

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Mise au point d'un modèle cellulaire permettant de localiser une activité de déphosphorylation des enzymes lysosomales dans le foie de souris

Ton Nu, Caroline

Award date:
2005

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.

TABLE DES MATIERES

Introduction	5
1. Les lysosomes : description	5
1.1. Généralités	5
1.2. Fonctions.....	5
1.3. Les protéines lysosomales (figure 1)	6
1.3.1. Les protéines lysosomales solubles.....	6
1.3.2. Les protéines lysosomales membranaires	6
1.3.2.1. La membrane lysosomale : propriétés.....	6
1.3.2.2. Les protéines lysosomales membranaires (Eskelinen et al., 2003)	6
1.3.2.2.1. Les LAMPs.....	7
1.3.2.2.2. Les LIMPs	7
1.3.2.2.3. Les autres protéines membranaires lysosomales	7
2. Origine des protéines lysosomales.....	8
2.1. Les protéines lysosomales solubles	8
2.1.1. Maturation précoce des protéines	8
2.1.1.1. Biosynthèse et translocation co-translationnelle dans le RER.....	8
2.1.1.2. Glycosylation des hydrolases acides	9
2.1.1.3. Acquisition du signal mannose-6-phosphate	9
2.1.2. Transport des protéines vers le compartiment endolysosomal.....	10
2.1.2.1. Transport dépendant du mannose-6-phosphate.....	10
2.1.2.1.1. Les récepteurs du M6P : localisation, fonctions et structure (figure 4).....	10
2.1.2.1.2. Spécificité de la liaison aux récepteurs M6P.....	11
2.1.2.1.3. Transport vésiculaire vers le compartiment endolysosomal.....	12
2.1.2.1.4. Arrivée des vésicules de transport au compartiment accepteur.....	12
2.1.2.1.5. Dissociation du complexe ligand/MPR et recyclage des MPRs.....	13
2.1.2.2. Transport indépendant du mannose-6-phosphate.....	13
2.1.3. Maturation tardive des protéines	14
2.1.3.1. Clivage protéolytique des proenzymes	14
2.1.3.2. Déphosphorylation des chaînes oligosaccharides haut-mannose.....	15
2.2. Les protéines lysosomales membranaires.....	15
2.2.1. Les motifs d'adressage : généralités (Bonifacino and Traub, 2003)	16
2.2.2. Rôle des motifs d'adressage	16

2.3. Biogenèse des lysosomes	16
3. Cadre du mémoire	17
3.1. Etudes antérieures	17
3.1.1. Taux d'enzymes lysosomales-M6P élevé dans le cerveau de rat	17
3.1.2. Localisation des glycoprotéines-M6P dans le cerveau de rat	18
3.2. Objectifs et stratégies	19
3.2.1. Objectifs	19
3.2.2. Stratégies	19
3.2.2.1. Modèle cellulaire	19
3.2.2.2. Source d'activité de déphosphorylation	19
3.2.2.3. Caractérisation de l'activité mannose-6-phosphatase	19
Matériel et méthodes	20
1. Culture cellulaire	20
1.1. Matériel	20
1.2. Repiquage des cellules	20
2. Fractionnement cellulaire	20
2.1. La centrifugation : généralités	20
2.2. Centrifugation différentielle	21
2.3. Centrifugation isopycnique	22
3. Colonne de chromatographie d'affinité porteuse du MPR	22
3.1. Principe	22
3.2. Incubation des cellules	23
3.2.1. Préparation des cellules	23
3.2.2. Préparation des échantillons à déposer sur cellules	23
3.2.2.1. Choc osmotique	23
3.2.2.2. Endoglycosidase H	23
3.2.2.3. Chauffage d'une fraction L	23
3.3. Préparation d'un lysat des cellules N1E115	23
3.4. Matériel	23
3.5. Méthode	24
4. Dosage des enzymes de référence	25
4.1. Principe	25
4.1.1. Fractionnement cellulaire	25
4.1.2. Colonne MPR	25

4.2. Méthode	26
5. Western Blotting	26
5.1. Electrophorèse sur gel polyacrylamide	26
5.1.1. Principe.....	26
5.2.2. Matériel et méthode.....	27
5.2. Transfert des protéines sur une membrane de PVDF	27
5.2.1. Matériel	27
5.2.2. Méthode.....	27
5.2.2.1. Transfert des protéines sur une membrane PVDF	27
5.2.2.2. Incubation de la membrane avec les anticorps et révélation	28
Résultats et discussions	29
1. Mise au point d'un modèle pour l'étude de l'activité mannose-6-phosphatase	29
1.1. Comparaison du taux d'enzymes lysosomales-M6P dans le foie et le cerveau.....	29
1.2. Détermination du taux d'enzymes lysosomales-M6P dans les cellules N1E115	29
2. Localisation de l'activité mannose-6-phosphatase dans le foie de souris	30
2.1. Préparation d'une source d'activité mannose-6-phosphatase : fractionnement de foie de souris.....	30
2.1.1. Fractionnement de foie de souris.....	30
2.1.2. Détection d'une activité de déphosphorylation dans une fraction MLP de foie de souris	31
2.2. Localisation de l'activité de déphosphorylation dans les fractions M, L et P de foie de souris	32
2.3. Localisation de l'activité de déphosphorylation dans la fraction ML : effet d'une injection de Triton	34
2.3.1. Centrifugation isopycnique sur gradient de saccharose	34
2.3.2. Incubation des fractions du gradient saccharose sur cellules N1E115	35
2.4. Localisation intralysosomale de la mannose-6-phosphatase	36
3. Caractérisation de l'activité mannose-6-phosphatase.....	36
3.1. Effet du chauffage sur l'activité de déphosphorylation	36
3.2. Détermination du point isoélectrique de la mannose-6-phosphatase	37
3.3. <i>Pulse-chase</i> de la fraction L sur les cellules N1E115	37
3.4. Effet de la déglycosylation des enzymes lysosomales-M6P sur leur liaison avec le MPR	38
3.4.1. Effet de l'endoglycosidase H	38
3.4.2. Etude de la déglycosylation de LAMP-1 en <i>Western Blot</i>	38
3.5. Comparaison de l'activité mannose-6-phosphatase dans le foie et le cerveau	39

Discussion générale et perspectives.....	40
1. Discussion générale	40
2. Perspectives.....	43
Références bibliographiques.....	44

INTRODUCTION

1. LES LYSOSOMES : DESCRIPTION

1.1. Généralités

Les lysosomes sont des organites subcellulaires limités par une membrane unique et contenant essentiellement des hydrolases acides. Ils sont considérés comme le site final de la dégradation dans la cellule.

Les lysosomes furent découverts par le professeur de Duve et son équipe en 1949 (de Duve, 1959). Alors que ceux-ci cherchaient à mesurer dans un homogénat frais de foie l'activité d'une enzyme, la phosphatase acide, celle-ci s'est révélée pratiquement indécélable. Mais après avoir congelé leurs échantillons et répété les dosages après décongélation, l'activité de la phosphatase acide avait radicalement augmenté. Cette « latence » de la phosphatase acide a amené de Duve à supposer que l'enzyme présente dans la préparation fraîche de foie était cachée et inaccessible à son substrat par une barrière de type membranaire, qui serait rompue lors des congélations et décongélation (Bowers, 1998). De semblables observations pour d'autres hydrolases acides ont mené au concept de lysosomes, car ces particules contiennent finalement des enzymes remplissant des fonctions lytiques.

Peu de temps après, leur observation par microscopie électronique révéla que ces organites denses aux électrons étaient très diversifiés en forme et taille (Holtzman, 1989). Ainsi, leur diamètre varie de 0,05 à 0,5 μm . Cette hétérogénéité morphologique contraste avec la relative uniformité de structure de la plupart des autres organites. Cette diversité reflète les nombreuses fonctions digestives médiées par les hydrolases acides, et ce sur des matériaux à dégrader très divers. Les lysosomes constituent donc un ensemble d'organites de morphologie hétérogène mais qui possèdent en commun un contenu riche en enzymes hydrolytiques.

1.2. Fonctions

Les lysosomes sont considérés comme le site intracellulaire principal et final de dégradation. En ce sens, ils constituent la destination finale de la majorité des matériaux endocytés (Mukherjee et al., 1997) et autophagocytés (Lawrence and Brown, 1992), destinés à la dégradation. Ainsi, les principales classes de macromolécules telles les protéines, les lipides, les hydrates de carbone et les acides nucléiques sont dégradés en composés qui pourront à nouveau être réutilisés par la cellule (de Duve and Wattiaux, 1966).

Toutefois, les lysosomes ne sont pas réduits à la seule fonction de dégradation proprement dite : ils sont également critiques pour beaucoup de processus physiologiques tels que le *turn-over* des protéines cellulaires normales, l'élimination des protéines anormales, le recyclage des récepteurs de surface et l'homéostasie du cholestérol cellulaire. Dans ce dernier cas, le cholestérol lié au LDL plasmatique est endocyté, et dans les lysosomes, il sera hydrolysé en cholestérol libre qui va ensuite être transféré vers la membrane plasmique (Goldstein et al., 1975). Les lysosomes jouent également un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique. Suite à une disruption de celle-ci, les lysosomes interviendraient, en collaboration avec des éléments du cytosquelette, dans sa reconstitution selon l'« hypothèse du patch » émise par McNeil (McNeil, 2002).

De manière plus spécifique, les lysosomes sont impliqués dans le remodelage des os (la cathepsine K et la phosphatase acide pourpre sont des enzymes lysosomales qui interviennent dans l'hydrolyse de protéines de la matrice extracellulaire osseuse) (Saftig et al., 2000), la maturation des prohormones (la prohormone thyroglobuline stockée dans la lumière des follicules thyroïdiens subit déjà une protéolyse extracellulaire par la cathepsine K qui conduit à la libération de la thyroxine, avant d'être endocytée pour subir une dégradation complète et libérer la triiodothyronine) (Tepel et al., 2000), des micro-organismes pathogènes endocytés, le processing et la maturation des antigènes (des protéases interviennent dans la formation ou la dégradation d'épitopes antigéniques dans les compartiments endocytaires) (Watts, 2001) et la sécrétion régulée des cellules hématopoïétiques (les cellules dérivées de la lignée hématopoïétique utilisent les lysosomes pour stocker et libérer leur produit de sécrétion) (Stinchcombe and Griffiths, 1999).

Signalons, enfin, que l'importance physiologique des lysosomes est évidente par le nombre important de maladies résultant d'une déficience dans leur fonctionnement ou leur biogenèse.

1.3. Les protéines lysosomales (figure 1)

1.3.1. Les protéines lysosomales solubles

On connaît à ce jour une cinquantaine d'hydrolases solubles capables d'hydrolyser toute une série de substrats différents. Parmi les enzymes lysosomales, citons principalement les protéases, les nucléases, les glycosidases et les lipases (tableau 1).

L'espace intérieur des lysosomes est maintenu à un pH considérablement plus acide (entre 5,2 et 5,5) que celui du cytosol et du milieu extracellulaire, ce qui correspond au pH optimal d'activité des hydrolases acides.

1.3.2. Les protéines lysosomales membranaires

1.3.2.1. La membrane lysosomale : propriétés

La membrane constitue, avant tout, une barrière résistante qui protège les autres structures cellulaires de la dégradation par les hydrolases acides.

Le pH intralysosomal est maintenu entre 5,2 et 5,5 grâce à un complexe protéique membranaire qui consiste en une pompe à protons électrogène appelée « pompe à protons vacuolaire » ou « H⁺-ATPase de type V ». Cette pompe à protons utilise l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP afin de pomper les ions H⁺ dans la lumière du lysosome (Forgac, 1999).

La composition particulière en lipides de la membrane lui confère une protection vis-à-vis de l'autodigestion. Elle est essentiellement constituée de phospholipides, majoritairement la phosphatidylcholine. Des sphingomyélines sont également présentes (8-18 % des phospholipides). Ce qui distingue la constitution des membranes lysosomales des membranes « classiques » est leur haute teneur en dolichol (Wong et al., 1982) et en cholestérol (Schoer et al., 2000). De plus, la membrane lysosomale possède un taux particulièrement élevé en bismonoacylglycéryl phosphate, un phospholipide particulier qui représente 4 à 23 % des phospholipides de la membrane lysosomale.

1.3.2.2. Les protéines lysosomales membranaires (Eskelinen et al., 2003)

La membrane lysosomale est enrichie en glycoprotéines intégrales que l'on appelle LAMPs (*Lysosome Associated Membrane Proteins*) et LIMPs (*Lysosome Integral Membrane Proteins*). Elles représentent 50 % de la totalité des protéines membranaires des lysosomes.

1.3.2.2.1. Les LAMPs

LAMP-1 et LAMP-2 possèdent dans leur structure primaire une séquence signal de ciblage vers le réticulum endoplasmique (RE), clivable et distincte de la séquence d'insertion (Goder and Spiess, 2001). Elles possèdent un poids moléculaire allant de 90 à 120 kDa, et un domaine luminal qui est séparé d'une courte queue cytoplasmique par une région transmembranaire unique. Le domaine luminal de ces protéines est abondamment glycosylé. En effet, les hydrates de carbone constituent 60 % du poids moléculaire de ces protéines membranaires. Cette glycosylation élevée pourrait servir à protéger la membrane lysosomale de la digestion par les hydrolases acides (Kundra and Kornfeld, 1999).

Le rôle des LAMPs n'est pas encore bien défini. Cependant, des souris déficientes en LAMP-1 sont viables et fertiles, et une surexpression compensatoire traductionnelle de LAMP-2 est observée (Andrejewski et al., 1999), ce qui suggère que les fonctions de LAMP-1 et LAMP-2 puissent être redondantes.

Contrairement à une déficience en LAMP-1, la déficience en LAMP-2 provoque des symptômes plus sévères (Tanaka et al., 2000). Les souris meurent à l'âge de 20 à 40 jours avec une accumulation massive de vacuoles autophagiques dans le tissu rénal, pancréatique, musculaire et cardiaque. De plus, il semblerait qu'une déficience de LAMP-2 dans les hépatocytes de ces souris mène à un recyclage moins efficace du MPR-CD du compartiment endosomal vers le TGN (*Trans Golgi Network*) et donc à une diminution de l'apport en enzymes lysosomales nouvellement synthétisées. Les voies endocytaires et autophagiques se rejoignant, l'accumulation de vacuoles autophagiques serait expliquée par une déficience dans la dégradation lysosomale (Eskelinen et al., 2002).

La double déficience LAMP-1/LAMP-2 conduit, quant à elle, à une létalité embryonnaire. Les fibroblastes isolés de ces animaux présentent également une accumulation de vacuoles d'autophagie, des anomalies de localisation et de morphologie des lysosomes avec un déséquilibre dans leur composition en protéines lysosomales, et une perturbation dans le métabolisme du cholestérol (Eskelinen et al., 2004).

1.3.2.2.2. Les LIMPs

LIMP-1 et LIMP-2, sont des glycoprotéines membranaires qui sont insérées dans la membrane intracellulaire par une séquence signal NH₂-terminale non clivable et par un court domaine C-terminal. Elles sont également hautement glycosylées. Le poids moléculaire de LIMP-1 et LIMP-2 est respectivement de 35-55 et 60-85 kDa, et le nombre de leurs domaines transmembranaires est respectivement de 4 et 2.

On ne connaît pas encore précisément le rôle des LIMPs. Une surexpression de LIMP-2 cause un accroissement des compartiments endolysosomaux et une perturbation du trafic à partir des compartiments endolysosomaux. De plus, cette surexpression serait en partie la cause d'une accumulation de cholestérol dans ces compartiments. LIMP-2 jouerait un rôle clé dans la régulation du compartiment endolysosomal, probablement en interagissant avec la machinerie moléculaire de régulation des mécanismes de fusion ou fission vésiculaire (Kuronita et al., 2002).

1.3.2.2.3. Les autres protéines membranaires lysosomales

Il existe d'autres protéines membranaires moins abondantes mais qui médient des fonctions essentielles telles que la translocation vers le cytosol des acides aminés, des acides gras et des hydrates de carbone.

Bien qu'une vingtaine d'activités de transport différentes aient été caractérisées, leur identification moléculaire n'est pas encore connue, de même que le mécanisme et la voie de transport qui leur permet d'arriver aux lysosomes. Cependant, la cystinosine et la sialine sont les

seules, jusqu'à ce jour, à avoir été identifiées d'un point de vue moléculaire. La cystinosine transporte la cystine (un produit de la dégradation lysosomale des protéines) vers le cytosol (Kalatzis et al., 2001). La sialine est un transporteur de l'acide sialique (produit de dégradation lysosomale des glycoprotéines, des glycosaminoglycanes et des glycolipides) (Havelaar et al., 1999).

Pour terminer, signalons l'existence de protéines membranaires intervenant dans le trafic des vésicules de transport et dans la fusion de ces vésicules avec leur compartiment d'adressage : les SNAREs [*N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein (SNAP) receptor*]. Elles possèdent un seul domaine transmembranaire et sont insérées dans la membrane par une séquence signal localisée à leur extrémité C-terminale. Elles sont donc exposées dans leur quasi totalité dans le cytosol. Citons comme exemples : SNAP-25, la syntaxine 1 et VAMP (*vacuolar associated membrane protein*). L'intervention et le rôle de ces protéines dans la voie de transport vers les lysosomes seront abordés en détail ultérieurement.

2. ORIGINE DES PROTEINES LYSOSOMALES

Les lysosomes sont incapables de synthétiser eux-mêmes les protéines qui les constituent. C'est pourquoi il leur faut un apport constant de protéines lysosomales, particulièrement dans le cas de l'expansion du compartiment lysosomal lors de divisions cellulaires et dans le cas du remplacement des protéines perdues lors du *turnover*.

2.1. Les protéines lysosomales solubles

Au cours de leur biosynthèse, les hydrolases solubles reçoivent dans le Golgi un résidu mannose-6-phosphate (M6P) qui sera reconnu par des récepteurs spécifiques au niveau du TGN. Ceux-ci permettent le transport des enzymes lysosomales du Golgi vers un compartiment pré-lysosomal. Ceci a été démontré pour la première fois par des études biochimiques en 1977 (Kaplan et al., 1977).

Le ciblage des hydrolases acides passe par trois étapes indispensables (Gabel, 1992) :

- 1) L'addition spécifique du M6P sur les hydrolases acides.
- 2) La reconnaissance du signal M6P par son récepteur (MPR).
- 3) Le transport ciblé du complexe hydrolases acides-M6P/récepteur vers les lysosomes.

2.1.1. Maturation précoce des protéines

2.1.1.1. Biosynthèse et translocation co-traductionnelle dans le RER

La synthèse des hydrolases acides commence, comme pour toutes les protéines, dans le cytoplasme. Dans un second temps, ces enzymes lysosomales, au même titre que les protéines solubles sécrétées et membranaires, seront introduites dans la lumière du réticulum endoplasmique rugueux (RER). La translocation est assurée par la présence, à l'extrémité N-terminal de la chaîne peptidique naissante, d'une séquence signal peptidique reconnue par la SRP (*Signal Recognition Particle*) qui va médier la liaison de la protéine à la machinerie d'importation. La séquence signal sera clivée dès son introduction dans la lumière du RER. La séquence signal des hydrolases acides est identique à celle des protéines membranaires et solubles de la voie de sécrétion.

2.1.1.2. Glycosylation des hydrolases acides

Parallèlement au clivage de leur peptide signal, les hydrolases acides sont glycosylées dès leur entrée dans la lumière du RER par l'addition, sur un résidu asparagine, d'un oligosaccharide qui a été préformé sur un dolichol (Hirschberg and Snider, 1987) (étape 1, [figure 2](#)). Ce résidu asparagine fait partie d'un tripeptide de type Asn-X-Ser/Thr, où X est un acide aminé quelconque, suivi d'un résidu sérine ou thréonine.

L'oligosaccharide, de type haut-mannose, est identique pour toutes les protéines qui pénètrent dans le RER ([figure 3](#)). Il contient une branche principale, formée de deux résidus N-acétylglucosamine. De celle-ci part une arborescence de 8 mannoses répartis sur les deux branches $\alpha 1,3$ et $\alpha 1,6$ qui sont réunies par un mannose, lui-même attaché à la branche principale par une liaison $\beta 1,4$. On trouve également trois glucoses à l'extrémité de la branche $\alpha 1,3$.

Une fois transféré sur la protéine nouvellement synthétisée, cet oligosaccharide subit différentes modifications post-traductionnelles pour aboutir à diverses structures finales, dont certaines seront propres aux lysosomes. Ces réactions ont lieu dans différentes régions de la voie de biosynthèse. La compartimentalisation des modifications post-traductionnelles est due à la localisation des enzymes qui les réalisent.

Dans le RE, l'oligosaccharide est déglucosylé par deux glucosidases distinctes (étape 2, [figure 2](#)). La glucosidase I enlève un premier glucose. Ensuite, la glucosidase II se charge d'hydrolyser séquentiellement les deux derniers résidus glucose de l'oligosaccharide. L'enlèvement en deux temps des deux derniers résidus glucose a pour fonction de permettre un repliement correct des protéines.

En plus des glucosidases, on retrouve également au niveau du RE une α -mannosidase qui enlève un résidu mannose.

2.1.1.3. Acquisition du signal mannose-6-phosphate

Les réactions précédemment décrites concernent l'oligosaccharide de toutes les glycoprotéines, qu'elles soient lysosomales ou non. La distinction entre les deux types de glycoprotéines se fera, par la suite, grâce à l'acquisition d'un résidu M6P sur les enzymes lysosomales. Celle-ci est réalisée séquentiellement sous l'action de deux enzymes distinctes.

Premièrement, une phosphotransférase transfère une N-acétylglucosamine-1-phosphate à partir d'une UDP-N-acétylglucosamine sur le carbone 6 d'un résidu mannose de la branche $\alpha 1,6$ de l'oligosaccharide, et ce via une liaison phosphodiester (étape 3, [figure 2](#)). Cette phosphotransférase agit exclusivement sur les enzymes lysosomales (Reitman and Kornfeld, 1981). Il est évident que la reconnaissance spécifique des enzymes lysosomales par la phosphotransférase est cruciale. En effet, l'oligosaccharide est identique pour toutes les protéines et la phosphotransférase doit reconnaître des hydrolases acides de structures très diverses. Il semble que des résidus lysine jouent un rôle important lors de la reconnaissance par la phosphotransférase. Cependant, aucune structure topogénique commune n'a encore été identifiée à ce jour (Yaghoofam et al., 2003). Selon une étude réalisée par Kornfeld et son équipe, le signal de reconnaissance est dépendant de la structure, et plus précisément, de la conformation tridimensionnelle de l'enzyme native. Les hydrolases acides possèdent vraisemblablement des domaines de reconnaissance qui doivent être agencés l'un par rapport à l'autre, de manière précise, à la surface de la protéine, afin d'être reconnus par la phosphotransférase (Lang et al., 1984).

Tout porte à croire que cette première phosphorylation a lieu dans un compartiment pré-golgien. Ainsi, après inhibition, dans des cellules de lymphome de souris, du transport du RE vers le Golgi des enzymes lysosomales nouvellement synthétisées, celles-ci sont malgré tout

phosphorylées (Lazzarino and Gabel, 1988). Des études basées sur la cinétique du processus de phosphorylation suggèrent que l'enzyme résiderait dans les éléments de transition du RE et/ou dans un compartiment membranaire proche du cis-Golgi. Une fois que l'enzyme lysosomale-M6P atteint le compartiment cis-Golgi, l' α -mannosidase I clive le résidu mannose terminal de la branche α 1,3 (étape 4, [figure 2](#)).

Une seconde phosphorylation de l'oligosaccharide peut avoir lieu un peu plus loin dans la voie de biosynthèse, au niveau du Golgi (étape 5, [figure 2](#)). Elle concerne pratiquement toujours le mannose de la branche α 1,3 de l'oligosaccharide. L'enzyme à l'origine de cette seconde phosphorylation est une phosphotransférase qui est propre au Golgi. Cette deuxième phosphorylation ne peut avoir lieu que si le résidu mannose terminal est au préalable enlevé de la branche α 1,3 de l'oligosaccharide. Les deux réactions de phosphorylation des hydrolases acides se font donc dans deux régions différentes de la voie de biosynthèse. La première phosphorylation a lieu dans un compartiment intermédiaire au RE et au Golgi, tandis que la seconde phosphorylation se passe dans le cis-Golgi (Dittmer et al., 1999).

La formation du signal M6P se termine par le biais d'une enzyme qui enlève le résidu N-acétylglucosamine, ce qui expose alors le résidu M6P qui se retrouve sous la forme d'un groupement phosphomonoester (étape 6, [figure 2](#)). La réaction est catalysée par la N-acétylglucosamine-1-phosphodiester α -N-acétylglucosaminidase, une phosphoglycosidase. Cette enzyme est localisée dans le TGN.

L'oligosaccharide de toutes les enzymes lysosomales n'est pas forcément phosphorylé une deuxième fois, ou encore, tout simplement phosphorylé. Cela dépend de l'enzyme ou du type de cellules concernés. Par exemple, seul 1/3 des oligosaccharides de la β -glucuronidase possède le signal mannose-6-phosphate, par contre, la chaîne oligosaccharidique unique de la cathepsine L est systématiquement pourvue du signal M6P (Braulke, 1996; Goldberg and Kornfeld, 1981).

Les oligosaccharides non-phosphorylés des hydrolases acides peuvent soit rester sous la forme haut-mannose, soit être transformés en unités complexes possédant des résidus terminaux contenant l'acide sialique (Hasilik and Von Figura, 1981).

2.1.2. Transport des protéines vers le compartiment endolysosomal

2.1.2.1. Transport dépendant du mannose-6-phosphate

Le M6P correspond à un signal de reconnaissance de haute affinité vis-à-vis des récepteurs qui médient la déviation des hydrolases acides de la voie de sécrétion et permettent leur adressage vers le compartiment endolysosomal. L'importance physiologique du signal M6P est clairement démontrée dans les cas de la maladie de type I-cell où l'activité phosphotransférase est déficiente, voire absente (Hasilik et al., 1981). Cette maladie est une affection rare où une déficience de la phosphotransférase conduit à l'absence du signal M6P sur les enzymes lysosomales. Celles-ci ne suivent plus la voie du M6P et sont alors sécrétées hors de la cellule. Des fibroblastes isolés de ces patients possèdent des lysosomes sans hydrolases acides, en conséquence de quoi ces organites sont engorgés de matériaux non-digérés.

2.1.2.1.1. Les récepteurs du M6P : localisation, fonctions et structure (figure 4)

A ce jour, deux récepteurs du M6P sont connus : le récepteur M6P cation-indépendant/récepteur de l'IGF-II (MPR-CI ou récepteur de l'*Insulin-like Growth Factor*), dont le poids moléculaire est de 300 kDa ou plus, et le récepteur M6P cation-dépendant (MPR-CD) dont le poids moléculaire est de 46 kDa. Tous deux sont des protéines de membrane avec un seul domaine transmembranaire. Leur distribution par immunolocalisation montre que les MPRs sont tous deux présents au niveau du TGN, des endosomes et de la membrane plasmique. Ces

compartiments étant impliqués dans la voie de biosynthèse des enzymes lysosomales, c'est un élément pour dire que les MPRs interviennent tous deux dans la voie de transport des hydrolases acides. Notons que ces récepteurs sont absents au niveau des lysosomes (Ghosh et al., 2003).

Ces deux récepteurs ont en commun la tâche de délivrer les hydrolases acides nouvellement synthétisées du TGN au compartiment endolysosomal. Ce processus implique la liaison des hydrolases à leur récepteur par la reconnaissance du M6P, le rassemblement et la concentration des complexes récepteur-ligand dans des vésicules de transport qui transporteront l'ensemble jusqu'au compartiment endolysosomal. Dans différents types cellulaires déficients en MPRs, l'hypersécrétion d'enzymes lysosomales n'est pas complètement compensé après ré-expression d'un des deux récepteurs, ce qui indique que les MPRs ont des fonctions complémentaires dans le transport des hydrolases acides et que pour avoir un transport des enzymes lysosomales efficient, l'expression des deux types de MPRs est requis (Munier-Lehmann et al., 1996). En outre, bien qu'ils co-localisent au niveau des endosomes, les deux types de récepteurs semblent être distribués dans des sous-populations endosomales distinctes. Notons que l'abondance relative des deux MPRs varie en fonction du type cellulaire et du tissu concerné (Klumperman et al., 1993).

Le MPR-CI est impliqué dans d'autres processus physiologiques. Ainsi, à la surface cellulaire, celui-ci assure l'internalisation des hydrolases acides sécrétées. En effet, une quantité variable d'hydrolases acides solubles possédant le signal M6P échappe à la reconnaissance par leurs récepteurs, et suit donc la voie de sécrétion. Une partie de ces enzymes sera alors récupérée via l'endocytose médiée par les MPRs-CI et acheminée vers les lysosomes. Le MPR-CI peut également lier l'IGF II (*Insulin-like Growth Factor II*), une hormone de croissance mitogénique, à la surface de la cellule et l'internaliser afin de la dégrader. En effet, un excès de ce facteur de croissance est nuisible, surtout lors de la période de développement embryonnaire (Kieiss et al., 1988). Par ailleurs, le MPR-CI facilite l'activation du précurseur TGF- β_1 (*Transforming Growth Factor β_1*) (Dennis and Rifkin, 1991), un inhibiteur de croissance des cellules impliquées dans l'apoptose induit par les cellules T cytotoxiques. Il semblerait que le MPR-CI remplit également la fonction de suppresseur de tumeur, probablement par le biais de ses fonctions d'inhibiteur de croissance (Ghosh et al., 2003).

Les récepteurs sont constitués de 4 domaines (figure 4) : une séquence signal qui est clivée après translocation dans le RER, un grand domaine extracytoplasmique, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique (Ghosh et al., 2003). Le domaine extracytoplasmique du MPR-CI possède 15 domaines de répétition de 147 acides aminés qui partagent 14 à 38 % d'identité (Dahms et al., 1987). L'unique domaine extra-cytoplasmique de 157 acides aminés du MPR-CD est apparenté aux domaines de répétitions du MPR-CI. La dimérisation des récepteurs permet une liaison de haute affinité avec des enzymes lysosomales porteuses de plusieurs motifs M6P (Byrd and MacDonald, 2000; Byrd et al., 2000). Le domaine transmembranaire et le domaine cytoplasmique des récepteurs ne présentent pas d'homologie. Leur queue cytoplasmique est dotée d'un grand nombre de motifs d'adressage qui peuvent être modifiés par phosphorylation ou palmitoylation (Meresse et al., 1990).

2.1.2.1.2. Spécificité de la liaison aux récepteurs M6P

Les deux MPRs lient spécifiquement tous les enzymes lysosomales porteuses du signal M6P, mais les différents types d'enzymes porteurs du signal M6P ne se lient pas avec la même affinité à leurs récepteurs.

Tout d'abord, la composition des oligosaccharides des hydrolases acides influence l'affinité de la liaison avec les MPRs. Par exemple, les oligosaccharides haut-mannose qui possèdent un ou deux groupes phosphodiester (avant le clivage du NacGlc) ne présentent aucune affinité pour le MPR. Si l'enzyme lysosomale possède 2 signaux M6P (sous forme de

phosphomonoester), l'affinité avec laquelle l'enzyme va se lier à son récepteur est très élevée. Dans le cas où il n'y a qu'un seul signal M6P, l'affinité de liaison est moindre.

Ensuite, la position du M6P sur l'oligosaccharide phosphorylé influence la liaison aux récepteurs. Un phosphate positionné sur la branche α 1,3 de l'oligosaccharide a une affinité plus grande pour le récepteur par opposition à la situation où le phosphate est sur la branche α 1,6. De plus, la localisation du groupement M6P sur l'oligosaccharide influence son degré d'interaction avec le récepteur. Ainsi, si le résidu M6P est positionné sur un mannose terminal, l'interaction de l'oligosaccharide avec son récepteur est favorisée par rapport à la situation où le M6P se trouve sur un mannose non terminal (Varki and Kornfeld, 1983).

2.1.2.1.3. Transport vésiculaire vers le compartiment endolysosomal

Comme expliqué plus haut, les MPRs sont localisés au niveau du TGN, des endosomes précoces, des endosomes de recyclage, des endosomes tardifs et de la membrane plasmique. Les récepteurs du M6P se déplacent continuellement entre ces organites. Ce cycle leur évite, en fait, de parvenir aux lysosomes où ils seraient dégradés.

Le TGN est la région où les hydrolases acides nouvellement synthétisées sont extraites de la voie de sécrétion et rassemblées afin d'être adressées vers le compartiment endolysosomal.

Récemment, un modèle de transport vésiculaire du TGN vers le compartiment endolysosomal a été proposé (Ghosh and Kornfeld, 2004) ([figure 5](#)). Plusieurs molécules cytosoliques et membranaires y sont impliquées. Dans un premier temps, des protéines adaptatrices, les GGAs (*Golgi-associated γ -ear containing ADP-ribosylation factors binding*), sous leur forme phosphorylée, sont recrutées du cytosol vers le TGN par une petite protéine, ARF (*ADP-Ribosylation Factor*). Une déphosphorylation des GGAs induit leur modification conformationnelle, ce qui permet l'interaction avec la queue cytoplasmique des MPRs via un motif de type dileucine (Bonifacino, 2004). Une fois ce complexe formé, une autre protéine adaptatrice de type tétramérique, AP-1 (*Adaptor Protein-1*) est recrutée, de même que des molécules de clathrine. Une nouvelle phosphorylation des GGAs va rompre leur liaison avec le MPR. Suite à quoi, les GGAs seront de nouveau libérés dans le cytosol. Dans le même temps, le MPR est transféré à AP-1 et incorporé dans les vésicules couvertes de clathrine en cours de formation.

Dans un second temps, le manteau de clathrine est rapidement démantelé via la HSC70, une protéine de type chaperone, en conjonction avec l'auxiline 2, une Ser/Thr kinase de la famille GAK (*cyclin G Associated Kinase protein*) qui active la fonction ATPase de la HSC70 (Greener et al., 2000). AP-1 reste quant à lui associé aux vésicules de transport jusqu'à leur destination finale (Huang et al., 2001).

2.1.2.1.4. Arrivée des vésicules de transport au compartiment accepteur

L'accostage et la fusion de ces vésicules de transport avec leur compartiment final nécessitent une machinerie particulière. L'intervention des Rab-GTPases et des SNAREs dans le processus d'accostage et de fusion est de plus en plus manifeste ([figure 6](#)).

Ainsi, l'accostage des vésicules de transport au niveau de leur compartiment accepteur serait médié par des protéines Rab, recrutées lors de la formation des vésicules par les protéines adaptatrices (AP-1, au niveau du compartiment donneur). Les protéines Rab reconnaîtraient des facteurs d'attachement propres (*Rab effector*), qui sont localisés sur la face cytosolique de la membrane du compartiment accepteur (Ghosh et al., 2003; Luzio et al., 2003). Ces protéines oscillent entre la conformation liée à un GDP, cytosolique, et liée à un GTP, ce qui leur permet d'être recrutées au niveau des vésicules de transport en formation. Jusqu'à présent, aucune protéine Rab spécifique du transport du TGN vers le compartiment endolysosomal n'a été

identifiée. Néanmoins, il semblerait que la Rabaptine 5 pourrait être un candidat potentiel (Ghosh et al., 2003).

Le mécanisme de fusion serait, quant à lui, médié par les SNAREs. Certains sont présents sur la face cytosolique des vésicules de clathrine formées au niveau du compartiment donneur (v-SNAREs), d'autres au niveau de la face cytosolique du compartiment accepteur (t-SNAREs). Une interaction dépendant du NSF et des SNAPs entre ces deux types de SNAREs aboutit à la formation d'un complexe trans-SNARE, qui permet la fusion de la vésicule de transport avec son compartiment accepteur (Bonifacino and Glick, 2004).

Bien que les protéines adaptatrices de type AP et les GGAs, les Rabs et les SNAREs jouent un rôle fondamental dans le transport vers le compartiment endolysosomal, signalons qu'ils ne représentent qu'une partie des composants de la machinerie de la biogenèse lysosomale. Beaucoup d'autres composants des vacuoles de levures, qui correspondent aux lysosomes mammaliens, ont été identifiés par approche génétique chez *S. cerevisiae*, avec des homologues chez les mammifères (Mullins and Bonifacino, 2001).

2.1.2.1.5. Dissociation du complexe ligand/MPR et recyclage des MPRs

Une fois parvenues au niveau du compartiment endolysosomal, les hydrolases acides se dissocient de leur récepteur sous l'influence du pH acide (étape 8, [figure 2](#)) Le chemin que suivent les enzymes lysosomales pour parvenir du TGN aux lysosomes fait encore l'objet d'un débat. Elles peuvent soit être directement acheminées aux endosomes tardifs, soit passer par le compartiment endosomal précoce. Certains auteurs plaident pour la seconde hypothèse (Diesner et al., 1993; Waguri et al., 2003), quoique celle-ci soit remise en question (Bucci et al., 2000).

Les MPRs, une fois leur ligand libéré, ne suivent pas la même voie que les hydrolases acides. Ils ne parviennent pas aux lysosomes car ils sont retenus au niveau des endosomes par des protéines cargo spécifiques qui reconnaissent un signal de rétention contenu dans leur queue cytoplasmique. Dans le cas du MPR-CD, la rétention est médiée par un motif phénylalanine-tryptophane. Le MPR-CI ne possède pas ce motif, mais celui-ci présente néanmoins dans sa queue cytoplasmique un tryptophane hautement conservé chez le rat, le bovin et l'homme (Diaz and Pfeffer, 1998). Les MPRs sont ensuite recyclés vers le Golgi par l'intervention de diverses protéines cytosoliques ou membranaires. Par ailleurs, il semblerait que PACS-1 (*Phosphofurin Acidic Cluster Sorting protein-1*) et AP-1 interviennent dans le recyclage des MPRs des endosomes tardifs, tandis que TIP47 (*Tail Interacting Protein 47 kDa*) et Rab9 coopèrent au niveau des endosomes précoces (Luzio et al., 2003). PACS-1 et Rab 9 joueraient, conformément à ce qui a été dit plus haut, un rôle semblable aux GGAs par rapport à AP-1, à savoir présenter les MPRs aux protéines cargo (Ghosh et al., 2003; Hanners and Tooze, 2003). Toutefois, ces faits sont à considérer avec prudence et doivent encore être concrètement vérifiés.

2.1.2.2. Transport indépendant du mannose-6-phosphate

Une voie de transport indépendant du M6P a été mise en évidence suite à l'étude de patients atteints d'*I-cell disease*. Dans les fibroblastes possédant le phénotype I-cell, beaucoup d'enzymes lysosomales sont sécrétées à défaut d'être transportées vers le compartiment endolysosomal. En conséquence, le lysosome déficient en hydrolases acides accumule de nombreuses molécules non dégradées qui vont, dès lors, former des corps d'inclusion.

L'origine de cette maladie est due à une déficience de l'activité phosphotransférase, qui conduit à l'absence du signal M6P sur les enzymes (Hasilik et al., 1981). Cependant, Kornfeld a observé chez les patients atteints de cette maladie, plusieurs types cellulaires, dont les hépatocytes et les leucocytes, où le taux d'enzymes lysosomales était pratiquement normal.

De plus, une étude portant sur des souris déficientes en MPRs et en IGF II a permis de mettre en évidence l'existence de différentes voies de transport indépendantes du M6P, car ces souris possèdent malgré tout un taux élevé d'hydrolases acides actives. Certaines de ces voies de transport sont spécifiques à un type de cellules et/ou au type d'enzyme (Gabel et al., 1983).

Citons la phosphatase acide lysosomale (LAP), qui parvient également au compartiment endolysosomal par une voie indépendante du MPRs, bien qu'elle soit une protéine lysosomale soluble. Von Figura et son équipe ont clairement démontré comment cette enzyme lysosomale soluble parvient aux lysosomes indépendamment des MPRs (Braun et al., 1989). Dans un premier temps, la proenzyme est synthétisée sous forme transmembranaire et transportée jusqu'à la surface cellulaire. De là, elle est rapidement internalisée vers le compartiment endolysosomal. La LAP sous forme transmembranaire subit alors deux clivages protéolytiques au niveau du domaine transmembranaire et de l'extrémité C-terminale cytoplasmique, qui vont l'amener à sa forme mature, soluble.

Par ailleurs, d'autres études ont décrit une association membranaire indépendante des MPRs de précurseurs d'hydrolases acides dans plusieurs types cellulaires (Brault, 1996). Par exemple, le comportement de 50 à 90 % de la cathepsine D plaide pour un ciblage vers les lysosomes par un tel mécanisme. Un motif de reconnaissance pour la voie d'adressage vers les lysosomes indépendante du M6P serait contenu dans l'extrémité carboxyl de la cathepsine D. Ce motif chevauche celui de la reconnaissance par la phosphotransférase, ce qui empêcherait dès lors un transport dépendant du M6P. De plus, il serait à l'origine d'une association avec une protéine membranaire (Zhu and Conner, 1994). Celle-ci n'est pas encore connue chez les mammifères, en revanche, elle correspondrait à VPS10 chez *S. cerevisiae* (Marcusson et al., 1994).

2.1.3. Maturation tardive des protéines

Dans le compartiment endolysosomal, les hydrolases acides subissent les modifications posttraductionnelles finales. Celles-ci impliquent des modifications au niveau de la protéine et des oligosaccharides.

2.1.3.1. Clivage protéolytique des proenzymes

La majorité des hydrolases acides sont synthétisées sous la forme d'une proenzyme généralement inactive. Cette inactivité est le reflet de la nécessité de maintenir les précurseurs dans un état inactif dans l'appareil de sécrétion.

Tout d'abord, les réactions de maturation protéolytique dépendent du pH et les clivages peuvent avoir lieu soit dans le compartiment endosomal et/ou dans les lysosomes. De plus, le nombre de clivages protéolytiques varie d'une enzyme à l'autre. Par exemple, la cathepsine D, produite par les fibroblastes humains, est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 53 kDa, qui est clivé en un intermédiaire de 47 kDa dans un compartiment post-Golgi, avant d'être converti en une forme mature de 31 kDa dans les lysosomes (Gieselmann et al., 1983). La β -glucuronidase, en revanche, ne subit qu'un seul clivage protéolytique au cours de la maturation tardive, où la forme précurseur de 75 kDa est clivée en une forme mature de 73 kDa avant son arrivée aux lysosomes. Les protéases impliquées dans la maturation protéolytique des hydrolases acides ne sont pas connues. On sait en tout cas qu'il ne s'agit pas d'une hydrolase acide soluble. Suite à certaines études, on a démontré *in vitro* que certaines enzymes seraient capables de s'autoactiver, comme par exemple les cathepsines D, B et L (Gal and Gottesman, 1986; Mach et al., 1993; Richo and Conner, 1994).

2.1.3.2. Déphosphorylation des chaînes oligosaccharides haut-mannose

Parallèlement à leur maturation protéolytique, les précurseurs d'hydrolases acides sont déphosphorylés. Le taux de déphosphorylation des oligosaccharides des enzymes lysosomales varie selon le type cellulaire et l'enzyme lysosomale concernée (Einstein and Gabel, 1991). A ce jour, l'enzyme responsable de cette déphosphorylation n'est pas encore connue. Par contre, il a été démontré que ni la phosphatase acide lysosomale, ni la phosphatase acide pourpre, une phosphatase lysosomale résistante au tartrate, ne correspondent à la mannose-6-phosphatase responsable de la déphosphorylation des hydrolases acides (Bresciani et al., 1992; Suter et al., 2001).

La cinétique de cette déphosphorylation a été étudiée dans différents types cellulaires. Ainsi, l'incubation de cellules BW5147 avec du mannose marqué a révélé que l'activité de déphosphorylation se situe dans les endosomes et/ou dans les lysosomes (Gabel et al., 1982). De même, l'étude de la déphosphorylation de l'arylsulfatase-M6P, conduit à des conclusions semblables (Bresciani and Von Figura, 1996). Par ailleurs, il existerait une corrélation entre le taux de déphosphorylation et l'expression du MPR-CI. En effet, des cellules n'exprimant pas de MPRs-CI (les cellules P388D1, par exemple) sécrètent 60 à 70 % de leurs hydrolases acides sous forme hautement phosphorylées. Ces enzymes lysosomales-M6P peuvent être internalisées par des cellules qui expriment, pour leur part, le MPR-CI et ne subissent alors pas de clivage protéolytique, mais, par contre, leur oligosaccharide sera déphosphorylé. En revanche, les hydrolases acides qui ne sont pas sécrétées et qui sont transportées par la voie indépendante du M6P et du MPR-CI aux lysosomes ne seront pas déphosphorylées. Cela laisse à supposer que le MPR-CI délivre son ligand à une population de lysosome capable de déphosphoryler les enzymes lysosomales. De plus, les conditions externes, telles la densité cellulaire et la présence de sérum, peuvent moduler le taux de déphosphorylation (Einstein and Gabel, 1989; Einstein and Gabel, 1991).

Signalons enfin que le pourcentage d'enzymes lysosomales porteuses du signal M6P présent dans les lysosomes en temps normal est très faible, à cause de la présence transitoire du signal M6P combiné au long temps de demi-vie des hydrolases acides (> 24 h) (Gabel and Foster, 1986).

2.2. Les protéines lysosomales membranaires

De même que les protéines lysosomales solubles, les protéines de membrane sont synthétisées dans le cytoplasme via les ribosomes. Suite à la traduction d'une séquence signal identique à celles des hydrolases acides solubles et à sa reconnaissance par la SRP (*Signal Recognition Particle*), la protéine lysosomale membranaire sera « transloquée » dans le RER. Par la suite, ces protéines membranaires lysosomales ne sont pas dotées du signal M6P.

La machinerie de transport vers les lysosomes des protéines lysosomales membranaires est comparable en certains points à celle des protéines solubles. Cependant, contrairement aux protéines solubles, le transport des protéines membranaires dépend d'un motif contenu dans leur domaine cytosolique, le motif d'adressage. Celui-ci est alors reconnu par des protéines adaptatrices. Les machineries de transport et de fusion qui feront suite sont semblables à celles des protéines solubles, impliquant les clathrines, Rabs et SNAREs (Brulke, 1996).

Les protéines de membrane intégrales lysosomales parviennent du TGN aux lysosomes soit de manière directe pour les LAMPs et LIMP, soit de manière indirecte (via la membrane plasmique) pour la LAP (dont nous avons évoqué l'importation aux lysosomes plus haut, et que nous n'aborderons plus). Les MPRs-CI et -CD sont également porteurs des même types de motif et sont donc dirigés par le même mécanisme vers le compartiment endolysosomal.

2.2.1. Les motifs d'adressage : généralités (Bonifacino and Traub, 2003)

La majorité des motifs d'adressage, que ce soit pour la voie d'endocytose ou de biosynthèse, vers les compartiments endosomes et lysosomes est présente au niveau du domaine cytosolique des protéines transmembranaires. Ce signal est souvent constitué d'une courte séquence de 4 à 7 acides aminés qui est peu conservée. La spécificité des signaux repose, en fait, sur deux ou trois acides aminés critiques, qui correspondent généralement à un résidu hydrophobe encombrant ou un acide aminé chargé.

Sur base de la nature de leurs acides aminés critiques, deux catégories principales de motif d'adressage vers les lysosomes et les endosomes peuvent être établies : les motifs basés sur la tyrosine et ceux qui possèdent une séquence de type dileucine. Dans la première catégorie, on retrouve les signaux de types NPXY et YXX ϕ où X correspond à n'importe quel acide aminé, ϕ à un acide aminé hydrophobe, N et P à une asparagine et une proline. La deuxième catégorie comporte les motifs de type [DE]XXXL[LI] et DXXLL, où X est un acide quelconque, D un aspartate, E un glutamate, L une leucine, et I une isoleucine.

Enfin, signalons que tous les motifs d'adressage ne se composent pas forcément d'une courte séquence peptidique linéaire. Dans certains cas, le motif de reconnaissance est contenu dans la structure tertiaire de la protéine, ce qui signifie que les résidus critiques ne sont pas nécessairement colinéaires (Orsel et al., 2000).

2.2.2. Rôle des motifs d'adressage

Le motif de type NPXY a pour fonction de médier l'internalisation à partir de la membrane plasmique des protéines de membrane telles les récepteurs à LDL, le récepteur à l'insuline et les récepteurs EGF. En conséquence, nous ne nous attarderons pas sur ce type de motif. Retenons seulement que ces motifs sont reconnus par la protéine adaptatrice AP-2 et d'autres potentielles protéines adaptatrices (Bonifacino and Traub, 2003).

Le motif le plus impliqué dans le tri des protéines est celui du type YXX ϕ . Ainsi, les protéines membranaires LAMPs et LIMP-1, de même que les deux types de MPRs possèdent ce motif dans leur séquence C-terminal. Ce motif est reconnu par les complexes de protéines adaptatrices et 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 (Bonifacino and Traub, 2003; Luzio et al., 2003; Mullins and Bonifacino, 2001).

LIMP-2 possède le motif dileucine [DE]XXXL[LI]. Comme le motif YXX ϕ , ce type de motif est reconnu par des complexes de protéines adaptatrices. En conséquence, il intervient également dans l'internalisation et le ciblage vers le compartiment endolysosomal.

Les MPRs ont la particularité de posséder en plus du motif YXX ϕ , un deuxième motif de type DXXLL. Si le motif tyrosine permet l'internalisation des MPRs de la membrane plasmique, le motif dileucine permet, quant à lui, l'interaction du récepteur avec les protéines adaptatrices GGAs (Bonifacino and Glick, 2004; Johnson and Kornfeld, 1992; Puertollano et al., 2001; Zhu and Conner, 1994).

2.3. Biogenèse des lysosomes (figure 7)

Le mécanisme par lequel les hydrolases acides endocytées ou nouvellement synthétisées parviennent du compartiment endosomal aux lysosomes, c'est-à-dire la biogenèse des lysosomes, suscite beaucoup d'intérêt. Plusieurs modèles divergents ont été proposés, remettant en cause le rôle ou l'existence des compartiments intervenants. C'est pourquoi, nous avons préféré

utiliser le terme de compartiment endolysosomal plutôt que ceux de compartiments endosomal et lysosomal.

Le *modèle de la maturation* (Dunn and Maxfield, 1992) postule que les lysosomes sont formés à partir du compartiment endosomal. En premier lieu, les endosomes précoces sont formés par la fusion de vésicules dérivant de la membrane plasmique. Le recyclage d'une partie des membranes sous forme de vésicules et l'addition de vésicules provenant du TGN convertit ces endosomes précoces en endosomes tardifs et, par la suite, éventuellement en lysosomes.

Suite à l'observation d'un trafic vésiculaire entre les endosomes tardifs et les lysosomes, on a alternativement proposé le *modèle du transport vésiculaire* (Griffiths and Gruenberg, 1991). Les endosomes précoces et tardifs, ainsi que les lysosomes y sont considérés comme des entités distinctes et pré-existantes. Les matériaux dans les endosomes précoces sont livrés aux endosomes tardifs par l'intermédiaire de vésicules de transport endosomales, que l'on appelle également « corps multivésiculaires ». Les endosomes tardifs sont ainsi progressivement remaniés en lysosomes. Par ailleurs, des auteurs ont également proposé la possibilité d'un transport direct du compartiment endosomal précoce vers les lysosomes matures, sans passage par les endosomes tardifs, via les corps multivésiculaires (Dell'Angelica et al., 2000; Mellman and Warren, 2000; Murphy, 1991).

Le *modèle kiss and run* propose que des interactions entre les endosomes et les lysosomes contribuent à la maturation lysosomale. Dans ce modèle, la biogenèse des lysosomes se fait en permanence par de brefs contacts (ou *kiss*) entre les endosomes tardifs et les lysosomes, accompagnés d'un échange de matériel, et suivis par une dissociation (ou *run*) des deux entités (Storrie and Desjardins, 1996).

Plus récemment, ce modèle a fait place à une variante, le *modèle de fusion-fission* (Mullock et al., 1998). Celui-ci implique que les endosomes tardifs et les lysosomes subissent des fusions hétérotypiques conduisant à la formation d'un organite hybride possédant des marqueurs des deux compartiments. L'organite hybride subit alors des remaniements en lysosomes, qui consistent en la condensation du contenu lysosomal et le retrait des éléments endosomaux via le recyclage vésiculaire ou la digestion.

Ces modèles ne sont pas exclusifs et il est possible que les cellules emploient plusieurs de ces mécanismes pour former leurs lysosomes. Cependant, de récentes études faites par Luzio et son équipe plaident pour une biogenèse des lysosomes par un contact direct entre les organites avant tout échange de matériel (Bright et al., 2005).

3. CADRE DU MEMOIRE

3.1. Etudes antérieures

3.1.1. Taux d'enzymes lysosomales-M6P élevé dans le cerveau de rat

Au terme de leur passage par les différents compartiments subcellulaires où elles ont subi plusieurs modifications, les hydrolases acides nouvellement synthétisées se retrouvent au niveau des lysosomes sous leur forme mature et déphosphorylée. En effet, dans la majorité des tissus et des cellules en culture, il s'avère que le signal M6P est présent de manière transitoire, car rapidement enlevé lorsque les enzymes lysosomales atteignent les lysosomes (Einstein and Gabel, 1991).

Cependant, cette situation n'est pas exclusive. Par exemple, dans des cellules de souris déficientes en MPR-C1, les hydrolases acides qui parviennent aux lysosomes gardent leur signal M6P (Gabel et al., 1983). En outre, dans les cellules L de souris, la déphosphorylation des enzymes lysosomales-M6P varie selon les conditions auxquelles sont soumises les cellules *in vitro*

(Einstein and Gabel, 1989). Ainsi, la déphosphorylation est normale quand les cellules croissent à faible densité, et au contraire, il y a accumulation d'enzymes-M6P lorsque les cellules sont cultivées à forte densité ou en l'absence de sérum.

L'équipe du Professeur Lobel a démontré que les enzymes lysosomales possédant le M6P étaient proportionnellement 2 à 8 fois plus élevées dans le cerveau de rat par rapport aux autres tissus (Sleat et al., 1996). Afin de savoir si ce taux élevé d'enzymes lysosomales-M6P est dû à une quantité totale d'enzymes lysosomales plus élevée ou à une proportion plus élevée d'enzymes-M6P dans le cerveau, l'activité spécifique d'enzymes lysosomales dans les différents tissus a été mesurée. Les résultats montrent clairement que le cerveau ne possède pas d'activités enzymatiques lysosomales plus élevées. En conséquence, le taux élevé de glycoprotéine-M6P est dû à une proportion plus élevée d'enzymes lysosomales possédant le M6P. Ensuite, le pourcentage d'activité de plusieurs enzymes lysosomales-M6P a été mesuré dans le foie, les reins, les poumons et le cerveau de rat. Il s'avère que le pourcentage d'activité enzymatique représenté par des hydrolases acides-M6P est considérablement plus élevé dans le cerveau (en moyenne 36,2 %) par rapport aux poumons (5,5 %), aux reins (2,3 %) et au foie (0,7 %).

D'autre part, par une approche histochimique, Gabel a suggéré qu'il existerait deux populations de lysosomes qui diffèrent l'une de l'autre par l'absence ou la présence d'une activité mannose-6-phosphatase (Gabel, 1992). Dès lors, la grande proportion d'enzymes lysosomales-M6P présente dans le cerveau pourrait être due au ciblage de ces protéines vers le compartiment déficient en phosphatase. Néanmoins, la nature de ce compartiment phosphatase-négatif reste à être déterminée, de même que sa fonction dans la rétention des marqueurs-M6P. Certains auteurs ont corrélé cette particularité avec le taux d'expression plus faible des MPR-CI dans le cerveau (Ballesteros et al., 1990; Sklar et al., 1989).

3.1.2. Localisation des glycoprotéines-M6P dans le cerveau de rat

Le fait que le cerveau ait un taux d'enzymes lysosomales-M6P plus élevé laisse supposer que ce tissu ne possède pas la capacité de procéder à l'élimination du signal M6P des enzymes lysosomales.

Deux approches complémentaires ont été utilisées au cours de cette étude afin de déterminer la localisation subcellulaire des glycoprotéines-M6P (Jadot et al., 1999). La première approche, biochimique, s'est appliquée à comparer la distribution des glycoprotéines-M6P et de certaines enzymes lysosomales. Pour cela, plusieurs techniques de fractionnement ont été utilisées. L'approche morphologique, quant à elle, a permis de comparer la localisation relative des glycoprotéines-M6P et de certaines enzymes lysosomales par microscopie confocale.

De ces différentes études, il ressort que la population des enzymes lysosomales-M6P dans le cerveau est principalement localisée dans les lysosomes neuronaux. En outre, les enzymes lysosomales s'accumuleraient dans des lysosomes qui sont incapables de déphosphoryler le signal M6P. Les auteurs terminent en émettant des hypothèses sur les conséquences fonctionnelles que représente cette absence de modifications du M6P. Une première possibilité serait un rôle de protection contre la dégradation, dans la mesure où la rétention du signal permettrait une récupération efficace des hydrolases acides sécrétées dans le milieu extracellulaire. Ou bien, une concentration locale des glycoprotéines-M6P en surface de la cellule via les MPRs permettrait une dégradation plus efficace du matériel extracellulaire, reflétant la participation des enzymes lysosomales dans la migration et la croissance neuronale et le remodelage synaptique (Brauker et al., 1986; Roff et al., 1983).

3.2. Objectifs et stratégies

3.2.1. Objectifs

L'objectif général de notre mémoire est de comprendre le mécanisme par lequel les enzymes lysosomales dans les neurones conservent le signal M6P. L'enzyme responsable de l'activité mannose-6-phosphatase n'étant pas connu, la compréhension du maintien du signal M6P passe donc nécessairement par l'identification de cette mannose-6-phosphatase responsable du clivage du motif M6P.

Au cours de ce mémoire, nous avons mis au point un modèle permettant d'étudier la déphosphorylation des enzymes lysosomales, afin de détecter la présence d'une activité mannose-6-phosphatase. Nous avons incubé des cellules neuronales déphosphorylant mal leurs enzymes en présence d'échantillon de foie de souris contenant une activité de déphosphorylation. Les enzymes M6P des cellules neuronales servent donc de substrat à l'activité de déphosphorylation (ou manose-6-phosphatase) présente dans le foie de souris.

Une fois la localisation effectuée, nous utiliserions cette activité sur le modèle cellulaire pour caractériser l'activité mannose-6-phosphatase. Nous avons voulu pousser un peu plus loin la caractérisation de la mannose-6-phosphatase dans le but d'effectuer une purification de son activité. Cette purification nous ouvrirait les portes vers une identification de l'agent responsable de l'élimination du signal M6P.

3.2.2. Stratégies

3.2.2.1. Modèle cellulaire

Nous avons cherché un modèle cellulaire présentant la même particularité que les cellules neuronales, à savoir une absence de déphosphorylation des enzymes lysosomales solubles. Notre choix s'est porté sur les cellules N1E115, une lignée cellulaire dérivée d'un neuroblastome murin, correspondant à ce critère en tant que modèle d'étude de la déphosphorylation *in vitro*.

3.2.2.2. Source d'activité de déphosphorylation

Le foie est capable de cliver les motifs M6P et représente donc un bon candidat. L'activité de déphosphorylation a été recherchée dans un homogénat total de foie de souris, ainsi que dans les fractions obtenues après centrifugation différentielle et isopycnique.

3.2.2.3. Caractérisation de l'activité mannose-6-phosphatase

Afin d'étudier l'activité de déphosphorylation (ou mannose-6-phosphatase), des fractions de foie de souris ont été incubées en présence des cellules N1E115.

L'analyse du contenu cellulaire en enzymes lysosomales-M6P avant et après incubation est réalisée par l'intermédiaire d'une colonne de chromatographie d'affinité porteuse du récepteur du M6P. Cette colonne va lier, via les MPRs greffés à la résine, les protéines possédant le signal M6P. Les fractions de *flow-through*, de lavage et d'élutions seront récoltées et analysées en dosant leur contenu en activité enzymatique lysosomale (la β -galactosidase, la β -glucuronidase, la β -hexosaminidase, la β -mannosidase et la β -glucosidase). Ainsi, le pourcentage d'activité enzymatique lysosomale retenue sur colonne correspond aux enzymes-M6P, alors que le pourcentage d'activité enzymatique dans le *flow-through* correspond aux enzymes déphosphorylées. La présence d'une activité de déphosphorylation dans les fractions de foie est représenté par la diminution du pourcentage de rétention d'enzymes lysosomales sur colonne après incubation.

MATERIEL ET METHODES

1. CULTURE CELLULAIRE

1.1. Matériel

Au cours de ce travail, nous avons utilisé une lignée cellulaire N1E115 qui est issue d'un neuroblastome murin. Les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm² (Greiner) en présence de 20 ml de milieu DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Cambrex) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (Greiner) et des antibiotiques (pénicilline, 100 U/ml et streptomycine, 100 µg/ml) (Cambrex). Les cellules sont maintenues dans une étuve à 37°C dont l'atmosphère contient 5 % de CO₂ et 95 % d'air humide.

1.2. Repiquage des cellules

Lorsque les cellules arrivent à confluence, elles sont rincées avec 12 ml de PBSa stérile (Phosphate Buffer Saline) pour éliminer toute trace de sérum. Le PBS est préparé à partir d'un stock de PBS concentré 10 fois.

Stock de PBS concentré 10 fois : (pour culture cellulaire)	KH ₂ PO ₄ 1,44 g	pour 1 litre de solution.
	NaCl	90 g
	Na ₂ HPO ₄	4,22 g

Les cellules sont ensuite incubées avec 1 ml de trypsine/EDTA (0,5 mg de trypsine/ml et 0,2 mg d'EDTA/ml) pendant environ 5 minutes jusqu'à ce que les cellules se détachent de leur support. Afin d'inactiver la trypsine, nous rajoutons 9 ml de milieu complet et la suspension cellulaire est intensivement mélangée à l'aide d'une pipette.

Pour maintenir la culture cellulaire, les cellules sontensemencées dans de nouvelles boîtes de culture de 75 cm² à une dilution de 1/2,8. Pour les expériences, les cellules sontensemencées dans des boîtes de Pétri à une dilution de 1/3 et réensemencées dans des P-100. Les cellules sont repiquées 2 fois par semaine.

2. FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

2.1. La centrifugation : généralités

De manière générale, les techniques de fractionnement permettent de séparer les organites subcellulaires en les soumettant à un champ centrifuge.

Le comportement des particules soumises à une force centrifuge est donnée par l'équation de Svedberg :

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

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

De là, on en déduit que plus les particules seront petites, plus il faudra augmenter la vitesse de centrifugation. De plus, si la densité de la particule est supérieure à celle du milieu, elle sédimente. Par contre, si elle est égale ou inférieure à la densité du milieu, elle ne sédimente pas dans le premier cas, et elle flotte, dans le second. Par ailleurs, le coefficient de friction indique que si le milieu est trop visqueux, la vitesse de sédimentation d'une particule sédimentable diminuera.

2.2. Centrifugation différentielle

Nous avons utilisé des souris NMRI femelles (Charles River Laboratories), mises à jeun la veille des expériences. Le foie est homogénéisé à 4°C dans du saccharose 0,25M à l'aide d'un Potter Elvehjem dont le piston en teflon, actionné par un moteur, tourne 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) [figure 8]. Cette centrifugation donne lieu successivement à cinq fractions hétérogènes qui sont, chacune, enrichies en certains types d'organites.

- la fraction N est essentiellement constituée 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 est principalement enrichie en 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'une structure par rapport à l'homogénat. La surface de chaque rectangle correspond au pourcentage d'activité enzymatique retrouvé dans chaque fraction.

Lors d'un fractionnement, il arrive fréquemment que l'on ne récupère pas 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 qui équivaut à E+N.

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.

2.3. Centrifugation isopycnique

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 (Beaufay et al., 1964).

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 (4,6 ml de chaque solution) ayant respectivement une densité de 1,09 g/ml et 1,26 g/ml.

Après avoir déposé 0,5 ml d'une fraction ML au sommet du gradient, le tube est soumis à une centrifugation pendant 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, de plus ou moins 3 mm de haut. Le contenu de chaque section est récolté et sa densité est déterminée en mesurant l'indice de réfraction.

La représentation graphique des résultats obtenus après centrifugation isopycnique est celle décrite par Beaufay et al. (Beaufay et al., 1964). Il s'agit également d'histogrammes où chaque fraction est à nouveau symbolisée par un rectangle, avec en abscisse, la densité (ρ) 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.

3. COLONNE DE CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE PORTEUSE DU MPR

3.1. Principe

La chromatographie par affinité permet de séparer d'un échantillon une protéine qui présente une affinité élevée pour une molécule complémentaire. Dans le cadre de ce mémoire, la protéine à isoler correspond à toute enzyme lysosomale porteuse du signal M6P, et la molécule complémentaire est le récepteur du M6P (MPR) (affinité ligand-récepteur).

Le MPR-CI est greffé de manière covalente sur un support Affi-Gel 10 (BioRad) à une concentration de 2mg/cm^3 . Cette colonne nous a été généreusement donnée par le professeur P. Lobel (Center for Advanced Biotechnology and Medicine, USA). Le récepteur reconnaît toutes les protéines porteuse du signal M6P qui vont, dès lors, se lier à leur récepteur. De la sorte, les protéines-M6P sont isolées des protéines qui n'interagissent pas avec le MPR et qui vont directement passer au travers de la colonne et se retrouver dans la première fraction récoltée, le *flow-through*. Par la suite, les protéines-M6P peuvent être récupérées en effectuant une élution de façon spécifique par compétition avec le ligand mannose-6-phosphate libre.

3.2. Incubation des cellules

3.2.1. Préparation des cellules

Les cellules, cultivées dans des boîtes de Pétri 100 mm, sont lavées 3 fois avec 8ml de PBSa stérile. Pour les expériences nécessitant une incubation, les cellules sont cultivées dans 6 ml de milieu DMEM-F12 sans sérum. Ensuite, les fractions à analyser sont ajoutées et les cellules sont incubées à 37°C jusqu'à l'analyse.

3.2.2. Préparation des échantillons à déposer sur cellules

3.2.2.1. Choc osmotique

Une fraction L de foie de souris obtenue par centrifugation différentielle est resuspendue dans de l'eau et incubée pendant 30 minutes à 4°C. Ensuite, la fraction est centrifugée à 50000 rpm pendant 30 minutes et une fraction L soluble et une fraction L membranaire sont récupérées. La fraction L membranaire est encore soumise à 4 cycles de sonication à amplitude 40 pendant 10 secondes (Vibra Cell, Sonics), ensuite centrifugée à 50000 rpm pendant 30 minutes afin de récupérer la fraction membranaire finale qui sera resuspendue dans de l'eau.

3.2.2.2. Endoglycosidase H

Un lysat des cellules N1E115 (voir point 3.3) est incubé pendant 6 heures dans un bain à 37°C en présence d'1 µl d'endoglycosidase H (500000 U/ml) (New England Biolabs, UK).

3.2.2.3. Chauffage d'une fraction L

Une fraction L de foie de souris provenant d'une centrifugation différentielle est portée à 95°C pendant 5 minutes sur une plaque chauffante (Thermal Cycler, Techne).

3.3. Préparation d'un lysat des cellules N1E115

Les cellules N1E115 sont rincées 3 fois avec 8 ml de PBSb froid, puis lysées dans 0,7 ml de tampon de lyse phosphate. Après 15 minutes d'incubation sur glace, le lysat est transféré dans un tube Eppendorf 1,5 ml. La boîte de culture est rincée avec 0,3 ml de tampon de lyse que l'on rajoute au tube Eppendorf. Ensuite, le lysat est centrifugé 10 minutes à 50000 rpm (rotor Beckman TLA 100.3). Le surnageant est récupéré et conservé sur glace.

<i>Stock de PBSb 10 x</i>	Solution A :	NaCl	45g	pour 500 ml de solution
		Na ₂ HPO ₄	5,5g	
	Solution B :	NaCl	9g	pour 100 ml de solution
	NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	2,01g		
Amener la solution A à pH 7,4 avec la solution B.				

Stock tampon phosphate	Stock 1M Na ₂ HPO ₄ Stock 1M NaH ₂ PO ₄	68,4 ml 31,6 ml	pour 1 litre de solution
	Vérifier le pH 7,2		
Tampon de lyse phosphate 10 mM <i>NaCl</i> 0,15M <i>Triton X-100</i> 1 %	Stock tampon phosphate Triton X-100 NaCl	10 ml 1g 0,9g	pour 100 ml de solution
	Vérifier le pH 7,2		

3.4. Matériel

<i>Colonne MPR (Affigel, Biorad)</i>		
<i>PBS-Triton X-100 0,1 %</i>	Triton X-100 PBS (voir point 3.3)	0,1g 500 ml
<i>Glucose-6-phosphate 10mM</i>	glucose-6-phosphate (Sigma) dans PBS-Triton X-100 0,1 %	141 mg 50 ml
<i>Mannose-6-phosphate 10mM</i>	mannose-6-phosphate (Sigma) dans PBS-Triton X-100 0,1 %	34 mg 10 ml
<i>Glycine 200mM pH2,5</i>	Glycine 1,5g H ₂ O 100 ml	
	Amener à pH 2,5 avec une solution d'HCl	
<i>Stock d'azide 10 %</i>	Azide (NaN ₃) H ₂ O	2g 20 ml
	Conserver à l'abri de la lumière à 4°C.	
<i>PBS-azide 0,02 %</i>	Stock azide 10 % PBS (voir point 1.3)	0,5 ml 250 ml

Toutes les solutions sont filtrées au travers d'un filtre 0,22 µm.

3.5. Méthode

La colonne MPR contient 1 ml de résine à laquelle le MPR-CI est greffé. Les colonnes MPR sont conservées et utilisées à 4°C. Avant chaque analyse, un rinçage de la colonne avec 10 ml de PBS-Triton 0,1 % est effectué. La récolte des fractions se fait dans des tubes tarés que l'on garde toujours sur glace afin de préserver les activités enzymatiques.

Suite à la préparation d'un lysat des cellules N1E115, nous déposons sur la colonne MPR un volume connu de l'échantillon à analyser, tout en préservant une partie pour les dosages. La solution non retenue sur colonne est récoltée dans un tube taré (tube 1). La colonne est refermée et 1 ml de PBS-Triton 0,1 % est déposé sur la colonne. Ceci permet un contact prolongé entre les MPR et les protéines de l'échantillon. Après 5 minutes, la colonne est réouverte et la récolte est effectuée dans le tube 1. Il constitue le *flow-through*, fraction dans laquelle se retrouve les protéines ne possédant pas le signal M6P.

Ensuite, des lavages sont effectués avec 3 ml de PBS-Triton 0,1 % (récolté dans un tube 2), suivi de 2 ml de glucose-6-phosphate (G6P) 10 mM (récolté dans un tube 3). Le G6P constitue, en plus d'un lavage supplémentaire, un contrôle interne afin de démontrer la spécificité du MPR pour son ligand étant donné la structure très similaire du G6P à celle du M6P.

Suit alors l'étape d'éluion avec 3 x 1ml d'une solution de mannose-6-phosphate (M6P) 10 mM. L'équilibre de liaison des protéines-M6P avec leur récepteur est déplacé par le M6P libre qui entre en compétition avec les protéines-M6P. Celles-ci se détachent alors de la résine et sont élués de la colonne (récolté dans les tubes 4, 5 et 6).

Finalement, nous déposons 2 ml de Glycine 200mM pH2,5 que l'on récolte dans un tube 7, afin de décrocher toutes protéines restantes sur la colonne. La colonne est ensuite abondamment rincée au PBS-Triton 0,1 % et stockée à 4°C en présence de PBS-azide 0,02 %.

Au terme de l'analyse sur colonne MPR, 7 fractions sont récoltées :

- la fraction 1 : la fraction du *flow-through*.
- la fraction 2 : la fraction de lavage au PBS-Triton 0,1 %
- la fraction 3 : la fraction de lavage au G6P 10 mM
- les fractions 4, 5 et 6 : les fractions d'élution au M6P 10
- la fraction 7 : la fraction d'élution finale à la glycine 200 mM pH 2,5

Les résultats de l'analyse par colonne MPR sont représentés sous la forme d'un histogramme ou d'une courbe avec, en ordonnée, le pourcentage d'activité enzymatique. Les pourcentages d'activité enzymatique contenus dans chaque fraction sont calculés par rapport à l'activité enzymatique totale récoltée. Pour chaque enzyme, un pourcentage de récupération est calculé. Il correspond au rapport de l'activité totale récoltée sur l'activité présente dans le lysat de départ. La somme des activités contenues dans les fractions 1 et 2 constitue l'activité contenue dans une fraction *flow-through* (FT), alors que la somme des activités contenues dans les fractions d'élutions 4 à 6 représente l'activité des enzymes possédant un signal M6P.

4. DOSAGE DES ENZYMES DE REFERENCE

4.1. Principe

4.1.1. Fractionnement cellulaire

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

Au cours de ce mémoire, nous avons choisi de mesurer l'activité d'une enzyme caractéristique de la membrane plasmique, la phosphodiesterase alcaline, une enzyme caractéristique du réticulum endoplasmique, la α -glucosidase alcaline et différentes enzymes lysosomales, la β -galactosidase, la β -glucuronidase, la β -hexosaminidase et la β -mannosidase. En plus du dosage des activités, nous effectuons un dosage des protéines contenues dans les fractions N, M, L, P et S.

4.1.2. Colonne MPR

Afin de connaître la proportion d'enzymes lysosomales-M6P contenue dans l'échantillon, nous avons dosé dans les fractions récoltées par colonne MPR quatre enzymes lysosomales dépendantes de la voie du M6P : la β -galactosidase, la β -glucuronidase, la β -hexosaminidase et la β -mannosidase. Cela permet de calculer le pourcentage d'activité enzymatique dans chaque fraction récoltée et de déterminer la proportion d'enzymes lysosomales portant le signal M6P. Nous avons également dosé la β -glucosidase acide, une enzyme arrivant aux lysosomes par une voie indépendante du M6P. Par conséquent, elle ne se liera pas à la colonne et se retrouvera dans le *flow-through*. Elle constitue donc une garantie de la spécificité de notre colonne à lier uniquement les protéines porteuses du M6P.

4.2. Méthode

Le dosage des protéines s'effectue selon la méthode de Lowry et al. (Lowry et al., 1951) en utilisant un kit DC Protein Assay (BioRad). Le tableau ci-dessous résume les conditions expérimentales des dosages enzymatiques.

Enzyme	Organite associé	Substrat	Tampon	Addition	Méthode de mesure
Phosphodiesterase alcaline	Membrane plasmique	Thymidine 5' monophosphate p-nitrophenylester 1,5 mM	Glycine/NaOH 0,1M pH 9,6	Zn acétate 2 mM	p-nitrophénol 400 nm
α -glucosidase alcaline	Réticulum endoplasmique	4-Methylumbelliféryl α -glucopyranoside 0,1 mM	Glycine/NaOH 0,05M pH 9	Triton X-100 0,02 %	4-Méthylumbelliférone Exc=360 / Em=460
β -galactosidase	Lysosomes	4-Methylumbelliféryl β -galactopyranoside 0,8 mM	Sodium acétate 0,05M pH 5	Triton X-100 0,04 %	4-Méthylumbelliférone Exc=360 / Em=460
β -glucuronidase	Lysosomes	4-Methylumbelliféryl β -glucopyranoside 0,8 mM	Sodium acétate 0,05M pH 5	Triton X-100 0,04 %	4-Méthylumbelliférone Exc=360 / Em=460
β -mannosidase	Lysosomes	4-Methylumbelliféryl β -mannopyranoside 0,8 mM	Sodium acétate 0,05M pH 5	Triton X-100 0,04 %	4-Méthylumbelliférone Exc=360 / Em=460
β -hexosaminidase	Lysosomes	4-Methylumbelliféryl N-acétyl- β -glucosaminide 0,8 mM	Sodium acétate 0,05M pH 5	Triton X-100 0,04 %	4-Méthylumbelliférone Exc=360 / Em=460
β -glucosidase	Lysosomes	4-Methylumbelliféryl β -glucopyranoside 0,8 mM	Sodium citrate 0,05M pH 5	Triton X-100 0,04 % Sodium taurocholate 0,08 %	4-Méthylumbelliférone Exc=360 / Em=460

5. WESTERN BLOTTING

Dans le cadre de ce mémoire, le Western Blot (WB) a été utilisé pour démontrer la nature du clivage effectué sur le signal M6P des protéines lysosomales-M6P. Nous avons étudié le poids moléculaire d'une protéine lysosomale membranaire, LAMP-1, dans les cellules N1E115 incubées *in vivo* en présence d'une fraction L et dans un lysat de cellules N1E115 incubé *in vitro* avec de l'endoglycosidase H. La technique de WB consiste en la séparation des protéines d'un extrait cellulaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). En fin de migration, les protéines sont transférées sur une membrane en polyvinylidène fluorure (PVDF). La présence de la protéine d'intérêt sera mise en évidence par l'intermédiaire d'anticorps. Un anticorps primaire reconnaît spécifiquement la protéine d'intérêt est reconnue par un anticorps secondaire, couplé à la peroxydase (HRP ou Horse radish Peroxydase). La détection de l'activité HRP se fait par cheluminescence.

5.1. Electrophorèse sur gel polyacrylamide

5.1.1. Principe

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS permet de séparer des protéines soumises à un champ électrique en fonction de leur poids moléculaire. Le gel de

polyacrylamide est formé par la polymérisation de monomères d'acrylamide en longues chaînes reliées entre elles par la bisacrylamide. Le gel d'acrylamide comprend deux parties : le gel de concentration (ou *stacking gel*), assez lâche, et le gel de séparation (ou *resolving gel*), dont le pourcentage d'acrylamide varie en fonction du poids moléculaire des protéines à analyser. Plus la protéine a un poids moléculaire élevé, plus le pourcentage du gel doit être faible.

5.2.2. Matériel et méthode

Tampon de solubilisation 5x	Tris-HCl pH 6,8 Glycérol Bleu de bromophénol SDS DTT	0,25M 50 % 0,5 % 10 % 0,5M	Gel de concentration (stacking gel) 5 %	Pour un gel : H ₂ O Acrylamide 30 % Tris-HCl 0,5M pH6,8 SDS 10 % APS 10 % TEMED	2,8 ml 0,83 ml 1,25 ml 50 µl 50 µl 5 µl
Tampon d'électrophorèse	Tris Glycine SDS	25 mM 192 mM 0,1 %	Gel de séparation (running gel) 8 %	Pour un gel : H ₂ O Acrylamide 30 % Tris-HCl 2M pH8,8 SDS 10 % APS 10 % TEMED	7,9 ml 4 ml 2,8 ml 150 µl 150 µl 12 µl

Pour chaque condition, 32 µl de lysat cellulaire est mélangé avec 8 µl de tampon de solubilisation 5x. Ensuite, les échantillons sont portés à 95°C pendant 5 minutes pour dénaturer les protéines et puis déposés sur gel. Un des puits est chargé avec 10 µl d'un étalon de poids moléculaire (Prosize).

5.2. Transfert des protéines sur une membrane de PVDF

5.2.1. Matériel

Membrane de PVDF Méthanol 100 % PBS-Tween 0,1 % Papier Whatman Eponges	Tampon de transfert Tris Glycine Ethanol	25 mM 192 mM 20 %
Tampons de saturation	1) Polyvinylalcool (4 mg/100 ml PBS) 2) Lait en poudre	dilué 80 fois dans du PBS-Tween 0,1 % 10 % dans du PBS-Tween 0,1 %
Tampons de lavage	1) PBS-Tween 0,05 % 2) PBS-Tween 0,3 %	
Anticorps primaire	α-LAMP-1 (1D4β) dilué 1000 fois dans du lait 5 % (dans du PBS-Tween 0,1 %)	
Anticorps secondaire	α-rat-HRP (Dako) dilué 2000 fois dans du lait 5 % (dans du PBS-Tween 0,1 %)	
Kit de révélation des anticorps (PerkinElmer Life Science, USA)		

5.2.2. Méthode

5.2.2.1. Transfert des protéines sur une membrane PVDF

Après la migration, le gel polyacrylamide est trempé dans le tampon de transfert pendant 15 minutes. En parallèle, la membrane PVDF est trempée dans du méthanol 100 % pendant 1 minute, puis dans de l'eau pendant 5 minutes et enfin dans le tampon de transfert pendant au

moins 10 minutes. Finalement, un montage est composé avec (dans l'ordre) une éponge, 3 papiers Whatman, la membrane PVDF, le gel, 3 papiers Whatman et une éponge. Ce montage est placé dans une cuve de transfert, la membrane orientée vers l'anode. Le transfert se déroule sous un ampérage de 400 mA pendant 1 heure. Après le transfert, la membrane est séchée à l'air libre.

5.2.2.2. Incubation de la membrane avec les anticorps et révélation

La membrane est humidifiée pendant 1 minute dans du méthanol 100 %, puis dans de l'eau pendant 5 minutes. Elle est ensuite incubée dans la solution de PVA pendant 1 minute, puis pendant 10 minutes dans le PBS-Tween 0,1 % avec 10 % de lait, dans le but de saturer les sites de liaison aspécifique.

La membrane est alors incubée pendant 2 heures avec l'anticorps primaire α -LAMP-1 qui a été préparé dans du PBS-Tween 0,1 %-lait 5 % à température ambiante sous légère agitation. Cette incubation est suivie de trois lavages extensifs de 5 minutes au PBS-Tween 0,05 % afin d'enlever tout anticorps primaire résiduel ou qui s'est lié de manière non-spécifique sur la membrane. Les anticorps secondaires α -rat-HRP préparés dans du PBS-Tween 0,1 %-lait 5 % sont incubés avec la membrane pendant 1 heure. Pour terminer, des lavages de 7 minutes sont effectués deux fois avec du PBS-Tween 0,3 % et 3 fois avec de PBS-Tween 0,05 %.

L'étape de révélation passe par l'imbibition pendant 1 minute de la membrane avec la solution de révélation. L'exposition des films autoradiographiques est de durée variable afin d'obtenir l'exposition optimale.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

1. MISE AU POINT D'UN MODELE POUR L'ETUDE DE L'ACTIVITE MANNOSE-6-PHOSPHATASE

1.1. Comparaison du taux d'enzymes lysosomales-M6P dans le foie et le cerveau

Dans un premier temps, nous avons comparé le taux de glycoprotéines possédant le signal M6P dans le foie et le cerveau de souris à l'aide d'une colonne de chromatographie d'affinité porteuse du récepteur M6P (colonne MPR), afin de confirmer ce qui a été décrit dans la littérature. L'équipe de Lobel avait, en effet, mis en évidence que, chez le rat, le cerveau contenait 2 à 8 fois plus de glycoprotéines M6P que les autres tissus (Sleat et al., 1996).

Des homogénats de foie et de cerveau ont été déposés sur colonne MPR. Les MPRs greffés à la résine fixent les protéines possédant le signal M6P. Suite à la récolte des différentes fractions de lavage et d'élution avec le mannose-6-phosphate (voir Matériel et Méthode), nous avons dosé l'activité des enzymes marqueurs des lysosomes (la β -galactosidase, la β -glucuronidase, la β -hexosaminidase et la β -mannosidase) dans chacune des fractions récoltées. Ces enzymes utilisent la voie du signal M6P pour arriver aux lysosomes. Nous avons également dosé la β -glucosidase acide. Celle-ci est une enzyme lysosomale membranaire qui parvient aux lysosomes par la voie indépendante du M6P et qui ne possède donc pas le signal M6P. Elle n'est dès lors pas retenue sur la colonne et passe dans la fraction *flow-through* (FT). Elle constitue donc un contrôle négatif pour mettre en évidence la spécificité des colonnes MPR. La représentation des pourcentages d'activité enzymatique retenus sur colonne MPR sous la forme d'histogrammes permet de détecter la présence du signal M6P et donc d'estimer dans le foie et le cerveau le degré de phosphorylation des différentes enzymes lysosomales que nous avons dosées.

Nos résultats, représentés sur la [figure 9](#), montrent que dans un homogénat de foie, le pourcentage d'activité enzymatique retenu sur colonne MPR est très faible (en moyenne 2,4 %). En revanche, pour le cerveau, nous observons une rétention d'activité enzymatique considérablement plus importante (en moyenne 53,4 %). Remarquons que la β -glucosidase n'est pratiquement pas retenue sur la colonne et se retrouve majoritairement dans le *flow-through*. Ceci indique que la colonne ne lie que les enzymes possédant le signal M6P.

Cette expérience nous a permis de réaffirmer ce qui a été décrit par la littérature, à savoir que le cerveau contient un pourcentage d'enzymes lysosomales possédant le signal M6P plus élevé que le foie. Le cerveau serait donc déficient en une activité mannose-6-phosphatase. Nous avons aussi pu valider la colonne d'affinité MPR, qui représente donc un système d'analyse performant pour analyser l'état de phosphorylation de l'ensemble des protéines lysosomales.

1.2. Détermination du taux d'enzymes lysosomales-M6P dans les cellules N1E115

Le cerveau n'est pas homogène au point de vue cellulaire. Il est constitué de neurones et de cellules gliales (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. En plus, l'abondance relative de plusieurs enzymes

lysosomales varie dans les neurones et les cellules gliales (Petanceska et al., 1994). Cette hétérogénéité peut donc influencer le taux d'enzymes lysosomales porteur du signal M6P. Pour cette raison, nous avons cherché un modèle cellulaire homogène représentant la même particularité que le cerveau, à savoir l'absence d'élimination du signal M6P des hydrolases acides. Les cellules N1E115 sont dérivées d'un neuroblastome murin et nous avons analysé le niveau de phosphorylation de quelques-unes de leurs enzymes lysosomales.

Des lysats des cellules N1E115 ont été déposés sur colonne MPR et le contenu enzymatique des différentes fractions récoltées a été analysé.

Comme l'indique la figure 10, le pourcentage d'activité enzymatique retenu sur colonne pour un lysat de cellules N1E115 est en moyenne de 77,7 %. Le degré de rétention sur colonne MPR n'atteint pas 100%. Il se peut qu'un encombrement du récepteur ou encore une « non-rencontre » entre le ligand et son récepteur conduise la glycoprotéine-M6P à se retrouver directement dans le *flow-through* sans être retenue sur colonne MPR. Par ailleurs, nous avons précédemment évoqué le fait que les hydrolases acides pouvaient porter un ou deux signaux M6P, ce qui influence l'affinité de leur liaison aux MPRs. Ainsi, si une enzyme lysosomale est porteuse d'un seul signal M6P, elle se lie avec moins d'affinité au MPR et peut déjà être éluee lors des étapes de lavage. Signalons enfin que la β -glucosidase n'est pratiquement pas retenue sur la colonne MPR étant donné que son activité se retrouve quasiment entièrement dans le *flow-through*.

De la même manière que le cerveau, il semble que les cellules N1E115 ne possèdent pas ou peu l'activité d'élimination du M6P des enzymes lysosomales M6P-dépendant. Ces résultats indiquent que les cellules N1E115 constituent un bon modèle pour étudier la déphosphorylation des enzymes lysosomales afin d'identifier la mannose-6-phosphatase responsable du clivage du signal M6P. Les hydrolases acides des cellules N1E-115 constituent en effet un substrat approprié pour mettre en évidence cette activité de déphosphorylation.

2. LOCALISATION DE L'ACTIVITE MANNOSE-6-PHOSPHATASE DANS LE FOIE DE SOURIS

2.1. Préparation d'une source d'activité mannose-6-phosphatase : fractionnement de foie de souris

2.1.1. Fractionnement de foie de souris

Comme nous l'avons observé plus haut, le foie élimine efficacement le signal M6P des hydrolases acides. Ceci suggère la présence d'une mannose-6-phosphatase active dans cet organe. Nous avons donc utilisé le foie comme source d'une activité mannose-6-phosphatase afin d'étudier l'élimination du signal M6P des enzymes lysosomales dans les cellules N1E115.

Un homogénat de foie de souris a été soumis à un fractionnement par centrifugation différentielle selon le protocole établi par De Duve et al. (De Duve et al., 1955). La mesure de l'activité d'une enzyme spécifique d'un organite subcellulaire permet de suivre sa distribution dans les cinq fractions. Les enzymes de référence sont la β -galactosidase et la β -hexosaminidase pour les lysosomes, la phosphodiesterase alcaline (PDase) pour la membrane plasmique et l' α -glucosidase alcaline pour le réticulum endoplasmique. Les résultats sont exprimés sous la forme d'histogrammes avec en ordonnée l'activité spécifique relative (ASR) et en abscisse le pourcentage cumulé de protéines dans les fractions successives N, M, L, P et S. La hauteur de chaque fraction est indicative de la purification de l'activité considérée. La surface de chaque fraction représente le pourcentage d'activité dans cette fraction.

La [figure 11](#) représente la distribution des différentes enzymes marqueurs. Le profil de distribution des enzymes marqueurs est celui observé classiquement après centrifugation d'un homogénat de foie de souris (Lecocq et al., 2003) : les lysosomes sédimentent majoritairement dans les fractions M et L, les fragments du réticulum endoplasmique dans la fraction P et les feuillettes et vésicules dérivés de la membrane plasmique se retrouvent respectivement dans les fractions N et P.

Comme la fraction MLP contient la majorité des organites subcellulaires, nous avons décidé d'utiliser cette fraction comme source de mannose-6-phosphatase.

2.1.2. Détection d'une activité de déphosphorylation dans une fraction MLP de foie de souris

Pour tester l'éventuelle présence d'une activité mannose-6-phosphatase, nous avons incubé les cellules N1E115 en présence d'une fraction MLP de foie de souris et analysé son contenu en glycoprotéines-M6P. L'activité mannose-6-phosphatase n'étant pas connue, nous ne pouvons pas la doser directement. C'est pourquoi, nous mesurons la diminution d'enzymes lysosomales retenues ou non sur colonne MPR en mesurant leur activité (la β -galactosidase, la β -glucuronidase, la β -hexosaminidase et la β -mannosidase) dans l'éluat et le *flow-through*. Ceci traduit l'activité de déphosphorylation des fractions de foie de souris. Nous avons essayé de déterminer la quantité de matériel à déposer, ainsi que le temps d'incubation nécessaire pour observer un effet de diminution de rétention sur colonne MPR suffisamment significatif.

Afin de standardiser le volume de fraction de foie à déposer sur les cellules, nous avons décidé de travailler avec une quantité déterminée d'« unités d'activité β -galactosidase » ou de quantité de protéines. Les unités d'activité β -galactosidase sont calculées à partir de valeurs obtenues au fluorimètre pour chaque fraction et représentent donc des valeurs relatives. Ainsi, nous avons déposé sur les cellules N1E115 15, 30 et 60 μ l de la MLP qui correspondent respectivement à 250, 500 et 1000 μ g de protéines, et qui, en activité β -galactosidase, égalent 5500, 11000 et 22000 unités. Après 4 heures d'incubation, nous avons analysé le contenu en glycoprotéines-M6P des lysats cellulaires par colonne MPR et dosé l'activité des enzymes marqueurs du compartiment lysosomal dans les différentes fractions récoltées.

La [figure 12](#) nous montre qu'après 4 heures d'incubation, la diminution de rétention des activités enzymatiques sur colonne MPR n'est pas totale pour les différents volumes déposés bien qu'elle soit croissante en fonction de la dose de fraction MLP. Comme attendu, la β -glucosidase ne présente pas de rétention sur la colonne quelle que soit la quantité de matériel incubé. Il semble donc qu'un temps d'incubation de 4 heures ne soit pas suffisant pour observer une diminution totale de rétention. Nous avons donc décidé de répéter la même expérience au cours du temps (0, 1, 2, 4, 7 et 16 heures d'incubation) avec une fraction MLP contenant 1000 μ g de protéines ou 22000 unités d'activités β -galactosidase. Pour chaque temps d'incubation, nous avons de nouveau analysé les lysats cellulaires sur colonne MPR et dosé dans chaque fraction l'activité enzymatique des mêmes enzymes.

Les résultats obtenus pour cette dernière expérience sont présentés à la [figure 13](#). Nous observons une diminution significative de rétention des activités enzymatiques sur colonne au cours du temps. La β -glucosidase qui sert de contrôle négatif n'est pas retenue sur colonne MPR quelles que soient les conditions d'incubation.

Nous avons également vérifié que l'activité des hydrolases acides dans les cellules incubées en présence d'une fraction MLP n'est pas différente de celle des cellules non traitées. Ceci indique que le pourcentage d'enzymes lysosomales, provenant de la fraction MLP de foie de souris, internalisé par les cellules N1E115 est très faible et que ces enzymes n'interfèrent pas avec le système d'analyse.

Cette diminution de rétention des activités enzymatiques retenues sur colonne MPR est la conséquence directe de la diminution de la proportion d'enzymes lysosomales porteuses du signal M6P dans les cellules N1E115. Cela implique donc, dans la fraction MLP, la présence d'un agent qui permet une diminution de rétention d'activité sur colonne MPR, c'est à dire une élimination du signal M6P des enzymes lysosomales dépendantes du M6P.

2.2. Localisation de l'activité de déphosphorylation dans les fractions M, L et P de foie de souris

Sur base de l'expérience précédente et dans le but de localiser l'activité de diminution de rétention sur colonne MPR, nous avons déposé séparément les fractions M, L et P sur les cellules N1E115 et analysé l'effet de diminution de rétention au cours du temps. La partie linéaire de la courbe permet de tracer une droite de régression dont la pente représente l'activité de la mannose-6-phosphatase. Une fois cette valeur d'activité déterminée, il nous est possible de calculer l'activité spécifique relative (ASR).

Pour pouvoir suivre la distribution de l'activité mannose-6-phosphatase dans les fractions M, L et P, nous devons déposer pour chaque fraction une quantité égale de protéines sur les cellules N1E115. Nous avons choisi de déposer soit 250 µg soit 1000 µg de protéines. Après incubation, les cellules sont lysées et analysées sur colonne MPR. L'activité de plusieurs enzymes lysosomales est ensuite mesurée dans les différentes fractions récoltées après passage sur colonne MPR.

Suite au dépôt de 250 µg de protéines des fractions M, L et P, nous avons déterminé le pourcentage d'activité enzymatique retenu sur colonne MPR au cours du temps. Comme l'illustre la figure 14, l'activité enzymatique retenue sur colonne MPR diminue le plus après dépôt d'une fraction L. En effet, entre 0 et 16 heures d'incubation des fractions en présence des cellules N1E115, la diminution de rétention sur colonne est en moyenne de 18 % pour la fraction M, de 35 % pour la fraction L et de 10 % pour une fraction P. Nous observons également que le pourcentage d'activité enzymatique retenu sur colonne arrive à un plateau à partir de 7 heures d'incubation et ceci pour les trois fractions. Nous avons ensuite tracé la droite de régression sur la partie linéaire de chaque courbe, qui se situe entre 0 et 4 heures d'incubation. L'équation de chaque droite de régression est reprise dans le tableau 1.

A partir de la pente de chaque droite de régression, nous avons calculé l'ASR que nous avons représenté sous forme d'histogramme en fonction du pourcentage de protéines de chaque fraction (figure 15a). Nous observons que l'ASR est élevée dans la fraction L pour la déphosphorylation de la β -hexosaminidase et la β -mannosidase. Le pourcentage d'activité de déphosphorylation est élevé dans les fractions M et P (tableau 1). Il faut noter que la pente de la droite de régression de la fraction P pour la β -glucuronidase et la β -galactosidase est faussée par la position du premier point (0 heure). Nous avons donc probablement surestimé l'action de la fraction P et ceci rend les résultats de distribution de l'activité de déphosphorylation de la ces deux enzymes difficile à interpréter.

		N	M	L	P	S
Dilution primaire		5	2,05	2	2	15,29
% protéines		26,80	25,95	3,29	19,18	24,78
Concentration de protéines (mg/ml)			35,1570	4,5740	26,6368	
β-galactosidase	 pente		1,3648	2,9558	3,3877	
	% activité		31,62	8,91	59,47	
	ASR		1,22	2,71	3,10	
β-glucuronidase	 pente		2,5863	3,5343	3,4104	
	% activité		45,94	8,17	45,9	
	ASR		1,77	2,48	2,39	
β-hexosaminidase	 pente		2,6304	4,8266	1,5398	
	% activité		59,44	14,19	26,36	
	ASR		2,29	4,31	1,37	
β-mannosidase	 pente		3,3019	9,0728	2,166	
	% activité		53,92	19,28	26,80	
	ASR		2,08	5,85	1,40	

Tableau 1. La pente de la droite de régression, le pourcentage d'activité de diminution de rétention sur colonne MPR et l'activité spécifique relative dans les fractions M, L et P pour 250 µg de protéines incubées en présence des cellules N1E115.

Parallèlement à l'activité responsable de la diminution de rétention sur colonne MPR, nous avons représenté l'activité des enzymes lysosomales de référence (β-glucuronidase, β-galactosidase, β-mannosidase, β-hexosaminidase) dans les fractions M, L et P. La [figure 15b](#) montre que le profil de distribution des enzymes lysosomales est similaire à celui de la diminution de rétention sur colonne MPR (pour la déphosphorylation des enzymes β-hexosaminidase et β-mannosidase), mais avec un pourcentage d'activité enzymatique plus faible dans la fraction P.

Nous avons répété la même expérience en déposant 1000 µg de protéines des fractions M, L et P sur les cellules N1E115. Les fractions à partir desquelles nous avons travaillé pour cette manipulation proviennent d'un nouveau fractionnement. Comme en témoigne le résultat du dosage des enzymes de références lysosomales ([figure 17b](#)), ce fractionnement ne s'est pas déroulé correctement. En effet, suite à un mauvais lavage et décantation lors de la préparation de la fraction N, le pourcentage de protéines dans la fraction N est très élevé. La répartition classique des protéines au sein des fractions N, M, L, P et S étant respectivement d'à peu près 20, 30, 5, 15 et 30 %, elle est dans ce cas-ci de 53, 17, 5, 15 et 10 %.

Suite à l'analyse sur colonne MPR des lysats cellulaires et l'analyse de leur contenu en hydrolases acides-M6P, nous avons également obtenu des courbes de diminution de rétention en fonction du temps. Celles-ci nous ont permis d'établir des droites de régression et d'obtenir l'activité de diminution de rétention pour chaque enzyme marqueur lysosomal ([figure 16](#)). Les équations des droites de régression sont indiquées dans le [tableau 2](#).

Les profils de distribution de l'activité de diminution de rétention sur colonne MPR sont, de nouveau, semblables à ceux des enzymes lysosomales ([figures 17a et 17b](#)), avec cependant une augmentation de l'activité de diminution de rétention sur colonne MPR dans la fraction P.

		N	M	L	P	S
Dilution primaire		5	2	2	2	8,89
% protéines		52,73	17,13	4,68	15,15	10,30
Concentration de protéines (mg/ml)			21,9780	5,9932	19,3836	
β-galactosidase	pente		5,8978	7,2505	4,105	
	% activité		51,31	17,20	31,49	
	ASR		2,99	3,67	2,08	
β-glucuronidase	pente		8,3842	11,107	4,5988	
	% activité		54,2	19,58	26,22	
	ASR		3,16	4,18	1,73	
β-hexosaminidase	pente		8,1968	10,236	6,7511	
	% activité		48,38	16,48	35,14	
	ASR		2,82	3,52	2,32	
β-mannosidase	pente		11,508	13,821	6,3279	
	% activité		55,17	18,07	26,76	
	ASR		3,22	3,86	1,77	

Tableau 2. La pente de la droite de régression, le pourcentage d'activité de diminution de rétention sur colonne MPR et l'activité spécifique relative dans les fractions M, L et P pour 1000 µg de protéines incubées en présence des cellules N1E115.

Ces résultats sembleraient indiquer que l'activité de diminution de rétention serait un agent localisé dans des compartiments endosomes-lysosomes, qui sédimentent dans les fractions M, L et P.

2.3. Localisation de l'activité de déphosphorylation dans la fraction ML : effet d'une injection de Triton WR 1339

En vue de vérifier cette hypothèse sur la localisation de l'agent mannose-6-phosphatase dans les lysosomes, nous avons réalisé une centrifugation isopycnique sur gradient saccharose d'une fraction ML de foie de souris ayant reçue une injection de Triton WR 1339. Le Triton WR 1339 est un détergent synthétique non ionique. Suite à son injection, il est endocyté par les cellules et s'accumule dans les lysosomes et provoque un allègement de ces organites (Wattiaux et al., 1963). Des fractions de ce gradient saccharose sont déposées sur cellules N1E115 afin de vérifier la présence ou non de l'activité responsable de la diminution de rétention sur colonne MPR.

2.3.1. Centrifugation isopycnique sur gradient de saccharose

Des fractions ML provenant d'un fractionnement de foie de souris normale et d'un foie de souris injectée au Triton WR 1339 ont été analysées par centrifugation isopycnique sur un gradient saccharose.

Les résultats de la centrifugation isopycnique sont repris à la [figure 18](#). Nous remarquons que les lysosomes de la fraction ML de foie de souris contrôle ont migré à une densité médiane d'environ 1,2 g/ml, ainsi que le démontre la distribution de l'activité de la β-galactosidase. C'est la densité classique à laquelle s'équilibrent les lysosomes (Wattiaux et al., 1963). En revanche,

nous remarquons que les lysosomes dans la fraction ML de foie de souris Triton s'équilibrent à une densité médiane plus légère de 1,13 g/ml. Suite à l'injection de Triton WR 1339, le profil de distribution des hydrolases lysosomales s'est nettement déplacé vers les zones de faibles densités du gradient. Des résultats semblables ont été obtenus pour la β -glucuronidase, la β -hexosaminidase et la β -mannosidase (résultats non montrés). Dans le gradient contrôle, les endosomes précoces s'équilibrent à une densité de 1,10 à 1,13 g/ml, alors que les endosomes tardifs s'équilibrent à une densité de 1,18 g/ml (Courtoy, P.J., 1992). L'effet du Triton WR 1339 sur la densité des endosomes tardifs n'est pas connu et nous ne pouvons donc pas localiser ces organites.

Nous pouvons conclure que l'analyse par centrifugation isopycnique des fractions ML « contrôle » et « Triton » déposées sur gradient saccharose permet d'isoler des fractions enrichies en enzymes lysosomales. Les fractions du gradient saccharose après centrifugation isopycnique sont donc exploitables pour la seconde étape de notre expérience, à savoir, essayer de localiser de manière plus précise la mannose-6-phosphatase.

2.3.2. Incubation des fractions du gradient saccharose sur cellules N1E115

Comme nous l'avons expliqué plus haut, une injection de Triton WR 1339 provoque un déplacement des lysosomes vers les zones de faible densité du gradient. Dès lors, si un composé est présent dans les lysosomes, sa distribution après une centrifugation isopycnique subira un même glissement vers les zones de faible densité du gradient (Misquith et al., 1988). Cependant, l'activité de la mannose-6-phosphatase doit être déterminée de façon indirecte. Pour cette raison, nous avons déposé ces fractions enrichies en lysosomes sur les cellules N1E115. Si la mannose-6-phosphatase est lysosomale, l'activité de diminution de rétention sur colonne MPR sera déplacée vers des fractions de plus faible densité.

Pour chacun des deux gradients, nous avons mélangé les fractions correspondant aux pics d'activités de la β -galactosidase. Ainsi, les fractions 8 à 12 du gradient saccharose contrôle et 2 à 5 du gradient saccharose Triton ont été déposées sur cellules. Chaque mélange incubé en présence des cellules correspond à 15 000 unités d'activité β -galactosidase. Comme contrôle négatif, les fractions 2 à 5 du gradient saccharose contrôle et 8 à 12 du gradient saccharose Triton ont également été mélangées et un même volume a été déposé sur cellules N1E115. Par ailleurs, nous avons également incubé les fractions ML contrôle et ML Triton correspondant à 15 000 unités d'activité β -galactosidase afin de s'assurer que le Triton n'affecte pas l'activité mannose-6-phosphatase. Au bout de 16 heures d'incubation, nous avons analysé les lysats cellulaires sur colonne MPR et dosé leur contenu en glycoprotéines-M6P.

Les pourcentages d'activité enzymatique retenus sur colonne MPR, correspondant au taux d'enzymes lysosomales-M6P suite à cette expérience, sont montrés sur la [figure 19](#). Il semble que le Triton n'affecte pas l'activité mannose-6-phosphatase, car après incubation de fraction ML provenant d'un foie normal et de foie injecté au Triton, la diminution de rétention sur colonne MPR est significativement élevée dans les deux cas.

Après incubation des cellules N1E115 en présence des fractions 8 à 12 du gradient contrôle (qui contiennent les lysosomes et les endosomes tardifs), le pourcentage d'activité enzymatique retenu sur colonne MPR est faible (en moyenne 18,2 %) ([figure 20](#)). Par contre, après incubation des fractions 8 à 12 provenant d'une fraction ML Triton, ce pourcentage a augmenté (en moyenne 53,5%). Ceci indique que l'activité mannose-6-phosphatase est présente dans des compartiments affectés par le Triton WR 1339. L'incubation des cellules N1E115 en présence des fractions 2 à 5 du gradient contrôle met également en évidence une activité de diminution de rétention sur colonne MPR, indiquant la présence de cette activité dans des compartiments prélysosomaux s'équilibrant à une densité de 1,09 à 1,14 g/ml. Cette zone du gradient correspond à la zone d'équilibration des endosomes précoces. L'activité de déphosphorylation

présente dans les fractions 2 à 5 est encore renforcée après traitement après une injection au triton WR 1339. Ceci pourrait être attribué à la présence dans ces fractions à la fois de lysosomes allégés et des endosomes précoces.

L'ensemble des résultats semble indiquer que l'agent responsable de la diminution de rétention sur colonne MPR est localisé dans les compartiments affectés par le Triton WR 1339 dont les candidats potentiels sont les lysosomes. Il semble aussi être présent au niveau des endosomes précoces, mais nous ne pouvons pas exclure la présence de l'agent dans les endosomes tardifs.

2.4. Localisation intra-endolysosomale de la mannose-6-phosphatase

Afin de déterminer si l'activité de diminution de rétention sur colonne est localisée dans la lumière du lysosome ou au niveau des membranes lysosomales, nous avons soumis une fraction L de foie de souris à un choc osmotique. Ainsi, nous avons obtenu une fraction L soluble et une fraction L membranaire. Après dosage de l'activité de la β -galactosidase dans les fractions soluble et membranaire, nous retrouvons 78 % de l'activité dans la fraction soluble et 22 % de l'activité dans la fraction membranaire. Après avoir soumis la fraction membranaire à des cycles de sonication, l'activité β -galactosidase qui y est dosée tombe à 7 %.

Nous avons déposé sur les cellules N1E115 15000 unités d'activité β -galactosidase de fraction L et de fraction L soluble. Pour la fraction L membranaire contenant très peu d'activité β -galactosidase, nous avons déposé un volume équivalent au volume de la fraction L soluble déposée sur les cellules. Après 4 heures d'incubation, nous avons analysé les lysats cellulaires sur colonne MPR et ensuite dosé l'activité enzymatique M6P retenue sur colonne MPR des enzymes marqueurs des lysosomes.

Les résultats, repris sur la [figure 21](#) montrent que le pourcentage d'activité enzymatique retenu sur colonne MPR après incubation d'une fraction L membranaire est comparable à la situation contrôle, où les cellules sont non-traitées. Nous observons toutefois, par comparaison avec le contrôle, un léger effet de diminution de rétention sur la colonne MPR, en raison de l'impossibilité de séparer toute enzyme soluble de la fraction L membranaire. La fraction L soluble, en revanche, semble induire la même diminution de rétention sur colonne qu'une fraction L.

Ces résultats indiquent que l'activité de diminution de rétention sur colonne est associée à la fraction L soluble, ce qui suggère une localisation dans la lumière des endolysosomes de l'enzyme.

3. CARACTERISATION DE L'ACTIVITE MANNOSE-6-PHOSPHATASE

3.1. Effet du chauffage sur l'activité de déphosphorylation

Nous avons voulu déterminer la nature de l'activité mannose-6-phosphatase. Dans ce but, nous avons chauffé une fraction L et vérifié l'activité de déphosphorylation, ainsi qu'à titre de contrôle, l'activité β -galactosidase.

Une fraction L est chauffée à 95°C pendant 5 minutes avant d'être déposée sur les cellules N1E115. Nous avons tout d'abord vérifié, dans la fraction L chauffée, que l'activité β -galactosidase est détruite après ce traitement. De plus, après 4 heures d'incubation de cette

fraction L chauffée, sur les cellules N1E115, le lysat cellulaire est analysé sur colonne MPR et un dosage de l'activité enzymatique retenue sur la colonne est effectué.

La figure 22 montre qu'après avoir chauffé une fraction L, nous n'observons pas de diminution de rétention des activités enzymatiques des marqueurs lysosomaux sur colonne MPR.

L'activité mannose-6-phosphatase ou de déphosphorylation s'avère donc sensible à la température, ce qui indique que cette activité est de type protéique.

3.2. Détermination du point isoélectrique de la mannose-6-phosphatase

En vue d'effectuer une purification sur colonne d'affinité échangeuse d'anions, nous avons déterminé le point isoélectrique (pI) de l'agent de déphosphorylation. En effet, le principe de séparation sur lequel repose cette méthode de purification est basé sur la différence de charge des protéines. Si les protéines sont dans un milieu où le pH est supérieur à leur pI, elles seront chargées négativement, ce qui permet leur liaison à la colonne d'affinité échangeuse d'anions chargée positivement. Au contraire, si le pH du milieu environnant est inférieur au pI, les particules se retrouvent sous leur forme positive et, à défaut de se lier à la colonne, passent directement dans le *flow-through*. C'est pourquoi il est nécessaire de déterminer le pH optimal auquel travailler afin de permettre à un maximum de molécules de mannose-6-phosphatase de se lier à une colonne échangeuse d'anions.

Nous avons incubé des fractions L solubles à des pH croissants allant de 4 à 8, pendant 30 minutes à 4°C en présence de la DEAE-cellulose. Après centrifugation du mélange, nous avons récupéré les surnageants que nous avons incubés en présence des cellules N1E115 pendant 4 heures. Tant que le pH est inférieur au pI de la mannose-6-phosphatase, l'enzyme ne se lie pas à la résine et reste donc dans le surnageant. Dans le cas où le pH est supérieur au pI de la mannose-6-phosphatase, celle-ci sera chargée négativement et sera absente du surnageant. Au terme du temps d'incubation, nous avons analysé les lysats cellulaires sur colonne MPR et dosé dans les fractions récoltées les activités enzymatiques retenues sur colonne MPR. Afin de s'assurer que l'incubation aux différents pH n'altère pas l'activité enzymatique, nous avons comparé l'activité de déphosphorylation contenu dans une fraction L soluble contrôle et dans des fractions L solubles incubées aux différents pH (de pH 4 à 8) pendant 30 minutes à 4C.

Sur la figure 23, nous observons qu'à partir d'un pH supérieur à 6, le pourcentage d'activités enzymatiques retenues sur colonne MPR augmente. Ceci indique que l'activité mannose-6-phosphatase n'est plus présente dans le surnageant déposé sur cellules et suggère donc une liaison de l'enzyme à la résine. Nous avons également observé que l'activité mannose-6-phosphatase diminue après une incubation de la fraction L soluble à pH 8.

Suite à cette expérience, nous supposons que le pI de la mannose-6-phosphatase est inférieur à 7. Nous travaillerons à pH 7 pour tenter de purifier sur colonne échangeuse d'anions la mannose-6-phosphatase. En effet, le fait d'effectuer les expériences à pH 7 permet d'éliminer les protéines possédant un pI supérieur à celui-ci et qui, chargées positivement, se retrouveront dans le *flow-through*.

3.3. Pulse-chase de la fraction L sur les cellules N1E115

L'incubation d'une fraction L de foie de souris en présence des cellules N1E115 conduit à une diminution de rétention des activités enzymatiques lysosomales sur colonne MPR. Afin de préciser le temps de contact nécessaire entre la fraction L et les cellules pour observer cet effet, nous avons effectué une expérience de *pulse-chase*.

Nous avons déposé sur les cellules N1E115 des volumes de fraction L correspondant à 30000 unités d'activité β -galactosidase et les avons incubées pendant 30 minutes, 1 heure et 4 heures (*pulse*). Ensuite nous avons retiré le milieu de culture cellulaire et remis un milieu frais afin d'éliminer toute trace de fraction L. Après un temps d'incubation total de 4 heures, nous avons analysé les lysats cellulaires sur colonne MPR et quantifié le contenu en glycoprotéines-M6P.

Quel que soit le temps de contact (ou *pulse*), nous observons un effet de diminution de rétention d'activité sur colonne MPR ([figure 24](#)). Cependant, pour un *pulse* de 30 minutes et 1 heure, l'effet de diminution de rétention, après un temps d'incubation total de 4 heures, n'est pas très significatif. Par contre, après 4 heures de contact en présence des cellules, nous observons une nette diminution de rétention d'activité sur colonne MPR.

Ces résultats indiquent que l'effet de diminution de rétention sur colonne MPR n'est pas immédiat et que pour observer une diminution nette de rétention sur colonne MPR, il faut un temps de contact minimum de 4 heures entre les cellules et l'agent responsable de la diminution de rétention sur colonne MPR.

3.4. Effet de la déglycosylation des enzymes lysosomales-M6P sur leur liaison avec le MPR

L'effet de diminution de rétention des activités enzymatiques lysosomales sur colonne MPR observé jusqu'à présent correspond concrètement à une diminution dans les cellules de la proportion des hydrolases acides-M6P et, en d'autres termes, à la perte du signal M6P des hydrolases acides.

Cependant, la diminution de rétention sur colonne MPR peut-être due soit à une déphosphorylation, soit à une déglycosylation des enzymes lysosomales, ce qui conduit dans les deux cas à une perte du signal M6P.

3.4.1. Effet de l'endoglycosidase H

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier la perte du signal M6P après incubation des cellules N1E115 en présence de l'endoglycosidase H (endo H). L'endo H est une endoglycosidase qui clive uniquement les sucres haut-mannose, dont ceux qui portent le signal M6P.

Un lysat cellulaire a été incubé à 37°C pendant 6 heures en présence de l'endo H (*in vitro*). Ensuite, le lysat a été directement analysé sur colonne MPR. Un dosage enzymatique des fractions récoltées par colonne MPR a été effectué. A titre de comparaison, nous avons également incubé une fraction L en présence des cellules N1E115 pendant 4 heures (*in vivo*).

La [figure 25a](#) montre clairement qu'il y a un effet de diminution de rétention sur colonne, que les cellules aient été incubées avec la fraction L ou avec l'endo H, avec cependant un effet beaucoup plus marqué par l'endo H.

Ceci prouve que l'endo H, au même titre que la fraction L, engendre une perte du signal M6P des enzymes lysosomales dépendantes du M6P.

3.4.2. Etude de la déglycosylation de LAMP-1 en *Western Blot*

Afin de savoir si la perte du signal est engendrée par une déglycosylation ou une déphosphorylation, nous avons effectué un *Western Blot* (WB) afin de comparer le poids moléculaire d'une protéine soumise à l'effet d'une fraction L et de l'endo H. En effet, les hydrates de carbone porteur du M6P présentent un poids moléculaire plus important qu'un phosphate seul et donc leur enlèvement induira une diminution de poids moléculaire décelable

par rapport à une déphosphorylation seule. La protéine que nous avons choisie d'étudier est LAMP-1, car nous n'avons pas à notre disposition d'anticorps dirigés contre des hydrolases solubles.

Suite aux incubations *in vitro* et *in vivo* précédemment réalisées, nous avons déposé les lysats cellulaires sur gel. Après migration et transfert sur membrane PVDF, nous avons détecté LAMP-1 à l'aide d'anticorps spécifiques.

La figure 25b montre que le poids moléculaire des LAMP-1, après traitement des cellules à l'endo H a diminué, ce qui correspond à une déglycosylation partielle. Cette observation correspond au résultat attendu, car l'endo H ne clive que les hydrates de carbone haut-mannose et non les hydrates de carbone de type complexe, alors que LAMP-1 porte majoritairement des hydrates de carbone complexes. L'incubation en présence d'une fraction L n'induit aucune modification décelable de poids moléculaire de LAMP-1.

Ces résultats suggèrent donc que l'agent responsable de la perte du signal M6P ne serait pas une glycosidase. Il faut cependant noter que LAMP-1 n'est pas une protéine soluble. Elle ne porte donc aucun signal M6P. Nous pouvons cependant émettre l'hypothèse que si l'agent de diminution de rétention sur colonne MPR, apporté par la fraction L ne possède pas d'activité endoglycosidase capable de déglycosyler LAMP-1, il n'est probablement pas en mesure de le faire pour les enzymes lysosomales-M6P.

3.5. Comparaison de l'activité mannose-6-phosphatase dans le foie et le cerveau

Comme nous l'avons démontré précédemment, le foie de souris, contrairement au cerveau, a la capacité de déphosphoryler les précurseurs lysosomaux. De plus, des fractions lysosomales provenant de foie de souris incubées en présence des cellules N1E115 induisent, comme nous l'avons suggéré plus haut, une déphosphorylation des enzymes lysosomales de ces cellules. Au cours de cette expérience, nous avons vérifié si des fractions lysosomales provenant du cerveau de souris sont en mesure ou non de déphosphoryler les enzymes lysosomales des cellules N1E115.

Des fractions MLP préparées à partir d'un homogénat de foie et de cerveau de souris sont incubées pendant 16 heures en présence des cellules N1E115. Nous avons décidé d'incuber une même quantité de protéines (2000 µg) et une même quantité d'unités d'activité β-galactosidase (11000 et 30000 unités d'activité) contenus dans les deux fractions MLP.

La figure 26 montre que, quelle que soient les unités d'activité β-galactosidase ou la quantité de protéines déposées, la fraction MLP provenant du cerveau n'induit qu'une légère diminution de rétention sur colonne MPR. En effet, les pourcentages de rétention sont en moyenne de 15,1 % et de 52,0 % pour les fractions MLP de foie et de cerveau respectivement.

Ces résultats semblent indiquer que soit le cerveau ne possède pas d'activité de déphosphorylation soit une activité moindre que dans le foie.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

1. DISCUSSION GENERALE

Le transport intracellulaire des enzymes lysosomales solubles est une voie impliquant de nombreuses molécules et enzymes. Cette voie repose en premier lieu sur l'addition d'un signal mannose-6-phosphate (M6P) qui permet l'adressage spécifique des hydrolases acides vers le compartiment endo-lysosomal via la reconnaissance du signal M6P par son récepteur MPR. Dans la plupart des types cellulaires, ce signal est rapidement enlevé quand les enzymes lysosomales atteignent les lysosomes. Cependant, dans le cerveau et dans certains types de cellules en culture, ce signal n'est peu ou pas enlevé, conduisant à une augmentation de la proportion d'enzymes lysosomales-M6P (Sleat et al., 1996).

Nous avons entrepris cette étude dans le but d'identifier l'agent responsable du clivage du M6P. Deux phosphatases acides lysosomales connues, la phosphatase acide lysosomale (LAP), ubiquiste, et la phosphatase acide de type 5 résistante au tartrate (Acp5) ne semblent pas impliquées dans le clivage du signal M6P. En effet, des études sur des souris knock-out doublement déficientes pour ces deux phosphatases les ont exclues comme candidates potentielles à l'élimination du signal M6P (Suter et al., 2001). Dans les fibroblastes des souris knock-out, les enzymes lysosomales sont déphosphorylées aussi efficacement que dans les fibroblastes de souris sauvages. De plus, une activité de la phosphatase acide lysosomale a été détectée dans des cellules incapables de déphosphoryler les enzymes lysosomales M6P (Jadot et al., 1999). Par ailleurs, il semblerait que l'activité mannose-6-phosphatase soit localisée dans un compartiment endo-lysosomal (Bresciani and Von Figura, 1996; Gabel and Foster, 1987; Gabel et al., 1982).

Un moyen de déterminer l'activité mannose-6-phosphatase dans un tissu ou un type cellulaire est d'examiner le pourcentage d'enzymes lysosomales-M6P retenu sur colonne MPR (un support Affigel sur lequel est fixé le récepteur Mannose-6-phosphate-CI). En présence d'une activité mannose-6-phosphatase élevée, le pourcentage retenu sur la colonne sera faible et, inversement, si l'activité mannose-6-phosphatase est faible, un pourcentage élevé d'enzymes lysosomales-M6P restera fixé sur la colonne.

Dans un premier temps nous avons confirmé la **capacité moindre du cerveau** à éliminer le signal M6P des hydrolases acides lysosomales. Nos résultats montrent de façon évidente que le cerveau n'élimine pas efficacement le signal M6P de sa population d'enzymes lysosomales. En effet, les pourcentages de rétention d'activité enzymatique sur colonne MPR sont nettement supérieurs pour le cerveau (53,4 %) que pour le foie (2,4 %). Ces pourcentages ne sont pas uniformes et présentent une certaine variation entre les différents enzymes lysosomales mesurées. Ainsi, le pourcentage de rétention d'activité enzymatique sur colonne MPR est moindre pour la β -hexosaminidase (de l'ordre de 30 % contre 60 % pour les autres enzymes dosées). Ces résultats sont en accord avec ceux de Sleat (Sleat et al., 1996). Ces auteurs ont obtenu de pareilles variations lorsqu'ils ont dosé le taux de phosphorylation et donc de signal mannose-6-phosphate de différentes enzymes lysosomales dans le cerveau de rat.

Une des raisons possibles pour expliquer cette variation est l'hétérogénéité cellulaire du cerveau. Celui-ci comporte, outre les cellules neuronales, les cellules gliales qui sont environ 10 fois plus nombreuses. Parmi ces dernières, les astrocytes sont les plus abondantes. On peut supposer que le contenu en enzymes lysosomales et en mannose-6-phosphatase soit différent

d'un type cellulaire à l'autre. De plus, une étude de la localisation des enzymes lysosomales M6P dans le cerveau, combinant des approches biochimiques et morphologiques, a montré qu'elles sont essentiellement présentes dans les lysosomes des neurones, reflétant une capacité moindre de ces cellules à éliminer le signal M6P (Jadot et al., 1999).

Par conséquent, le fait que les différentes hydrolases lysosomales ont un taux de phosphorylation différent exprime la différence d'activité mannose-6-phosphatase vis-à-vis des différentes hydrolases lysosomales. Cette variation peut être due :

- 1) soit à une activité mannose-6-phosphatase différente vis-à-vis de différents substrats. Par exemple, le nombre de M6P peut être différent d'une enzyme lysosomale à l'autre de même que son taux / nature de glycosylation. L'efficacité de la déphosphorylation serait variable en fonction de la nature du substrat.
- 2) soit à une activité de M-6-phosphatase et/ou d'enzymes lysosomales-M6P déterminée et différente d'un type cellulaire à l'autre.

Nous pourrions donc supposer que les enzymes lysosomales possédant le signal M6P proviendraient des cellules neuronales, incapables d'éliminer efficacement le signal tandis que les enzymes dépourvues du signal M6P appartiendraient aux cellules gliales qui, pour leur part, pourraient l'éliminer efficacement.

Afin d'éliminer ce facteur possible d'hétérogénéité et de faciliter l'interprétation des résultats, nous avons cherché un modèle cellulaire homogène. Notre choix s'est porté sur les **cellules N1E115**, des cellules de neuroblastome murin. Leur caractérisation présente un pourcentage de rétention d'enzymes lysosomales-M6P sur colonne MPR élevé et homogène (en moyenne 77,7 %) et plus précisément de 88 % pour la β -glucuronidase, 73 % pour la β -galactosidase, 68 % pour la β -hexosaminidase et 82 % pour la β -mannosidase.

Nous avons ensuite étudié la **localisation subcellulaire de la mannose-6-phosphatase de foie de souris**. A cet effet, les substrats utilisés sont les enzymes lysosomales de cellules N1E115, qui, comme nous l'avons démontré, sont fortement phosphorylées et donc retenues sur la colonne MPR.

La technique de fractionnement subcellulaire nous indique que la distribution de l'activité de déphosphorylation est étalée dans les fractions M, L et P. Toutefois, le pourcentage d'activité de déphosphorylation dans la fraction P est plus élevé que celui des enzymes lysosomales de référence. Ce résultat suppose donc une localisation endosomes-lysosomes.

Afin de préciser cette localisation, nous avons effectué des gradients de saccharose isopycniques à partir d'une fraction ML de foie de souris contrôle et de foie de souris injectée 4 jours auparavant de Triton WR 1339. Ce composé a comme effet de provoquer une surcharge des lysosomes et un allègement de ceux-ci dans un gradient saccharose.

Lorsque la source de mannose-6-phosphatase est le foie de souris contrôle, l'on observe une activité de cette enzyme la plus élevée dans les fractions 8-12, là où se trouvent localisées les enzymes lysosomales. De plus, l'activité mannose-6-phosphatase est loin d'être négligeable dans les fractions 2-5, zone d'équilibration des endosomes précoces. Lorsque, par contre, la source de mannose-6-phosphatase est le foie de souris traitée au Triton WR1339, l'activité mannose-6-phosphatase est essentiellement localisée dans les fractions 2-5, là où se localisent les lysosomes allégés, ainsi que les endosomes précoces. Il subsiste une certaine activité dans les fractions 8-12, que l'on pourrait attribuer à des lysosomes non allégés.

En résumé, suite à la réalisation des centrifugations isopycniques sur foies de souris injectées ou non au Triton WR 1339, il s'avère que **l'activité mannose-6-phosphatase se retrouve dans les compartiments endosomes- lysosomes.**

Nous avons recherché si cette activité était liée à la membrane endo-lysosomale ou présente dans la lumière de ce compartiment. Dans ce but, nous avons, par traitement hypotonique et sonication, libéré les éléments solubles d'une fraction L de foie de souris (Fraction soluble L) et récupéré d'autre part la fraction membranaire. Nos résultats montrent que l'activité mannose-6-phosphatase se trouve dans la **lumière de l'endo-lysosome** et non associée à la membrane.

Afin de caractériser la nature de cette activité, nous avons soumis une fraction L de foie de souris à un traitement à 95°C durant 5 minutes. L'activité mannose-6-phosphatase n'a pas résisté à ce traitement, de même que les enzymes lysosomales dont nous avons mesuré les activités à titre de contrôle. L'activité de la mannose-6-phosphatase serait donc de **nature protéique**.

Nous avons ensuite réalisé une expérience de « *pulse-chase* ». Nous avons incubé les cellules N1E115 en présence d'une fraction L, pendant des temps variables. On constate que l'activité mannose-6-phosphatase dépend du temps de « *pulse* » et ne semble pas immédiate : un certain temps de contact (4h) avec les cellules N1E115 est nécessaire pour observer un effet.

Trois hypothèses peuvent être formulées.

- 1) Ce temps de latence pourrait être lié à l'activité intrinsèque de l'enzyme, laquelle dépend du temps d'incubation.
- 2) L'élimination du signal mannose-6-phosphate induite par les fractions de foie de souris pourrait passer par un mécanisme tout à fait indirect. Ces fractions pourraient contenir un facteur qui, en se liant sur un récepteur présent à la surface des cellules, déclencherait par l'intermédiaire de voies de signalisation l'action de l'agent déphosphorylant. Des expériences préliminaires réalisées au sein de notre laboratoire ont montré qu'après inhibition de la synthèse protéique des cellules N1E115, l'agent apporté par la fraction L de foie de souris est toujours capable de diminuer la rétention sur colonne MPR des enzymes lysosomales des cellules N1E115. Ceci semble indiquer que l'action de l'agent de déphosphorylation ne passe pas par une synthèse protéique de la mannose-6-phosphatase.
- 3) Le délai observé correspondrait au temps nécessaire à l'enzyme contenue dans les fractions de foie de souris pour rencontrer son ou ses substrat(s), à savoir les enzymes lysosomales-M6P synthétisées par les cellules neuronales. L'on peut supposer que l'agent de déphosphorylation apporté par les fractions endo-lysosomales de foie de souris est internalisé par les cellules N1E115 et aboutit aux endolysosomes, ce qui demande un certain temps. C'est également là qu'aboutissent les hydrolases acides néo-synthétisées. Donc, les voies de biosynthèse et d'endocytose se croisent dans le compartiment endolysosomal, ce qui serait en accord avec les résultats obtenus. En effet, l'activité de déphosphorylation dans le foie de souris a été localisée dans les endosomes-lysosomes. Après son endocytose, la mannose-6-phosphatase aboutit donc dans des compartiments propices à son action de déphosphorylation.

Après avoir cherché à déterminer la localisation et la nature de la mannose-6-phosphatase, nous avons étudié son action directe sur les hydrolases acides-M6P. Et plus précisément, nous avons voulu savoir quel serait le **type de clivage** que subit l'oligosaccharide des enzymes lysosomales. Est-ce l'élimination de tout l'embranchement oligosaccharidique qui porte le mannose-6-phosphate ou juste l'élimination du phosphate terminal ? Ne disposant pas d'anticorps contre les enzymes lysosomales solubles, nous avons étudié la question sur LAMP-1, une protéine lysosomale membranaire qui ne possède pas de groupement M6P mais bien des oligosaccharides. Les résultats montrent que LAMP-1 sous l'effet d'une fraction L ne subit pas de modification de poids moléculaire apparent tandis qu'une incubation en présence

d'endoglycosidase H montre une très nette diminution de poids moléculaire de LAMP-1. L'oligosaccharide des enzymes lysosomales ne subirait pas de déglycosylation en réponse à l'addition d'une fraction L. Cependant, ces résultats restent à vérifier avec des enzymes lysosomales solubles qui possèdent effectivement le signal M6P.

Nous avons déterminé que la mannose-6-phosphatase a un **point isoélectrique** (pI) inférieur à 7. La connaissance du pI permettra de purifier la mannose-6-phosphatase sur colonne de chromatographie échangeuse d'anion. Cette technique est utilisée pour séparer les protéines en fonction de leur charge.

Finalement, nous avons recherché dans le cerveau une capacité à déphosphoryler les enzymes lysosomales des cellules N1E115. En effet, nous avons déjà montré que le cerveau possède beaucoup d'enzymes lysosomales M6P, mais nous ne pouvons pas exclure la présence de la mannose-6-phosphatase dans des organites autres que les lysosomes contenant les enzymes lysosomales. Nous avons donc incubé les cellules N1E115 en présence d'une fraction MLP de cerveau de souris. Il en ressort que le cerveau n'induit qu'une légère diminution de rétention des enzymes sur colonne MPR, indiquant une activité de déphosphorylation moindre que dans le foie.

Au cours de ce mémoire, nous avons mis au point un modèle cellulaire permettant de détecter une activité de déphosphorylation vis-à-vis des enzymes lysosomales porteuses du M6P. Cette activité a été localisée dans le compartiment endo-lysosomal du foie. Ceci permettra la purification de l'enzyme à partir de fraction de foie.

2. PERSPECTIVES

Nos dernières expériences ouvrent la voie de la purification de la mannose-6-phosphatase sur colonne de chromatographie échangeuse d'anions. La mannose-6-phosphatase étudiée ayant un pI inférieure à 7, nous savons qu'elle sera essentiellement chargée négativement si la purification est réalisée à pH 7, ce qui lui permettrait de se lier à la résine. Dès lors, lorsque la purification de cette enzyme sera réalisée, nous pourrions tenter l'identification par spectrométrie de masse en comparant le profil obtenu aux bases de données protéiques. Cependant, cette technique nécessite une grande pureté de l'échantillon.

Dans le cas où la purification et l'identification de la mannose-6-phosphatase est fructueuse, nous pourrions choisir des peptides antigéniques permettant la production d'anticorps chez le lapin. Ces anticorps vont nous permettre de localiser la mannose-6-phosphatase dans les cellules gliales et les neurones. D'un point de vue moléculaire, nous pourrions cloner le gène et approfondir notre étude sur la fonction de la mannose-6-phosphatase par mutagenèse dirigée ou encore en créant des souris KO pour le gène qui l'encode. Nous pourrions également exprimer la mannose-6-phosphatase dans les cellules N1E115, afin d'étudier les propriétés que confère aux cellules N1E115 la conservation du signal M6P sur les protéines lysosomales.

L'identification de la mannose-6-phosphatase pourrait nous ouvrir les portes vers d'autres domaines de la recherche et, ainsi, accélérer nos connaissances sur le rôle et l'action de cette protéine, dont l'identité reste encore à démontrer.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Andrejewski, N., Punnonen, E. L., Guhde, G., Tanaka, Y., Lullmann-Rauch, R., Hartmann, D., von Figura, K. and Saftig, P.** (1999). Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. *J Biol Chem* **274**, 12692-701.
- Ballesteros, M., Scott, C. D. and Baxter, R. C.** (1990). Developmental regulation of insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor mRNA in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* **172**, 775-9.
- 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.
- Bonifacino, J. S.** (2004). The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 23-32.
- Bonifacino, J. S. and Glick, B. S.** (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**, 153-66.
- Bonifacino, J. S. and Traub, L. M.** (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**, 395-447.
- Bowers, W. E.** (1998). Christian de Duve and the discovery of lysosomes and peroxisomes. *Trends Cell Biol* **8**, 330-3.
- Brauker, J. H., Roff, C. F. and Wang, J. L.** (1986). The effect of mannose 6-phosphate on the turnover of the proteoglycans in the extracellular matrix of human fibroblasts. *Exp Cell Res* **164**, 115-26.
- Braulke, T.** (1996). Origin of lysosomal proteins. In *Subcellular Biochemistry*, vol. 27 (ed. M. R. W. Lloyd J.B.), pp. 15-49.
- Braun, M., Waheed, A. and von Figura, K.** (1989). Lysosomal acid phosphatase is transported to lysosomes via the cell surface. *Embo J* **8**, 3633-40.
- Bresciani, R., Peters, C. and von Figura, K.** (1992). Lysosomal acid phosphatase is not involved in the dephosphorylation of mannose 6-phosphate containing lysosomal proteins. *Eur J Cell Biol* **58**, 57-61.
- Bresciani, R. and Von Figura, K.** (1996). Dephosphorylation of the mannose-6-phosphate recognition marker is localized in later compartments of the endocytic route. Identification of purple acid phosphatase (uteroferrin) as the candidate phosphatase. *Eur J Biochem* **238**, 669-74.
- Bright, N. A., Gratian, M. J. and Luzio, J. P.** (2005). Endocytic delivery to lysosomes mediated by concurrent fusion and kissing events in living cells. *Curr Biol* **15**, 360-5.
- Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J. and van Deurs, B.** (2000). Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell* **11**, 467-80.
- Byrd, J. C. and MacDonald, R. G.** (2000). Mechanisms for high affinity mannose 6-phosphate ligand binding to the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* **275**, 18638-46.
- Byrd, J. C., Park, J. H., Schaffer, B. S., Garmroudi, F. and MacDonald, R. G.** (2000). Dimerization of the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* **275**, 18647-56.
- Courtoy, P.J.** (1993). Analytical Subcellular Fractionation of endosomal compartments in rat hepatocytes in *Subcellular Biochemistry* **19**, 29-68.

Dahms, N. M., Lobel, P., Breitmeyer, J., Chirgwin, J. M. and Kornfeld, S. (1987). 46 kd mannose 6-phosphate receptor: cloning, expression, and homology to the 215 kd mannose 6-phosphate receptor. *Cell* **50**, 181-92.

de Duve, C. (1959). Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles.

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.

de Duve, C. and Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* **28**, 435-92.

Dell'Angelica, E. C., Mullins, C., Caplan, S. and Bonifacino, J. S. (2000). Lysosome-related organelles. *Faseb J* **14**, 1265-78.

Dennis, P. A. and Rifkin, D. B. (1991). Cellular activation of latent transforming growth factor beta requires binding to the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 580-4.

Diaz, E. and Pfeffer, S. R. (1998). TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell* **93**, 433-43.

Diesner, F., Sommerlade, H. J. and Braulke, T. (1993). Transport of newly synthesized arylsulfatase A to the lysosome via transferrin receptor-positive compartments. *Biochem Biophys Res Commun* **197**, 1-7.

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.

Dunn, K. W. and Maxfield, F. R. (1992). Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. *J Cell Biol* **117**, 301-10.

Einstein, R. and Gabel, C. A. (1989). Serum factors alter the extent of dephosphorylation of ligands endocytosed via the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *J Cell Biol* **109**, 1037-46.

Einstein, R. and Gabel, C. A. (1991). Cell- and ligand-specific dephosphorylation of acid hydrolases: evidence that the mannose 6-phosphatase is controlled by compartmentalization. *J Cell Biol* **112**, 81-94.

Eskelinen, E. L., Illert, A. L., Tanaka, Y., Schwarzmann, G., Blanz, J., Von Figura, K. and Saftig, P. (2002). Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Biol Cell* **13**, 3355-68.

Eskelinen, E. L., Schmidt, C. K., Neu, S., Willenborg, M., Fuertes, G., Salvador, N., Tanaka, Y., Lullmann-Rauch, R., Hartmann, D., Heeren, J. et al. (2004). Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts. *Mol Biol Cell* **15**, 3132-45.

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.

Forgac, M. (1999). Structure and properties of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *J Biol Chem* **274**, 12951-4.

Gabel, C. A. (1992). Posttranslational processing and intracellular transport of newly synthesized lysosomal enzymes. In *Mechanisms of Intracellular Trafficking and processing of proprotein*, (ed. Y. P. Loh), pp. 103-130: CRC-Taylor and Francis.

Gabel, C. A. and Foster, S. A. (1986). Lysosomal enzyme trafficking in mannose 6-phosphate receptor-positive mouse L-cells: demonstration of a steady state accumulation of phosphorylated acid hydrolases. *J Cell Biol* **102**, 943-50.

Gabel, C. A. and Foster, S. A. (1987). Postendocytic maturation of acid hydrolases: evidence of prelysosomal processing. *J Cell Biol* **105**, 1561-70.

- Gabel, C. A., Goldberg, D. E. and Kornfeld, S.** (1982). Lysosomal enzyme oligosaccharide phosphorylation in mouse lymphoma cells: specificity and kinetics of binding to the mannose 6-phosphate receptor in vivo. *J Cell Biol* **95**, 536-42.
- Gabel, C. A., Goldberg, D. E. and Kornfeld, S.** (1983). Identification and characterization of cells deficient in the mannose 6-phosphate receptor: evidence for an alternate pathway for lysosomal enzyme targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 775-9.
- Gal, S. and Gottesman, M. M.** (1986). The major excreted protein of transformed fibroblasts is an activable acid-protease. *J Biol Chem* **261**, 1760-5.
- Ghosh, P., Dahms, N. M. and Kornfeld, S.** (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 202-12.
- Ghosh, P. and Kornfeld, S.** (2004). The GGA proteins: key players in protein sorting at the trans-Golgi network. *Eur J Cell Biol* **83**, 257-62.
- Gieselmann, V., Pohlmann, R., Hasilik, A. and Von Figura, K.** (1983). Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultured human fibroblasts. *J Cell Biol* **97**, 1-5.
- Goder, V. and Spiess, M.** (2001). Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS Lett* **504**, 87-93.
- Goldberg, D. E. and Kornfeld, S.** (1981). The phosphorylation of beta-glucuronidase oligosaccharides in mouse P388D1 cells. *J Biol Chem* **256**, 13060-7.
- Goldstein, J. L., Dana, S. E., Faust, J. R., Beaudet, A. L. and Brown, M. S.** (1975). Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. Observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease. *J Biol Chem* **250**, 8487-95.
- Greener, T., Zhao, X., Nojima, H., Eisenberg, E. and Greene, L. E.** (2000). Role of cyclin G-associated kinase in uncoating clathrin-coated vesicles from non-neuronal cells. *J Biol Chem* **275**, 1365-70.
- Griffiths, G. and Gruenberg, J.** (1991). The arguments for pre-existing early and late endosomes. *Trends Cell Biol* **1**, 5-9.
- Hasilik, A. and Von Figura, K.** (1981). Oligosaccharides in lysosomal enzymes. Distribution of high-mannose and complex oligosaccharides in cathepsin D and beta-hexosaminidase. *Eur J Biochem* **121**, 125-9.
- Hasilik, A., Waheed, A. and von Figura, K.** (1981). Enzymatic phosphorylation of lysosomal enzymes in the presence of UDP-N-acetylglucosamine. Absence of the activity in I-cell fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **98**, 761-7.
- Havelaar, A. C., Beerens, C. E., Mancini, G. M. and Verheijen, F. W.** (1999). Transport of organic anions by the lysosomal sialic acid transporter: a functional approach towards the gene for sialic acid storage disease. *FEBS Lett* **446**, 65-8.
- Hinners, I. and Tooze, S. A.** (2003). Changing directions: clathrin-mediated transport between the Golgi and endosomes. *J Cell Sci* **116**, 763-71.
- Hirschberg, C. B. and Snider, M. D.** (1987). Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem* **56**, 63-87.
- Holtzman, E.** (1989). Lysosomes. NY-London: Plenum Press.
- Huang, F., Nesterov, A., Carter, R. E. and Sorkin, A.** (2001). Trafficking of yellow-fluorescent-protein-tagged mu1 subunit of clathrin adaptor AP-1 complex in living cells. *Traffic* **2**, 345-57.
- Jadot, M., Lin, L., Sleat, D. E., Sohar, I., Hsu, M. S., Pintar, J., Dubois, F., Coninck, S. W., Wattiaux-De Coninck, S. and Lobel, P.** (1999). Subcellular localization of mannose 6-phosphate glycoproteins in rat brain. *J Biol Chem* **274**, 21104-13.

- Johnson, K. F. and Kornfeld, S.** (1992). The cytoplasmic tail of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor has two signals for lysosomal enzyme sorting in the Golgi. *J Cell Biol* **119**, 249-57.
- Kalatzis, V., Cherqui, S., Antignac, C. and Gasnier, B.** (2001). Cystinosin, the protein defective in cystinosis, is a H(+)-driven lysosomal cystine transporter. *Embo J* **20**, 5940-9.
- Kaplan, A., Achord, D. T. and Sly, W. S.** (1977). Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors on human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 2026-30.
- Kiess, W., Blickenstaff, G. D., Sklar, M. M., Thomas, C. L., Nissley, S. P. and Sahagian, G. G.** (1988). Biochemical evidence that the type II insulin-like growth factor receptor is identical to the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* **263**, 9339-44.
- Klumperman, J., Hille, A., Veenendaal, T., Oorschot, V., Stoorvogel, W., von Figura, K. and Geuze, H. J.** (1993). Differences in the endosomal distributions of the two mannose 6-phosphate receptors. *J Cell Biol* **121**, 997-1010.
- Kundra, R. and Kornfeld, S.** (1999). Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *J Biol Chem* **274**, 31039-46.
- Kuronita, T., Eskelinen, E. L., Fujita, H., Saftig, P., Himeno, M. and Tanaka, Y.** (2002). A role for the lysosomal membrane protein LGP85 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology. *J Cell Sci* **115**, 4117-31.
- Lang, L., Reitman, M., Tang, J., Roberts, R. M. and Kornfeld, S.** (1984). Lysosomal enzyme phosphorylation. Recognition of a protein-dependent determinant allows specific phosphorylation of oligosaccharides present on lysosomal enzymes. *J Biol Chem* **259**, 14663-71.
- Lawrence, B. P. and Brown, W. J.** (1992). Autophagic vacuoles rapidly fuse with pre-existing lysosomes in cultured hepatocytes. *J Cell Sci* **102** (Pt 3), 515-26.
- Lazzarino, D. A. and Gabel, C. A.** (1988). Biosynthesis of the mannose 6-phosphate recognition marker in transport-impaired mouse lymphoma cells. Demonstration of a two-step phosphorylation. *J Biol Chem* **263**, 10118-26.
- Lecocq, M., Andrianaivo, F., Warnier, M. T., Wattiaux-De Coninck, S., Wattiaux, R. and Jadot, M.** (2003). Uptake by mouse liver and intracellular fate of plasmid DNA after a rapid tail vein injection of a small or a large volume. *J Gene Med* **5**, 142-56.
- 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.
- Luzio, J. P., Poupon, V., Lindsay, M. R., Mullock, B. M., Piper, R. C. and Pryor, P. R.** (2003). Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes. *Mol Membr Biol* **20**, 141-54.
- Mach, L., Schwihla, H., Stuwe, K., Rowan, A. D., Mort, J. S. and Glossl, J.** (1993). Activation of procathepsin B in human hepatoma cells: the conversion into the mature enzyme relies on the action of cathepsin B itself. *Biochem J* **293** (Pt 2), 437-42.
- Marcusson, E. G., Horazdovsky, B. F., Cereghino, J. L., Gharakhanian, E. and Emr, S. D.** (1994). The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell* **77**, 579-86.
- McNeil, P. L.** (2002). Repairing a torn cell surface: make way, lysosomes to the rescue. *J Cell Sci* **115**, 873-9.
- Mellman, I. and Warren, G.** (2000). The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* **100**, 99-112.
- Meresse, S., Ludwig, T., Frank, R. and Hoflack, B.** (1990). Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the bovine cation-independent mannose 6-phosphate receptor. Serines 2421 and 2492 are the targets of a casein kinase II associated to the Golgi-derived HAI adaptor complex. *J Biol Chem* **265**, 18833-42.

- Misquith, S., Wattiaux-De Coninck, S. and Wattiaux, R.** (1988). Uptake and intracellular transport in rat liver of formaldehyde-treated bovine serum albumin labelled with 125I-tyramine-cellobiose. *Eur J Biochem* **174**, 691-7.
- Mukherjee, S., Ghosh, R. N. and Maxfield, F. R.** (1997). Endocytosis. *Physiol Rev* **77**, 759-803.
- Mullins, C. and Bonifacino, J. S.** (2001). The molecular machinery for lysosome biogenesis. *Bioessays* **23**, 333-43.
- Mullock, B. M., Bright, N. A., Fearon, C. W., Gray, S. R. and Luzio, J. P.** (1998). Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J Cell Biol* **140**, 591-601.
- Munier-Lehmann, H., Mauxion, F., Bauer, U., Lobel, P. and Hoflack, B.** (1996). Re-expression of the mannose 6-phosphate receptors in receptor-deficient fibroblasts. Complementary function of the two mannose 6-phosphate receptors in lysosomal enzyme targeting. *J Biol Chem* **271**, 15166-74.
- Murphy, R. F.** (1991). Maturation models for endosome and lysosome biogenesis. *Trends Cell Biol* **1**, 77-82.
- Orsel, J. G., Sincock, P. M., Krise, J. P. and Pfeffer, S. R.** (2000). Recognition of the 300-kDa mannose 6-phosphate receptor cytoplasmic domain by 47-kDa tail-interacting protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9047-51.
- 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.
- 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.
- Reitman, M. L. and Kornfeld, S.** (1981). UDP-N-acetylglucosamine:glycoprotein N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. Proposed enzyme for the phosphorylation of the high mannose oligosaccharide units of lysosomal enzymes. *J Biol Chem* **256**, 4275-81.
- Richo, G. R. and Conner, G. E.** (1994). Structural requirements of procathepsin D activation and maturation. *J Biol Chem* **269**, 14806-12.
- Roff, C. F., Wozniak, R. W., Blenis, J. and Wang, J. L.** (1983). The effect of mannose6-phosphate on the turnover of cell surface glycosaminoglycans. *Exp Cell Res* **144**, 333-44.
- Saftig, P., Hunziker, E., Everts, V., Jones, S., Boyde, A., Wehmeyer, O., Suter, A. and von Figura, K.** (2000). Functions of cathepsin K in bone resorption. Lessons from cathepsin K deficient mice. *Adv Exp Med Biol* **477**, 293-303.
- Schoer, J. K., Gallegos, A. M., McIntosh, A. L., Starodub, O., Kier, A. B., Billheimer, J. T. and Schroeder, F.** (2000). Lysosomal membrane cholesterol dynamics. *Biochemistry* **39**, 7662-77.
- Sklar, M. M., Kiess, W., Thomas, C. L. and Nissley, S. P.** (1989). Developmental expression of the tissue insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor in the rat. Measurement by quantitative immunoblotting. *J Biol Chem* **264**, 16733-8.
- 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.
- Stinchcombe, J. C. and Griffiths, G. M.** (1999). Regulated secretion from hemopoietic cells. *J Cell Biol* **147**, 1-6.
- Storrie, B. and Desjardins, M.** (1996). The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? *Bioessays* **18**, 895-903.
- Suter, A., Everts, V., Boyde, A., Jones, S. J., Lullmann-Rauch, R., Hartmann, D., Hayman, A. R., Cox, T. M., Evans, M. J., Meister, T. et al.** (2001). Overlapping functions of lysosomal acid phosphatase (LAP) and tartrate-resistant acid phosphatase (Acp5) revealed by doubly deficient mice. *Development* **128**, 4899-910.

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.

Tepel, C., Bromme, D., Herzog, V. and Brix, K. (2000). Cathepsin K in thyroid epithelial cells: sequence, localization and possible function in extracellular proteolysis of thyroglobulin. *J Cell Sci* **113 Pt 24**, 4487-98.

Varki, A. and Kornfeld, S. (1983). The spectrum of anionic oligosaccharides released by endo-beta-N-acetylglucosaminidase H from glycoproteins. Structural studies and interactions with the phosphomannosyl receptor. *J Biol Chem* **258**, 2808-18.

Waguri, S., Dewitte, F., Le Borgne, R., Rouille, Y., Uchiyama, Y., Dubremetz, J. F. and Hoflack, B. (2003). Visualization of TGN to endosome trafficking through fluorescently labeled MPR and AP-1 in living cells. *Mol Biol Cell* **14**, 142-55.

Wattiaux, R., Wibo, M. and Baudhuin, P. (1963). Effect of the injection of Triton WR 1339 on the hepatic lysosomes of the rat. *Arch Int Physiol Biochim* **71**, 140-2.

Watts, C. (2001). Antigen processing in the endocytic compartment. *Curr Opin Immunol* **13**, 26-31.

Wong, T. K., Decker, G. L. and Lennarz, W. J. (1982). Localization of dolichol in the lysosomal fraction of rat liver. *J Biol Chem* **257**, 6614-8.

Yaghootfam, A., Schestag, F., Dierks, T. and Gieselmann, V. (2003). Recognition of arylsulfatase A and B by the UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-phosphotransferase. *J Biol Chem* **278**, 32653-61.

Zhu, Y. and Conner, G. E. (1994). Intermolecular association of lysosomal protein precursors during biosynthesis. *J Biol Chem* **269**, 3846-51.

MISE AU POINT D'UN MODELE CELLULAIRE PERMETTANT DE LOCALISER UNE ACTIVITE DE DEPHOSPHORYLATION DES ENZYMES LYSOSOMALES DANS LE FOIE DE SOURIS

TON NU
Caroline

ERRATA

Les modifications apportées sont soulignées.

Matériel et Méthodes, p.22, point 2.3, 4^e paragraphe :

Remplacer : « Il s'agit également d'histogrammes où... avec en abscisse, la densité (ρ) de chaque... et en ordonnée, la fréquence. »

Par : « Il s'agit également d'histogramme où chaque fraction est à nouveau symbolisée par un rectangle, avec en abscisse, l'incrément de densité ($\Delta\rho$) de chaque... et en ordonnée, la fréquence. »

Résultats, p. 33 et 34 : remplacer les tableaux 1 et 2 qui ont été complétés en vue de clarifier les étapes de calcul de l'ASR par les suivants.

	N	M	L	P	S
Dilution Primaire	5	2,05	2	2	15,29
% de protéines	26,8	25,95	3,29	19,18	24,78
Concentration de protéines (mg/ml)		35,15	4,57	26,63	
β-galactosidase	Droite de régression	$y = -1,3648x + 59,916$	$y = -2,9558x + 47,325$	$y = -3,3877x + 57,432$	
	R²	0,56	0,95	0,55	
	% d'activité	31,62	8,91	59,47	
	ASR	1,22	2,71	3,10	
β-glucuronidase	Droite de régression	$y = -2,5863x + 78,73$	$y = -3,5343x + 63,992$	$y = -3,4104x + 71,691$	
	R²	0,94	0,95	0,44	
	% d'activité	45,94	8,17	45,9	
	ASR	1,77	2,48	2,39	
β-hexosaminidase	Droite de régression	$y = -2,6304x + 64,232$	$y = -4,8266x + 57,936$	$y = -1,5398x + 53,163$	
	R²	0,95	0,99	0,42	
	% d'activité	59,44	14,19	26,36	
	ASR	2,29	4,31	1,37	
β-mannosidase	Droite de régression	$y = -3,3019x + 78,795$	$y = -9,0728x + 74,309$	$y = -2,166x + 75,352$	
	R²	0,73	0,98	0,98	
	% d'activité	53,92	19,28	26,80	

	ASR		2,08	5,85	1,40	
--	-----	--	------	------	------	--

Tableau 1. Répartition dans les fractions M, L et P de foie de souris de l'activité de déphosphorylation sur les enzymes lysosomales-M6P des cellules N1E115. Les données proviennent de l'expérience reprise à la figure 14, pour laquelle 250 µg de protéines provenant de chaque fraction ont été déposées sur les cellules N1E115.

Dilution primaire, à savoir volume des fractions (ml) par rapport à la quantité de foie (g). **R²**, le coefficient de détermination. **ASR**, l'activité spécifique relative, qui correspond au rapport entre le pourcentage d'activité et le pourcentage de protéines contenue dans la fraction.

A titre d'exemple, pour la fraction M, l'activité de la β-galactosidase est le rapport de l'activité par gramme de foie dans la fraction M par l'activité totale par gramme de foie dans les fractions M, L et P. L'activité par gramme de foie dans une fraction est obtenue en calculant la valeur de la pente de la droite de régression par gramme de foie, soit, en multipliant la pente de la droite (1,3648) par (35,1570/0,25) de façon à obtenir l'activité par ml de la fraction M et ensuite par la dilution (2,05).

		N	M	L	P	S
Dilution Primaire		5	2	2	2	8,89
% de protéines		52,73	17,13	4,68	15,15	10,30
Concentration de protéines (mg/ml)			21,97	5,99	19,38	
β-galactosidase	Droite de régression		$y=-5,8978x+53,854$	$y=-7,2505x+48,739$	$y=-4,105x+62,684$	
	R²		0,96	0,98	0,98	
	% d'activité		51,31	17,20	31,49	
ASR			2,99	3,67	2,08	
β-glucuronidase	Droite de régression		$y=-8,3842x+67,558$	$y=-11,107x+61,975$	$y=-4,5988x+78,934$	
	R²		0,96	0,98	0,93	
	% d'activité		54,2	19,58	26,22	
ASR			3,16	4,18	1,73	
β-hexosaminidase	Droite de régression		$y=-8,1968x+654,608$	$y=-10,236x+52,447$	$y=-6,7511x+63,335$	
	R²		0,97	0,97	0,97	
	% d'activité		48,38	16,48	35,14	
ASR			2,82	3,52	2,32	
β-mannosidase	Droite de régression		$y=-11,508x+64,694$	$y=-13,821x+60,982$	$y=-3,3279x+80,746$	
	R²		0,98	0,94	0,96	
	% d'activité		55,17	18,07	26,76	
ASR			3,22	3,86	1,77	

Tableau 2. Répartition dans les fractions M, L et P de foie de souris de l'activité de déphosphorylation sur les enzymes lysosomales-M6P des cellules N1E115. Les données proviennent de l'expérience reprise à la figure 16, pour laquelle 1000 µg de protéines provenant de chaque fraction ont été déposées sur les cellules N1E115 (voir légende du tableau 1).

Résultats, figure 22 : remplacer la légende de la figure 22 par la suivante.

Figure 22. Effet de fractions L et L chauffée à 95°C de foie de souris sur la rétention sur colonne MPR d'enzymes lysosomales-M6P de cellules N1E115. Une fraction L provenant d'une centrifugation différentielle de foie de souris est chauffée à 95 °C et est déposée, de même qu'une fraction L normale, en présence des cellules N1E115. Après 4 heures d'incubation en l'absence de sérum, les cellules sont lavées et les lysats cellulaires sont analysés sur colonne MPR et le pourcentage d'activité enzymatique retenu sur colonne MPR des enzymes de références lysosomales est calculé par rapport à l'activité totale récupérée. Le pourcentage de récupération des activités enzymatiques est en moyenne de 91,67%.

Résultats, figure 25a : remplacer la figure 25a et son titre par la suivante.

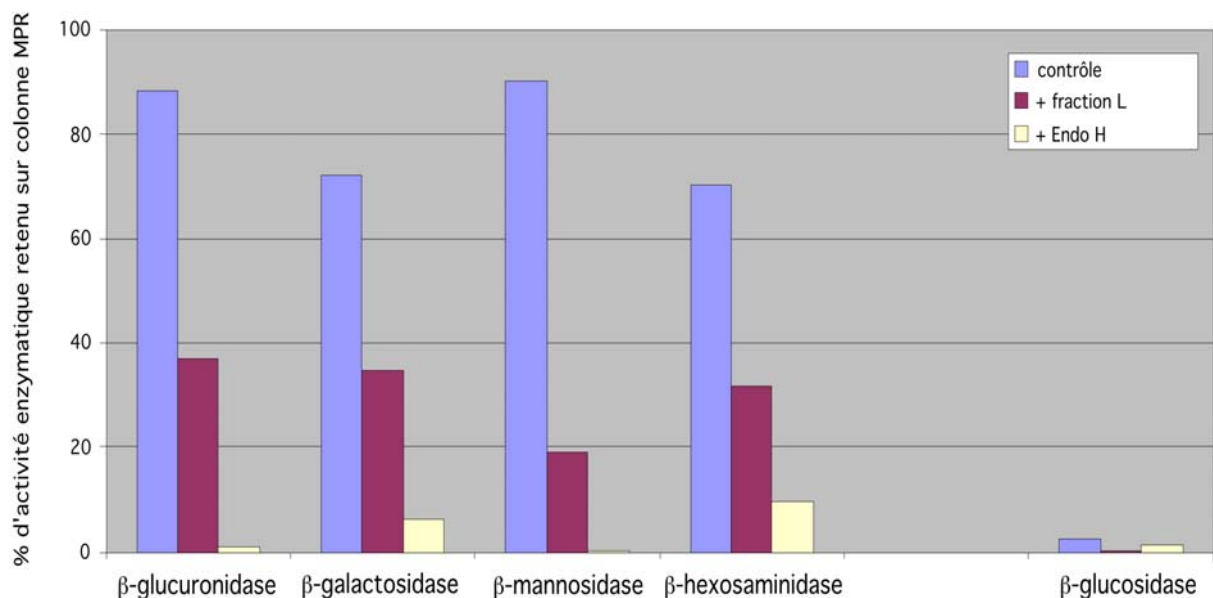


Figure 25a. Effet d'une fraction L de foie de souris et de l'endoglycosidase H, sur la rétention sur colonne MPR d'enzymes lysosomales de cellules N1E115. L'endoglycosidase H a été mise en présence d'un lysat de cellules N1E115 (*in vitro*) pendant 6 heures, et une fraction L a été incubée en présence des cellules N1E115 (*in vivo*) pendant 4 heures. Les lysats cellulaires sont alors analysés sur colonne MPR et les pourcentages d'activité enzymatiques retenus sur colonne MPR des enzymes de références lysosomales est calculé par rapport à l'activité totale récupérée. Le pourcentage de récupération des activités enzymatiques est en moyenne de 76%.

Résultats et Discussions, p. 39, point 3.5, avant-dernier paragraphe :

Ajouter en fin de paragraphe : « Des cellules non traitées présentent un pourcentage de rétention d'activité enzymatique sur colonne MPR qui est en moyenne de 77,7% (voir la figure 10). »