Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude du compartiment lysosomal dans le foie et le cerveau de souris CLN2 -/-

Lardinois, Amélyne

Award date:
2006

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 02. May. 2026

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

NAMUR

Faculté des Sciences

ETUDE DU COMPARTIMENT LYSOSOMAL DANS LE FOIE ET LE CERVEAU DE SOURIS CLN2 -/-

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de

licenciée en Sciences biologiques

Amélyne Lardinois

Juin 2006

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20.
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - http://www.fundp.ac.be/fundp.html

Etude du compartiment lysosomal dans le foie et le cerveau de souris CLN2 -/-

LARDINOIS Amélyne

Résumé

La lipofuscinose céroïde neuronale infantile tardive (cLINCL) est une maladie neurodégénérative héréditaire causée par la déficience d'une protéase lysosomale : la tripeptidyl peptidase I. Elle se caractérise par l'accumulation intralysosomale de lipofuscine et de la sous-unité C de l'ATP synthase mitochondriale. Récemment, un modèle animal de la maladie a été conçu dans le laboratoire du Professeur Peter Lobel aux Etats-Unis(CABM, Piscataway). Il s'agit de souris « knock-out » pour le gène CLN2 codant la protéase déficiente de la cLINCL, mimant la pathologie de la maladie.
Dans le but d'approfondir les connaissances actuelles sur la cLINCL, un projet de collaboration entre les deux laboratoires a été mis sur pied. Il consiste en une étude par spectrométrie de masse du contenu des lysosomes isolés de souris CLN2-/-. Ces préparations seront obtenues dans notre laboratoire par les méthodes de centrifugation différentielle et isopycnique.
Ce travail vise à caractériser le comportement des lysosomes de foie et de cerveau de souris CLN2 -/- en centrifugation, afin d'établir les bases d'une méthode préparative.
Les résultats des fractionnements subcellulaires par centrifugation différentielle suggèrent, dans les tissus CLN2-/-, l'existence d'une population de lysosomes plus fragiles, libérant leur contenu enzymatique dans la fraction soluble. En revanche, les lysosomes mutants intacts, isolés dans la fraction ML, présentent un comportement semblable aux lysosomes de type sauvage dans des gradients de densité de saccharose ou de Percoll[R] isotonique. La distribution des lysosomes a été caractérisée par la mesure de l'activité de plusieurs hydrolases acides comme marqueurs de ces organites. Après avoir vérifié que les préparations enrichies en lysosomes CLN2-/- contiennent effectivement le matériel de surcharge, ces résultats seront exploités pour la mise au point d'une méthode préparative.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2006

Promoteur: M.Jadot

Quelle expérience unique que le mémoire, chargé de rires et d'émotions, je n'aurais pas assez d'une page pour exprimer toute ma gratitude à toutes les personnes qui m'ont aidée et épaulée durant ces quelques mois.

Tout d'abord, j'aimerais remercier le Professeur Michel Jadot de m'avoir offert l'opportunité d'effectuer mon mémoire dans son laboratoire, ainsi que pour le temps et la patience qu'il m'a toujours accordé.

Je remercie également Catherine pour sa gentillesse et son aide précieuse lors de la période de stress « rédaction ».

Je remercie également Isabelle, Magali, Monsieur et Madame Wattiaux pour leurs judicieux conseils avec un clin d'œil particulier à Monsieur Wattiaux pour ses taquineries perpétuelles à propos de nos souris…et du fixateur fluo.

Comment oublier ces heures passées en la douce compagnie de Marie-Jeanne ? Toujours là pour m'épauler, me rassurer et me consoler dans les moments difficiles.

Je n'oublie pas non plus mes « copines » du labo qui m'ont toujours encouragée, soutenue et même parfois…secouée…Merci Fanfan ! Un grand merci à vous toutes : Fanfan, Sophie, Marielle, Marie et Coraline.

Merci aussi à « Dame » Jacqueline pour son aide à mes compréhensions difficiles ainsi qu'à toutes ces femmes du labo avec qui je passais d'agréables moments : Arlette, Marie-Thérèse et Marie-France.

Comment ne pas le citer ? Cet artiste de notre labo, l'homme de toutes les situations désespérées, ce génie d'informatique avec toujours sa bonne humeur communicative…Je te fais un gros bisous Michel !

Je remercie également Raphaël Déom du département d'histologie, Monsieur Depiereux et Benoît de Hertogh du département de statistiques pour leur secours quand j'en avais grand besoin.

Je vous embrasse aussi très fort Mo et Auré…sans vous le mémoire m'aurait paru bien terne…Merci pour tous ces bons moments que nous avons partagés où se mêlaient éclats de rire et blagues dans lesquelles je fonçais tête baissée à chaque fois…Encore merci, je vous adore !!

Et bien sûr, je remercie également ma famille pour son éternel soutien et sa confiance inébranlable et ainsi que mes amis du train pour l'ambiance chaleureuse tous les matins.

Et voilà ! Le mémoire c'est fini et sans vous, il ne se serait pas concrétisé.
Encore une fois, à vous tous, du fond du cœur merci !!

Listes des abbréviations :

AA	Amino Acid
AAV	*adeno-associated virus*
ANOVA	*Analysis of variance*
AP	*Adaptator Protein*
Asn	Asparagine
ASR	Activité spécifique relative
ATP	Adénosine TriPhosphate
°C	Degré Celsius
CD-MPR	Récepteur mannose-6-phosphate cation dépendant
CE	Esters de cholestérol
CESD	*Cholesteryl ester storage disease*
CI-MPR	Récepteur mannose-6-phosphate cation indépendant
CLN	Lipofuscinoses Céroïdes Neuronales
CLN2p	Protéine codée par le gène CLN2
CLN2 -/-	Souris déficiente en TPPI
CLN2+/+	Souris sauvage
cm	Centimètre
CO_2	Dioxyde de carbone
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dx/dt	Vitesse de sédimentation
E	Extrait cellulaire ou surnageant post-nucléaire
EDTA	Ethylenedinitrotetraacetic acid
f	Coefficient de friction
F-Gly	Cα-formylglycine
g	Gramme
GAG	Glycoaminoglycan
GGA	*Golgi localized, _-ear containing ARF binding protein*
GTP	Guanosine TriPhosphate
h	Heure
kDa	KiloDalton
KOH	Hydroxyde de potassium
L	Fraction mitochondriale légère
Lamp	*Lysosome-Associated membrane protein*
LDL	*Low Density Lipoprotein*
Limp	*Lysosome-Integral membrane protein*
LSD	Lysosomal Storage Disease
M	Mole par litre
M	Fraction mitochondriale lourde
m	Mètre
MHC	Major Histocompatibility Complex
MLs	Mucolipidoses
ML	Fraction mitochondriale totale
ml	Millilitre
mm	Millimètre
MPR	Récepteur au mannose 6-phosphate
MPS	Mucopolysaccharidoses

MSD	Déficience multiple en sulfatase
N	Fraction nucléaire
NaOH	Hydroxyde de sodium
nm	Nanomètre
NPC	Maladie de Niemann-Pick
P	Fraction microsomale
PPDS	Plus petite différence significative
RER	Reticulum Endoplasmique Rugueux
R-LDL	Récepteurs au lipoprotéine de faible densité
rpm	Rotation par minute
S	Fraction Soluble
Ser	Sérine
SRP	*Signal Recognition particule*
TG	Triglycéride
TGN	Trans-Golgi Network
Thr	Thréonine
TPP-I	Tripeptidyl peptidase I
x	Distance radiaire
$\Delta\rho$	Incrément de densité
µl	Microlitre
ρ	Densité
ϕ	Volume
ω	Vitesse angulaire
_	Somme

Table des matières

TABLE DES MATIERES

Introduction .....

A. Les lysosomes : 11

1. Généralités : 11
2. Description et fonctions du lysosome : 11
3. Les protéines lysosomales : 12

a) Les protéines solubles : 12

(1) Les endopeptidases : 12

(a) Les cystéines protéases : 12

(b) Les aspartyl protéases : 12

(2) Les exopeptidases : 13

(a) Les dipeptidylpeptidases : 13

(b) Les carboxypeptidases : 13

(c) Les dipeptidases : 13

(d) Les tripeptidylpeptidases : 13

b) Les protéines membranaires : 14

(1) Les protéines Lamps « Lysosome-associated membrane proteins» : 14

(2) Les protéines Limps « Lysosome-integral membrane proteins » : 15

(3) D'autres protéines membranaires: 15

c) La biosynthèse des protéines lysosomales et modifications post-traductionnelles : 16

(1) Les protéines solubles : 16

(2) Les protéines membranaires : 17

B. Les pathologies de surcharge : 18

1. Généralités : 18
2. Classifications des LSDs : 18

a) Classification en fonction du matériel stocké : 18

(1) Les lipofuscinoses neuronales : 18

(a) Généralités : 18

(b) La lipofuscinose céroïde tardive infantile: 19

(2) Les lipidoses : 20

(3) Les maladies de Wolman et CESD : 20

(a) Les sphingolipidoses : 20

(i) Les sphingolipides non glycosylés : 21

(a) Les maladies de Niemann-Pick de type A et B : 21

(b) La maladie de Niemann-Pick de type C: 21

(ii) Les sphingolipides glycosylés : 21

(a) La glucosylcéramide : 21

(b) La galactosylcéramide: 22

(4) Les mucopolysaccharidoses : 22

(5) Les mucolipidoses : 22

(6) Les glycogénoses : 22

(7) Les glycoprotéinoses : 23
(8) Divers: 23
b) Classification en fonction des déficiences moléculaires : 23
(1) Déficit en hydrolases acides : 23
(2) Défauts dans les modifications post-traductionnelles d'enzymes lysosomales : 24
(3) Défauts au niveau du trafic vers le compartiment lysosomal : 24
(4) Déficit en une enzyme de protection : 24
(5) Déficit de protéines transmembranaires: 25
C. La souris CLN2 -/- : 25
1. Le phénotype : 25
2. Histologie : 25
3. La neuropathologie: 26
D. Objectif du mémoire : 27
Matériel et méthodes 29
A. Fractionnement cellulaire : 29
1. La centrifugation: Généralités 29
2. Animaux : 29
3. La centrifugation différentielle : 29
4. La centrifugation isopycnique 30
a) Gradient de saccharose : 30
b) Gradient de Percoll : 31
B. Chocs hypotoniques: 32
C. Dosage des enzymes lysosomales marqueurs: 33
D. Statistiques : 34
Résultats et discussion 36
A. Généralités : 36
B. Etude par centrifugation différentielle du foie et du cerveau de souris CLN2 -/- : 37
1. Etude de la distribution des lysosomes chez les souris CLN2 +/+ : 38
a) Distribution des lysosomes dans un fractionnement subcellulaire de foie : 38
b) Distribution des lysosomes dans un fractionnement subcellulaire de cerveau: 38
2. Etude de la distribution des lysosomes de souris CLN2-/- : 39
a) Distribution des lysosomes dans un fractionnement subcellulaire de foie: 39
b) Distribution des lysosomes dans un fractionnement subcellulaire de cerveau: 39
C. Etude du comportement des lysosomes dans un gradient de densité : 39
1. Etude du comportement des lysosomes dans un gradient de saccharose : 40
a) Gradient de saccharose avec ML déposée au sommet du gradient : 40
(1) Distribution de l'activité enzymatique pour un dépôt de ML de foie: 41
(2) Distribution de l'activité enzymatique pour un dépôt de ML de cerveau: 41
(3) Discussion 42
b) Gradient de saccharose avec ML déposée au fond du gradient : 42
(1) Distribution de l'activité enzymatique pour un dépôt de ML de foie: 43
(2) Distribution de l'activité enzymatique pour un dépôt de ML de cerveau : 43

(3) Discussion : 43
2. Etude du comportement des lysosomes dans un gradient de Percoll préformé: 44
D. Etude de la sensibilité de lysosomes de souris CLN2 -/- soumis à des conditions hypotoniques : 45
Conclusion et perspectives**.....**
Bibliographie**.....**

Introducion

INTRODUCTION

A. Les lysosomes :

1. *Généralités :*

Les lysosomes sont des organites intracellulaires découverts lors d'études biochimiques sur des homogénats de foie de rat, via la technique de fractionnement subcellulaire élaborée par de Duve et ses collaborateurs à Louvain en 1949 (Berthet and De Duve, 1951; De Duve et al., 1955)

Lors d'expériences visant à déterminer la localisation intracellulaire de la glucose-6-phosphatase d'un homogénat de foie de rat, de Duve et ses collaborateurs constatent des différences dans la répartition d'une autre enzyme, la phosphatase acide, selon que les fractions subissent des cycles de congélations ou selon que l'organe soit broyé dans de l'eau distillée ou en milieu isotonique. Dans le premier cas, l'activité enzymatique de la phosphatase acide est très élevée et soluble. Tandis que dans le second cas, son activité est faible et liée à des granules sédimentant en partie avec les mitochondries. Il en conclut que cette hydrolase est présente dans un granule délimité par une membrane. Etant donné le contenu lytique de cet organite, il le nomme « lysosome ». C'est la première fois que l'existence d'un organite est suggérée par une approche biochimique (Berthet and De Duve, 1951) Ce n'est que plus tard en 1956, grâce à une collaboration avec Novikoff, qu'une étude morphologique à partir de fractions enrichies en lysosomes est effectuée en microscopie électronique à transmission (Beaufay et al., 1956)

2. *Description et fonctions du lysosome :*

Les lysosomes sont des organites possédant un diamètre de l'ordre de 0,5 µm et apparaissant denses aux électrons en microscopie électronique (Holtzmann, 1989). Toutefois, ils sont difficiles à cataloguer en fonction de leur morphologie. En effet, ces organites ont des tailles et des formes très hétérogènes. Par exemple, il est difficile de les distinguer des endosomes tardifs uniquement sur base de critères morphologiques (Platt F.M, 2004). Ils s'en différencient de manière biochimique par l'absence de récepteurs mannose-6-phosphate (Andrea Jahraus, 1994).

La fonction principale des lysosomes est la prise en charge de la dégradation de macromolécules provenant du milieu extracellulaire (via l'endocytose) ou de la cellule elle-même (via l'autophagie) (Mellman, 1989). L'organite participe à d'autres processus physiologiques incluant la dégradation de protéines anormales, le recyclage des récepteurs de surface, la lyse des agents pathogènes et enfin le « processing » des antigènes (Eeva-Liisa Eskelinen, 2003)

3. *Les protéines lysosomales :*

a) Les protéines solubles :

Les hydrolases acides lysosomales sont des protéines solubles, séquestrées à l'intérieur de la lumière du lysosome. On en compte plus d'une cinquantaine. Il en existe plusieurs classes qui permettent la digestion de différents substrats ; on y retrouve principalement des protéases, des glycosidases, des nucléases et des lipases (Tableau 1)(Holtzmann, 1989)

Ce mémoire concerne une maladie de surcharge lysosomale causée par le déficit en une protéase particulière : la tripeptidyl peptidase I. Voici un bref descriptif des différentes familles de protéases du lysosome.

Les enzymes protéolytiques (peptidases ou protéases) comportent deux classes d'enzymes (Tableau 2) distinctes par leur site de clivage :

(1) Les endopeptidases :

Elles sont aussi appelées protéinases. Elles possèdent la caractéristique de cliver des liaisons peptidiques « internes ».

Les endopeptidases sont classées selon la nature de l'acide aminé catalytique au sein du site actif de ces enzymes. Deux types d'endopeptidases sont présentes dans le lysosome. Il s'agit des cystéines protéases et des aspartyl protéases.

(a) Les cystéines protéases :

Ce type de peptidases est largement distribué chez les animaux, les végétaux et les microorganismes. Ces cystéines protéases sont groupées en plusieurs familles dont la mieux connue est la papaïne contenant entre autres les cathepsines B, H, L et S. Chez les êtres humains, les cathepsines B, H et L sont ubiquistes tandis que la cathepsine S est présente essentiellement dans les cellules présentatrices d'antigènes. On suppose que la cathepsine S joue un rôle dans la voie d'activation du MHC de classe II dans le cadre de la présentation antigénique (Turk, 1999).

(b) Les aspartyl protéases :

Les protéinases aspartiques constituent une super famille de protéinases dont l'activité catalytique dépend de deux résidus acide aspartique. Deux enzymes lysosomales sont présentes dans cette famille : la cathepsine D et la cathepsine E. Notamment, la cathepsine D est une enzyme lysosomale ubiquiste dans les tissus des mammifères et des oiseaux. Elle clive les liens peptidiques de manière préférentielle entre les acides aminés hydrophobes (Glaumann H., 1987).

(2) Les exopeptidases :

Ces protéases possèdent la caractéristique de cliver les protéines à partir d'une extrémité de la chaîne polypeptidique. Certaines enzymes peuvent montrer une activité endo- et exopeptidase. Elles sont classifiées par défaut parmi les endopeptidases. La dégradation des protéines est initiée par les endopeptidases, et se finalise par l'action des exopeptidases. Contrairement aux endopeptidases, les exopeptidases peuvent être classifiées selon les réactions qu'elles catalysent et le résidu présent au site catalytique. (Glaumann H., 1987)

On note quatre classes d'exopeptidases :

(a) Les dipeptidylpeptidases :

Il existe deux dipeptidylpeptidases. La dipeptidylpeptidase I est une cystéine protéase qui clive de manière séquentielle des dipeptides à partir de l'extrémité N-terminale de polypeptides. La dipeptidylpeptidase II, quant à elle, est une sérine protéase qui clive les dipeptides N-terminaux d'oligopeptides tels que les tripeptides générés par les tripeptidylpeptidases.

(b) Les carboxypeptidases :

Il existe quatre carboxypeptidases (A, B, prolyl et tyrosine). Toutes se caractérisent par des clivages à partir de l'extrémité C-terminale du peptide substrat. La carboxypeptidase A est une sérine protéase qui libère les acides aminés de façon séquentielle à partir de l'extrémité C-terminale de polypeptides. La carboxypeptidase B est une cystéine protéase libérant les acides aminés (à l'exception de la proline) de l'extrémité C-terminale de polypeptides, tripeptides et dipeptides N-acétylés. La prolyl carboxypeptidase, quant à elle, clive les acides aminés C-terminaux adjacents à une proline de polypeptides ou de dipeptides N-acétylés. La tyrosine carboxypeptidase est une cystéine protéase qui enlève généralement des résidus tyrosine de l'extrémité C-terminale de polypeptides et dipeptides N-acétylés.

(c) Les dipeptidases :

Les dipeptidases permettent l'hydrolyse de dipeptides résultant du catabolisme des protéines. Il en existe deux, une cystéine protéase et une Zn^{+} métalloprotéase.

(d) Les tripeptidylpeptidases :

Les tripeptidylpeptidases sont des sérine protéases qui permettent le clivage de tripeptides de l'extrémité N-terminale d'oligopeptides et de protéines.

On trouve dans ces hydrolases la tripeptidyl peptidase I (TPP-I) ou protéine CLN2. Son déficit, qui fait l'objet de ce travail, entraîne le développement d'une maladie de surcharge lysosomale. La tripeptidyl peptidase I est une sérine protéase qui clive des tripeptides à partir de l'extrémité N-terminale de petits polypeptides. Sa forme précurseur d'environ 68 kDa mature en une forme de 48 kDa. Cette enzyme, mise en présence de N-glycosidase F et endoglycosidase H, perd 10 kDa. TPP-I serait porteuse de 5 chaînes oligosaccharidiques (Golabek et al., 2003). Ces N-glycosylations semblent jouer un rôle important dans la stabilité et l'activité de l'enzyme (Wujek et al., 2004). TPP-I est une enzyme résistante à de nombreux

inhibiteurs classiques de sérine, cystéine, aspartate ou de métalloprotéases. Sa localisation intralysosomale a été établie de manière biochimique et morphologique par l'équipe d'Ezaki et ses collaborateurs. Ils ont montré la colocalisation de TPPI avec la cathepsine B dans des fractions lysosomales purifiées par centrifugation isopycnique. Ils ont vérifié par immunofluorescence la colocalisation de la protéine avec une autre enzyme lysosomale, la cathepsine D (Ezaki et al., 1999). Koike et son équipe ont étudié l'activité de TPP-I dans des tissus de souris et de rat. Leur étude a montré le caractère ubiquiste de cette activité protéolytique au niveau du cerveau, de l'estomac, des reins et des gonades des souris. Toutefois, cette activité ne coïncide pas toujours avec le niveau d'expression de la protéine. Par exemple, une faible activité de la protéase est mesurée, en dépit de son taux élevé d'expression dans le cerveau. Les auteurs tentent d'expliquer cet état de fait par la présence d'un inhibiteur endogène de TPPI dans le cerveau (Koike et al., 2002).

b) Les protéines membranaires :

La membrane lysosomale isole les constituants de la cellule de l'action des hydrolases acides contenues dans le lysosome (Figure 1). Elle est importante pour le maintien de l'homéostasie de la cellule car elle constitue le lien de communication entre la lumière du lysosome et le milieu cytosolique (Bagshaw et al., 2005).

Le pH à l'intérieur de l'organelle se maintient entre 5,0 et 5,5 grâce à l'action d'une pompe à protons appelée « pompe à protons vacuolaire » ou encore « H^+ATPase de type V » localisée dans la membrane lysosomale. Cette dernière se sert de l'énergie libérée par l'hydrolyse d'ATP pour permettre la translocation de protons à l'intérieur de la lumière du lysosome (Toyomura et al., 2003).

Environ 50 % des protéines membranaires lysosomales appartiennent à un groupe de glycoprotéines membranaires intégrales d'un poids moléculaire compris entre 85 et 120 kDa : Lamp-1, Lamp-2, Limp-I et Limp-II (Braulke, 1996)

(1) Les protéines Lamps « Lysosome-associated membrane proteins» :

Lamp-1 et Lamp-2 sont les protéines membranaires les mieux caractérisées. Il s'agit de protéines membranaires de type I, possédant l'extrémité N-terminale dans la lumière du lysosome et une extrémité C-terminale cytosolique. Elles possèdent une courte queue cytoplasmique contenant un signal composé d'une séquence d'acides aminés nécessaire à leur ciblage vers le lysosome. Leur domaine luminal possède 16 à 20 sites de N-glycosylation et des sites de O-glycosylation (Eskelinen et al., 2003). Les hydrates de carbone représentent environ 60% de la masse totale des protéines Lamp. Cette glycosylation constituerait une protection contre la protéolyse par les hydrolases acides (Mellman, 1989).

Des souris déficientes en Lamp-1 et Lamp-2 ont été créées. Les souris déficientes en Lamp-1 sont viables et fertiles. Des analyses morphologiques n'ont révélé aucune anomalie. De même, les propriétés du lysosome telles que les activités enzymatiques, le pH intralysosomal, l'équilibre osmotique et la densité, sont semblables à celles des souris contrôles. Donc, il semblerait que les lysosomes déficients en Lamp-1 soient normaux ; la surexpression de Lamp-2 observée dans ces animaux compenserait le déficit en Lamp-1 (Andrejewski, 1999)

Les souris déficientes en Lamp-2 révèlent un poids inférieur aux souris contrôles et une mortalité élevée entre 20 et 40 jours après la naissance. Les souris survivantes sont fertiles et

ont une durée de vie normale, en dépit d'une taille plus petite. Ces souris sont caractérisées par une accumulation de vacuoles autophagiques (remplies de débris cytoplasmiques et de glycogène) proéminentes au niveau du foie, du pancréas et des muscles cardiaques et squelettiques. Ce phénotype de myopathie cardiosquelettique vacuolaire ressemble aux symptômes rencontrés dans une maladie humaine, la maladie de Danon (Tanaka et al., 2000). Il s'agit d'une pathologie sans déficit en maltase acide (α-glucosidase acide) (Nishino I, 2000). Lamp-II serait impliqué dans les processus de fusion de vacuoles autophagiques avec les endosomes/lysosomes qui fournissent les hydrolases acides requises pour la dégradation, ou dans la maturation des autophagolysosomes en des organelles activement digestives (Tanaka et al., 2000).

(2) Les protéines Limps « Lysosome-integral membrane proteins » :

Les deux protéines Limps sont moins abondantes que les précédentes. Il s'agit de protéines membranaires de type III : les deux extrémités de la protéine se trouvent dans la lumière du lysosome et sont fortement glycosylées. Limp-I possède quatre domaines transmembranaires tandis que Limp-II n'en possède que deux (Hunziker and Geuze, 1996).

Le rôle exact des protéines Limp n'est pas clair. Une surexpression de LimpII entraîne la formation de larges compartiments vacuolaires pouvant résulter de l'augmentation de fusions entre vésicules et/ou de fusions homotypiques d'endosomes et de lysosomes. L'accumulation de Limp II dans le compartiment endosomal semble interférer avec le bourgeonnement vésiculaire sans toutefois altérer le mécanisme de fusion membranaire entraînant ainsi l'élargissement de ces compartiments. Limp-II semblerait jouer un rôle dans la biogenèse des compartiments endolysosomaux (T. Kuronita, 2002).

(3) D'autres protéines membranaires:

Il existe d'autres protéines dans la membrane du lysosome. Certaines sont des protéines de transport de métabolites issus de la digestion enzymatique. On retrouve notamment parmi les protéines de transport : la sialine qui transporte l'acide sialique hors du lysosome ainsi que la cystinosine qui est un transporteur de cystine (Eskelinen et al., 2003)

Récemment, une nouvelle protéine membranaire lysosomale a été identifiée par notre laboratoire. Des lysosomes de foie de rat purifiés par centrifugation isopycnique sur gradient de Nycodenz ont permis d'effectuer une préparation de membrane lysosomale afin d'en extraire les protéines les plus hydrophobes et de les analyser par spectrométrie de masse. Une séquence d'acides aminés a été identifiée et se révèle appartenir à une protéine hypothétique de 372 acides aminés avec une masse théorique d'environ 40 KDa, dès lors désignée sous le nom de « p40 ». Des études biochimiques et morphologiques de sa localisation ont apporté la preuve de sa localisation lysosomale. La protéine contient trois sites potentiels de N-glycosylation et quatre signaux membranaires potentiels pour le ciblage vers le lysosome. p40 semble toutefois être non glycosylée. La protéine possède entre sept et dix segments transmembranaires et de petites boucles exposées à l'intérieur de la lumière du lysosome. Le rôle de p40 reste inconnu. Des recherches d'homologie de séquences montrent la présence d'un domaine conservé chez plusieurs membres d'une famille de transporteurs de « nucléotide-sucre ». Une hypothèse de travail envisage que p40 correspondrait à un transporteur membranaire lysosomal (Boonen et al., 2006).

c) La biosynthèse des protéines lysosomales et modifications post-traductionnelles :

(1) Les protéines solubles :

Les premières étapes de la biosynthèse des protéines lysosomales sont communes à celles des protéines destinées à la sécrétion. Ces protéines sont synthétisées par les polysomes présents sur la membrane du réticulum endoplasmique rugueux (RER). La séquence de ces protéines contient un peptide signal amino-terminal qui est reconnu par la ribonucléoprotéine SRP (*Signal Recognition Particle*). Après reconnaissance du peptide signal, la protéine est transloquée dans la lumière du RER. De façon concomitante, à l'intérieur du RER a lieu le clivage du peptide signal ainsi que la glycosylation de résidus asparagine (Asn) sélectionnés à partir de séquences consensus Asn-X-Ser/Thr (X correspond à tous les acides aminés hormis la proline) (Braulke, 1996). La glycosylation implique le transfert « en bloc » d'un oligosaccharide préformé composé de trois glucoses, neuf mannoses et deux N-acétylglucosamines. Une maturation de cet oligosaccharide commence par l'excision progressive de trois glucoses terminaux et d'un résidu mannose (Fig 2).

Après cette étape de maturation, les protéines sont acheminées par le transport vésiculaire vers le Golgi, où elles subissent une série de remaniements spécifiques de leurs oligosaccharides : elle acquièrent un signal mannose 6-phosphate de ciblage vers les lysosomes. Deux enzymes golgiennes agissent de manière séquentielle sur les protéines lysosomales solubles.

La première enzyme, l'UDP-N-acétylglucosamine phosphotransférase, a été purifiée à partir de foie de bœuf et est composée de plusieurs sous-unités ($\alpha 2$, $\beta 2$ $\gamma 2$). Elle permet le transfert d'un N-acétylglucosamine-1-phosphate à partir d'un UDP-N-acétylglucosamine, sur un ou plusieurs résidus mannose des oligosaccharides N-liés des hydrolases (Bao et al., 1996). La spécificité de cette enzyme dépend à la fois de la présence de chaînes oligosaccharidiques et de la structure tridimensionnelle des protéines lysosomales. La seconde enzyme, l'N-Acétylglucosamine-1-phosphodiester α-N-acétylglucosaminidase enlève le résidu N-acétylglucosamine terminal, pour finalement exposer le groupement mannose-6-phosphate qui sera le signal de reconnaissance pour le ciblage vers le lysosome (Kornfeld et al., 1998).

Le groupement mannose-6-phosphate est reconnu au niveau du trans-Golgi network (TGN) par deux récepteurs : le CI-MPR (récepteur mannose-6-phosphate cation indépendant) de 300 kDa et le CD-MPR (récepteur mannose-6-phosphate cation dépendant) de 46 kDa. Ces deux récepteurs ont en commun la tâche de délivrer les hydrolases acides nouvellement synthétisées du TGN au compartiment endosomal (Fig 3). L'interaction du signal M6-P/MPR distingue les protéines solubles destinées au lysosome des protéines destinées à poursuivre la voie de sécrétion. Contrairement à leur molécule cargo, les MPRs n'atteignent pas le lysosome. Ils sont recyclés entre les endosomes et le TGN ainsi qu'entre les endosomes et la membrane plasmique. C'est le cas du CI-MPR qui est le seul récepteur à pouvoir lier des ligands en membrane plasmique(Tikkanen et al., 2000). Le ciblage au TGN des deux récepteurs est déterminé par des signaux présents dans leur queue cytoplasmique. Ces signaux, des motifs dileucine précédés de quelques acides aminés (D/EXXLL) (Jadot et al., 1992) et des motifs tyrosine (NPXY ou YXX_) interagissent avec des protéines adaptatrices (AP-1, GGAs). (Bonifacino and Traub, 2003)

Il existe toute une série de ces « adaptator proteins » (AP). Les APs se composent de 4 sous-unités dont une sous-unité β importante pour le recrutement de la clathrine. Des protéines nommées GGAs, « Golgi localized, _-ear containing ARF binding protein » sont d'autres protéines adaptatrices qui comprennent domaines. Un domaine VHS est responsable

de la liaison avec le motif dileucine de la queue cytosolique des MPRs. Un domaine GAT permet le recrutement du GGAs au TGN via une interaction avec une ARF-GTP présente sur la membrane du TGN. Une boucle (« hinge ») interagit avec le domaine terminal de la chaîne lourde de la clathrine et enfin, le domaine terminal « ear » interagit avec des protéines accessoires intervenant dans la formation de la vésicule (Fig 4) (Robinson and Bonifacino, 2001; Tooze, 2001). La clathrine est une protéine à trois jambes qui forme autour des bourgeons membranaires destinés au trafic intracellulaire, un manteau en forme de treillis. Ce manteau facilite le bourgeonnement des vésicules (Royle, 2006)

Les vésicules de transport issues du TGN contiennent le complexe récepteur-hydrolase et le transportent vers les endosomes où a lieu une fusion de la vésicule avec la membrane endosomale. L'enzyme se dissocie ensuite de son récepteur en réponse au pH acide du compartiment endosomal, ensuite le récepteur est recyclé vers le Golgi (Braulke, 1996).

(2) Les protéines membranaires :

La biosynthèse des protéines membranaires commence au niveau des ribosomes à proximité du RER comme pour les protéines solubles. Les protéines membranaires sont « transloquées » à travers la membrane du RER. Les protéines lysosomales membranaires ne reçoivent pas de groupement mannose-6-phosphate.

Le mécanisme de transport des protéines membranaires vers le lysosome ressemble à celui des MPRs. Le ciblage vers le lysosome se fait via la reconnaissance par des protéines adaptatrices d'un motif d'adressage contenu dans la queue cytosolique des protéines membranaires. Les machineries de transport et de fusion sont semblables à celles qui permettent le transport des complexes formés entre les MPRs et les protéines lysosomales phosphomannosylées.

Il existe différents motifs d'adressage pour le lysosome, constitués de courtes séquences d'acides aminés. Il existe deux catégories principales de signaux :

- Les motifs basés sur la tyrosine, répondant au consensus NPXY ou YXX_. Les motifs NPXY, présents par exemple dans les récepteurs à LDL, assurent l'internalisation de protéines membranaires à partir de la membrane plasmique (Chen et al., 1990). Les motifs tyrosine ou YXX_ (où X correspond à n'importe quel acide aminé, _ à un acide aminé hydrophobe) sont trouvés dans une population plus large de protéines que NPXY (Jadot et al., 1992). Ils sont rencontrés dans tous les types de protéines transmembranaires comme les LAMPs et LIMPs, et dans les deux types de MPRs. Ce motif est reconnu par les complexes de protéines adaptatrices. Il intervient à la fois dans l'internalisation des protéines à partir de la membrane plasmique et dans le ciblage des protéines membranaires du TGN vers la membrane plasmique et le compartiment endolysosomal.
- Les motifs dileucine de type [DE]XXX [LI]et DXXLL. Un tel motif est présent chez LIMP-2, et comme le motif YXX_, est reconnu par des complexes de protéines adaptatrices. Il est aussi présent chez les MPRs (en plus de YXX_) où il permet l'interaction du récepteur avec les protéines adaptatrices GGAs (Puertollano et al., 2001).

B. Les pathologies de surcharge :

1. *Généralités :*

Les maladies de surcharge lysosomale (LSDs) sont connues depuis longtemps. En 1882, avant même la découverte des lysosomes par Christian de Duve, Philippe Gaucher avait décrit une hépatosplénomégalie. Il venait de décrire ainsi sans le savoir une maladie de surcharge lysosomale.

A ce jour, plus d'une quarantaine d' LSDs ont été décrites. Beaucoup d'entre elles sont caractérisées par le déficit d'une ou plusieurs activités enzymatiques lysosomales ce qui a pour conséquence une accumulation intra-lysosomale massive de matériaux normalement dégradés par l'enzyme (Kornfeld, 1989)

Toutefois, toutes les LSDs ne sont pas dues à un dysfonctionnement d'une enzyme lysosomale. Comme nous l'avons détaillé précédemment, le processus de ciblage des enzymes pour le lysosome consiste en une série d'étapes successives et complexes. Il n'est donc pas étonnant de décrire des LSDs ayant pour origine un problème de trafic intracellulaire vers le lysosome plutôt qu'un problème de biosynthèse (Kornfeld, 1985).

Les LSDs sont en général des maladies génétiques rares et récessives. De nombreuses mutations différentes peuvent se présenter dans un même gène chez différents patients. Certaines mutations mènent à la perte complète de l'activité enzymatique tandis que d'autre ne font que la réduire (Futerman and van Meer, 2004; Meer, 2004). Globalement, ces maladies présentent une incidence d'une naissance sur 8000 ce qui en fait un problème de santé à l'échelle mondiale (Platt F.M, 2004)

2. *Classifications des LSDs :*

Il existe deux grands types de classifications, en fonction du matériel stocké et en fonction des défauts moléculaires impliqués :

Il existe 7 classes de maladies selon le matériel accumulé dans la lumière intralysosomale (Tableau 3).

a) Classification en fonction du matériel stocké :

(1) Les lipofuscinoses neuronales :

(a) Généralités :

Les lipofuscinoses céroïdes neuronales (CLNs) sont caractérisées par une accumulation d'un lipopigment autofluorescent « la lipofuscine céroïde » et également de la sous-unité c de l'ATP synthase mitochondriale dans les neurones et dans une large variété d'autres cellules (Kurachi et al., 2001).

Il s'agit d'un groupe de maladies neurodégénératives rencontrées chez les enfants et les adolescents avec une incidence de 1/12500 enfants (Futerman and van Meer, 2004). Elles partagent des symptômes similaires : retards mentaux, troubles de la locomotion, phases de tremblements, démence et cécité (Sleat et al., 1997)

Il existe 8 formes infantiles et une forme adulte de CLN : (Mole et al., 2005; Steinfeld et al., 2004)

- « *Infantile NCL* » : CLN1 (INCL) ou maladie de Santavuori-Haltia
- « *Classical-late infantile NCL* » :CLN2 (cLINCL) ou maladie de Jansky-Bielschowsky
- « *Juvenile NCL* » : CLN3 (JNCL) ou maladie de Spiegelmeyer-Vogt-Sjogren
- *« Adult NCL* » :CLN4 ou maladie de Kufs
- « Finnish variant LINCL » : CLN5
- «Variant LINCL» : CLN6
- "Turkish variant LINCL" : CLN7
- "Northern Epilepsy" : CLN8
- CLN9

Les différentes formes infantiles et juvéniles sont transmises de façon autosomale et récessive et causées par des mutations dans les différents gènes cités. Récemment, il fut possible de localiser les chromosomes sur lesquels se situent les gènes CLN6 et 7. Néanmoins, leur identité exacte reste encore à déterminer. Les gènes responsables de la forme adulte de la maladie (CLN4) pour l'heure sont toujours inconnus. (Sleat et al., 1999). La distinction entre CLN7 et CLN8 n'est pas claire. En effet, CLN7 semble partager une homologie de séquence avec une région du chromosome 8p23. C'est dans cette région télomérique que se localise le gène CLN8. On postule donc que CLN7 ne soit en fait qu'un variant allèlique du gène CLN8 (Mitchell et al., 2001). Le gène de CLN9 est inconnu (Schulz et al., 2006).

La fonction de la plupart des protéines codées par ces gènes est encore inconnue. Deux fonctions connues sont l'activité palmitoyl thioesterase de la protéine CLN1 (Ahtiainen et al., 2006) et l'activité tripeptidyl peptidase I de la protéine CLN2. Quatre des cinq protéines connues (CLN3, CLN5, CLN6 et CLN8) sont dotées d'un ou plusieurs segments transmembranaires potentiels (Mole et al., 2005).

(b) La lipofuscinose céroïde tardive infantile:

Dans ce paragraphe, nous accordons un intérêt particulier à la lipofuscinose céroïde neuronale infantile tardive qui fait l'objet de ce mémoire.

La « classical-late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis » est une maladie neurodégénérative progressive et fatale des enfants (Sohar et al., 1999). Elle est caractérisée par l'accumulation intralysosomale de lipofuscine céroide et de la sous-unité c de l'ATP synthase mitochondriale dans le système nerveux central et les tissus périphériques (Koike et al., 2002). La cause de cette accumulation de la sous-unité c de l'ATP synthase mitochondriale semble être liés à un défaut de dégradation (Kida et al., 1993).

Le processus neurodégénératif débute entre 2 et 4 ans et progresse pour mener l'enfant vers une issue fatale entre l'âge de 7 et 14 an . Cette progression se manifeste par des crises d'épilepsie, des tremblements de plus en plus importants, l'installation de la cécité, des retards mentaux, l'ataxie et la démence (Sleat et al., 2004).

L'origine de la maladie met en cause des mutations du gène « CLN2 » codant pour une protéase, et positionné sur le chromosome 11p15. Cette protéine a été identifiée au cours d'une étude biochimique visant à mettre en évidence la protéine déficiente chez les patients atteints de LINCL. Une étude comparative des protéines M6-P (préparées par

chromatographie d'affinité sur le MPR immobilisé) réalisée sur un échantillon LINCL et témoin a permis de mettre en évidence la protéine manquante chez les sujets malades (Sleat et al., 1997). Cette protéine de 46-48 kDa (Kurachi et al., 2001) hautement conservée et largement distribuée dans les organismes supérieurs partage de grandes similarités avec les protéases acides procaryotiques insensibles à la pepstatine A, un inhibiteur classique des protéases (Alenxander Wlodawer, 2003). Cette protéine montre une faible activité pepinase (protéase insensible à la pepstatine) dans le cerveau d'individu normaux et se montre absente chez les malades. Elle possède un pH optimal à 3.5, est rapidement inactivée à pH neutre. Des fractionnements subcellulaires par centrifugation différentielle et isopycnique sur gradient de Nycodenz ont démontré que la protéine CLN2p est localisée dans le lysosome (Sohar et al., 1999). Des études menées par Vines et Warburton ont permis d'apporter la preuve que la protéine CLN2p n'était autre que la tripeptidyl peptidase I (TPPI) sur base d'homologies de séquences d'acides aminés prédites pour CLN2 et TPPI (Vines and Warburton, 1999).

Il existe 24 mutations associées à cLINCL qui incluent des mutations « faux-sens », « aux sites d'épissages », « non-sens » et de petites délétions ou des insertions de nucléotides (Sleat et al., 1999).

(2) Les lipidoses :

Les lipidoses représentent environ la moitié des maladies de surcharge lysosomale. La plupart d'entre elles impliquent le système nerveux central vu l'importance des glycolipides dans les fonctions neuronales, où ils constituent les précurseurs des sphingolipides qui font partie de la composition de la membrane plasmique et de la sphingomyéline.

(3) Les maladies de Wolman et CESD :

Les maladies de Wolman et CESD « cholesteryl ester storage disease » sont deux lipidoses caractérisées par une déficience en lipase acide lysosomale responsables de la dégradation des esters de cholestérol (CE) et des triglycérides (TG) délivrés aux lysosomes via des récepteurs aux lipoprotéine de faible densité (R-LDL). Les produits de cette hydrolyse sont le cholestérol, des di- et monoacylglycérides, et des acides gras libres qui sont transportés dans le cytoplasme afin d'être recyclés par la cellule pour la biogenèse membranaire, la synthèse d'hormones stéroïdiennes, leur stockage ou leur ré-estérification. La maladie de Wolman est la forme la plus sévère avec une issue fatale pour les nouveaux-nés avant l'âge d'un an. Elle se caractérise par une accumulation massive de CE et TG dans le foie et l'intestin grêle. La CESD constitue une forme plus légère où les malades possèdent une durée de vie normale. Elle est caractérisée par une accumulation d'esters de cholestérol dans les tissus viscéraux (Du et al., 2001).

(a) Les sphingolipidoses :

Les sphingolipidoses sont dues à différents défauts dans la voie de dégradation des sphingolipides (Sandhoff and Kolter, 2003).Elles se décomposent en 2 sous-groupes suivant le matériel accumulé (Fig 5). :

(i) Les sphingolipides non glycosylés :

Voici quelques maladies rencontrées dans ce groupe de sphingolipidoses :

(a) Les maladies de Niemann-Pick de type A et B :

Toutes deux résultent d'une déficience de l'activité enzymatique de la sphingomyélinase acide. Elles se caractérisent par une accumulation de sphingomyéline et de gangliosides. La Niemann-Pick de type A est une maladie neurodégénérative qui se manifeste par des retards psycholocomoteurs, une hépatosplénomégalie et une issue fatale vers l'âge de 3 ans. La Niemann-Pick de type B porte peu ou pas atteinte aux cellules neuronales mais provoque une hépatosplénomégalie et des problèmes respiratoires. Les malades atteignent l'âge adulte. L'hétérogénéité phénotypique de ces deux maladies est issue de différentes mutations dans le gène de la sphingomyélinase acide, qui altèrent l'activité de l'enzyme (perte quasi totale chez la maladie de type A, de façon variable la maladie de type B) (Levran et al., 1991).

(b) La maladie de Niemann-Pick de type C:

Il existe deux types de maladies de Niemann-Pick de type C dont la plus fréquente est la NPC de type 1. La NPC1 est une maladie neurodégénérative caractérisée par une accumulation de sphingomyéline et de gangliosides. Elle est surtout connue pour la profonde perturbation de l'homéostasie du cholestérol. En effet, cette maladie montre une accumulation de cholestérol non estérifié dans les lysosomes. Cette surcharge affecte la mobilité de tubules d'endosomes tardifs, ce qui aurait un effet néfaste sur les fonctions neuronales (Zhang et al., 2001). Le neurone étant hautement dépendant des microtubules pour le transport axonal, la cessation du mouvement endosomal le long des microtubules porterait atteinte à la viabilité cellulaire (Yonekawa et al., 1998).

La maladie NPC2 est la deuxième forme de maladie de Niemann-Pick de type C. La maladie est causée par une déficience en HE1, une petite protéine lysosomale à caractère ubiquiste, identifiée comme une protéine de liaison au cholestérol (Naureckiene et al., 2000). Cette pathologie se caractérise par une accumulation de cholestérol dérivé des LDLs (*low density lipoproteins*). (Friedland et al., 2003)

(ii) Les sphingolipides glycosylés :

Cette classe de sphingolipidoses se divise en deux sous-groupes sur base du glycosphingolipide accumulé:

(a) La glucosylcéramide :

Voici deux maladies rencontrées dans ce groupe :

Les maladies de Tay-Sachs et Sandhoff (aussi appelées gangliosidoses GM2) sont caractérisées par l'absence d'activité de la β-hexosaminidase lysosomale. La maladie de Tay-Sachs est due à une déficience en β-hexosaminidase A tandis que la maladie de Sandhoff est un déficit en β-hexosaminidases A et B (Neufeld, 1989). La maladie de Tay-Sachs est biochimiquement et cliniquement similaire à la maladie de Sandhoff car c'est la déficience en

la β-hexosaminidase A qui entraîne l'accumulation de glycosphingolipides dans les lysosomes. Le stockage massif de ces glycosphingolipides est évident dans les neurones où des gangliosides sont synthétisés en grande quantité. Les conséquences de la surcharge se manifestent dès le plus jeune âge incluant des problèmes moteurs, des tremblements, la cécité et la mort vers l'âge de 5 ans (Wu and Proia, 2004).

(b) La galactosylcéramide:

Il existe deux formes de sphingolipidoses entraînant une accumulation de galactosylcéramide : la maladie de Krabbe (basée sur une déficience en β-galactosyl céramidase) et la leukodystrophie métachromatique (Platt F.M, 2004). Cette dernière est issue d'un déficit en arylsulfatase A ce qui a pour conséquence un stockage intralysosomal de galactosylcéramide sulfatée (von Figura et al., 1983).

(4) Les mucopolysaccharidoses :

Les mucopolysaccharidoses (MPS) sont des maladies caractérisées par le stockage ou la sécrétion hors de la cellule de glycoaminoglycans (GAGs) intacts ou partiellement dégradés qui se retrouvent dans la circulation sanguine et l'urine. Ces LSDs sont causées par la déficience d'enzymes lysosomales nécessaires à la dégradation des GAGs tels que le dermatan sulfate, l'héparane sulfate, le kératane sulfate, le chondroïtine sulfate et l' hyaluronan (Tomatsu et al., 2005) (Fig. 6).

(5) Les mucolipidoses :

Les mucolipidoses (MLs) se caractérisent par l'accumulation intracellulaire de GAGs et de sphingolipides. Il s'agit de maladies induites par un défaut dans la phosphorylation et la localisation d'enzymes lysosomales suite à une déficience en N-acetylglucoaminyl-1-phosphotransférase (Tomatsu et al., 2005) (Kornfeld, 1985), (Creek and Sly, 1983)

(6) Les glycogénoses :

Une maladie concerne une surcharge lysosomale en glycogène. Il s'agit de la « maladie de Pompe » ou « glycogen storage disease type II » résultant d'un déficit en une enzyme, la maltase acide (α-glucosidase acide). Cette maladie affecte la fonction cardiaque et celle des muscles squelettiques. Il existe deux formes de la maladie. La forme précoce est caractérisée par une surcharge lysosomale de glycogène dans le cœur, les muscles squelettiques, les muscles lisses, le rein, le foie et le système nerveux. La forme tardive se manifeste par une accumulation de glycogène uniquement dans les cellules musculaires squelettiques (Bijvoet et al., 1998).

Une autre maladie est classée dans cette catégorie : la maladie de Danon, qui résulte d'une déficience en protéine membranaire Lamp II (voir les protéines Lamp II). Néanmoins, elle n'est pas considérée comme glycogénose au sens propre car le stockage de glycogène ne se manifeste pas toujours (Tanaka et al., 2000).

(7) Les glycoprotéinoses :

Le terme de glycoprotéinose est mal choisi car cette classe comprend différentes maladies caractérisées soit par une accumulation de glycoprotéines, soit par une accumulation d'oligosaccharides ou encore une accumulation de glycoconjugués. On retrouve des maladies telles que la fucosidose due à un déficit en α-fucosidase responsable du catabolisme de nombreux glycoconjugués, les sialidoses, les galactosialidoses, …revu par (Platt F.M, 2004).

Les sialidoses sont causées par la déficience en sialidase lysosomale suite à des mutations dans le gène « NEU1 ». Les sialidases ou neuraminidases sont des enzymes glycolytiques qui ôtent les résidus d'acide sialique terminaux des glycoprotéines, des oligosaccharides et des glycolipides sialylés.

Les galactosialidoses résultent d'une déficience en cathepsine A, une enzyme dotée d'une fonction protectrice sans laquelle deux hydrolases, la sialidase et la β-galactosidase, sont protéolysées dans le lysosome. Il en résulte une déficience des deux enzymes. La maladie est dominée par une perte de l'activité de la sialidase car la β-galactosidase agit en aval de la sialidase et de ce fait contribue moins à la maladie (Platt F.M, 2004).

Dans les deux maladies, la déficience en sialidase provoque une rupture dans la voie catabolique de dégradation des glycoconjugués sialylés. Il en résulte une accumulation de ces substrats dans le lysosome (Seyrantepe et al., 2004).

(8) Divers:

Certaines maladies ne parviennent pas à être classées en fonction du matériel accumulé comme la déficience multiple en sulfatase, la cystinose et la maladie de Salla (voir plus loin) (Platt F.M, 2004).

b) Classification en fonction des déficiences moléculaires :

Une autre classification prend en compte les défauts moléculaires entraînant le développement de ces pathologies. Cette nouvelle classification, mise en parallèle avec la classification classique, permet d'établir un meilleur diagnostic et permet de développer différentes approches thérapeutiques adaptées spécifiquement au déficit constaté (Tableau 4).

(1) Déficit en hydrolases acides :

Cette catégorie représente les LSDs ayant pour cause des mutations de gènes codant pour des enzymes cataboliques. Ces mutations peuvent avoir lieu notamment dans le promoteur du gène, dans des séquences d'épissage ou encore dans la séquence codante du gène. Ces mutations induisent des problèmes d'affinité, de stabilité, de localisation ou encore de perte de l'activité catalytique de l'enzyme. Dans de tels cas, le système endosome/lysosome se retrouve privé d'une enzyme fonctionnelle (Bellier, 2001). Le cas de la « classical late infantile ceroid lipofuscinosis » qui fait l'objet de ce travail, illustre bien cette catégorie. La maladie est induite par des mutations dans le gène CLN2 codant pour une hydrolase acide lysosomale, la tripeptidyl peptidase I. Cela se manifeste par une accumulation massive de la sous-unité C de l'ATP synthase mitochondriale dans la lumière du lysosome ainsi que d'un lipopigment autofluorescent, la lipofuscine céroide. On pense que le clivage par TPP-I initie la dégradation de la sous-unité. Cette dégradation est alors complétée par

d'autres enzymes (Warburton and Bernardini, 2001). Il existe d'autres déficits en hydrolases acides. Citons notamment, le déficit en lipase acide lysosomale responsable des maladies de Wolmann et CESD (Du et al., 2001), le déficit en β-hexosaminidase (A et B) responsable des maladies de Tay-Sachs et de Sandhoff (Wu and Proia, 2004).

(2) Défauts dans les modifications post-traductionnelles d'enzymes lysosomales :

La déficience multiple en sulfatase (MSD) est une maladie de surcharge lysosomale caractérisée par la réduction de l'activité catalytique de l'ensemble des sulfatases. Ces enzymes sont, pour la plupart, solubles dans la lumière du lysosome. Au cours ou peu après la translocation des sulfatases encore non repliées dans le RER, a lieu une modification de l'enzyme : la génération d'un dérivé acide aminé indispensable à leur activité catalytique. Il s'agit d'un dérivé de cystéine unique : le Cα-formylglycine (FGly). Ce résidu FGly est présent dans le site actif des sulfatases. Les origines de la MSD sont des mutations dans le gène SUMF1 codant pour la protéine responsable de cette modification, la « *sulfatase modifying factor 1* » ou « *FGly generating enzyme* » (Dierks et al., 2003).

(3) Défauts au niveau du trafic vers le compartiment lysosomal :

Certaines maladies de surcharge sont dues à une déficience enzymatique affectant la synthèse du signal mannose-6-phosphate. Il en découle la perte du signal d'adressage intracellulaire vers le lysosome. Une de ces maladies est l' « I-cell disease » ou mucolipidose II. Comme développé plus haut, les enzymes lysosomales solubles nouvellement synthétisées dans le RE sont reconnues par leur marqueur mannose-6-phosphate afin d'être dirigées vers le lysosome. Dans l'I-cell disease, la N-Acétylglucosamine phosphotransférase est inactive. Il en découle une perturbation du ciblage des enzymes lysosomales dépourvues de leur marqueur mannose-6-phosphate. Toutefois, l'activité de plusieurs enzymes lysosomales (α-mannosidase, β-glucuronidase, β-N-acétylglucosaminidase et α-L-iduronidase) reste toujours comparable dans le foie de malades par rapport aux contrôles (Owada and Neufeld, 1982). Il existerait donc un mécanisme de transport vers le lysosome indépendant des MPRs. Une souris déficiente en MPRs (CD- et CDI- MPR) a été générée en 1998 et mime le phénotype rencontré chez les patients de l'I-cell disease, caractérisé par le stockage lysosomal d'hydrates de carbones complexes et de lipides. L'activité de plusieurs hydrolases acides diminue fortement dans les fibroblastes de ces souris tandis que les activités sont normales dans des organes tels que le foie, le rein et le cerveau. Les études de cette voie alternative chez cette souris ont permis de montrer que ces mécanismes sont spécifiques du type cellulaire (Dittmer et al., 1999).

(4) Déficit en une enzyme de protection :

La maladie de surcharge lysosomale mettant en cause une enzyme de protection lysosomale est la β-galactosialidose. Comme nous l'avons décrit précédemment (voir glycoprotéinose), il s'agit d'une maladie due à un déficit en cathepsine A, une protéine qui s'associe à la β-galactosidase et à la N-acétyl-α-neuraminidase. Cette déficience induit la protéolyse des deux enzymes, accompagnée d'un stockage massif d'oligosaccharides sialylés (Hiraiwa, 1999).

(5) Déficit de protéines transmembranaires:

On ne comprend pas encore très bien tous les défauts qui surviennent lorsqu'une protéine transmembranaire est absente, qu'elle soit une protéine de transport ou non. On pense que ces protéines pourraient avoir des implications dans le trafic intracellulaire, dans les mécanismes de fusion des vésicules, ou encore dans le transport de substrats entre les compartiments subcellulaires (Platt F.M, 2004)

Un exemple de ce type de maladie est la maladie de Salla. Cette maladie de surcharge est caractérisée par une accumulation d'acide sialique à l'intérieur de la lumière du lysosome (Mancini et al., 1991). Elle est due à une déficience dans le gène AST codant pour la sialine, une protéine lysosomale impliquée dans le transport de l'acide sialique de la lumière du lysosome vers le cytosol (Eskelinen et al., 2003).

Un autre exemple est la maladie de Danon, aussi connue comme glycogénose avec une activité maltase acide normale. Cette maladie est caractérisée par l'accumulation de vacuoles autophagiques contenant des débris cytoplasmiques dans les cellules musculaires squelettiques et cardiaques. La protéine déficitaire responsable est la glycoprotéine transmembranaire LampII. La fonction exacte de Lamp II et la raison pour laquelle son absence entraîne un phénotype de surcharge ne sont pas connus (Futerman and van Meer, 2004).

C. La souris CLN2 -/- :

Ce modèle animal a été développé par le laboratoire dirigé par Peter Lobel (CABM, Piscataway, New Jersey) par inactivation ciblée du gène CLN2 (Sleat et al., 2004).

1. *Le phénotype :*

La souris CLN2-/- semble normale à la naissance et se développe normalement. Elle est fertile et ne montre pas de signes extérieurs de maladie jusqu'à l'âge de 7 semaines où des tremblements commencent à apparaître. La pathologie évolue en s'aggravant, ce qui se manifeste par des difficultés locomotrices (marche en canard, …), l'apparition de crises d'épilepsie et une durée de vie raccourcie entre 103 et 169 jours.

2. *Histologie :*

La caractéristique principale de la cLINCL est l'accumulation de lipofuscine à l'intérieur des cellules des individus affectés. A 154 jours, les souris contrôles et hétérozygotes possèdent une distribution de lipofuscine ponctuée dans le cytoplasme, ce qui suggère une localisation dans les lysosomes. Cette distribution est observée dans des échantillons de néocortex. Chez les souris mutées du même âge, la quantité de matériel autofluorescent accumulé augmente, à un point tel qu'il remplit l'espace occupé normalement par le cytoplasme dans le corps neuronal. Les dépôts sont visibles dès 48 jours et s'accumulent progressivement. Ils sont présents dans la plupart des régions du cerveau incluant le néocortex, l'hippocampe, le thalamus et s'étendant vers le cerveau postérieur et le cordon médullaire. On note également une accumulation de matériel autofluorescent dans les neurones moteurs et sensoriels. La pathologie est surtout visible sur des neurones de taille moyenne et large surtout dans la région postérieure du cerveau. Des inclusions y sont visibles

dès l'âge de 50 jours environ même si d'autres manifestations de la pathologie n'apparaissent pas encore. Ces inclusions forment des agrégats qui s'accumulent dans le neurone. L'équipe de Lobel a décelé également dans les souris les plus âgées, une désorganisation de la myéline avec une dilatation sur toute l'étendue de l'axone.

Une caractéristique ultrastructurelle importante de la cLINCL est la présence de corps de stockage curvilignes (Mole et al., 2005). Des inclusions similaires sont observées chez les souris mutantes dès l'âge de 35 jours dans le cortex cérébral et dans d'autres régions du cerveau. Ces corps curvilignes sont larges et pas toujours entourés d'une membrane discernable.

La présence de matériel stocké en dehors du cerveau a aussi été observée chez ces souris. On note des niveaux plus importants de matériaux autofluorescents dans le foie, le rein, le cœur et la rate, bien qu'aucune cytopathologie associée avec la surcharge n'ait été observée.

3. *La neuropathologie:*

La souris CLN2-/- manifeste une atrophie modérée du cerveau antérieur, notamment au niveau de l'hippocampe et du néocortex. Ceci semble s'accorder avec la perte de neurones dont l'organisation cellulaire se dégrade. Cette perte est visible en microscopie électronique (désorganisation du neuropil, aspect difforme, noyau en dégénération…). Dans le cervelet, les cellules de Purkinje subissent des changements dégénératifs. Les observations de Lobel et al. montrent également une altération importante du système auditif tandis que les organes visuels semblent non affectés.

La souris CLN2-/- est actuellement le modèle animal le plus favorable à l'étude de la maladie cLINCL. Elle permet de mieux comprendre les mécanismes de la maladie. Il s'agit d'un atout précieux dans le cadre des approches thérapeutiques et notamment dans le cadre des thérapies géniques. Récemment, des essais d'injections intracrâniennes d'un vecteur viral (AAV) contenant une version fonctionnelle de CLN2 ont été effectués chez cette souris. Des observations en microscopie électronique révèlent que les cellules issues de cerveau ayant subi l'injection présentent une diminution des corps curvilignes caractéristiques de la pathologie, comparées aux souris CLN2 -/- non traitées. L'enzyme est capable de dégrader du matériel de stockage déjà présent chez des souris d'un âge avancé et présentant la pathologie lysosomale. Ces nouvelles données rendent intéressante la perspective d'utiliser la thérapie génique utilisant les AAV pour traiter les patients de la cLINCL (Passini et al., 2006).

D. Objectif du mémoire :

Parmi les maladies de surcharge lysosomale, nous nous sommes focalisés sur la lipofuscinose céroïde neuronale infantile tardive. Cette maladie neurodégénérative qui touche les jeunes enfants les mène à une mort précoce. Elle est causée par la déficience en une protéase : la tripeptidyl peptidase I (TPPI).

Le modèle animal de cette maladie a été mis au point récemment. Il s'agit d'une lignée de souris déficientes pour le gène CLN2 encodant TPPI. La surcharge dans les lysosomes affectés par cette maladie reste encore mal définie. Il est connu qu'on y retrouve une accumulation de sous-unité c de l'ATP synthase mitochondriale, et également de la lipofuscine, un lipopigment autofluorescent dont la composition n'est pas encore pleinement déterminée (agglomérat de protéines, de lipides, de débris cellulaires,…).

C'est dans cette optique qu'a débuté un travail de collaboration entre le laboratoire de Peter Lobel à Piscataway et le nôtre. Cette collaboration vise à étudier par spectrométrie de masse le contenu des lysosomes surchargés préparés à partir de la souris CLN2 -/-. Cette étude devrait un jour permettre d'identifier les différents matériaux accumulés dans ces lysosomes, et par la suite, de contribuer à une meilleure compréhension du dysfonctionnement lysosomal.

Cette étude détaillée du contenu lysosomal ne pourra se faire que si nous sommes capables de préparer, à partir des souris CLN2 -/-, des lysosomes (granules de surcharge) intacts et contaminés le moins possible. Pour y parvenir, nous avons choisi d'utiliser le fractionnement subcellulaire par centrifugation. C'est ici que mon mémoire prend place. En effet, pour pouvoir mettre au point un protocole efficace pour purifier les lysosomes surchargés de souris CLN2 -/-, il est d'abord nécessaire d'en caractériser le comportement en centrifugation.

Le but de mon mémoire consiste à étudier le comportement de ces lysosomes soumis aux techniques de purification par centrifugation. Pour cela, nous utiliserons les outils mis à notre disposition, à savoir les techniques classiques de centrifugation analytique différentielle et isopycnique. Les résultats obtenus serviront de base en vue du développement d'un protocole de purification de lysosomes surchargés de souris CLN2 -/- .

Matériel et méthodes

MATERIEL ET METHODES

A. Fractionnement cellulaire :

1. *La centrifugation: Généralités*

Les techniques de fractionnement permettent de séparer les organites subcellulaires en les soumettant à une force centrifuge.

Le comportement des particules soumises à cette force est exprimé par l'équation de Svedberg**:**

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\phi^2 (\rho_p - \rho_m) \omega^2 x}{f}$$

avec dx/dt, la vitesse de sédimentation
ϕ, le volume de la particule
ρ_p et ρ_m, les densités de la particule et du milieu
ω, la vitesse angulaire
x, la distance radiaire
f, le coefficient de friction

Donc, plus les particules sont de petite taille, plus il faudra augmenter la vitesse de centrifugation. Si la densité de la particule est supérieure à celle du milieu, elle sédimente. Dans le cas contraire, c'est-à-dire si la densité de la particule est égale ou plus faible que celle du milieu, elle ne sédimente pas dans le premier cas, et flotte dans le second cas.

De plus, si le milieu de sédimentation est trop visqueux, la vitesse de sédimentation de la particule diminue. Le coefficient de friction est donc important.

2. *Animaux :*

Nous utilisons une lignée de souris CLN2 qui sont élevées dans des conditions répondant aux normes locales et nationales en matière d'expérimentation animale.

Les animaux sont sacrifiés après avoir été mis à jeun la veille de l'expérience. Le jour J, les souris sont endormies dans une chambre à CO_2, avant d'être euthanasiées par dislocation cervicale. Les cadavres sont disséqués, et le foie et le cerveau sont prélevés et pesés dans du saccharose 0,25 M glacé.

3. *La centrifugation différentielle :*

Nous avons utilisé des souris CLN2 -/- et +/+, de 50 et 120 jours, sans se préoccuper de leur sexe, mises à jeun la veille des expériences. Leur foie et cerveau sont homogénéisés à 4°C dans du saccharose 0,25 M à l'aide d'un Potter Elvejhem dont le piston en téflon est actionné par un moteur tournant à 3000 rpm.

La centrifugation différentielle permet de séparer les organites subcellulaires en fonction de leur taille, facteur déterminant de ce type de centrifugation, en augmentant progressivement la vitesse de rotation selon le schéma décrit par de Duve (De Duve et al.,

1955) (Fig. 7). Cette centrifugation permet d'obtenir successivement cinq fractions hétérogènes enrichies en certains types d'organites :

- la fraction **N** ou **nucléaire**, se compose essentiellement de noyaux, de débris cellulaires, de gros fragments de la membrane plasmique et de quelques cellules intactes ayant résisté à l'homogénéisation.
- la fraction **M** ou **mitochondriale lourde** contient principalement des mitochondries, mais renferme aussi des lysosomes et des peroxysomes.
- la fraction **L** ou **mitochondriale légère** est enrichie en lysosomes et peroxysomes.
- la fraction **P** ou **microsomale** contient la plus grande partie des éléments du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, ainsi que des petits fragments de la membrane plasmique.
- la fraction **S** ou **soluble** contient tous les éléments cellulaires non sédimentables, ainsi que des éléments solubilisés lors des étapes du fractionnement.

Les résultats du fractionnement sont représentés sous la forme d'histogrammes, où chacune des cinq fractions (N, M, L, P et S) est représentée par un rectangle (De Duve et al., 1955). L'ordonnée correspond à l'activité spécifique relative (ASR) d'une enzyme (pourcentage d'activité par rapport au pourcentage de protéines dans chaque fraction) et l'abscisse correspond au pourcentage cumulé de protéines dans les fractions successives. L'ASR donne une idée de la purification d'un organite par rapport à l'homogénat. La surface de chaque rectangle correspond au pourcentage d'activité enzymatique retrouvé dans chaque fraction.

Il arrive souvent, lors d'un fractionnement, de ne pas récupérer la totalité des protéines présentes dans l'homogénat de départ. C'est pourquoi l'on corrige le pourcentage de protéines dans chaque fraction par rapport à la somme des protéines récupérées. Pour les dosages enzymatiques, comme pour les dosages des protéines, on réalise un calcul de récupération sur le fractionnement, ce qui correspond à la somme des valeurs trouvées dans les fractions N, M, L, P et S rapportée à la valeur de l'homogénat équivalent à N+ E (E :le surnageant post-nucléaire).

D'après cette méthode de présentation des résultats, on obtient les profils de distribution caractéristiques de l'un ou l'autre organite subcellulaire, selon le type d'enzyme marqueur étudié.

4. La centrifugation isopycnique

a) Gradient de saccharose :

Cette technique permet la séparation d'organites subcellulaires selon le critère de densité. Les organites migrent dans un gradient linéaire de saccharose jusqu'à ce qu'ils atteignent la zone de densité correspondant à leur propre densité, pour s'y équilibrer.

Nous avons analysé des fractions mitochondriales totales (M+L) provenant d'une centrifugation différentielle classique. Le gradient de saccharose est préparé dans un tube en pollyallomère Beckman à partir de deux solutions de saccharose (2,3ml de chaque solution) de densité « lourde » 1,24 g/ml et « légère » 1,05 g/ml.

600 µl de ML sont déposés au sommet d'un gradient. Nous avons également déposé une ML au fond du gradient après l'avoir diluée 5 fois dans du saccharose 1,32 g/ml. La fraction ML ainsi obtenue a une densité de 1,26 g/ml au dessus de laquelle on coule le gradient. Le tube est ensuite soumis à une centrifugation de 2h30 à une vitesse de 39000 rpm dans un rotor SW 55 Ti. Une fois la centrifugation terminée, le tube de centrifugation est sectionné en plusieurs tranches et les hauteurs sont mesurées. Le contenu de chaque section est récolté, pesé et sa densité est déterminée en mesurant l'indice de réfraction.

La représentation graphique des résultats obtenus par centrifugation isopycnique est celle décrite par Beaufay (Beaufay et al., 1964). Il s'agit d'histogrammes où chaque fraction est symbolisée par un rectangle, avec en abscisse, l'incrément de densité ($\Delta\rho$) de chaque fraction exprimée en g/cm^3, et en ordonnée, la fréquence. Ce dernier paramètre correspond au rapport entre le pourcentage d'activité enzymatique et l'incrément de densité dans chacune des fractions. Il représente, en quelque sorte, la répartition de chaque type de particule en fonction de la densité. Dans ce cas, la surface des différents rectangles équivaut au pourcentage d'activité retrouvée dans les fractions.

La densité qui répartit 50 % des activités enzymatiques de part et d'autre de celle-ci correspond à la densité médiane d'équilibration des organites considérés. Elle n'a de signification que si la distribution des marqueurs de ces organites est unimodale.

b) <u>Gradient de Percoll :</u>

Le Percoll est une suspension de grains de silice qui n'a pas d'effet osmotique. La tonicité de cette solution est fixée par l'utilisateur à l'aide de saccharose 0,25 M. Le Percoll a la propriété de former un gradient de densité lorsqu'il est soumis à une force centrifuge, mais ce gradient n'est pas linéaire. C'est pourquoi nous avons utilisé un gradient de Percoll préformé où le gradient reste linéaire.

600 µl d'une fraction ML préalablement préparée par centrifugation différentielle dans du saccharose 0,25 M sont déposés au sommet d'un gradient de Percoll préformé à partir d'une solution lourde et d'une solution légère (2,3 ml chacune), coulé dans un tube pour rotor SW 55 Ti (Beckman) et est soumis à une centrifugation de 25 000 rpm durant 55 minutes. Le tube est ensuite coupé en 12 fractions de 3,2 mm de hauteur. Chaque fraction est transvasée dans un tube d'échantillonnage. Le volume recueilli, la densité de la solution et la hauteur moyenne des coupes sont mesurés afin de connaître la dilution des fractions récoltées.

- Solutions utilisées:

1 Tampon saccharose 0,25 M, EDTA 1 mM, mis à pH 7 avec KOH 1 M

2 Tampon saccharose 0,25 M

3 Solution de Percoll lourde (1,15 g/ml):
45 ml de Percoll pur
5 ml de solution 1

4 Solution de Percoll légère (1,04 g/ml):
12 ml de solution 3
28 ml de solution 2

B. Chocs hypotoniques:

Le test du choc hypotonique consiste à mesurer le pourcentage d'activité non sédimentable d'une fraction mitochondriale totale (M + L) suite à l'immersion dans un milieu de tonicité décroissante. Ce test permet de juger de la fragilité de la membrane lysosomale.

Une ML est préparée via le schéma de centrifugation classique de de Duve, dans du saccharose 0,25 M glacé et amenée à une dilution 2.

5 tubes de concentrations décroissantes en saccharose sont préparés selon le tableau suivant:

Concentration en saccharose (en M)	ML (en ml)	Saccharose 0,25 M (en ml)	H_2O (en ml)
0,250	0,2	1,8	0
0,150	0,2	1	0,8
0,100	0,2	0,6	1,2
0,050	0,2	0,2	1,6
0,025	0,2	0	1,8

Les tubes sont vortexés avant d'être centrifugés à 39000 rpm pendant 40 minutes dans un rotor 50 Ti.

Après centrifugation, les surnageants des 5 tubes sont prélevés et placés dans des tubes d'échantillonnage. Les culots, quant à eux, sont resuspendus dans 1,8 ml de saccharose 0,25 M avant d'être transvasés dans des autres tubes d'échantillonnage.

Toutes les fractions obtenues se trouvent à une dilution 20.

Des dosages d'enzymes lysosomales sont par la suite effectués sur la ML de départ (diluée 2x) et sur les échantillons de culot (C) et de surnageant (S).

Les résultats sont portés en graphique avec en abscisse la concentration en saccharose et en ordonnée, le pourcentage d'activité enzymatique non sédimentable de la fraction considérée. Ce pourcentage est calculé selon la formule:

$$\frac{\text{Activité enzymatique mesurée dans S} \times 100}{\text{Activité dans S + C}}$$

Le pourcentage de récupération de l'activité enzymatique est calculé comme suit:

$$\frac{\text{Activité dans C+S} \times 100}{\text{Activité dans ML}}$$

Ce pourcentage permet de vérifier si toute l'activité présente dans la ML de départ est retrouvée dans le culot et le surnageant après le choc hypotonique.

C. Dosage des enzymes lysosomales marqueurs:

Lors d'un fractionnement, la mesure de l'activité d'une enzyme spécifique d'un organite subcellulaire permet de suivre sa répartition dans les 5 fractions N, M, L, P et S et dans le gradient de densité.

Le dosage des protéines repose sur la méthode de Lowry et al. (Lowry et al., 1951). Nous utilisons un kit commercial BioRad « DC Protein Assay ».

Au cours de ce mémoire, nous avons choisi de mesurer l'activité de 5 hydrolases acides: la β-galactosidase, la β-glucuronidase, la β-hexosaminidase, la β-mannosidase et la cathepsine C. Le principe de ces dosages repose sur une réaction enzymatique :

Méthylumbelliféryl-X + hydrolase $\longrightarrow$ méthylumbelliférone (fluorescent) + X
(X =substrat)

Voici un tableau résumant les conditions expérimentales des dosages enzymatiques :

Enzyme	Substrats	Tampon	Addition	Méthode de mesure
_-galactosidase	MU-_-galactopyranoside 40mM dans du DMSO	Acétate 0,5M pH5	TritonX-100 2%	4-Méthyl umbelliférone Exc : 365nm Em : 450nm
_-hexosaminidase	MU-N-acétyl-_-glucosaminide 100mM dans du DMSO.	Acétate 0,5M pH5	TritonX-100 2%	4-Méthyl umbelliférone Exc : 365nm Em : 450nm
_-mannosidase	MU-_-mannopyranoside 100mM dans du DMSO	Acétate 0,5M pH5	TritonX-100 2%	4-Méthyl umbelliférone Exc : 365nm Em : 450nm
_-glucuronidase	MU-_-glucopyranoside 100mM dans du DMSO.	Acétate 0,5M pH 5	TritonX-100 2%	4-Méthyl umbelliférone Exc : 365nm Em : 450nm
Cathepsine C	9,7 mgr H-Gly-Arg-	Acétate 0,2M pH6	TritonX-100 2%	AMChydrochloride Exc : 365nm

	AMChydrochlor ide salt + 5 ml acétate 1M pH 5 (porté à 50 ml avec H_2O)		Mercaptoéth ylamine (activateur)	Em : 450nm

Les fractions diluées sont incubées en présence de substrat à 37°C pendant 15 minutes (cuvettes) ou 1h (96-puits)

Après incubation, la réaction est fixée par addition de fixateur (Tampon Glycine/EDTA 5 mM + Triton 0.05% + NaOH 50mM pH 10.5). Le pH élevé du fixateur inhibe l'activité enzymatique. L'EDTA qu'il contient complexe les ions bivalents, le triton quant à lui, sert à solubiliser la membrane lysosomale.

D. Statistiques :

Au cours de ce mémoire, nous avons voulu comparer nos souris mutées et sauvages. Nous avons eu recours à l'outil statistique. Nous avons commencé par un test d'ANOVA1 pour déterminer si les variances de nos échantillons varient de la même façon.

Pour cela, nous avons au préalable effectué un test de Bartlett afin de vérifier les conditions d'homoscédasticité (égalité) des variances soient respectées. En aval d'une ANOVA1, nous effectuons un contraste de Scheffé. Le contraste de Scheffé est un test de comparaisons de moyenne 2 à 2. Soit les moyennes sont identiques, soit elles sont différentes. Il permet de comparer la différence entre les deux moyennes par rapport à une valeur seuil PPDS (plus petite différence significative). Chaque différence de moyenne est comparée à la PPDS.

Si la différence des moyennes est supérieure à PPDS, l'écart entre les deux échantillons est significatif ou hautement significatif suivant l'alpha utilisé pour déterminer la valeur PPDS.

Résultats et discussion

RESULTATS ET DISCUSSION

A. Généralités :

Au cours de ce mémoire, nous avons tenté de caractériser le compartiment lysosomal issu de foie et de cerveau de souris déficientes en TPPI, le modèle animal de la lipofuscinose céroide neuronale infantile tardive mis au point récemment par le laboratoire de Peter Lobel (CABM, Piscataway, New Jersey) (Sleat et al., 2004).

Dans ce but, nous avons utilisé les techniques du fractionnement subcellulaire par centrifugation(De Duve et al., 1955; Hamer and Jadot, 2005; Naureckiene et al., 2000). Ces techniques regroupent la centrifugation différentielle et la centrifugation isopycnique. La première est basée sur une séparation en fonction du coefficient de sédimentation, où le facteur déterminant est la taille des particules. Dans la seconde méthode, les granules sédimentent dans un milieu de densité croissante jusqu'à l'immobilisation dans une zone où la densité du milieu est égale à celle de la particule (densité « d'équilibration »).

Les techniques de séparation subcellulaire permettent deux approches. L'approche préparative est une méthode utilisée afin d'obtenir des fractions enrichies en organelles, destinées à des techniques nécessitant des échantillons contenant le moins possible de contaminants, par exemple pour des études protéomiques. L'approche analytique nous concerne plus particulièrement car elle permet de mettre en évidence le comportement d'organelles, par exemple le lysosome. Elle fournit des données sur les propriétés physico-chimiques de l'organelle : densité, perméabilité membranaire, résistance à l'homogénéisation, taille, etc….

Le mémoire consiste à utiliser cet outil analytique en vue d'élaborer par la suite un protocole de purification de fractions lysosomales de souris CLN2 -/-, destinées à l'étude de leur contenu par spectrométrie de masse.

Le choix de la méthode repose sur plusieurs critères dont le premier reste un facteur historique. C'est par ces techniques que fut mise en évidence l'existence du lysosome par de Duve et ses collaborateurs (De Duve et al., 1955). Depuis lors, les techniques de centrifugation ont permis d'apporter de nouvelles données concernant cet organite et le trafic intracellulaire. De plus, les techniques de centrifugation sont un outil de choix pour préparer des échantillons destinés à l'étude du protéome des organites(Journet et al., 2000; Sleat et al., 1996).

Lors de ce travail, nous avons comparé le comportement des lysosomes de foie et de cerveau de souris CLN2 -/- à ceux de souris sauvages. Le système nerveux central est très souvent affecté chez les individus touchés par une maladie de surcharge lysosomale. Par conséquent, nous avons focalisé notre étude sur le cerveau des souris CLN2-/-, où une neurodégénérescence est constatée(Sleat et al., 2004). D'autres exemples sont la maladie de Tay-Sachs, où une inflammation du SNC coïncide avec l'évolution de la maladie chez la souris modèle de cette LSD (Jeyakumar et al., 2003) et la leukodystrophie métachromatique. Les conséquences peuvent être la démyélination entraînant des problèmes psychomoteurs, ou la perte de capacité sensorielle (revu par (Platt F.M, 2004))ou encore la mort cellulaire entraînant une neurodégénérescence. Le cerveau constitue un organe d'une grande complexité. En effet, il se compose de neurones et de cellules gliales. Les cellules gliales sont

contituées de différents types cellulaires comme les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules microgliales et les cellules épendymaires. Les cellules gliales sont dix fois plus nombreuses que les neurones et représentent la moitié du volume cérébral(Petanceska et al., 1994). En revanche, le foie présente une relative homogénéité cellulaire. Cet organe est très bien connu des biochimistes à cause notamment de son homogénéisation aisée (Beaufay et al., 1964; De Duve et al., 1955).

Notre choix d'étudier le foie, en parallèle du cerveau, vient de ces considérations techniques.

B. Etude par centrifugation différentielle du foie et du cerveau de souris CLN2 -/- :

Un homogénat est soumis à un fractionnement par centrifugation différentielle selon le protocole établi par de Duve et al.(De Duve et al., 1955). Cette technique permet d'obtenir des fractions de composition très hétérogène, mais enrichies en certaines organelles. La mesure de l'activité d'une ou plusieurs enzymes spécifiques du lysosome permet de suivre la distribution de cet organite dans les cinq fractions subcellulaires, appelées respectivement fraction nucléaire (N), mitochondriale lourde (M), mitochondriale légère (L), microsomale (P) et soluble (S). La fraction N est enrichie en noyaux, en morceaux de la membrane plasmique, en débris cellulaires, et contient quelques cellules intactes. La fraction M se compose principalement de mitochondries mais contient des lysosomes et des peroxysomes. La fraction L contient des lysosomes et des peroxysomes. La fraction P se compose d'éléments du réticulum endoplasmique, du Golgi, de vésicules dérivées de la membrane plasmique, de même que des structures de petite taille issus du compartiment endolysosomal. La fraction S, contient tous les éléments non sédimentables (ou solubilisés) dans les conditions de centrifugation utilisées pour sédimenter la fraction P. Dans le cas présent, nous avons dosé sur les fractions subcellulaires les enzymes de référence suivantes : la _-galactosidase, la _-hexosamininase, la _-mannosidase et enfin la _-glucuronidase. Ces enzymes lysosomales doivent nous renseigner sur la distribution des lysosomes dans les différentes fractions.

Les résultats de fractionnement peuvent être représentés sous forme d'histogrammes présentant en ordonnée l'activité spécifique relative (ASR) de l'enzyme et en abscisse les pourcentages cumulés de protéines dans les cinq fractions. Cette ASR correspond au rapport calculé entre le pourcentage d'activité et le pourcentage de protéines mesurés dans une fraction déterminée. La hauteur de la fraction donne donc une indication quant à la « purification » de l'organite considéré. La surface de chaque fraction, quant à elle, représente le pourcentage de la population d'un organite, présent dans la fraction considérée.

Une autre façon de présenter nos résultats est de montrer simplement le pourcentage d'activité enzymatique de chaque fraction. La somme des activités (l'activité totale de l'homogénat) est obtenue en additionnant l'activité de la fraction nucléaire (N) et l'activité du surnageant post-nucléaire (E) obtenu après la première séparation (voir Matériel et Méthodes). Cette représentation permet de donner une indication quant à l'activité de chaque fraction. Pour chaque dosage, nous avons également effectué un calcul du pourcentage de récupération de l'activité par rapport à l'activité totale présente dans notre homogénat de départ :

(_ activités de N, M, L, P, S / activité de E+N)*100

Nous avons considéré comme acceptables des pourcentages de récupération situés entre 85 et 110%.

1. *Etude de la distribution des lysosomes chez les souris CLN2 +/+ :*

a) Distribution des lysosomes dans un fractionnement subcellulaire de foie :

La figure 8 représente le profil de distribution des 4 enzymes marqueurs lysosomales.

Comme décrit dans la littérature, nous retrouvons une proportion importante des activités lysosomales dans les fractions M et L(Mertens-Strijthagen et al., 1979). Nous constatons que la valeur d'ASR de L atteint une valeur de quatre tandis que dans la fraction M, elle est de deux. Rappelons que ce chiffre donne une indication sur l'enrichissement de la fraction en lysosomes. On observe également une faible quantité d'hydrolases dans les fractions microsomales (P) et soluble (S).

La _-glucuronidase manifeste une distribution plus importante dans la fraction P par rapport aux autres enzymes. La β-glucuronidase est une hydrolase qui, au niveau du foie, se retrouve sous deux formes : lysosomale et microsomale. Quand on observe le comportement électrophorétique des deux enzymes, on constate que la forme lysosomale possède un poids moléculaire de 280 kDa tandis que la forme microsomale constitue un tétramère de 290 kDa. Les études comparatives des deux types d'enzyme montrent qu'elles sont distinctes uniquement par leur comportement électrophorétique. (Owens and Stahl, 1976; Tomino et al., 1975) Les deux formes possèdent un optimum d'activité à pH 4.4. (Himeno Mnishimura et al., 1976)

Par la suite, nous avons représenté le pourcentage d'activité de chaque enzyme chez les souris normales âgées de 50 et 120 jours. A 50 jours, les souris CLN2-/- commencent à montrer des signes de la maladie, qui mène à la mort vers l'âge de 160 jours en moyenne (Sleat et al., 2004). C'est pour cela que nous avons choisi d'étudier ces souris à l'âge de 50 et 120 jours en espérant préciser l'impact de l'évolution de la maladie sur les propriétés des lysosomes. La figure 9 (A et B) montre la distribution des quatre enzymes dans le foie. Nous observons ce qui transparaissait déjà avec la représentation classique, à savoir un pourcentage d'activité important dans les fractions M (50%), et L (15%), et un faible pourcentage pour les fractions P (5%) et S (5%).

Nous pouvons constater que les profils des quatre enzymes dans le foie de souris de 50 et 120 jours ne diffèrent pas de manière significative à l'exception de la β−glucuronidase qui affiche une activité trois fois supérieure (15%) à celles des trois autres enzymes dans la fraction P.

b) Distribution des lysosomes dans un fractionnement subcellulaire de cerveau:

Nous constatons dans le cerveau de souris sauvages âgées de 50 jours que les quatre enzymes montrent un même profil de distribution (figure 10). Nous remarquons également que le pourcentage de protéines dans L est plus important dans le cerveau (≈10%) que dans le foie (≈5%). D'où, étant donné que l'ASR est le rapport entre le pourcentage d'activité et le pourcentage de protéines associées à une fraction déterminée, il est évident que l'abondance de protéines dans la fraction est au moins partiellement responsable du faible taux d'enrichissement des lysosomes. Ceci explique en partie la faible ASR de la fraction L dans le cerveau.

Si nous observons à la figure 9 (C et D), le pourcentage d'activité des quatre enzymes dans les différentes fractions, au niveau du cerveau de souris âgées de 50 et 120 jours, nous ne constatons pas de différence entre les profils des différentes enzymes lysosomales. Nous

retrouvons comme dans le foie, le pourcentage d'activité β-galactosidase le plus élevé dans la fraction mitochondriale lourde M (≈35%) et dans la fraction mitochondriale légère L (≈20%). Les fractions P et S contiennent un pourcentage d'activité plus faible (≈10 et 5%). Dans le cerveau, on ne constate pas de différence entre la β-glucuronidase et les autres enzymes dans la fraction P. Les profils observés à 50 et 120 jours ne montrent pas de différences marquantes.

2. *Etude de la distribution des lysosomes de souris CLN2-/- :*

Nous avons réalisé une série de fractionnements subcellulaires à partir de foie et de cerveau CLN2 -/- et +/+. Les résultats obtenus à partir de mutants sont comparés à ceux des animaux sauvages. Les tests statistiques ont été réalisés sur des échantillons de taille égale ou supérieure à 3.

a) Distribution des lysosomes dans un fractionnement subcellulaire de foie:

Dans le foie, on note peu de différences dans la distribution des enzymes chez les souris mutantes et les souris sauvages, indifféremment de l'âge (Fig.11). On semble toutefois observer une augmentation de l'activité des hydrolases dans la fraction soluble (S). Cette augmentation pourrait signifier qu'une partie de la population lysosomale est plus sensible, fragilisée aux conditions d'homogénéisation et/ou au stress subi lors de la centrifugation. Des lysosomes surchargés éclateraient au cours des différentes étapes de l'expérience et libéreraient ainsi leur contenu enzymatique dans la fraction soluble.

Une analyse statistique réalisée à partir des résultats obtenus indique que cette élévation de l'activité dans la fraction soluble est significative uniquement pour la β-galactosidase et la β-mannosidase ($p < 0.001$), chez les souris mutantes âgées de 120 jours.

b) Distribution des lysosomes dans un fractionnement subcellulaire de cerveau:

Lorsque nous comparons la distribution obtenue à partir d'homogénats de cerveaux mutants et sauvages à 50 et 120 jours (Fig.12), nous observons l'apparition d'une proportion plus importante d'hydrolases dans la fraction S des animaux mutants. Pour les souris âgées de 120 jours, l'augmentation est significative pour les quatre hydrolases ($p < 0.001$). Ceci confirme ce que nous pensions observer dans le foie. L'augmentation de l'activité des hydrolases dans la fraction S chez le mutant est plus marquée dans le cerveau que dans le foie.

C. Etude du comportement des lysosomes dans un gradient de densité :

Afin d'obtenir de plus amples informations quant aux propriétés des lysosomes de ces souris CLN2 -/-, nous avons effectué une série de centrifugations isopycniques. Ces centrifugations se basent sur la différence de densité des particules subcellulaires pour les séparer. Les particules migrent dans un gradient de densité jusqu'à ce qu'elles atteignent leur densité propre. Dès que la densité de la particule est égale à celle du milieu, la particule cesse de migrer. Au cours de ces centrifugations, nous avons expérimenté 3 types de gradients de densité :

- Un gradient de saccharose 1.05-1.24 g/ml où une fraction mitochondriale totale (ML) est déposée au sommet du gradient.
- Un gradient de saccharose 1.05-1.26 g/ml où une fraction ML est déposée au fond du gradient.
- Un gradient de Percoll préformé isotonique 1.04-1.15 g/ml où une fraction ML est déposée au sommet du gradient.

Les fractions mitochondriales totales (ML) de foie et de cerveau ont été obtenues par centrifugation différentielle classique, et englobent la majorité des lysosomes ainsi que les mitochondries et les peroxysomes, dont nous ne parlerons pas.

Les quatre enzymes lysosomales sont dosées dans chaque fraction du gradient. Les résultats sont présentés sous forme de graphique avec en ordonnée la fréquence de l'activité enzymatique dans le gradient (% d'activité/ l'incrément de densité __) et en abscisse la densité de saccharose ou de Percoll (g/ml) (voir Matériel et méthodes).

Le tableau ci-dessous présente les pourcentages de récupération des activités enzymatiques dans les trois types de gradients.

	Pourcentage de récupération (%)							
	Bgalactosidase		**Bhexosaminidase**		**Bmannosidase**		**Bglucuronidase**	
CLN2 -/-	Foie	Cerveau	Foie	Cerveau	Foie	Cerveau	Foie	Cerveau
Gradient saccharose 1.05-1.24 ML au dessus	84	94	72	112	101	107	75	79
Gradient saccharose 1.05-1.26 ML en dessous	68	83	89	85	70	77	95	93
Gradient Percoll préformé	87	91	111	143	80	59	116	93
	Bgalactosidase		**Bhexosaminidase**		**Bmannosidase**		**Bglucuronidase**	
CLN2 +/+	Foie	Cerveau	Foie	Cerveau	Foie	Cerveau	Foie	Cerveau
Gradient saccharose 1.05-1.24 ML au dessus	71	101	63	87	67	58	74	64
Gradient saccharose 1.05-1.26 ML en dessous	111	110	80	93	65	71	82	125
Gradient Percoll préformé	109	117	108	92	111	115	104	129

Tableau 5: Pourcentage d'activité enzymatique corrigée pour les expériences de centrifugations isopycniques

1. *Etude du comportement des lysosomes dans un gradient de saccharose :*

Notons que dans un gradient de saccharose, la densité du lysosome n'est pas la même que dans un milieu isotonique. En effet, en progressant dans les zones de densité croissante, la tonicité du milieu augmente, et le lysosome perd son eau osmotiquement échangeable. Au fur et à mesure que les granules pénètrent dans un milieu de plus en plus tonique, ils vont, pour équilibrer la pression osmotique, subir une perte d'eau. En perdant cette eau, les granules se condensent et acquièrent une densité plus importante qu'à l'état physiologique. La densité du lysosome se rapproche donc de la densité de la matrice hydratée du lysosome, dépourvue d'eau osmotiquement échangeable.

a) **Gradient de saccharose avec ML déposée au sommet du gradient** *:*

(1) Distribution de l'activité enzymatique pour un dépôt de ML de foie:

Nous avons effectué un gradient de saccharose de densité limite 1.05-1.24 g/ml au sommet duquel la fraction ML provenant de foie de souris CLN2 -/- a été déposée. Une expérience identique a été menée pour les souris sauvages.

A partir des résultats du fractionnement subcellulaire, nous estimons que la population de lysosomes dans le dépôt représente 55 % de la population totale dans le cas des animaux sauvages de 120 jours, et 51 % chez les souris mutées du même âge. Ces chiffres représentent le pourcentage moyen des activités enzymatiques dans la fraction ML, par rapport à l'activité totale. Comme ces valeurs sont assez proches, nous pouvons comparer de manière fiable le comportement des populations de lysosomes CLN2-/- et +/+ dans le gradient.

La figure 13 représente la distribution des enzymes lysosomales marqueurs dosées dans les fractions du gradient. Nous remarquons que l'activité de ces enzymes présente une distribution bimodale. En effet, deux régions présentent un pic d'activité enzymatique : au sommet du gradient et dans le fond. Le pic d'activité au fond du gradient représenterait la population de lysosomes intacts.

Si nous comparons les résultats du gradient obtenu à partir de souris mutantes avec ceux de souris sauvages, nous ne constatons pas de grandes différences. La différence principale concerne le fait que le pic d'activité dans les fractions légères semble plus important chez les souris mutantes. Notons toutefois qu'il s'agit d'une expérience unique.

La signification du pic d'activité retrouvé au sommet du gradient nécessiterait des expériences supplémentaires. A ce stade, il est toutefois tentant de penser que ces enzymes sont issues de lysosomes fragilisés qui ont libéré leur contenu dans la zone de densité légère, au début de la centrifugation. Notons enfin que le choix de la densité limite supérieure du gradient (1.24 g/ml) n'est pas idéal. En effet, les lysosomes hépatiques de cette lignée de souris ont une densité telle dans le saccharose, qu'ils ont été trop nombreux à s'accumuler dans la dernière fraction du gradient, ce qui conduit à une sous-estimation de leur densité d'équilibration.

(2) Distribution de l'activité enzymatique pour un dépôt de ML de cerveau:

A partir des résultats du fractionnement subcellulaire, nous estimons que la population de lysosomes dans la fraction ML, qui constitue le dépôt, représente environ 50 % de la population totale dans le cas des animaux sauvages, et 35 % chez les souris mutées de 120 jours.

Comme dans le foie, nous remarquons que les lysosomes issus d'une ML de cerveau de souris CLN2 -/- de 120 jours révèlent une distribution bimodale pour les quatre enzymes. Ceci est représenté par la figure 14. On note la présence de deux pics d'activité situés au sommet et en bas du gradient avec toutefois un pourcentage moindre dans la dernière fraction par rapport à ce que nous observions dans le foie. Ceci révèle que la densité d'équilibration des lysosomes de cerveau en milieu hypertonique est inférieure à celle observée dans le foie. L'hypothèse pour expliquer la bimodalité reste la même que pour le foie, à savoir que le pic d'activité retrouvé au sommet du gradient pourrait correspondre à des lysosomes lésés au début de la centrifugation. En revanche, le pic d'activité présent dans une zone de densité plus élevée serait une population de lysosomes intacts.

Nous constatons également que le gradient témoin possède une distribution plus étalée. Les quatre enzymes lysosomales affichent globalement le même type de profil. Toutefois, nos pourcentages de récupération de l'activité enzymatique totale de la fraction ML dans le gradient sont supérieurs à 80% pour la β-galactosidase et la β-hexosaminidase mais moindres (58 et 64%) pour les deux autres enzymes (voir Tableau 5). C'est pour cette raison que nous maintenons une certaine retenue quant à l'exactitude du profil enzymatique des souris témoins, réalisé une seule fois.

(3) Discussion

Plusieurs hypothèses peuvent être mentionnées pour tenter d'expliquer la bimodalité de la population lysosomale et essentiellement d'expliquer le pic d'activité dans les fractions plus légères dans le foie et le cerveau.

Premièrement, la population lysosomale pourrait être constituée de deux sous-populations. Une partie de cette population serait constituée de lysosomes plus légers, moins denses tandis que la seconde rassemblerait des lysosomes de densité plus élevée. Il a déjà été montré dans la littérature qu'une maladie de surcharge lysosomale pouvait influencer la densité des lysosomes. Par exemple, un tel cas a été rencontré au cours de l'étude d'une lignée de souris NCTR-BALB/c (découverte fortuitement en 1975 parmi 24000 souris de laboratoire au National Center for Toxicological Research (NCTR), Jefferson, Arkansas). Ces souris souffrent d'une maladie de surcharge lysosomale héréditaire entraînant des dysfonctionnements neurologiques progressifs et une mort prématurée. Les produits de stockage sont le cholestérol non-estérifié et la sphingomyéline. La pathologie de ces animaux ressemble à la maladie de Niemann-Pick. Des expériences d'isolement sur gradient de saccharose des lysosomes de ces souris ont montré un allègement se manifestant par un « shift » dans les fractions légères du gradient. Cet allègement est induit suite à l'accumulation de cholestérol dans les lysosomes (Morris et al., 1982). Nous ignorons la densité que peut posséder le matériel stocké chez les souris CLN2-/-.

Une autre explication envisageable serait que ce pic d'activité en haut du gradient correspondrait au contenu soluble de lysosomes détériorés au cours du processus de centrifugation isopycnique. Nous avons estimé le pourcentage de lysosomes intacts à une valeur située entre 66 et 91 %, en rapportant l'activité enzymatique dans le pic de densité élevée à l'activité de la fraction ML, qui représente le dépôt. Les lysosomes abîmés représenteraient donc 9 à 34 % de la population initiale. Si cette hypothèse s'avère correcte, la différence de distribution de la _-hexosaminidase par rapport aux autres enzymes pourrait peut-être s'expliquer par le fait que cette enzyme a une tendance plus marquée que les autres à rester ancrée, peut-être par simple adsorption, à des structures vésiculaires qui progressent dans le gradient (Jadot et al., 1997)

b) Gradient de saccharose avec ML déposée au fond du gradient :

Nous avons fait un autre type de gradient de saccharose où nous avons chargé la fraction ML au fond du gradient. L'intérêt est de vérifier l'hypothèse selon laquelle le pic d'activité en haut du gradient observé lors d'un dépôt au sommet de ce dernier constitue réellement une population de lysosomes plus légers. Si c'est le cas, les granules remonteront à travers le gradient de densité jusqu'à atteindre leur densité propre. Si, par contre, ce pic représente une activité soluble, l'activité restera au fond du gradient. Les récupérations des activités enzymatiques sont plus élevées que pour le gradient précédent et se situent entre 65 et 125 %.

(1) Distribution de l'activité enzymatique pour un dépôt de ML de foie:

Nous observons dans le foie (figure 15) un pic d'activité important pour les quatre enzymes marqueurs dans les fractions de haute densité du gradient de saccharose. Les hydrolases des souris témoins et des souris mutantes montrent le même profil de distribution.

Dans les deux types de souris, on ne retrouve plus la distribution bimodale observée lors d'un dépôt de la fraction ML au sommet du gradient. L'activité détectée dans les fractions légères (voir fig.13) n'est plus observée lors d'un dépôt au fond du gradient. Cette observation soutient l'hypothèse selon laquelle cette activité serait une activité « soluble » issue de lysosomes dégradés, lésés par les traitements auxquels ils ont été soumis, notamment par le choc tonique que subissent les granules lors de leur entrée dans le gradient de saccharose.

L'observation qui nous semble la plus importante, est que les lysosomes qui ont supporté le stress de la centrifugation présentent une densité d'équilibre identique dans le saccharose hypertonique, qu'ils soient issus de souris mutantes CLN2 -/- ou de souris sauvages. Ces lysosomes intacts représentent 66 à 91% des lysosomes de la ML, comme calculé précédemment.

(2) Distribution de l'activité enzymatique pour un dépôt de ML de cerveau :

La figure 16 présente les résultats observés pour le cerveau de souris sauvages et mutantes.

Comme nous l'avons observé lors du dépôt au sommet du gradient d'une fraction ML préparée à partir de souris mutantes, nous détectons dans les fractions légères du gradient un pic d'activité dont l'importance relative varie en fonction de l'enzyme mesurée. Ce pic est visible aussi bien dans l'expérience réalisée à partir de cerveaux +/+ que de cerveaux CLN2 -/-.

Les densités limites utilisées sont meilleures pour le cerveau que pour le foie. En effet, nous y retrouvons une activité dans le fond du gradient correspondant vraisemblablement à de l'activité soluble. Cette activité dans la dernière fraction (n°12) est bien séparée du pic majeur d'activité se situant dans la neuvième fraction. Ceci s'observe pour le cerveau mutant comme pour le type sauvage. Le pic majeur d'activité se situe à une densité d'environ 1.20. Nous n'observons pas de grandes différences entre les expériences sur les souris sauvages et mutantes. Les lysosomes résistants aux traitements s'avèrent donc être normaux pour ce qui concerne leur comportement en centrifugation dans un gradient de densité en saccharose.

Le fait de garder une activité dans le haut du gradient en déposant la ML par dessous pourrait signifier que nous sommes face à deux populations lysosomales dans le cerveau. Toutefois, l'interprétation à donner à ce résultat impose beaucoup de prudence. Rappelons que le cerveau renferme énormément de lipides, de sphingolipides et de myéline. Ces substances de densité légère (de l'ordre de 1.1) ont tendance à remonter dans un gradient. De plus, une étude menée au sein de notre laboratoire a montré la capacité de certaines hydrolases acides lysosomales à remonter dans le haut du gradient en restant agglomérées aux lipides ((Jadot et al., 1997)

(3) Discussion :

Nous ne distinguons pas de différences entre les distributions des hydrolases dans les témoins et les mutants. Ceci nous laisse supposer que la population de lysosomes intègres et résistants dans le foie et le cerveau d'animaux CLN2-/- est normale. Nous notons toutefois que la « normalité » pour ce critère de densité d'équilibration dans un gradient de saccharose ne signifie pas pour autant que les lysosomes ne sont atteints d'aucune surcharge. En effet, nous ne connaissons pas la densité du matériel qui s'accumule dans les lysosomes chez les animaux CLN2-/-. La lipofuscine est un agglomérat hétérogène de débris cellulaires, de protéines et de lipides. Il n'est pas impossible que la densité de ce lipopigment soit proche de la densité de la matrice hydratée. Cette matrice est constituée des composantes solides de la particule et leur eau d'hydratation. Dans un tel cas, la différence entre les lysosomes mutants et sauvages ne pourrait pas être visualisée dans ce type d'expérience.

Quand nous avons observé la distribution de l'activité des enzymes lysosomales lors d'une centrifugation différentielle, nous avons noté une augmentation de l'activité soluble chez les souris mutantes. Le fait de ne pas observer davantage d'activité soluble dans le gradient peut nous suggérer que la population de lysosomes recueillie dans la fraction ML lors de la centrifugation différentielle est normale. Une grosse partie des lysosomes surchargés pourraient avoir été dégradés dès la phase de centrifugation différentielle.

Nous avons effectué un calcul de la densité d'équilibration de la population lysosomale la plus dense où nous avions déposé la ML par le sommet, en ne tenant pas compte des cinq premières fractions constituant le premier pic d'activité. Nous avons obtenu pour le foie une densité d'équilibration de 1.21 tandis que pour le cerveau nous avons calculé une valeur de 1.20. Ces valeurs sont semblables pour les souris CLN2-/- et +/+.

2. *Etude du comportement des lysosomes dans un gradient de Percoll préformé:*

La solution commerciale Percoll est constituée de grains de silice qui n'ont pas de propriétés osmotiques et ont tendance à sédimenter. La centrifugation sur gradient de Percoll présente l'avantage de s'effectuer dans des conditions de tonicité qui sont choisies par l'expérimentateur et uniformes dans tout le gradient. Nous avons choisi d'utiliser ce type de gradient pour comparer la densité des lysosomes préparés à partir de souris +/+ et -/- dans un milieu isotonique (saccharose 0.25 M).

Pour avoir un gradient de Percoll linéaire, reproductible, nous avons utilisé un gradient préformé. Comme pour les gradients de saccharose, une fraction ML est préparée à partir d'un homogénat de foie ou de cerveau par centrifugation différentielle classique, avant d'être déposée au sommet du d'un gradient Percoll de densité 1.04-1.15 g/ml.

Après observation des profils enzymatiques des quatre enzymes lysosomales chez les souris mutantes et sauvages (figure 17 et 18), nous n'apercevons pas de différences apparentes pour le foie et le cerveau.

Les distributions obtenues en gradient de Percoll isotonique révèlent un pourcentage d'activité lysosomale élevé dans la fraction 1 correspondant au dépôt de la ML. Ce pourcentage est toutefois moindre dans le cas de la β–hexosaminidase. Comme nous l'avons évoqué dans le cas du gradient de saccharose, le matériel relargué (c.-à -d. les lysosomes lésés) pourrait contribuer à cette activité présente au sommet du gradient. Nous notons néanmoins que l'importance relative de l'activité retrouvée au sommet du gradient ne semble pas dépendre du fait que la ML analysée provienne d'un animal sauvage ou muté. Nous signalons enfin que dans les conditions de champ centrifuge imposées par l'utilisation du gradient de Percoll, nous ne pouvons pas exclure qu'une partie de la population lysosomale

n'ait pas rejoint sa densité d'équilibre. En effet, l'utilisation d'une centrifugation à vitesse plus élevée ou pendant un temps plus long a été évitée afin de minimiser la déformation du gradient de densité sous l'effet de la sédimentation du Percoll.

Ce qui nous semble le plus important, c'est de constater, comme nous l'avons fait en analysant les distributions obtenues en gradient de saccharose, que les lysosomes de la ML, qu'ils proviennent de foie ou de cerveau, ne présentent pas de différences importantes de densité en milieu isotonique suite à l'invalidation du gène CLN2.

Nous attirons l'attention sur les récupérations d'activités enzymatiques, qui possèdent des valeurs très variables dans ces expériences. Par exemple, la récupération de l'activité β-mannosidase dans le cerveau CLN2 -/- est de 59% tandis que chez les animaux +/+, elle est de 115%. Il faut donc faire preuve de prudence dans l'interprétation des résultats.

D. Etude de la sensibilité de lysosomes de souris CLN2 -/- soumis à des conditions hypotoniques :

Dans un autre volet de ce mémoire nous avons voulu comparer la sensibilité des lysosomes de souris sauvages et atteintes par la maladie de surcharge, lors d'une resuspension dans un milieu d'osmolarité décroissante.

Le test du « choc hypotonique » consiste à plonger des lysosomes dans un milieu de plus en plus hypotonique et à mesurer l'activité enzymatique solubilisée. Ce test fait partie d'un arsenal classique de techniques permettant d'obtenir des renseignements sur l'identité d'un compartiment subcellulaire(Jadot et al., 1997). Le relargage des constituants solubles de l'organite (la sensibilité osmotique) est en effet une caractéristique du granule analysé, qui tient compte de plusieurs facteurs comme la perméabilité de sa membrane aux solutés osmotiquement actifs, la vitesse de diffusion de l'eau et bien sûr, la résistance mécanique de la membrane au gonflement. A la fin de notre travail, nous avons fait appel à cette méthode pour comparer les propriétés des lysosomes préparés à partir de foie de souris sauvages et CLN2-/-.

Nous avons soumis une fraction mitochondriale totale (ML) de foie de souris mutantes et sauvages à différentes concentrations de saccharose (0.025, 0.05, 0.10, 0.15 et 0.25M). Nous y avons sédimenté les granules intacts (culot) et une fraction soluble. Nous avons mesuré l'activité enzymatique de la β-galactosidase et la cathepsine C dans les surnageants et culots recueillis. La cathepsine C a été choisie en vertu de sa grande solubilité (Jadot et al., 1997)ce qui en fait une enzyme de choix pour étudier l'activité non-sédimentable des enzymes suite aux chocs hypotoniques. Nous avons déterminé le pourcentage d'activité enzymatique non-sédimentable de la fraction ML aux différentes concentrations de saccharose.

Nos résultats (figure 19) montrent en ordonnée le pourcentage d'activité non-sédimentable de la β-galactosidase et de la cathepsine C et en abscisse la concentration en saccharose. Les pourcentages de récupération des activités enzymatiques se situent entre 108 et 117 % pour la β-galactosidase et entre 72 et 97% pour la cathepsine C.

Dans cette expérience, qui n'a pu être répétée faute de temps, nous constatons pour les souris témoins en conditions isotoniques (0.25 M) que l'activité non-sédimentable des deux enzymes est égale à 8 %. Pour les mutants, elle est de 13 à 16 %. L'évolution des activités non-sédimentables mesurées après suspension des granules dans des milieux de tonicité décroissante révèle une sensibilité moindre des lysosomes des souris CLN2-/- au déséquilibre

osmotique. A une concentration de 0.025 M, l'activité non-sédimentable des lysosomes d'animaux mutants atteint 55% pour la β-galactosidase et 74% pour la cathepsine C, tandis que pour les souris sauvages, les valeurs atteignent 74 et 91%.

Cette expérience devrait être répétée. En effet, nos observations semblent intéressantes et poussent à continuer l'étude de cette voie. De plus, nous n'avons mesuré que l'activité enzymatique non-sédimentable. Il serait intéressant de compléter cette expérience par une mesure de la latence enzymatique des hydrolases lorsque les granules sont soumis au choc osmotique.

Ce test consiste à comparer les activités enzymatiques mesurées en présence (activité totale) ou en absence (activité libre) de détergent. Ce test possède le double avantage de nous mettre à l'abri de possibles interprétations erronées liées aux propriétés d'adsorption des hydrolases au matériel sédimentable, et surtout de permettre la mise en évidence de différences plus subtiles de perméabilité membranaire, puisque l'activité libre exprimée en pourcentage de l'activité totale augmentera suite à une simple augmentation de la perméabilité aux substrats de petite taille, même si l'organite reste intact et sédimentable dans sa globalité.

Conclusion et perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de ce mémoire, nous nous sommes intéressés à une maladie de surcharge lysosomale: la lipofuscinose céroïde neuronale infantile tardive. Cette maladie provoquée par la déficience en une protéase lysosomale (TPPI) codée par le gène CLN2, se caractérise par une accumulation intralysosomale massive de lipofuscine (dont la composition exacte n'est pas connue) et de la sous-unité C de l'ATP synthase mitochondriale (Sleat et al., 1997).

Un travail de collaboration avec l'équipe du Professeur Lobel (CABM, Piscataway, N.J) vise à étudier par spectrométrie de masse la composition des matériaux stockés dans le compartiment endolysosomal suite au déficit en activité TPPI. Ce projet nécessite une préparation de lysosomes surchargés intacts et peu contaminés, isolés à partir de la souris modèle de la maladie. La souris CLN2 -/- est déficiente pour la protéase TTPI par inactivation ciblée du gène CLN2, et mime la pathologie de la cLINCL (Sleat et al., 2004). Pour la préparation des lysosomes, nous avons choisi d'utiliser la centrifugation, une méthode qui a déjà été utilisée avec succès pour étudier le protéome des lysosomes « normaux » (Bagshaw et al., 2005).

Au cours de ce mémoire, nous avons entrepris de caractériser le comportement en centrifugation des lysosomes de souris CLN2 -/-. Les résultats serviront de point de départ à l'élaboration d'un protocole de purification de lysosomes à partir de ces souris.

Dans un premier temps, nous avons effectué des fractionnements par centrifugation différentielle. Nos résultats montrent une augmentation de l'activité des hydrolases lysosomales dans la fraction soluble dans le foie et le cerveau de souris CLN2 -/-. Cette augmentation est plus importante dans le cerveau, lieu de manifestation de la pathologie, que dans le foie. Ces résultats suggèrent l'existence d'une fraction de la population lysosomale plus sensible à la rupture dans les souris mutantes, lors de l'étape d'homogénéisation ou de centrifugation différentielle.

Nous avons également observé le comportement en centrifugation isopycnique de fractions ML issues de foie et de cerveau de souris mutées et sauvages, en milieu hypertonique (gradient de saccharose) et isotonique (gradient de Percoll). Nous avons constaté que les profils de distribution des hydrolases dans les deux types de gradients ne varient pas en fonction du génotype des animaux, et ce pour le foie et le cerveau. Nous concluons que la fraction de la population lysosomale des souris CLN2 -/- qui résiste à l'homogénéisation, présente, dans ces conditions, un comportement semblable à celui des granules préparés à partir de souris sauvages, dans le foie comme dans le cerveau.

Enfin, nous avons effectué une expérience visant à comparer la sensibilité des lysosomes de souris sauvages et mutées à la resuspension dans un milieu de plus en plus hypotonique. Nos résultats semblent indiquer une moindre sensibilité des lysosomes de foie de souris mutées au déséquilibre hypotonique, par rapport au type sauvage.

Si nous considérons ce travail dans la perspective d'une mise au point de la purification des granules de surcharge des souris CLN2 -/-, la similitude de comportement en centrifugation pourrait constituer un résultat très favorable. Il laisse entrevoir la possibilité de transposer aux tissus prélevés chez les souris malades les techniques de purification des lysosomes de cerveau et de foie décrites dans la littérature, respectivement la centrifugation

isopycnique sur gradient de Percoll (Ohshita and Kido, 1995) et la purification sur un gradient de métrizamide (nycodenz) (Wattiaux et al., 1978).

Néanmoins, nous n'écartons pas deux possibilités compatibles avec nos résultats.

Nous avons déjà évoqué l'augmentation de l'activité enzymatique dans la fraction soluble de foie et de cerveau chez les souris mutées. Nous en avons conclu que cette activité soluble provient d'une population fragilisée, plus sensible à l'homogénéisation et/ou au stress de la centrifugation. Il n'est pas impossible que la fraction ne supportant pas le stress au début de la centrifugation représente spécifiquement les granules de surcharge. Cette hypothèse est compatible avec le peu de différences observées entre les profils de distribution enzymatique au cours des centrifugations isopycniques chez les souris malades et sauvages.

Alternativement, même si cette hypothèse est peu probable, nous ne pouvons pas exclure que les granules de surcharge que nous cherchons à purifier soient dépourvus d'hydrolases actives. Dans une telle situation, nous ne pourrions pas les repérer d'après la distribution des activités enzymatiques d'hydrolases lysosomales.

A la suite de ce travail, plusieurs expériences devraient être réalisées. Il serait indispensable de détecter par Western blot sur les fractions récoltées, le marqueur le plus représentatif des granules surchargés en lipofuscine ceroïde, à savoir la sous-unité C de l'ATP synthase mitochondriale (Palmer et al., 1989). D'autre part, il serait intéressant de réaliser en microscopie électronique une analyse morphologique des lysosomes que nous aurions purifiés à partir de souris CLN2-/-.

Après avoir vérifié que les préparations enrichies en lysosomes CLN2-/- contiennent effectivement le matériel de surcharge, nos résultats pourront être exploités pour la mise au point d'une méthode préparative en vue d'une étude analytique par spectrométrie de masse. Cette analyse devrait fournir des informations sur la nature des composants impliqués dans le dysfonctionnement lysosomal de la lipofuscinose céroïde neuronale tardive infantile.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

Ahtiainen, L., Luiro, K., Kauppi, M., Tyynela, J., Kopra, O. and Jalanko, A. (2006). Palmitoyl protein thioesterase 1 (PPT1) deficiency causes endocytic defects connected to abnormal saposin processing. *Exp Cell Res* **312**, 1540-53.

Alenxander Wlodawer, S. R. D., Mi Li, Hiroshi Oyama, Kohei Oda and Ben M Dunn. (2003). A model of tripeptidyl-peptidase I (CLN2), a ubiquitous and highly conserved member of the sedosilin family of serine-carboxyl peptidases. *BMC Structural Biology*, 8.

Andrea Jahraus, B. S., Gareth Griffiths and Michel Desjardins. (1994). Evidence for retrograde traffic between terminal lysosomes and the prelysosomal/late endosome compartment. *Journal of Cell Science* **107**, 145-157.

Andrejewski, P., Guhde, Tanaka, Lullmann-Rauch, Hartmann, Von Figura and Saftig. (1999). Normal lysosomal morphology and function in Lamp-1 deficient mice. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 12692-12701.

Bagshaw, R. D., Mahuran, D. J. and Callahan, J. W. (2005). A proteomic analysis of lysosomal integral membrane proteins reveals the diverse composition of the organelle. *Mol Cell Proteomics* **4**, 133-43.

Bao, M., Booth, J. L., Elmendorf, B. J. and Canfield, W. M. (1996). Bovine UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal-enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. I. Purification and subunit structure. *J Biol Chem* **271**, 31437-45.

Beaufay, H., De Duve, C. and Novikoff, A. B. (1956). Electron microscopy of lysosomerich fractions from rat liver. *J Biophys Biochem Cytol* **2**, 179-84.

Beaufay, H., Jacques, P., Baudhuin, P., Sellinger, O. Z., Berthet, J. and De Duve, C. (1964). Tissue fractionation studies. 18. Resolution of mitochondrial fractions from rat liver into three distinct populations of cytoplasmic particles by means of density equilibration in various gradients. *Biochem J* **92**, 184-205.

Bellier, S. (2001). Les maladies lysosomales de l'homme et des animaux domestiques. *Revue méd.Vét.* **152**, 435-446.

Berthet, J. and De Duve, C. (1951). Tissue fractionation studies. I. The existence of a mitochondria-linked, enzymically inactive form of acid phosphatase in rat-liver tissue. *Biochem J* **50**, 174-81.

Bijvoet, A. G., van de Kamp, E. H., Kroos, M. A., Ding, J. H., Yang, B. Z., Visser, P., Bakker, C. E., Verbeet, M. P., Oostra, B. A., Reuser, A. J. et al. (1998). Generalized glycogen storage and cardiomegaly in a knockout mouse model of Pompe disease. *Hum Mol Genet* 7, 53-62.

Bonifacino, J. S. and Traub, L. M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**, 395-447.

Boonen, M., Hamer, I., Boussac, M., Delsaute, A. F., Flamion, B., Garin, J. and Jadot, M. (2006). Intracellular localization of p40, a protein identified in a preparation of lysosomal membranes. *Biochem J* 395, 39-47.

Braulke, T. (1996). Origin of lysosomal proteins. *Subcell Biochem* **27**, 15-49.

Chen, W. J., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1990). NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* **265**, 3116-23.

Creek, K. E. and Sly, W. S. (1983). Biosynthesis and turnover of the phosphomannosyl receptor in human fibroblasts. *Biochem J* **214**, 353-60.

De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F. (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J* **60**, 604-17.

Dierks, T., Schmidt, B., Borissenko, L. V., Peng, J., Preusser, A., Mariappan, M. and von Figura, K. (2003). Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C(alpha)-formylglycine generating enzyme. *Cell* **113**, 435-44.

Dittmer, F., Ulbrich, E. J., Hafner, A., Schmahl, W., Meister, T., Pohlmann, R. and von Figura, K. (1999). Alternative mechanisms for trafficking of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient mice are cell type-specific. *J Cell Sci* **112 (Pt 10)**, 1591-7.

Du, H., Heur, M., Duanmu, M., Grabowski, G. A., Hui, D. Y., Witte, D. P. and Mishra, J. (2001). Lysosomal acid lipase-deficient mice: depletion of white and brown fat, severe hepatosplenomegaly, and shortened life span. *J Lipid Res* **42**, 489-500.

Eeva-Liisa Eskelinen, Y. T. a. P. S. (2003). At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *TRENDS in cell biology* **13**, 137-145.

Eskelinen, E. L., Tanaka, Y. and Saftig, P. (2003). At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol* **13**, 137-45.

Ezaki, J., Tanida, I., Kanehagi, N. and Kominami, E. (1999). A lysosomal proteinase, the late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis gene (CLN2) product, is essential for degradation of a hydrophobic protein, the subunit c of ATP synthase. *J Neurochem* **72**, 2573-82.

Friedland, N., Liou, H. L., Lobel, P. and Stock, A. M. (2003). Structure of a cholesterol-binding protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2512-7.

Futerman, A. H. and van Meer, G. (2004). The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 554-65.

Glaumann H., B. F. J. (1987). LYSOSOMES: Their role in protein breakdown. London.

Golabek, A. A., Kida, E., Walus, M., Wujek, P., Mehta, P. and Wisniewski, K. E. (2003). Biosynthesis, glycosylation, and enzymatic processing in vivo of human tripeptidyl-peptidase I. *J Biol Chem* 278, 7135-45.

Hamer, I. and Jadot, M. (2005). Endolysosomal transport of newly-synthesized cathepsin D in a sucrose model of lysosomal storage. *Exp Cell Res* **309**, 284-95.

Himeno Mnishimura, Y., Tsuji, H. and Kato, K. (1976). Purification and characterization of microsomal and lysosomal beta-glucuronidase from rat liver by use of immunoaffinity chromatography. *Eur J Biochem* **70**, 349-59.

Hiraiwa, M. (1999). Cathepsin A/protective protein: an unusual lysosomal multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci* **56**, 894-907.

Holtzmann, E. (1989). Lysosomes.

Hunziker, W. and Geuze, H. J. (1996). Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays* **18**, 379-89.

Jadot, M., Canfield, W. M., Gregory, W. and Kornfeld, S. (1992). Characterization of the signal for rapid internalization of the bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor. *J Biol Chem* **267**, 11069-77.

Jadot, M., Dubois, F., Wattiaux-De Coninck, S. and Wattiaux, R. (1997). Supramolecular assemblies from lysosomal matrix proteins and complex lipids. *Eur J Biochem* **249**, 862-9.

Jeyakumar, M., Thomas, R., Elliot-Smith, E., Smith, D. A., van der Spoel, A. C., d'Azzo, A., Perry, V. H., Butters, T. D., Dwek, R. A. and Platt, F. M. (2003). Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis. *Brain* 126, 974-87.

Journet, A., Chapel, A., Kieffer, S., Louwagie, M., Luche, S. and Garin, J. (2000). Towards a human repertoire of monocytic lysosomal proteins. *Electrophoresis* 21, 3411-9.

Kida, E., Wisniewski, K. E. and Golabek, A. A. (1993). Increased expression of subunit c of mitochondrial ATP synthase in brain tissue from neuronal ceroid lipofuscinoses and mucopolysaccharidosis cases but not in long-term fibroblast cultures. *Neurosci Lett* **164**, 121-4.

Koike, M., Shibata, M., Ohsawa, Y., Kametaka, S., Waguri, S., Kominami, E. and Uchiyama, Y. (2002). The expression of tripeptidyl peptidase I in various tissues of rats and mice. *Arch Histol Cytol* 65, 219-32.

Kornfeld, R., Bao, M., Brewer, K., Noll, C. and Canfield, W. M. (1998). Purification and multimeric structure of bovine N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase. *J Biol Chem* **273**, 23203-10.

Kornfeld, S. (1985). Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. *Journal of Clinical investigation* **77**, 1-6.

Kornfeld, S. (1989). Lysosomal enzyme targeting. *Biochemical society transactions* **18**.

Kurachi, Y., Oka, A., Itoh, M., Mizuguchi, M., Hayashi, M. and Takashima, S. (2001). Distribution and development of CLN2 protein, the late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis gene product. *Acta Neuropathol (Berl)* **102**, 20-6.

Levran, O., Desnick, R. J. and Schuchman, E. H. (1991). Niemann-Pick type B disease. Identification of a single codon deletion in the acid sphingomyelinase gene and genotype/phenotype correlations in type A and B patients. *J Clin Invest* **88**, 806-10.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-75.

Mancini, G. M., Beerens, C. E., Aula, P. P. and Verheijen, F. W. (1991). Sialic acid storage diseases. A multiple lysosomal transport defect for acidic monosaccharides. *J Clin Invest* **87**, 1329-35.

Meer, A. H. F. a. G. v. (2004). The cell biology of lysosomal storage disorder. Nature **5**.

Mellman, S. K. a. I. (1989). The biogenesis of lysosomes. *Annual Review of Cell Biology* **5**, 483-525.

Mertens-Strijthagen, J., De Schrijver, C., Wattiaux-De Coninck, S. and Wattiaux, R. (1979). A centrifugation study of rat-liver mitochondria, lysosomes and peroxisomes during the perinatal period. *Eur J Biochem* **98**, 339-52.

Mitchell, W. A., Wheeler, R. B., Sharp, J. D., Bate, S. L., Gardiner, R. M., Ranta, U. S., Lonka, L., Williams, R. E., Lehesjoki, A. E. and Mole, S. E. (2001). Turkish variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN7) may be allelic to CLN8. *Eur J Paediatr Neurol* 5 Suppl A, 21-7.

Mole, S. E., Williams, R. E. and Goebel, H. H. (2005). Correlations between genotype, ultrastructural morphology and clinical phenotype in the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Neurogenetics* **6**, 107-26.

Morris, M. D., Bhuvaneswaran, C., Shio, H. and Fowler, S. (1982). Lysosome lipid storage disorder in NCTR-BALB/c mice. I. Description of the disease and genetics. *Am J Pathol* **108**, 140-9.

Naureckiene, S., Sleat, D. E., Lackland, H., Fensom, A., Vanier, M. T., Wattiaux, R., Jadot, M. and Lobel, P. (2000). Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science* 290, 2298-301.

Neufeld, E. F. (1989). Natural history and inherited disorders of a lysosomal enzyme, beta-hexosaminidase. *J Biol Chem* **264**, 10927-30.

Nishino I, F. J., Tanji K, Yamada T, Shimojo S, Koori T, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Koga Y, Sue CM, Yamamoto A, Murakami N, Shanske S, Byrne E, Bonilla E, Nonaka I, DiMauro S, Hirano M. (2000). Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* 406, 906-10.

Ohshita, T. and Kido, H. (1995). Simple preparation of rat brain lysosomes and their proteolytic properties. *Anal Biochem* **230**, 41-7.

Owada, M. and Neufeld, E. F. (1982). Is there a mechanism for introducing acid hydrolases into liver lysosomes that is independent of mannose 6-phosphate recognition? Evidence from I-cell disease. *Biochem Biophys Res Commun* **105**, 814-20.

Owens, J. W. and Stahl, P. (1976). Purification and characterization of rat liver microsomal beta-glucuronidase. *Biochim Biophys Acta* **438**, 474-86.

Palmer, D. N., Martinus, R. D., Cooper, S. M., Midwinter, G. G., Reid, J. C. and Jolly, R. D. (1989). Ovine ceroid lipofuscinosis. The major lipopigment protein and the lipid-binding subunit of mitochondrial ATP synthase have the same NH2-terminal sequence. *J Biol Chem* **264**, 5736-40.

Passini, M. A., Dodge, J. C., Bu, J., Yang, W., Zhao, Q., Sondhi, D., Hackett, N. R., Kaminsky, S. M., Mao, Q., Shihabuddin, L. S. et al. (2006). Intracranial delivery of CLN2 reduces brain pathology in a mouse model of classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Neurosci* 26, 1334-42.

Petanceska, S., Burke, S., Watson, S. J. and Devi, L. (1994). Differential distribution of messenger RNAs for cathepsins B, L and S in adult rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience* **59**, 729-38.

Platt F.M, W. S. U. (2004). Lysosomal disorders of the brain. Oxford: Oxford University Press.

Puertollano, R., Aguilar, R. C., Gorshkova, I., Crouch, R. J. and Bonifacino, J. S. (2001). Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science* 292, 1712-6.

Robinson, M. S. and Bonifacino, J. S. (2001). Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 444-53.

Royle, S. J. (2006). The cellular functions of clathrin. *Cell Mol Life Sci*.

Sandhoff, K. and Kolter, T. (2003). Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 847-61.

Schulz, A., Mousallem, T., Venkataramani, M., Persaud-Sawin, D. A., Zucker, A., Luberto, C., Bielawska, A., Bielawski, J., Holthuis, J. C., Jazwinski, S. M. et al. (2006). The CLN9 protein, a regulator of dihydroceramide synthase. *J Biol Chem* 281, 2784-94.

Seyrantepe, V., Landry, K., Trudel, S., Hassan, J. A., Morales, C. R. and Pshezhetsky, A. V. (2004). Neu4, a novel human lysosomal lumen sialidase, confers normal phenotype to sialidosis and galactosialidosis cells. *J Biol Chem* **279**, 37021-9.

Sleat, D. E., Donnelly, R. J., Lackland, H., Liu, C. G., Sohar, I., Pullarkat, R. K. and Lobel, P. (1997). Association of mutations in a lysosomal protein with classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Science* 277, 1802-5.

Sleat, D. E., Gin, R. M., Sohar, I., Wisniewski, K., Sklower-Brooks, S., Pullarkat, R. K., Palmer, D. N., Lerner, T. J., Boustany, R. M., Uldall, P. et al. (1999). Mutational analysis of the defective protease in classic late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, a neurodegenerative lysosomal storage disorder. *Am J Hum Genet* 64, 1511-23.

Sleat, D. E., Sohar, I., Lackland, H., Majercak, J. and Lobel, P. (1996). Rat brain contains high levels of mannose-6-phosphorylated glycoproteins including lysosomal enzymes and palmitoyl-protein thioesterase, an enzyme implicated in infantile neuronal lipofuscinosis. *J Biol Chem* **271**, 19191-8.

Sleat, D. E., Wiseman, J. A., El-Banna, M., Kim, K. H., Mao, Q., Price, S., Macauley, S. L., Sidman, R. L., Shen, M. M., Zhao, Q. et al. (2004). A mouse model of classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis based on targeted disruption of the CLN2 gene results in a loss of tripeptidyl-peptidase I activity and progressive neurodegeneration. *J Neurosci* 24, 9117-26.

Sohar, I., Sleat, D. E., Jadot, M. and Lobel, P. (1999). Biochemical characterization of a lysosomal protease deficient in classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (LINCL) and development of an enzyme-based assay for diagnosis and exclusion of LINCL in human specimens and animal models. *J Neurochem* **73**, 700-11.

Steinfeld, R., Steinke, H. B., Isbrandt, D., Kohlschutter, A. and Gartner, J. (2004). Mutations in classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis disrupt transport of tripeptidyl-peptidase I to lysosomes. *Hum Mol Genet* **13**, 2483-91.

T. Kuronita, E.-L. e., H.Fujita, P.Saftig, M.Himeno and Yμ. Tanaka. (2002). A role for the lysosomal membrane protein LGP85 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology. *Journal of Cell Science* **115**, 4117-4131.

Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E. L., Hartmann, D., Lullmann-Rauch, R., Janssen, P. M., Blanz, J., von Figura, K. and Saftig, P. (2000). Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* 406, 902-6.

Tikkanen, R., Obermuller, S., Denzer, K., Pungitore, R., Geuze, H. J., von Figura, K. and Honing, S. (2000). The dileucine motif within the tail of MPR46 is required for sorting of the receptor in endosomes. *Traffic* **1**, 631-40.

Tomatsu, S., Gutierrez, M. A., Ishimaru, T., Pena, O. M., Montano, A. M., Maeda, H., Velez-Castrillon, S., Nishioka, T., Fachel, A. A., Cooper, A. et al. (2005). Heparan sulfate levels in mucopolysaccharidoses and mucolipidoses. *J Inherit Metab Dis* 28, 743-57.

Tomino, S., Paigen, K., Tulsiani, D. R. and Touster, O. (1975). Purification and chemical properities of mouse liver lysosomal (L form) beta-glucuronidase. *J Biol Chem* **250**, 8503-9.

Tooze, S. A. (2001). Cell biology. GGAs tie up the loose ends. *Science* **292**, 1663-5.

Toyomura, T., Murata, Y., Yamamoto, A., Oka, T., Sun-Wada, G. H., Wada, Y. and Futai, M. (2003). From lysosomes to the plasma membrane: localization of vacuolar-type H+ -ATPase with the a3 isoform during osteoclast differentiation. *J Biol Chem* **278**, 22023-30.

Turk. (1999). Proteases New perspectives.

Vines, D. J. and Warburton, M. J. (1999). Classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis fibroblasts are deficient in lysosomal tripeptidyl peptidase I. *FEBS Lett* **443**, 131-5.

von Figura, K., Steckel, F. and Hasilik, A. (1983). Juvenile and adult metachromatic leukodystrophy: partial restoration of arylsulfatase A (cerebroside sulfatase) activity by inhibitors of thiol proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 6066-70.

Warburton, M. J. and Bernardini, F. (2001). The specificity of lysosomal tripeptidyl peptidase-I determined by its action on angiotensin-II analogues. *FEBS Lett* **500**, 145-8.

Wattiaux, R., Wattiaux-De Coninck, S., Ronveaux-dupal, M. F. and Dubois, F. (1978). Isolation of rat liver lysosomes by isopycnic centrifugation in a metrizamide gradient. *J Cell Biol* **78**, 349-68.

Wu, Y. P. and Proia, R. L. (2004). Deletion of macrophage-inflammatory protein 1 alpha retards neurodegeneration in Sandhoff disease mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8425-30.

Wujek, P., Kida, E., Walus, M., Wisniewski, K. E. and Golabek, A. A. (2004). N-glycosylation is crucial for folding, trafficking, and stability of human tripeptidyl-peptidase I. *J Biol Chem* **279**, 12827-39.

Yonekawa, Y., Harada, A., Okada, Y., Funakoshi, T., Kanai, Y., Takei, Y., Terada, S., Noda, T. and Hirokawa, N. (1998). Defect in synaptic vesicle precursor transport and neuronal cell death in KIF1A motor protein-deficient mice. *J Cell Biol* 141, 431-41.

Zhang, M., Dwyer, N. K., Love, D. C., Cooney, A., Comly, M., Neufeld, E., Pentchev, P. G., Blanchette-Mackie, E. J. and Hanover, J. A. (2001). Cessation of rapid late endosomal tubulovesicular trafficking in Niemann-Pick type C1 disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4466-71**.**

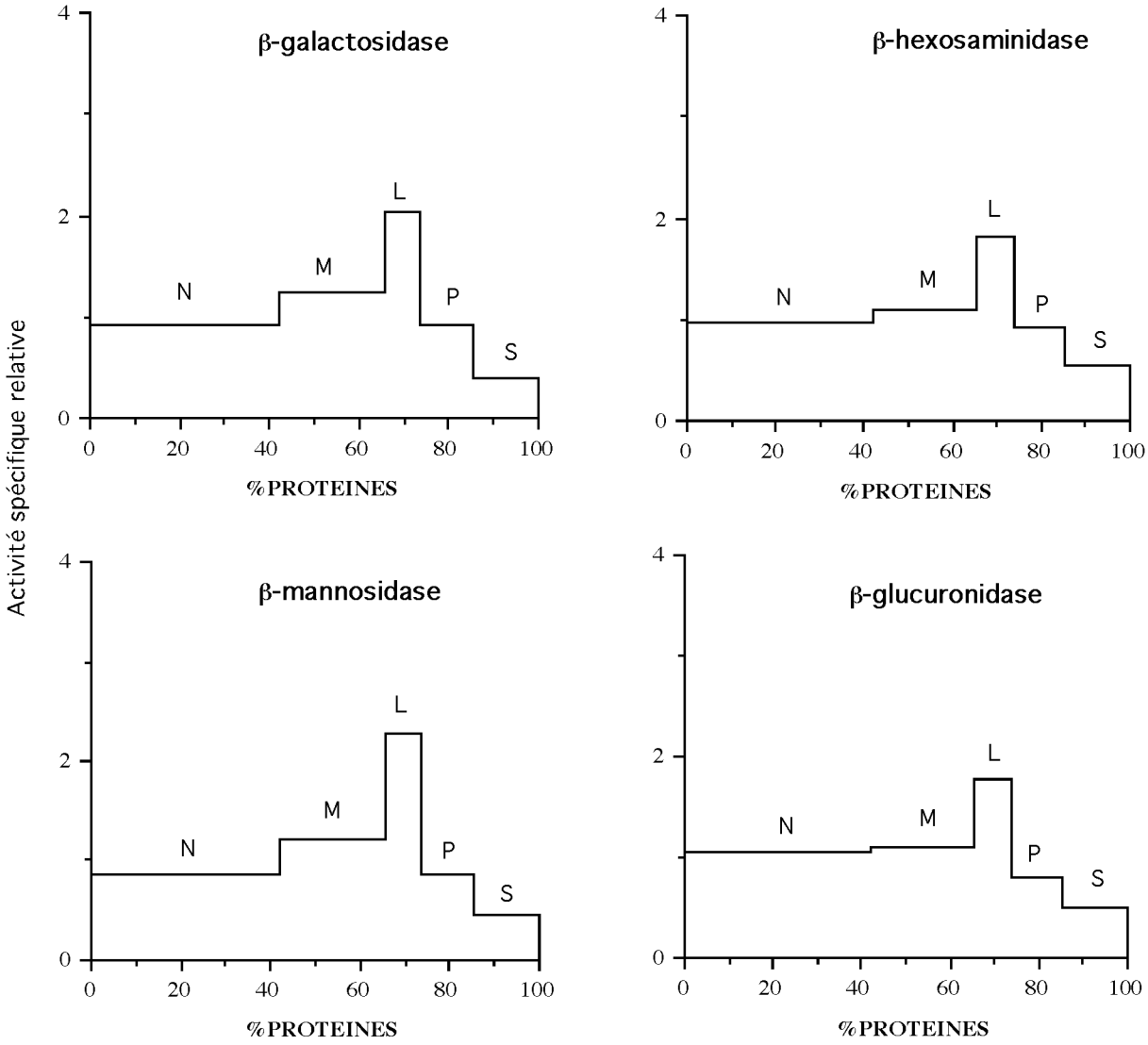

Figure 8: Distribution de quatre enzymes lysosomales de référence après centrifugation différentielle de foie de souris CLN2 +/+ âgées de 50 jours. N, fraction nucléaire; M, fraction mitochondriale lourde; L, fraction mitochondriale légère; P, fraction microsomale; S, fraction soluble. La surface est proportionnelle à l'activité totale. En ordonnée, l'activité spécifique relative (pourcentage d'activité enzymatique par rapport au pourcentage de protéine corrigé). En abscisse, le pourcentage cumulé de protéines contenues dans chaque fraction.

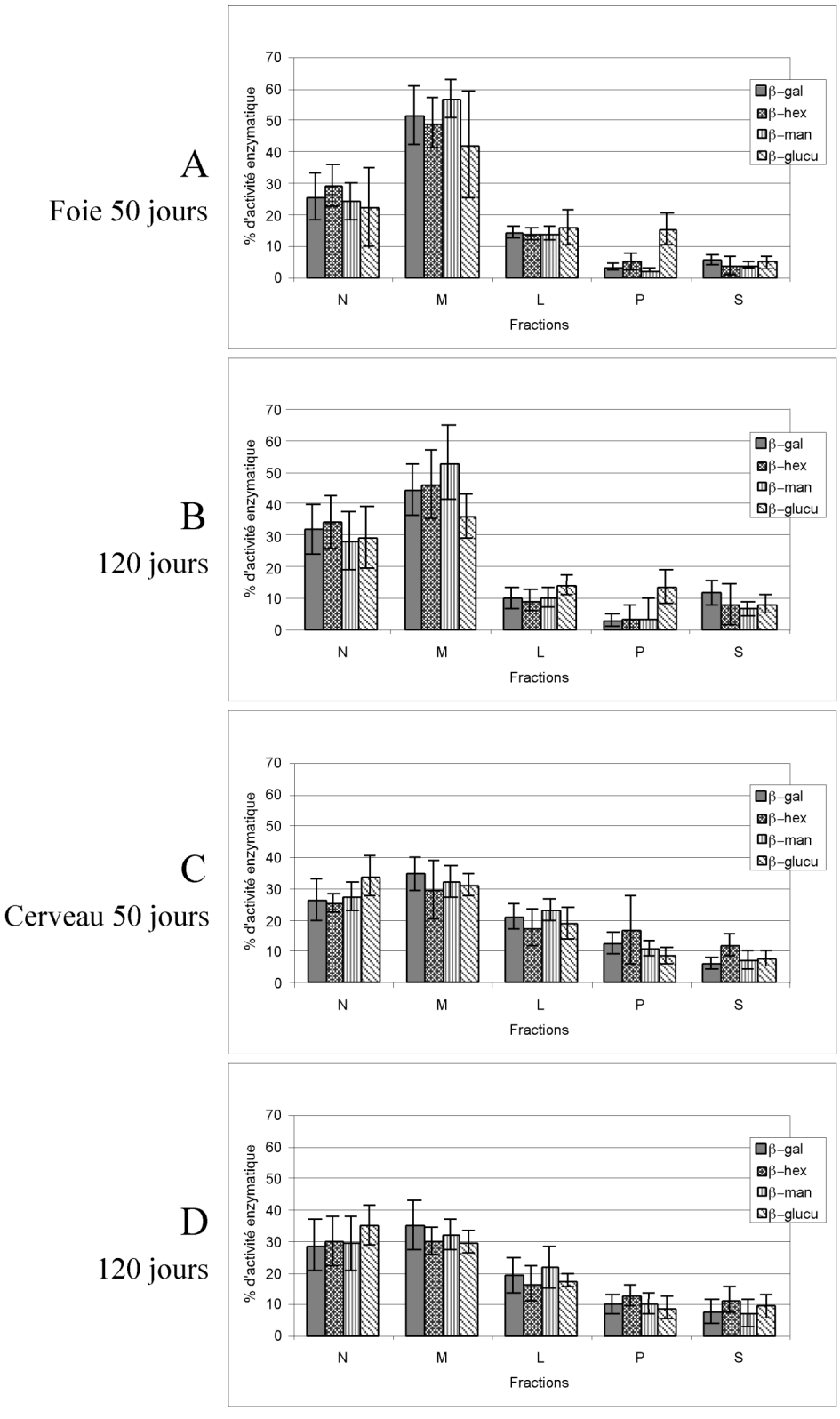

Figure 9: Distribution du pourcentage d'activité enzymatique de quatre enzymes lysosomales dans les fractions subcellulaires obtenues à partir d'un homogénat de foie ou de cerveau de souris CLN2 +/+ âgées de 50 et 120 jours. A: Distribution dans le foie de souris âgées de 50 jours; B: Distribution dans le foie de souris âgées de 120 jours; C: Distribution dans le cerveau de souris âgées de 50 jours; D: Distribution dans le cerveau de souris âgées de 120 jours. La distribution est représentée sous forme d'histogrammes. Les barres d'erreurs représentent +/- 2 écart-types ce qui correspond à un intervalle de confiance de 95%.

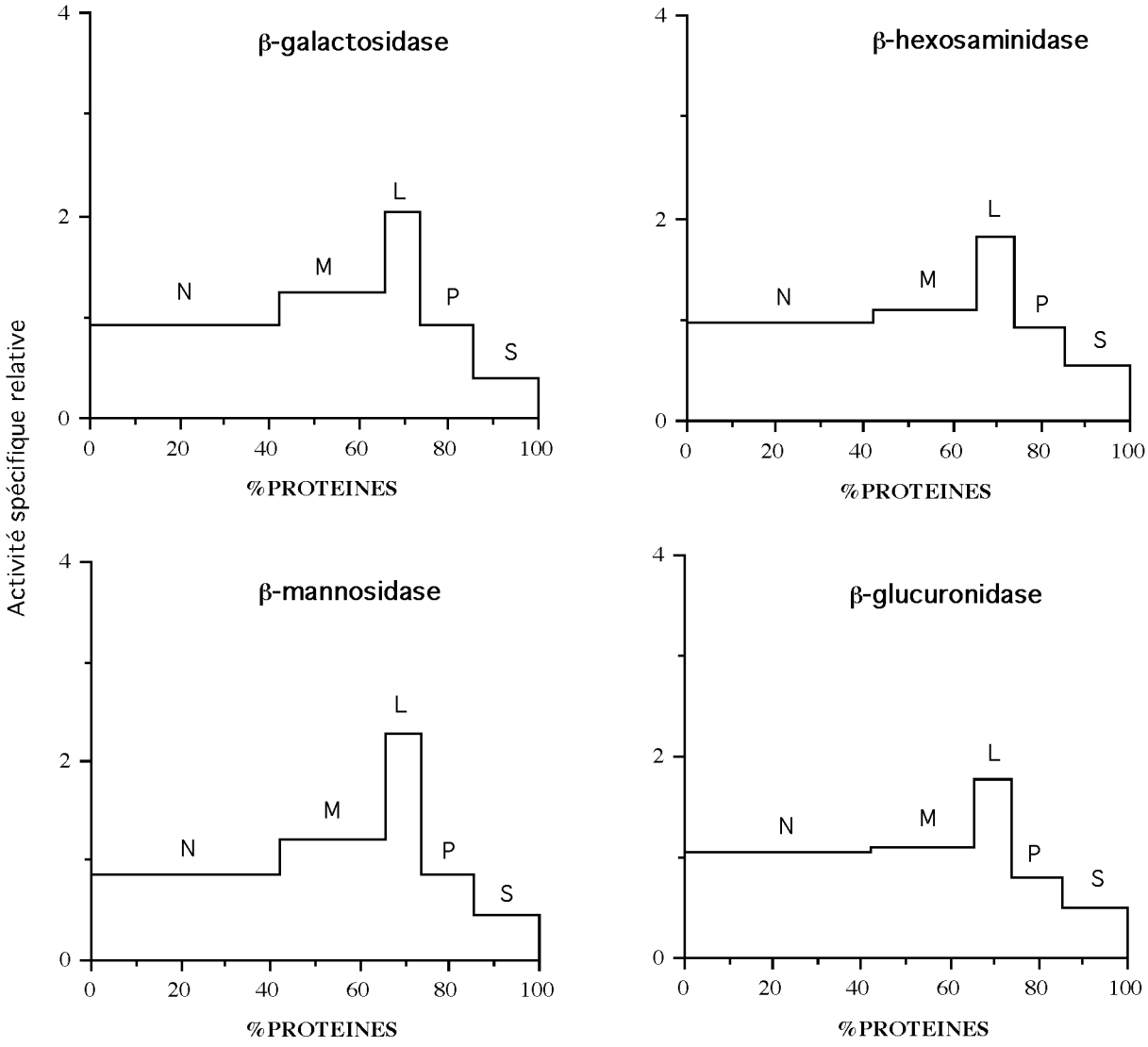

Figure 10: Distribution de quatre enzymes lysosomales de référence après centrifugation différentielle de cerveau de souris CLN2 +/+ âgées de 50 jours. N, fraction nucléaire; M, fraction mitochondriale lourde; L, fraction mitochondriale légère; P, fraction microsomale; S, fraction soluble.

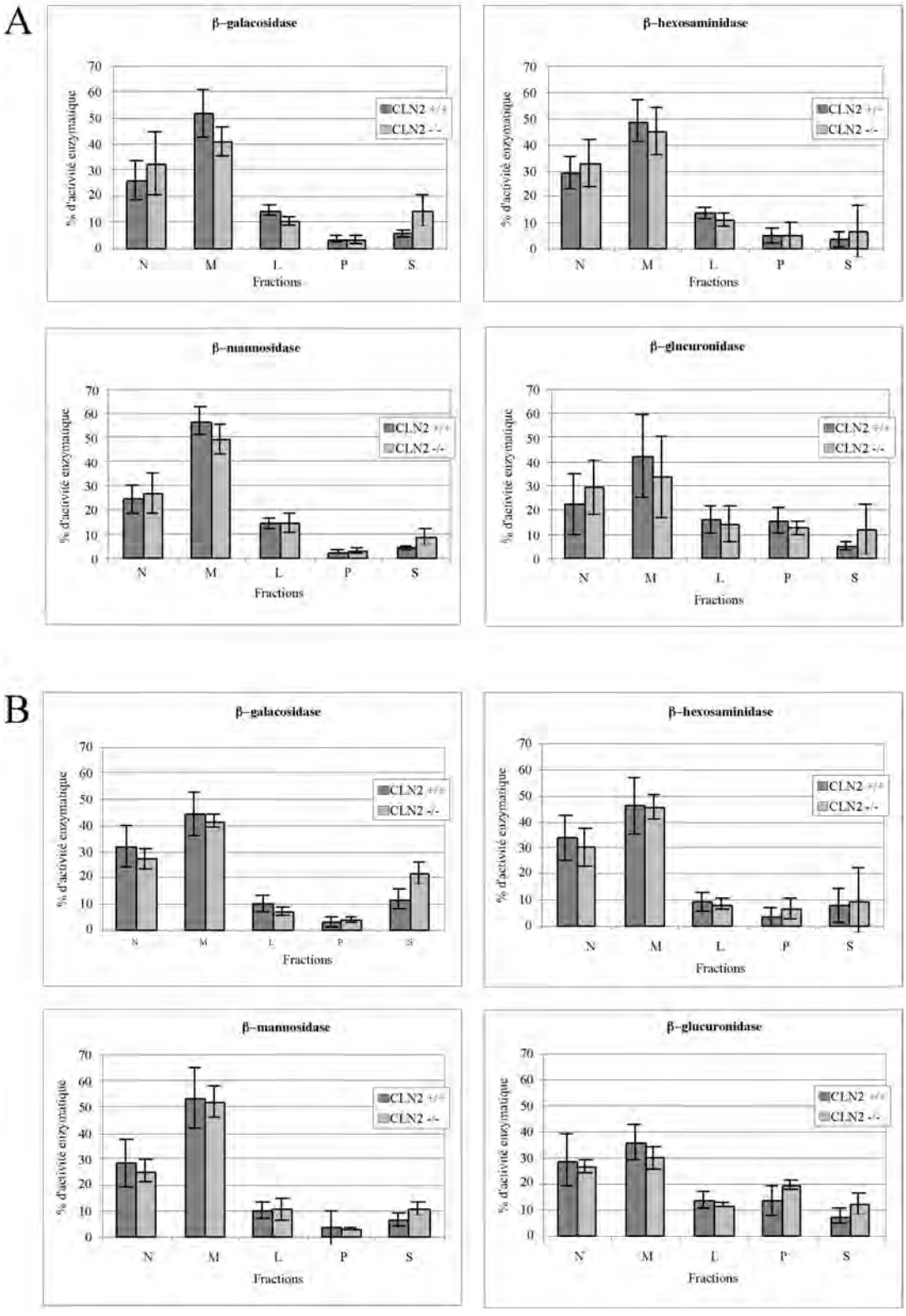

Figure 11: Répartition de quatre enzymes lysosomales dans un fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle d'homogénats de foie de souris CLN2 -/- et +/+. N, fraction nucléaire; M, fraction mitochondriale lourde; L, fraction mitochondriale légère; P, fraction microsomale; S, fraction soluble. La répartition est représentée sous forme d'histogrammes avec en ordonnée le pourcentage d'activité enzymatique. Les barres d'erreurs représentent +/- 2 écart-types (intervalle de confiance à 95%). A: Répartition dans le foie de souris âgées de 50 jours; B: Répartition dans le foie de souris âgées de 120 jours.

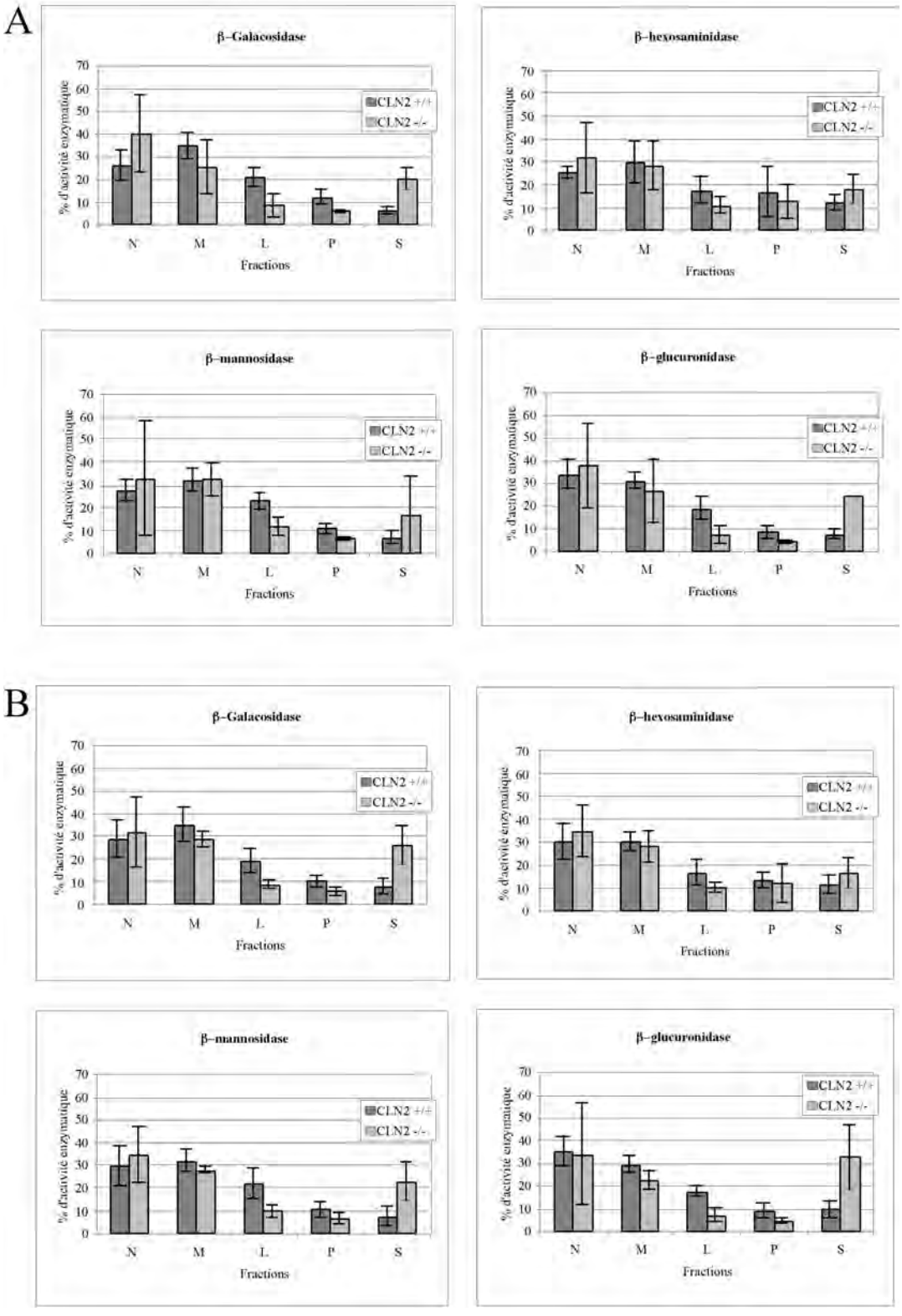

Figure 12: Répartition de quatre enzymes lysosomales dans un fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle d'homogénats de cerveau de souris CLN2 -/- et +/+. N, fraction nucléaire; M, fraction mitochondriale lourde; L, fraction mitochondriale légère; P, fraction microsomale; S, fraction soluble. La répartition est représentée sous forme d'histogrammes avec en ordonnée le pourcentage d'activité enzymatique. Les barres d'erreurs représentent +/- 2 écart-types

(intervalle de confiance à 95%). A : répartition dans le cerveau de souris âgées de 50 jours; B : répartition dans le cerveau de souris âgées de 120 jours.

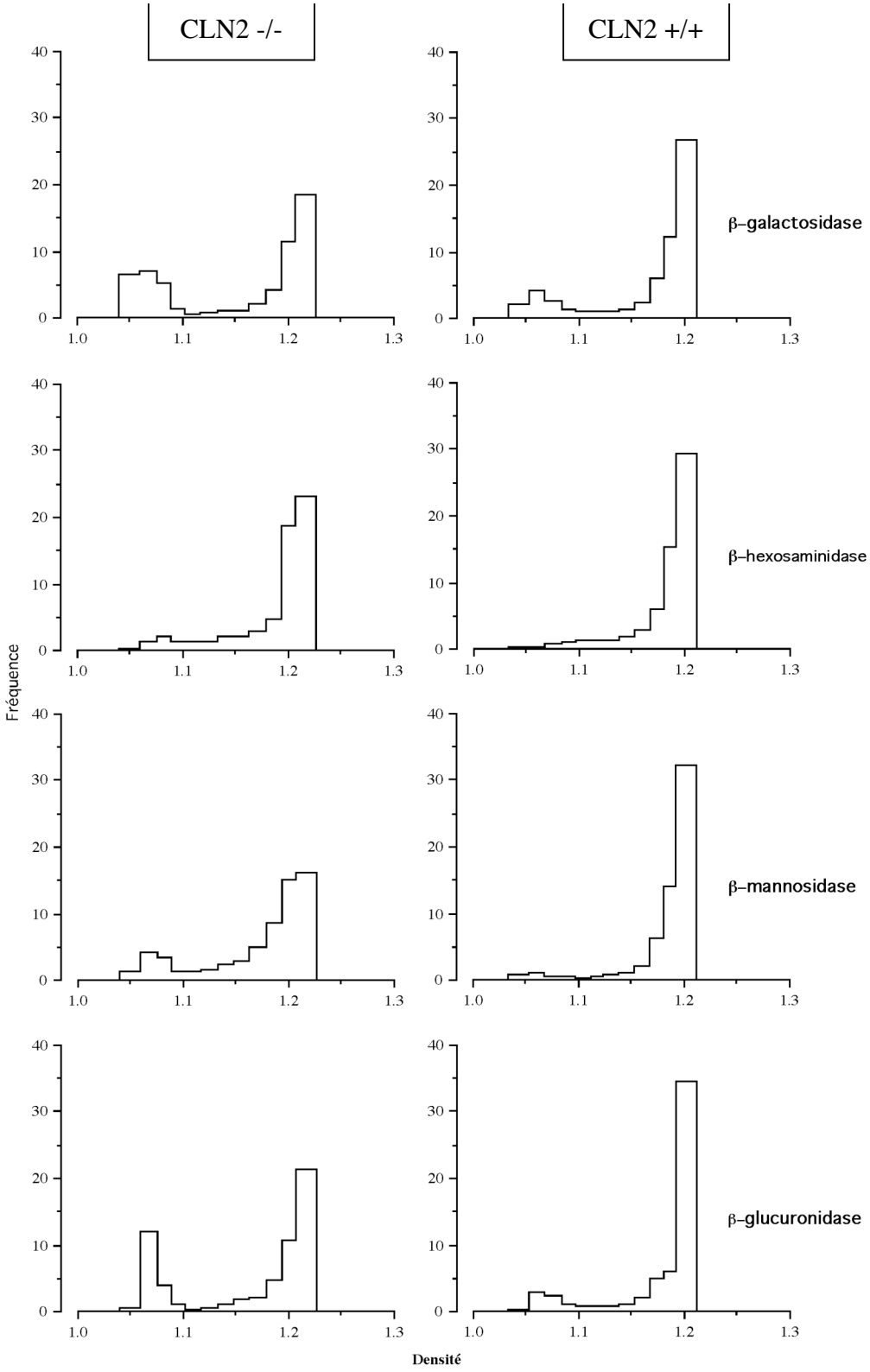
CLN2 -/-
CLN2 +/+
β-galactosidase
β-hexosaminidase
β-mannosidase
β-glucuronidase
Fréquence
Densité
0
10
20
30
40
1.0
1.1
1.2
1.3

Figure 13: Distribution de l'activité de quatre enzymes lysosomales de référence après centrifugation isopycnique dans un gradient de saccharose 1,05-1,24 g/ml d'une fraction mitochondriale totale ML déposée au sommet du gradient, provenant de foie de souris CLN2 -/- et +/+. Les fractions M et L, obtenues à partir d'une centrifugation différentielle de foie de souris CLN2 -/- et +/+ âgées de 120 jours sont déposées au sommet d'un gradient de densité continu de saccharose allant de 1,05 à 1,24g/ml. A gauche, la fraction ML provenant de foie de souris CLN2 -/-. A droite, la fraction ML provenant de foie de souris CLN2 +/+.

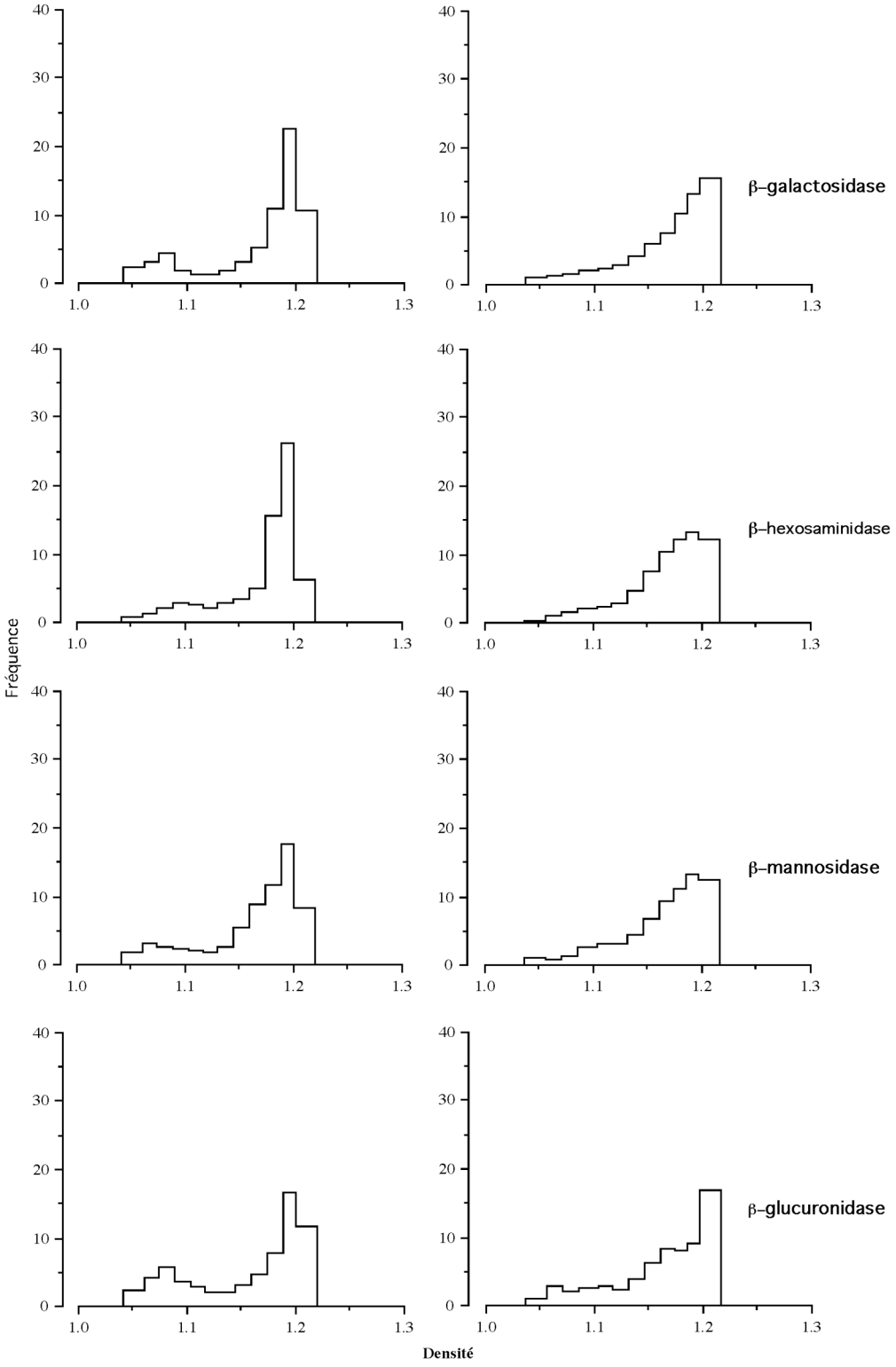

Figure 14: Distribution de l'activité de quatre enzymes lysosomales de référence après centrifugation isopycnique dans un gradient de saccharose 1,05-1,24 g/ml d'une fraction mitochondriale totale ML déposée au sommet du gradient, provenant de cerveau de souris CLN2 -/- et +/+. Les fractions M et L, obtenues à partir d'une centrifugation différentielle de foie de souris CLN2 -/- et +/+ âgées de 120 jours sont déposées au sommet d'un gradient de densité continu de saccharose allant de 1,05 à 1,24g/ml.

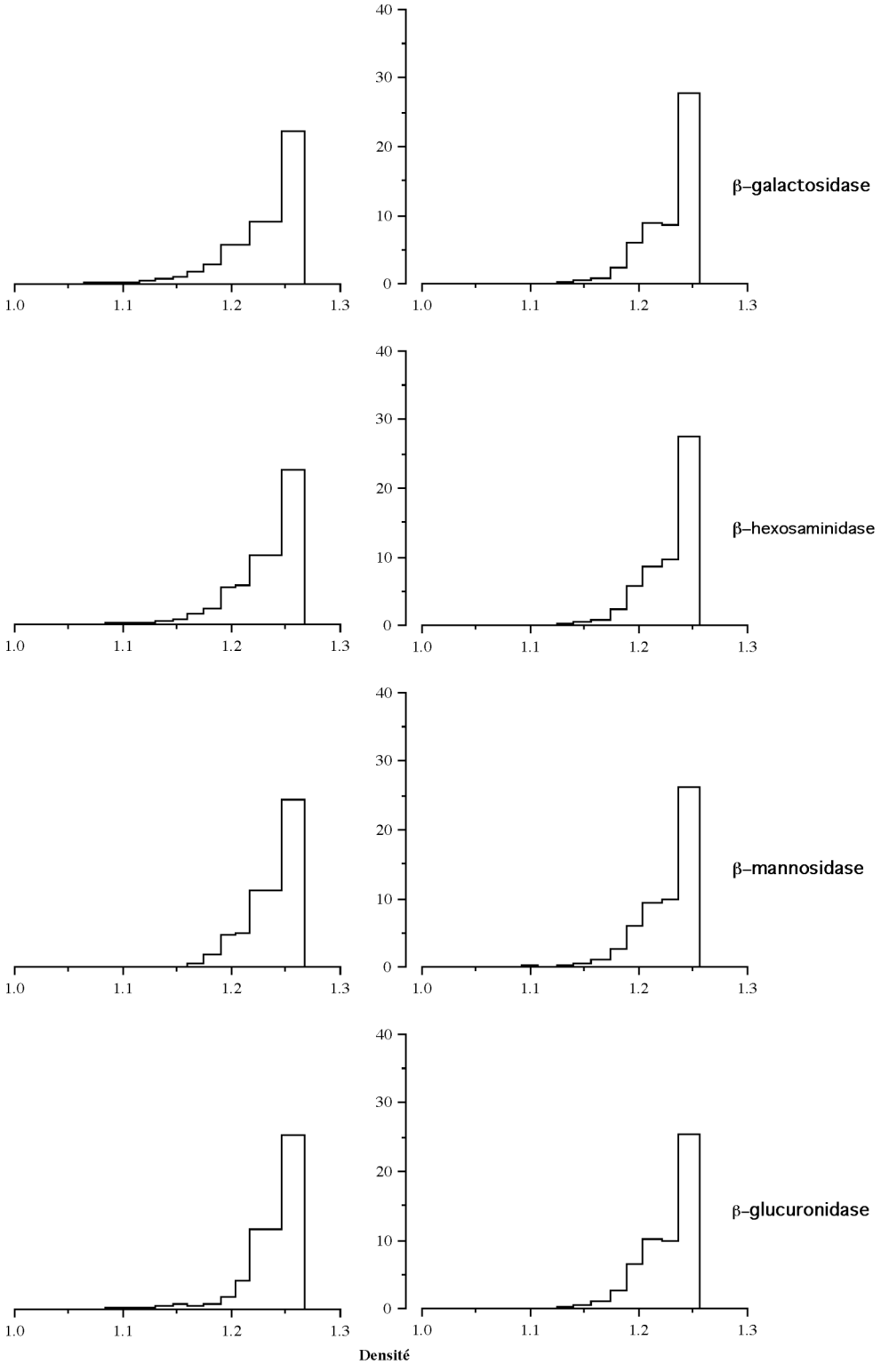

Figure 15: Distribution de l'activité de quatre enzymes lysosomales de référence après centrifugation isopycnique dans un gradient de saccharose 1,05-1,26 g/ml d'une fraction mitochondriale totale ML déposée au fond du gradient, provenant de foie de souris CLN2 -/- et +/+. Les fractions M et L, obtenues à partir d'une centrifugation différentielle de foie de souris CLN2 -/- et +/+ âgées de 120 jours sont déposées au fond d'un gradient de densité continu de saccharose allant de 1,05 à 1,26g/ml. A gauche, les résultats obtenus pour la fraction ML provenant de foie de souris CLN2-/-. A droite, les résultats obtenus pour la fraction ML provenant de foie de souris CLN2 +/+.

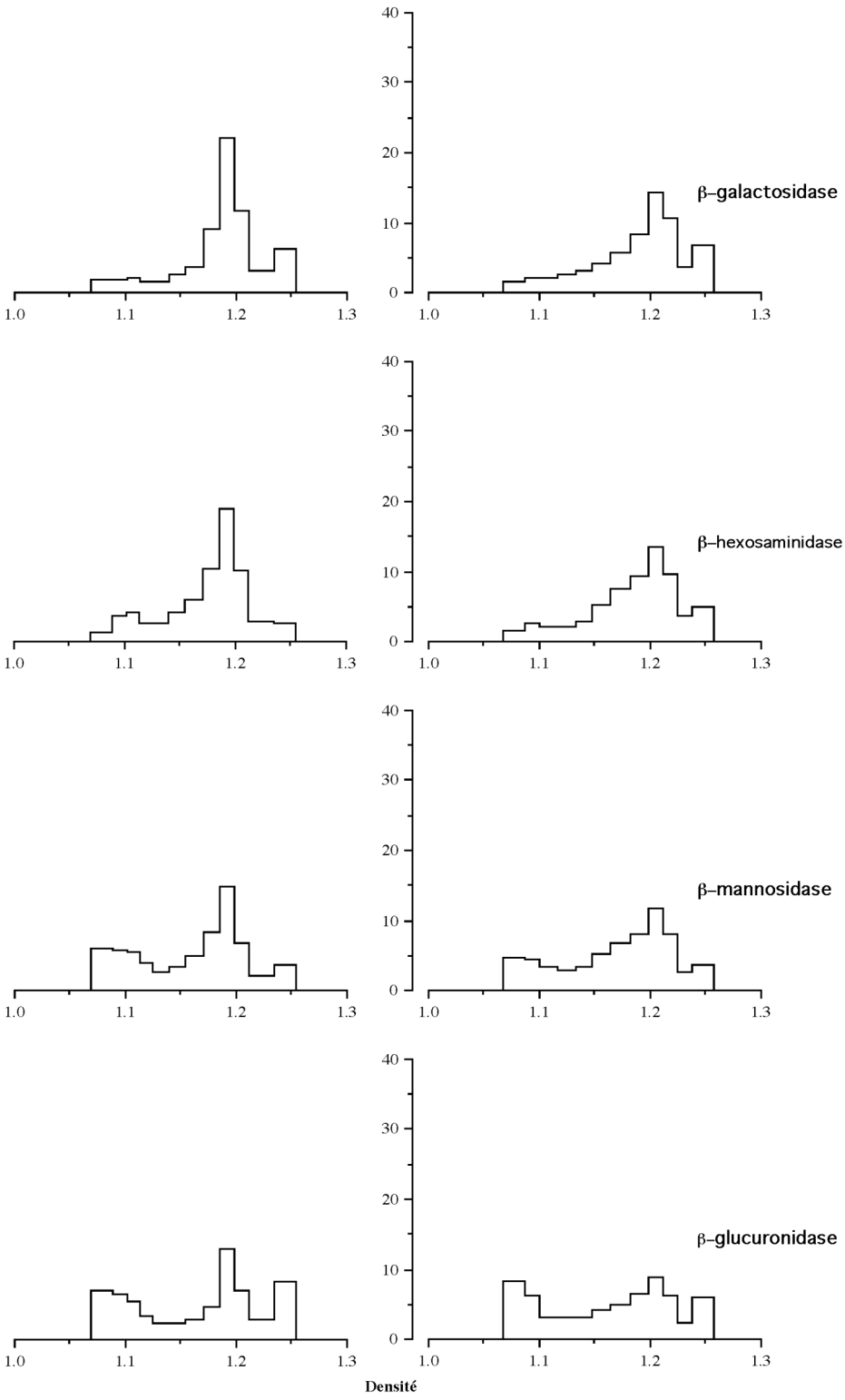

Figure 16:Distribution de l'activité de quatre enzymes lysosomales de référence après centrifugation isopycnique dans un gradient de saccharose 1,05-1,26 g/ml d'une fraction mitochondriale totale ML déposée au fond du gradient, provenant de cerveau de souris CLN2 -/- et +/+. Les fractions M et L, obtenues à partir d'une centrifugation différentielle de foie de souris CLN2 -/- et +/+ âgées de 120 jours sont déposées au fond d'un gradient de densité continu de saccharose allant de 1,05 à 1,26g/ml.

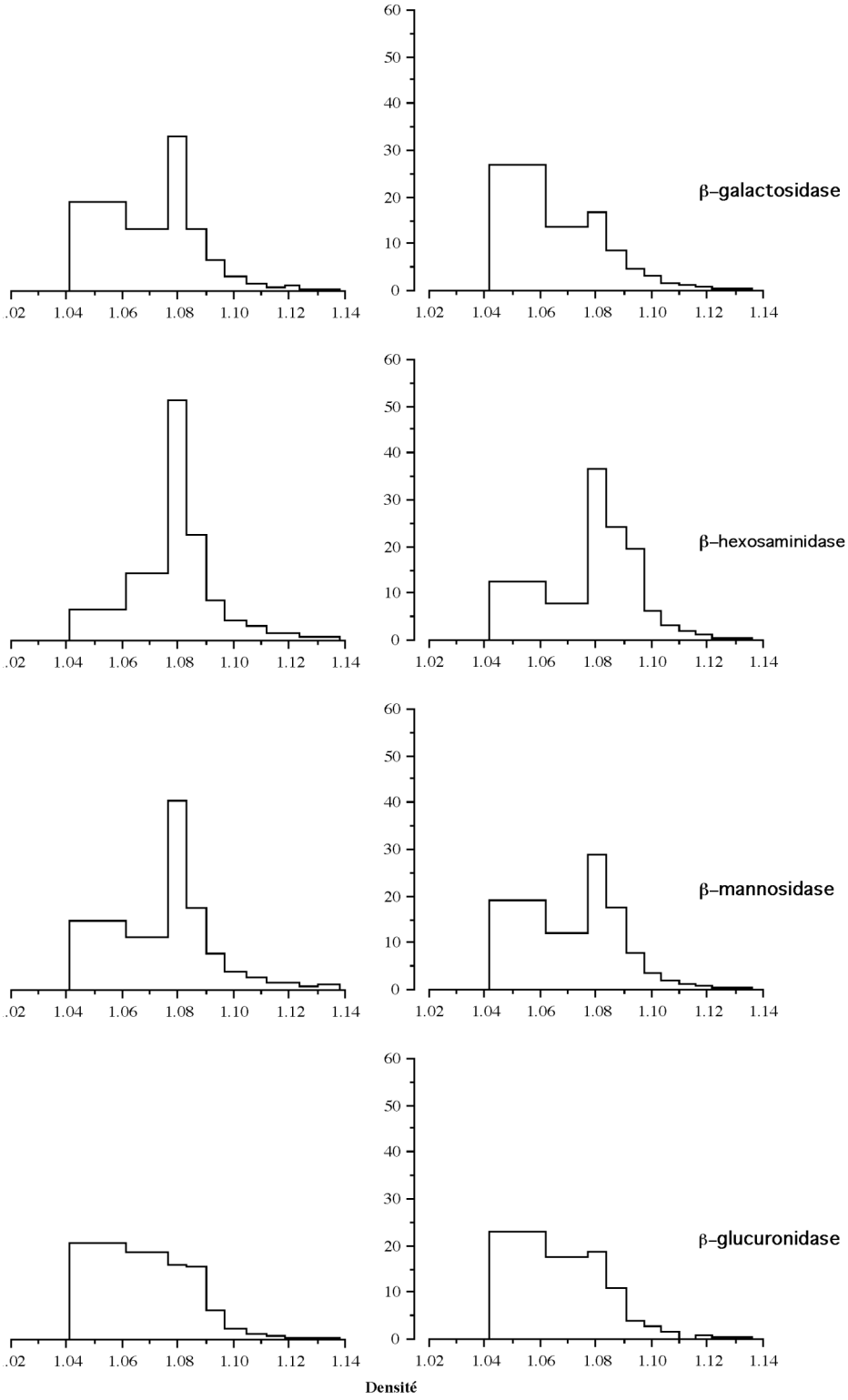

Figure 17: Distribution de l'activité de quatre enzymes lysosomales de référence après centrifugation isopycnique dans un gradient de Percoll préformé d'une fraction mitochondriale totale ML déposée au fond du gradient, provenant de foie de souris CLN2 -/- et +/+. Les fractions M et L, obtenues à partir d'une centrifugation différentielle de foie de souris CLN2 -/- et +/+ âgées de 120 jours sont déposées au sommet d'un gradient de Percoll préformé allant de 1,04 à 1,15g/ml. A gauche, les résultats obtenus pour la fraction ML provenant de foie de souris CLN2-/-. A droite, les résultats obtenus pour la fraction ML provenant de foie de souris CLN2+/+.

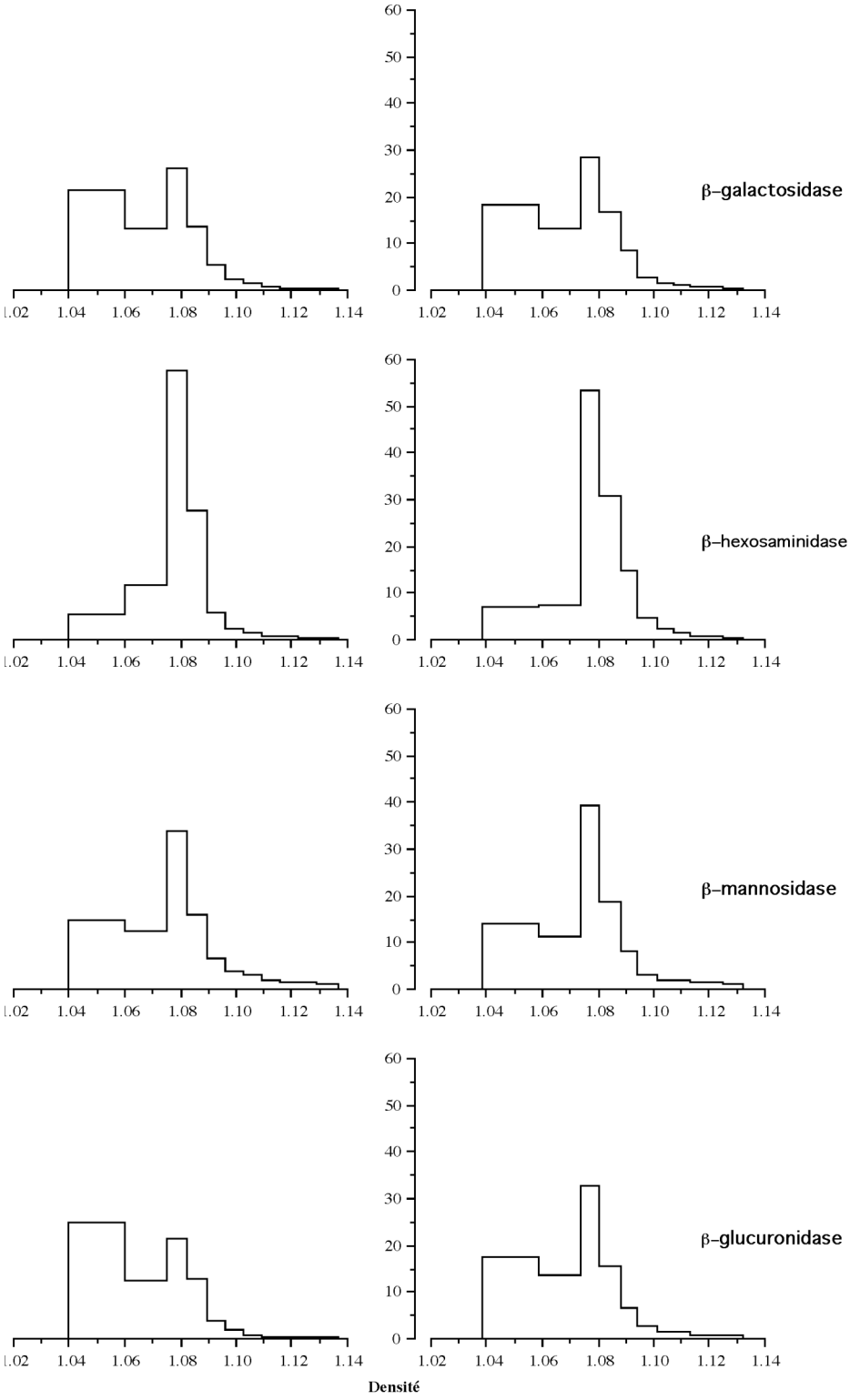

Figure 18: Distribution de l'activité de quatre enzymes lysosomales de référence après centrifugation isopycnique dans un gradient de Percoll préformé d'une fraction mitochondriale totale ML déposée au fond du gradient, provenant de cerveau de souris CLN2 -/- et +/+. Les fractions M et L, obtenues à partir d'une centrifugation différentielle de foie de souris CLN2 -/- et +/+ âgées de 120 jours sont déposées au sommet d'un gradient de Percoll préformé allant de 1,04 à 1,15g/ml.

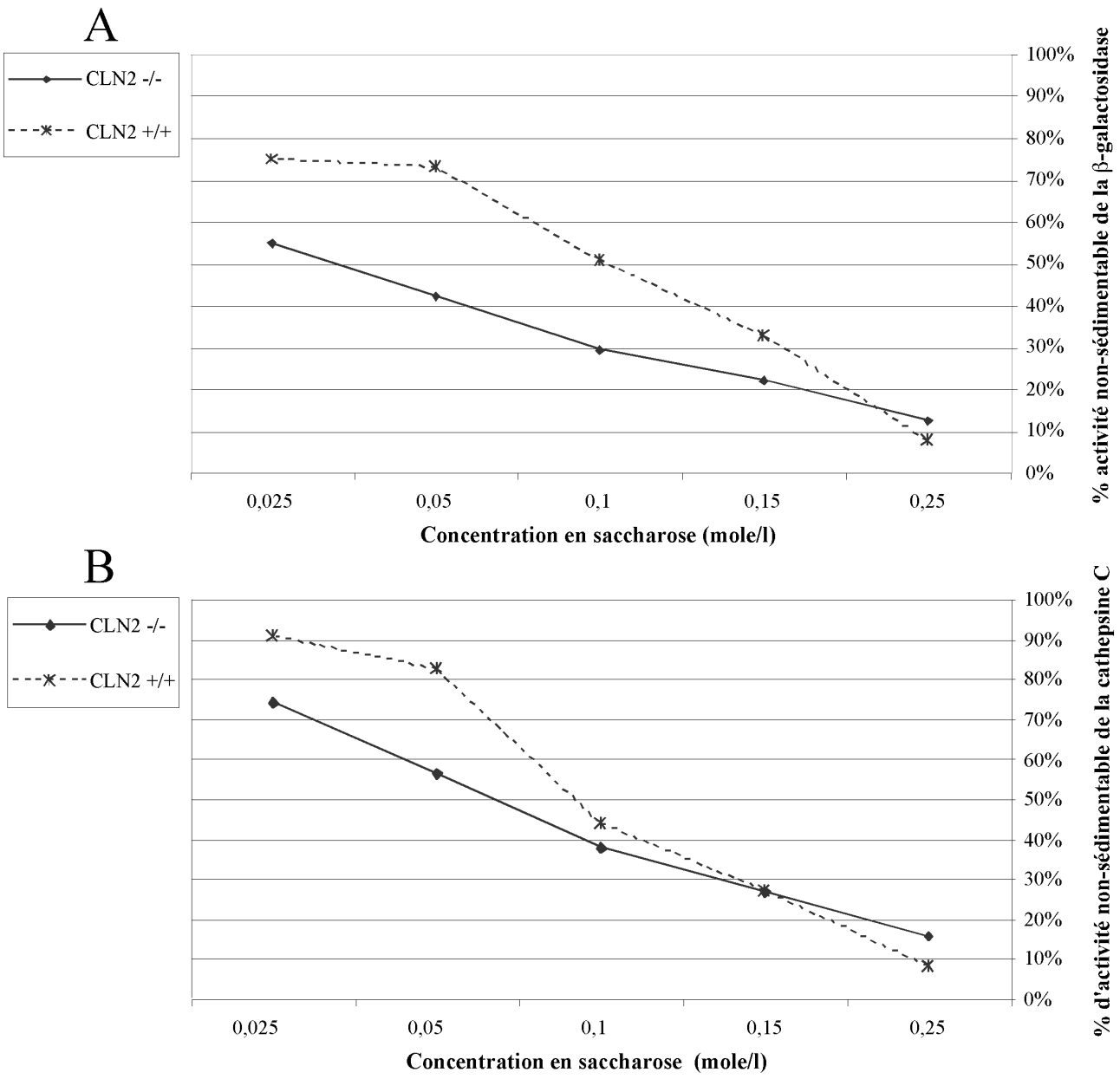

Figure 19 : Pourcentage d'activité non-sédimentable d'une fraction mitochondriale totale ML provenant de foie de souris CLN2 -/-et +/+ soumise à des conditions d'osmolarité décroissante (de la droite vers la gauche). Une fraction ML obtenue à partir d'une centrifugation différentielle de foie de souris CLN2-/- et +/+ âgées de 120 jours, est resuspendue dans du saccharose d'osmolarité décroissante (0,25 M; 0,15 M; 0,1 M; 0,05 M; 0,025 M) avant d'être centrifugée à 39000 rpm dans un rotor « 50Ti » pendant 40 minutes. Les culots et surnageants obtenus sont recueillis et, l'activité enzymatique a été dosée dans les surnageants et les culots, en A: la βgalactosidase et en B: la cathepsine C.

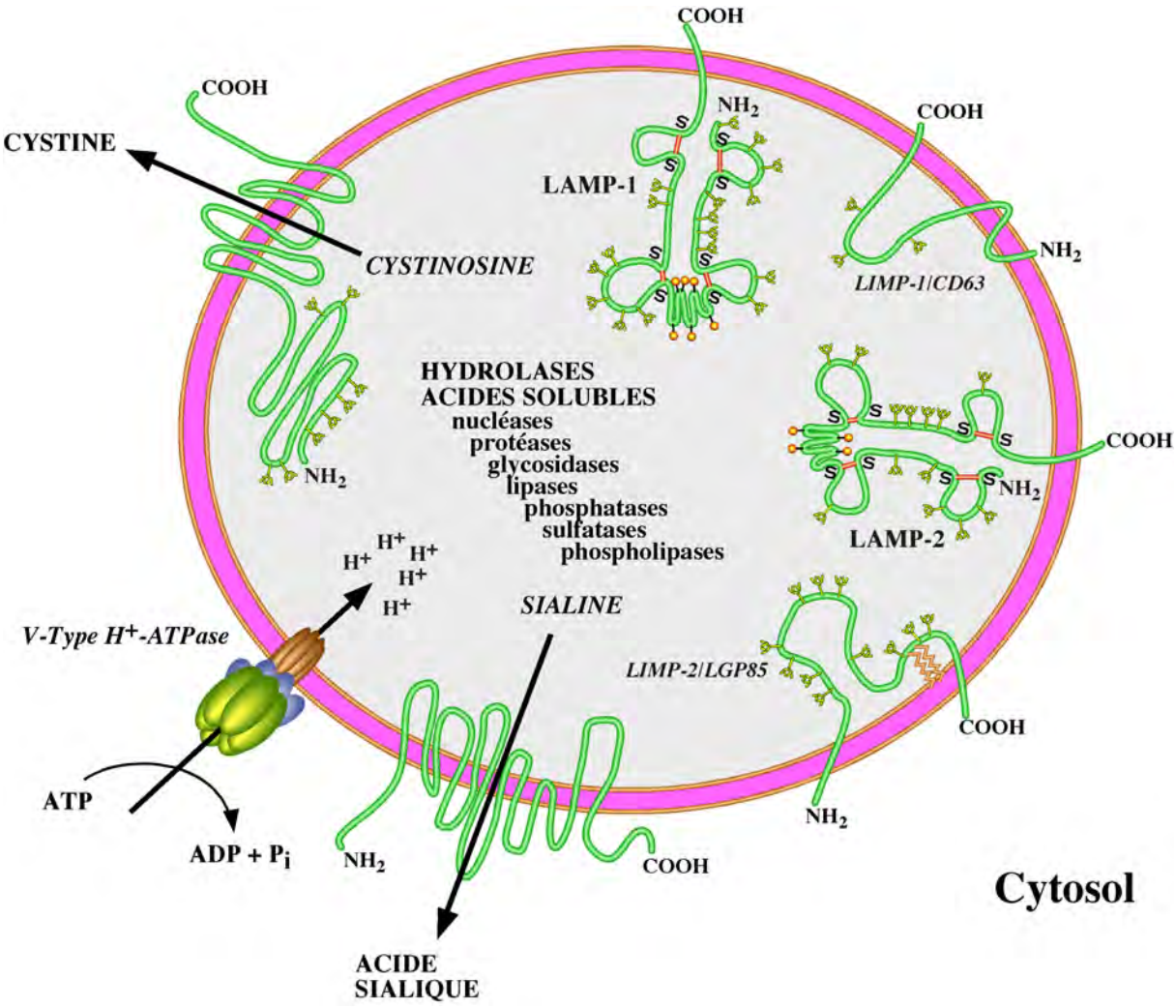

Figure 1: Les protéines de membrane lysosomale (d'après Eskelinen et al., 2003)
Schéma de la topologie des principales protéines membranaires lysosomales (LAMP-1, LAMP-2, LIMP-1 et LIMP-2). La pompe à protons vacuolaire, essentielle pour l'acidification de la lumière lysosomale et les transporteurs sialine et cystinosine sont également représentés. Les sites potentiels de N-glycosylation (en jaune) et de O-glycosylation (en orange) de ces protéines sont aussi indiqués.

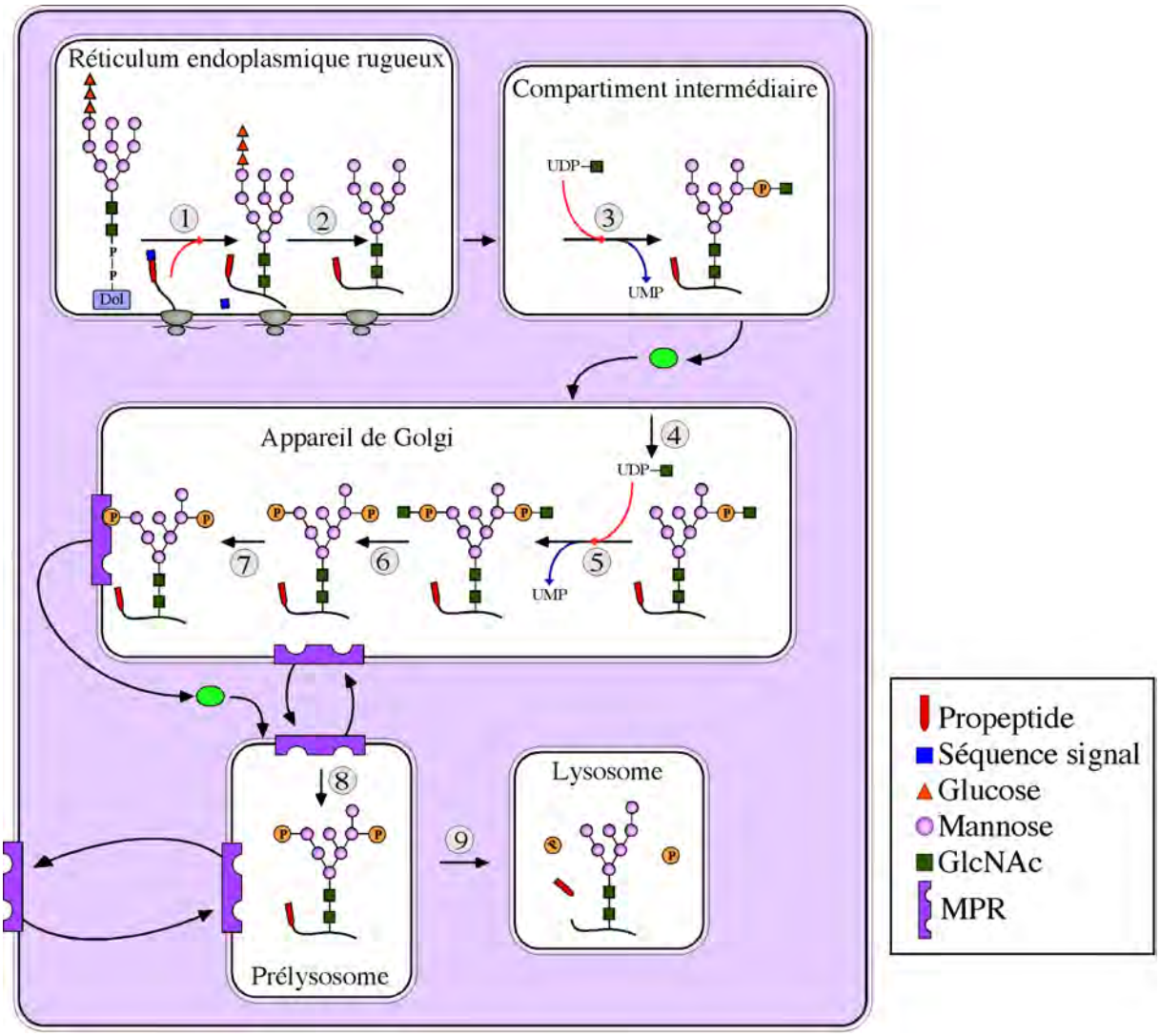

Figure 2: Représentation schématique des processus de maturation post-traductionnels des hydrolases acides nouvellement synthétisées au cours de leur transport vers les lysosomes

Au cours de leur synthèse, les enzymes lysosomales sont introduites de manière co-traductionnelle dans le réticulum endoplasmique (RE) via une séquence signal rapidement clivée. Un oligosaccharide préformé est transféré d'un dolichol pyrophosphate sur un résidu asparagine de la protéine naissante (étape 1). L'oligosaccharide de cette dernière va subir un élagage progressif des trois glucoses terminaux et d'un résidu mannose (étape 2). Lors de son passage vers le Golgi, une phosphotransférase va permettre le transfert d'un N-acétylglucosamine-1-phosphate (NAcGlc-1-P) sur des résidus mannose de l'oligosaccharide de cette nouvelle protéine. Cette enzyme peut modifier jusqu'à deux résidus mannose par chaîne oligosaccharidique (étapes 3 à 5). Au niveau du TGN, une enzyme de "démasquage" (N-acétylglucosamine-1-phosphodiester α-N-acétylglucosaminidase) rompt la liaison entre le N-acétylglucosamine et le phosphate, dévoilant ainsi les motifs Man 6-P (étape 6). C'est à ce niveau que le signal Man 6-P est reconnu par son récepteur. Cette liaison va permettre le transport de la nouvelle hydrolase vers le compartiment endosomal (étape 7). Dans ce compartiment, le complexe ligand récepteur va se dissocier dû au faible pH, et le MPR va être recyclé vers le Golgi (étape 8). Par la suite, les enzymes lysosomales sont transférées vers les lysosomes.

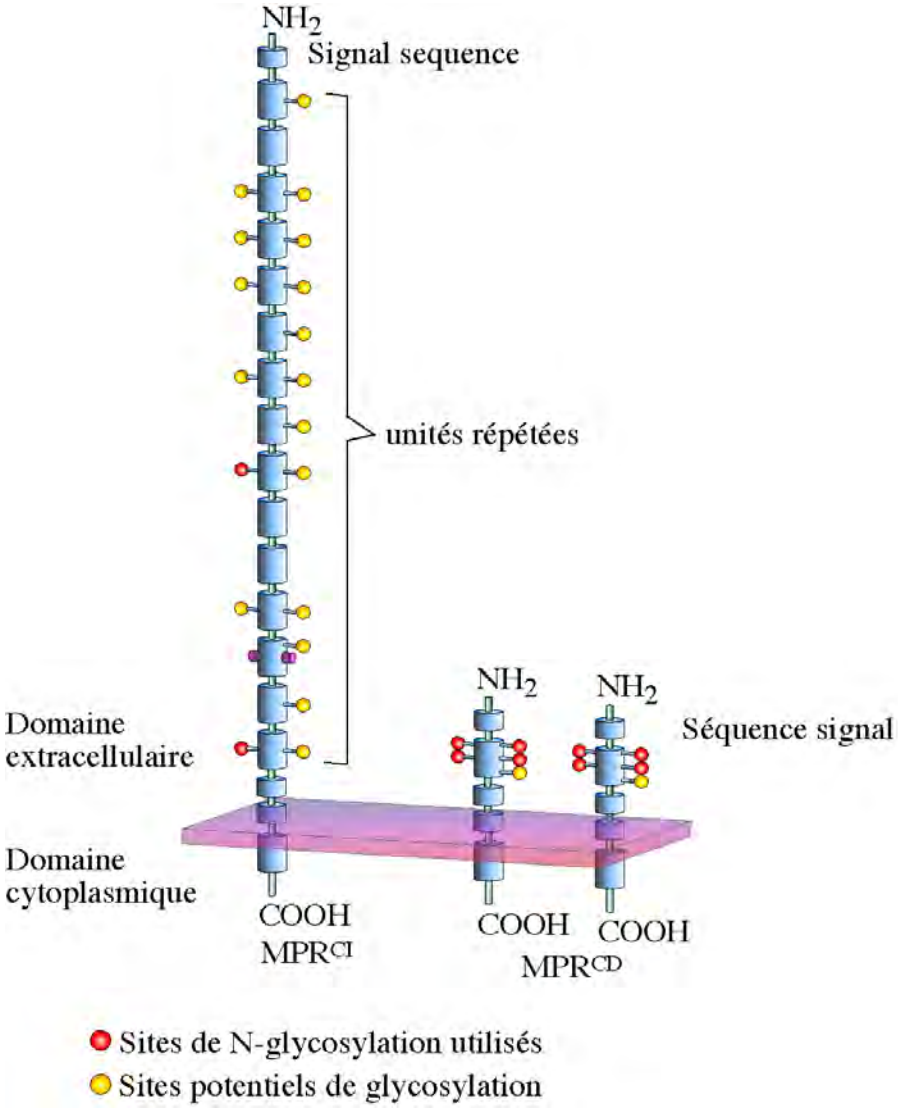

Figure 3: Structures des récepteurs du mannose 6-phosphate
Schématisation de la structure des récepteurs M6PR cation indépendant à gauche et M6PR cation dépendant à droite (d'après Kornfeld et al, 1989).

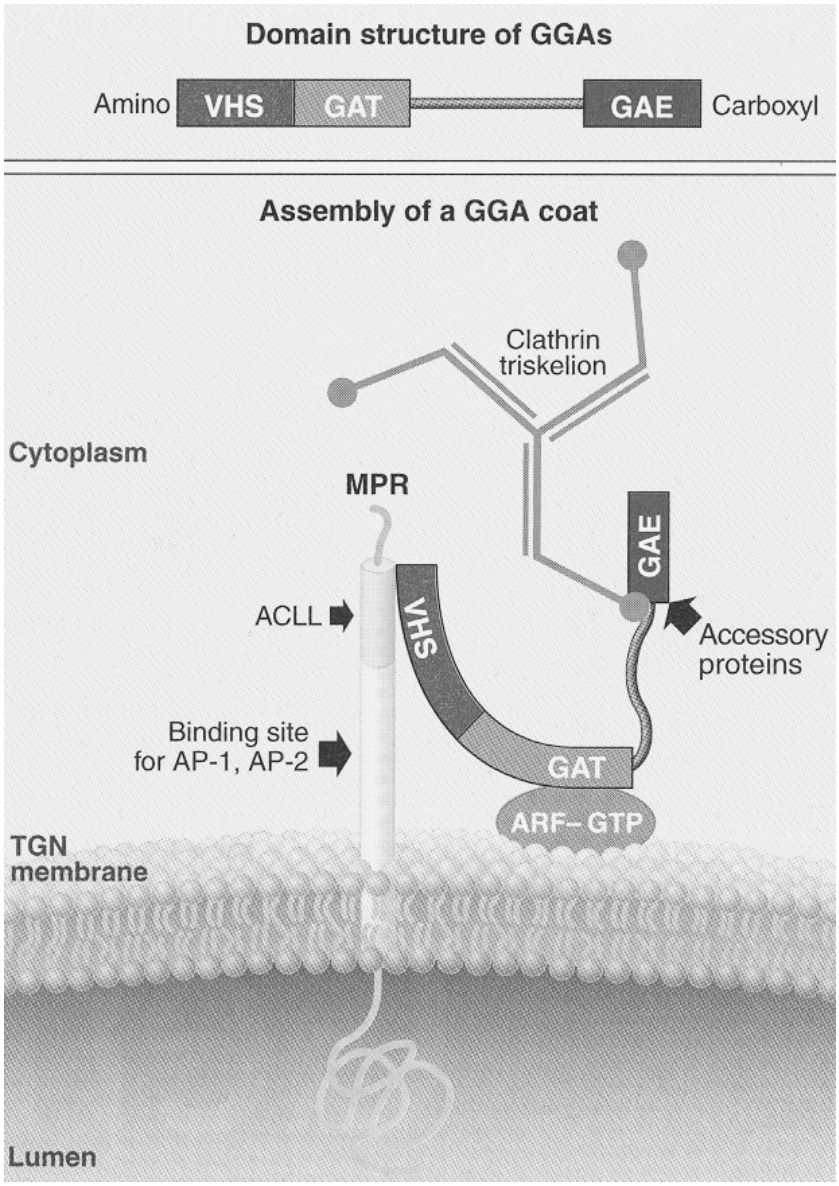

Figure 4: Structure et rôle des GGAs (d'après Tooze, 2001)
Les GGAs sont composées d'un domaine VHS, d'un domaine GAT et d'un domaine GAE. Le domaine GAT est lié au domaine GAE par une boucle flexible « hinge ». Le domaine GAT interagit avec une ARF-GTP (ADP-ribosylation factor-guanosine triphosphate), entraînant le recrutement des GGAs à la membrane du TGN. Via leur domaine VHS, les GGAs se lient au motif dileucine de l'extrémité amino-terminale des MPRs, qui sont des récepteurs cargo dans les membranes des vésicules bourgeonnantes du TGN. Les GGAs en membrane du TGN recrutent des clathrines via des motifs de liaison dans le « hinge » et le domaine GAE.

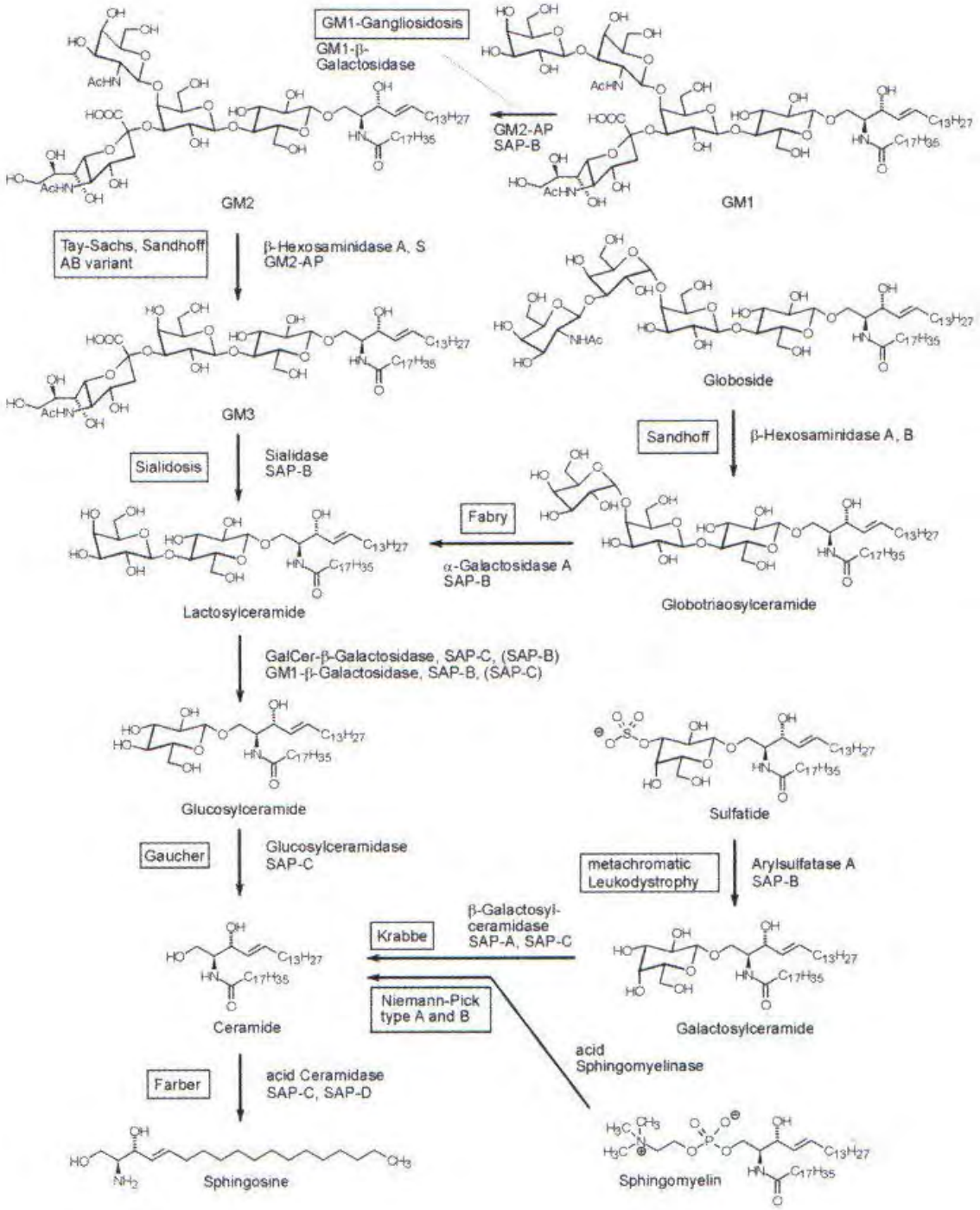

Figure 5: Dégradation lysosomale des glycosphingolipides

Les glycosphingolipides sont dégradés de manière séquentielle par différentes enzymes lysosomales. La déficience de ces enzymes peut entraîner des maladies de surcharge: les glycosphingolipidoses. Cette cascade montre les différentes étapes de dégradation des glycosphingolipides. En parallèle, elle indique la glycosphingolipidose qui survient en cas de déficience enzymatique (revu par Platt et al, 2004).

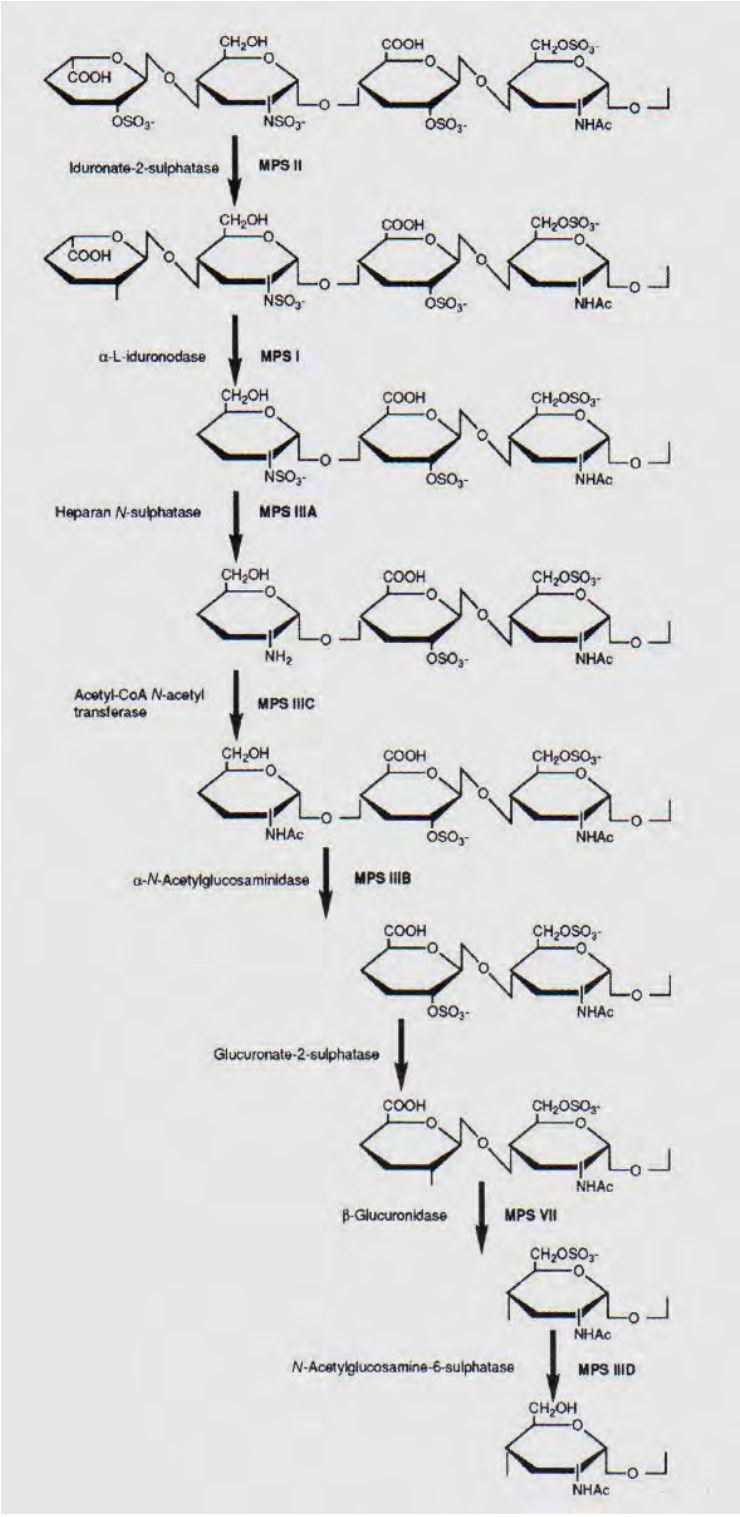

Figure 6: Catabolisme des glycosaminoglycans dans le lysosome

Les glycoaminoglycans (GAGs ou mucopolysaccharides) sont dégradés de manière séquentielle à partir de leur extrémité non-réduite, par des enzymes lysosomales. La déficience de ces enzymes peut entraîner des maladies de surcharge lysosomale : les mucopolysaccharidoses (MPS). Cette cascade montre les différentes étapes de dégradation des GAGs par les différentes enzymes. En parallèle, elle indique la MPS qui survient en cas de déficience enzymatique (revu par Platt et al, 2004).

Endopeptidases	
Classe	Nom
Cystéine protéinase	Cathepsine B
	Cathepsine H
	Cathepsine I
	Cathepsine L
	Cathepsine N
	Cathepsine S
	Cathepsine T
Aspartic protéinase	Cathepsine D
	Cathepsine E

Exopeptidases		
Classes	Site catalytique	Nom
Dipeptidylpeptidase	cystéine	dipeptidyl peptidase I
	sérine	dipeptidyl peptidase II
Tripeptidylpeptidase	sérine	tripeptidyl peptidase
Carboxy peptidase	sérine	carboxypeptidase lysosomale A
	sérine	lysosomal prolyl carboxypeptidase
	cystéine ?	tyrosine carboxypeptidase
	cystéine	carboxypeptidase lysosomale B
Dipeptidase	metallo-	lysosomal dipeptidase I
	cystéine	lysosomal dipeptidase II

Tableau 2: **Classification des enzymes protéolytiques lysosomales (d'après Glaumann et al, 1987).**

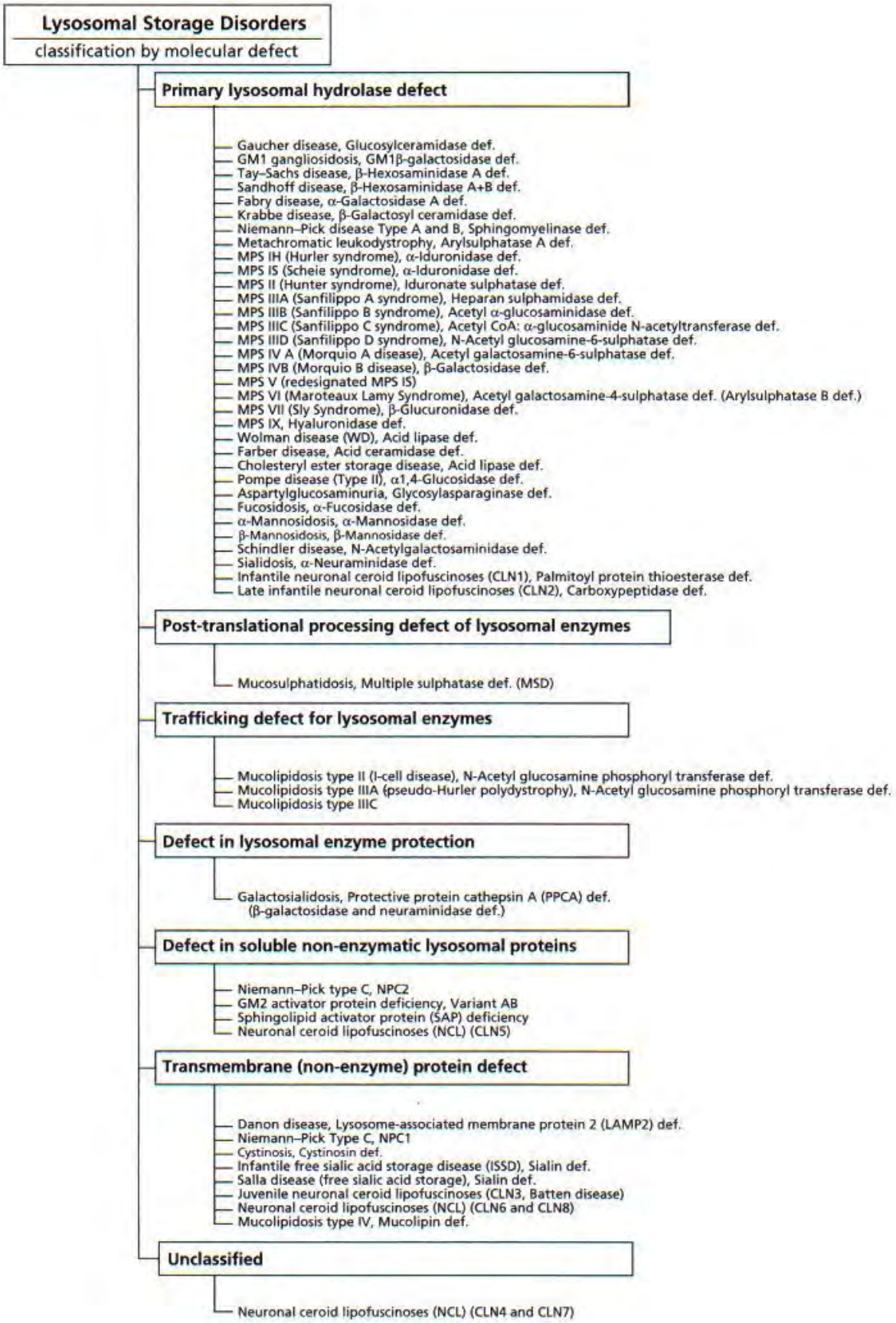

Tableau 4: Classification des maladies de surcharge lysosomale en fonction des déficiences moléculaires (revu par Platt et al, 2004).

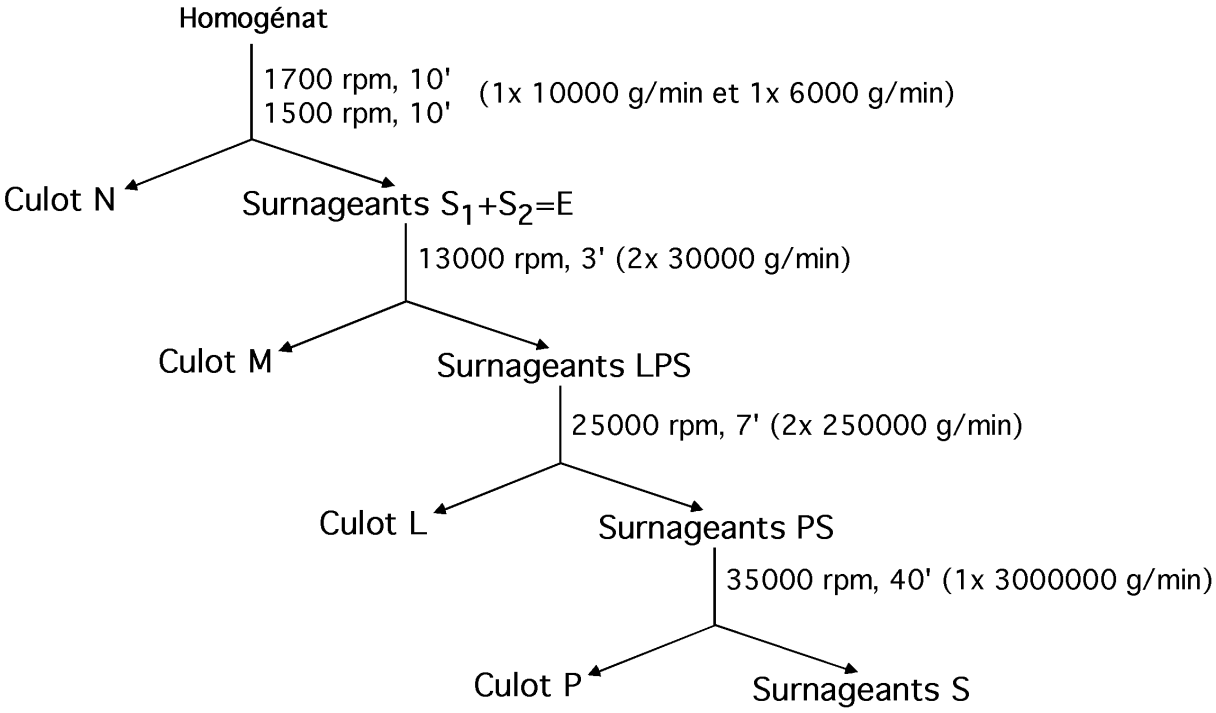

Figure 7: Schéma de fractionnement subcellulaire en centrifugation différentielle d'après de Duve et al., 1955.

PROTEASES	GLYCOSIDASES	NUCLEASES	LIPASES
Cathepsine D	Hyaluronidase	Ribonucléase II	Triacylglycérol lipase
Cathepsine B	Héparine Endoglucuronidase	Déoxyribonucléase II	Phospholipase A_1
Cathepsine H	Héparan Sulfate Endoglycosidase		Phospholipase A_2
Cathepsine L	Lysosyme	Exonucléase (5'-terminal)	Phosphatidate phosphatase
		Phosphatase acide	Acylsphingosine déacylase
Tripeptidyl peptidase	_-L-Fucosidase		Sphingomyéline phosphodiestérase
Dipeptidyl peptidase I	_-Galactosidase	Phosphodiestérase	
Dipeptidyl peptidase II	_-Galactosidase	Pyrophosphatase	
Arginyl aminopeptidase	_-Glucosidase	Nucléoside triphosphatase	
(Cathepsine H)	_-Glucosidase	Phosphoamidase	
Peptidyl dipeptidase C	_-N-acetylgalactosaminidase		
(Cathepsine B)	_-N-acetylglucosaminidase		
Carboxypeptidase A	_-N-acetylglucosaminidase		
Carboxypeptidase B	_-Glucuronidase		
Prolyl carboxypeptidase	_-L-Iduronidase		
Tyrosine carboxypeptidase	_-Mannosidase		
Dipeptidase I	_-Mannosidase		
Dipeptidase II	Neuraminidase		
	_-Aspartylglucosylaminase		
	Chondroïntine-6-sulfatase		
	Héparine sulfamatase		
	Iduronosulfatase		
	Sulfatase A et B		

Tableau 1. Les enzymes lysosomales (d'après Holtzman, 1989).

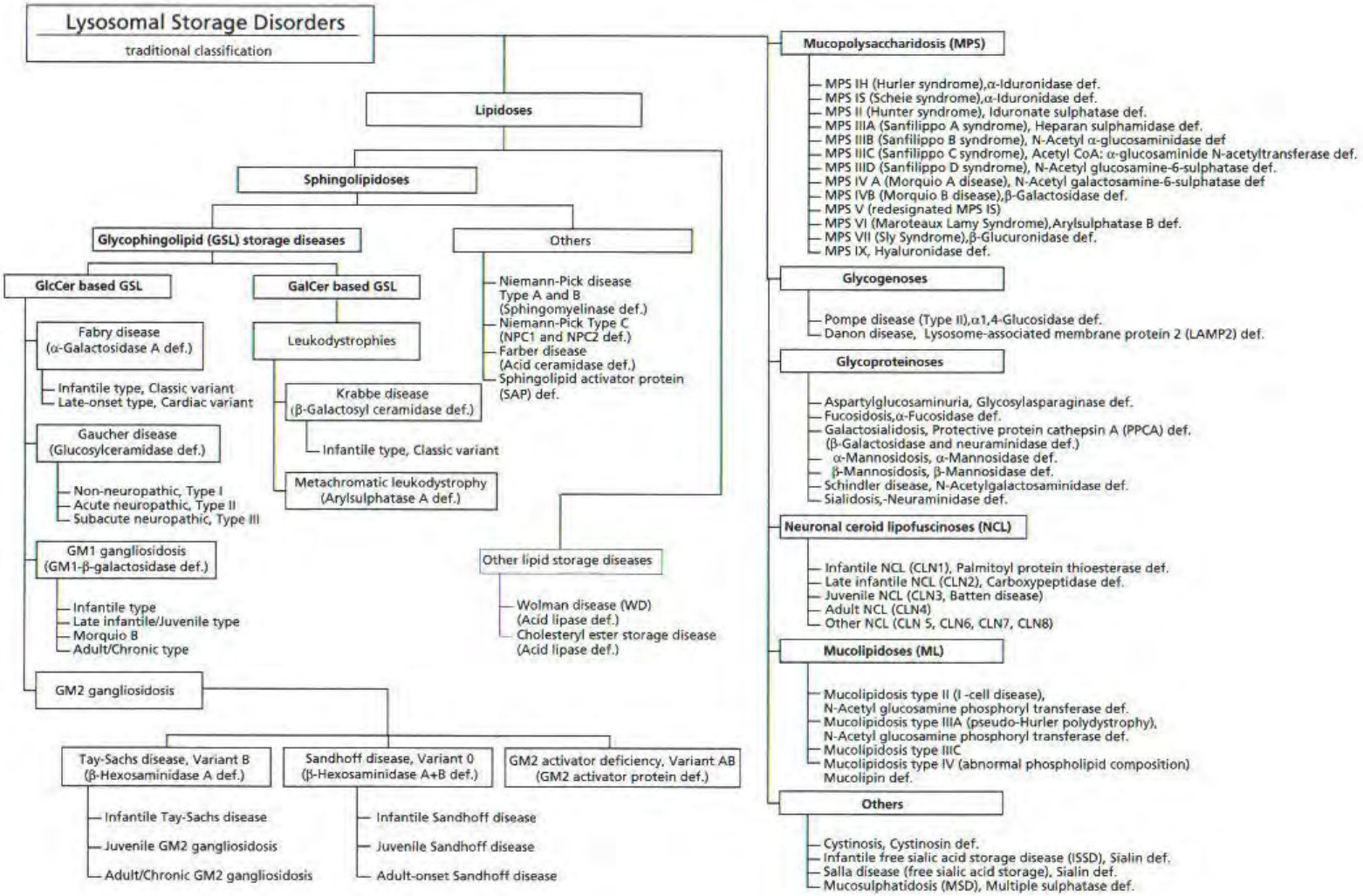

Tableau 3: Classification traditionnelle des maladies de surcharge lysosomale en fonction du matériel stocké (revu par Platt et al, 2004).