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

THESIS / THÈSE

**MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES**

# Localisation intracellulaire de l'hyaluronidase Hyal-1 dans le rein de rat

Ghitescu, Simona

*Award date:*
2005

Link to publication

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

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

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

Download date: 02. May. 2026

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

# Localisation intracellulaire de l'hyaluronidase Hyal-1 dans le rein de rat

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques

Simona GHITESCU
Juin 2005

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

# Localisation intracellulaire de l'Hyaluronidase Hyal-1 dans le rein de rat

GHITESCU Simona

Résumé

Hyal-1, une enzyme de la famille des hyaluronidases, est considérée dans la littérature, comme une enzyme lysosomale. Cette propriété, cependant, n'a jamais été démontrée.
Une réinvestigation de la localisation subcellulaire de Hyal-1 a donc été envisagée dans notre laboratoire. Des premiers résultats obtenus sur le foie de rat semblent démontrer une localisation non lysosomale d'Hyal-1.
Le but de notre mémoire était de confirmer ou d'infirmer ces premiers résultats en analysant un autre organe riche en hyaluronan et hyaluronidases : le rein.
Des analyses biochimiques ont donc été effectuées à partir d'homogénats de rein de rat. Nous avons comparé la distribution d'Hyal-1, détectée par Western Blotting, à celle de différents marqueurs enzymatiques après une centrifugation différencielle de l'homogénat de rein, ainsi qu'après une centrifugation isopycnique en gradient de saccharose d'une fraction post-nucléaire sédimentable MLP. La fraction MLP a ensuite été soumise à différents traitements : choc hypotonique et mécanique, détergents et sels, afin d'obtenir plus de renseignements sur la structure abritant Hyal-1.
Les résultats obtenus sont en faveur d'une localisation non lysosomale de Hyal-1, et confirment donc ceux obtenus sur le foie. Selon nos données, Hyal-1 résiderait dans une structure qui lui est propre, et serait associée à la membrane de cette structure de manière extrinsèque. Cette membrane serait pauvre en cholestérol.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Juin 2005
**Promoteur:** J. Thirion
**Co-Promoteur :** B. Flamion

*Je remercie tout d'abord Mr Jadot pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir confié ce travail de mémoire.*

*Merci de tout cœur à vous , Mme Thirion, pour tout ce que vous m'avez appris, pour tout le temps que vous m'avez consacré, pour votre gentillesse et vos précieux conseils...Les mots me manquent pour vous exprimer toute ma reconnaissance.*

*Merci, Mr Flamion, pour vos suggestions, vos encouragements, et votre bonne humeur.*

*Merci, Mme Mertens, pour vos conseils et votre disponibilité, ainsi que pour votre optimisme et vos encouragements... Merci de tout cœur pour le temps que vous m'avez accordé.*

*Merci, Marie-Christine, pour ta patience avec moi lors de mes premiers Western Blot, pour ta bonne humeur contagieuse. Garde toujours ton sourire et bon courage pour ton doctorat !*

*Merci, Mr Wattiaux, pour l'intérêt que vous avez porté à mon mémoire, ce fut pour moi un honneur que de recevoir vos conseils et suggestions !*

*Merci à Arlette, Josiane et Camille, pour votre aide « sur le terrain » dans le labo.*

*Merci, Michel (Savels), pour avoir résolu mes « problèmes d'ordinateur », pour ton aide lors des figures, mais aussi et surtout pour ton humour ( sacré Michel !).*

*Merci, Fanfan, pour ton amitié, pour ton soutien dans les moments difficiles, ainsi que pour tes magnifiques surprises ! Bonne chance dans la vie !*

*Merci, Marielle, pour m'avoir guidée lors des expériences d'immunofluorescence ; Bon courage pour ton doctorat !*

*Merci, Cécile, pour ta bonne humeur, ainsi que pour les anticorps « souris verte »...*

*Merci à Noëlle et Catherine (d' URBC) pour leur aide et leurs conseils lors des observations au microscope confocal.*

*Merci à tous ceux et celles que j'ai croisé dans le labo et à qui j'ai parfois demandé conseil : Isabelle, Catherine, Magali, les deux Sophie , Michèle, , Mme Wattiaux, Marie-Thérése, Marie-France, Marie-Jeanne, Guy...*

*Merci aux autres mémorantes de l'Urphym, ; bonne chance dans tout ce que vous entreprendrez dans la vie !*

*D'avance, merci à ceux et celles qui prendront le temps de lire ce mémoire : Merci à Mme Mertens, Mme Lecocq, Mr Remacle et Mr Pochet.*

*Merci également à ceux qui m'ont aidée à garder vivant l'espoir pendant mes moments de doute et d'échec. Merci, Fanfan, Flo, Philippe, Virginie, Marina, Patrycja, Mike et tous les autres !*

*Enfin, merci à ma mère et à mon père de m'avoir encouragée tout au long de ce parcours parfois difficile. Merci pour leur confiance en moi.*

# Abréviations

| | |
|---|---|
| aa | acide aminé |
| ADNc | Acide desoxyribonucléique complémentaire |
| ARN | acide ribonucléique |
| ASR | activité spécifique relative |
| BSA | Bovine Sérum Albumine |
| CD44 | Clusters of differentiation 44 |
| CS | chondroïtine sulfate |
| Da | Dalton |
| DAP | donneur-accepteur de proton |
| DPP IV | dipeptidyl peptidase 4 |
| EDTA | Acide éthylènediamine-tétra-acétique. |
| GAG | glycosaminoglycane |
| GPI | glycophophatidylinositol |
| HA | hyaluronan |
| HARE | Hyaluronan Receptor for Endocytosis |
| HAS | hyaluronan synthase |
| HK2 | human kidney 2 |
| HPV-16 | Human Papilloma virus 16 |
| HRP | Horse Raddish Peroxydase = peroxydase de raifort |
| HS | héparan sulfate |
| Hyal | hyaluronidase |
| Lamp-1 | Lysosomal-Associated Membrane Protein 1 |
| LEC | Liver sinusoidal Endothelial Cell |
| LUCA-1 | Lung Cancer-1 |
| LYVE-1 | Lymphatic Vessel Endothelial (hyaluronan receptor) 1 |
| MDH | malate déshydrogénase |
| MEC | matrice extra-cellulaire |
| PBS | Phosphate Buffer Saline |
| PHYAL-1 | pseudo-HYAL-1 |
| RHAMM | receptor for hyaluronate-mediated motility |
| rpm | round per minute |
| SDS | Sodium Dodécyl Sulfate |
| SPAM-1 | Sperm Adhesion Molecule-1 |
| TEMED | NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine |
| TNF | Tumor necrosis factor |
| TSG | Tumor suppressor gene= gène suppresseur de tumeur |

# TABLE DE MATIERES


**1 INTRODUCTION ..... 1**

**1.1 Intérêt du domaine ..... 1**

**1.2 Définition de l'hyaluronan ..... 1**

1.2.1 Dénomination, structure chimique et formule ..... 1

1.2.2 Propriétés physico-chimiques et biologiques ..... 2

1.2.3 Synthèse *in vivo* et localisation ..... 2

1.2.3.1 Synthèse de l'hyaluronan ..... 2

1.2.3.1.1 Hyaluronan synthases (HAS) ..... 3

1.2.3.1.2 Mécanisme de la biosynthèse de l'hyaluronan ..... 3

1.2.3.2 Localisation de l'hyaluronan ..... 3

1.2.4 Métabolisme de l'hyaluronan ..... 4

1.2.5 Différents rôles de l'hyaluronan ..... 6

1.2.5.1 Rôle de l'hyaluronan dans des conditions physiologiques normales ..... 6

**1.3 Récepteurs de l'hyaluronan ..... 6**

1.3.1 CD44 ..... 7

1.3.2 RHAMM ..... 7

**1.4 La famille des enzymes hyaluronidases et les gènes HYAL ..... 8**

1.4.1 Définition et classification des hyaluronidases ..... 8

1.4.2 Hyaluronidases et gènes HYAL ..... 8

1.4.3 Localisation et activité enzymatique ..... 9

1.4.3.1 Hyaluronidases au niveau des tissus et des organes ..... 9

1.4.3.2 Activité enzymatique ..... 10

1.4.3.2.1 Hyal-1 ..... 10

1.4.3.2.2 Autres enzymes de la famille Hyal ..... 12

1.4.4 Hyal-1 et cancer ..... 14

1.4.4.1 Hyal-1 comme agent actif contre le cancer ..... 15

1.4.5 Hyal-1 et autres hyaluronidases impliquées dans d'autres maladies ..... 17

**2 BUT DU MÉMOIRE ..... 18**

**2.1 Localisation subcellulaire d'Hyal-1 : controverses ..... 18**

**2.2 Démarche expérimentale ..... 18**

**3 MATÉRIEL ET MÉTHODES ..... 20**

**3.1 Etudes morphologiques ..... 20**

3.1.1 Les cellules HK2 ..... 20

3.1.2 Immunofluorescence ..... 20

**3.2 Le rein ..... 21**
3.2.1 Le fractionnement complet par centrifugation différentielle ..... 21
3.2.2 Centrifugation isopycnique en gradient de saccharose ..... 23
3.2.3 Choc hypotonique ..... 24
3.2.4 Choc mécanique ..... 24
3.2.5 Solubilisation des enzymes membranaires ..... 24
3.2.5.1 Traitement par la digitonine ..... 24
3.2.5.2 Traitement par le Triton X100 (0.5%) ..... 25
3.2.5.3 Traitement des membranes par différents solubilisants ..... 25
3.2.6 Dosages enzymatiques ..... 25
3.2.6.1 Marqueurs spécifiques ..... 25
3.2.7 Western Blotting ..... 27

**4 RÉSULTATS ET DISCUSSION ..... 29**

**4.1 Cellules HK2 ..... 29**

**4.2 Rein de rat ..... 30**
4.2.1 Fractionnement subcellulaire ..... 30
4.2.2 Centrifugation isopycnique en gradient de saccharose de la fraction sédimentable post-nucléaire MLP ..... 31
4.2.3 Choc hypotonique ..... 32
4.2.4 Choc mécanique ..... 33
4.2.5 Effet des détergents ..... 34
4.2.5.1 Effets de la digitonine ..... 34
4.2.5.2 Triton X100 ..... 34
4.2.6 Effet de différents solubilisants des protéines membranaires ..... 35

**5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES ..... 37**

**6 BIBLIOGRAPHIE ..... 40**

# Introduction

# 1 Introduction

## *1.1 Intérêt du domaine*

L'intérêt accru des chercheurs pour l'hyaluronan (HA) et son métabolisme est dû en grande partie à sa réputation d'être une « molécule mystérieuse ». Il fait partie des hydrates de carbone, composés d'une importance capitale pour la vie, qui représentent deux tiers du carbone trouvé dans la biosphère (Yip et Withers, 2004).

L'HA est présent dans une multitude de tissus et d'organes. On le trouve dans le plasma, dans l'humeur vitrée de l'œil, la peau, les reins, le foie, la rate, les intestins, le fluide amniotique, le fluide synovial, les cartilages...et la liste reste ouverte. Certaines de ses fonctions physiologiques dans tous ces organes et tissus ont été clarifiées mais de nombreuses autres restent inconnues. On ne connaît pas à ce jour avec précision par quel mécanisme l'HA remplit son rôle dans différentes maladies (surtout dans les différentes formes de cancer), mais on sait qu'il agit en concertation avec d'autres classes de composés organiques (glycoprotéines, glycolipides, métalloprotéines, ...) pour accomplir ses fonctions biologiques (activité cellulaire, signalisation régulant la communication intracellulaire ).

L'intérêt en embryologie n'est pas négligeable. En effet, l'HA est impliqué dans différents stades de développement de l'embryon. La découverte des gènes responsables de la synthèse de l'HA chez un invertébré (*Amphioxus*) a démontré que la biosynthèse de l'HA est apparue avant l'évolution des vertébrés (Stern,2003).

Les enzymes hyaluronidases, capables de scinder l'HA, jouent un rôle extrêmement important dans des conditions physiologiques et pathologiques. Elles sont notamment utilisées dans le traitement de différentes formes de cancer, mais aussi dans d'autres domaines tels que la fertilisation et la cryptorchidie, la hernie et la stérilité chez les mammifères (Gatphayak, 2003), ainsi que dans d'autres maladies où le niveau de HA est élevé.

## *1.2 Définition de l'hyaluronan*

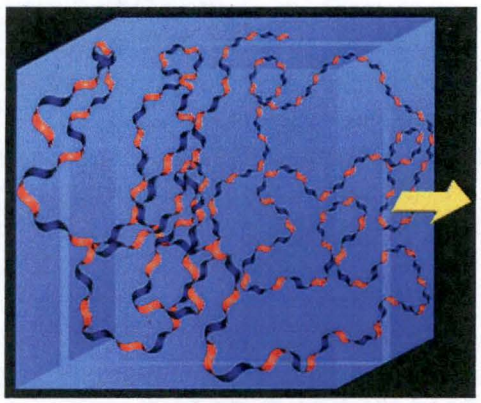
### 1.2.1 Dénomination, structure chimique et formule

L'HA, aussi appelé acide hyaluronique, est un polymère appartenant à la famille des mucopolysaccharides ou glycosaminoglycans (GAGs).

Il a été découvert en 1934 dans l'humeur vitrée de l'œil de bovin par Meyer et Palmer. Son nom réunit le terme « hyaloïde » signifiant transparent, vitré et le terme « acide uronique ». Plus tard, il a été renommé hyaluronan, suite à la mise en évidence de sa structure *in vivo*, celle d'un polymère anionique.

De la même famille font partie également des oligomères de HA, dont la taille varie en fonction de l'enzyme responsable de la dégradation du polymère. Les produits de dégradation de l'HA par l'hyaluronidase Hyal-2 auraient un poids moléculaire d'environ 20 kDa (50 unités de disaccharide), et ceux résultant de l'action d' **Hyal-1** seraient majoritairement des tétrasaccharides.

La structure chimique de l'HA a été élucidée par Scott en 1989 (Scott, 1989). C'est un GAG à chaîne non ramifiée, étant le seul non sulfaté dans la classe des GAGs (Scott et Heatley, 1999 ; Heldin, 2003 ; Stern, 2003). Le monomère d'HA est un disaccharide formé de



(Hascall, 1997) (http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan)

**Figure 1.1** – *Le modèle du ruban torsadé en trois dimensions. Les parties alternantes bleues et rouges représentent respectivement les parties hydrophiles et hydrophobes.*

N-acétyl-D-glucosamine et d'acide D-glucuronique, reliés par des liaisons $\beta$-(1,4) et $\beta$-(1,3) glycosidiques (*structure primaire*).

La formule chimique du polymère HA est: [- β(1,4)-GlcUA-β(1,3)-GlcNAc-]$_n$ .

## 1.2.2 Propriétés physico-chimiques et biologiques

L'HA est constitué d'unités répétitives de disaccharides, dont la taille varie de 2000 à 25000 unités de disaccharides, ce qui correspond à une masse moléculaire relative de $10^5$ à $10^7$ ; la longueur du polymère est comprise entre 2 et 25 micromètres (Toole, 2004 ; Stern, 2003).

La molécule d'HA (**Figure 1.1**) est *amphiphile*. Grâce aux *ponts hydrogène* et à *des interactions entre les parties hydrophobes*, l'HA peut s'associer avec lui-même pour former des « clusters ». Il peut aussi former des complexes avec d'autres types de molécules, comme les phospholipides (importants constituants des membranes (Scott, 1998), les protéoglycans et d'autres molécules extra-cellulaires, fait important pour la régulation de la porosité et de la malléabilité de la matrice extra-cellulaire (Toole, 2004).

*Les parties hydrophiles* présentent des charges négatives provenant de l'ionisation des groupements carboxyliques de l'acide glucuronique au pH physiologique. Ce caractère anionique de l'HA explique la fixation de certains cations : $Na^+$, $K^+$, $Ca^{++}$, $Mg^{++}$ (au pH physiologique) ce qui modifie les propriétés du gel d'HA.

L'une des propriétés très intéressantes de l'HA est la *malléabilité* ; elle est due aux répulsions entre les groupements $COO^-$ qui provoquent (dans les solutions diluées) l'augmentation du volume occupé par la molécule, emprisonnant l'eau. Dans les solutions plus concentrées, les molécules de HA s'enchevêtrent pour former un réseau poreux qui exerce une « pression de gonflement ». Cette pression est due aux répulsions entre les molécules, et à l'intérieur de celles-ci (Toole, 2004).

## 1.2.3 Synthèse *in vivo* et localisation

### 1.2.3.1 Synthèse de l'hyaluronan

L'HA est construit (*in vivo*) par voie enzymatique, par les hyaluronan-synthases (HAS).

Il est synthétisé (dans des conditions physiologiques normales) dans les membranes des cellules, contrairement à ses homologues l'héparane sulfate, la chondroïtine sulfate et d'autres glycosaminoglycans (GAGs) qui sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique rugueux et l'appareil de Golgi. La synthèse est contrôlée par différents facteurs chez les mammifères : facteurs de croissance, hormones et médiateurs d'inflammation.

L'endroit où se passe la synthèse est bien connu : pour les cellules eucaryotes le processus a lieu à la face interne de la membrane plasmique, l'HA étant expulsé vers la matrice extracellulaire (MEC) au fur et à mesure qu'il est formé (Toole, 2004). Le passage du polymère d'HA à travers la membrane plasmique se fait via un pore constitué par l'association des HAS avec des molécules de cardiolipine (Weigel, 1998).

#### *1.2.3.1.1 Hyaluronan synthases (HAS)*

Chez les mammifères, trois HAS participent à la synthèse de HA *in vivo* : Has1, Has2, Has3. Les trois HAS présentent des propriétés enzymatiques différentes.

Des études récemment entreprises par Weigel (Weigel, 2004b), ont montré que les produits des HAS n'ont pas une taille unique, mais leur taille varie, en fonction du type de HAS, entre $10^5$ et $10^7$ Da. Cependant, selon les études de Weigel, l'expression de HAS2 mène à la production de HA de grande taille, tandis que l'expression de HAS1 et HAS3 mènent à des polymères HA de plus petite taille (Weigel, 2004b).

Has1 est toujours la moins réactive, tandis que Has2, beaucoup plus active que Has1, a un rôle important dans le développement embryonnaire. Has3 (dont les produits sont de petits fragments de HA, mais en grande quantité) est exprimée dans la dernière étape de développement de l'embryon et dans une multitude des tissus adultes. Le « pourquoi » de ce comportement différent des HAS n'a pas encore trouvé de réponse satisfaisante à cette date.

La conclusion de ces études est que Has2 est une enzyme indispensable pour le développement embryonnaire (les embryons privés de Has2 ne sont pas viables). Par contre, Has1 et Has3 ne sont pas indispensables au développement embryonnaire (Spicer, 1998).

#### *1.2.3.1.2 Mécanisme de la biosynthèse de l'hyaluronan*

Pour réaliser la synthèse de l'HA les HAS utilisent deux substrats : UDP-GlcUA (acide uridine diphospho-glucuronique) et UDP-GlcNAc (uridine diphospho-N-acétylglucosamine). On crée d'abord « l'unité primaire » (ou monomère) de l'HA avec les deux sucres cités. La réaction se déroule ensuite par l'addition d'un nouveau sucre à « l'unité primaire », à l'extrémité réductrice de celle-ci (Weigel 2004). Les substrats nucléotide-sucre sont produits à l'intérieur de la cellule et la chaîne de HA est transférée continuellement vers l'extérieur de la cellule par la même enzyme.

En ce qui concerne la longueur de la chaîne, il n'y a pas un mécanisme valable pour le contrôle de la taille de l'HA synthétisé. Il est supposé pourtant qu'il existe une région sur le polypeptide HAS qui saisit la longueur de l'HA et qui peut ensuite moduler son activité catalytique. HAS pourrait « deviner » la longueur de l'HA selon la force qui tient ensemble la protéine et le carbohydrate (si la force est grande, un polymère plus long va être synthétisé) (DeAngelis, 1999).

### 1.2.3.2 Localisation de l'hyaluronan

*L'HA au niveau des tissus sains*

Concernant la localisation de l'HA au niveau des différents tissus, la plus grande quantité se trouve dans les tissus de la peau (7-8g, ce qui représente la moitié de la quantité totale (15g) de HA pour un adulte de taille moyenne pesant 70 kg). Ce poids est réparti entre le tissu épidermique (2-4 mg/ml) et le tissu dermique (~ 0,5 mg/ml). La matrice qui entoure les kératinocytes concentre une très grande quantité de HA (~ 4 mg/ml), aussi grande que celle trouvée dans le cordon ombilical (considéré comme le tissu avec la plus grande quantité de HA chez les mammifères) (Hascall, 1997 ; Stern, 2003 ). L'humeur vitrée de l'œil contient aussi une quantité appréciable de HA (2 mg/ml).

Les tissus des articulations synthétisent HA comme composant ayant un rôle essentiel dans les propriétés viscoélastiques du fluide synovial (Hascall, 1997).

L'HA apparaît aussi dans tous les vaisseaux sanguins (artères et veines), la quantité de HA étant fonction du type et de l'âge du vaisseau. Ainsi, l'artère du cordon ombilical du fœtus humain contient environ 40% de la quantité totale de HA et pour un adulte, les artères ne contiennent que 4-6% (dans des conditions physiologiques normales) de l'HA total (Wight, 1999).

Le niveau moyen d'HA dans la lymphe est d'environ 40 μg/ml pour un adulte sain, d'âge moyen. Un contenu élevé de HA dans la lymphe (valeur approximative 250 μg/ml) est un indicateur dans diverses maladies (arthrite rhumatoïde, maladies inflammatoires et vasculaires, cancer) (Heldin, 2003).

Les études sur les reins ont montré que, dans cet organe, la plus grande quantité de HA se trouve dans la papille (environ 400 μg/g de matière sèche) ; 250 μg/g dans la médullaire externe et de très petites quantités dans le cortex (< 5 μg/g), pour un rein en conditions non pathologiques. Les maladies rénales s'accompagnent d'une accumulation de HA, spécialement dans le cortex (Göransson, 2001).

On a identifié HA dans les intestins, où sa concentration varie selon l'emplacement : la quantité de HA contenu dans le colon était quatre fois supérieure à celle trouvée dans le duodénum (Göransson, 2001).

HA constitue un composant majeur de la matrice extracellulaire dans le parenchyme pulmonaire et dans les sécrétions des bronches. Il a été trouvé également dans les sécrétions salivaires, dans la muqueuse nasale, ainsi que dans le fluide séminal. Il remplit son rôle grâce à ses propriétés viscoélastiques, contribuant à l'hydratation des muqueuses, à la réparation de l'épithélium et au transport du mucus en dehors des bronches (Forteza, *et al.*, 2002).

On trouve également HA dans le glycocalyx et à la surface apicale des cellules endothéliales, mais aussi en localisation intracellulaire dans le cytoplasme, le noyau et le nucléole. Cela pourrait être dû au fait que les cellules peuvent internaliser le HA grâce à des récepteurs tels que CD44 (Knudson et Knudson, 1999), LYVE-1 (Jackson, 2004) et RHAMM (Turley et Harrison, 1999).

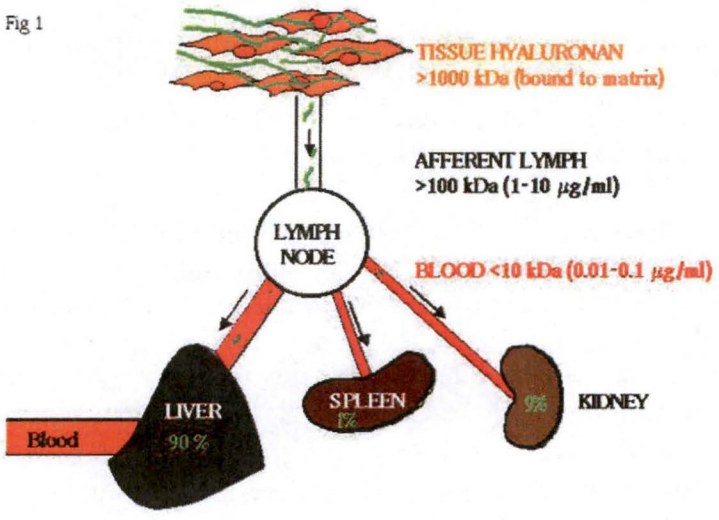
L'HA est produit par les cellules stromales et épithéliales, et possède un taux de renouvellement très rapide.

### 1.2.4 Métabolisme de l'hyaluronan

Connaître le métabolisme de l'HA pourrait éclairer de nombreuses questions sur la cancérisation des tissus et des organes, car on a constaté que ce processus va de pair avec un niveau élevé de l'HA. Le problème devrait se situer apparemment au niveau de l'équilibre entre *la synthèse* de l'HA, contrôlée par les HAS et *la dégradation* de celui-ci, contrôlée par les hyaluronidases.

*La synthèse de l'HA* se réalise « à la demande », c'est à dire, au fur et à mesure que l'HA est catabolisé. On parle d'un « métabolisme dynamique ». Certaines cellules (par exemple celles du derme) synthétisent plus qu'elles ne détruisent. On a estimé que la quantité totale de HA dans le corps humain est catabolisée et remplacée en moyenne une fois tous les jours (Laurent et Fraser, 1992).

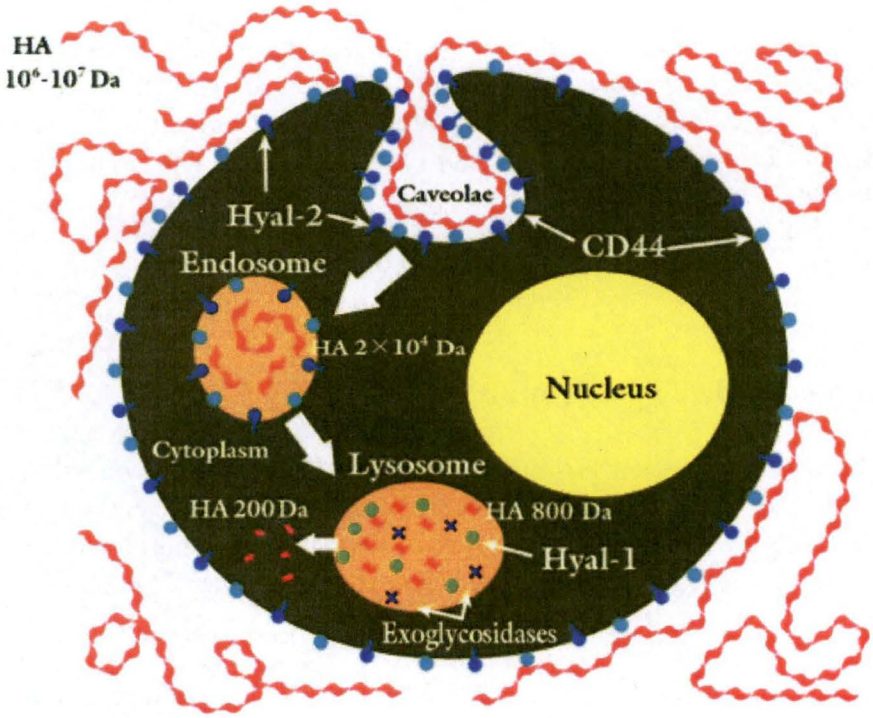
Aronson et De Duve ont été les premiers à étudier le mécanisme de *dégradation* de l'HA. Ils ont identifié un mélange d'enzymes lysosomales capables de cliver le polymère : les




**Hyaluronan and the lymphatic system**

(http//www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan)

**Figure 1.2** - *Le rôle du système lymphatique dans la dégradation de l'HA*




http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA15a/HA15aE.html

**Figure 1.3** - *Un mécanisme possible pour la dégradation de l'HA (Stern, R., 2004)*

hyaluronidases et deux exo-glycosidases : ß-glucuronidase et N- ß –acétyl-glucosaminidase présentes dans le foie de rat (Aronson et De Duve, 1968).

Le schéma proposé pour ce mécanisme laisse à supposer qu'il existe deux types de hyaluronidases : une enzyme qui clive l'HA en oligosaccharides d'une certaine taille et une autre hyaluronidase qui utilise ces derniers comme substrat, pour produire des oligosaccharides encore plus petits. Ces nouveaux fragments sont ensuite scindés par les deux ß –exoglucosidases ; les produits finaux sont : GlcUA et GlcNAc (obtenu avec un rendement de 85%) et des disaccharides (rendement 15% ). Les monosaccharides quitteraient les lysosomes pour être métabolisés ou recyclés dans le cytoplasme ; pour les disaccharides on ne connaît pas le cheminement.

Les travaux ultérieurs ont confirmé les hypothèses d'Aronson et de De Duve susmentionnées.

L*a dégradation* de l'HA, selon certains auteurs, aurait lieu dans les endosomes et les lysosomes, sous l'action de plusieurs hyaluronidases (cfr ci-après). Selon d'autres, l'HA serait dégradé d'abord au niveau des tissus (par des radicaux libres), ensuite il serait dégradé dans les ganglions lymphatiques (**Figure 1.2**) (Jackson, 2004), où il serait dépolymérisé partiellement grâce aux enzymes lysosomales (McGary *et al.*, 1989 ). Les fragments résultant entreraient en circulation sanguine, pour atteindre le foie, la rate et le rein pour l'hydrolyse terminale (Jackson, 2004).

Les principales étapes du processus seraient : la capture de l'HA extracellulaire par les cellules, grâce au récepteur CD44 et à l'action de l'hyaluronidase Hyal-2 (Csoka *et al.*, 2001 ; Stern et Csoka, 2004) ; Hyal-2 cliverait l'HA internalisé dans les invaginations de la membrane plasmique en produits de 20 kDa (50 unités de disaccharides); ces fragments sont ensuite dégradés par **Hyal-1** (et d'autres enzymes) dans les lysosomes, jusqu'au stade d'oligosaccharides (di- et tetrasaccharides) (**Figure 1.3**).

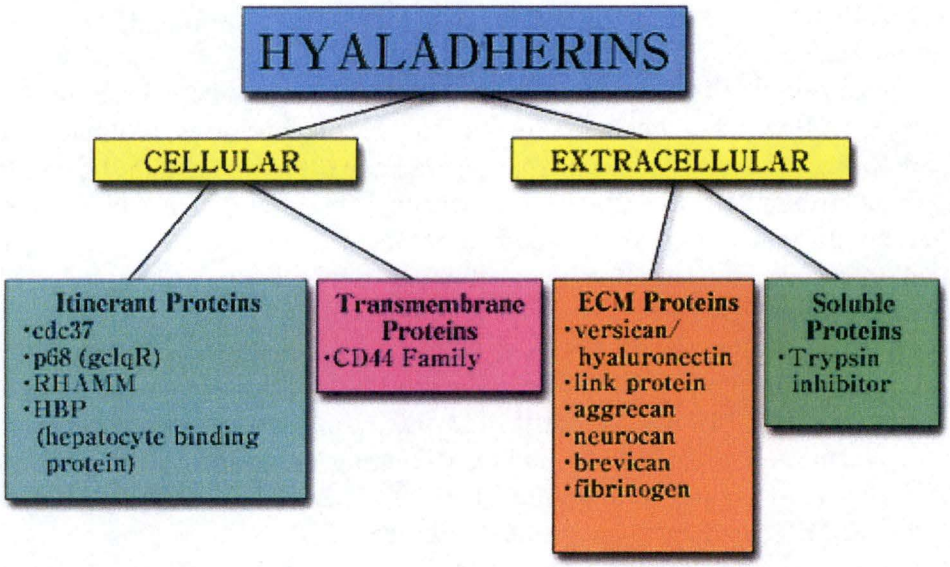
Les produits de digestion des enzymes **Hyal-1** et Hyal–2 deviennent substrats pour les exo-glycosidases lysosomales: β-glucuronidase et β-N-acétyl glucosaminidase (Csoka *et al.*, 2001).

Concernant la façon dont les oligosaccharides quittent le lysosome pour sortir dans le cytoplasme, deux hypothèses sont avancées par Stern : soit ils sont clivés auparavant en monosaccharides (car seuls les monosaccharides sont capables de diffuser à travers la membrane lysosomale) ; soit il existe des transporteurs spécifiques pour ces produits (Stern, 2004).

Les produits finaux du catabolisme de l'HA sont les sucres N-acetylglucosamine et acide glucuronique.

Stern a récemment proposé l'existence d'un mini-organite cellulaire pour le métabolisme de l'HA : *l'hyaluronasome*. Il serait une unité fonctionnelle contenant non seulement le polymère HA, mais aussi des synthases, des hyaluronidases, des inhibiteurs des hyaluronidases, des exo-β-glycosidases, et d'autres protéines nécessaires au métabolisme de l'HA comme les récepteurs CD44 et RHAMM (Stern, 2004.). L'hyaluronasome serait localisé à la surface interne de la membrane plasmique et serait le siège de la synthèse ainsi que de la dégradation de l'HA, par des mécanismes impliquant des molécules « sensibles ». Ces senseurs informeraient la cellule des niveaux de HA déjà synthétisé par un mécanisme de feedback (Stern, 2003 ).

Il est à noter que l'existence de ce nouveau mini-organite est pour l'instant remise en question, par manque d'études immuno-histo-chimiques élargies (Stern, 2004).




(http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA11/HA11E.html)

**Figure 1.4** – *La famille des protéines nommées hyaladhérines.*

### 1.2.5 Différents rôles de l'hyaluronan

L'HA joue des rôles contradictoires. D'une part il entre dans la composition de certains tissus, et joue de multiples rôles dans des conditions physiologiques normales. D'autre part, il est présent et sa concentration augmente (ou diminue) dans des conditions pathologiques (cancer et autres maladies).

#### 1.2.5.1 Rôle de l'hyaluronan dans des conditions physiologiques normales

Les rôles biologiques de l'HA sont multiples, leurs mécanismes restant toujours sous la loupe des chercheurs.

D'une part, l'HA joue un rôle mécanique ou structurel, par exemple, un rôle de colle pour les tissus conjonctifs, ou de lubrifiant pour les articulations (Toole, 2004). D'autre part, grâce à sa capacité à se lier à la matrice extracellulaire par des récepteurs (CD44, RHAMM etc.), il peut influencer le comportement cellulaire.

Le rôle structurel de l'HA est d'une immense importance pour l'humeur vitrée de l'œil, où, bien que HA se trouve à une concentration de 2 mg/ml, il n'est pas sous forme de gel fluide, mais plutôt d'un réseau solide et stable permettant l'accès libre de la lumière, à travers les mailles de l'humeur vitrée.

Il est admis par un bon nombre de chercheurs que le polymère HA est associé au développement embryonnaire précoce et à un stade non différencié des cellules. L'HA confère aux cellules des capacités de prolifération et de motilité, en leur permettant de voyager à travers l'embryon jusqu'à leur destination finale,. Ensuite l'hyaluronan sera dégradé par les hyaluronidases, qui permettront donc aux cellules de subir une différentiation.

L'apparition de l'HA dans l'évolution pourrait coïncider avec le besoin de maintenir un pool de cellules-souches dans un état non différencié, permettant ainsi des processus de régénération tissulaire et de réparation (après une blessure, par exemple) (Stern, 2003).

## *1.3 Récepteurs de l'hyaluronan*

Les recherches sur le développement embryonnaire et la réparation des tissus ont montré l'influence de l'HA sur le comportement cellulaire. L'HA se lie à la surface des cellules grâce aux récepteurs. Il est aussi unanimement accepté que l'hyaluronan se lie à des récepteurs avant d'être métabolisé. D'où l'importance de connaître, même à petite échelle, cette classe de substances.

Les récepteurs de l'HA sont des protéines appelées *hyaladhérines*, leur nom venant de l'Anglais «*hyaladherins* » ou « *hyaluronan binding proteins* ». Ces récepteurs se trouvent dans la matrice extracellulaire, mais aussi à la surface des cellules et dans le domaine intracellulaire, où ils jouent un rôle important dans le catabolisme de l'HA, dans des conditions physiologiques normales et/ou pathologiques.

Les principaux récepteurs peuvent être groupés selon leur distribution extracellulaire ou subcellulaire (**Figure 1.4**).

Parmi les récepteurs identifiés à présent on peut citer : CD44, RHAMM, LYVE-1, LEC, HARE, Layilin. Les plus importants sont CD44 (une protéine transmembranaire) et RHAMM (Turley et Harrison, 1999).

Le HA peut également pénétrer dans les cellules par un mécanisme d'endocytose fluide, ou pinocytose, non médiée par un récepteur (Tammi *et al.*, 2001).

### 1.3.1 CD44

CD44 est un récepteur glycoprotéique de 85 kDa, situé à la surface des cellules (surtout à la surface des lymphocytes); il est reconnu comme étant le récepteur prédominant pour l'HA. Il se trouve sur une multitude de cellules saines, mais également sur certaines cellules tumorales (Knudson et Knudson, 1999 ; Toole 2004).

*CD44 et cancer*

Ce récepteur est impliqué dans certains cancers (par exemple ceux de la prostate et du pancréas) (Ekici *et al.*, 2004). Des études récentes ont montré que CD44s (la forme courte) se trouve sur les cellules normales, tandis que les variants longs sont associées uniquement aux cellules cancéreuses, en facilitant leur mobilité et donc les métastases. D'autres études ont mis en évidence d'autres isoformes CD44 actives dans différentes formes de cancers humains (Knudson et Knudson, 1999).

La formation des complexes HA-CD44 et HA-RHAMM serait un facteur déterminant pour la survie des cellules cancéreuses, même dans des conditions qui conduiraient, pour des cellules saines, à l'apoptose ou à l'arrêt de croissance (Toole, 2004).

Un problème non encore résolu par les chercheurs est le suivant: quelle relation pourrait s'établir entre la capacité d'internalisation de l'HA par CD44 et son implication dans l'évolution des tumeurs ?

### 1.3.2 RHAMM

*RHAMM et cancer*

L'hyaladhérine RHAMM, comme CD44 d'ailleurs, présente plusieurs variants. Mais, contrairement au CD44, où la forme longue est impliquée dans la progression du cancer, pour RHAMM c'est la forme la plus courte qui intervient au niveau des tissus cancéreux (Turley et Harrison, 1999).

On a montré récemment, grâce à une protéine de synthèse contenant trois fois le motif de liaison $B[X_7]B$, (B représentant une arginine ou une lysine, X représentant n'importe quel acide aminé non-acide) ), que ce motif est un inhibiteur de tumeurs ; ce fait laisse à supposer que RHAMM amène l'HA à l'intérieur du cytoplasme (surtout dans les mitochondries) où il y a induction de l'apoptose. Mais le mécanisme n'est pas encore élucidé (Toole, 2004).

## *1.4 La famille des enzymes hyaluronidases et les gènes HYAL*

### 1.4.1 Définition et classification des hyaluronidases

La transformation de l'HA de haut poids moléculaire (inhibiteur d'angiogenèse) en fragments plus petits (hautement angiogéniques) se fait par l'intermédiaire d'enzymes hydrolytiques: *les hyaluronidases*.

Chez les procaryotes et les invertébrés, les hyaluronidases ont une spécificité totale pour l'HA, tandis que pour les organismes vertébrés, ces enzymes peuvent dégrader aussi la chondroïtine-sulfate (Frost, *et al.*, 1996).

La terminologie « *hyaluronidases* » a été introduite par Karl Meyer pour désigner les enzymes qui dégradent le polymère de HA. En 1971, il les classifie en trois grandes catégories, sur base d'analyses biochimiques des enzymes et de leurs produits:

1) Les hyaluronidases bactériennes sont des endo-β-acétyl-hexosaminidases qui fonctionnent comme des β – éliminases. Leurs produits de clivage sont surtout des disaccharides insaturés. Ces enzymes possèdent une spécificité pour l'HA.

2) Les hyaluronidases isolées des sangsues, autres parasites et crustacés, sont des endo-β-glucuronidases et génèrent des tétra- et hexasaccharides.

3) Les hyaluronidases mammaliennes sont des enzymes hydrolytiques de type endo-β-acétyl-hexosaminidases, générant majoritairement des tétrasaccharides et ne possédant pas une spécificité absolue pour l'HA. Elles sont actives aussi vis-à-vis de la chondroïtine et la chondroïtine-sulfate. (Stern 2003 ; 2004).

Dans les années 50, la distinction entre les différentes hyaluronidases ne se faisait pas : on parlait d' *hyaluronidases totales*, auxquelles on a attribué une localisation **lysosomale**.

Les travaux de Hutterer ont montré la présence d'une enzyme (une endohexosaminidase) dans les lysosomes du foie (rat) et ont montré son rôle dans la dégradation des mucopolysaccharides (Hutterer, 1966). L'enzyme était très active vis-à-vis de l'HA et agissait 6 – 7 fois plus lentement sur d'autres substrats (chondroïtine sulfate et héparan sulfate).

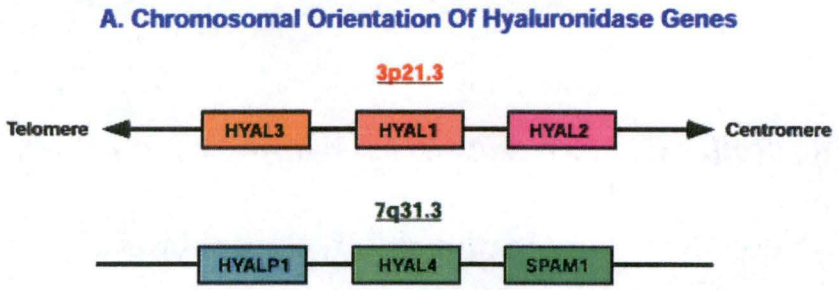
Dans la même logique s'inscrivent les recherches d'Aronson et Davidson, qui essaient de séparer les hyaluronidases en isolant du foie de rat une fraction mitochondriale-lysosomale, afin d'obtenir deux hyaluronidases, dont une seule était active (poids moléculaire 89 000) (Aronson et Davidson, 1967).

Vaes a localisé l'hyaluronidase du tissu osseux également dans les lysosomes. Cette enzyme était partiellement active à pH 3,7. Vaes a réussi à augmenter l'activité de l'enzyme par l'ajout de détergent (Vaes, 1967).

En 1968, Aronson et De Duve ont confirmé les recherches précédentes en identifiant dans une « fraction lysosomale » une famille de hyaluronidases actives en milieu acide (Aronson & De Duve, 1968).

### 1.4.2 Hyaluronidases et gènes HYAL

On sait à présent que les hyaluronidases sont des protéines dont la biosynthèse est sous le contrôle des six gènes (chez l'homme), nommés HYAL1, HYAL2 , HYAL3, HYAL4,

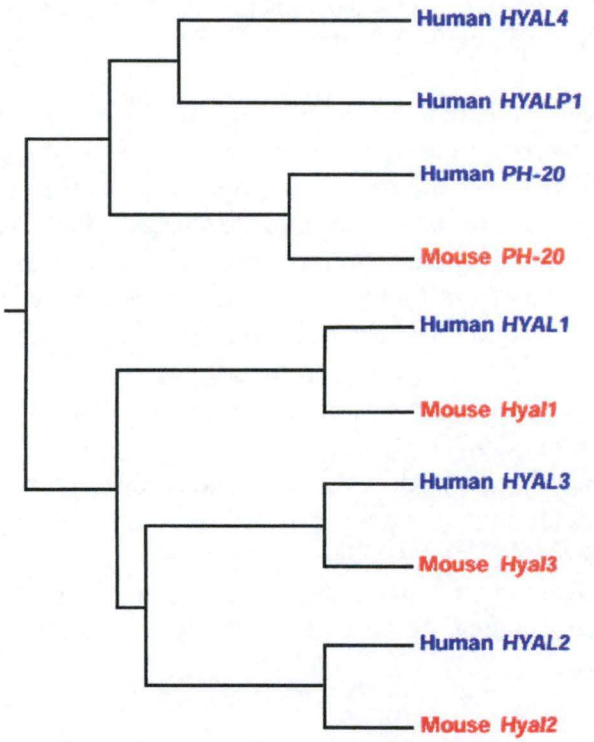



**B. Hyaluronidase Genes and their gene products:**

| | Gene | Protein |
|---|---|---|
| | HYAL1 | Hyal-1 |
| 3p21.3 | HYAL2 | Hyal-2 |
| | HYAL3 | Hyal-3 |
| | HYAL4 | Hyal-4 |
| 7q31.3 | SPAM1 | PH-20 |
| | HYALP1 | None |

(http//www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan)

**Figure 1.5 –** *Les six gènes paralogues du génome humain, codant pour les protéines hyaluronidases et leur emplacement sur les deux chromosomes.*




(http://www.bionavigator.com. http//www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan)

**Figure 1.6 -** *L'analyse phylogénique des six gènes humains et quatre gènes de souris*

SPAM1, PHYAL1 (un pseudo gène), et qui ont une identité de 40 % l'un par rapport à l'autre (Stern et Csoka, 2000).

Ils se trouvent sur deux chromosomes, répartis en deux triplets : les gènes HYAL1, HYAL2 et HYAL3, codant respectivement pour les enzymes **Hyal-1**, Hyal-2 et Hyal-3, se trouvent sur le chromosome 3p21.3 ; les autres, HYAL4 (codant pour Hyal-4), SPAM1 (Sperm Adhesion Molécule 1, codant pour PH-20) et PHYAL1 (un pseudo gène de HYAL1 qui n'a pas de produit enzymatique) se trouvent sur le chromosome 7q31.3 (**Figure 1.5**) (Stern, 2003 ; 2004).

On a trouvé un degré d'homologie beaucoup plus avancé entre les paires d'orthologues des humains et des souris qu'entre les six paralogues des humains (**Figure 1.6**) (Stern, 2004 ). Cela laisse penser que la divergence entre les paralogues s'est produite bien avant la divergence entre l'homme et la souris ( il y a environ 80 millions d'années).

L'homologie étendue des différents gènes HYAL suggère que cette famille de gènes dérive d'un gène ancestral (HYAL4) (voir plus loin, le point **1.4.3.3.2**) par duplications répétées (Csoka *et al.*, 2001).

La **Figure 1.7** représente en détail les six gènes codant pour des hyaluronidases. On peut observer que les gènes HYAL1, HYAL2, HYAL3, (sur le chromosome 3 humain), ainsi que HYAL4 et PH-20 (sur le chromosome 7) ont trois exons et quatre introns qui se succèdent de la même manière, tandis que le pseudogène HYALP1 (sur le chromosome 7 humain) n'a que deux introns intercalés entre les trois exons.

En ce qui concerne la taille des gènes, elle diffère également dans cette famille : le plus petit est HYAL1 (~3,7 kb) et, contrairement aux autres gènes, il masque parfois l'intron 1 à l'intérieur de l'exon 1 dans son ARNm ; le plus large des six gènes est HYAL4 (~ 32 kb) (Stern et Csoka, 2004).

## 1.4.3 Localisation et activité enzymatique

### 1.4.3.1 Hyaluronidases au niveau des tissus et des organes

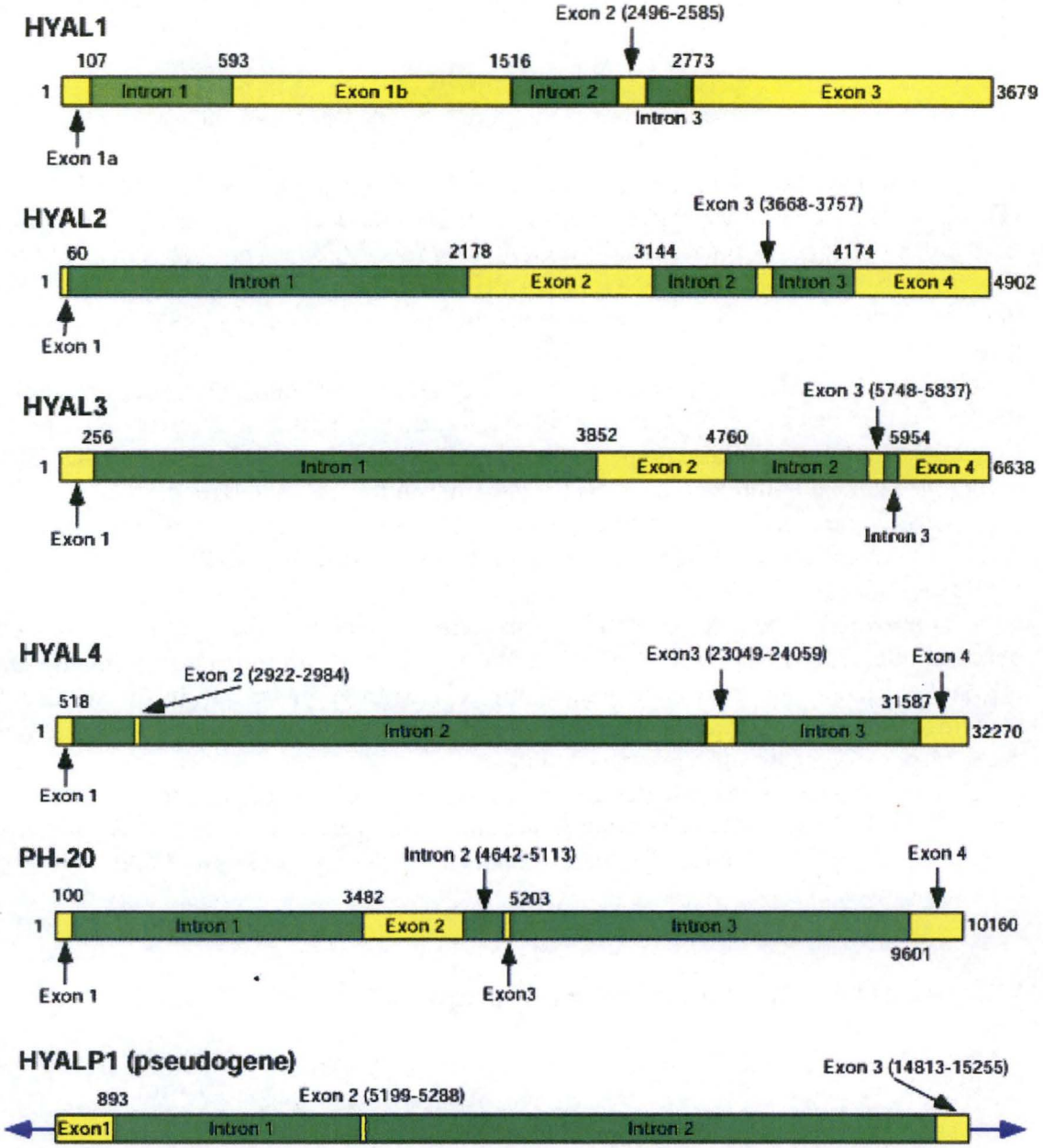
La présence des hyaluronidases a été signalée dans de nombreux tissus et organes.

C'est dans les testicules que l'on a découvert pour la première fois les hyaluronidases (Aronson et Davidson, 1965).

*Le foie et les reins* sont les organes majeurs pour la dégradation de l'HA présent dans la circulation. Les sites de dégradation sont des cellules hépatiques ou rénales ayant des récepteurs spécifiques pour l'HA. On a constaté que l'occlusion des vaisseaux hépatiques ou rénaux a comme conséquence l'augmentation du niveau d'HA dans le sang. Les recherches cliniques sur des patients souffrant de maladies rénales ont révélé des concentrations moins élevées d'HA, par rapport aux patients avec des maladies du foie, ce qui suggère des mécanismes différents pour le clivage de l'HA dans les deux organes. Ces mécanismes dépendent de la taille du substrat HA et du pH du milieu (le pH optimal pour l'enzyme **Hyal-1** du rein est 3,5) (Frost, *et al.*, 1996 ; 1997 ; Stern et Csoka, 2000).

*Les hyaluronidases des ganglions lymphatiques* dégradent 90% de l'HA avant qu'il ne rejoigne le flux sanguin. Les enzymes agissent en synergie avec les macrophages (Frost *et al.* 1996).

Les hyaluronidases de la peau agissent au pH 3,7 tandis que celles du sperme (PH-20) agissent au pH neutre. On a identifié des hyaluronidases dans le placenta humain, l'humeur




(http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA15a/HA15aE.html)

**Figure 1.7** – *La structure détaillée des gènes HYAL*

- les chiffres indiquent les nucléotides du début et de la fin de l'exon
- les gènes ne sont pas représentés à l'échelle, mais pour chacun des gènes, les proportions relatives des exons par rapport aux introns, sont respectées

vitrée, le cœur, les poumons, le cerveau, les gencives et les glandes salivaires (Bollet et al., 1963) et dans les os (Vaes, 1967).

### 1.4.3.2 Activité enzymatique

Les hyaluronidases catalysent l'hydrolyse des liaisons β-(1,4) entre les unités disaccharides de l'acide hyaluronique. L'étude des lyases (chez les bactéries ) a mis en évidence le fait que ces enzymes sont synthétisées dans leur forme inactive (zymogène). Ensuite elles sont sécrétées en dehors de la cellule bactérienne, où elles deviennent actives, en subissant une auto-dégradation significative (Jedrzejas, 2002). Plusieurs isoformes de différents poids moléculaires en résultent. On peut supposer une voie analogue pour les enzymes hydrolases chez les mammifères, qui pourrait expliquer la présence de hyaluronidases sous plusieurs isoformes. Par exemple, **Hyal-1** existe sous deux formes : la forme longue de 57 kDa, présente dans le plasma et une forme plus courte de 45 kDa, présente uniquement dans l'urine (Csoka *et al.*, 2001).

#### *1.4.3.2.1 Hyal-1*

*Dénomination et historique*

On connaît cette enzyme (qui est une endo-β-N-acétylhexosaminidase) sous le nom hyaluronoglucosaminidase-1 ou **Hyal-1**, produit du gène HYAL1 ou LUCA-1 (Lung Cancer-1) (Frost *et al.*, 2000).

**Hyal-1** a été identifiée dans les années 60 (De Salegui et Pigman, 1967) et isolée à partir du plasma humain beaucoup plus tard comme produit homogène, suite à un travail très laborieux (elle dût être purifiée 1,5 millions de fois avant d'obtenir un produit homogène) (Frost *et al.*, 1997).

*Localisation*

**Hyal-1** et Hyal-2 (qui sont des endo-β-glycosidases) constituent les principales hyaluronidases des tissus somatiques. Il est supposé que ces deux enzymes agissent d'une manière concertée pour dégrader l'HA (Csoka, *et al.*, 2001 ; Heldin, 2003) (voir aussi le point **1.2.5. Métabolisme de l'hyaluronan**).

Les analyses Northern blotting ont révélé la présence de l'ARNm d'**Hyal-1** (2,6-kb HYAL1) en abondance dans le foie, les reins et le cœur ; on a détecté très peu de cette enzyme dans les poumons et les muscles squelettiques et uniquement des traces dans le pancréas ; **Hyal-1** est absente du cerveau (Frost *et al.*, 1997 ; Lerman et Minna, 2000). On trouve aussi **Hyal-1** dans la peau et la rate (Csoka *et al.*, 2001) (Shuttleworth *et al.*, 2002). **Hyal-1** est la seule hyaluronidase présente dans l'urine.

La localisation précise des hyaluronidases au niveau subcellulaire (**Hyal-1** entre autres) n'est pas certaine. Heldin propose les lysosomes comme localisation intracellulaire, s'inscrivant ainsi dans la même logique que ses prédécesseurs. En effet, toutes les hyaluronidases connues sont actives à pH acide (en accord avec une localisation **lysosomale**). Une seule enzyme fait exception : la PH-20 qui est active au pH neutre (Heldin, 2003).

Mais la localisation des hyaluronidases dans les lysosomes ne fait pas l'unanimité. Selon Frost et ses collaborateurs les hyaluronidases dégradent l'HA dans des cavéoles situées à la surface des cellules et non pas dans les lysosomes (Frost *et al.*, 1996).

Des études plus récentes ont montré que les cavéoles ou invaginations jouent plutôt un rôle de capteurs d'HA où Hyal-2 agit en concertation avec les récepteurs (voir **Figure 1.3** ) (Stern et Csoka, 2004).

Enfin, l'existence d'un organite (appelé **hyaluronasome**) spécialisé pour le métabolisme de l'HA n'est pas impossible selon Stern. Cet organite serait le siège de la synthèse de l'HA (grâce aux HAS) mais aussi le siège des transformations de l'HA par les hyaluronidases (Stern, 2004) (voir aussi le point **1.2.5. Métabolisme de l'hyaluronan**).

En ce qui concerne **Hyal-1**, plusieurs arguments semblent contredire une localisation lysosomale. En effet, son pH optimal est de 3,8 alors que le pH lysosomal est de 4,5 (Stern, 2003). Pourtant, Lokeshwar et ses collaborateurs, se référant à l'expression de **Hyal-1** dans les tumeurs du sein et de la prostate, signalent un intervalle de pH entre 4,0 et 4,3 pour une activité maximale de l'enzyme et une diminution de l'activité enzymatique de 20% à 50% si le pH augmente (>4,5) (Lokeshwar *et al.*, 2002).

Stern et Csoka ont soulevé une série de questions par rapport à l'endroit où cette enzyme existe et agit, en mettant en discussion le rôle du CD44 comme médiateur pour la formation du complexe HA-Hyaluronidase. Ils ont conclu que ce genre de complexe ne peut pas se former, vu l'activité de l'enzyme au pH acide et l'existence de l'HA au pH neutre. Ils supposent l'intervention d'une autre molécule (inconnue) comme médiateur pour la formation du complexe enzyme-substrat au pH neutre (Stern et Csoka, 2000).

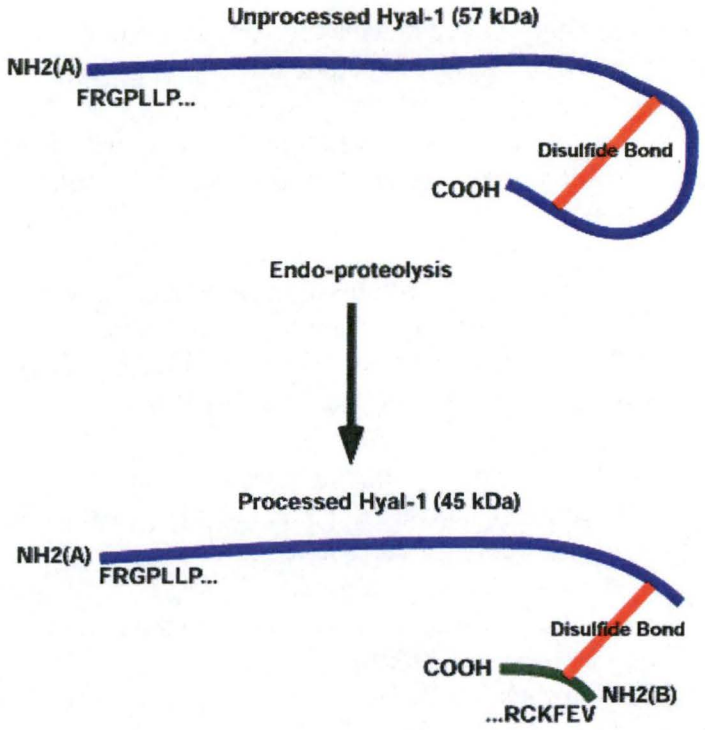
Un autre problème non élucidé : pourquoi cette enzyme lysosomale se trouve-t-elle aussi en circulation, au pH physiologique ? (Stern, 2003). De plus, il a été découvert que **Hyal-1** est enrichie dans la fraction solubilisée par le détergent Triton X114 après centrifugation, ce qui laisse plutôt supposer une association membranaire ( Frost *et al.*, 1997). Mais les études *in vitro* ont montré que **Hyal-1** est rapidement sécrétée dans le milieu de culture (cellules stromales et épithéliales) et n'est pas, ou peu, retenue par les cellules en culture (Stern et Csoka, 2000).

*Structure*

**Hyal-1** est la première hyaluronidase à avoir été isolée à partir du plasma humain, où elle se trouve à une concentration de 60 ng/ml (Frost *et al*, 1997). Sa purification à partir du plasma humain a été très difficile. En effet, comme toutes les hyaluronidases, elle est peu abondante dans le plasma, et elle possède une activité spécifique élevée, mais instable, en l'absence de détergents ou d'inhibiteurs de protéases (Csoka *et al.*, 2001). La fabrication d'anticorps monoclonaux spécifiques à l'enzyme purifiée a facilité cette purification (Frost *et al*, 1997).

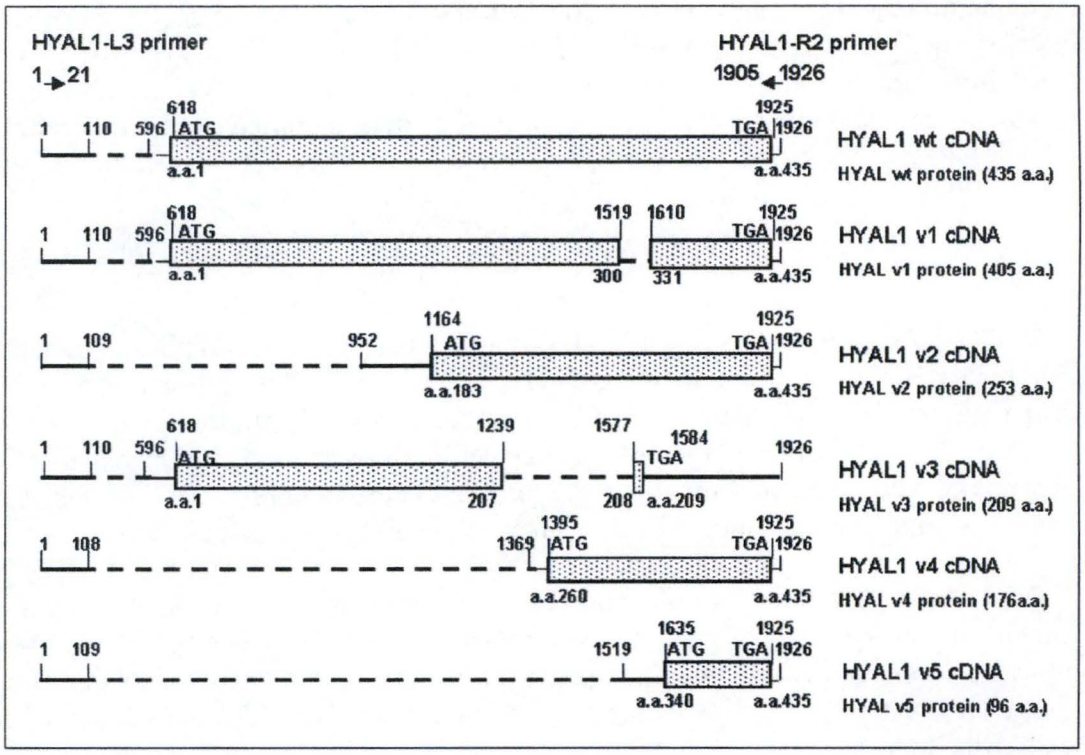
Frost et ses collaborateurs l'ont caractérisée comme une enzyme « hautement spécifique » et stable en présence de détergents (Triton X-100, Triton X-114). Il s'agit d'une glycoprotéine de 57 kDa et 435 acides aminés. Cette première isoforme contient des ponts di-sulfure. Il existe également une deuxième isoforme de 45 kDa et environ 335 acides aminés, présente dans l'urine, mais pas dans la circulation.

a) **Hyal-1** du plasma est active en milieu acide (la forme longue de 57 kDa), présente environ 40% d'identité avec l'enzyme du sperme, PH-20.




(http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA06a/HA06aE.html

**Figure1.8** - *Le processus endo- protéolytique de Hyal-1.*




http://www.jbc.org

**Figure 1.9** – *Représentation schématique des variants de splicing de HYAL1* (selon Lokeshwar *et al.*, 2002)

b) **Hyal-1** de l'urine a été identifié par Ginetzinsky et ses collaborateurs en 1954 ; ils la nomment à l'époque tout simplement « hyaluronidase » et soulignent son rôle dans la balance hydrique du rein (rat) (Ginetzinsky, 1958).

Son activité spécifique est 100 fois plus élevée que celle trouvée dans le plasma (Csoka *et al.*, 2001). Deux iso-enzymes **Hyal-1** sont présentes dans l'urine: le fragment de 57 kDa et un fragment de 45 kDa, où environ 100 acides aminés sont effacés (**Figure 1.8**). La signification de la deuxième forme (45 kDa) n'est pas connue et il reste à déterminer si elle est produite au niveau des reins (Stern et Csoka, 2004).

*Aspects génétiques*

**Hyal-1** est le produit protéique du gène HYAL1, situé sur le chromosome 3p21.3.

L'ADNc (2507 kb de longueur) pour **Hyal-1** a été caractérisé par Frost et ses collaborateurs (Frost *et al.*, 1997).

**Hyal-1** des humains et des souris ont une identité de structure de 79% (Gatphayak, 2003) ; d'autres auteurs proposent une identité de 73% (Csoka et al., 2001).

Plusieurs variants de **Hyal-1** sont produits. La **Figure 1.9** représente par ordre décroissant les 6 variants de splicing du gène HYAL1 et leurs produits enzymatiques; **Hyal-1** (la forme longue) (de 435 aa) est la forme active, les autres formes sont inactives du point de vue enzymatique (Lokeshwar *et al.*, 2002). On peut remarquer l'absence de certaines séquences d'acides aminés sur les formes inactives de **Hyal-1**.

*Activité enzymatique*

Comme l'on a déjà spécifié, **Hyal-1** agit en milieu acide (plusieurs valeurs sont proposées : pH=3,8 (Stern, 2003) ; pH=3,5 –3,7 (Stern et Csoka, 2000) ; pH= 4,0-4,3 (Lokeshwar *et al.*, 2002)). Comment ces valeurs de pH s'accommoderaient-elles avec l'action de **Hyal-1** au niveau du plasma (pH neutre) ? La question reste posée.

Concernant les produits de réaction, **Hyal-1** peut cliver (jusqu'à un certain degré) les liaisons de l'HA. Le grand polymère est fragmenté en oligosaccharides de petite taille, essentiellement des tétrasaccharides. A noter que l'activité de **Hyal-1** ne dépend pas de la taille du substrat (HA) (Stern, 2004). Elle peut cliver aussi les liaisons de chondroïtine-sulfate (elle est aussi une chondroïtinase) (Csoka *et al.*, 2001).

Le site actif de cette enzyme est formé, selon Lokeshwar, de deux résidus d'aa : $Asp^{131}$ et $Glu^{133}$. Ce duo catalytique Asp – Glu se retrouve aussi chez les autres hyaluronidases des mammifères : par exemple, Hyal-3 a un site actif formé d'$Asp^{127}$ et de $Glu^{129}$ (Lokeshwar *et al.*, 2002).

**Hyal-1** clive les liaisons β-1,4-glycosidiques, entre N-acétyl-D-glucosamine et l'acide D-glucuronique, par un mécanisme donneur-accepteur de proton (ou mécanisme acide/base). **Hyal-1** joue un rôle extrêmement important dans le domaine du cancer et dans d'autres maladies (voir les points **1.4.6 Hyaluronidases et cancer** et **1.4.7 Hyaluronidases impliquées dans d'autres maladies**).

### *1.4.3.2.2 Autres enzymes de la famille Hyal*

*Hyal-2*

HYAL-2 (situé sur le chromosome 3p21.3) se trouve dans la plupart des cellules sauf les cellules du cerveau adulte (Lepperdinger *et al,* 1998 ; Gatpahayak, 2003). Son produit,

l'enzyme Hyal-2, est ancrée dans la membrane plasmique par un lien glycosylphosphatidylinositol (GPI) ; pourtant, une certaine quantité d'Hyal-2 existe également sous forme soluble. Elle est une hydrolase, active en milieu acide (son optimum d'activité se situe en-dessous du pH = 4) et située dans les lysosomes (Lepperdinger *et al,* 1998 et 2001).

Hyal-2 clive l'HA de haut poids moléculaire en des produits constitués de 50 unités de disaccharides (20 kDa). Elle possède une plus grande affinité pour l'HA lorsque celui-ci est sous forme de structure tertiaire que lorsque celui-ci perd cette structure. Cette différence d'affinité pourrait être expliquée par le fait que l'ensemble des hyaladhérines interagissant avec les structures tertiaires de l'HA sont différentes de celles interagissant avec les structures secondaires.

Hyal-2 semble être une enzyme très importante, car la mutation nulle d'Hyal-2 chez la souris est létale. Elle semble fonctionner parfois comme un oncogène, parfois comme un gène suppresseur de tumeur (TSG) (Stern, 2003).

Hyal-2 est un récepteur de surface pour certains rétrovirus, dont l'enveloppe protéique médie la transformation oncogénique (Dirks *et al.*,2002). Hyal-2 peut également accélérer l'apoptose.

*Hyal-3*

Cette enzyme est le produit du troisième gène HYAL3 situé sur le chromosome 3p21.3. On sait aussi qu'elle se trouve dans les testicules et la moelle osseuse (Heldin, 2003), ainsi que dans le cerveau et le foie (Gatphayak, 2003). Elle est surtout exprimée dans les chondrocytes, et augmente lorsque les fibroblastes se différencient en chondrocytes. Tout comme Hyal-2, elle peut être régulée par des cytokines inflammatoires (interleukine-1, TNF $\alpha$).

La traduction *in vitro* du HYAL3 a eu comme résultat 4 variants de différentes tailles (48-, 45-, 20- et 16 kDa), parmi lesquelles uniquement la plus longue forme de Hyal-3 est active au pH = 4,2 (les autres ne présentent pas d'activité enzymatique). On a associé cette activité catalytique à la présence de l'acide aminé Glu en position 226 et à une séquence de 30 aa sur les sites 229-328 (Lokeshwar *et al.*, 2002).

En ce qui concerne les formes inactives de Hyal-3, elles sont supposées jouer un rôle dans la carcinogenèse, mais leur fonction n'est pas claire.

Il y a une grande analogie entre les enzymes **Hyal-1** et Hyal-3 du point de vue catalytique ; la perte de la séquence de 30 aa dans les deux enzymes entraîne la perte totale d'activité, probablement liée à la disparition des sites actifs impliqués dans la fixation du substrat (HA) (Gatphayak, 2003).

*Hyal-4*

HYAL4 est situé sur le chromosome 7q31.3. La longueur de l'ADNc de Hyal-4 est de 2414 nucléotides et son expression est restreinte au placenta et aux muscles squelettiques (Gatphayak, 2003 ; Stern et Csoka, 2004).

L'Hyal-4 est une chondroïtinase, la première enzyme de ce type identifiée chez les vertébrés ; elle ne possède pas d'affinité pour l'HA (Stern et Csoka, 2004).

Il est possible que HYAL4 soit la séquence ancestrale de toutes les hyaluronidases. En effet, le nématode *Caenorhabditis elegans* ne possède qu'une seule séquence homologue aux 6 paralogues humains ; or le seul GAG trouvé dans le nématode est la chondroïtine. Donc l'enzyme serait une chondroïtinase. L'hyaluronan et la chondroïtine sont des molécules très

proches : la seule différence étant que la N-acétylglucosamine de l'HA est remplacée par la N-acétylgalactosamine dans la chondroïtine. La duplication du gène, suivie par des mutations génétiques, ont permis à l'enzyme de reconnaître un second substrat (l'HA) tout en gardant une certaine affinité pour le premier (chondroïtine et chondroïtine-sulfate).

On pense que l'organisme dans lequel la duplication s'est produite est le céphalocordé *Amphioxus,* qui possède une seconde séquence ressemblant à une hyaluronidase. Celle-ci code pour une enzyme ayant probablement une vraie activité hyaluronidase (Spicer et McDonand, 1998 ; Stern, 2003).

*HYALP1*

Selon certains chercheurs, le pseudogène PHYAL-1 (ou HYALP-1) (présent sur le chromosome 7q31.3 ) se trouve dans la glande thyroïde et dans les glandes surrénales et selon d'autres (Gatphayak, 2003) il se trouve exclusivement dans les testicules.

PHYAL1 des humains est considéré plutôt comme un pseudogène que comme un gène, à cause de sa dégénérescence provoquée par quelques mutations ; il a des codons-stop aberrants. Par contre, chez les souris il ne contient aucune mutation et c'est un gène fonctionnel.

*PH-20*

La première hyaluronidase eucaryote que l'on a réussi à cloner provenait du venin d'abeille et était homologue à la PH-20 humaine.

Cette enzyme (qui est le produit protéique du gène SPAM1 situé sur le chromosome 7q31.3 ) est surtout présente dans les testicules, plus précisément dans les spermatozoïdes.

Il existe deux formes de PH-20. La première, de 64 kDa, est présente à la surface de la tête acrosomale du spermatozoïde pendant la fertilisation. Elle est liée à la membrane plasmique par une ancre lipidique GPI (glycosylphosphatidylinositol) et agit au pH neutre (Frost, *et al.*, 1996). Son rôle est d'aider le spermatozoïde à pénétrer la matrice extra-cellulaire riche en HA des cellules du cummulus. La seconde forme, de 53 kDa, est soluble et localisée dans la vésicule acrosomale, elle aide le spermatozoïde à atteindre la membrane de l'ovocyte, en digérant l'HA de la zona pellucida. Cette forme est active en milieu acide (Stern et Csoka, 2000).

### 1.4.4 Hyal-1 et cancer

Plusieurs facteurs sont à prendre en compte lorsqu'on aborde le problème complexe de la relation **Hyal-1** et cancer.

Tout d'abord, le niveau élevé de HA dans les tumeurs peut s'expliquer soit par une hyper-activité des enzymes HA synthases (HAS), soit par une diminution de l'activité des hyaluronidases.

Des mutations du gène **HYAL-1** (ou LUCA-1) peuvent avoir pour conséquence la disparition de l'enzyme **Hyal-1** fonctionnelle. En effet, Lokeshwar et ses collaborateurs (2002) ont étudié les différentes variantes de **HYAL1** et HYAL3 et l'activité catalytique des enzymes en fonction de pH, dans les cellules tumorales (cancer de vessie, de prostate et cellules rénales). Ils ont trouvé plusieurs isoformes (**Hyal-1**v1 à **Hyal-1**v5) inactives qui sont présentes dans les tissus normaux et dans les cellules tumorales du cancer de la vessie G1. Seule la forme longue de **Hyal-1** était présente dans les tumeurs G2/G3 et les métastases.

Le pH du milieu environnant peut également influencer l'état d'activité des enzymes hyaluronidases. Les enzymes **Hyal-1** étaient inactives (*in vitro*) au pH 3,7 ; 5,0 et 7,0 (Lokeshwar, *et al.*, 2002).

Une étude similaire a été réalisée pour les isoformes de Hyal-3 : Hyal-3wt (la forme longue) et Hyal-3v1, v2 et v3. La seule enzyme active au pH=7,4 était Hyal-3wt. On a conclu qu'une séquence de 30 aa était responsable de l'activité enzymatique des **Hyal-1** et Hyal-3. En fait cette séquence participe à la constitution du site de fixation de l'hyaluronan. (Lokeshwar, *et al.*, 2002).

D'autres facteurs à prendre en considération dans le développement des cancers sont le comportement ambigu de Hyal-2 qui peut fonctionner soit comme un oncogène soit comme un gène suppresseur de tumeur (tumour suppressor gene = TSG); ainsi que le rôle de certains récepteurs à l'HA (notamment CD44).

### 1.4.4.1 Hyal-1 comme agent actif contre le cancer

L'implication des hyaluronidases dans le cancer a été signalée voici une trentaine d'années. Elles ont été d'abord utilisées comme adjuvant dans les traitements anti-cancéreux, surtout quand la chimiothérapie était inefficace. Leur rôle présumé était de faciliter l'entrée des médicaments jusqu'au niveau des cellules cancéreuses.

Le traitement des tumeurs avec des hyaluronidases, en particulier **Hyal-1**, peut réduire la prolifération des tumeurs par le clivage de l'HA ; les oligomères résultants bloquent les récepteurs CD44 et RHAMM et les tumeurs régressent (Toole, 1998).

D'autre part, des études ont montré que **Hyal-1** est capable de transformer l'isoforme longue et mobile de CD44, impliquée dans le processus de cancérisation, en isoforme courte et immobile ou « normale » (Gatphayak, 2003).

De plus, de nombreuses études expérimentales sur les tumeurs ont mis en évidence les effets anticancéreux des hyaluronidases, entre autres **Hyal-1**. Cette enzyme est le produit d'un gène candidat TSG (tumor suppressor gene), effacé (au niveau de l'ADN et de l'ARN) dans les tumeurs des cancers des poumons (Frost *et al*, 2000 ; Lerman *et* Minna, 2000 ; Junker *et al.*, 2003).

*Les rôles de **Hyal-1*** dans le traitement des tumeurs peuvent être groupés comme suit :

1) On a souvent observé que les tumeurs sont entourées par une matrice de tissu conjonctif enrichi en hyaluronan qui augmente la motilité des cellules cancéreuses et qui assure une protection de ces cellules contre le système immunitaire (par la sécrétion d'anti-inflammatoires ou par la destruction des antigènes spécifiques de la tumeur). Un premier rôle des hyaluronidases serait donc de rendre la tumeur plus accessible aux lymphocytes T effecteurs, en digérant l'HA qui entoure la tumeur (Gatphayak, 2003).

2) Les hyaluronidases peuvent également empêcher la métastase en agissant sur le récepteur CD44, en convertissant, par splicing alternatif, la forme longue associée aux cancers en la forme courte associée aux cellules normales (voir aussi le point **1.3.1. *CD44 et cancer)*** (Gatpahayak, 2003).

3) Les hyaluronidases peuvent être utilisées elles-mêmes comme médicaments anticancéreux. Des études entreprises par Stern sur des souris atteintes de cancer du sein ont

montré que le traitement du cancer du sein avec l'hyaluronidase avait comme effet la régression du volume des tumeurs (Stern, 1995). Des études *in vitro* et *in vivo* (intra-veineux) ont montré que le traitement du cancer de sein avec l'hyaluronidase avait comme effet la régression du volume des tumeurs, par la destruction partielle de l'HA ; l'expression du récepteur CD44 des cellules tumorales était également modifiée et le récepteur ne pouvait plus ancrer les grandes molécules de HA.

*L'influence du pH du milieu*

On a essayé de relier l'activité des hyaluronidases dans des conditions pathologiques au pH du milieu. Des études cliniques ont montré que l'activité de **Hyal-1** est indépendante du pH dans différentes formes de cancer (du larynx, du pharynx et de la cavité orale), où une même valeur du pH = 4,4 a été trouvée dans la salive des patients et dans la salive des individus sains ; le niveau de **Hyal-1** (la forme de 55kDa) est beaucoup plus élevé dans la salive des patients atteints de cancer (Franzmann, *et al.*, 2004). Cette observation a poussé certains chercheurs à envisager **Hyal-1** (seule ou associée avec HA) comme marqueur tumoral dans différentes formes de cancer comme le cancer de prostate (Ekici, *et al.*, 2004) ; pourtant d'autres invitent à la prudence (Stern, 2003).

D'autres études ont révélé une forte dépendance du pH de l'activité enzymatique des hyaluronidases. Ainsi, on a trouvé une hyaluronidase agissant au pH neutre dans le cancer de l'utérus, une autre pour le cancer de prostate, agissant au pH optimal 4,6 (Frost *et al.*, 1996).

*Le tandem HAS-hyaluronidases*

Un examen comparatif du rôle des HAS et des hyaluronidases a permis de constater que la sur-expression des HAS dans les tissus, augmentait la possibilité de développer des tumeurs et que les hyaluronidases se comportaient différemment : dans certains cas elles augmentaient la tumorigénicité et dans d'autres elles supprimaient les tumeurs. L'étude comparée de l'expression de **Hyal-1** et HAS2 dans le cancer de colon (*in vitro* et *in vivo*) a montré que HAS2 développait les tumeurs, tandis que **Hyal-1** retardait le développement des tumeurs (Jacobson, *et al.*, 2002).

D'autre part, on a émis l'hypothèse que les hyaluronidases pourraient jouer un rôle dans l'induction de l'angiogenèse de la cornée.

Il n'est pas clair à ce jour, de savoir si les hyaluronidases aident à la prolifération des tumeurs ou si par contre, elles les inhibent. A ce propos, les résultats présents dans la littérature sont contradictoires: d'une part, les hyaluronidases sont très bien exprimées en terme d'activité dans les mélanomes, les glioblastomes et les cancers du colon chez les humains ; d'autre part, les hyaluronidases apparaissent comme suppresseurs des tumeurs (Heldin, 2003).

Ces études ont ouvert une voie de recherche pour découvrir la manière dont les enzymes HAS et les hyaluronidases pourraient intervenir dans le processus de cancérisation des organes.

*Le rôle de Hyal-2* dans le développement du cancer a été également exploré. On a conclu que :

Hyal-2 peut induire le cancer ; elle fonctionne comme un oncogène et peut accélérer la formation des tumeurs (Novak *et al.*, 1999). Mais elle peut fonctionner aussi comme produit TSG et accélérer l'apoptose.

### 1.4.5 Hyal-1 et autres hyaluronidases impliquées dans d'autres maladies

**Hyal-1** et Hyal-2 sont des déterminants importants dans l'apparition de certaines maladies comme la *mucopolysaccharidose IX, la sclérodermie* et la *cryptorchidie.*

La *mucopolysaccharidose IX* (associée à une déficience d'activité des hyaluronidases) apparaît suite aux mutations génétiques au niveau du gène HYAL1, avec la diminution voir la disparition de son produit enzymatique. Mais l'absence de **Hyal-1** semble compensée par les β- exo-glycosidases, donc les sujets restent toujours viables (Triggs-Raine *et al.*, 1999).

La *sclérodermie* (dont les caractéristiques diffèrent en fonction du stade de la pathologie) est provoquée par une forte diminution de l'activité de **Hyal-1**, surtout en phase avancée de la maladie (plus de 2 ans) (Neudecker *et al.*, 2004).

La *cryptorchidie* (la descente incomplète des testicules dans le scrotum) est provoquée par un déséquilibre entre le développement du gubernaculum d'une part et le métabolisme de l'HA d'autre part, pendant le développement du fœtus. Des expériences sur des porcins ont montré que la dégradation sélective de l'HA a lieu dans le gubernaculum au niveau des lysosomes, sous l'influence de hyaluronidases actives en milieu acide (pH 2,5-3,5) (Gatphayak, 2003).

# But du mémoire

# 2 But du mémoire

## *2.1 Localisation subcellulaire d'Hyal-1 : controverses*

La localisation subcellulaire précise de l'**Hyal-1** apporterait quelques éclaircissements sur sa biosynthèse et son importance métabolique. Dans la littérature, **Hyal-1** est considérée comme une enzyme lysosomale. Elle est en outre secrétée dans le plasma (Heldin, 2003 ; Stern, 2003). Pourtant, cette localisation lysosomale n'a jamais été confirmée expérimentalement.

Des arguments en faveur de la localisation lysosomale de l'**Hyal-1** sont le pH optimal acide de l'enzyme compris entre 3,5 et 3,8 (Stern, 2003 ; Stern et Csoka, 2000), et le fait que la déficience en **Hyal-1** plasmatique provoque une maladie de surcharge lysosomale : la mucopolysaccharidose IX (Triggs-Raine *et al*, 1999).

Cependant, **Hyal-1** présente parfois un comportement entrant en conflit avec une localisation lysosomale. Pourquoi cette enzyme est-elle solubilisée dans le plasma par le Triton X 114, habituellement utilisé pour isoler les protéines intégrales membranaires? (Frost *et al*, 1997).

Des observations sur les patients atteints de I-cell disease montrent également que **Hyal-1** n'a pas le même comportement que les autres enzymes lysosomales. Cette maladie consiste en une déficience de la N-acétylglucosamine-1-phosphotransférase, responsable de la fixation d'un signal mannose-6-phosphate sur les enzymes destinées aux lysosomes. En l'absence de ce signal, les enzymes sont secrétées et l'on observe, dans le plasma des personnes atteintes de I-cell disease , une augmentation de l'activité des enzymes lysosomales. Cette situation ne s'observe pas pour **Hyal-1** (Stern 2004), ce qui laisse supposer :

- soit que celle-ci ne serait pas une enzyme lysosomale
- soit qu'elle serait dirigée vers les lysosomes par un mécanisme différent de la voie du mannose-6-phosphate.

## *2.2 Démarche expérimentale*

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une réinvestigation de la localisation subcellulaire de **Hyal-1**, faite à l'unité de recherche URPHYM. Des premiers résultats, obtenus au laboratoire, suggèrent en effet qu'**Hyal-1** ne serait pas un composant lysosomal dans le foie de rat.

Le but de notre mémoire est donc de rechercher si, sur un autre organe, le rein, également riche en hyaluronan et en **Hyal-1**, des données comparables sont obtenues.

Nous avons ébauché une étude morphologique par immunofluorescence, sur des cellules HK2, provenant du tubule rénal proximal humain.

Afin d'étendre les résultats obtenus en morphologie par des analyses biochimiques, nous avons utilisé le rein de rat. En effet, les cellules HK2 étant difficiles à cultiver, des analyses biochimiques sur ces cellules sont malaisées.

Dans un premier temps, nous avons comparé, dans le rein de rat, la distribution de **Hyal-1** à celle de différents marqueurs enzymatiques, après centrifugation différentielle d'un homogénat, ainsi qu'après une centrifugation isopycnique en gradient de saccharose d'une fraction sédimentable post-nucléaire MLP.

Il n'existe aucun test enzymatique permettant de mesurer spécifiquement l'activité d'**Hyal-1**. Pour repérer cette protéine, nous avons donc fait appel à la méthode de « Western-Blotting » à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine **Hyal-1** recombinante (don du Dr. B.Triggs-Raine).

Dans le but d'obtenir de plus amples renseignements sur la structure abritant **Hyal-1**, nous avons soumis la fraction MLP à divers traitements : choc hypotonique et mécanique, détergents et sels.

# Matériel et méthodes

# 3 Matériel et méthodes

## *3.1 Etudes morphologiques*

### 3.1.1 Les cellules HK2

Les cellules HK2 (human kidney 2) sont des cellules du tubule proximal rénal. Elles dérivent de cellules normales humaines, qui ont ensuite été immortalisées par transduction avec les gènes E6 et E7 du virus HPV-16 (human papilloma virus 16).

Elles sont cultivées dans des boîtes T75, à 37°C, dans une étuve avec 5% de $CO_2$. Le milieu de culture employé est le « Keratinocyte-Serum Free Medium » (GIBCO-BRL), auquel on ajoute les substances suivantes :

-recombinant epidermal growth factor : 5 ng/ml

-bovine pituitary extract : 0,05 mg/ml

-un mélange contenant : de l'insuline à une concentration finale de 5 µg/ml, de la transferrine à une concentration finale de 5 µg/ml et du sélénate à une concentration finale de 5 ng/ml (Sigma, I-1884).

Le milieu de culture est changé tous les trois jours. Lorsqu'elles atteignent 80% de confluence, les cellules HK2 doivent être trypsinisées et repiquées dans de nouvelles boîtes.

### 3.1.2 Immunofluorescence

Cette technique est utilisée pour visualiser au sein d'une cellule la localisation d'une protéine, grâce à un système de reconnaissance par un anticorps primaire, lui-même reconnu par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome.

Les cellules sont repiquées sur des lamelles stériles de 15 mm de diamètre. Une fois qu'elles sont adhérentes et suffisamment confluentes, les cellules sont lavées au PBS (Phosphate Buffer Saline) filtré. Elles sont ensuite fixées dans du méthanol-acétone (préparé dans un rapport 80/20), pendant 20 min à –20°C.

Afin de permettre l'entrée de l'anticorps primaire dans les cellules, celles-ci sont perméabilisées au PBS-saponine 0.05% pendant 10 min à température ambiante.

Les cellules sont ensuite mises en présence d'une solution de PBS-BSA 1 % (10 min à T° ambiante), dans le but de saturer les sites non-spécifiques présents dans la cellule.

L'anticorps primaire utilisé pour reconnaître **Hyal-1** est 1D10 (fourni par le Dr. B. Triggs-Raine, Département de Biochimie et Biologie Moléculaire, Université de Manitoba), dilué dans du PBS-BSA. Les cellules sont incubées avec cet anticorps pendant 2h à T° ambiante (30 µl d'anticorps par lamelle, dans une chambre humide).

L'anticorps secondaire est un anticorps anti-souris couplé à un fluorochrome ALEXA vert. Il est utilisé à une dilution de 1/500, dans du PBS-BSA, à raison de 30 µl d'anticorps par lamelle. Les cellules sont incubées pendant 45 min, à T° ambiante, à l'abri de la lumière.

Si l'on désire mettre en évidence le noyau de la cellule, on doit faire un marquage au TOPRO (à dissoudre dans de la RNAse A, à raison de 3 µl de TOPRO pour 160 µl de RNAse A à 2mg/ml). Les lamelles sont incubées dans 30 µl de TOPRO pendant 30 min à T° ambiante, à l'abri de la lumière.

Elles sont ensuite montées au MOWIOL (± 25 µl), et observées le lendemain au microscope confocal. Le MOWIOL est un agent empêchant le « fading », c'est à dire la diminution du signal fluorescent au cours du temps.

Après chacune de ces différentes étapes, les cellules sont rincées 3 fois au PBS. A partir de la préparation de l'anticorps secondaire et jusqu'à la fin de l'expérience, il faut travailler dans la pénombre.

Un contrôle négatif, c'est à dire une lamelle non soumise à de l'anticorps primaire, est également préparée, afin de vérifier la spécificité de l'anticorps secondaire.

Lorsque l'on désire mettre en évidence les lysosomes par un marquage immunofluorescent, le marqueur utilisé est la protéine LAMP-1. L'anticorps primaire reconnaissant cette protéine est H4A3 (DSHB, Developmental Studies Hybridoma Bank, USA), et l'anticorps secondaire, un anticorps anti-souris couplé au fluorochrome ALEXA vert.

## *3.2 Le rein*

Le rein est un organe faisant partie de l'appareil urinaire. Il est le principal responsable de l'homéostasie du milieu intérieur, en régulant les quantités d'eau et d'électrolytes excrétées dans l'urine (maintenant ainsi l'équilibre osmotique dans l'organisme), ainsi qu'en éliminant des produits toxiques du métabolisme, comme les composés azotés du sang, l'urée et la créatinine.

Le rein exerce également une fonction endocrine, en synthétisant l'angiotensine II, faisant partie du système rénine-angiotensine – aldostérone, responsable du maintien de la pression sanguine. C'est aussi le rein qui fabrique l'érythropoïétine, dont le rôle est de stimuler la production d'érythrocytes dans la moelle osseuse.

Les unités fonctionnelles du rein sont les néphrons, constitués chacun d'un corpuscule rénal et d'un tubule rénal entouré de vaisseaux sanguins. Le corpuscule rénal est formé par un glomérule ( petit peloton de capillaires sanguins) entouré de la capsule de Bowman ; il est le siège de la filtration du plasma. Le tubule rénal est subdivisé en plusieurs régions : le tubule proximal, l'anse de Henlé et le tubule distal, qui se jette dans le canal collecteur aboutissant au bassinet. La fonction principale de ces tubules rénaux est de transformer l'urine primitive par des mécanismes d'absorption et de sécrétion.

### 3.2.1 Le fractionnement complet par centrifugation différentielle

Le fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle permet de séparer les différents constituants des cellules en fonction de leur taille.

L'étape préliminaire est l'homogénéisation ou la désintégration des tissus et des cellules, par la rupture des membranes plasmiques; le résultat est un **homogénat** qui contient en suspension les organites, des fragments de membrane et des molécules solubles. Ce mélange biologique est ensuite centrifugé plusieurs fois, à des vitesses et durées croissantes afin d'obtenir des constituants cellulaires de plus en plus petits. On obtient un ***culot*** (fraction sédimentée) et un ***surnageant*** (fraction non sédimentée), qu'on soumet à des nouvelles centrifugations.

***La centrifugation différentielle*** est une méthode souvent utilisée pour déterminer la localisation de protéines dans l'un ou l'autre des organites subcellulaires (noyau, mitochondrie, lysosome, peroxysome, etc. ou dans la portion soluble du cytoplasme).

Nous avons appliqué cette méthode aux tissus rénaux du rat, afin de déterminer la localisation subcellulaire de l'**Hyal-1**.

Des rats de 200 à 250 g , sont mis à jeun, anesthésiés à l'éther puis sacrifiés. Leurs reins sont prélevés et conservés dans du saccharose 0.25 M, refroidi dans de la glace. Ils sont ensuite pesés, découpés en fines lamelles et homogénéisés par 10 passages au Dounce Loose (Blaessig glass, Rochester, N.Y.), dans le même milieu isotonique de saccharose 0.25 M.

Cette suspension homogénéisée est ensuite fractionnée par centrifugation différentielle selon le schéma de de Duve *et al (*1955) en tenant compte des modifications nécessaires pour ce tissu (Wattiaux, communication personnelle).

Le surnageant est soumis successivement à des champs centrifuges croissants selon le schéma ci-après :

**Homogénat de rein**

(10 min à 1700 rpm puis 2x10 min à 1500 rpm) (centrifugeuse Internationale)

Culot = **N** Surnageant (**S1**+**S2**+**S3**) = **E**

(2x3 min à 8000 rpm)(centrifugeuse Beckman Rotor 40)

Culot = **M1** Surnageant (**S1**+**S2**) = **M2LPS**

(2x3 min à 13000 rpm)

Culot = **M 2** Surnageant (**S1**+**S2**) = **LPS**

(2x7 min à 25000 rpm)

Culot = **L** Surnageant (**S1**+**S2**) = **PS**

(40 min à 39000 rpm)

Culot = **P** Surnageant = **S**

**NB** : Toutes les centrifugations effectuées pour fractionner l'extrait cytoplasmique E se déroulent dans une centrifugeuse Beckman (Rotor 40).

Finalement, six fractions sont obtenues, qui bien qu'hétérogènes sont fortement enrichies en organites spécifiques:

**La fraction N** (nucléaire) est formée principalement de noyaux, de cellules intactes ayant résisté à l'homogénéisation ainsi que de gros débris cellulaires (membrane plasmique et réticulum).

**La fraction M1** contient essentiellement des structures lysosomales, spécifiques au rein, ainsi que des mitochondries et des peroxysomes.

**La fraction M2** est enrichie en mitochondries, mais contient également des peroxysomes.

**La fraction L** est enrichie en éléments du réticulum et de la membrane plasmique, et peut parfois contenir des peroxysomes.

**La fraction P** (microsomale) contient des petits éléments du réticulum endoplasmique, et des fragments de la membrane plasmique.

**La fraction S** ou fraction soluble est constituée par tous les éléments solubles (non-sédimentables) de la cellule.

**NB : La fraction sédimentable post-nucléaire MLP,** utilisée dans divers types d'expériences de gradients, est obtenue après une centrifugation de 45 minutes à 39 000 tours (centrifugeuse de Beckman), de **la fraction E** de rein de rat obtenue après les trois centrifugations à l'Internationale.

### 3.2.2 Centrifugation isopycnique en gradient de saccharose

Cette technique permet la séparation des organites selon un critère de *densité*.

Dans nos expériences sur le rein de rat, une fraction MLP (0.5 mL) est déposée au sommet d'un gradient de saccharose dont les limites de densité sont 1.09 g/mL et 1.26 g/mL (tube Beckman de 5 mL). Ce tube est ensuite centrifugé à 39 000 tours par minute pendant 150 minutes dans un Rotor SW65.

Après centrifugation, le tube est découpé en 13 sections parallèles de 3.2 mm de hauteur, afin d'obtenir les différentes fractions de densités croissantes. Ces densités sont mesurées grâce au réfractomètre et les hauteurs des fractions, grâce au pied à coulisse. L'activité des enzymes de référence peut dès lors y être mesurée.

### 3.2.3 Choc hypotonique

Le principe de ce procédé est de soumettre les organites à des concentrations décroissantes en saccharose. Les structures sensibles à l'hypotonicité éclatent, provoquant ainsi une libération des enzymes initialement libres dans leur matrice.

Nous avons soumis une fraction sédimentable post-nucléaire MLP aux concentrations suivantes de saccharose: 0.25 M (concentration isotonique servant de témoin), 0.15 M, 0.10 M, 0.05 M et 0.025 M. Après une centrifugation de 45 min à 39 000 tours par minute (centrifugeuse Beckman, Rotor 40), nous avons récupéré les culots et les surnageants correspondant à chaque traitement. Les culots ont été resuspendus dans les volumes initiaux. Avant la centrifugation, nous avons prélevé, pour des analyses ultérieures, une aliquote de chaque MLP traitée.

### 3.2.4 Choc mécanique

Cette technique repose sur le même principe que celle du choc hypotonique, sauf que dans ce cas les organites éclatent grâce à un broyage de l'échantillon par un appareil Ultra-Turrax.

Le choc mécanique est plus violent que le choc hypotonique, auquel certains organites comme les peroxysomes sont résistants.

Nous avons soumis une fraction sédimentable post-nucléaire MLP à un passage de 1, 2, ou 3 minutes à l'Ultra-Turrax. Après une centrifugation de 45 minutes à 39000 tours par minute (centrifugeuse Beckman, Rotor 40), nous avons récupéré les surnageants et les culots resuspendus dans leurs volumes initiaux.

Avant la centrifugation, nous avons prélevé, pour des analyses ultérieures, une aliquote de chaque MLP traitée.

### 3.2.5 Solubilisation des enzymes membranaires

Si la protéine (l'enzyme) est associée à des membranes, elle peut dans certains cas être extraite de celles-ci sous forme soluble. Afin de détruire les structures membranaires, différentes techniques ont été utilisées: les détergents (digitonine, Triton X100, SDS) , différents sels ($Na_2CO_3$ -KCl ), ainsi que l'EDTA.

#### 3.2.5.1 Traitement par la digitonine

Dans cette expérience, nous avons soumis une fraction MLP à des concentrations croissantes de digitonine. Cette substance est un détergent non ionique ayant la propriété de solubiliser le cholestérol, libérant ainsi déjà pour de faibles concentrations les enzymes associées à des organites dont les membranes sont riches en cholestérol.

Les concentrations de digitonine utilisées sont : 0 mg/mL (témoin), 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 1.5 mg/mL et 2 mg/mL. Après avoir prélevé une aliquote de la MLP pour des analyses ultérieures, nous avons centrifugé chaque échantillon 45 min à 39 000 tours (centrifugeuse Beckman, Rotor 40), afin d'obtenir un culot et un surnageant pour chaque situation. Les culots sont resuspendus dans leurs volumes initiaux.

#### 3.2.5.2 Traitement par le Triton X100 (0.5%)

Une expérience similaire a été menée avec le Triton X100 (à 0°C) , détergent non ionique connu pour solubiliser la plupart des protéines membranaires ( à l'exception de celles ancrées à la membrane par une ancre lipidique).

Nous avons soumis la fraction post-nucléaire sédimentable MLP du rein de rat à l'action du Triton X100 (0,5%). Les échantillons ont été ensuite centrifugés à haute vitesse et nous avons récupéré un culot et un surnageant.

#### 3.2.5.3 Traitement des membranes par différents solubilisants

Afin d'isoler les membranes de tous les organites subcellulaires, nous avons soumis une fraction MLP de rein de rat à un passage de 3 min à l'Ultra-Turrax, puis à une centrifugation de 45 min à 39 000 tours (centrifugeuse Beckman, Rotor 40). Le culot ainsi obtenu, resuspendu dans son volume initial, a été mis en présence de différentes substances susceptibles de solubiliser les protéines qui y sont liées.

Les produits suivants ont été utilisés : le détergent Sodium dodécylsulfate (SDS) (0.1 %), les sels $Na_2CO_3$ (0.1 M), KCl (100 mM) et EDTA (50 mM, pH 7.4).

Après avoir prélevé une aliquote des membranes traitées avec un solubilisant particulier, nous avons centrifugé chaque échantillon 45 min à 39 000 tours (centrifugeuse Beckman, Rotor 40), afin d'obtenir un culot et un surnageant pour chaque situation. A nouveau, les culots ont été resuspendus dans leur volume initial.

### 3.2.6 Dosages enzymatiques

#### 3.2.6.1 Marqueurs spécifiques

Afin de déterminer la répartition des organites dans les différentes fractions subcellulaires utilisées, nous avons mesuré l'activité de certaines enzymes considérées comme des marqueurs spécifiques de chaque organite :

- Les lysosomes sont représentés par la β-galactosidase, la cathepsine C, l'arylsulfatase et la N-acétylglucosaminidase.
- Les mitochondries sont représentées par la malate déshydrogénase (MDH) et la cytochrome oxydase.
- Les peroxysomes sont représentés par la catalase
- La membrane plasmique est représentée par la dipeptidyl peptidase IV (DPPIV).
- Le réticulum endoplasmique est représenté par l'α-glucosidase alcaline.

La quantité de protéines contenue dans chaque fraction a été déterminée grâce à la méthode de Lowry *et al.*, 1951.

Les conditions expérimentales des dosages enzymatiques ainsi que les références auxquelles nous avons fait appel sont reprises dans le tableau ci-après.

**Tableau 3.1** – *Conditions expérimentales pour le dosage des enzymes localisées au niveau des organites subcellulaires*

| Organites subcellulaires | Enzymes | Substrats | Mesure | Références |
|---|---|---|---|---|
| Lysosomes | ß-Galactosidase | 4-Méthyl-umbélliféryl ß-D galactopyranoside | Fluorimétrique du 4-Méthyl-umbélliférone | Peters *et al,* 1972 |
| | Cathepsine C | Glycyl-L-arginine ß-Naphtylamide | Fluorimétrique de la ß-Naphtylamine | Jadot *et al.,* 1984 |
| | Arylsulfatase | Nitro-cathécol sulfate | Spectrophotométrique | Bowers *et al.,* 1967 |
| | N-Acétyl-glucosaminidase | 4-Méthyl-umbélliféryl ß-D glucosaminide | Fluorimétrique du 4-Méthyl-umbélliférone | Peters *et al,* 1972 |
| Mitochondries | Malate déshydrogénase | Oxaloacétate + NADH | Spectrophotométrique du NADH (diminution de l'absorbance) | Colorwick *et al.,*1965 |
| | Cytochrome oxydase | Cytochrome C réduit | Spectrophotométrique du cytochrome C réduit | Appelmans *et al.,* 1955 |
| Peroxysomes | Catalase | $H_2O_2$ | Spectrophotométrique de la disparition de $H_2O_2$ | Aebi, 1984 |
| Membrane plasmique | Dipeptidyl peptidase IV | Glycyl-proline-ß-Naphtylamide | Fluorimétrique de la ß-Naphtylamine | Peters *et al,* 1972 |
| Réticulum endoplasmique | α-glucosidase alcaline | 4-Méthyl-umbélliféryl α-D glucopyranoside | Fluorimétrique du 4-Méthyl-umbélliférone | Peters *et al,* 1972 |

### 3.2.7 Western Blotting

Cette méthode est utilisée afin de détecter la présence d'une protéine dans un échantillon, grâce à une reconnaissance spécifique par un anticorps dirigé contre cette protéine.

Les protéines contenues dans les échantillons sont tout d'abord séparées en fonction de leur poids moléculaire, par migration sur un gel de polyacrylamide, en présence de SDS, sous l'influence d'un champs électrique. Le sodium dodécylsulfate (SDS) a la propriété de dénaturer les protéines, mais aussi de leur conférer une même charge négative, supprimant ainsi les différences de charges des protéines. Ce critère aurait, en effet , pu interférer avec une séparation selon le poids moléculaire.

Ce gel est composé de deux parties : le gel de séparation, permettant effectivement la séparation des protéines de l'échantillon, et le gel d'empilement, situé au-dessus du précédent, qui sert à concentrer les protéines.
La composition des deux gels est donnée au tableau 3.2 :

**Tableau 3.2** – *La composition des gels utilisés dans le Western Blotting*

| | ***Gel de séparation*** | ***Gel d'empilement*** |
|---|---|---|
| $H_2O$ distillé | 3 ml | 2.75 ml |
| | Tris-HCl pH 8.8 ;1.5M + SDS 0.4 % ->2.5 ml | Tris-HCl pH 6.8 ;0.5M + SDS 0.4 % ->1.25 ml |
| Acrylamide 30% Bisacrylamide 0.8% | 4ml | 0.625ml |
| Persulfate d'ammonium 10 % | 0.5 ml | 0.375 ml |
| TEMED | 10 µl | 5 µl |

Les échantillons sont d'abord bouillis pendant 3 minutes, puis centrifugés, avant d'être chargés sur le gel. Un marqueur de taille protéique « Prosieve® » (Color protein markers, Cambrex) est également déposé sur le gel. Le tampon de migration, qui baigne la préparation est composé de tampon Tris 250 mM, de Glycine 1.92M et de SDS 1%.

Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (PolyVinylidiène DiFluoride). Pour ce faire, le gel est mis en contact avec la membrane, entre 4 feuilles de papier Whatman et deux éponges, le tout étant imbibé d'une solution de transfert,

composée de Tris-HCl (25 mM) , de glycine (192 mM) et de méthanol 20% .Un courant de 230 milliAmpères avec une différence de potentiel de 8V est appliqué au montage.

Une coloration au Rouge Ponceau (Sigma, 0,1% dans 5% d'acide acétique) marque de façon réversible l'ensemble des protéines présentes sur la membrane et permet de visualiser, ainsi que le marqueur de taille, la qualité du transfert.

Les sites aspécifiques seront ensuite bloqués par une solution contenant du PBS-Tween 0.01% et 2% de solution de blocage (Amersham) ou bien 5 % de lait en poudre.

Le lendemain, la membrane est mise en présence d'un anticorps primaire reconnaissant **Hyal-1**. Il s'agit de 1D10, un anticorps dirigé contre la protéine **Hyal-1** recombinante humaine, généreusement fourni par Le Dr. B. Triggs-Raine ( Département de Biochimie et Biologie Moléculaire, Université de Manitoba).

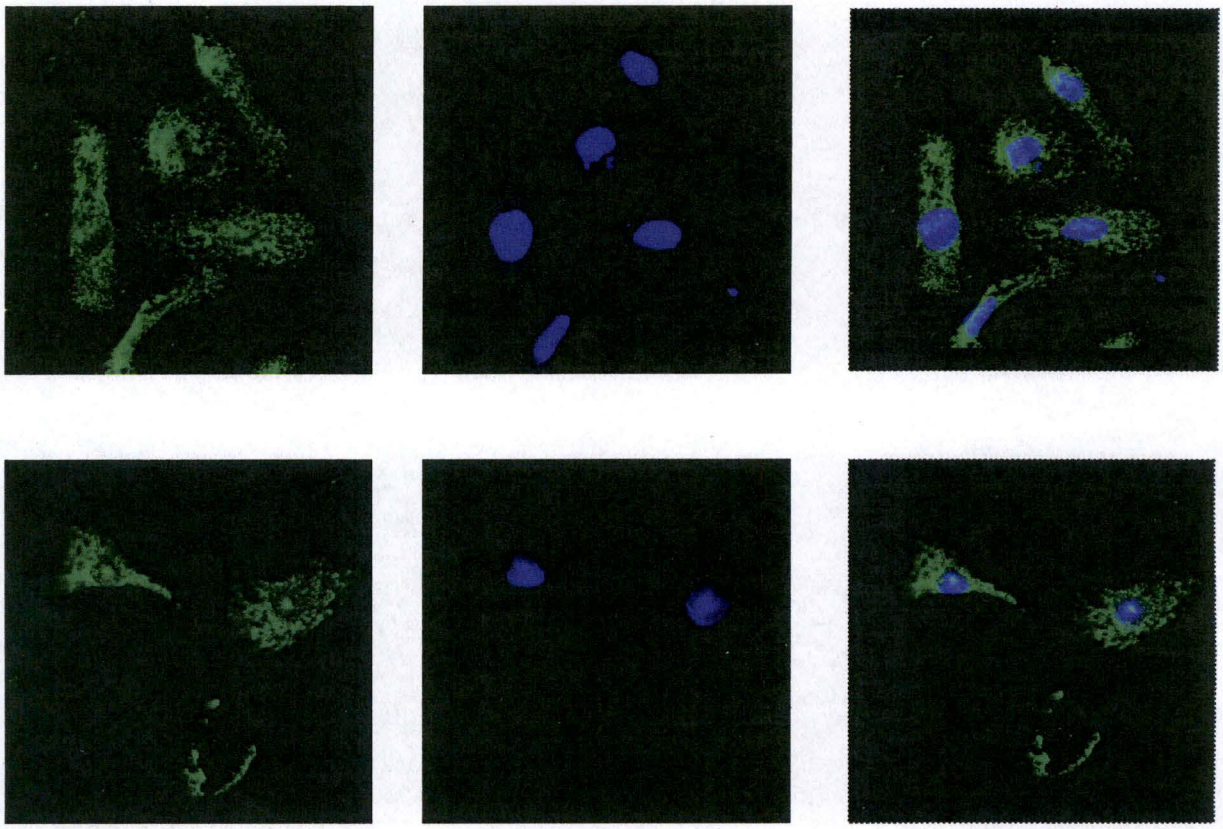
Cet anticorps est reconnu par un anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à de l'HRP (Horse Raddish Peroxydase) (DAKO-HRP).

La visualisation des protéines reconnues par l'anticorps se fait grâce à une réaction de chémoluminescence. La HRP catalyse la dégradation de $H_2O_2$ en $H_2O$ et $O_2$. L' $O_2$ oxyde le luminol, provoquant ainsi une émission de lumière détectée sur un film photographique. Les kits utilisés proviennent soit de chez Amersham Biosciences, soit de chez Perkin Elmer.

# Résultats et discussion

dilution de l'anticorps 1aire : 1/200

Hyal-1 TOPRO Superposition



dilution de l'anticorps 1aire : 1/1000

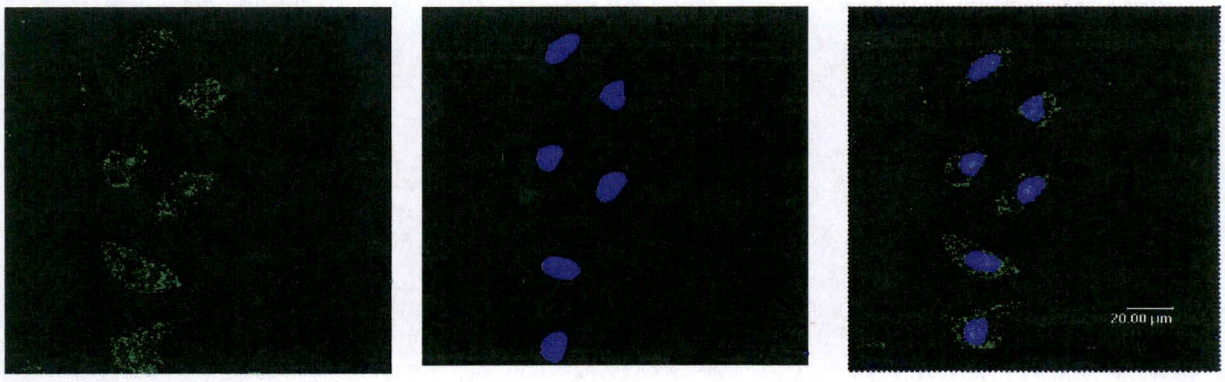



**Figure 4.1 a-** *Mise en évidence de Hyal-1dans les cellules HK2. Les noyaux sont visualisés grâce à une coloration de TOPRO.*

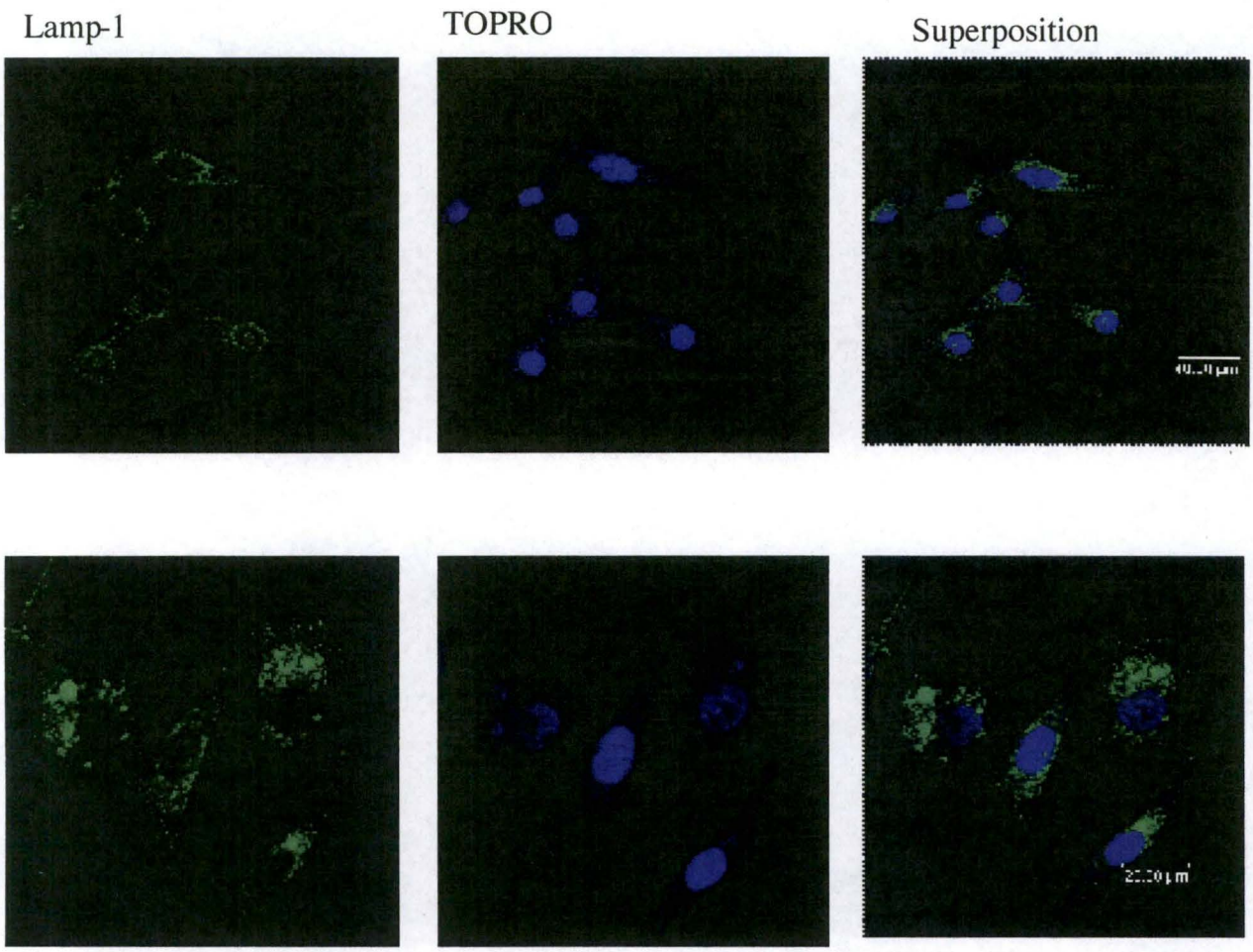



**Figure 4.1 b-** *Mise en évidence de la protéine lysosomale Lamp-1 dans les cellules HK2 (dilution de l'anticorps 1$^{aire}$ : 1/50). Les noyaux sont visualisés grâce à la coloration de TOPRO.*

# 4 Résultats et discussion

## *4.1 Cellules HK2*

Comme première étape dans la localisation subcellulaire d'**Hyal-1** dans le rein, nous avons d'abord effectué des études morphologiques par immunofluorescence sur des cellules tubulaires rénales HK2, prototypes du tubule proximal.

L' immunofluorescence permet de visualiser la localisation subcellulaire d'une protéine *in situ*, grâce à un système de reconnaissance anticorps-antigène. Nous avons essayé de mettre en évidence d'une part, la localisation de **Hyal-1**, et d'autre part, la localisation de la protéine LAMP-1, un marqueur lysosomal, afin de comparer les images obtenues.

La protéine **Hyal-1** a été reconnue par l'anticorps 1D10, tandis que LAMP-1 a été reconnue par l'anticorps H4A3. Dans les deux cas, l'anticorps secondaire était un anticorps anti-souris couplé à un fluorochrome ALEXA vert.

Les résultats obtenus sont présentés à la **Figure 4.1** Le marquage vert représente soit la protéine **Hyal-1**, soit la protéine LAMP-1 (donc les lysosomes), selon la situation étudiée. En bleu, nous observons les noyaux marqués par la coloration de TOPRO.

*Discussion*

Nous observons que le marquage de **Hyal-1** s'étale sur tout le cytoplasme de la cellule; il présente un aspect finement réticulé, coalescent par endroits. Un léger marquage du noyau est parfois également observé, sous la forme d'un point pouvant représenter le nucléole. On ne peut pas distinguer une localisation claire en membrane plasmique.

En ce qui concerne LAMP-1, sa distribution, et donc celle des lysosomes, se concentre principalement autour du noyau .

Lorsque nous comparons les images obtenues, nous constatons que les marquages sont différents ; la distribution de **Hyal-1** ne se superpose pas à celle des lysosomes. Ne disposant pas d'anticorps anti-**Hyal-1** et anti-LAMP-1 générés dans des espèces différentes, nous n'avons pas pu réaliser de colocalisation sur les mêmes coupes.

Les résultats obtenus ne confirment donc pas une localisation lysosomale de **Hyal-1**. Afin de compléter ces études morphologiques, nous avons décidé d'utiliser des homogénats de rein de rat pour effectuer des études biochimiques. En effet, la culture des cellules HK2 à grande échelle est malaisée et rend difficile les études biochimiques.

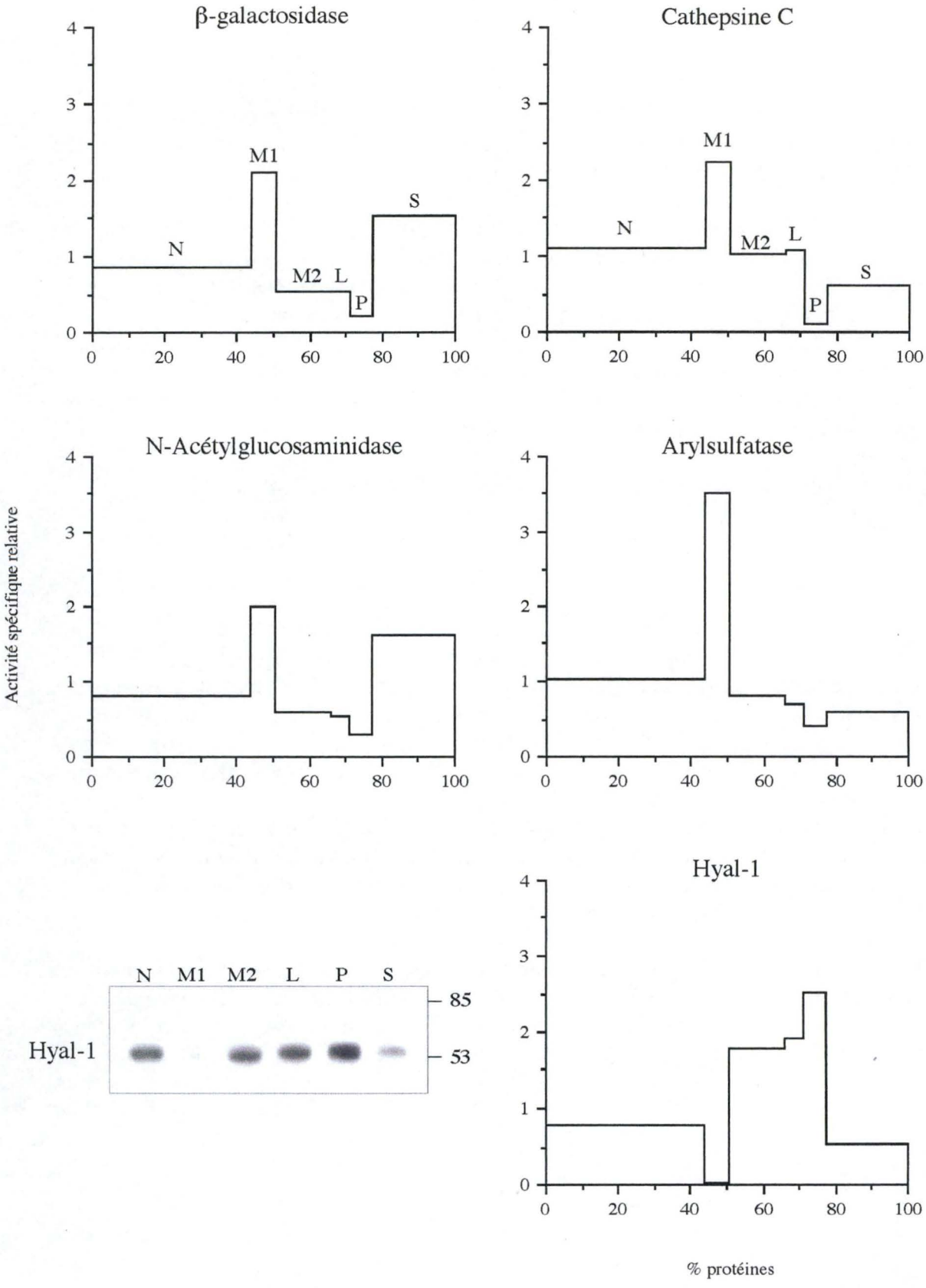



Figure 4.2:- *Distribution intracellulaire de différentes enzymes lysosomales, ainsi que de Hyal-1, après centrifugation différentielle d'un homogénat de rein de rat.*

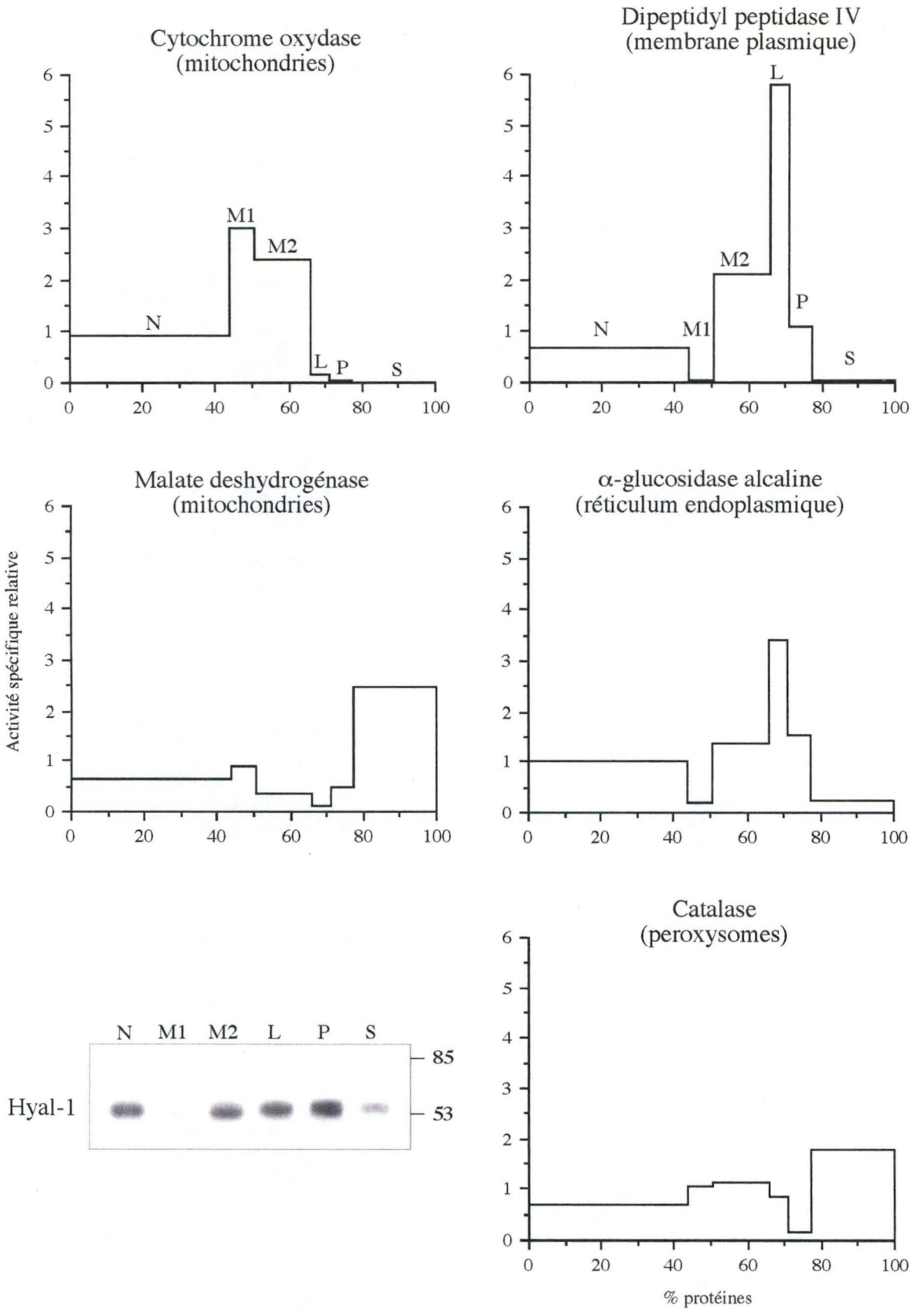



**Figure 4,3-** *Distribution intracellulaire de différents marqueurs enzymatiques, ainsi que de Hyal-1, après centrifugation différentielle d'un homogénat de rein de rat.*

## *4.2 Rein de rat*

Cet organe a été choisi comme modèle d'étude en raison de sa richesse en hyaluronidases et en hyaluronan. En effet, il a été observé que les organes avec les taux d'ARNm correspondant à **Hyal-1** les plus élevés sont le foie, le rein, la rate et le cœur (Csoka *et al.*, 2001).

Afin d'établir la localisation subcellulaire de **Hyal-1**, nous avons procédé à des centrifugations différentielles d'un homogénat de rein de rat, ainsi qu'à des centrifugations isopycniques d'une fraction sédimentable post-nucléaire, suivies de dosages enzymatiques et d'une analyse en Western Blotting.

### 4.2.1 Fractionnement subcellulaire

Le fractionnement subcellulaire d'un homogénat tissulaire nous permet de séparer les organites en fonction de leur taille. Grâce à la mesure de l'activité de différents marqueurs enzymatiques (dans les fractions N, M1, M2, L, P et S dans notre cas), nous pouvons évaluer l'enrichissement de ces fractions en organites spécifiques.

La distribution de **Hyal-1** est mise en évidence par immunoblotting puis comparée à celle de différents marqueurs enzymatiques.

Les éléments retrouvés dans la fraction soluble S peuvent représenter soit des composants cytosoliques de la cellule, soit une libération à partir d'organites abîmés lors de l'homogénéisation.

Les **Figures 4.2** et **4.3** représentent les profils de distribution des activités de différentes enzymes, sous forme d'histogrammes avec, en ordonnée, l'activité spécifique relative (ASR) (c'est à dire le rapport entre le pourcentage d'activité totale de la fraction et le pourcentage de protéines dans cette même fraction) et, en abscisse la quantité relative de protéines des fractions cumulées de gauche à droite. Chacune des six fractions est donc représentée par un rectangle dont la hauteur est proportionnelle à la purification de l'enzyme, la base, à la quantité de protéines totales présentes dans chaque fraction, et la surface totale, au contenu relatif en enzyme de la fraction.

*Discussion*

Lorsqu'on examine la distribution des marqueurs des lysosomes: β-galactosidase, cathepsine C, arylsulfatase et N-acétylglucosaminidase, on constate que les activités spécifiques relatives (ASR) sont les plus importantes dans la fraction M1.

Dans le cas de la β-galactosidase et de la N-acétylglucosaminidase, on voit également une forte activité en S, expliquée sans doute par la destruction de certains lysosomes lors de l'homogénéisation du tissu. Ce phénomène est moins prononcé pour la cathepsine C et l'arylsulfatase.

Les marqueurs mitochondriaux (malate deshydrogénase (MDH) et cytochrome oxydase) montrent que les mitochondries se retrouvent principalement dans les fractions M1 et M2.

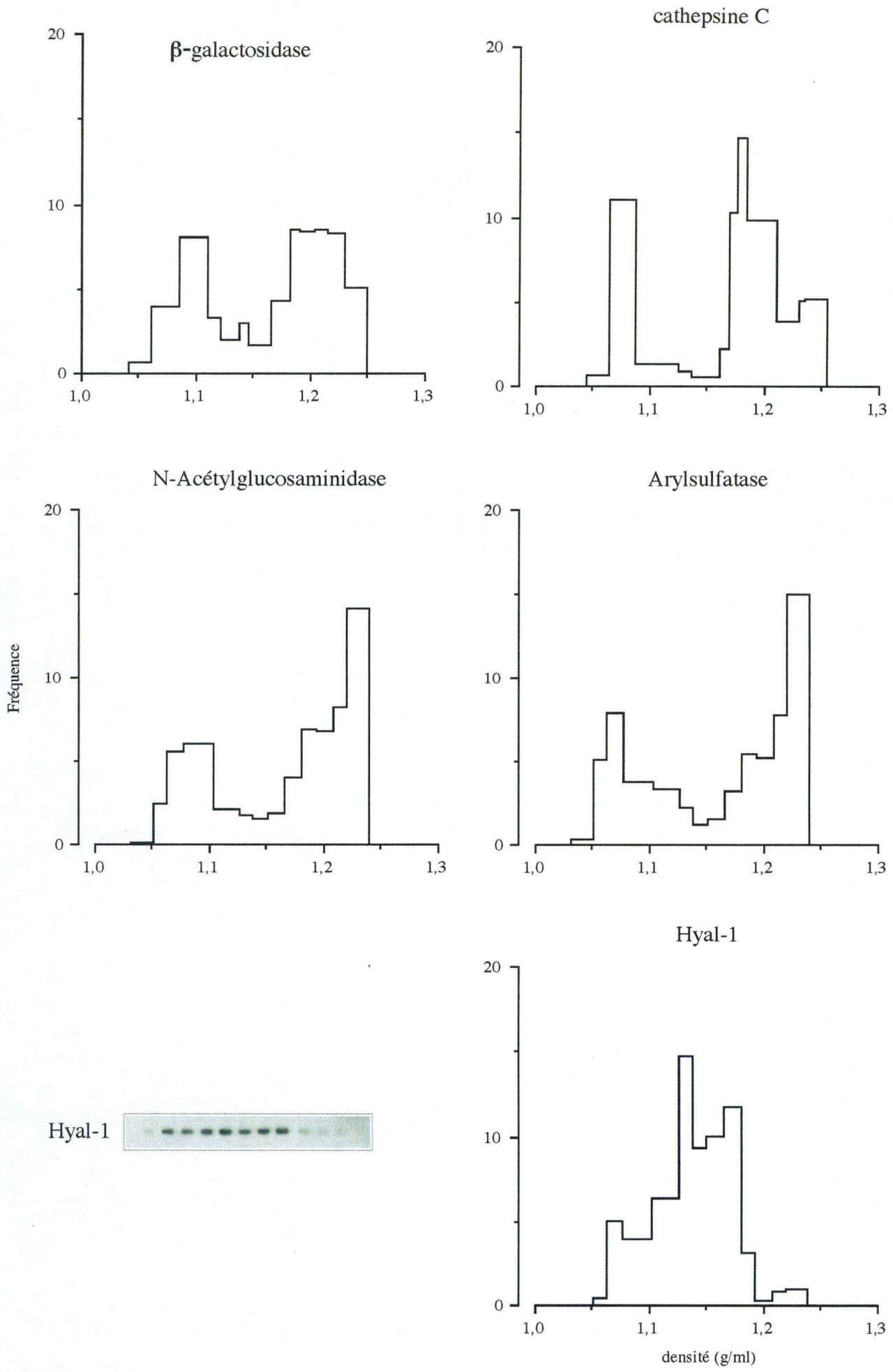



**Figure 4.4-** *Distribution de différents marqueurs enzymatiques après centrifugation isopycnique en gradient de saccharose (1,09-1,26 g/ml), d'une fraction MLP de rein de rat. MLP représente la fraction post-nucléaire sédimentable après une centrifugation de 45min à 39000tours (Rotor 40, centrifugeuse Beckman) .*

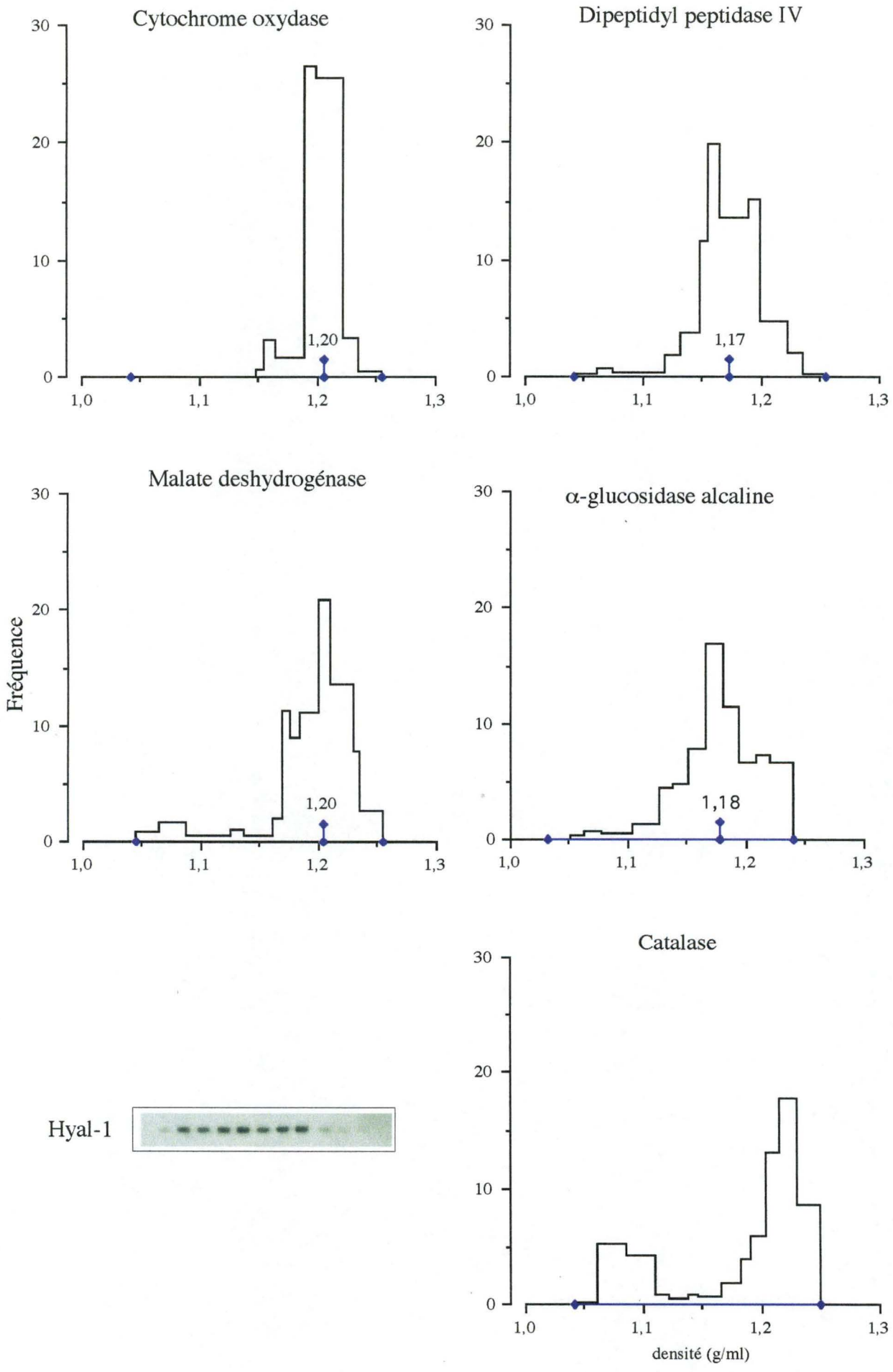



**Figure 4.5-** *Distribution de différents marqueurs enzymatiques après centrifugation isopycnique en gradient de saccharose (1,09-1,26 g/ml), d'une fraction MLP de rein de rat. MLP représente la fraction post-nucléaire sédimentable après une centrifugation de 45min à 39000tours (Rotor 40, centrifugeuse Beckman). Les traits verticaux bleus représentent la position de la densité médiane d'équilibre.*

La forte activité en S de la MDH peut représenter à la fois une isoforme cytosolique et une libération à partir de mitochondries lésées.

Les éléments de la membrane plasmique se retrouvent surtout dans les fractions M2 et L, comme le montre la distribution de la dipeptidyl peptidase IV (DPPIV).

Le réticulum endoplasmique, représenté par l'α-glucosidase alcaline, montre l'ASR la plus marquée dans la fraction L.

La distribution de l'activité de la catalase montre que les fractions enrichies en peroxysomes sont M1, M2 et L (l'activité présente dans la fraction S pourrait correspondre sans doute à une libération de l'enzyme à partir d'organites lésés, ou à l'existence d'une forme cytosolique).

Pour la mise en évidence de **Hyal-1**, des quantités égales de protéines de chaque fraction ont été chargées sur un gel et soumises à un Western Blotting. L'intensité des bandes est donc comparable à l'activité spécifique relative (ASR). Après quantification des signaux, les résultats ont été portés en graphique selon le même principe que pour les dosages enzymatiques.

Comme on peut le constater dans la **Figure 4.2**, **Hyal-1** se retrouve dans toutes les fractions mais est majoritairement présente en M2, L et P. L'ASR est la plus importante dans P. Peu de marquage s'observe en M1, riche en lysosomes ; ces premiers résultats ne concordent donc pas avec une localisation lysosomale de la protéine **Hyal-1**.

### 4.2.2 Centrifugation isopycnique en gradient de saccharose de la fraction sédimentable post-nucléaire MLP

Pour affiner les résultats obtenus sur le rein de rat après un fractionnement complet, nous avons soumis la fraction sédimentable post-nucléaire (MLP) à une centrifugation isopycnique en gradient de saccharose.

Le principe de cette technique est de séparer les organites en fonction de leur densité. Sous l'effet du champ centrifuge, les organites s'équilibrent dans le gradient lorsque la densité du milieu est égale à leur propre densité.

En analysant les activités enzymatiques dans les différentes fractions du gradient, nous pouvons établir les distributions des différents organites.

Les **Figures 4.4 et 4.5** représentent les résultats sous forme d'histogramme.
Chaque fraction correspond à un rectangle dont la base correspond aux limites de densité de la fraction et la hauteur représente la fréquence, c'est à dire le rapport entre le pourcentage d'activité enzymatique dans chaque fraction et la différence de densité entre le début et la fin de cette même fraction. La surface totale de chaque rectangle représente la proportion d'activité enzymatique dans chaque fraction.

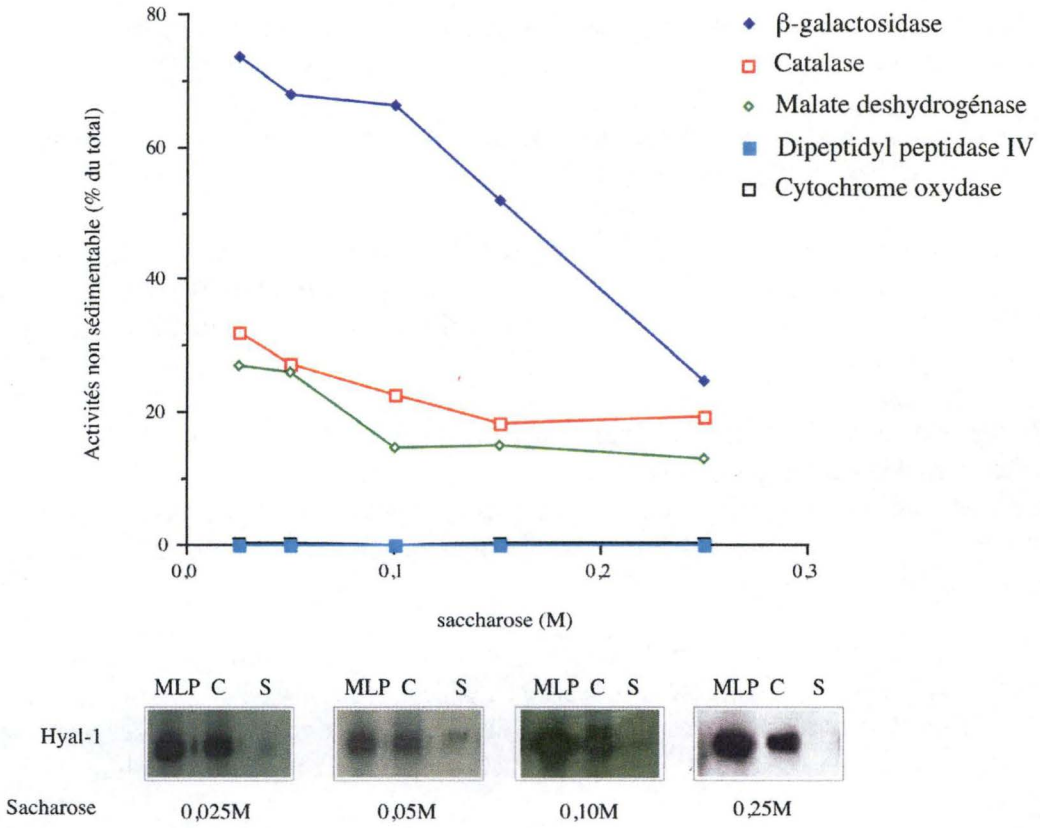



**Figure 4.6** - *Effet du choc hypotonique appliqué à une fraction post-nucléaire sédimentable (MLP) sur la libération de différents marqueurs enzymatiques, ainsi que de Hyal-1. En abcisse: la concentration de sacharose (M). En ordonnée: le pourcentage d'activité non sédimentable calculée par rapport à l'activité totale retrouvée dans le culot (C) et le surnageant (S).*

*Discussion*

Lorsqu'on examine les marqueurs des lysosomes : β-galactosidase, cathepsine C, arylsulfatase et N-acétylglucosaminidase, on constate que les lysosomes intacts s'équilibrent vers le fond du gradient. Cependant, une importante proportion de l'activité se retrouve au sommet du gradient et pourrait représenter des enzymes solubles libérés des organites lors de l'homogénéisation du tissu et contaminant la fraction MLP.

La dipeptidyl peptidase IV, marqueur de la membrane plasmique, montre une distribution étalée autour de 1,17 g/ml. La membrane plasmique s'équilibre donc vers le milieu du gradient.

Les marqueurs mitochondriaux cytochrome oxydase et malate deshydrogénase se distribuent autour d'une densité de 1,20 g/ml. Les mitochondries s'équilibrent donc à une densité supérieure à celle de la membrane plasmique, mais inférieure à celle des lysosomes.

L' α–glucosidase alcaline, représentant le réticulum endoplasmique, montre une distribution étalée autour d'une densité de 1,18 g/ml.

On observe que les peroxysomes intacts représentés par la catalase s'équilibrent vers la fin du gradient, mais à une densité très légèrement supérieure à celle des lysosomes (1,23 g/ml). L'activité retrouvée au sommet du gradient pourrait provenir des peroxysomes lésés lors de l'homogénéisation.

**Hyal-1**, mise en évidence par immunoblotting et ensuite quantifiée, montre une distribution étalée autour d'une densité de 1,14 g/ml. Cette distribution ne présente aucune ressemblance avec celle des marqueurs des lysosomes, ni des marqueurs des autres organites.

* *
*

Afin de préciser le type de structure à laquelle **Hyal-1** est associée, nous avons soumis la fraction post-nucléaire sédimentable (MLP) à divers traitements tels que le choc hypotonique, le choc mécanique et l'effet de différents solubilisants des protéines membranaires.

### 4.2.3 Choc hypotonique

Le principe de cette expérience est de soumettre la fraction MLP à des concentrations décroissantes en saccharose, ce qui provoque un choc hypotonique et la libération, dans le milieu (si les organites sont osmotiquement actifs), de composants non associés à des structures membranaires.

Après une centrifugation de 45 min à 39 000 tours (centrifugeuse Beckman, Rotor 40), nous obtenons un culot contenant les enzymes fortement associées aux membranes et un surnageant contenant les protéines libérées.

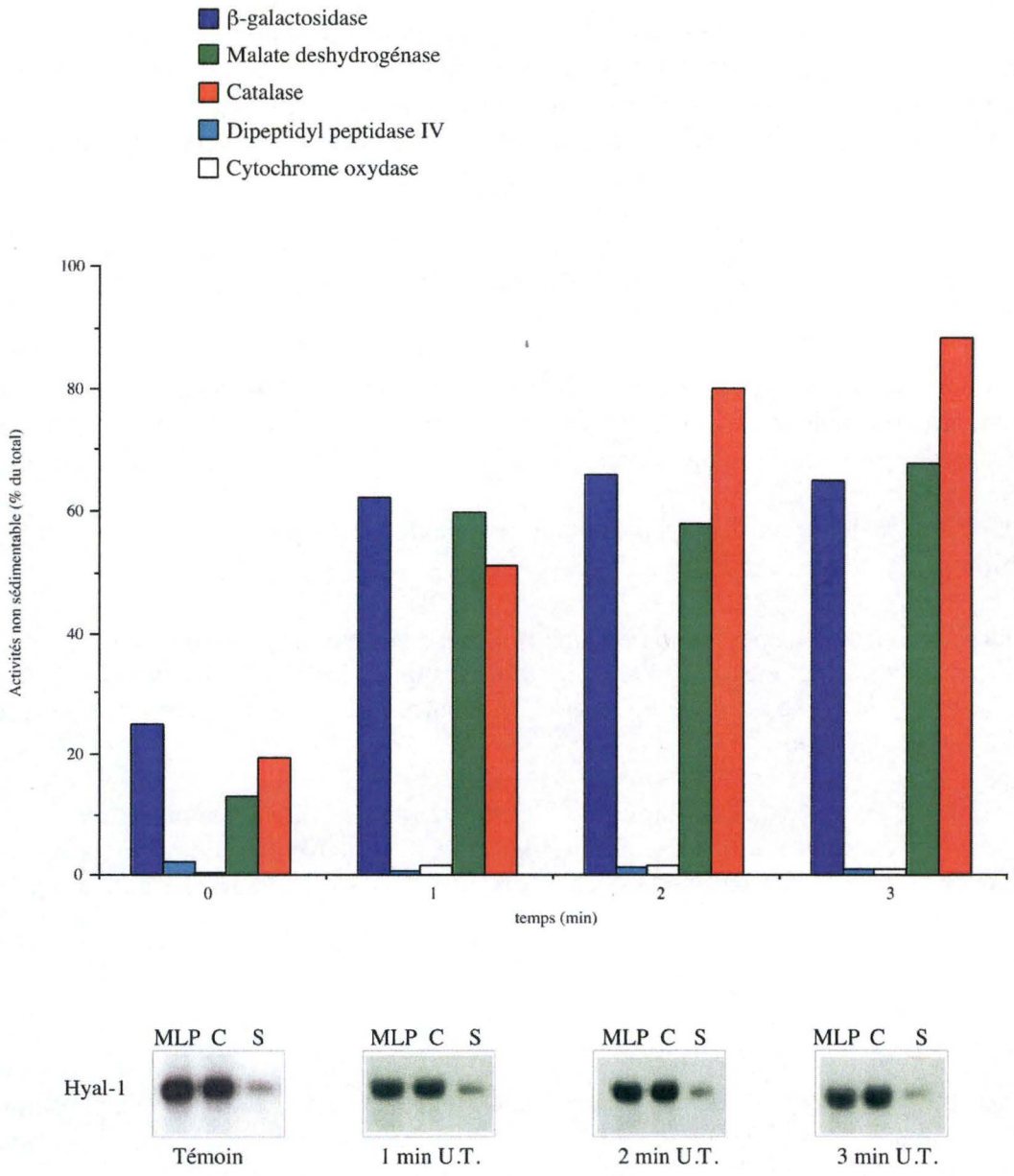



**Figure 4.7** - *Effet du choc mécanique appliqué à une fraction post-nucléaire sédimentable (MLP) sur la libération de différents marqueurs enzymatiques, ainsi que de Hyal-1. En abcisse: le temps pendant lequel la MLP a été soumise à l'Ultra-Turrax. En ordonnée: le pourcentage d'activité non sédimentable calculée par rapport à l'activité totale retrouvée dans le culot (C) et le surnageant (S).*

*Discussion*

La **Figure 4.6**. représente, en ordonnée, l'activité non sédimentable, et en abscisse la concentration de saccharose,.

Comme attendu, les lysosomes se montrent très sensibles au choc hypotonique, et l'on observe une forte libération de la β-galactosidase.

La catalase des peroxysomes et la MDH de la matrice mitochondriale ne sont que faiblement libérées, ces organites étant peu sensibles au choc osmotique.

On observe que la DPP IV (enzyme de la membrane plasmique) et la cytochrome oxydase (enzyme de la membrane mitochondriale interne), restent totalement associées au culot des membranes, ce qui confirme la validité de la technique.

En ce qui concerne **Hyal-1**, détectée par immunoblotting, on observe qu'elle n'est presque pas présente dans les surnageants ; elle est donc soit associée à une structure membranaire, ou à un agrégat de grande taille (présent ou non dans un organite), soit encore à un organite insensible au choc hypotonique.

### 4.2.4 Choc mécanique

Afin de préciser l'éventuelle liaison de **Hyal-1** à une membrane, nous avons étudié la sensibilité au choc mécanique de la structure à laquelle **Hyal-1** est associée.

La fraction post-nucléaire sédimentable ( MLP) a été soumise à l'Ultra-Turrax pendant des temps croissants, puis centrifugée à haute vitesse, ce qui conduit à l'obtention d'un culot C et d'un surnageant S. Ce choc est encore plus violent que le choc hypotonique et seules les enzymes fortement associées à une structure membranaire resteront associées au culot.

*Discussion*

La **Figure 4.7** représente les activités non sédimentables libérées en fonction du temps pendant lequel la MLP a été soumise à l'Ultra-Turrax. On constate que les enzymes membranaires (DPP IV et cytochrome oxydase) restent associées au culot, les autres enzymes sont toutes libérées dans le surnageant.

L'analyse par Western Blotting révèle que **Hyal-1** n'est que très peu libérée, même après un passage de 3 minutes à l'Ultra-Turrax. Son comportement ressemble plus à celui d'une enzyme membranaire qu'à celui d'une enzyme soluble.

On peut donc supposer qu'elle se trouve soit dans une structure membranaire, soit associée à un agrégat de grande taille.

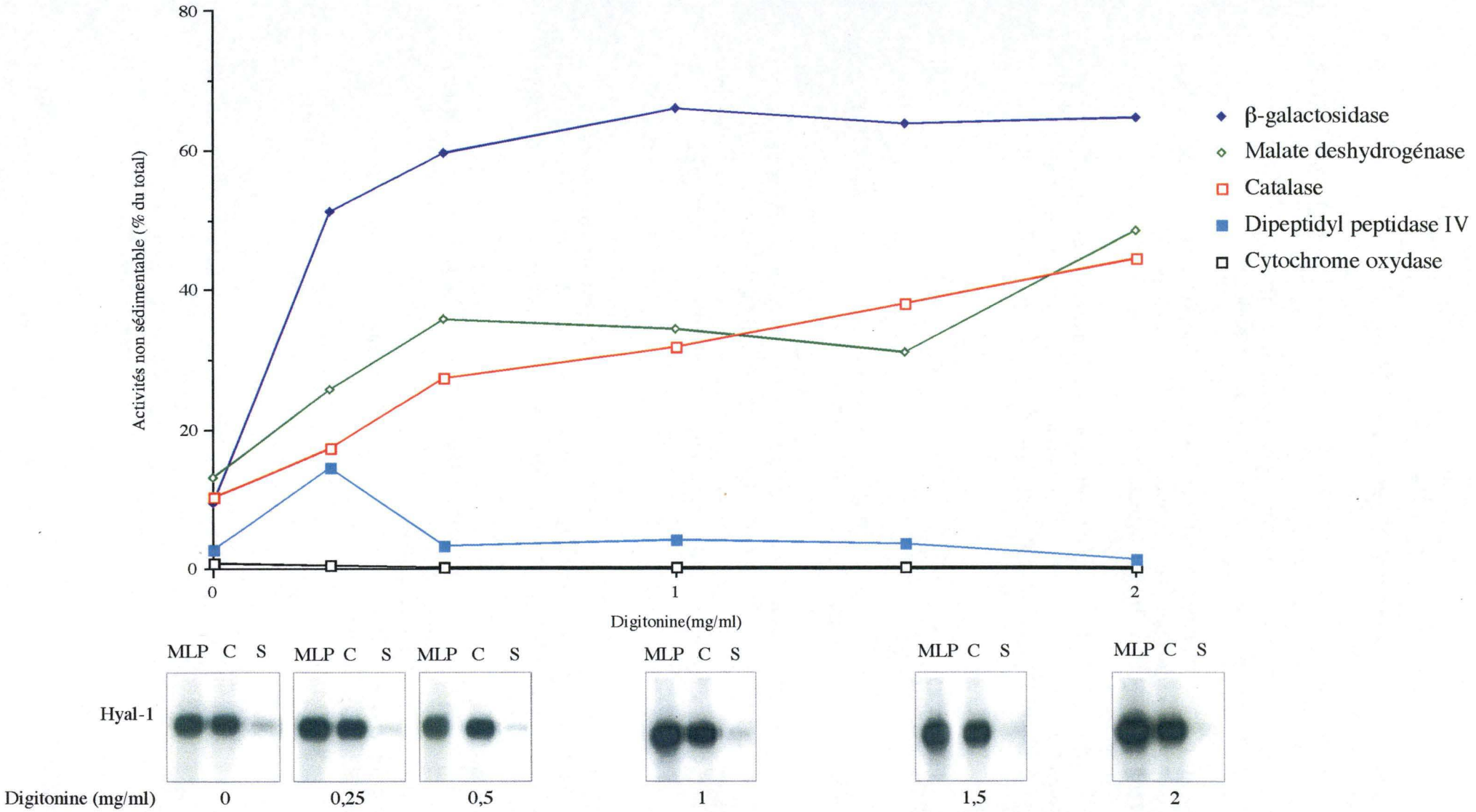



**Figure 4.8 -** *Effet de la digitonine additionnée à une fraction post-nucléaire sédimentable (MLP), sur la libération de différents marqueurs enzymatiques, ainsi que de Hyal-1. En abcisse: la concentration de digitonine (mg/ml). En ordonnée: le pourcentage d'activité non sédimentable calculée par rapport à l'activité totale retrouvée dans le culot (C) et le surnageant (S).*

### 4.2.5 Effet des détergents

Nous avons soumis la fraction post-nucléaire sédimentable MLP du rein de rat à différents détergents afin d'obtenir plus de renseignements sur le mode de liaison de **Hyal-1** à une éventuelle membrane.

#### 4.2.5.1 Effets de la digitonine

La digitonine est un détergent possédant la propriété de perméabiliser les membranes en dissolvant le cholestérol (Amar-Costesec, A *et al.*, 1974). En créant des « trous » dans les membranes, la digitonine provoque également une libération des enzymes contenues dans l'organite, pour autant que ses membranes soient riches en cholestérol.

Nous avons soumis la fraction MLP à des concentrations croissantes en digitonine. Les échantillons sont ensuite centrifugés à haute vitesse et les enzymes sont mesurées dans les culots et les surnageants obtenus.

Les résultats de cette expérience sont présentés à la **Figure 4.8 .**

*Discussion*

Les membranes des lysosomes sont riches en cholestérol (Schoer *et al.*, 2000 ; McIntosh *et al.*, 2003 ), c'est pourquoi les enzymes lysosomales, comme la β-galactosidase, sont libérées par la digitonine, même à une faible concentration. Il faut en revanche une concentration plus élevée de digitonine pour libérer la malate deshydrogénase mitochondriale et la catalase peroxysomale. Pour ces deux enzymes, même à la concentration maximale en digitonine (2mg/ml), l'ampleur de la libération reste plus faible que pour la β-galactosidase. Ces résultats sont en accord avec le contenu en cholestérol des membranes de ces organites (Schoer *et al.*, 2000 ; McIntosh *et al.*, 2003 ).

Quant aux enzymes membranaires, comme la DPP IV et la cytochrome oxydase, elles restent fortement associées au culot, même pour des concentrations élevées de digitonine.

On voit, après Western Blotting, que **Hyal-1** n'est presque pas présente dans le surnageant, même à des fortes concentrations en digitonine.

On pourrait donc émettre l'hypothèse qu'elle se trouve associée à une structure pauvre en cholestérol.

#### 4.2.5.2 Triton X100

Le Triton X100 est un détergent très puissant, qui solubilise la plupart des protéines de membrane, à l'exception de celles ancrées dans la membrane par une ancre lipidique. (Cerneus, D.P., *et al.*, 1993).

Nous avons soumis la fraction post-nucléaire sédimentable MLP du rein de rat à l'action du Triton X100 (0,5%). Les échantillons sont ensuite centrifugés à haute vitesse et **Hyal-1** est mesurée dans les culots et les surnageants obtenus.

*Discussion*

Comme on peut le constater à la **Figure 4.9,** le Triton X100 à 0,5% solubilise entièrement **Hyal-1**. Ce résultat est en accord avec une localisation membranaire de **Hyal-1** ou avec une association à un complexe lipidique.

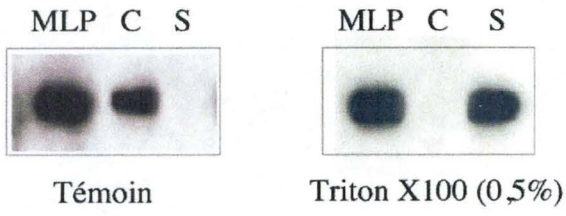



**Figure 4.9** - *Effet du détergent Triton X-100 sur la solubilisation de **Hyal-1** contenue dans une fraction post-nucléaire sédimentable (MLP). (C= culot ; S= surnageant) .*

## 4.2.6 Effet de différents solubilisants des protéines membranaires

Une série de sels sont capables de libérer de leur membrane les protéines extrinsèques (c'est à dire associées aux membranes mais sans y être ancrées) (Fujiki, Y., *et al.,* 1982).

Nous avons étudié l'effet de ces sels sur une préparation membranaire, afin de mieux caractériser la manière dont **Hyal-1** est associée à sa structure.

Une fraction MLP a été soumise à un traitement de 3 minutes à l'Ultra-Turrax. Les membranes ont ensuite été récupérées par centrifugation à haute vitesse. Le culot obtenu a été resuspendu dans le saccharose 0,25 M (témoin) et dans diverses solutions salines ou dans le saccharose 0,25 M en présence de SDS (0,1%).

*Discussion*

Comme nous pouvons le constater à la **Figure 4.10,** le $Na_2CO_3$ 100 mM solubilise **Hyal-1**. Il se montre aussi puissant que le SDS (0.1 %). Une solubilisation partielle est également observée par le KCl 100 mM et l'EDTA 50 mM, pH 7.4.

Ces résultats sont en faveur de l'association d'**Hyal-1** à une structure membranaire de manière extrinsèque.

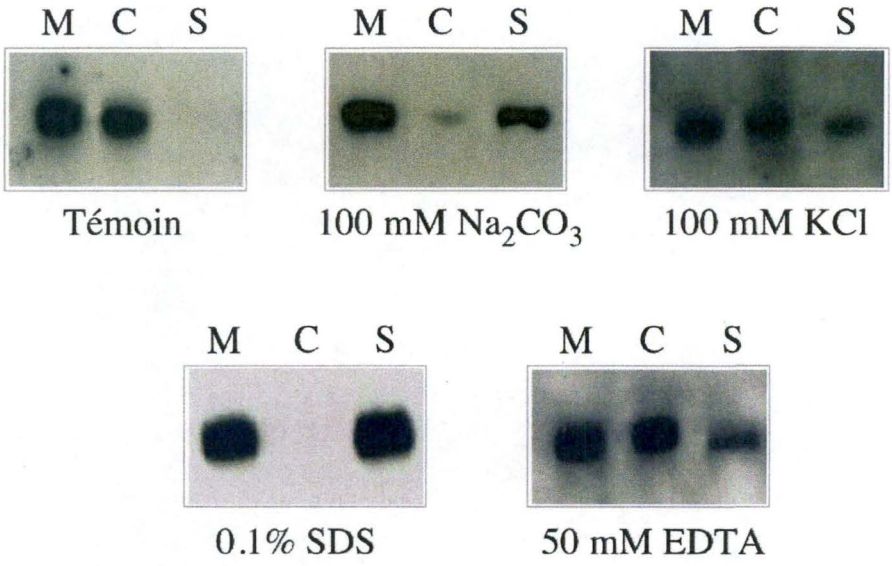



**Figure 4.10 -** *Effet de différents agents, appliqués sur une fraction membranaire (cfr Matériel et Méthodes § 3.6.3), sur la solubilisation de* ***Hyal-1****. (M= membranes avant centrifugation ; C= culot ; S= surnageant).*

# Conclusions et perspectives

# 5 Conclusions et perspectives

L'hyaluronan est un polymère appartenant à la famille des mucopolysaccharides, composé d'unités répétitives de disaccharides (N-acétyl-D-glucosamine et acide D-glucuronique). Son métabolisme est assuré par des synthases (les hyaluronan-synthases HAS1, HAS2 et HAS3), et des hydrolases (les hyaluronidases **Hyal-1**, Hyal-2, Hyal-3 et PH-20 chez l'homme). Parmi ces dernières, l'hyaluronidase **Hyal-1**, la seule présente dans le sang, est souvent considérée dans la littérature comme une enzyme lysosomale. Elle possède un pH optimum acide (Stern et Csoka, 2000 ; Stern, 2003 ), et la déficience en **Hyal-1** provoque une maladie de surcharge lysosomale : la mucopolysaccharidose IX (Triggs-Raine *et al*, 1999) .

Il a été proposé que la dégradation de l'hyaluronan commencerait au niveau d'un repli de la membrane plasmique, sous l'action de l'hyaluronidase Hyal-2. Le polymère de hyaluronan serait clivé en des produits d'environ 20 kDa, qui rejoindraient alors les lysosomes où **Hyal-1** hydrolyserait les oligosaccharides de 20 kDa en petites unités de 3 à 4 kDa. Les autres enzymes lysosomales, β-glucuronidase et N-acétylglucosaminidase, achèveraient l'hydrolyse jusqu'à des sucres simples (Stern, 2004).

D'autres données permettent cependant de douter d'une origine lysosomale de **Hyal-1**. En effet, Frost et ses collaborateurs ont dû utiliser le Triton X 114 pour isoler **Hyal-1** du plasma (Frost *et al*, 1997). Or, ce détergent est habituellement employé pour solubiliser les protéines intégrales membranaires.

En ce qui concerne la mucopolysaccharidose IX, il a été observé que cette maladie se manifestait par un phénotype assez doux (masses périarticulaires, troubles osseux discrets), phénomène rare dans le cas des pathologies dues à de véritables surcharges lysosomales.

Des observations ont également été faites sur des patients atteints de I-cell disease, dont l'une des caractéristiques principales est une augmentation, dans le plasma, du taux d'enzymes lysosomales (Stern 2004 ). Or, cette augmentation n'est pas observée pour **Hyal-1**.

Une autre question non élucidée est la présence de cette enzyme, active à un pH acide, dans le plasma, donc à un pH neutre .

La localisation lysosomale de **Hyal-1** n'a jamais été mise en évidence de manière directe. Une étude de la localisation de cette enzyme dans le foie de rat, entreprise au laboratoire, indiquait, au contraire, qu'**Hyal-1** ne serait pas un composant lysosomal.

Dans le but de confirmer ou d'infirmer ces données, nous avons étudié la localisation subcellulaire d'**Hyal-1** dans un autre organe du rat : le rein, également riche en hyaluronan et en ARNm de **Hyal-1** (Csoka, A. *et al.*, 2001).

Quelques essais de mise en évidence de la protéine **Hyal-1** par immunofluorescence (microscope confocal) dans les cellules HK2 (cellules du tube proximal rénal) ont montré une distribution cytoplasmique diffuse de type granulaire. Ces images ne correspondent pas à celles de la protéine lysosomale Lamp-1 examinée dans les mêmes conditions ; elles confirment que la localisation d'**Hyal-1** n'est pas typiquement lysosomale.

Les cellules HK2 ne se cultivent pas aisément à grande échelle et rendent difficiles les études biochimiques.

Pour obtenir plus de précisions sur la localisation de **Hyal-1**, nous avons eu recours à une série de techniques biochimiques faisant appel à la centrifugation d'un homogénat de rein de rat.

La distribution intracellulaire de **Hyal-1**, repérée par immunoblotting, après centrifugation différentielle d'un homogénat du rein de rat, suggère déjà un caractère non lysosomal de cette protéine. **Hyal-1** se retrouve principalement dans les fractions M2, L, P, rassemblant des organites de plus petite taille que les lysosomes. Les hydrolases présentent, en effet, leur activité spécifique relative maximale dans la fraction M1.

Ces premiers résultats sont confirmés par centrifugation isopycnique en gradient de saccharose d'une fraction post-nucléaire sédimentable. En effet, les lysosomes s'équilibrent autour d'une densité de 1.20-1.21 g/ml, alors que Hyal-1 s'étale largement autour d'une densité de 1.14 g/ml.

Nous avons donc émis l'hypothèse qu'Hyal-1 résiderait dans une structure qui lui est propre. Afin de tenter d'obtenir des renseignements sur la nature de cette structure qui abriterait Hyal-1 nous avons soumis la fraction sédimentable post-nucléaire à différents traitements.

Le choc hypotonique ne permet pas de solubiliser Hyal-1 ; il en est de même pour le choc mécanique. Après application de ces chocs sur une fraction post-nucléaire sédimentable (MLP), suivie d'une centrifugation à haute vitesse, Hyal-1 se retrouve toujours dans le culot de membranes. Ceci suggère que Hyal-1 appartiendrait soit à la membrane d'un organite, soit à un complexe macromoléculaire sédimentable.

Nous avons tenté de solubiliser **Hyal-1** par différents traitements. Nous avons constaté que, parmi les détergents, la digitonine, même à des fortes concentrations, ne solubilise pas **Hyal-1**. Par contre, le Triton X100 et le SDS sont capables de solubiliser totalement **Hyal-1**, suggérant une interaction de la protéine avec des composants lipidiques.

Mais des produits tels que le $Na_2CO_3$ et l'EDTA permettent également de libérer, partiellement ou non, l'enzyme de sa structure. Ce comportement est en accord avec celui d'une protéine extrinsèque.

L'ensemble de nos données concordent avec celles obtenues au laboratoire sur le foie de rat. Elles suggèrent que **Hyal-1** réside dans des structures distinctes des lysosomes et qu'elle est associée à la paroi de ces structures de façon extrinsèque (il ne s'agit pas d'une protéine transmembranaire). Nous avons cependant mis en évidence que, dans le rein, la structure à laquelle **Hyal-1** est associée est à la fois plus petite et moins dense que dans le foie.

Nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse que l'homogénéisation du rein détruise l'organite qui abriterait **Hyal-1** et que nos expériences ne localisent, dans ce cas, que leur membrane. Cette membrane serait pauvre en cholestérol, comme l'indique la faible solubilisation d'**Hyal-1** par la digitonine.

Nos résultats ne sont donc pas compatibles avec la localisation lysosomale de **Hyal-1**. Par contre ils pourraient s'accorder avec l'hypothèse avancée par Stern, d'un organite appelé « hyaluronasome », abritant à la fois l'hyaluronan, ses enzymes de synthèse et de

dégradation. Cet organite résulterait d'un repli de la membrane plasmique et contiendrait des récepteurs, principalement CD44, lui permettant de réagir à des stimuli intra- et extra-cellulaires. Il contiendrait aussi un échangeur $Na^+$- $H^+$ (appelé NHE1), responsable du microenvironnement acide nécessaire pour l'activité de Hyal-2 (Bourguignon *et al.*, 2004 ; Stern 2004 et 2003).

Dans l'optique d'une poursuite de ce travail, nous pourrions proposer de mieux caractériser l'éventuel « hyaluronasome », par différentes techniques.

Par la poursuite de nos expériences de centrifugation de l'homogénat de rein, nous pourrions mettre au point une technique de purification des organites abritant **Hyal-1**. La fraction obtenue pourrait ainsi être examinée au microscope électronique, par des techniques d'immunoélectromicroscopie. De même, des observations électroniques sur coupe de tissu, accompagnées de la mise en évidence de **Hyal-1** au moyen de l'anticorps, pourraient également être envisagées.

Enfin, l'étude morphologique que nous avons ébauchée sur les cellules HK2 de rein mériterait d'être précisée. Rappelons que des analyses biochimiques sur ces cellules sont difficiles à effectuer.

Nous pourrions envisager une colocalisation de **Hyal-1** avec Lamp-1 (ou avec d'autres marqueurs lysosomaux). En effet, cette colocalisation n'a pas pu être réalisée précédemment car les anticorps primaires utilisés étaient tous deux des anticorps de souris. Il suffirait donc de trouver un anticorps d'une autre espèce (lapin, chèvre...) dirigé contre Lamp-1 (ou contre un autre marqueur lysosomal).

L'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre les différents organites subcellulaires ( notamment contre certains compartiments de la voie endocytaire), et la comparaison de leur localisation avec celle de **Hyal-1**, pourraient certainement apporter de précieuses données. Les anticorps que nous pourrions utiliser sont :

- ➔ Un anticorps dirigé contre EEA1 contenue dans les endosomes précoces et dans le cytoplasme.
- ➔ Un anticorps H50 de Santa Cruz dirigé contre Rab7 contenue dans les endosomes tardifs.
- ➔ Un anticorps dirigé contre Rab5 contenue dans les endosomes précoces.
- ➔ Un anticorps anti Mannose-6-Phosphate Receptor. Ce récepteur est contenu dans le trans-Golgi et les endosomes tardifs.

Afin de déterminer si **Hyal-1** se trouve dans l' « hyaluronasome » dont l'existence a été proposée par Stern, nous pourrions tenter une expérience de colocalisation de **Hyal-1** avec CD44, Hyal-2 et NHE1.

# Bibliographie

# 6 Bibliographie


Aebi, H. – "Catalase in vitro", Methods in Enzymology", **105**, (1984).

Amar-Costesec, A. , Wibo, M., Thines-Sempoux, D., Beaufay, H. and Berthet, J.- « Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver IV. Biochemical, Physical, and Morphological Modifications of Microsomal Components Induced by Digitonin, EDTA, and Pyrophosphate », *The Journal of cell biology,* **62,** 717-745 (1974).

Aronson, N.N. Jr and Davidson, E.A.- "Lysosomal Hyaluronidase", *Preliminary Communications*, **240(7)**, 3222 (1965).

Aronson, N.N. Jr and Davidson, E.A.- "Lysosomal Hyaluronidase from rat liver", *J. Biol. Chem.*, **242(3),** 437 (1967).

Aronson, N.N. Jr and De Duve, C. – "Digestive Activity of Lysosomes. II. The digestion of macromolecules carbohydrates by extracts of rat liver Lysosomes", *J. Biol. Chem.*, **213(17),** 4564 (1968).

Bollet, A.J., Bonner, W.M. and Nance, J.L. – "The presence of hyaluronidase in various mammalian tissues" – J. Biol. Chem., **238(11),** 3522-3527 (1963).

Bourguignon, L.Y., Singleton P.A., Diedrich F., Stern R., Gilad E.- « CD44 interaction with Na+-H+ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. » , *J Biol Chem.* **279(26),** 26991-7007 (2004).

Bowers, W.E., Finkenstaedt, J.T. and De Duve, C. – "Lysosomes in lymphoid tissue. I. The measurement of activities in whole homogenates", *J. Cell. Biol.*, **32,** 325 (1967).

Cerneus, D. P., Ueffing, E., Posthuma, G. Strousz, G.J. and van der Endeg, A.-« Detergent Insolubility of Alkaline Phosphatase during Biosynthetic Transport and Endocytosis », *The Journal of Biological Chemistry,* **268 (5),** 3150-3155, (1993).

Colorwick, S.P., Kaplan, N.O. – "Methods in Enzymology I", Academic Press N.Y. London **735** (1965).

Csoka, A.B., Frost, G.I., and Stern, R. – "The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genoms" *Matrix Biology*, **20,** 499-508 (2001)

DeAngelis, P.L. - "Hyaluronan synthases: fascinating glycosyltransferases from vertebra, bacterial pathogens and algal viruses"; *Cell. Mol. Life Sci.* , **56,** 670 – 682 (1999).

De Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F. –" Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue." *Biochem. J.,* **60,** 604-617 (1955).

De Salegui, M., Pigman, W. -"The existence of an acid-active hyaluronidase in serum" *Arch. Biochem. Biophys.* **120,** 60-67 (1967).

Dirks, C., Duh, F.-M., Rai, S.K., Lerman, M.I., Miller, A.D.-"Mechanism of cell entry and transformation by enzootic nasal tumor virus", *J. Virol.*, **76,** 2141-2149 (2002).

Ekici, S., Cerwinka, W.H., Duncan, R., Gomez, P., Civantos, F., Soloway, M.S. and Lokeshwar, V.B. –"Comparison of the prognostic of hyaluronic acid, hyaluronidase (HYAL-1), CD44v6 and microvessl density for prostate cancer", *Int. J. Cancer*, **112(1),** 121-129 (2004).

Forteza, R.M., Conner, G.E. and Salathe, M. –"Hyaluronan and airway mucosal host defense.", *Glycoforum*, Dec. 16, (2002).
www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA25/HA25E.html

Franzmann, E.J., Schroeder, G.L., Goodwin, W.J., Weed, D.T., Fischer, P. and Lokeshwar, V.B., -"Expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) in head and neck tumors", *Int. J. Cancer*, **109(5),** 793-794 (2004).

Frost, G.I., Csoka, A.B. and Stern, R –" The hyaluronidases: A chemical, biological and clinical overview" – *Trends Glycosci.Glycotechnol.*, **8**, 419-434 (1996).

Frost, G.I., Csoka, T.B., Wong, T., Stern, R.- "Purification, cloning and expression of plasma human hyaluronidase." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **236,** 10-15. (1997).

Frost, G.I., Mohapatra, G., Wong, T.M., Csoka, A.B., Gray, J.W., Stern,R.-"Hyal-1 LUCA-1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p21.3, is inactivated in head and neck squamous cell carcinomas by aberrant splicing of pre-mRNA.", *Oncogene*, **19**, 870-877 (2000).

Fujiki Y., Hubbard A.L., Fowler S ., Lazarow P.B. –"Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum ». *J Cell Biol.*, **93(1)**, 97-102 (1982)

Gatphayak, K. – "Molecular caracterization of the porcine hyaluronidase gene cluster on SSC 13q21", Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Agrarwissenschaften des GeorAugust-Universität Göttingen, Dezember (2003)
http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2004/gatphayak/gatphayak.pdf

Ginetzinsky, A.G. – "Role of hyaluronidase in the re-absorption of watter in renal tubules: the mechanism of action of antidiuretic hormone", *Nature*, **1,** 1218 (1958).

Göransson, V. - « Hyaluronan and renal fluid handling » ; *Acta Universitatis Upsaliensis Uppsala* 2001).

Hascall, V.C. – "Hyaluronan: structure and physical properties", *Glycoforum*, Dec. 15, (1997).

Heldin, P - "Importance of hyaluronan biosynthesis and degradation in cell differenciation and tumor formation"; *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **36(8),** 967-973 (2003).

Hutterer, F.- "Degradation of mucopolysaccharides by hepatic lysosomes", *Biochim. Biophys. Acta*, **115,** 312 (1966).

Jackson, D.G.-" The lymphatic endothelial hyaluronan receptor LYVE-1", *Glycoforum*, Apr. 15, (2004).

Jacobson, A., Rahmanian, M., Rubin, K., and Heldin, P. – « Expression of hyaluronan synthase2 or hyaluronidase1 differentially affects the growth rate of transplantable colon carcinoma cell tumors », *International Journal of Cancer*, **102**, 212-219 (2002).

Jadot, M., Colmant, C., Wattiaux-De Conink, S. and Wattiaux, R. – « Intralysosomal hydrolysis of glycyl-L-phénylalanine-2-naphtylamide", *Biochem. J.*, **219,** 965 (1984).

Jedrzejas, M.J., -" Three dimensional structures of hyaluronidases lyases from Streptococcus species and their mechanism of hyaluronan degradation", *Glycoforum*, Aug. 16, (2002).

Junker N., Latini S., Petersen L.N., Kristjansen P.E.- « Expression and regulation patterns of hyaluronidases in small cell lung cancer and glioma lines. », *Oncol Rep.*, **10(3),** 609-616 (2003)

Knudson, W. and Knudson, C.B. –" The Hyaluronan Receptor, CD44", *Glycoforum*, Mar. 15, (1999).

Laurent T.C., Fraser J.R. –« Hyaluronan », *FASEB J.* **6(7),** 2397-2404 (1992).

Lepperdinger, G., Strobl, B. and Kreil, G. –"Hyal-2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity ", *J.Biol. Chem.* **273(35),** 22466-22470 (1998)

Lepperdinger, G., Müllegger, J. and Kreil, G. –"Hyal-2, less active, but more versatile?", *Matrix Biology*, **20,** 509-514 (2001).

Lerman, M.I. and Minna, J.D. –" The 630 kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3 identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes", *Cacer Res.*, **60**, 6116-6133 (2000) .

Lokeshwar, V.B., Schroder G.L., Carey R.I., Soloway M.S. and Lida N.- "Regulation of hyaluronidase activity by alternative mRNA splicing" *J. Biol. Chem.*, **277,** 33654-33663 (2002).

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. –" Protein measurement with the Folin phenol reagent », *J Biol Chem.* **193(1),** 265-75 (1951).

McGary, C.T., Raja, R.H. and Weigel, P.H.-" Endocytosis of hyaluronic acid by rat liver endothelial cells. Evidence for receptor recycling." *Biochem. J.* **257**: 875-884.(1989)

McIntosh, A.L., Gallegos, A.M., Atshaves, B.P., Storey, S.M., Kannoju, D. and Schroeder, F.-"Fluorescence and multiphoton imaging resolve unique structural forms of sterol in membranes of living cells", *J.Biol. Chem.* **278(8),** 6384-6403 (2003)

Neudecker, B.A., Stern, R. and Connolly, M.K. –„ Clinical and laboratory investigations. Aberrant serum hyaluronan and hyaluronidase levels in scleroderma", *British Journal of Dermatology*, **150(3),** 469 (2004).

Novak, U., Stylly, S.S., Kaye, A.H., Lepperdinger, G. – "Hyaluronidase-2 overexpression accelerates intracerebral but not subcutaneous tumor formation of murine astrocytoma cells", *Cancer Res.*, **59,** 6246-6250 (1999).

Peters, T.J., Müller, M. and De Duve, C. – „Lysosomes of the arterial wall", *J. Exp. Med.*, **136,** 1117 (1972).

Schoer, J.K., Gallegos, A.M., McIntosh, A.L., Starodub, O., Kier, A.B., Billheimer, J.T. and Schroeder, F. –"Lysosomal membrane cholesterol dynamics" , *Biochemistry,* **39** (26), 7662-7677, (2000).

Scott, J.E.- "Secondary structure in hyaluronan solutions: chemical and biological implications. The biology of Hyaluronan", *Ciba Foundation Symposium* No. 143: 6-14 (1989).

Scott, J.E. – "Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution. Some biological consequences." *Glycoforum,* Mar.15 (1998).

Scott, J.E and Heatley, F, - "Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution : A $^{13}C$ NMR study", *Proc. Natl. Acad. USA*, **96,** 4850-4855 (1999).

Shuttleworth T.L., Wilson M.D., Wicklow B.A., Wilkins J.A. and Trigs-Raine B.L., "Characterization of the Murine Hyaluronidase Gene Region Reveals Complex Organization and Cotranscription of Hyal-1 with Downstream Genes, Fus-2 and Hyal-3", *J. Biol. Chem.*, **277,** 23008, (2002).

Spicer,A.P. and McDonand, J.A. – « Eucaryotic Hyaluronan Synthases"-*Glycoforum*, Sep. 15 (1998)

Stern, R.- "The breast tumor suppressor function of hyaluronidase", *Tumor Biology. California Breast cancer research program.* (1995)

Stern, R. –"Devising a pathway for hyaluronan catabolism : are we there yet ?", *Glycobiology*, **13(12),** 105R – 115R (2003 ).

Stern, R. – "Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway", *Eur. J. Cell Biol.* **83,** 317-325. (2004).

Stern, R and Csoka, A.B. – "Mammalian Hyaluronidases", *Glycoforum*, June, 23 (2000).

Stern, R. and Csoka, A.B.- "Mammalian hyaluronidases", *Glycoforum*, Mai 18, (2004).

Tammi, R., Rilla, K., Pienimäki, J-P., MacCallum, D.K., Hogg, M.., Luukkonen, M., Hascall, V.C., and Tammi, M, -"Hyaluronan Enters Keratinocytes by a Novel Endocytic Route for Catabolism », *J Biol Chem.*, **276(37),** 35111-35122 (2001)

Toole, B.P. –"Hyaluronan in Morphogenesis and Tissue Remodeling", *Glycoforum*, Dec. 15, (1998).

Toole B.P.- "Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue", *Nature Reviews/Cancer*, **4**, 528-537 (2004).

Triggs-Raine, B.S., Salo, T.J., Zhang, H., Wicklow, B.A., Natowicz, M.R.- " Mutations in HYAL1, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6296-6300 (1999).

Turley, E. and Harrison, R. –"RHAMM, a member of hyalaldherins", *Glycoforum*, Jul. 25, (1999).

Vaes, G. – "Hyaluronidase Activity in Lysosomes of Bone Tissue", *Biochem. J.*, **103,** 802 (1967).

Weigel P.H. -"Bacterial hyaluronan synthases" *Glycoforum,* Aug. 15, (1998).

Weigel P.H. -"Bacterial hyaluronan synthases-an update" *Glycoforum,* April 15, (2004).

Weigel, P.H. – "Current progress and limitations in understanding of the molecular and cellular functions of hyaluronan synthases,, *Matrix Biology Institute* (2004b) (http://www.matrixbiologyinstitute.org/ha03/ch2/Weigel,%20Chap.%202,%20%20CURRENT%20PROGRESS%20AND%20LIMITS.pdf)

Wight, T.N. – "Hyaluronan in Atherosclerosis and restenosis", *Glycoforum*, Feb. 15 (1999).

Yip, V.L.Y. and Withers, S.G., -" Nature's many mechanisms for the degradation of oligosaccharides", *Org. Biomol. Chem.*, **2,** 2707-2713 (2004).