular cells and in Sertoli cells respectively . By contrast, the LH receptor is expressed circumferentially in target gonadic cells. We expressed these receptors in MDCK cells (a well characterized model of polarized epithelial cells) to understand this difference of properties

We show that the three receptors have a polarized basolateral expression in these cells. All contain a basolateral targeting signal. Furthermore, gonadotropin receptors undergo a partial transcytosis which is not observed for the TSH receptor. We show that heterotrimeric G proteins play a role in this mechanism of transcytosis. This effect is not mediated by adenylate cyclase activation and involves a population of G proteins different from that involved in signal transduction.

We thus used in vitro mutagenesis to delineate the basolateral localization signal of the FSH receptor. Surprisingly, the signal is localized in the C-terminal tail of the intracellular domain which is not conserved between the three receptors. It contains 14 amino-acids and its activity is mainly dependent on a tyrosine and a leucine residue. The basolateral localization signal of the FSHR is not colinear with its internalization signal. This signal is autonomous and dominant because, when transferred to an apically targeted membrane protein, the neurotrophin receptor, it redirects the chimeric construct to the basolateral domain of MDCK cells.

The basolateral localization signal of the FSH receptor is thus the first signal identified for a G protein-coupled receptor and more generally for a hormone receptor.

Le récepteur de la FSH appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (28, 29). Comme tous ces récepteurs, il possède sept segments transmembranaires. Avec les récepteurs de la LH et de la TSH ils forment cependant un sous-groupe spécifique caractérisé par la présence d'un domaine extracellulaire très long constitué de répétitions de motifs riches en leucine. Ce domaine est responsable de la liaison à l'hormone.

Le récepteur de la FSH joue un rôle important dans la reproduction en contrôlant la production des gamètes. Il est exprimé au niveau des cellules de Sertoli chez l'homme et au niveau des cellules de la granulosa chez la femme. Il agit également en coopération avec le récepteur de la LH pour assurer la stéroïdogenèse ovarienne.

Peu de choses sont connues sur le trafic intracellulaire des récepteurs couplés aux protéines G en général et plus particulièrement de ce sous-groupe de récepteurs. Les mécanismes d'internalisation du récepteur de la LH et de la TSH ont été étudiés au laboratoire en immunocytochimie ultrastructurale (10, Barrati et al soumis pour publication). Une transcytose de la LH médiée par son récepteur a également été observée dans les cellules endothéliales des microvaisseaux testiculaires (11). Plus récemment, des études immunocytochimiques avec des anticorps monoclonaux ont montré que les récepteurs de la TSH (20) et de la FSH (44) ont une distribution basolatérale respectivement dans les cellules folliculaires thyroïdiennes et dans les cellules de Sertoli du testicule. Par contre, le récepteur de la LH est exprimé de façon circonférentielle au niveau des cellules de la thèque et de la granulosa de l'ovaire et des cellules de Leydig du testicule (27).

Cette différence de distribution pourrait être due à des propriétés différentes de ces récepteurs ou à une différence de propriété des cellules dans lesquelles ces récepteurs sont exprimés physiologiquement. En effet, les cellules folliculaires thyroïdiennes et les cellules de Sertoli sont des cellules épithéliales polarisées alors que les cellules dans lesquelles le récepteur de la LH s'exprime physiologiquement ne le sont pas. D'autre part, il était intéressant de savoir si le mécanisme d'adressage basolatéral des récepteurs de ce groupe était spécifique de certaines cellules ou pouvait être reproduit dans toutes les cellules polarisées.

ADRESSAGE POLARISÉ DU RECEPTEUR DE LA FSH, DE LA LH ET DE LA TSH DANS LES CELLULES MDCK

Les récepteurs de la FSH, de la LH et de la TSH ont une distribution basolatérale dans les cellules MDCK

Pour répondre à ces questions nous avons exprimé les récepteurs de la FSH, de la LH et de la TSH dans les cellules épithéliales rénales canines MDCK.

Nous avons alors étudié par microscopie confocale la localisation membranaire de ces récepteurs. Nous avons ainsi pu reproduire dans ces cellules la polarisation physiologique basolatérale des récepteurs de la FSH et de la TSH. Cependant nous avons également observé que le récepteur de la LH qui n'est pas exprimé dans des cellules polarisées physiologiquement subit le même adressage basolatéral dans les cellules MDCK.

Ceci montre que les trois récepteurs possèdent dans leur structure un signal d'adressage basolatéral. Ce signal est fonctionnel dans des cellules hétérologues polarisées.

De plus, nous avons étudié les propriétés fonctionnelles des récepteurs à chaque pôle cellulaire. Nous avons montré que cette différence de distribution est corrélée à une différence de fonction : la majorité de la stimulation de l'adénylate cyclase sous l'influence de l'hormone est détectée au niveau du pôle basolatéral des cellules transfectées.

Une quantification précise par une méthode biochimique d'immunoprécipitation de surface des récepteurs exprimés au niveau de chaque pôle membranaire nous a permis d'observer qu'environ 80 % du récepteur de la FSH et de la LH sont présents au niveau de la membrane basolatérale des cellules MDCK et 20 % au niveau de la membrane apicale. Par contre la totalité du récepteur de la TSH est retrouvée au niveau du compartiment basolatéral.

Voies d'adressage membranaire des récepteurs des gonadotrophines et de la TSH.

Les récepteurs peuvent emprunter différentes voies par pour atteindre chaque surface membranaire (revue 25 et 31). En effet, après leur synthèse les protéines membranaires peuvent être adressées directement à la surface apicale ou basolatérale des cellules. Elles peuvent également être adressées à l'une de ces surface et ensuite subir une transcytose vers le pôle opposé. Enfin elles peuvent être adressées au hasard au niveau des deux surfaces membranaires puis être ensuite stabilisées au niveau de l'un de ces compartiments par interaction avec des composants spécifiques de ce compartiment.

Des expériences cinétiques et des expériences de sensibilité à la trypsine nous ont permis de montrer que les trois récepteurs subissaient en totalité, après leur synthèse, un adressage direct au pôle basolatéral des cellules MDCK.

Dans un deuxième temps une petite proportion (~ 20 %) du récepteur de la FSH et de la LH est adressée de la membrane basolatérale vers la membrane apicale des cellules MDCK par un mécanisme de transcytose. Ce phénomène n'est pas détecté pour le récepteur de la TSH.

Mécanismes de l'adressage membranaire des récepteurs des gonadotrophines et de la TSH.

Nous avons ensuite étudié les mécanismes de cet adressage. Pour atteindre un même compartiment membranaire, les protéines néosynthétisées peuvent utiliser différentes vésicules de transport. L'une des façons de disséquer ces voies de transport est d'utiliser la bréfeldine A (BFA). En effet, il a été montré dans quelques cas

que cette drogue peut exercer des effets différents sur l'adressage basolatéral de protéines membranaires. Par exemple, dans les cellules MDCK traitées à la BFA, le récepteur des LDL sauvage normalement exprimé au niveau de la surface basolatérale, se retrouve exprimé au niveau des deux surfaces membranaires, apicale et basolatérale (24). De même, la BFA inhibe fortement le transport à la surface basolatérale du récepteur des immunoglobulines polymériques (pIgR), alors que, dans les mêmes conditions, le transport d'autres protéines basolatérales n'est pas affecté (3). L'inhibition de l'adressage membranaire basolatéral par la BFA est donc sélectif. Ceci suggère qu'il pourrait exister différentes routes d'adressage basolatéral dans les cellules MDCK (3).

Nous avons montré que l'adressage basolatéral du récepteur de la FSH, utilisé comme modèle, n'était pas sensible à la bréfeldine A. Le récepteur utilise donc une route intracellulaire différente de celle qui est utilisée par les récepteurs des LDL et des immunoglobulines polymériques.

Les protéines G jouent également un rôle dans le trafic intracellulaire. Le rôle des petites protéines G (familles rab et ARF) est connu depuis longtemps (12, 32) mais celui des protéines G hétérotrimériques n'a été mis en évidence que beaucoup plus récemment. Ce rôle a tout d'abord été évoqué quand différentes sous-unités a des protéines G ont été retrouvées associées à différents compartiments intracellulaires tels que le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les endosomes... (4, 1, 19, 40, 22). Des études fonctionnelles ont ensuite montré que ces protéines G hétérotrimériques étaient impliquées dans différentes étapes du trafic vésiculaire. Le mécanisme moléculaire par lequel les protéines G agissent est encore inconnu. Des études ont montré que les protéines G hétérotrimériques pourraient être impliquées dans la régulation de l'interaction des protéines cytosoliques solubles avec les membranes golgiennes pour former un manteau vésiculaire (40).

Les protéines G ont également été impliquées dans l'adressage polarisé de protéines membranaires virales (33) et dans le mécanisme de transcytose du récepteur des immunoglobulines polymériques (6). A partir de l'exemple de glycoprotéines virales, un modèle a été proposé par certains auteurs dans lequel l'adressage aux surfaces apicale et basolatérale serait contrôlé par les protéines G hétérotrimériques au niveau du réseau transgolgien. Des protéines Gs activeraient l'adressage apical alors que les protéines Gi seraient responsables d'un contrôle inhibiteur du transport basolatéral (33).

Le fait que les récepteurs de la FSH, de la LH et de la TSH soient couplés à des protéines G hétérotrimériques dans leur mécanisme d'action était pour nous un argument supplémentaire pour tester l'implication de ces protéines G dans l'adressage membranaire de ces récepteurs.

Pour cela, nous avons utilisé le récepteur de la FSH comme modèle. Nous avons ainsi montré, grâce à l'utilisation de différentes drogues ou toxines agissant sur ces protéines G, que les protéines Gi et Gs n'étaient pas impliquées dans l'adressage basolatéral de ce récepteur.

Par contre l'utilisation d'agents stimulant Gs (AlF4- et toxine cholérique) nous a permis d'observer une augmentation très importante de la transcytose du récepteur de la FSH du pôle basolatéral vers le pôle apical des cellules MDCK. Le même phénomène a ensuite été observé avec le récepteur de la LH. Par contre, le récepteur de la TSH ne semble pas subir de transcytose ni à l'état basal ni lors de la stimulation de Gs.

On peut donc conclure que l'adressage polarisé de cette famille de récepteurs ne suit pas les règles proposées antérieurement pour d'autres protéines membranaires. Le fait que le récepteur de la TSH ne subisse pas de transcytose dans les cellules MDCK pourrait être dû à l'existence d'interactions entre ce récepteur et certains composants du compartiment basolatéral de ces cellules ou de la matrice extracellulaire.

Les récepteurs des gonadotrophines et de la TSH sont couplés à la protéine Gs pour la transduction du signal hormonal et ce couplage conduit à l'activation de l'adénylate cyclase. On pouvait donc se demander si l'augmentation de transcytose observée pour les récepteurs des gonadotropines lors de la stimulation de la protéine Gs était un effet direct ou un effet indirect nécessitant l'intervention d'un autre effecteur activé par Gs.

Nous avons donc voulu savoir si l'augmentation intracellulaire d'AMPc produit lors de la stimulation hormonale pouvait reproduire l'effet de la stimulation de Gs sur le trafic de ces récepteurs. En utilisant toujours le récepteur de la FSH comme modèle, nous avons montré que ni la forskoline, ni la FSH ne produisent de modification de l'adressage polarisé : il n'y a pas d'augmentation de la transcytose. Cette action des protéines G est donc indépendante du second messager classiquement impliqué dans la transduction du signal qui est l'AMPc. Ceci montre également que la population intracellulaire de protéines G intervenant dans le trafic est différente de la population associée à la membrane plasmique impliquée dans la transduction du signal. Les cibles intracellulaires de ces protéines G sont inconnues à l'heure actuelle.

Transcytose de l'hormone

L'augmentation de transcytose du récepteur faisait supposer la possibilité d'une transcytose de l'hormone. Nous avons effectivement observé que l'augmentation de transcytose des récepteurs de la FSH et de la LH lors de la stimulation de Gs s'accompagne d'une augmentation de la transcytose spécifique de l'hormone correspondante.

Ce phénomène de transcytose du ligand rappelle ce qui a été observé physiologiquement dans les cellules endothéliales testiculaires pour le récepteur de la LH (11). Il est très probable que le même mécanisme existe pour le récepteur de la FSH car ce récepteur a été détecté au niveau des cellules endothéliales testiculaires. Par ailleurs, il a été montré que la FSH s'accumule dans le fluide tubulaire testiculaire du rat plus rapidement que l'albumine (38), ce qui suggère donc également la possibilité d'une transcytose de la FSH à travers les cellules

de Sertoli. Une étude récente vient d'ailleurs de montrer qu'il existe des sites de liaison de la FSH au niveau des cellules germinales (5).

NATURE DU SIGNAL D'ADRESSAGE BASOLATÉRAL DU RÉCEPTEUR DE LA FSH

A ce jour, peu de signaux d'adressage polarisé de protéines ou récepteurs membranaires sont connus et aucun signal n'a été caractérisé pour les récepteurs couplés aux protéines G. Plusieurs études de mutagenèse ont pourtant été effectuées sur les récepteurs α2A-adrénergiques qui subissent un adressage basolatéral dans les cellules MDCK (17). Elles n'ont cependant pas permis de mettre clairement en évidence un signal d'adressage basolatéral. En fait, l'adressage basolatéral des récepteurs α2A-adrénergiques ferait intervenir plusieurs régions membranaires non contiguës (37).

De nombreuses études ont cependant établi que l'adressage des protéines membranaires basolatérales nécessite un signal localisé dans leur domaine cytoplasmique. Ceci montre que le transport basolatéral est un processus qui nécessite une séquence d'adressage spécifique au sein des protéines.

Deux grandes classes de signaux ont été mises en évidence :

– le signal d'adressage basolatéral est le plus souvent étroitement lié au signal d'endocytose (7, 13, 23, 9, 34, 30). Ce type de séquence comprend généralement une tyrosine qui joue un rôle important à la fois dans l'adressage polarisé et dans l'endocytose. Il y a une exception dans le cas du récepteur du fragment Fc des IgG où un motif di-leucine est impliqué dans le fonctionnement du signal d'adressage basolatéral et du signal d'endocytose (14, 26). Cependant, même quand les deux signaux sont intriqués, les processus d'endocytose et d'adressage basolatéral sont sensibles à différentes caractéristiques de la séquence.

– la deuxième catégorie de signaux est, elle, indépendante du signal d'endocytose. Seuls trois exemples ont été caractérisés à ce jour. C'est le cas du signal d'adressage basolatéral distal du récepteur des LDL ou des signaux d'adressage basolatéral de la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire (23, 43) et du récepteur des immunoglobulines polymériques (8).

La comparaison de la structure primaire des différents signaux connus n'a pas permis d'établir une séquence consensus. Il a été proposé que la structure tridimensionnelle des signaux puisse jouer un rôle important. Un seul signal d'adressage basolatéral a été étudié sur le plan conformationnel, celui du récepteur des immunoglobulines polymériques. Il a été montré que la séquence correspondante forme un tour β relativement stable comme la plupart des signaux d'endocytose (2).

Analyse du signal d'adressage basolatéral du récepteur de la FSH par mutagenèse dirigée

Nous avons comparé la séquence primaire des domaines intracellulaires des récepteurs de la FSH, de la TSH et de la LH. Il apparaît ainsi que la région N-terminale du domaine intracellulaire est très conservée (le récepteur de la TSH a 73 % et 64 % d'homologie avec les récepteurs de la LH et de la FSH respectivement). Par contre, la région C-terminale est très divergente. Les récepteurs de la TSH, de la FSH et de la LH étant tous les trois polarisés dans les cellules MDCK, on pouvait supposer que leur signal de localisation basolatérale serait localisé dans un domaine d'homologie entre ces récepteurs et donc au début du domaine intracellulaire. De plus les autres signaux d'adressage basolatéral connus pour d'autres protéines membranaires sont tous relativement proches de la membrane.

Pour déterminer la nature du signal d'adressage basolatéral du récepteur de la FSH, nous avons donc construit des mutants délétés d'une partie plus ou moins importante du domaine cytoplasmique du récepteur. Après avoir exprimé les récepteurs tronqués dans les cellules MDCK, nous avons étudié leur localisation par immunofluorescence indirecte en microscopie confocale.

Nous avons tout d'abord délété une grande partie du domaine intracellulaire du récepteur (résidus 657-695). Ceci nous a permis d'observer une inversion de la polarité de l'expression du récepteur, la majorité se trouvant localisée au niveau de la membrane apicale des cellules MDCK.

Pour délimiter plus précisément la séquence cytoplasmique impliquée dans l'adressage basolatéral, nous avons analysé en microscopie confocale deux autres mutants de délétion : FSHR Δ677-695 et FSHR Δ692-695. Alors que le premier mutant a une expression apicale similaire au récepteur FSHR Δ657-695, le second mutant FSHR Δ692-695 a une expression basolatérale identique au récepteur sauvage.

Ceci nous a donc permis de conclure que la séquence comprise entre les acides aminés 678 et 691 contient les informations nécessaires à l'adressage basolatéral du récepteur de la FSH.

Des expériences d'immunoprécipitation de surface nous ont ensuite permis de mesurer la quantité relative de récepteur présente au niveau de chaque surface. Comme nous l'avons vu précédemment, 85 % du récepteur sauvage sont présents au niveau de la surface basolatérale. Le même résultat est observé pour le mutant FSHR Δ692-695 alors que pour les mutants FSHR Δ657-695 et FSHR Δ677-695, 30 % seulement sont présents au niveau de la surface basolatérale. Ces résultats confirment donc la localisation du signal d'adressage basolatéral du récepteur de la FSH entre les acides aminés 678 et 691.

Nous avons ensuite étudié les voies suivies par le récepteur FSHR Δ677-695 pour atteindre la membrane apicale. En effet l'inversion de polarisation observée avec ce récepteur tronqué peut avoir différentes causes : la perte du signal d'adressage basolatéral, l'augmentation de la transcytose, la délétion d'une séquence d'ancrage basolatérale.

Des expériences cinétiques d'incorporation d'acides aminés radioactifs suivie de chasse nous ont permis de déterminer lequel de ces mécanismes était en cause. En

effet pour des temps très précoces, il existe un adressage direct majoritaire du récepteur muté à la membrane apicale. Nous n'avons observé aucun élément en faveur d'une augmentation de la transcytose ou d'une diminution de l'ancrage basolatéral. Ceci suggère donc que le signal d'adressage basolatéral est inactivé dans le récepteur tronqué.

D'une façon inattendue, ce signal est donc localisé dans la partie la moins conservée du domaine intracellulaire de ce sous groupe de récepteurs et se trouve de plus à distance de la membrane plasmique (47 acides aminés).

Caractérisation du signal d'adressage basolatéral du récepteur de la FSH

Nous avons muté un à un les 14 acides aminés de la séquence d'adressage basolatéral pour connaître le rôle fonctionnel de chacun d'entre eux. Chaque acide aminé a été substitué par une alanine. Au sein de cette séquence, seuls deux acides aminés ont un rôle fonctionnel important : la tyrosine en position 684 et la leucine en position 689. Trois autres acides aminés (Gly 681, Ile 685 et His 691) semblent jouer un rôle plus mineur.

Contrairement à ce qui a été décrit pour d'autres signaux, la phosphorylation des sérines et thréonines n'est pas impliquée dans l'adressage basolatéral du récepteur de la FSH (la mutation de ces résidus n'affecte pas l'adressage du récepteur). Par contre, il existe très probablement un rôle conformationnel du signal car les mutations ponctuelles de la tyrosine et de la leucine ne reproduisent qu'en partie seulement l'effet observé avec la délétion de l'ensemble du signal. Une prédiction de structure utilisant plusieurs algorithmes a montré l'existence d'un tour b dans le signal d'adressage basolatéral du récepteur de la FSH.

Au total, nous avons donc montré que le récepteur de la FSH possède un signal d'adressage basolatéral composé de 14 acides aminés, distant de 47 acides aminés de la membrane plasmique. Ce signal est différent de l'ensemble des autres signaux caractérisés à ce jour qui sont tous relativement proches de la membrane plasmique. Ce signal est essentiellement dépendant de deux acides aminés : la tyrosine 684 et la leucine 689.

Étude de chimères entre le récepteur du NGF et le récepteur de la FSH

Pour savoir si le signal d'adressage basolatéral du récepteur de la FSH constituait un signal autonome transférable à une autre protéine nous avons construit des chimères entre le récepteur du NGF et le récepteur de la FSH.

Le récepteur du NGF est une protéine membranaire qui lorsqu'elle est exprimée dans les cellules MDCK, est localisée au pôle apical de ces cellules (18). Lorsque ce récepteur est délété de la plus grande partie de son domaine intracellulaire (NGFRt), il conserve sa localisation apicale. Nous avons donc greffé à l'extrémité C-terminale de ce récepteur tronqué le signal d'adressage basolatéral du récepteur de la FSH.

Nous avons alors observé en microscopie confocale la localisation de cette protéine chimère : NGFRt/FSHR677-691. Contrairement au récepteur du NGFRt qui est localisé exclusivement au niveau de la membrane apicale des cellules MDCK, le récepteur chimérique présente une localisation basolatérale.

Des expériences biochimiques d'immunoprécipitation de surface nous ont permis de confirmer ces résultats : 90 % du récepteur chimérique est présent au niveau de la surface basolatérale des cellules MDCK contre 10 % seulement dans le cas du récepteur NGFRt.

On peut donc conclure que les résidus 678-691 du récepteur de la FSH codent effectivement pour un signal d'adressage basolatéral. Ce signal fonctionne de façon autonome et est transférable à une autre protéine membranaire.

Relation entre le signal d'adressage basolatéral et le signal d'endocytose.

Nous avons voulu savoir si le signal d'adressage basolatéral du récepteur de la FSH était lié au signal d'endocytose. Pour cela, nous avons utilisé le mutant du récepteur de la FSH délété de la totalité du signal d'adressage basolatéral.

Nous avons effectué des expériences d'internalisation avec de la FSH marquée à l'iode 125. Nous n'avons observé aucune différence d'internalisation entre le récepteur sauvage et le récepteur tronqué pour des temps précoces (15 minutes) ou tardifs (6 heures).

Nous pouvons donc en conclure que le signal d'adressage basolatéral du récepteur de la FSH est indépendant du signal d'endocytose.

Très peu de signaux de ce type ont été décrits à ce jour. On pourrait uniquement rapprocher le signal d'adressage basolatéral du récepteur de la FSH du signal d'adressage basolatéral de la glycoprotéine G du Virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV G) qui est indépendant de l'endocytose et dont la fonction est majoritairement contrôlée par un résidu tyrosine et une isoleucine (43)

Le signal d'adressage basolatéral du récepteur de la FSH est le premier signal caractérisé pour un récepteur couplé aux protéines G et d'une façon plus générale pour un récepteur hormonal.

En effet, il a été montré que physiologiquement le récepteur de l'insuline a une expression basolatérale dans les cellules rénales qui est reproduite dans les cellules MDCK (41, 46). Toutefois on ne connaît pas la nature du signal impliqué. De même, plusieurs récepteurs couplés aux protéines G (les récepteurs de la parathormone, de la mélatonine, de l'adénosine A1, α2-adrénergiques, sérotoninergiques) sont connus pour avoir une localisation apicale ou basolatérale (15, 39, 36, 16, 45, 35, 21). Cependant aucun signal responsable de l'adressage polarisé n'a encore été identifié.

La détermination des acides aminés importants pour le trafic polarisé peut avoir des répercussions importantes sur la compréhension des altérations de ces récepteurs en pathologie. En effet, il existe des mutations naturelles des récepteurs de la TSH et de la FSH qui ont été détectées

chez des patients présentant des hypo ou hyperthyroïdies familiales non immunes ou des insuffisances ovariennes primitives. L'étude du retentissement fonctionnel de ces mutations est effectuée dans des cellules eucaryotes hétérologues non polarisées. Ces cellules ne permettent donc pas de mettre en évidence une éventuelle altération de l'adressage polarisé. Toute altération moléculaire localisée à l'intérieur de la séquence d'adressage que nous venons de déterminer devra être explorée dans des cellules polarisées.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ali N., Milligan G. & Evans W. H. Distribution of G-protein in rat liver plasma-membrane domains and endocytic pathways. *Biochem. J.*, 1989, *261*, 905-912.
2. Aoreti B., Kosen P., Kuntz I. Cohen F. E. & Mostov K. Mutational and secondary structural analysis of the basolateral sorting signal of the polymeric immunoglobulin receptor. *J. Cell Biol.*, 1993, *123*, 1149-1160.
3. Apodaca G., Aroeti B., Tang K. & Mostov K. E. Brefeldin-A inhibits the delivery of the polymeric immunoglobulin receptor to the basolateral surface of MDCK cell. *J. Biol. Chem.*, 1993, *268*, 20380-20385.
4. Audigier Y., Nigam S. N. & Blobel G. Identification of a G protein in rough endoplasmic reticulum of canine pancreas. *J. Biol. Chem.*, 1988, *263*, 16352-16357.
5. Baccetti B., Collodel G., Costantino-Ceccarini E., Eshkol A., Gambera L., Moretti E., Strazza M. & Piomboni P., Localization of human follicle-stimulating hormone in the testis. *FASEB J.*, 1998, *12*, 1045-1054.
6. Bomsel M. & Mostov K., Possible role of both the a and bg subunits of the heterotrimeric G protein, Gs, in transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor. *J. Biol. Chem.*, 1993, *268*, 25824-25835.
7. Brewer C. B. & Roth M., A single aminoacid change in the cytoplamic domain alters the polarized delivery of inflenza virus hemagglutinin. *J. Biol. Chem.*, 1991, *114*, 413-421.
8. Casanova J. E., Apodaca G. & Mostov K. E., An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor. *Cell*, 1991, *66*, 65-75.
9. Geffen I., Fuhrer C., Leitinger B., Weiss M., Huggel K., Griffiths G. & Speiss M., Related signals for endocytosis and basolateral sorting of the asialoglycoprotein receptor. *J. Biol. Chem.*, 1993, *268*, 20772-20777.
10. Ghinea N., Vu Hai M. T., Groyer-Picard M. T., Houllier A., Schoëvaërt D. & Milgrom E., Pathways of internalization of the hCG/LH receptor : immunoelectron microscopic studies in Leydig cells and transfected L-cells. *J. Cell Biol.*, 1992, *118*, 1347-1358.
11. Ghinea N., Vu Hai M. T., Groyer-Picard M. T. & Milgrom E., How protein hormones reach their target cells. Receptor-mediated transcytosis of hCG through endothelial cells. *J. Cell Biol.*, 1994, *125*, 87-97.
12. Goud B. & McCaffrey M., Small GTP-binding proteins and their role in transport. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1991, *3*, 626-633.
13. Hunziker W., Cordula H., Matter K. & Mellman I., Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant. *Cell*, 1991, *66*, 907-920.
14. Hunziker W. & Fumey C., A di-leucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells. *EMBO J.*, 1994, *13*, 2963-2969.
15. Kaufmann M., Muff R., Stieger B., Biber J., Murer H. & Fischer J., A. Apical and basolateral parathyroid hormone receptors in rat renal cortical membranes. *Endocrinology*, 1994, *134*, 1173-1178.
16. Keefer J. R. & Limbird L. E., The α2A-adrenergic receptor is targeted directly to the basolateral membrane domain of Madin-Darby canine kidney cells independent of coupling to pertussis toxin-sensitive GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.*, 1993, *268*, 11340-11347.
17. Keefer J. R., Kennedy M. E. & Limbird L. E., Unique structural feature important for stabilisation versus polarization of the α2A-adrenergique receptor on the basolateral membrane of Madin Darby Canine Kidney Cells. *J. Biol. Chem.*, 1994, *269*, 16425-16433.
18. Le Bivic A., Sambuy Y., Patzak A., Patil N., Chao M. & Rodriguez-Boulan E., An internal deletion in the cytoplasmic tail reverses the apical localization of Human NGF receptor in transfected MDCK cells. *J. Cell. Biol.*, 1991, *115*, 607-618.
19. Leyte A., Barr F.A., Kehlenbach R. H. & Huttner W. B., Multiple trimeric G-proteins on the trans-Gogi network exert stimulatory and inhibitory effects on secretory vesicle formation. *EMBO J.*, 1992, 11, 4795-4804.
20. Loosfelt H., Pichon C., Jolivet A., Misrahi M., Caillou B., Jamous M., Vannier B. & Milgrom E., Two-subunit structure of the human TSH receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, *89*, 3765-3769.
21. Luo H., Tesfaye A., Schieren I. & Chase H. S. Jr Expression of 5-HT1C receptors in transfected MDCK cells is functionally and anatomically asymmetric. *Am. J. Physiol.*, 1993, *265*, C193-200.
22. Maier O., Ehmsen E. & Westermann P., Trimeric G protein a subunits of the Gs and Gi families localized at the golgi membrane. Biochem. *Biophys. Res. Commun.*, 1995, *208*, 135-143.
23. Matter K., Hunziker W. & Mellman I., Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK : the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targetting determinants. *Cell*, 1992, *71*, 741-753.
24. Matter K., Whitney A., Yamamoto E.M. & Mellman I., Commons signals control low density lipoprotein receptor sorting in endosomes and the Golgi complex of MDCK cells. *Cell*, 1993, *74*, 1053-1064.
25. Matter K. & Mellman I. Mechanism of cell polarity : sorting and transport in epithelial cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1994, *6*, 545-554.
26. 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.
27. Meduri G., Vu Hai M T., Jolivet A. & Milgrom E., New fonctionnal zonation in the ovary as shown by immunohistochimistry of LH receptor. *Endocrinology*, 1992, *131*, 366-373.
28. Misrahi M. & Milgrom E., The TSH receptor. In : *Pharmacotherapeutics of the thyroid gland* (A. P. Weetman and A. Grossman eds.), 1997, *128*, 33-73. Springer-Verlag Heidelberg New York.
29. Misrahi M., Beau I., Meduri G., Bouvattier C., Ghinea N., Atger M., Vu Hai MT, Loosfelt H., Bougnères P. & Milgrom E., Gonadotropin receptors and the control of gonadal steroidogenesis : physiology and pathology. *Bailliere's Clin. Endocrinol. Metab.*, 1998, *12*, 35-66.
30. Monlauzeur L., Rajasekaran A., Chaos M., Rodriguez-Boulan E. & Le Bivic A., A cytoplasmic tyrosine is essential for the basolateral localisation of mutants of the human Nerve Growth Factor receptor in Madin-Darby Canine kidney cells. *J. Biol. Chem.*, 1995, *270*, 12219-12225.
31. Mostov K. E., Protein traffic in epithelial cells: the polymeric immunoglobulin receptor as a model system. *J. Cell Sci.*, 1993, *17*, 21-26.

32. Nuoffer C. & Balch W. E., GTPases: multifunctionnal molecular switches regulating vesicular traffic. *Annu. Rev. Biochem.*, 1994, *63*, 949-990.
33. Pimplikar S. W. & Simons K., Regulation of apical transport in epithelial cells by a Gs class of heterotrimeric G proteins. *Nature*, 1993, *362*, 456-458.
34. Prill V., Lehmann L., von Figura K. & Peters C., The cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase contains overlapping but distinct signals for basolateral sorting and rapid internalization in polarized MDCK cells. *EMBO J.*, 1993, *12*, 2181-2193.
35. Raymond J. R., Kim J., Beach R. E. & Tisher C. C., Immunohistochemical mapping of cellular and subcellular distribution of 5-HT1A receptors in rat and human kidneys. *Am. J. Physiol.*, 1993, *264*, F9-19.
36. Saunders C., Keefer J. R., Kennedy A. P., Wells J. N. & Limbird E., Receptors coupled to pertussis toxin-sensitive G-proteins traffic to opposite surfaces in Madin-Darby canine kidney cells. A1 adenosine receptors achieve apical and α2A-adrenergic receptors achieve basolateral localization. *J. Biol. Chem.*, 1996, *271*, 995-1002.
37. Saunders C., Keefer J. R, Bonner C. A. & Limbird L. E., Targeting of G protein-coupled receptors to the basolateral surface of polarized renal epithelial cells involves multiple, non-contiguous structural signals. *J. Biol. Chem.*, 1998, *273*, 24196-24206.
38. Setchell B. P. & Wallace A. L. C., The penetration of iodine-labelled follicle stimulating hormone and albumin into the seminiferous tubules of sheeps and rats. *J. Endocrinol.*, 1972, *54*, 67-77.
39. Song Y., Chan C. W., Brown G. M., Pang S. F. & Silverman M., Studies of the renal action of melatonin : evidence that the effects are mediated by 37 kDa receptors of the Mel1a subtype localized primarily to the basolateral membrane of the proximal tubule. *FASEB J.*, 1997, *11*, 93-100.
40. Stow J. L., de Almeida J. B., Narula N., Holtzman E. J., Ercolani L. & Ausiello D. A., A heterotrimeric G protein, Gai-3, on Golgi membranes regulates the secretion of a heparan sulfate proteoglycan in LLC-PK1 epithelial cells. *J. Cell. Biol.*, 1991, *114*, 1113-1124.
41. Talor Z., Emmanouel D. S. & Katz A. I., Insulin binding and degradation by luminal and basolateral tubular membranes from rabbit kidney. *J. Clin. Invest.*, 1982, *69*, 1136-1146.
42. Thomas D. C., Brewer C. B. & Roth M. G. Vesicular Stomatitis Virus glycoprotein contains a dominant cytoplasmic basolateral sorting signal critically dependent upon a tyrosine. *J. Biol. Chem.*, 1993, *268*, 3313-3320.
43. Thomas D. C. & Roth M. G., The basolateral targeting signal in the cytoplasmic domain of glycoprotein G from vesicular stomatitis virus resembles a variety of intracellular targeting motifs related by primary sequence but having diverse targeting activities. *J. Biol. Chem.*, 1994, *269*, 15732-15739.
44. Vannier B., Loosfelt H., Meduri G., Pichon C. & Milgrom E., Antihuman FSH receptor monoclonal antibodies : immunochemical characterization of the receptor. *Biochemistry*, 1995, *35*, 1358-1366.
45. Wozniak M. & Limbird L. E., The Three α2-adrenergic receptor subtypes achieve basolateral localization in Madin-Darby Canine Kidney II cells via differen targeting mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 1996, *271*, 5017-5024.
46. Yeh T. C. & Roth R. A., Insulin receptor signaling in Madin-Darby canine kidney cells overexpressing the human insulin receptor. *Diabetes*, 1994, *43*, 1297-303.

Séance du 20 janvier 1999