



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Rôle potentiel de LAMP II sur le trafic intracellulaire des hydrolases lysosomales

Leclère, Lionel

Award date:
2007

[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.



**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Rôle potentiel de LAMP II sur le trafic intracellulaire des hydrolases
lysosomales.**

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

Lionel LECLERE

Août 2007

Facultés Universitaire 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>

Rôle potentiel de LAMP-2 sur le trafic intracellulaire des hydrolases lysosomales.

LECLERE Lionel

Résumé

Dans certaines maladies, la voie classique de transport des hydrolases lysosomales par ciblage avec le résidu mannose 6-P ne peut pas fonctionner, suite à une déficience génétique. Pourtant, dans certains tissus, dont le foie, les lysosomes présentent malgré tout, un certain arsenal hydrolytique. Il doit donc exister une voie indépendante du mannose 6-P, de nature encore inconnue.

Notre laboratoire a montré qu'à pH légèrement acide, des enzymes solubles formaient des assemblages supra-moléculaires impliquant des lipides et une glycoprotéine membranaire : LAMP-2. Des phénomènes d'agrégation sont au centre de mécanismes de tri de protéines dans certains granules de sécrétion. Par analogie, nous avons basé notre travail sur l'hypothèse d'une activité de LAMP-2 dans le pilotage des hydrolases lysosomales. Nous avons choisi d'exprimer une forme tronquée de LAMP-2 de rat dans des cellules HepG2. Si notre hypothèse est exacte, l'expression de cette forme de LAMP-2 dépourvue de ses régions transmembranaire et cytoplasmique (LAMP-2 Δ TM) pourrait entraîner une augmentation de la sécrétion de protéines lysosomales dans le milieu de culture. Nous avons d'abord vérifié par immunofluorescence et Western Blot que la protéine LAMP-2 Δ TM était bien sécrétée par les cellules transfectées. Après avoir préparé des clones stables, nous avons dû faire face à un dilemme : pour l'analyse des sécrétomes, fallait-il ou non ajouter du sérum dans le milieu de culture ? D'un côté, la présence de protéines sériques dans le sécrétome risquait de masquer des variations d'abondance entre les cellules exprimant LAMP-2 Δ TM et les cellules contrôles. Nous avons essayé d'éliminer l'albumine, une protéine majeure du sérum, par chromatographie d'affinité mais à la sortie de la colonne, il en restait une quantité importante. D'un autre côté, la privation de sérum risquait d'induire l'autophagie. L'examen morphologique en microscopie confocale semble le confirmer. Finalement, nous avons procédé à l'analyse protéomique par la technique 2D-DIGE sur des milieux de culture de cellules exprimant LAMP-2 Δ TM et de cellules contrôles, incubées pendant 24h en absence de sérum. Aucune protéine lysosomale soluble ne se trouve dans la liste des protéines sécrétées en plus grande quantité par les cellules LAMP-2 Δ TM par rapport aux cellules contrôles et identifiées par spectrométrie de masse. Dans cette liste, figure la protéine TIP47 qui est impliquée dans le transport rétrograde des récepteurs au mannose 6-P mais sa présence dans le sécrétome peut difficilement s'expliquer.

Mémoire de licence en Science Biologiques
Août 2007-08-24

Promoteur : M. Jadot,

Tuteur : I. Hamer

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier M. Jadot qui m'a donné l'opportunité de venir effectuer ce mémoire au sein de son laboratoire.

Je tiens ensuite à remercier tout particulièrement Isabelle Hamer qui a eu la patience pour me guider et me former au cours de ce mémoire. Merci à vous, vos conseils et vos remarques m'ont beaucoup appris, j'espère avoir été à la hauteur de vos attentes.

Merci à Marie-Thérèse. Profite bien de ta retraite.

Merci à toutes les personnes que j'ai eu le plaisir de côtoyer dans mon labo, de près ou de loin. Marie-Jeanne, Laetitia, Anne-Françoise, Sophie, Marielle (merci pour les conseils lors de mes IF), Roberta (merci d'avoir étanché ma soif...d'ice-tea) ainsi que toutes les autres personnes non citées mais qui je l'espère se reconnaîtront.

Merci à Edouard Delaive pour sa science en matière de gels 2D et pour sa patience de me l'avoir fait partager.

Merci à Marc Dieu et Catherine Demazy, pour m'avoir laissé participer à la spectrométrie de masse.

Merci à Noëlle Ninanne pour la microscopie confocale

Merci à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin à concrétiser ce mémoire.

Je remercie les personnes qui prendront le temps de lire ce mémoire, M. Arnould, M. DeBaker, Cindy Gustin, Marielle Boonen.

Je tiens également à remercier tous mes amis de bio, ces dernières années passées avec vous me semblent être les meilleures de mon cursus ! Merci en particulier à : Lolo, Fwé, Kiki, Gommelette, le Poison, Audrita, Castor (c'est toi Andréa !!), Châlé, Buch, MelBush ,etc...(en fait c'est surtout pour avoir un coin « surnom »). Merci aussi en particulier à Aude, Thibaut et Pauline, on doit toujours aller au Cat's à l'heure où je rédige ces lignes...

Merci de tout mon cœur à ma famille, Maïlys, Benoit et maman, sans toi je ne serais pas là, tu nous as toujours soutenus, on te sera toujours redevable pour tout ce que tu as fait, merci de tout mon cœur !!

En vrac mais de tout mon cœur je tiens à remercier : petite souris, mes amis de Dinant, surtout Bob (Gontrand), le starkot au complet, mes cokoteurs Parce et Cobal (vive la lumière bleue les gars !!).

Pour finir, je tiens à remercier ma Sabelle, Astrid, qui m'a soutenu et encouragé durant toute cette année. Cette année avec toi était magique, pourvu que cela dure...je t'embrasse ma douce!

La liste pourrait encore être longue mais je préfère la stopper ici. Sinon, je ne saurai pas m'arrêter !

Abréviations :

AP	<i>Adaptor protein</i>
ARF-GTP	<i>ADP-ribosylation factor-GTP</i>
ATP	Adénosine triphosphate
CD-MPR	Récepteur au mannose 6-phosphate cation-dépendant
CI-MPR	Récepteur au mannose 6-phosphate cation-indépendant
CMA	Autophagie médiée par des chaperonnes
DRM	<i>Detergent resistant microdomains</i>
ECV	<i>Endosomal carrier vesicle</i>
FCS	<i>Foetal calf serum</i>
GGA	<i>Golgi localized, γ adaptin ear homology domain, ARF-binding protein</i>
Hsc	<i>Heat shock cognate protein</i>
IGF II	<i>Insulin growth factor II</i>
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knock-out</i>
LAMP	<i>Lysosomal associated membrane protein</i>
LAP	Phosphatase acide lysosomale
LDH	Lactate déshydrogénase
LGP	<i>Lysosomal glycoprotein</i>
LIMP	<i>Lysosomal integral membrane protein</i>
MPR	Récepteur au mannose 6-phosphate
MVB	Corps multivésiculaire
M6P	Mannose 6-phosphate
RER	Réticulum endoplasmique rugueux
SNARE	<i>Soluble N-ethyl-maleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
TCA	Acide trichloracétique
TGN	Réseau trans-Golgien

I. Introduction	4
1. Généralités sur les lysosomes	4
2. Les hydrolases lysosomales	5
2.1. Description	5
2.2 Transport cellulaire	5
2.2.1. Transport biosynthétique.....	5
2.2.2. Transport dépendant des récepteurs au mannose 6-phosphate	6
2.2.2.1. Caractéristiques des récepteurs au mannose 6-phosphate	6
2.2.2.2. Trafic antérograde des MPRs	7
2.2.2.3. Recyclage des MPRs.....	9
2.2.3. Voies indépendantes du mannose 6-phosphate	10
3. Les protéines membranaires des lysosomes	12
3.1. Caractéristiques de la membrane des lysosomes	12
3.2. Description des protéines membranaires	12
3.2.1. Les glycoprotéines	12
3.2.1.1. LAMP-1 et LAMP-2	12
3.2.1.2. LIMP-I et LIMP-II	13
3.2.2. Les autres composants de la membrane lysosomale	13
3.2.2.1. La pompe à protons.....	14
3.2.2.2. Les transporteurs	14
3.2.2.3. p40.....	14
3.3. Ciblage des protéines membranaires	14
3.4. Rôles des protéines LAMPs et LIMPs	15
3.4.1. Rôle de LAMP-1.....	16
3.4.2. Rôle de LAMP-2 dans la biogenèse des lysosomes et dans l'autophagie	16
3.4.3. Intervention des LAMPs dans la biogenèse des phagosomes	18
3.4.4. Rôle de LIMP-II dans la biogenèse et le maintien de la morphologie des lysosomes	18
4. Biogenèse des lysosomes	19
5. Objectifs du mémoire	21
II. Matériel et Méthodes	22
1. Culture cellulaire de HepG2	22
2. Transfection des cellules	22
2.1. Transfections transitoires	22
2.2. Obtention de lignées clonales stables.....	23
3. Traitement des cellules et collecte des milieux de culture	23
4. Electrophorèse sur gels de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)	23
5. Western Blot	24
6. Immunofluorescence	25
7. Chromatographie d'affinité	26
8. Dosage des protéines	26
8.1. Méthode de Bradford	26
8.2. Méthode de l'acide bicinchoninique (BCA)	27
9. Fractionnement subcellulaire	27
10. Dosages enzymatiques	28

10.1. Dosage de la β -galactosidase	28
10.2. Dosage de la lactate déshydrogénase	28
11. Analyse protéomique par la technique 2D-DIGE	28
11.1. Principe	28
11.2. Préparation des échantillons.....	29
11.3. Focalisation isoélectrique (IEF).....	29
11.4. Electrophorèse SDS-PAGE.....	30
11.5. Détection des spots	30
12. Identification des spots par spectrométrie de masse MALDI-TOF	31
III. Résultats et Discussion	14
1. Transfection transitoire de cellules HepG2.....	32
1.1 Distribution de LAMP-2 de rat	32
1.2. Sécrétion des cathepsines B et D	34
1.3. Expression de LAMP-2 humain.....	35
2. Obtention de clones HepG2 stables	35
3. Distribution de LAMP-2 ΔTM, LAMP-1 et -2 humains dans les clones stables en présence ou en absence de sérum	36
4. Test d'autophagie sur les clones stables.....	38
5. Elimination de l'albumine sérique par chromatographie d'affinité.	38
6. Analyse par la technique du 2-D-DIGE des sécrétomes de HepG2 incubées pendant 24h sans sérum	40
7. Identification des spots par spectrométrie de masse	41
IV. conclusions	43
V. Références bibliographiques	45

Introduction

I. Introduction

1. Généralités sur les lysosomes

Les lysosomes sont généralement décrits comme des organites délimités par une membrane lipoprotéique, renfermant une cinquantaine d'enzymes de type hydrolase acide (Tableau I) qui présentent un pH optimal correspondant à celui de la lumière des lysosomes (entre pH 4 et pH 5) (Holtzman, 1989; Kollmann et al., 2005). Cette acidité qui permet l'activité optimale des enzymes est assurée par une pompe à protons H⁺-ATPase située dans la membrane des lysosomes. Toutes ces hydrolases permettent la dégradation de macromolécules provenant du milieu extérieur de la cellule via les voies d'endocytose, de phagocytose ou provenant du milieu interne via l'autophagie.

En microscopie électronique, ils apparaissent comme des vésicules d'un diamètre d'environ 0.5 μm renfermant un contenu très hétérogène, dense aux électrons. Cette hétérogénéité reflète la grande variété du contenu lysosomal en produits dégradés.

Les lysosomes représentent la destination finale de beaucoup de molécules, en vue de leur destruction ou de leur recyclage, mais ils présentent également plusieurs autres finalités comme le recyclage de protéines cellulaires, la diminution d'expression des récepteurs de surface, le largage de nutriments endocytés, l'inactivation d'organismes pathogènes, la réparation de la membrane plasmique et le présentation des antigènes via les molécules MHC (Mullins and Bonifacino, 2001).

Même si les lysosomes sont souvent considérés comme le principal site de dégradation, il est clair aujourd'hui que la dégradation peut déjà commencer dans les endosomes, en particulier dans les endosomes tardifs. Ce sont des compartiments prélysosomaux, également acidifiés et enrichis en hydrolases acides et en glycoprotéines membranaires. Mais, par rapport aux lysosomes, ils présentent une structure pléomorphique et une faible densité après migration sur gradient de Percoll. Enfin, contrairement aux lysosomes, ils contiennent des récepteurs aux résidus mannose 6-phosphate.

Les lysosomes sont en équilibre dynamique avec les endosomes tardifs. Grâce à des mécanismes de fusion, il y a des échanges de matériel entre lysosomes d'une part et entre endosomes d'autre part (fusion homotypique) ou entre lysosomes et endosomes (fusion hétérotypique). Ces phénomènes ont été mis en évidence *in vitro* par Luzio et son équipe. Ils ont montré que lors de la fusion entre des cellules de rat et de souris, avec le temps, il y avait un mélange des contenus membranaires et luminaux des endosomes et des lysosomes (Mullock et al., 1994). Par la suite, ces résultats ont été confirmés *in vivo* sur des cellules NRK (*normal rat kidney*) incubées d'abord avec du saccharose et ensuite avec des billes de latex couplées à l'invertase (enzyme qui hydrolyse le saccharose en glucose et fructose) (Jahraus et al., 1994). Dans les cellules NRK, le saccharose s'accumule dans les lysosomes suite à l'absence d'invertase endogène et provoque un gonflement osmotique tandis que les billes de latex s'accumulent dans les endosomes tardifs après phagocytose. Avec le temps, les lysosomes dilatés disparaissent arguant en faveur d'un transport rétrograde du saccharose des lysosomes vers les endosomes tardifs (Jahraus et al., 1994). Ce transport implique des mécanismes de fusion qui requièrent l'intervention d'une petite protéine G appelée Rab7. Les Rabs GTPases sont de petites protéines qui se lient au GTP. Avec l'aide des protéines

Protéases	Glycosidases	Nucléases	Lipases
Cathepsine D Cathepsine B Cathepsine H Cathepsine L Tripeptidyl peptidase Dipeptidyl peptidase I Dipeptidyl peptidase II Arginyl aminopeptidase Peptidyl dipeptidase C Carboxypeptidase A Carboxypeptidase B Prolyl carboxypeptidase Tyrosine carboxypeptidase Dipeptidase I Dipeptidase II	Hyaluronidase Héparine endoglucuronidase Heparan sulfate endoglucosidase Lysosyme b α -L-Fucosidase α -Galactosidase β -Galactosidase α -Glucosidase β -Glucosidase α -N-acétylgalactosaminidase α -N-acétylglucosaminidase β -N-acétylglucosaminidase β -Glucuronidase α -L-Iduronidase α -Mannosidase β -Mannosidase Neuraminidase β -Aspartylglucosylaminase Chondroïtin 6-sulfatase Heparin sulfamatase Iduronosulfatase Sulfatase A et B	Ribonucléase II Déoxyribonucléase Exonucléase (5'-terminal) Phosphatase acide	Triacylglycérol lipase Phospholipase A1 Phospholipase A2 Phosphatidate phosphatase Acylsphingosine deacylase Sphingomyelin phosphodiesterase

Tableau I: Enzymes lysosomales majeures de la voie métabolique, groupées selon les principales classes de substrats naturels sur lesquels elles agissent.

SNAREs, elles jouent un rôle central dans les mécanismes moléculaires qui rapprochent les membranes d'organites distincts et conduisent à leur fusion (Bonifacino and Glick, 2004).

2. Les hydrolases lysosomales

2.1. Description

Les enzymes contenues dans le lysosome sont des hydrolases acides. Elles catalysent des réactions de type $A-B + H_2O \rightarrow A-H + B-OH$. La plupart d'entre elles ont une activité maximale à pH 4-5 mais certaines peuvent avoir une activité non négligeable à un pH plus élevé. Ensemble, les enzymes sont capables de dégrader toutes les macromolécules cellulaires (les acides nucléiques, les protéines, les polysaccharides et les lipides) en produits de faible poids moléculaire (Tableau I). Récemment, des études de protéomique menées sur des milieux de culture de cellules traitées avec du NH_4Cl et passés sur colonne d'affinité pour le M6-P ont permis l'identification de nouvelles hydrolases lysosomales potentielles. Le traitement au NH_4Cl perturbe la voie endocytaire en modifiant le gradient de pH et stimule la sécrétion des hydrolases lysosomales (Jensen et al., 2007; Kollmann et al., 2005; Sleat et al., 2007).

La déficience des lysosomes en hydrolases lysosomales engendre des maladies dites de surcharge lysosomale. Jusqu'à présent, plus de 40 maladies de surcharge lysosomale ont pu être directement liées au déficit d'une ou de plusieurs hydrolase(s) (Kollmann et al., 2005) (Sleat et al., 2007).

Dans une gamme de pH semblable à celui des lysosomes, certaines enzymes sont capables de s'agréger et de s'associer *in vitro* à des complexes lipidiques (Buckmaster et al., 1988; Jadot et al., 1996; Jadot et al., 1997). La fonction biologique de cette agrégation reste encore inconnue à ce jour, mais elle soulève la question de l'existence d'une matrice insoluble dans la lumière des lysosomes. Celle-ci pourrait jouer plusieurs rôles. En formant des complexes supra-moléculaires insolubles, les protéines lysosomales pourraient résister à la protéolyse. Cette matrice pourrait également rassembler les enzymes agissant séquentiellement dans les mêmes voies métaboliques. Enfin, elle pourrait intervenir dans la rétention des hydrolases lysosomales lors des différentes étapes de fusion des lysosomes avec les endosomes tardifs, comme cela a été observé avec la β -1-4-galactosyltransférase dont l'agrégation permet sa rétention dans l'appareil de Golgi (Yamaguchi and Fukuda, 1995).

2.2 Transport cellulaire

2.2.1. Transport biosynthétique

La majorité des hydrolases solubles sont synthétisées sous forme de pré-proenzymes au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER). Elles possèdent un peptide signal N-terminal qui est clivé par une peptidase lors de la translocation à travers la membrane du RER. Le peptide signal est suivi d'un propeptide et de la chaîne polypeptidique. Dans le RER, les hydrolases sont glycosylées par l'ajout d'une chaîne préformée d'oligosaccharides sur certains résidus asparagine. Tout le long de leur voyage jusqu'au Golgi, les oligosaccharides vont subir plusieurs remaniements qui font partie de la maturation de la protéine. Les protéines destinées à la sécrétion subissent également ces différentes étapes lors de leur

biosynthèse. C'est grâce à l'action de deux enzymes, l'UDP-N-acétylglucosamine phosphotransférase, qui ajoute un résidu N-acétylglucosamine-1-phosphate (GlcNac-P) sur le C6 de certaines molécules de mannose situées sur des chaînes d'oligosaccharides, et l' α -N-acétylglucosaminidase qui enlève le résidu N-acétylglucosamine terminal, que les glycoprotéines acquièrent les résidus phosphomannosylés qui servent de marqueurs de reconnaissance pour la liaison de haute affinité avec les récepteurs au mannose 6-phosphate (MPRs). La plupart des enzymes lysosomales se lient à ces récepteurs et les complexes ligands-récepteurs sont conduits jusqu'aux endosomes où le pH acide libère les hydrolases, permettant le recyclage des MPRs (Kornfeld and Mellman, 1989). Une partie des hydrolases lysosomales n'emprunte pas cette voie et arrive aux lysosomes après avoir été sécrétée et ensuite endocytée grâce aux MPRs se trouvant à la surface cellulaire.

Pour être pleinement actives, la majorité des protéases doivent encore subir une ou plusieurs étape(s) de maturation protéolytique au niveau des endosomes ou des lysosomes. Ces étapes sont dépendantes du pH et de certaines enzymes lysosomales comme les cathepsines B et D. Les étapes de maturation des cathepsines B, D et L ont été bien étudiées. Le propeptide qui sert jusque là de « cran de sûreté » sur l'enzyme est retiré et les précurseurs deviennent alors des « formes intermédiaires » catalytiquement actives, constituées de leur seule chaîne polypeptidique. Celles-ci sont ensuite clivées de manière asymétrique pour donner les formes matures qui sont constituées de l'association d'une chaîne courte et d'une chaîne longue (Gieselmann et al., 1983; Schmid et al., 1999). Pour la cathepsine B, il y a en plus un raccourcissement de quelques acides aminés sur l'extrémité carboxy-terminale (Schmid et al., 1999). Ces étapes de maturation ont probablement pour fonction de protéger la voie biosynthétique de l'activité potentielle des protéases lysosomales.

Après le retrait du peptide signal, les glycosidases ne subissent plus de clivage protéolytique mais elles doivent néanmoins se replier correctement et éventuellement s'associer avec d'autres sous-unités pour acquérir leur activité.

2.2.2. Transport dépendant des récepteurs au mannose 6-phosphate

(Pour des revues, voir Ghosh et al., 2003; Kornfeld, 1987; Kornfeld and Mellman, 1989)

Les récepteurs au mannose 6-phosphate (MPRs) se lient aux enzymes lysosomales nouvellement synthétisées dans le réseau trans-Golgien (TGN) et les transportent jusqu'aux endosomes où, grâce au pH acide, les enzymes se séparent des récepteurs. Les MPRs sont ensuite recyclés jusqu'au TGN pour être réutilisés (Kornfeld, 1987; Kornfeld and Mellman, 1989).

2.2.2.1. Caractéristiques des récepteurs au mannose 6-phosphate

Les cellules de mammifères expriment deux types de récepteur au mannose 6-phosphate, l'un avec une taille apparente de 300 kDa appelé récepteur au mannose 6-phosphate cation-indépendant (CI-MPR) et l'autre de 46 kDa appelé cation-dépendant (CD-MPR). Des souris déficientes en CD-MPR et en CI-MPR ont été générées et des études sur des fibroblastes déplétés en CD-MPR ou CI-MPR ont permis de démontrer que les deux types de récepteurs sont nécessaires pour un ciblage efficace de l'ensemble des hydrolases jusqu'aux lysosomes (Pohlmann et al., 1995). Il a été suggéré que les deux récepteurs se complètent l'un l'autre en se liant à des sous-populations distinctes d'enzymes lysosomales. Ils présentent en effet des affinités différentes pour les protéines en fonction de la nature des hydrates de carbone (Pohlmann et al., 1995). L'adressage via le CI-MPR est généralement

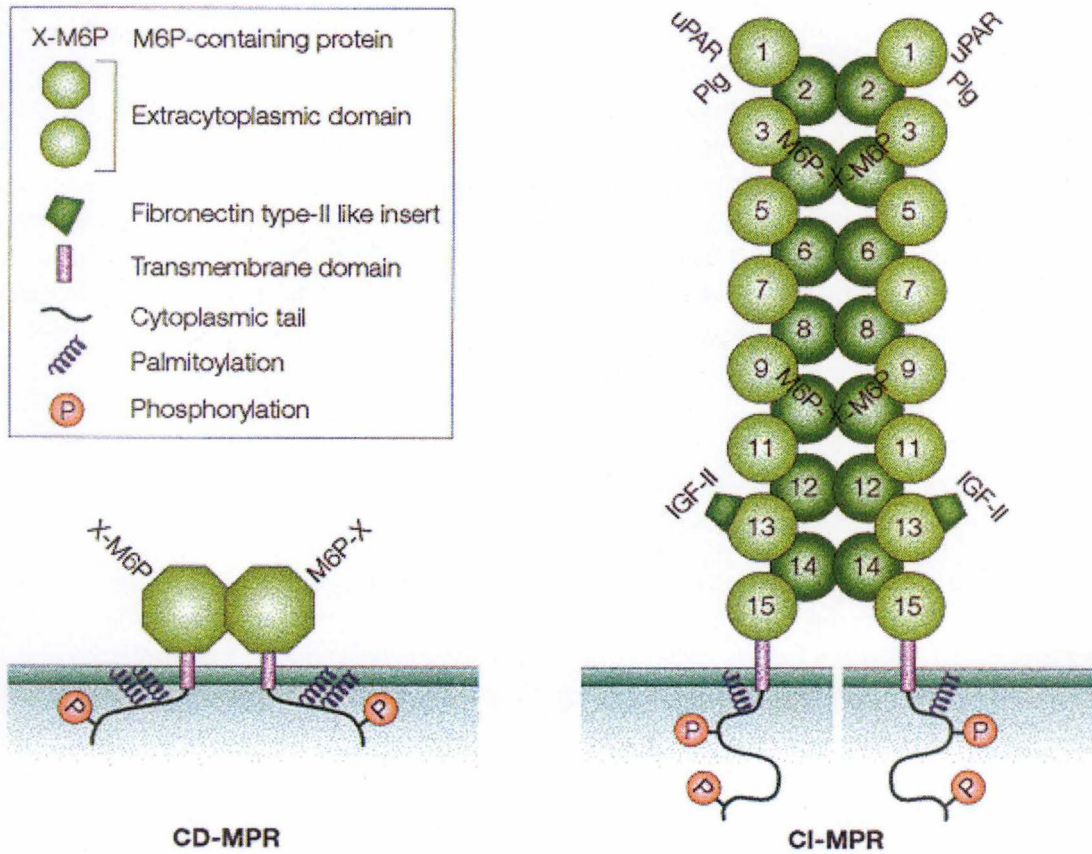


Fig.1 Structure des récepteurs au mannose 6-phosphate. MPR cation-dépendant à gauche
MPR cation-indépendant à droite (d'après Gosh, 2003)

plus efficace que celui via le CD-MPR. Cela serait dû en partie à une plus faible affinité du CD-MPR pour des ligands contenant plusieurs résidus M6P.

Les deux types de récepteur sont des glycoprotéines membranaires de type I, composés de quatre domaines structuraux : une séquence signal, un domaine amino-terminal extracytoplasmique contenant les sites de liaison au M6P, une région transmembranaire hydrophobe et un domaine cytoplasmique contenant de nombreux signaux d'adressage dont certains sont modifiés par phosphorylation ou par palmitoylation (Fig. 1) (Ghosh et al., 2003; Kornfeld and Mellman, 1989; Pfeffer, 1991).

Le CI-MPR, est également appelé M6P/IGF2R (*insulin-like growth factor II receptor*). La partie extracytoplasmique qui renferme 2 sites de liaison au M6P, est constituée d'une structure de 15 répétitions de 147 acides aminés chacune. Le segment répété partage des homologies de séquence (14-38%) ainsi que des distributions de résidus cystéines qui permettent la formation des ponts disulfure et l'obtention d'une structure tertiaire. Cette répétition de séquences est interrompue par l'insertion d'un segment de 43 acides aminés qui partage des homologies avec une séquence de la fibronectine, constituant une partie du domaine de liaison au collagène. Ce récepteur est également capable de se lier à l'IGF II (*insulin growth factor II*) à la surface cellulaire pour ensuite l'internaliser et le dégrader dans les lysosomes. La queue cytoplasmique du CI-MPR renferme des motifs d'adressage aux endolysosomes (motifs tyrosine et dileucine) qui sont reconnus par des protéines adaptatrices (voir § 2.2.2.2.). Dans la membrane, le CI-MPR semble former des dimères, ce qui augmenterait son affinité pour des ligands possédant plusieurs résidus M6P.

Le CD-MPR existe principalement sous forme d'homodimères, chaque chaîne polypeptidique possédant un site de liaison au M6P. Il nécessite la présence de cations bivalents (surtout des ions Mg^{++}) pour son fonctionnement. Une grande partie de sa masse moléculaire est composée par des sucres. Déglycosylée, le core protéique a une masse de seulement 28 kDa. La portion extracellulaire est formée d'une séquence qui est semblable aux domaines répétés dans le CI-MPR. Pour son adressage jusqu'aux endosomes, il possède également un motif dileucine dans sa queue cytosoplasmique. Une étude récente menée sur des cellules de carcinome murin, suggère que l'acidification des compartiments prélysosomaux n'est pas nécessaire pour la dissociation des complexes ligands-récepteurs (Probst et al., 2006). Selon ces auteurs, l'oligomérisation du récepteur CD-MPR ou la présence de phosphatases encore inconnues pourrait être impliquée dans ce processus.

2.2.2.2. Trafic antérograde des MPRs

(Pour des revues, voir Ghosh et al., 2003; Nakayama and Wakatsuki, 2003; Ohno, 2006)

On retrouve les MPRs dans le TGN, dans les endosomes précoces, dans les endosomes de recyclage, dans les endosomes tardifs et dans la membrane plasmique. En revanche, ils sont complètement absents des lysosomes car il existe des systèmes efficaces pour les recycler au niveau des endosomes (voir § 2.2.2.3). Le trafic antérograde des MPRs (entre le TGN et les endosomes) est dirigé par des signaux d'adressage présents dans leur queue cytoplasmique. Il s'agit du motif tyrosine YXX Φ (où X correspond à n'importe quel acide aminé et Φ à un acide aminé hydrophobe) et du motif dileucine AC-LL (où les 2 résidus leucine sont précédés de quelques acides aminés acides). Les motifs d'adressage permettent aux récepteurs de se lier à des protéines adaptatrices dont le rôle est d'une part, de rassembler des complexes récepteurs-ligands et d'autre part, de recruter les protéines nécessaires à la

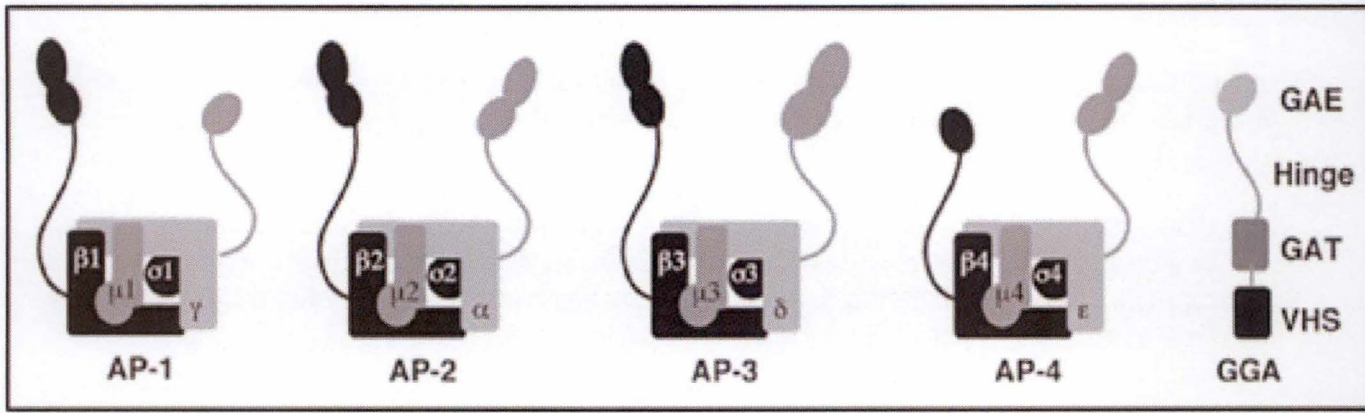


Fig. 2 : Structure des complexes protéiques AP-1, AP-2, AP-3 et AP-4 et des protéines monomériques GGAs.

formation de vésicules de transport destinées aux endosomes au sein de microdomaines membranaires.

Les premières protéines adaptatrices à avoir été étudiées sont les APs (*adaptor proteins*) qui forment des complexes hétérotétramériques (Fig. 2). Chez les mammifères, il y a six types d'APs, AP-1A, AP-2, AP-3A et AP-4 qui sont exprimés de manière ubiquiste et AP-5 et AP-6 qui sont des isoformes de AP-1A et AP-3A spécifiquement exprimés dans certains types cellulaires. Chaque complexe AP intervient dans une voie de transport distincte, soit du réseau post-Golgien, soit de la voie endocytaire. Le complexe AP-2 est associé à la membrane plasmique où il permet la formation des vésicules recouvertes de clathrine (CCV) impliquées dans les phénomènes d'endocytose. AP-1A est associé au TGN et aux endosomes, il est responsable du transport sélectif des hydrolases lysosomales entre ces deux compartiments. Il agirait en association avec d'autres protéines appelées GGAs (voir ci-après). AP-3A interviendrait dans le trafic de molécules cargos à partir des endosomes précoces jusqu'aux endosomes tardifs et aux organites qui y sont apparentés, comme les mélanosomes ou les granules denses des plaquettes. AP-3 pourrait également intervenir dans l'adressage de protéines membranaires lysosomales comme LAMP-1, LAMP-2 et LIMP-II. La voie exacte de AP-3 fait encore l'objet de controverse. AP-4 interviendrait dans le transport de certaines protéines membranaires (notamment de LAMP-2) du réseau trans-Golgien vers les lysosomes sans passer par la membrane plasmique. AP-4 pourrait également avoir un rôle dans le transport basolatéral de récepteurs de lipoprotéines de faible poids moléculaire dans les cellules épithéliales (Ohno, 2006).

Les complexes APs sont formés de quatre sous-unités, une petite ($\sigma 1$ - $\sigma 4$ adaptines), une moyenne ($\mu 1$ - $\mu 4$ adaptines) et deux grandes (α , β , γ ou ϵ et $\beta 1$ - $\beta 4$ adaptines) (Fig.2). Chaque sous-unité a une fonction spécifique, la chaîne μ reconnaît un signal de sortie de type tyrosine dans le domaine cytoplasmique des protéines cargos, la partie coudée des adaptines reconnaît la clathrine, les « oreilles » du domaine C-terminal de l' α , de la $\beta 1/2$ et de la γ adaptines recrutent une grande variété de protéines accessoires qui modulent la fonction des APs. Cependant, AP-4 diffère des autres complexes AP car il ne possède pas la région coudée de la sous-unité β . Sans ces « oreilles », il n'y a normalement pas d'interactions avec la clathrine. Or, AP-4 a été détecté dans des vésicules recouvertes de clathrine et dans des membranes d'endosomes précoces recouvertes également de clathrine. On retrouve AP-4 dans des vésicules contenant le CI-MPR mais qui sont morphologiquement distinctes des vésicules positives pour AP-1 (Barois and Bakke, 2005).

En l'an 2000, d'autres protéines adaptatrices impliquées dans le transport des MPRs ont été identifiées (Boman et al., 2000; Dell'Angelica et al., 2000; Hirst et al., 2000). Ce sont les GGAs, qui semblent aussi importantes, sinon plus, que les APs. Les GGAs (*Golgi localized, γ adaptin ear homology domain, ARF-binding protein*) sont des protéines monomériques composées d'un domaine VHS amino-terminal, d'un domaine GAT, d'une région charnière de taille variable, contenant un ou plusieurs domaine(s) de liaison à la clathrine, et d'un domaine GAE carboxy-terminal qui présente des homologies avec la γ -adaptine (Fig. 2). Ces protéines sont recrutées du cytoplasme vers la membrane du TGN par une petite GTPase, ARF-GTP (*ADP-ribosylation factor-GTP*) via le domaine GAT. Grâce à leur domaine VHS, les GGAs se lient au motif dileucine AC-LL des protéines cargos.

Plusieurs modèles tentent d'expliquer le rôle des protéines APs et GGAs dans le transport post-Golgien. Dans le premier, les GGAs et AP-1 sont présents sur différentes vésicules recouvertes de clathrine et sont responsables du transport de différentes protéines cargos. Un deuxième modèle propose que les GGAs et AP-1 exercent leur activité sur les mêmes vésicules mais recrutent des protéines cargos différentes. Enfin, le troisième modèle suggère que les GGAs et AP-1 coopèrent pour recruter les mêmes protéines cargos dans la même vésicule. Plusieurs études montrent que les GGAs interagissent avec le motif dileucine DXXLL présent dans la queue cytoplasmique des MPRs et sont indispensables pour leur adressage vers le compartiment endolysosomal (Doray et al., 2002; Ghosh and Kornfeld, 2003; Puertollano et al., 2001; Zhu et al., 2001). Les GGAs et le complexe AP-1 pourraient agir successivement pour empaqueter les récepteurs MPRs dans les vésicules recouvertes de clathrine émanant du TGN (Doray et al., 2002; Ghosh and Kornfeld, 2003; Puertollano et al., 2001; Zhu et al., 2001).

Le retrait de la clathrine de la membrane des vésicules dépend de l'activité ATPasique de la protéine chaperonne Hsc 70 (*heat shock cognate protein of 70 kDa*) qui est recrutée à la membrane par une sérine/thréonine kinase, l'auxiline 2 (Ghosh et al., 2003). Les vésicules sont alors amenées sur leur lieu de destination, les endosomes précoces ou tardifs, en suivant les éléments du cytosquelette. De petites GTPases de la famille des Rabs ainsi que des protéines SNAREs (*soluble N-ethyl-maleimide-sensitive (NSF) attachment protein receptor*) interviennent dans le rapprochement et la fusion des vésicules de transport avec la membranes des endosomes.

Pendant la maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs, les hydrolases sont dissociées de leur récepteur et délivrées aux lysosomes probablement lors de la fusion hétérotypique des lysosomes avec des endosomes. Les MPRs n'entrent jamais dans les lysosomes. Ils sont redirigés vers les compartiments Golgiens où ils exerceront à nouveau leur fonction.

2.2.2.3. Recyclage des MPRs

(Pour des revues, voir (Bonifacino and Rojas, 2006; Ghosh et al., 2003; Seaman, 2005))

Le processus de recyclage des MPRs des endosomes vers le TGN (ou transport rétrograde) est encore mal compris. Vu le grand nombre de protéines impliquées dans ce processus, il existe probablement plusieurs voies de transport mais aucune ne semble nécessiter l'intervention de vésicules recouvertes de clathrine.

La protéine cytosolique PACS-1 (*phosphofurin acidic cluster-sorting protein*) et le complexe AP-1 seraient chargés du recyclage des MPRs à partir des endosomes précoces. Cette conclusion repose sur le fait que PACS-1 est capable de se lier à des acides aminés acides regroupés à l'extrémité C-terminale du CI-MPR et d'interagir avec AP-1 dans le cytosol. De plus, l'absence de PACS-1 ou de AP-1 provoque l'accumulation de MPRs dans les endosomes, ce qui indique que les 2 protéines jouent un rôle dans le transport rétrograde des récepteurs MPRs.

TIP47 (*tail interacting protein of 47 kDa*) une protéine hydrophile cytosolique et Rab9 permettraient le recyclage des MPRs à partir des endosomes tardifs jusqu'au TGN. TIP47 est recruté sur la membrane des endosomes tardifs grâce à Rab9. Là, il retient les MPRs en interagissant avec un motif phénylalanine-tryptophane (CD-MPR) ou avec un motif complexe riche en résidus proline (CI-MPR) situé dans la queue cytoplasmique des récepteurs (Diaz and Pfeffer, 1998). TIP47 est capable de s'oligomériser grâce à son domaine N-terminal. Elle

pourrait donc agir comme protéine adaptatrice ou comme protéine de recouvrement (en remplacement de la clathrine). Les MPRs pourraient quitter les endosomes tardifs à destination du TGN à bord de vésicules de transport positives pour Rab9. Ce transport rétrograde serait facilité par une protéine de 40 kDa qui est recrutée sur la membrane des endosomes via Rab9 (Diaz et al., 1997) et par la protéine GCC185 située sur la membrane du Golgi (Reddy et al., 2006). Des expériences *in vitro* ont montré que la dynéine, la dynactine et la mapmoduline stimulaient les étapes initiales du transport rétrograde des MPRs mais le rôle exact de ces protéines n'est pas encore connu. Il semble que le cytosquelette basé sur les microtubules contribue à l'efficacité du transport vésiculaire (Itin et al., 1999).

Des études plus récentes menées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont permis de mettre en avant l'existence d'un complexe protéique, appelé rétromère, qui jouerait un rôle clé dans le recyclage du CI-MPR (Bonifacino and Rojas, 2006; Seaman, 2006). Le rétromère est composé de plusieurs protéines appelées Vps (*vacuolar protein sorting*). Les Vps s'associent en sous-complexes. Le dimère Vps5p-Vps17p forme un manteau lié à la membrane et permet le bourgeonnement des vésicules tandis que le deuxième sous-complexe, formé de Vps26p, Vps29p et Vps35p permet la sélection des protéines cargos et notamment de la protéine Vps10p qui assure chez la levure la même fonction que les MPRs. Ces protéines retrouvent leurs homologues chez les cellules de mammifères, ce sont les mVps35, mVps26, mVps29 (qui interagissent avec la queue cytoplasmique des MPRs), la « *sorting nexin* » SNX1 et peut-être la SNX2. Pour l'instant, aucun homologue de Vps17p n'a pu être clairement identifié mais il se pourrait qu'il s'agisse de SNX2 qui dimérise avec SNX1, l'homologue de Vps5p, ou de SNX6. Les mécanismes qui en découlent ne sont pas encore bien élucidés mais il semblerait qu'une interaction entre les nexines et des lipides membranaires soit nécessaire. Les nexines s'auto-assembleraient pour former des tubules qui émergeraient des endosomes pour retourner jusqu'au Golgi où les protéines recyclées sont réutilisées (Wassmer et al., 2007).

2.2.3. Voies indépendantes du mannose 6-phosphate

Dans certaines pathologies, comme la *I-cell disease* et la polydystrophie pseudo-Hurler, suite à une déficience partielle ou complète de l'UDP-N-acétylglucosamine phosphotransférase (qui rappelons-le participe à la fixation des M6P sur les hydrolases acides), la plupart des hydrolases lysosomales ne sont pas acheminées aux lysosomes et sont sécrétées. Cependant, dans certains tissus et types cellulaires, comme le foie, la rate, les reins, les cellules de Kupffer et les lymphocytes B, on peut retrouver un taux normal d'enzymes comme, l' α - et la β - galactosidases et la cathepsine D (Waheed et al., 1982).

Par ailleurs, la phosphatase acide lysosomale (LAP) ne possède pas de signal M6-P. Elle est transportée jusqu'aux lysosomes comme une glycoprotéine membranaire de type I avec un grand domaine luminal N-terminal, un seul domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique de 19 acides aminés. Le domaine luminal comprend 8 sites potentiels de N-glycosylation qui sont tous utilisés. Après son arrivée dans les lysosomes, le domaine luminal de LAP contenant le site actif de l'enzyme est lentement libéré dans la matrice du lysosome par un processus protéolytique. Comme les glycoprotéines de la membrane lysosomale, LAP est adressé aux lysosomes grâce à des signaux d'adressage situés dans sa queue cytoplasmique (Brulke, 1996).

Ces situations laissent à penser que des voies de transport alternatives et indépendantes de la voie du M6-P existent. Plusieurs mécanismes ont été proposés. Dans des cellules déficientes en MPRs, Von Figura et son équipe ont noté une augmentation de l'abondance de

la cathepsine D dans les compartiments endo-lysosomaux alors que plus de 90% de cathepsine B néosynthétisée était sécrétée dans le milieu de culture sous forme de précurseur. Selon eux, il existe une voie qui passe par la sécrétion des enzymes dans un premier temps puis par leur recapture par endocytose (Dittmer et al., 1999).

Des études menées par Rijnbout sur des cellules HepG2 ont montré que la cathepsine D, la glucocérébrosidase et la prosaposine étaient associées à des membranes pendant leur biosynthèse, et ce indépendamment de la présence de résidus monophosphorylés (M6-P). La prosaposine est une glycoprotéine qui existe sous forme de 65 et de 70 kDa. La forme précurseur de 65 kDa est clivée dans les lysosomes pour donner naissance à 4 polypeptides, les saposines A, B, C et D. Ces dernières sont nécessaires à la dégradation des glycosphingolipides à courtes chaînes d'oligosaccharides par des hydrolases spécifiques (Kolter and Sandhoff, 2005). L'association membranaire des précurseurs commencerait dès leur sortie du RER (Rijnbout et al., 1991a; Rijnbout et al., 1991b). Des résultats similaires ont été obtenus sur des fibroblastes de souris (McIntyre and Erickson, 1991) et sur des lymphoblastes de patients atteints de *I-cell disease* (Glickman and Kornfeld, 1993). L'hypothèse la plus probable pour expliquer cette association membranaire est l'existence d'un récepteur membranaire différent des MPRs et de capacité moindre. Alternativement, il pourrait s'expliquer par une agrégation sélective de certaines enzymes qui entraînerait leur ségrégation, comme cela se fait pour les granules de sécrétion (Glickman and Kornfeld, 1993).

Par la suite, des expériences de marquage métabolique menées sur des HepG2 ont révélé que la procathepsine D et la prosaposine s'associaient entre elles. Cette association commencerait déjà dans le RER et se maintiendrait jusque dans les lysosomes denses mais l'association membranaire ne se ferait pas avant d'atteindre le TGN (Zhu and Conner, 1994). En plus de se lier aux récepteurs MPRs membranaires, la forme précurseur de la prosaposine (65 kDa) pourrait s'associer à la membrane du Golgi via des sphingolipides telle que la sphingomyéline. La sphingomyéline faciliterait l'interaction de la prosaposine avec une protéine membranaire non-identifiée qui agirait comme transporteur (Lefrancois et al., 2002; Zhao and Morales, 2000). Il se pourrait que ce transporteur soit la sortiline, un récepteur membranaire de type I qui présente des homologies de séquence au niveau de son domaine luminal avec la partie luminale du *sorting receptor* de la carboxypeptidase Y chez la levure (vps10p). Son domaine C-terminal contient plusieurs séquences d'adressage aux lysosomes similaires à celles du CI-MPR (motifs YXX Φ et AC-LL) et capables d'interagir avec GGA2 (Nielsen et al., 2001). Des travaux récents ont montré que la sortiline interagissait avec la prosaposine, avec G_{M2}AP (un autre activateur de l'hydrolyse des glycosphingolipides) et avec la sphingomyélinase acide (enzyme soluble impliquée dans l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide et phosphatidylcholine) (Lefrancois et al., 2003; Ni et al., 2006). De plus, ils ont montré que la diminution de l'expression de la sortiline par des constructions dominantes négatives ou par ARN interférant, bloquait le trafic de ces protéines vers les lysosomes. Ces résultats semblent indiquer que la sortiline est impliquée dans le transport des protéines possédant un domaine de type saposine (Ni et al., 2006).

Les différents mécanismes alternatifs à la voie du M6-P actuellement proposés sont donc, une sécrétion puis une recapture par endocytose ou une association membranaire via un récepteur, qui pourrait être la sortiline

Lysosomal membrane protein ^a	Synonyms	Molecular mass (kDa)	Trans-membrane domains	Carbohydrates	Expression	Targeting signal ^b	Presumed function
LAMP-1 LGP-A	LGP120 (rat) LGP107 (rat) LEP100 (chicken) LAMP-1 (mouse) lamp-A (human) CD107a	90-120	1	17-20 N-glycans Poly-N-acetyl-lactosaminyl structures ~55% of molecular mass O-glycosylation described	Ubiquitous In lysosomes/late endosomes Exceptionally at the cell surface	-RKRSHAGYQTI (at the C-terminal domain)	Lysosomal stability and integrity Knockout mice with mild astrogliosis, normal lysosomal functions; overlapping functions with LAMP-2
LAMP-2 LGP-B	LGP110 (rat) LGP96 (rat) LAMP-2 (mouse) CD107b	95-120	1	16-17 N-glycans Poly-N-acetyl-lactosaminyl structures ~55% of molecular mass O-glycosylation described	Ubiquitous In lysosomes/late endosomes Exceptionally at the cell surface	-LKHHHAGYEQF (at the C-terminal domain)	Lysosomal stability and integrity; chaperone-mediated autophagy Knockout mice with cardiomyopathy and myopathy resembling Danon disease Role in macroautophagy and lysosomal biogenesis Overlapping functions with LAMP-1
LIMP-1	CD63 ME491 AD1	30-50	4	3 N-glycans Poly-N-acetyl-lactosaminyl structures ~35% of molecular mass	Ubiquitous In lysosomes/late endosomes Exceptionally at the cell surface	-VKSIRSGYEVV (at the C-terminal domain)	Cell activation, mediator release, involvement in membrane fusion of secretory organelles
LIMP-2	LGP85 CD36L2	74-85	2	Up to 11 N-glycans ~20% of molecular mass	Ubiquitous In lysosomes/late endosomes Exceptionally at the cell surface	-RGQGSTDEGT ADERAPLIRT (at the C-terminal domain)	Involved in biogenesis and maintenance of endosomes/lysosomes; interacting with the vesicle fission/fusion machinery Knockout mice with urogenital tract obstruction, deafness and peripheral neuropathy

Tableau II : Principales protéines membranaires lysosomales (nomenclature, glycosylation, séquence signal, et propriétés).

3. Les protéines membranaires des lysosomes

3.1. Caractéristiques de la membrane des lysosomes

Un des rôles de la membrane lysosomale est de séparer les hydrolases acides des autres constituants cellulaires et ainsi de les protéger d'une dégradation non désirée. La composante lipidique de la membrane lysosomale est surtout riche en phospholipides (phosphatidylcholine, phosphatidylsérine, phosphatidyléthanolamine et phosphatidylinositol) (Holtzman, 1989). Dans les hépatocytes, ces membranes contiennent également de la sphingomyéline, une forte concentration de dolichols et de l'acide lyso-bisphosphatidique. De plus, des microdomaines riches en cholestérol et en glycosphingolipides, résistants aux détergents (DRM) ont été décrits (Kaushik and Cuervo, 2006; Taute et al., 2002). Des fonctions majeures de cet organite sont assurées par les protéines membranaires : l'acidification grâce aux pompes à protons, la translocation des acides aminés, des acides gras, des hydrates de carbone résultant de la dégradation hydrolytique et des nutriments libérés par des hydrolases lysosomales spécifiques. On pense également que des protéines membranaires des lysosomes sont impliquées dans la fusion homotypique lysosomale aussi bien que dans la fusion avec les membranes d'autres organites subcellulaires.

3.2. Description des protéines membranaires

(Pour des revues Eskelinen et al., 2003; Winchester, 2001)

3.2.1. Les glycoprotéines

Près de 50% des protéines de la membrane lysosomale sont des glycoprotéines contenant 15 à 20 chaînes oligosaccharidiques liées sur une asparagine, dont beaucoup sont terminées par des acides sialiques. Ces protéines sont appelées LAMPs (pour *lysosomal associated membrane proteins*), LIMPs (pour *lysosomal integral membrane proteins*) et LGPs (*lysosomal glycoproteins*) (Tableau II). On a pensé pendant longtemps que le rôle de ces protéines était simplement de former une barrière d'hydrates de carbone (appelée glycocalyx) qui permet de limiter l'action des hydrolases sur la membrane interne. Il est évident que le rôle de ces protéines dans la membrane lysosomale ou plasmique, où les LAMPs résident transitoirement, reste à éclaircir.

3.2.1.1. LAMP-1 et LAMP-2

LAMP-1 et LAMP-2 sont 2 protéines membranaires de type I dont l'extrémité N-terminale est dirigée vers la lumière du lysosome et qui traversent une seule fois la membrane (Fig.3 et 4). Le grand ectodomaine luminal est divisé en deux domaines homologues, séparés par une région riche en résidus proline, sérine et thréonine. Cette partie luminale est glycosylée par quelques O-glycans mais surtout par des N-glycans (de 16 à 20) dont la plupart sont du type poly-N-acétyllactosamine, ce qui explique le faible point isoélectrique des ces protéines (de 2 à 4) (Eskelinen et al., 2003). Cette glycosylation représente 60% de la masse totale des protéines, faisant de ces protéines les plus densément glycosylées connues à ce jour. La petite partie C-terminale forme une queue de 11 acides aminés dans le cytoplasme. Cette queue cytoplasmique contient le signal nécessaire pour l'adressage intracellulaire après la biosynthèse.

Malgré leur forte homologie de leur séquence primaire (37%), il y a plus de ressemblance entre deux LAMP-1 ou -2 d'espèces différentes que LAMP-1 comparé à

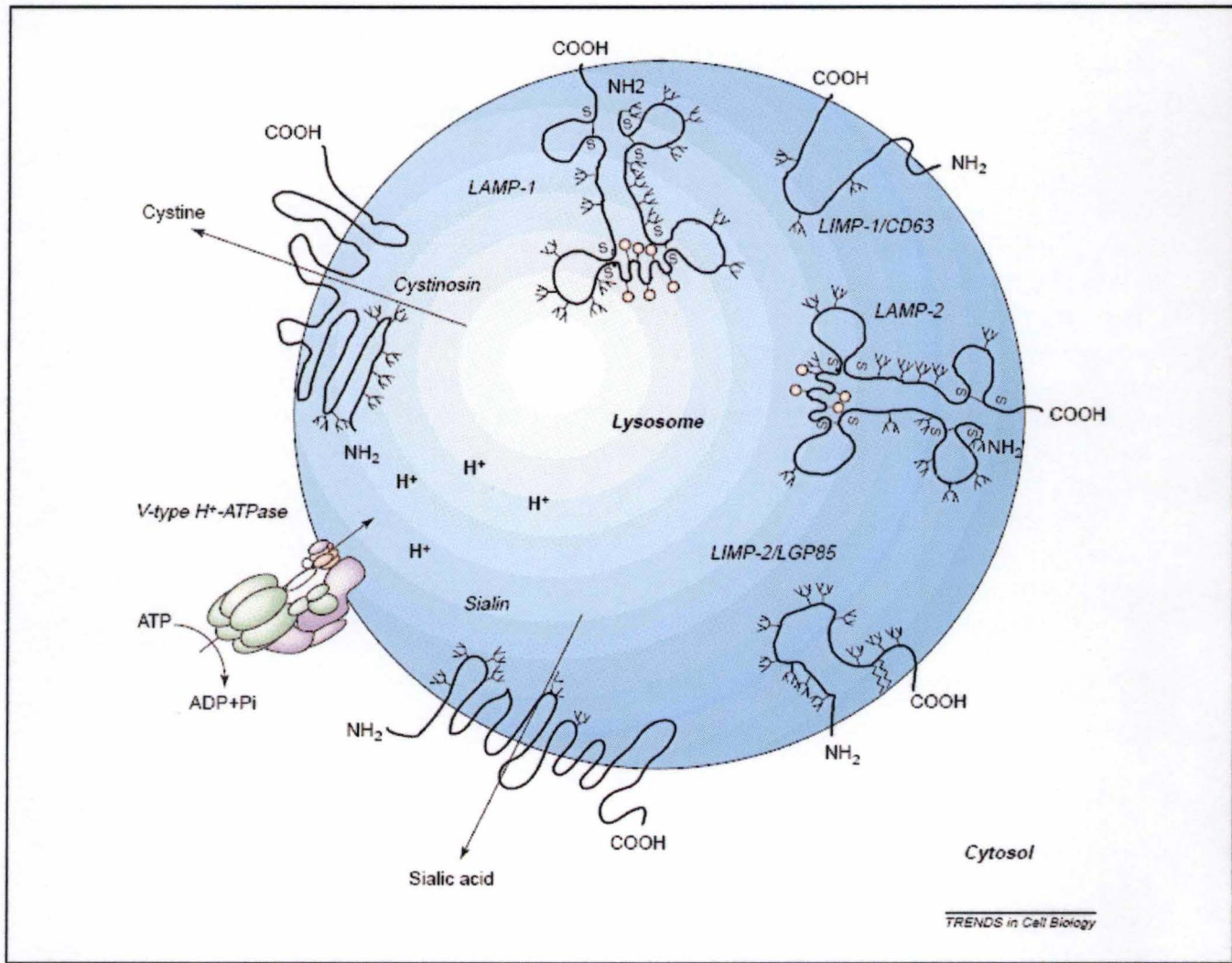


Fig.3 Représentation d'un lysosome avec ses principales protéines membranaires : LAMP-1, LAMP-2, LIMP-I et LIMP-II, les transporteurs sialine et la cystinosine ainsi que la pompe à protons H^+ -ATPase de type V.

LAMP-2 dans une même espèce. Cela suggère que les gènes de ces 2 protéines sont séparés très tôt dans l'évolution, avant la divergence des mammifères et des oiseaux.

Une forme soluble de LAMP-2 a été mise en évidence dans notre laboratoire dans des lysosomes purifiés à partir de foie de rat (Jadot et al., 1996). A un pH légèrement acide (en-dessous de pH 6), cette forme de LAMP-2 est capable de s'agréger de manière réversible avec des enzymes lysosomales. Le fait qu'une partie de LAMP-2 ne soit pas associée à la membrane pourrait être le fruit d'une désinsertion suite à un changement de conformation de la partie transmembranaire. Cela pourrait également être dû au clivage des régions transmembranaire et cytosolique (Jadot et al., 1997; Jadot et al., 1996).

Le gène de LAMP-2 subit des épissages alternatifs qui conduisent à au moins 3 isoformes : LAMP-2 A, B et C. Les différentes formes de LAMP-2 présentent une forte homologie dans leur séquence d'acides aminés pour la région luminale mais peu pour les régions transmembranaire et cytoplasmique. Leur distribution intracellulaire (membrane plasmique vs membrane lysosomale) et leur taux d'expression varient suivant les tissus (Eskelinen, 2006).

Selon Cuervo et Dice, l'abondance de LAMP-2A dans la membrane des lysosomes dépendrait de son turnover et de sa distribution dynamique entre la membrane et la lumière des lysosomes (Cuervo et al., 2003; Kaushik et al., 2006; Massey et al., 2006). Selon ces auteurs, à l'état basal, LAMP-2A se trouverait dans des microdomaines membranaires riches en cholestérol, en gangliosides GM-1 et en flotiline, appelés «*detergent resistant microdomains* ou DRM». Là, il serait clivé en 3 étapes: d'abord, il subirait le clivage de la queue cytoplasmique par une métalloprotéase membranaire non identifiée, suivi du clivage par la cathepsine A de la jonction entre les régions transmembranaire et luminale et enfin dégradation rapide par les hydrolases lumineuses (Cuervo et al., 2003; Massey et al., 2006). En période de jeûne, LAMP-2A serait délocalisé, entraînant ainsi une augmentation de son temps de demi-vie (Kaushik et al., 2006).

3.2.1.2. LIMP-I et LIMP-II

LIMP-I et LIMP-II sont des glycoprotéines membranaires de type III. Elles ne présentent pas d'homologie de séquence entre elles ni avec LAMP-1 et -2. LIMP-I (qui est également appelé LAMP-3 ou CD63) a une masse moléculaire de 30-50 kDa, le core peptidique contribue à environ 25 kDa et contient 4 domaines transmembranaires. Le grand domaine luminal comprend 3 sites de N-glycosylation qui peuvent être substitués par des structures poly-N-acétyllactosaminyles. LIMP-II a une masse moléculaire de 74 kDa. Elle traverse la membrane à deux reprises et possède 2 queues cytoplasmiques de 2 à 4 et de 20 à 21 acides aminés respectivement, du côté amino- et carboxy-terminal. La partie la plus importante de la protéine est localisée du côté luminal et contient 11 sites potentiels de N-glycosylation (Braulke, 1996) (Fig.3).

3.2.2. Les autres composants de la membrane lysosomale

A côté des glycoprotéines LAMPs et LIMPs qui représentent la majorité des protéines membranaires, on retrouve des protéines moins abondantes qui peuvent être exprimées dans des types cellulaires ou des tissus de manière spécifique (Bagshaw et al., 2005).

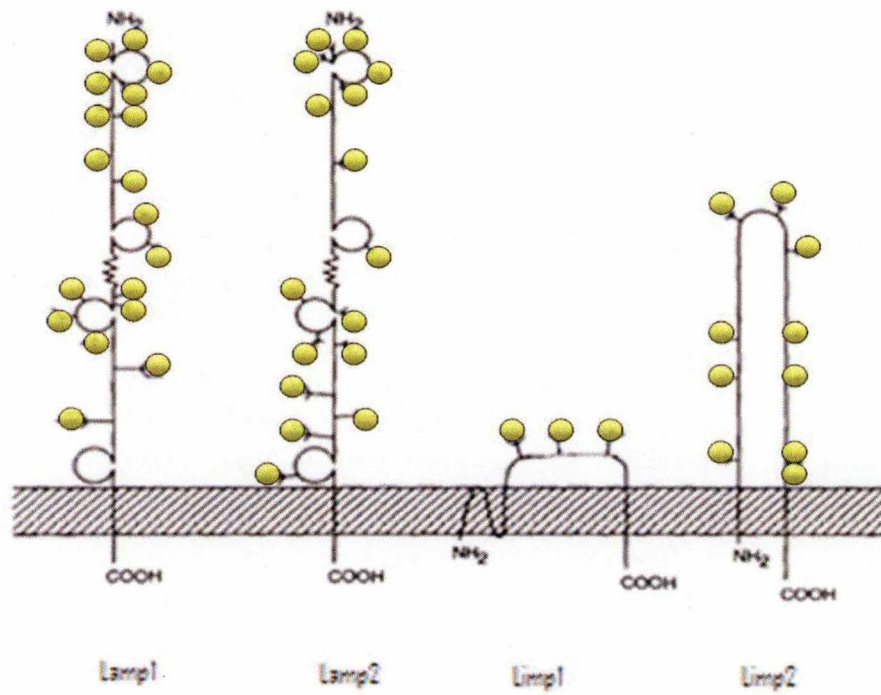


Fig.4 : Structure et orientation membranaire potentielles des glycoprotéines majeures de la membrane lysosomale

3.2.2.1. La pompe à protons

La pompe vacuolaire à protons V-type H⁺ ATPase est une protéine conservée tout au long de l'évolution. Elle utilise de l'énergie dérivée de l'hydrolyse de l'ATP pour permettre la translocation de protons. C'est un complexe transmembranaire d'au moins 13 sous-unités différentes qui est responsable de l'acidification de la lumière du lysosome. Huit de ces sous-unités forment une unité fonctionnelle localisée dans le cytosol et responsable de l'hydrolyse de l'ATP (Forgac, 1999).

3.2.2.2. Les transporteurs

Les molécules dégradées dans la lumière des lysosomes sont transloquées à travers la membrane lysosomale grâce à un nombre important de transporteurs. Un déficit en ces transporteurs est directement responsable de maladies de surcharge entraînant une accumulation de macromolécules concernées. Par exemple, un déficit en cystinosine (transporteur de la cystéine) ou en sialine (transporteur de l'acide sialique) provoque respectivement une cystinose ou la maladie de Salla. Les maladies de surcharge sont souvent des maladies neurodégénératives. Il existe des transporteurs impliqués dans le transport des acides aminés, des mono- et oligosaccharides et des oligopeptides. Leur existence a été mise en évidence par des expériences de capture mais la plupart d'entre eux n'ont pas encore été identifiés (Eskelinen et al., 2003).

3.2.2.3. p40

Une analyse protéomique réalisée sur des lysosomes de foie de rat, par l'équipe de J. Garin (CEA Grenoble, France) et notre laboratoire, a conduit à l'identification d'une nouvelle protéine membranaire lysosomale. Cette protéine appelée p40 a une masse moléculaire approximative de 33 kDa, ce qui lui a valu son nom (Boonen et al., 2006). Les analyses assistées par ordinateur révèlent que c'est probablement une protéine membranaire intégrale mais le nombre exact de domaines transmembranaires n'est pas clairement établi, il oscille entre 7 et 10, suivant les programmes de simulations utilisés. P40 possède 3 sites potentiels de N-glycosylation mais aucun d'entre eux ne semble être utilisé. Il pourrait s'agir d'un transporteur membranaire mais à ce jour, la nature du/des soluté(s) éventuellement transporté(s) par p40 est toujours inconnue.

3.3. Ciblage des protéines membranaires

La route par laquelle les glycoprotéines membranaires arrivent jusqu'aux lysosomes reste encore vivement débattue. Après translocation au niveau du réticulum endoplasmique, les LAMPs, les LIMPs traversent les citernes de l'appareil de Golgi où la majorité des chaînes oligosaccharidiques de type haut-mannose sont converties en types complexes. Cette étape a une cinétique comparable pour toutes les glycoprotéines. A partir du TGN, les glycoprotéines nouvellement synthétisées peuvent être transportées jusqu'aux lysosomes par deux voies distinctes, directement en passant par les endosomes ou indirectement après transport vers la membrane plasmique puis en empruntant la voie de l'endocytose (Akasaki et al., 1995; Cook et al., 2004; Hunziker and Geuze, 1996).

Il est bien établi que le transport des protéines de la membrane du lysosome n'emprunte pas la voie des MPRs. LAMP-1 et LAMP-2 conservent toutes deux dans leur extrémité carboxy-terminale un signal tyrosine de ciblage vers les lysosomes, G-Y-X-X-Φ, où

Φ correspond à Ile dans LAMP-1 et à Phe, Leu ou Val dans les différentes formes de LAMP-2. LIMP-I porte un résidu du côté C-terminal de 11 acides aminés dans lequel on retrouve le motif de sortie G-Y-X-X-M similaire à celui de LAMP-1 et -2. LIMP-II quant à lui ne possède pas le motif de ciblage caractéristique des autres glycoprotéines de membrane. A la place, le ciblage lysosomal de LIMP-II se fait via un signal di-leucine de type LI (Hunziker and Geuze, 1996).

Après leur transit à travers de l'appareil de Golgi, une grande partie des protéines membranaires lysosomales quittent le TGN par des vésicules recouvertes de clathrine dérivant de l'appareil de Golgi et suivent probablement le même cheminement que les protéines solubles lysosomales. Elles rejoindraient les lysosomes via les endosomes précoces ou tardifs sans passer par la surface de la cellule (Cook et al., 2004).

Les protéines membranaires lysosomales qui ne suivent pas cette route quittent le TGN via la voie de sécrétion constitutive, se retrouvent en surface et rejoignent les endosomes tardifs et les lysosomes par la voie de l'endocytose (Hunziker and Geuze, 1996). Il est également possible que, comme pour le précurseur de la phosphatase acide lysosomale ces protéines membranaires lysosomales atteignent d'abord les endosomes tardifs avant de se retrouver en surface sur la membrane plasmique. Auparavant, on considérait que les motifs G-Y-X-X- Φ étaient reconnus par le complexe de AP-1 et que cette dernière était la principale protéine responsable de la formation des CCVs et du transport des protéines membranaires LAMPs et LIMP-I (Honing et al., 1996). La délétion génétique de AP-1 démontre qu'il n'en est rien puisque celle-ci n'est pas accompagnée d'une diminution du transport de glycoprotéines jusqu'aux lysosomes (Meyer et al., 2000). Il semblerait plutôt que les LAMPs et LIMPs soient ciblées du TGN vers les endosomes grâce aux protéines AP-3. En effet, dans des fibroblastes de personnes atteintes du syndrome de Hermansky-Pudlak (qui présentent une diminution de l'expression de AP-3) et dans les souris mutantes pour AP-3, LAMP-1 est redirigé vers la surface cellulaire (Dell'Angelica et al., 1999; Le Borgne et al., 1998). De même, le transport de LIMP-II dépend probablement de AP-3 puisqu'il interagit avec AP-3 via son domaine LI, l'interaction étant modulée par des résidus acides situés en position -4 et -5 (Honing et al., 1998). Dans les cellules HeLa, la sous-unité μ 4 de AP-4 interagit avec le motif tyrosine de protéines cargos comme LAMP-2 et pourrait également médier leur transport vers les lysosomes sans passer par la membrane plasmique (Aguilar et al., 2001).

3.4. Rôles des protéines LAMPs et LIMPs

Malgré de sérieuses avancées, le rôle exact des protéines LAMPs est encore inconnu. Il était communément admis que la fonction principale de ces protéines hautement glycosylées était surtout de protéger la membrane de la dégradation par le contenu luminal. Elles sont tellement abondantes et glycosylées qu'elles formeraient une couche continue sur la surface interne de la membrane. Leur rôle ne se limite pas à cela puisqu'on retrouve des protéines LAMPs ailleurs que dans la membrane des compartiments lysosomaux, par exemple à la surface de plaquettes activées, de granulocytes différenciés, de lymphocytes T cytotoxiques ou des cellules tumorales. A la surface cellulaire, les LAMPs pourraient intervenir dans des phénomènes d'adhésion intercellulaire ou entre les cellules et la matrice extracellulaire (Andrejewski et al., 1999; Lichter-Konecki et al., 1999). Depuis quelques années, des souris Knock-out pour LAMP-1 et LAMP-2 ont été créées, permettant de lever une partie du voile concernant leurs fonctions réelles.

3.4.1. Rôle de LAMP-1

Les souris déficientes uniquement en LAMP-1 sont viables et fertiles. A part une astrogliose et une immunoréactivité à la cathepsine D dans le cerveau, tous les tissus de ces souris sont normaux. Les propriétés lysosomales incluant l'activité enzymatique, le pH, la stabilité osmotique, la densité, la morphologie, le processing des enzymes lysosomales et la distribution subcellulaire sont inchangées. Une augmentation de l'expression de LAMP-2 est cependant observée dans les reins, le cœur et la rate. Cette augmentation a lieu au niveau de la traduction et semble compenser le déficit en LAMP-1. Le niveau des autres protéines membranaires (notamment des LIMPs) n'est pas affecté (Andrejewski et al., 1999; Eskelinen et al., 2004).

3.4.2. Rôle de LAMP-2 dans la biogenèse des lysosomes et dans l'autophagie

Par opposition à ces symptômes plutôt légers, la déficience en LAMP-2, a des effets plus sévères : 50 % des souris meurent entre le 20^e et le 40^e jour *post partum* (Tanaka et al., 2000). Ces souris sont caractérisées par une accumulation massive de vacuoles autophagiques dans plusieurs tissus comme le foie, le rein, le pancréas, la rate, le cœur, les muscles squelettiques, les capillaires endothéliaux, les nœuds lymphatiques, la paroi intestinale et les neutrophiles.

L'autophagie joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Elle est responsable du turnover en continu de composants cellulaires, allant de simples macromolécules (comme les protéines, les lipides, les acides nucléiques) jusqu'à des organites entiers. Même si elle est toujours active à un niveau basal, l'autophagie atteint son activité maximale en condition de stress cellulaire, comme par exemple, une privation de sérum. Elle intervient dans des rôles défensifs, en protégeant la cellule de blessures biologiques, physiques ou chimiques. Elle est également essentielle pour la morphogenèse, le remodelage des tissus et la différenciation cellulaire. Il existe plusieurs types d'autophagie : la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par des chaperonnes (CMA) (Massey et al., 2004). Dans la macro- et la microautophagie, des portions du cytosol comprenant des protéines solubles mais également des organites entiers sont encerclés par une membrane et détruites par des enzymes lysosomales. Pour la macroautophagie, une membrane entoure la région du cytosol qui doit être détruite et forme un autophagosome. L'origine de la double membrane des autophagosomes n'est pas encore tout à fait claire mais il semblerait qu'elle provienne d'une région du réticulum endoplasmique dépourvue de ribosomes. Les autophagosomes immatures perdent rapidement leur membrane interne et acquièrent un pH acide ainsi que des enzymes hydrolytiques et des protéines membranaires lysosomales en fusionnant avec des lysosomes. La vésicule, appelée alors autophagolysosome dégrade rapidement son contenu. Pour la microautophagie, la membrane du lysosome elle-même séquestre la région du cytosol à dégrader. Les substrats sont donc « internalisés » dans des vésicules à membrane unique. Quand cette membrane est dégradée, les enzymes lysosomales ont accès au contenu de la vésicule et peuvent alors remplir leur rôle de dégradation.

Les hépatocytes en cultures primaires de souris déficientes en LAMP-2 présentent une accumulation de vacuoles autophagiques dans le cytosol (Tanaka et al., 2000). De plus, la dégradation des protéines de longue durée de vie n'est pas activée lors d'une privation de sérum comme c'est le cas dans les cultures d'hépatocytes sauvages. Cela sous-entend une implication de LAMP-2 dans les processus qui permettent aux phagosomes d'obtenir les hydrolases acides, c'est-à-dire les phénomènes de fusion entre les vacuoles autophagiques et les compartiments endo-lysosomaux (Tanaka et al., 2000). Par la suite, des analyses

biochimiques de ces cellules ont montré une hypersécrétion de la cathepsine D néosynthétisée et une diminution importante de l'abondance des récepteurs CD-MPR (et dans une moindre mesure du CI-MPR) dans la région du Golgi et des endosomes (Eskelinen et al., 2002). En revanche, les récepteurs MPRs étaient plus abondants dans les vacuoles d'autophagie, ce qui suggère que la déficience en LAMP-2 entraîne directement ou indirectement un défaut dans le recyclage des récepteurs CD-MPR. Celui-ci pourrait expliquer le défaut partiel de l'adressage de certaines enzymes lysosomales et le ralentissement de la dégradation des protéines de longue durée de vie observé précédemment (Tanaka et al., 2000). Par conséquent, l'accumulation des vacuoles d'autophagie dans les souris LAMP-2^{-/-} pourrait résulter d'un problème dans la biogenèse des lysosomes (Eskelinen et al., 2002). Selon ces auteurs, les protéines LAMP-2 sont peut-être nécessaires à la ségrégation des récepteurs CD-MPR à l'intérieur des endosomes ou au mécanisme de rétention des récepteurs existant dans les endosomes et les empêchant d'atteindre les lysosomes.

Les souris qui sont à la fois déficientes en LAMP-1 et en LAMP-2 (double KO) ne sont pas viables (Eskelinen et al., 2004). Curieusement, les cellules fibroblastiques embryonnaires (ou MEFs) contiennent malgré tout des lysosomes capables d'accueillir des marqueurs de l'endocytose fluide et de les dégrader. Cela s'explique probablement par le fait que d'autres protéines membranaires lysosomales, telles que LIMP-I et LIMP-II sont capables d'assurer les fonctions protectrices contre les hydrolases lysosomales. Les lysosomes qui proviennent des cellules MEFs des souris double KO sont cependant plus grands, moins denses et contiennent plus de cholestérol non estérifié dans leur membrane que les lysosomes de fibroblastes normaux. Ce phénotype rappelle celui des fibroblastes de patients atteints de la maladie de Niemann-Pick, une maladie de surcharge lysosomale résultant de la mutation des protéines NPC1 et NPC2. La distribution de ces lysosomes change également, on les retrouve plus en périphérie, ce qui pourrait s'expliquer par une surabondance et à un mauvais fonctionnement de la petite GTPase Rab7, résultant de l'accumulation de cholestérol dans les membranes des endolysosomes (Eskelinen et al., 2004).

Enfin, les travaux de Cuervo et Dice suggèrent que LAMP-2A intervient comme récepteur dans l'autophagie médiée par les chaperonnes, où seules des protéines du cytosol sont ciblées et transloquées une à une dans la lumière des lysosomes afin d'y être détruites en composants de base (Cuervo and Dice, 1996). Tous les substrats de cette dernière voie présentent un signal composé d'une série de 5 acides aminés correspondant à la séquence KFERQ. Ce signal permettrait la reconnaissance par une protéine chaperonne, Hsc70, membre constitutif de la famille des Hsp70. A l'aide d'une cochaperonne, Hsc70 rendrait à la protéine-substrat sa conformation native, ce qui permettrait au substrat d'interagir directement avec la queue cytoplasmique de LAMP-2A. Cette liaison spécifique se ferait grâce à un groupe de résidus positifs absents de la queue cytoplasmique des autres isoformes de LAMP-2, ce qui résulterait dans l'internalisation de la cible uniquement, sans les protéines chaperonnes. Le mécanisme de translocation n'est pas encore élucidé mais il semblerait qu'une chaperonne résidente de la lumière du lysosome (lys-Hsc70) soit nécessaire à la translocation complète du substrat. La liaison de protéines substrats à LAMP-2A serait l'étape limitante de la dégradation et il y aurait une corrélation directe entre le taux d'expression de LAMP-2A sur la membrane lysosomale et le taux d'autophagie médiée par des chaperonnes (Cuervo and Dice, 2000). Toutefois, le taux normal de dégradation des protéines de longue durée de vie dans les fibroblastes doublement déficients en LAMP-1 et -2 va à l'encontre de ce rôle de LAMP-2 (Eskelinen et al., 2004).

Chez l'homme, l'importance physiologique de LAMP-2 est soulignée par le fait que la déficience en cette protéine conduit à la maladie de Danon (Nishino et al., 2000). La maladie de Danon est une maladie de surcharge lysosomale dans laquelle des vacuoles intracytoplasmiques contenant du matériel autophagique et du glycogène s'accumulent dans les muscles squelettiques et cardiaques. Cliniquement, la maladie de Danon est caractérisée par une cardiomyopathie, une myopathie (atrophie des tissus musculaires) et éventuellement un retard mental. Cette maladie est due à un défaut de synthèse des protéines LAMP-2 et plus particulièrement de l'isoforme LAMP-2B dont l'ARNm est plus abondant dans le cœur, les muscles squelettiques et le cerveau (Nishino et al., 2000). La plupart des mutations identifiées jusqu'à présent sont responsables de la synthèse de protéines tronquées résultant dans la perte des domaines transmembranaire et cytoplasmique de LAMP-2B, d'où l'incapacité du produit muté à jouer son rôle de protéine structurelle de la membrane lysosomale (Nishino, 2006).

3.4.3. Intervention des LAMPs dans la biogenèse des phagosomes

La phagocytose est une composante essentielle de la réponse immunitaire innée. Au cours du processus de maturation des phagosomes, les vacuoles phagocytaires acquièrent leurs propriétés de dégradation et microbicides en interagissant avec les membranes endosomales. Rab7, une petite protéine de liaison au GTP impliquée dans la voie de l'endocytose et la biogenèse des lysosomes, forme un complexe avec RILP et permet aux phagosomes de recruter la dynéine et la dynactine, nécessaires à la motilité des phagosomes le long des microtubules jusqu'à la région juxta-nucléaire où se trouvent les lysosomes. L'étape culminante de ce processus est la fusion des phagosomes avec les lysosomes créant un organite hybride enrichi en enzymes hydrolytiques, en dérivés actifs de l'oxygène et en peptides antimicrobiens.

D'après une étude réalisée sur des fibroblastes de souris KO pour LAMP-1 ou pour LAMP-2 ou KO pour les 2 en même temps, il s'avère que les LAMPs sont essentielles pour une maturation complète des phagosomes. La perte des 2 LAMPs inhibe de manière marquée la fusion des phagosomes avec les lysosomes, empêchant la biogenèse des phagolysosomes (Huynh et al., 2007). De plus, il semble que la déplétion des LAMPs empêche Rab7 d'être correctement délivrée, indiquant que l'association de Rab7 avec des phagosomes est elle-même « LAMP-dépendante ». Cela implique que Rab7 et les protéines LAMPs agissent de concert pour diriger la maturation des vacuoles. Cependant, la manière dont les LAMPs sont physiquement liées au réseau microtubulaire reste encore obscure. La queue cytoplasmique C-terminale de LAMP-2 qui n'expose que 11 acides aminés pourrait interagir avec des protéines cytoplasmiques. L'interaction pourrait également impliquer la région transmembranaire des LAMPs (Huynh et al., 2007).

3.4.4. Rôle de LIMP-II dans la biogenèse et le maintien de la morphologie des lysosomes

Une surexpression de LIMP-II engendre un élargissement des endosomes précoces et tardifs formant de grandes vésicules ayant des caractéristiques à la fois des endosomes et des lysosomes. La formation de ces vacuoles pourrait résulter d'une augmentation des phénomènes de fusion homotypique des endosomes et des fusions ultérieures avec les lysosomes. Cela pourrait provenir également d'un problème d'invagination de la membrane lors du phénomène de fission. Il est aussi concevable que la formation de larges vacuoles soit due à une augmentation de la biogenèse de la membrane limitante qui pourrait être induite par une surexpression de LIMP-II (Kuronita et al., 2002).

Des souris KO en LIMP-II ont été créées. Ces souris sont viables et fertiles. Cependant elles présentent les symptômes suivants : une obstruction de la jonction ureteropelvienne, une surdité résultant d'une dégénérescence de la *stria vascularis* et une neuropathie périphérique résultant d'une démyélinisation des nerfs (Gamp et al., 2003). La démyélinisation des nerfs périphériques dans ces souris LIMP-II^{-/-} est associée à une *upregulation* des enzymes lysosomales et à une *down-regulation* concomitante de la myéline périphérique. Il reste à déterminer si la diminution d'abondance des protéines myéliniques périphériques est due à un adressage inapproprié et à leur dégradation dans le compartiment lysosomal. Quoiqu'il en soit, ces observations indiquent de façon inattendue que LIMP-II joue un rôle dans la régulation des protéines myéliniques (Gamp et al., 2003). On observe également chez ces souris, une accumulation de structures vésiculaires remplies de matériel flocculant, d'inclusions allongées limitées par une membrane, des mitochondries et des citernes dilatées provenant du RE, à l'intérieur des cellules superficielles de l'urothélium. Cela met en évidence une perturbation au niveau du transport vésiculaire et de la biogenèse des lysosomes (Gamp et al., 2003).

Enfin, il semble également que LIMP-II soit exprimé dans les disques intercalaires des myocytes cardiaques, qui sont composés de jonctions *gap*, de jonctions adhérentes et de desmosomes. LIMP-II jouerait un rôle critique dans le développement d'une hypertrophie des myocytes en réponse à une hausse de la pression cardiaque en s'associant à la N-cadhérine, une protéine cruciale dans les jonctions adhérentes (Schroen et al., 2007).

4. Biogenèse des lysosomes

(Pour des revues, voir Luzio et al., 2003; Mullins and Bonifacino, 2001; Storrie and Desjardins, 1996)

La première hypothèse proposée pour expliquer l'origine des lysosomes est celle du « bourgeonnement » faite par de Duve et son équipe. Dans cette hypothèse, par analogie avec les granules de sécrétion, les lysosomes se forment par bourgeonnement à partir du Golgi en tant qu'organites complets mais de taille réduite. Ces vésicules, appelées lysosomes primaires se développent ensuite en lysosomes secondaires, capables de fusionner avec des endosomes pour former un compartiment hybride, appelé endolysosome (De Duve and Wattiaux, 1966). Par la suite, d'autres hypothèses ont été postulées. Toutes proposent que les lysosomes proviennent d'endosomes par différents processus de maturation, de transport vésiculaire ou de fusion/fission.

D'après le modèle de la maturation, les endosomes précoces sont formés par la fusion de vésicules provenant de la membrane plasmique. L'addition de vésicules provenant du TGN et la disparition des vésicules de recyclage transforment les endosomes précoces d'abord en endosomes tardifs puis en lysosomes (Futter et al., 1996).

Le modèle du transport vésiculaire avance que, les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les lysosomes sont tous des compartiments stables. Le transport s'effectuerait des endosomes précoces vers les endosomes tardifs puis vers les lysosomes matures (ou bien directement des endosomes précoces vers les lysosomes matures) par des vésicules de transport, appelée ECV (*endosomal carrier vesicles*) qui bourgeonneraient des endosomes précoces. Une fois formées, ces vésicules seraient ciblées par des petites GTPases cytoplasmiques de la famille des Rab. Les protéines Rab assurent cette fonction aussi bien au niveau du transport vésiculaire qu'au niveau de l'ancrage et de la fusion des vésicules (Gruenberg, 2001).

Il se pourrait également que les endosomes tardifs et les lysosomes subissent en continu des phénomènes de fusion et de fission éphémères de type « *kiss and run* » tels que ceux décrits pour la formation des phagolysosomes. Cela permettrait aux lysosomes d'acquérir en même temps les molécules néosynthétisées nécessaires à leur fonctionnement et le matériel provenant des voies de l'endocytose, phagocytose et autophagie (Storrie and Desjardins, 1996).

L'hypothèse émise par Luzio implique la fusion directe et complète, entre les endosomes et les lysosomes, suivie de la reformation ultérieure d'un lysosome pour une réutilisation. Les lysosomes joueraient dans ce cas le rôle de lieu de stockage pour enzymes lysosomales matures. Périodiquement, les lysosomes fusionneraient avec les endosomes pour former un organite hybride appelé « estomac cellulaire » dans lequel se déroulerait la dégradation proprement dite (Luzio et al., 2000). La recondensation des lysosomes à partir de ces compartiments hybrides nécessiterait de l'ATP, du calcium et une H⁺-ATPase fonctionnelle.

5. Objectifs du mémoire

Les précurseurs d'enzymes lysosomales solubles subissent une modification de leurs chaînes oligosaccharidiques sur lesquelles apparaissent des résidus mannose 6-phosphate. Elles peuvent ainsi être guidées vers des structures endosomales tardives grâce à l'interaction des précurseurs avec des récepteurs spécifiques (MPRs). Si l'intervention des MPRs n'est plus contestée, la dernière étape du transport biosynthétique, permettant l'accès des hydrolases aux lysosomes et souvent aussi, leur maturation terminale est nettement moins bien comprise. Il existe par ailleurs des données expérimentales indiquant l'existence de mécanismes de transport des protéines lysosomales qui ne dépendent pas de l'intervention des MPRs. Leur mécanisme reste à découvrir.

Nos travaux antérieurs ont étudié les propriétés d'agrégation de protéines lysosomales, et démontré la formation, aux pH légèrement acides, proches du pH intralysosomal, d'assemblages supramoléculaires de nature lipo-protéique impliquant de nombreuses hydrolases lysosomales solubles mais aussi la participation d'une protéine de membrane: LAMP-2. Ces observations sont à la base de l'hypothèse selon laquelle il existerait un lien entre l'organisation du contenu lysosomal et la biosynthèse (transport et/ou maturation) des protéines précurseur. Le rôle que pourrait avoir l'agrégation de précurseurs protéiques dans un mécanisme de transport a été particulièrement bien étudié dans le cas de protéines sécrétées. Plusieurs études ont en effet montré que la formation d'agrégats dans les conditions régnant dans le TGN (acidité, concentration en Ca^{++}) est à la base de la sélectivité du mécanisme permettant à certaines protéines de rejoindre les granules de sécrétion régulée plutôt que de suivre la voie constitutive (Chanat and Huttner, 1991).

Tenant compte de la possible agrégation du domaine luminal de la protéine LAMP-2 avec les futures protéines lysosomales, et de la présence d'un motif d'adressage dans la queue cytoplasmique de cette protéine transmembranaire, nous avons voulu poser la question de la possible participation de LAMP-2 dans le transport biosynthétique des protéines lysosomales solubles. Cette hypothèse nous a semblé d'autant plus crédible que le phénotype de souris dépourvues de LAMP-2 démontre la participation de cette protéine à la transformation d'autophagosomes en lysosomes (Eskelinen et al., 2002; Tanaka et al., 2000).

Parmi plusieurs stratégies expérimentales envisageables, nous avons choisi, par opportunisme, de faire usage d'une forme moléculaire tronquée de LAMP-2, dépourvue de son segment transmembranaire et de sa queue cytoplasmique (LAMP-2 Δ TM), disponible dans le laboratoire. Nous avons produit des lignées stables de cellules HepG2 exprimant cette forme "soluble" de LAMP-2, et nous avons tenté de déceler sa participation au trafic des protéines lysosomales solubles en analysant l'impact de cette transfection sur le sécrétome des cellules HepG2, analysé par la technique "2D-DIGE".

Matériel et méthodes

II. Matériel et Méthodes

1. Culture cellulaire de HepG2

Des cellules HepG2, provenant de la firme ATCC (*American Type Culture Collection, USA*) ont été cultivées à 37°C dans des boîtes de 75 cm² (Greiner Bio-One) dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ dans de l'air humide. Le milieu de culture DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Lonza*) enrichi avec du sérum de veau fœtal (10%) (Greiner Bio-One) de la pénicilline (100 U/ml) et de la streptomycine (100 µg/ml) (Lonza, Verviers) était changé tous les deux jours. Lorsque les cellules atteignaient environ 80% de confluence, elles étaient « repiquées » de la manière suivante. Les cellules étaient d'abord lavées avec 10 ml de HBSS (*Hank's Balanced Solution, Lonza*) puis avec 3 ml de Trypsine/EDTA (trypsine 0,5 g/l et EDTA 0,2 g/l, Lonza). Pour que les cellules se détachent plus rapidement de la boîte, on les incubait à 37°C pendant quelques minutes en présence de 1,5 ml de trypsine/EDTA. Enfin, les cellules étaient resuspendues dans un volume final de 10 ml de DMEM grâce à 30 passages dans une pipette stérile de 10 ml etensemencées dans des nouvelles boîtes avec une dilution 1/3 ou 1/6 suivant les besoins.

2. Transfection des cellules

Il s'agit d'introduire dans des cellules, un plasmide contenant la séquence codante d'un gène d'intérêt afin que la protéine soit exprimée de façon transitoire ou stable. L'expression stable nécessite l'insertion de la séquence d'ADN dans le génome de la cellule hôte.

2.1. Transfections transitoires

Les cellules ont été transfectées avec un plasmide pcDNA 3.1 (*Invitrogen*) contenant la séquence codante de la forme sauvage (WT) de LAMP-2 de rat ou d'une forme tronquée (Δ TM) de cette même protéine. Des cellules ont également été transfectées avec le vecteur vide (pcDNA 3.1) pour servir de contrôle négatif. Deux approches ont été suivies pour transfecter les cellules HepG2 : la précipitation au phosphate de calcium et l'utilisation de lipides cationiques (FuGENE 6, Roche). Dans les deux cas, les cellules ont été utilisées à 30-50 % de confluence. La première approche consiste à déposer goutte à goutte un mélange formé de 62,5 µl de CaCl₂ 0,25 M et de 1,25 µg de plasmide dans 62,5 µl de tampon HEBS 2x (Tampon HEPES 50 mM pH 7,05, NaCl 140 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM) et d'incuber le tube pendant 1 h à T° ambiante. Ensuite, il faut aspirer le milieu de culture qui se trouve sur le tapis cellulaire et ajouter 1,25 ml de milieu sans sérum puis goutte à goutte les 125 µl de mixture ADN/Calcium/HEBS. Après 4h d'incubation à 37°C dans l'incubateur à CO₂, 625 µl de milieu contenant du DMSO 10% sont ajoutés. 7 min plus tard, le tapis cellulaire est lavé 3 fois avec du milieu et 2 ml de milieu complet (contenant du sérum 10% et des antibiotiques) sont ajoutés pour une période de 48h. La deuxième méthode consiste à mélanger 1 µg d'ADN plasmidique avec 4 µl de FuGENE 6 (ratio 1:4) dans 100 µl de milieu de culture sans sérum. Après une incubation de 15 min à température ambiante, la mixture ADN:FuGENE est dispensée goutte à goutte sur le tapis cellulaire sur lequel 2 ml de milieu complet ont été ajoutés au préalable. Dans les 2 cas, les volumes et concentrations donnés ici s'appliquent à une plaque multipuits de 6 puits (CellStar, Greiner Bio-One). Pour les Pétris de 100 mm de diamètre, ils doivent être adaptés, proportionnellement à la surface.

2.2. Obtention de lignées clonales stables

Lors d'une transfection transitoire, seule une partie de la population cellulaire exprime la protéine d'intérêt. De plus, il arrive que certaines cellules surexpriment la protéine à un niveau tellement élevé que celle-ci ne se comporte pas de la même manière qu'une protéine équivalente, exprimée naturellement. De plus, pour obtenir une bonne reproductibilité d'une expérience à l'autre, il est vivement conseillé de préparer des lignées clonales stables.

Étant donné que le plasmide pcDNA 3.1 possède un gène de résistance à la néomycine, après la transfection avec le FuGENE 6, nous avons sélectionné les cellules ayant incorporé le plasmide grâce à un traitement de 3 semaines avec du G418 (800 µg/ml), un antibiotique de la famille des néomycines. Dans ces conditions, les cellules non transfectées se détachent et meurent dans le milieu alors que les cellules qui ont incorporé le gène de résistance restent accrochées et sont capables de proliférer. Afin d'obtenir des clones stables, nous avons effectué des dilutions limites (de 10 en 10) dans des plaques 96 puits (CellStar, Greiner Bio-One). Après quelques jours, nous avons sélectionné les puits où il n'y avait qu'une seule cellule. Nous avons stimulé la prolifération des cellules HepG2 en utilisant du milieu conditionné, tout en passant graduellement à des surfaces de culture de plus en plus grandes. Le milieu conditionné comprend 50 % de milieu frais contenant les nutriments et 50 % de milieu provenant de cultures de cellules HepG2 non transfectées et par conséquent, enrichi en facteurs de croissance sécrétés par les cellules contrôles. Nous avons sélectionné les clones de LAMP-2 WT et ΔTM sur base des résultats obtenus par Western blot avec l'anticorps 10D10 (voir plus loin).

3. Traitement des cellules et collecte des milieux de culture

Lorsque des cellules ensemencées dans des Pétris de 10 mm de diamètre arrivaient à environ 80 % de confluence, elles étaient rincées 3 fois avec 10 ml de PBS stérile (KH₂PO₄ 1,06 mM Na₂HPO₄ 3 mM et NaCl 154 mM) et remises dans l'incubateur à CO₂ durant 24h, en présence de 10 ml de DMEM dépourvu de sérum ou contenant 1 % de sérum.

A la fin de l'incubation, les milieux de culture étaient collectés et centrifugés à 1.000 RPM pendant 10 min afin de sédimenter les débris cellulaires éventuels. Le surnageant était récupéré dans un tube en polypropylène de 50 ml (type Falcon) et additionné d'une pastille d'inhibiteurs de protéases (Mini-Complete, Roche). Les milieux ainsi traités étaient conservés à -70°C en attente des expériences ultérieures.

4. Electrophorèse sur gels de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

Dans une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, le SDS dénature les protéines en leur donnant une même densité de charges négatives. Par conséquent, lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique, les protéines contenues dans un échantillon donné sont séparées uniquement en fonction de leur poids moléculaire. Le gel se compose de deux parties de concentrations en acrylamide différentes : d'une part, le gel d'empilement où sont déposés les échantillons et qui permet de concentrer les protéines sur une même « ligne » et d'autre part, le gel de séparation permettant la séparation de ces protéines. En augmentant la concentration en acrylamide/bisacrylamide du gel de séparation, le réseau de maille formé par l'acrylamide polymérisé est plus étroit, permettant une meilleure séparation des protéines de faible poids moléculaire.

Concrètement, les échantillons ont été préparés dans du tampon de solubilisation, contenant du Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, du glycérol 50 % (pour lester les échantillons lors du chargement), du SDS 2 % et du DTT 100 mM (pour réduire les ponts disulfures). Avant d'être déposés dans le fond des puits, les échantillons ont été chauffés 5 min à 95°C. Parallèlement aux échantillons, des étalons de poids moléculaire connu (ProSieve, Lonza) ont été chargés sur les gels dont la composition est reprise dans les tableaux ci-dessous. La migration se fait dans un tampon Tris 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1 %. Les protéines sont visualisées soit par coloration au bleu de Coomassie soit par Western Blot (voir plus loin).

Tampon de solubilisation 5x	Tris-HCl pH 6.8	0,312 M
	Bleu de Bromophénol	0,05 %
	Glycérol	50 %
	SDS	10 %
	DTT	0,5 M

Gel de séparation

Gel 8%		
Solutions stocks	15 ml	[] finale
H ₂ O	7,9 ml	
Acrylamide/bisacrylamide 30%	4 ml	8%
Tris-HCl 2M pH 8,8	2,8 ml	0,37 M
SDS 10 %	150 µl	1%
APS 10 %	150 µl	1%
TEMED	12 µl	0,8%

Gel d'empilement

Gel 5%		
Solutions stocks	5 ml	[] finale
H ₂ O	2,8 ml	
Acrylamide/bisacrylamide 30%	0,83 ml	5%
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	1,25 ml	0,125 M
SDS 10 %	50 µl	1%
APS 10 %	50 µl	1%
TEMED	5 µl	0,10%

5. Western Blot

Cette technique permet de détecter la présence d'une protéine d'intérêt dans un échantillon, grâce à la reconnaissance spécifique de cette protéine par un anticorps primaire. Cet anticorps est ensuite reconnu par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (Horseradish Peroxidase ou HRP) et détecté par la technique de chemiluminescence. Elle implique *primo* une séparation des protéines par électrophorèse et *secundo* un transfert des protéines sur une membrane PVDF (pour *PolyVinylidene DiFluoride*) pour permettre l'exposition des sites antigéniques.

En pratique, après l'électrophorèse, les gels ont été mis en contact étroit avec la membrane de PVDF dans un « sandwich » composé de chaque côté de quatre papiers de type Whatman et d'une éponge, imbibés d'une solution de transfert (Tris 25 mM, glycine 192 mM et méthanol 20 %). Le transfert a été effectué dans une cuve en appliquant un courant électrique de 400 mA durant une heure. Les sites non-spécifiques ont ensuite été bloqués dans une solution saturante de PBS-Tween 20 0,1% comprenant 2 % de poudre ECL *Advance*TM (GE Healthcare). Enfin, les membranes ont été incubées toute la nuit à 4°C en présence d'un anticorps primaire dilué dans de la solution saturante. Au cours de ce travail, 5 anticorps primaires ont été utilisés :

- l'anticorps 10D10, anticorps monoclonal de souris provenant d'un surnageant d'hybridome. Cet anticorps, produit dans notre laboratoire, reconnaît spécifiquement LAMP-2 de rat (Jadot et al., 1996 ; Jadot et al., 1997) ;

- un anticorps monoclonal de souris anti-Cathepsine B (Calbiochem) dilution 1/400 ou 1/1000 ;
- un anticorps polyclonal de lapin anti-Cathepsine D (DakoCytomation) dilution 1/700 ;
- des anticorps monoclonaux de souris anti-LAMP-1 et anti-LAMP-2 humains (Developmental Hybridoma Bank, University of Iowa)

Le lendemain matin, les membranes ont été lavées dans des solutions de PBS-Tween 20 0,1%, et incubées pendant 1h avec un anticorps secondaire de chèvre (soit anti-souris, soit anti-lapin, suivant l'anticorps primaire utilisé) couplé à HRP (DakoCytomation). Les complexes antigènes-anticorps-HRP ont été révélés grâce à un kit de chemiluminescence (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, Perkin Elmer). L'HRP réduit l' H_2O_2 en H_2O et $1/2 O_2$ et l' O_2 oxyde le luminol. Il en résulte une émission de lumière que l'on peut capturer sur des films autoradiographiques de type HyperFilm ECL (GE Healthcare).

6. Immunofluorescence

Cette technique permet de visualiser et de localiser des protéines au sein d'une cellule grâce à un système de reconnaissance par un anticorps primaire, lui-même reconnu par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome.

Dans nos expériences d'immunofluorescence, des cellules HepG2 ont été ensemencées sur des lamelles de 15 mm de diamètre passées à l'alcool. Une fois que les cellules ont adhéré à la surface et atteint un niveau de confluence de l'ordre de 50%, elles ont été rincées à trois reprises avec 2 ml de PBS stérile puis incubées pendant 24h dans du DMEM avec ou sans sérum. Après incubation, les cellules ont été lavées avec du dPBS (PBS avec $CaCl_2$ 1mM et $MgCl_2$ 0,5mM) puis fixées et perméabilisées avec du méthanol glacé pendant 5 min puis avec de l'acétone 80% glacé pendant 2 min. Les cellules ont ensuite été mises en présence d'une solution de PBS-BSA 1% pendant 30 min à T° ambiante afin de saturer les sites non spécifiques. Les lamelles ont ensuite été incubées avec un anticorps primaire pendant 2h à T° ambiante dans une chambre humide. Pour nos expériences, nous avons utilisé les anticorps suivants : l'anticorps anti-LAMP-2 de rat (10D10, dilution 1/2), l'anticorps anti-LAMP-2 humain (H4B4, dilution 1/200) et l'anticorps anti-LAMP-1 humain (H4A3, dilution 1/200). L'anticorps secondaire utilisé est un anticorps de chèvre anti-souris couplé au fluorochrome ALEXA 488 (dilution 1/500). Après 1h d'incubation à T° ambiante et à l'abri de la lumière, nous avons procédé au marquage des noyaux avec du TO-PRO-3. Pour cela, les lamelles ont été incubées pendant 30 min dans 20 μ l de TO-PRO-3, dilué 50 fois dans du tampon PBS contenant de la RNase (2 mg/ml). 3 lavages au dPBS ont été effectués entre chaque étape. Finalement, les lamelles ont été montées sur des lames avec du MOWIOL 4-88 (Calbiochem) chauffé à 56 °C. Pour chaque condition, des contrôles négatifs ont été réalisés en omettant l'anticorps primaire, l'anticorps secondaire ou les deux, afin de pouvoir observer l'autofluorescence des cellules. Les cellules ont été examinées avec un microscope à fluorescence classique (Olympus Provis) équipé d'une caméra AxioCam (Zeiss) ou avec un microscope à fluorescence confocale (*Leica Microsystems*) équipé de deux faisceaux laser.

7. Chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité permet de séparer des protéines sur la base d'interactions réversibles entre une protéine (ou un groupe de protéines) et un ligand spécifique, couplé à une matrice chromatographique. Pour éluer la molécule d'intérêt, l'interaction peut être supprimée soit de manière spécifique en utilisant un ligand compétitif, soit de manière non spécifique en jouant sur le pH, les forces ioniques ou la polarité. Nous avons utilisé cette technique pour éliminer l'albumine présente dans les milieux de culture enrichis en sérum 1% et récoltés après 24h d'incubation. Pour cela, nous avons profité d'une colonne préparée par E. Delaive en URBC (FUNDP Namur) contenant des anticorps de lapin dirigés contre l'albumine bovine et fixés sur une matrice de sépharose 4D. Cette colonne était connectée à un spectrophotomètre UV de façon à pouvoir enregistrer la sortie des protéines.

En pratique, la colonne était d'abord équilibrée avec du PBS avant de déposer maximum 30 ml de milieu de culture. Après l'entrée des protéines dans la matrice, du PBS était ajouté pour éviter l'assèchement de la colonne. Lorsque le pic des protéines non retenues par la colonne commençait à fléchir, on ajoutait environ 30 ml d'acide formique 2% pour dissocier l'albumine des anticorps. Cette étape d'élution se traduisait par l'apparition d'un second pic sur le chromatogramme. Ensuite, on ajoutait du Tris-HCl 2M pH8 pour neutraliser le pH. Cela entraînait la libération d'autres molécules d'albumine. Enfin, la colonne était régénérée par des lavages extensifs avec du PBS.

Après passage sur la colonne, les volumes protéines sont fortement diluées. Pour obtenir des échantillons plus concentrés, nous avons centrifugé ces différentes fractions (maximum 15 ml à la fois) sur des filtres Amicon Ultra-15 (Millipore) qui retiennent les molécules qui ont un poids moléculaire supérieur à 10 kDa (*cut-off* de 10 kDa). Pour cela, nous avons employé la centrifugeuse Allegra R-22 équipée d'un rotor SX4250 (Beckman-Coulter). Après plusieurs cycles de centrifugation à 2.500 g_{av} pendant 20 min, les protéines étaient concentrées environ 60 fois.

A la suite de cette étape de centrifugation, les protéines ont été précipitées avec de l'acide trichloracétique (TCA) 10 %. Après 30 min à 4°C, les échantillons étaient centrifugés pendant 15 min à 13.000 RPM dans une microcentrifuge Eppendorf. Les culots étaient lavés avec 1 ml d'éthanol/éther (ratio 50:50) et centrifugés à nouveau. Finalement, les protéines étaient solubilisées dans du tampon Tris-HCl 62,4 mM pH 6,8 contenant du glycérol 10%, du SDS 2%, du DTT 100mM et du bleu de bromophénol 0,01 %. Les protéines ont été dosées par la méthode de Bradford.

8. Dosage des protéines

8.1. Méthode de Bradford

Cette technique permet de déterminer la concentration protéique d'un échantillon grâce au bleu de Coomassie G250 qui, en milieu acide, change de couleur après fixation sur les résidus arginine, phénylalanine, tryptophane et proline. Ce changement de couleur s'accompagne d'une modification de sa longueur d'onde d'absorbance. La concentration protéique est mesurée avec un spectrophotomètre en comparant l'absorbance des tests avec l'absorbance d'échantillons de BSA de concentration connue.

En pratique, nous avons ajouté 1 ml de solution de Bradford (Bio-Rad), diluée 5 fois dans de l'eau distillée et filtrée sur filtre Whatmann, à un volume donné de protéines à doser. Nous avons prévu des étalons BSA, un blanc contenant de l'H₂O et un blanc contenant du tampon de solubilisation (utilisé pour suspendre les échantillons). Les échantillons ont été vortexés, incubés, pendant minimum 15 min et l'absorbance a été mesurée avec spectrophotomètre (Perkin-Elmer) à 595 nm. La concentration est donnée par la formule :

$$\text{Conc}_{\text{éch}} (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = ((\text{Abs}_{\text{éch}} - \text{Abs}_{\text{blanc éch}}) / (\text{Abs}_{\text{étalon}} - \text{Abs}_{\text{blanc étalon}})) \times ((\text{Vol}_{\text{étalon}} \times \text{Conc}_{\text{étalon}} / \text{Vol}_{\text{éch}}))$$

8.2. Méthode de l'acide bicinchoninique (BCA)

Cette méthode repose sur la réduction des ions Cu⁺⁺ par les atomes d'azote des liens peptidiques des protéines dénaturées par une lyse alcaline. Les ions monovalents (Cu⁺) générés réagissent alors avec le BCA, formant ainsi un complexe violet qui présente un maximum d'absorbance à 562 nm. Pour déterminer la concentration protéique des lysats cellulaires ou des fractions subcellulaires, nous avons mélangé énergiquement 20 µl d'échantillons dilués 4x dans 800 µl de réactif contenant le BCA, du tartrate de sodium, du carbonate et bicarbonate de sodium ainsi que du sulfate de cuivre (Pierce). Après 30 min d'incubation à 37°C, l'absorbance des tests était mesurée à 562 nm et comparée à l'absorbance des étalons de BSA.

9. Fractionnement subcellulaire

Le fractionnement subcellulaire consiste à casser un maximum de cellules tout en préservant l'intégrité des organites cellulaires et à séparer les organites en fonction leur coefficient de sédimentation. Dans le cadre de ce travail, le but de ces expériences était d'étudier la compartimentalisation de la lactate déshydrogénase (LDH) dans les différentes conditions de culture afin de déterminer si la privation de sérum ou l'expression de LAMP-2 ΔTM induisait l'autophagie.

Des cellules cultivées dans 3 Pétris de 100 mm de diamètre ont été incubées pendant 24h dans du milieu DMEM ± sérum 10%. Après 3 lavages dans du PBS à T° ambiante puis 2 lavages dans du saccharose 0,25M glacé, elles ont été récoltées à l'aide d'un racloir, transférées dans un homogénéiseur de type Dounce (piston B) et portées à un volume de 7 ml de saccharose 0,25 M. Les cellules ont été homogénéisées par 6 passages de piston dans le Dounce et centrifugées dans des tubes en polypropylène de 15 ml pendant 10 min à 544 g, en utilisant une centrifugeuse Allegra R-22 équipée d'un rotor SX4250 (Beckman-Coulter). Le surnageant ainsi obtenu était transféré dans un tube taré tandis que le culot était resuspendu grossièrement, transféré dans le Dounce et porté à 5 ml de saccharose 0,25 M glacé. Les cellules encore intactes qui étaient éventuellement présentes dans le culot ont été à nouveau soumises à une ou deux étape(s) d'homogénéisation (6 passages dans le Dounce) et de centrifugation. A l'issue de la dernière centrifugation à basse vitesse, le culot resuspendu dans 3 ml de saccharose constitue la fraction nucléaire N et les surnageants poolés représentent le surnageant post-nucléaire (ou fraction E). Ensuite 3 ml de surnageant post-nucléaire ont été transférés dans des tubes en polycarbonate à paroi épaisse et centrifugés à 100.000 g dans une centrifugeuse TLX, équipée d'un rotor TLA 100.3 (Beckman-Coulter) de façon à obtenir une fraction MLP (fraction sédimentable contenant les compartiments membranaires) et une fraction S (fraction non sédimentable cytoplasmique). Enfin, la distribution des protéines et de l'activité de la β-galactosidase a été établie afin de vérifier si la majorité des cellules avaient bien été abîmées et si les organites cellulaires étaient encore intacts.

10. Dosages enzymatiques

10.1. Dosage de la β -galactosidase

Afin de juger de l'efficacité des fractionnements, nous avons analysé la distribution d'une enzyme marqueur des lysosomes, la β -galactosidase. La β -galactosidase hydrolyse le méthylumbelliféryl β -galactopyranoside en méthylumbelliférone, un produit qui émet de la fluorescence à 450 nm lorsqu'il est excité à 365 nm.

Pour doser la β -galactosidase, nous avons incubé pendant 15 min. à 37°C, 180 μ l de mixture (contenant du tampon acétate 55,5 mM pH 5, du NaCl 55,5 mM, du Triton X-100 0,055% et du substrat 0,55 mM (Sigma-Aldrich)) avec 20 μ l de fraction (diluée si nécessaire). La réaction a été arrêtée par l'ajout de 1 ml de tampon glycine 50 mM/EDTA 5mM/NaOH/Triton X-100 0,05 % à pH 10,5. Le pH élevé du fixateur inhibe l'activité enzymatique. La fluorescence émise a été lue avec un spectrofluorimètre SPF-500C (SLM Instruments) (λ excitation : 365 nm, λ émission : 450 nm).

10.2. Dosage de la lactate déshydrogénase

La lactate déshydrogénase (LDH) réduit le pyruvate en lactate en utilisant le NADH comme cofacteur. Son activité est mesurée en suivant la diminution d'absorbance à 340 nm, liée à la consommation du NADH. Concrètement, nous avons ajouté 100 μ l d'échantillon dilué et 100 μ l de NADH 1 mM dans une cuvette réduite contenant 800 μ l de tampon Tris-HCl 62,5 mM pH 7,4, du pyruvate 1,25 mM et du Triton X-100 0,5% et nous avons suivi pendant 1 min la variation d'absorbance à 340 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Uvikon 930 (Kontron Instruments).

11. Analyse protéomique par la technique 2D-DIGE

11.1. Principe

L'électrophorèse 2-D permet de séparer des protéines contenues dans un échantillon complexe d'abord selon leur point isoélectrique (IEF) et ensuite selon leur poids moléculaire (SDS-PAGE). Chaque spot sur le gel 2-D qui en résulte correspond potentiellement à une seule protéine. La méthode 2-D-DIGE (*Difference Gel Electrophoresis*) a été développée par la firme GE Healthcare. Elle présente l'avantage considérable de contrôler les variations inhérentes à la technique grâce à l'introduction d'un standard interne. Cela permet d'identifier des variations d'abondance des protéines avec une confiance statistique. Elle repose sur l'utilisation de sondes de faible poids moléculaire et de propriétés spectrales différentes (les cyanines CY2, CY3 et CY5) qui, à la concentration utilisée, marquent seulement 1 à 2 % de résidus lysine des protéines. Le marquage avec des sondes différentes (CY3 et CY5, par exemple) de protéines provenant de 2 conditions expérimentales différentes (contrôle et test) permet leur migration sur un même gel. Pour l'analyse statistique, il faut faire minimum 3 gels avec des échantillons indépendants. Un mélange d'une même quantité de protéines issues des différentes conditions expérimentales est marqué avec CY2 et constitue un standard interne qui sera ajouté sur chacun des 3 gels. Celui-ci permet d'éliminer les variations de gel à gel en les normalisant par rapport à l'un d'entre eux qui est considéré comme gel « *master* ». Les spots sont détectés en scannant les gels aux longueurs d'onde correspondant à chacune des trois cyanines 2, 3 et 5. Ensuite, le logiciel DeCyder 2-D permet la détection des spots, la quantification de l'intensité des spots et l'analyse statistique des variations d'intensité. On peut ainsi éditer une liste de spots numérotés avec les variations d'abondance et les valeurs de

t-Student. De manière générale, les gels analytiques ne renferment pas la quantité de protéines requise pour l'identification des protéines par spectrométrie de masse. Dans cette optique, il faut réaliser des gels préparatifs. Ceux-ci sont chargés avec 2 à 4 fois plus de protéines et sont colorés avec par exemple du KryptonTM (Pierce) après l'électrophorèse 2-D. Les spots à prélever sont repérés par superposition des images des gels analytiques et préparatifs. Dans le cadre de ce mémoire, nous avons opté pour une alternative qui consiste à mélanger aux protéines marquées avec les cyanines, des protéines non marquées, provenant d'un mélange en quantité équivalente de nos 6 échantillons (tests et contrôles). L'étude comparative s'effectue sur le faible pourcentage de protéines marquées avec les cyanines tandis que la localisation de la totalité des protéines est déterminée après coloration du même gel avec le Krypton. Cette approche est moins coûteuse, plus rapide et permet de récolter une quantité suffisante de protéines en vue de l'identification par spectrométrie de masse. Les spots d'intérêt sont ensuite prélevés par un robot (Spot picker, GE Healthcare) puis digérés dans le gel avec de la trypsine et les peptides sont analysés en spectrométrie de masse MALDI-TOF à l'aide d'un appareil MALDI MX (Waters), qui permet l'obtention de la séquence et de la masse des peptides issus de la digestion.

11.2. Préparation des échantillons

Des milieux de culture provenant de cellules contrôles (F2) ou exprimant LAMP-2 Δ TM de rat (G7) ont été récoltés après 24h d'incubation en absence de sérum. Ils ont ensuite été concentrés environ 30 fois par centrifugation sur des filtres Amicon Ultra-15 (*cut-off* de 10 kDa, Millipore). Un volume correspondant à 100 μ g de protéines a été précipité avec le kit « *clean up* » (GE Healthcare) et resuspendu dans du tampon de marquage contenant du Tris-HCl 30 mM, de l'urée 7M, de la thiourée 2M et du CHAPS 4%. L'urée et la thiourée sont des agents dénaturants tandis que le CHAPS est un détergent zwitterionique. Ils assurent une bonne solubilisation des protéines et les empêchent de s'agréger et de précipiter au cours de l'électrophorèse 2-D. La concentration en protéines a ensuite été déterminée par la méthode de Bradford. Chaque fois, le rendement de la précipitation était supérieur à 80%. 25 μ g de protéines (environ 7 μ l) provenant des milieux de culture des cellules F2 ou G7 ont été prélevés et marqués avec 1 μ l de CY3 ou 1 μ l de CY5 pendant 30 minutes à 4°C, à l'abri de la lumière. Parallèlement à cela, 14,5 μ g de protéines provenant de chaque condition expérimentale ont été mélangés et marqués avec 7 μ l de CY2. Ce mélange constitue le standard interne. La réaction a été arrêtée en ajoutant un excès de lysine (1mM final) et en incubant les tubes pendant 10 min sur la glace. Pendant ce temps, nous avons préparé un mélange de 120 μ g de protéines non marquées provenant à quantité égale de chaque échantillon. 3 mélanges composés de 25 μ g de protéines contrôles, 25 μ g de protéines tests, 25 μ g de standard interne et 37 μ g de protéines non marquées (soit 112 μ g au total) ont été préparés et dilués 2 fois dans une solution de solubilisation (urée 7M, thiourée 2M, CHAPS 4%, DTT 0,28% et IPG buffer 1,25%). Après 15 minutes d'incubation à T° ambiante, les échantillons ont été centrifugés pendant 15 min à 13.000 RPM avant d'être chargés sur les gels.

11.3. Focalisation isoélectrique (IEF)

Des gels de première dimension contenant un gradient de pH immobilisé s'étendant de pH 4 à pH 7 (GE Healthcare) ont été réhydratés dans des gouttières contenant la solution de réhydratation (qui correspond à la solution de solubilisation plus 0,002% de bleu de bromophénol préparé dans du Tris-HCl 50 mM pH 6,8). 15 minutes plus tard, nous les avons recouverts avec de l'huile de paraffine pour éviter leur déshydratation. Le lendemain, les gels ont été transférés dans un sarcophage multipiste (*Manifold*) posé sur l'appareil IPGPhor (GE

Healthcare) et sur lequel nous avons versé 110 ml d'huile de paraffine. A chaque extrémité des gels, nous avons déposé un petit bout de papier buvard imbibé d'eau bidistillée. Ceux-ci permettent de recueillir les sels lors de la migration. Ensuite, les électrodes ont été fixées sur les papiers buvards et les échantillons ont été chargés dans des cupules posées près de l'électrode positive. Les conditions de migration étaient les suivantes : 300V pendant 3h, 1.000V pendant 6h, 8.000V pendant 3h et 8.000V pendant 50.000Vh (Volt-heure). Ce programme (qui dure environ 16h) permet successivement, l'entrée des échantillons dans le gel, la migration des sels vers les extrémités et la migration des protéines en fonction de leur point isoélectrique. Après migration, les gels ont été conservés à -70°C en attendant de faire la deuxième dimension.

11.4. Electrophorèse SDS-PAGE

Des gels de 25 cm sur 20 cm ont été préparés d'après la composition suivante :

Composition du gel de 2° dimension	Solutions stocks	Concentration finale
	Acrylamide 30%	10 %
	Tampon Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	375 mM
	SDS 10 %	0,1%
	APS 10%	0,1%
	TEMED	0,0139%

Après avoir été coulés, les gels ont été recouverts avec de l'isobutanol afin d'éviter tout contact avec l'oxygène et ainsi éviter des problèmes de polymérisation puis avec du SDS 1%. Les gels de la première dimension ont été dégelés puis rincés à l'eau distillée et placés pendant 15 min dans un tampon d'équilibration (Tris-HCl 50 mM pH 8,8, urée 6M, glycérol 30% et SDS 2%) contenant du DTT 1 % pour réduire les ponts S-S. Les gels ont ensuite été transférés dans la même tampon contenant cette fois de l'iodoacétamide 2,5% pour bloquer les groupements -SH et enfin dans du tampon d'électrophorèse. Les gels de première dimension ont été posés puis scellés sur les gels SDS-PAGE par une solution d'agarose 0,5%, préparée dans le tampon d'électrophorèse.

Finalement, les montages ont été déposés dans une cuve d'électrophorèse (Ettan Dalt 6, GE Healthcare) préalablement remplie de tampon d'électrophorèse suivant les instructions de la firme. La migration s'effectue à 1 W par gel pendant 17h.

11.5. Détection des spots

Une fois la migration terminée, les gels ont été rincés à l'eau et placés dans le scanner Typhoon 9400 (GE Healthcare). Chacun des trois gels a été scanné aux 3 longueurs d'onde différentes correspondant aux longueurs d'ondes d'absorbance des 3 fluorochromes utilisés (CY2, CY3 et CY5). Les images des gels ont été analysées à l'aide du programme DeCyder 6.5 (GE Healthcare).

Après cette analyse, les gels ont été démoulés, rincés dans de l'eau distillée puis fixés dans une solution contenant 40% d'éthanol et 10% d'acide acétique pendant 2 x 30 minutes. Cette étape précipite les protéines au sein du gel. Après de nouveaux rinçages, les gels ont été incubés dans une solution de Krypton 10% pendant toute une nuit à T° ambiante. Le lendemain, les gels ont été transférés dans une solution d'acide acétique 10% puis dans de l'eau distillée pour éliminer l'excès de Krypton.

Les gels ont été scannés et analysés une nouvelle fois. Les spots obtenus après le marquage au Krypton ont été superposés à ceux obtenus précédemment par le marquage aux

cyanine. Les coordonnées des spots d'intérêt ont été envoyées au robot s'est chargé de prélever les spots sélectionnés et de les déposer dans une plaque de 96 puits contenant de l'eau distillée.

12. Identification des spots par spectrométrie de masse MALDI-TOF

La technique MALDI-TOF permet d'obtenir la séquence et la masse de peptides sur base de leur « temps de vol ». Les peptides, provenant par exemple de la digestion d'un spot de gel 2-D, sont co-cristallisés sur une cible avec une matrice (généralement de l'acide alpha-cyno-4-hydroxycinnamique), un laser vient ensuite frapper la matrice, ce qui provoque l'ionisation des peptides. Les peptides étant chargés, les ions sont accélérés à l'aide d'un champ électrique et volent dans un tube sous vide. Le temps de vol d'un peptide dépend à la fois de son poids moléculaire et de sa charge, il est donc possible de déterminer le rapport masse/charge en fonction du temps de vol (Mann et al., 2001).

Les petits morceaux de gel prélevés par le robot ont été lavés avec de l'acétonitrile puis traités successivement avec du DTT et de l'iodoacétamide, préparés tous deux dans une solution de NH_4HCO_3 100mM pH 7,8. Les protéines ont ensuite été trypsinisées *in gel* d'abord à froid pendant 45 min puis à 37°C pendant une nuit. Après récupération du surnageant de digestion, les peptides restés dans les morceaux de gel ont été extraits avec de l'acide formique 5% et de l'acétonitrile. Les peptides ainsi obtenus ont ensuite été passés dans des embouts contenant des petites colonnes de chromatographie (GELoader, PROXEON) équilibrées avec de l'acide formique 5%. Cette étape permet d'éliminer les sels restants. Les peptides restés dans la colonne ont été élués directement sur la cible du MALDI-TOF par une mixture composée d'acide alpha-cyno-4-hydroxycinnamique qui sert également de matrice pour la spectrométrie de masse. L'identification des peptides et des protéines correspondantes a été réalisée grâce au logiciel MASCOT (Matrix science) qui a interrogé une banque génomique humaine (NCBI).

Résultats et discussion

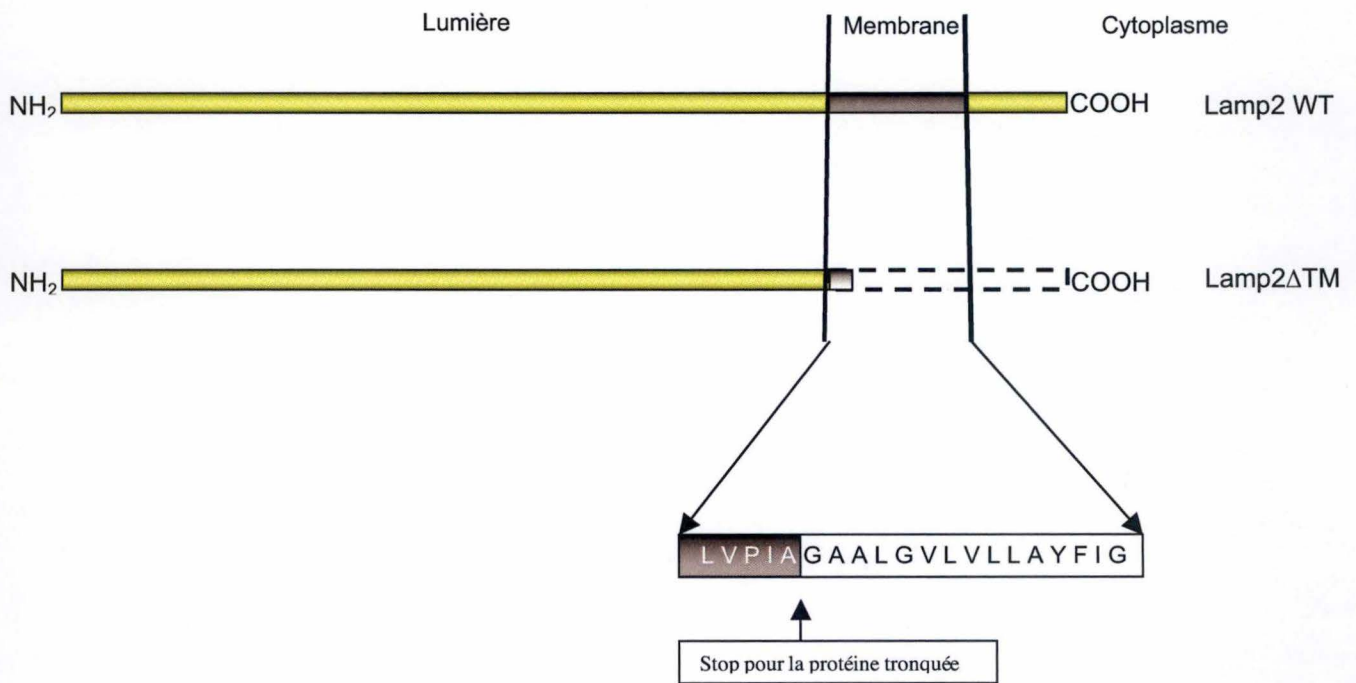


Fig. 1. Représentation schématique de la structure de LAMP-2 et LAMP-2 Δ TM de rat. Les acides aminés (code avec une lettre) composant le segment transmembranaire se trouvent entre les 2 flèches.

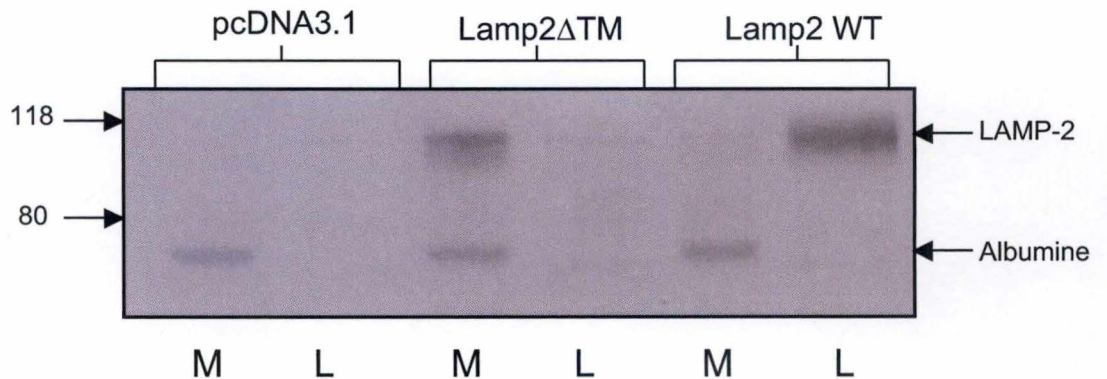


Fig. 2. Expression de LAMP-2 de rat dans des cellules HepG2 transfectées de façon transitoire. Des cellules transfectées avec le vecteur pcDNA 3.1 vide ou avec le même vecteur contenant la séquence de LAMP-2 Δ TM ou de LAMP-2 WT de rat ont été incubées pendant 24h dans du milieu de culture dépourvu de sérum. Ensuite, les protéines contenues dans le milieu ont été précipitées avec du TCA 10% tandis que les protéines intracellulaires ont été solubilisées dans du PBS/Triton 0,5% à 4°C. 2,5% du volume de milieu et de lysat (ce qui équivaut à environ 25 μ g de protéines) ont été dénaturés à 95°C en présence de SDS et de DDT puis déposés sur un gel de polyacrylamide 10%. Les protéines LAMP-2 ont été révélées par Western blot en utilisant un anticorps monoclonal de souris (10D10) et un anticorps secondaire couplé à HRP. Les signaux ont été visualisés par ECL sur un film d'autoradiographie. M et L correspondent respectivement aux milieux et aux lysats.

III. Résultats et Discussion

Dans l'hypothèse où le domaine luminal de LAMP-2 interagirait avec des précurseurs des hydrolases acides pour participer à leur transport, l'expression d'une forme mutée de LAMP-2 dépourvue de ses domaines transmembranaire et cytoplasmique pourrait entraîner la sécrétion de cette protéine LAMP-2 Δ TM et avec elle d'un certain nombre d'hydrolases lysosomales dans le milieu extracellulaire.

Avant de réaliser une étude protéomique sur l'ensemble des protéines sécrétées par des cellules exprimant LAMP-2 Δ TM (également appelé sécrétome) plusieurs contrôles et mises au point étaient indispensables. Après avoir vérifié la séquence de LAMP-2 Δ TM, nous avons essayé de transfecter des cellules HepG2 de façon transitoire pour nous assurer que la protéine LAMP-2 Δ TM était sécrétée dans le milieu de culture. Ensuite, nous avons préparé des clones stables pour obtenir des populations cellulaires homogènes. Enfin, nous avons recherché les conditions optimales pour faire une analyse protéomique sur gels 2-D sur le milieu de culture des cellules transfectées.

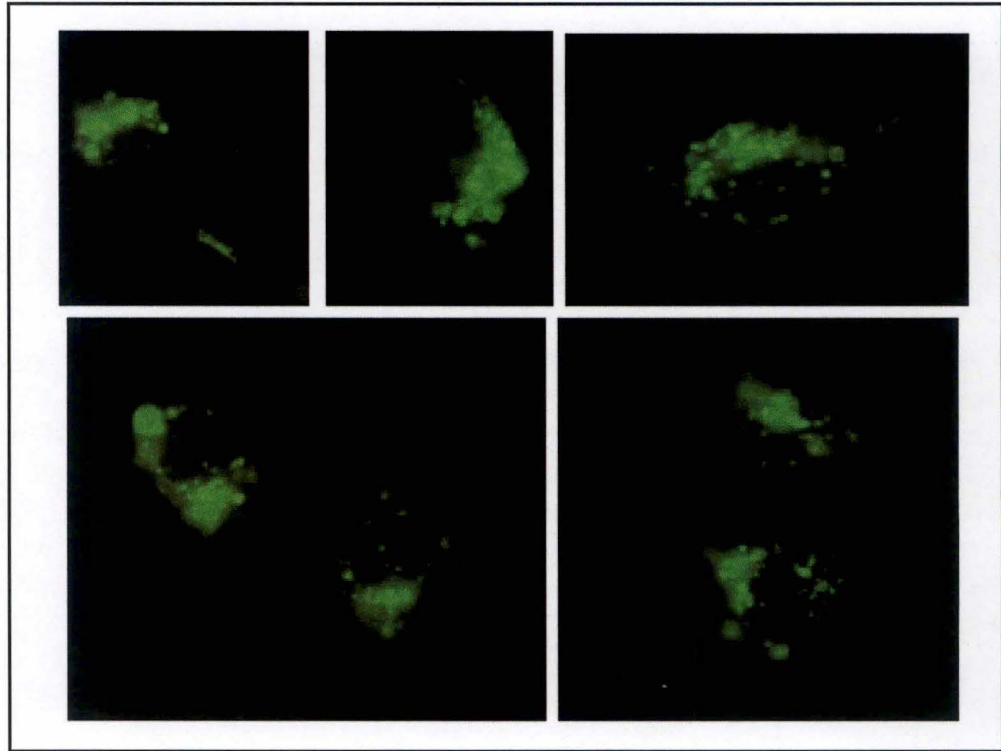
1. Transfection transitoire de cellules HepG2

1.1 Distribution de LAMP-2 de rat

Grâce à des travaux menés précédemment dans notre laboratoire, nous disposons d'un plasmide renfermant la séquence d'une version tronquée de LAMP-2 de rat. Cette version mutée est dépourvue de la séquence codant pour le segment transmembranaire et la queue cytoplasmique de LAMP-2 de rat, résultant de l'introduction d'un codon STOP après le cinquième acide aminé du segment transmembranaire (**Fig. 1**). Cette construction LAMP-2 Δ TM est insérée dans le plasmide vecteur pcDNA3.1 (Invitrogen).

Nous avons essayé d'exprimer cette protéine LAMP-2 Δ TM de rat ainsi que la forme entière (LAMP-2 WT) dans des cellules provenant d'un hépatome humain, les cellules HepG2. Ces cellules sont souvent utilisées pour étudier le trafic intracellulaire des hydrolases acides (Delbruck et al., 1994; Mach et al., 1992; Rijnbouts et al., 1991b; Zhu and Conner, 1994). Rappelons l'intérêt de travailler ici avec des cellules qui pourraient être capables de transporter les hydrolases lysosomales sans intervention du M6P comme c'est le cas des hépatocytes (voir introduction). Pour cela, nous avons suivi deux approches : l'utilisation d'un agent transfectant de nature lipidique (FuGENE, Roche) et la précipitation au phosphate de calcium. Des résultats similaires ont été obtenus avec les deux techniques de transfection mais comme attendu, le taux d'expression des protéines LAMP-2 était supérieur avec le FuGene qu'avec le phosphate de calcium.

48h après la transfection, nous avons rincé les cellules puis nous les avons incubées dans du milieu de culture dépourvu de sérum, afin de réduire la concentration en protéines sériques et ainsi augmenter nos chances de visualiser les protéines sécrétées par les cellules. Nous avons précipité les milieux de culture avec du TCA 10% et lysé les cellules avec du tampon PBS-Triton X-100 0,5% avant de séparer les protéines par électrophorèse sur gels de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE). Les protéines LAMP-2 de rat ont été détectées par Western blot sur les milieux de culture ainsi que sur les lysats cellulaires (**Fig. 2**)



B

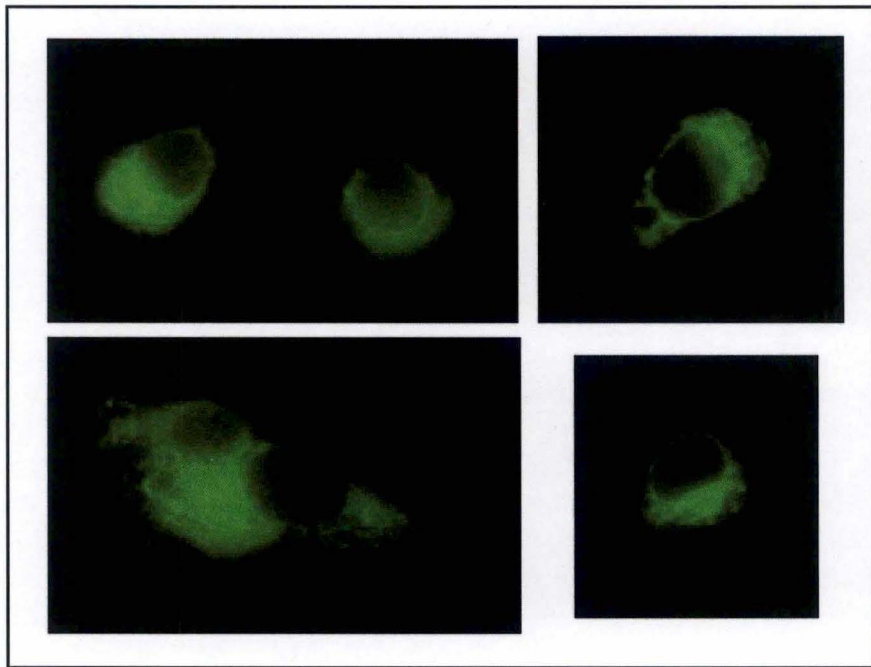


Fig. 3. Distribution de LAMP-2 WT (A) et de LAMP-2 Δ TM (B) dans des cellules HepG2 transfectées de façon transitoire. Des cellules transfectées avec le plasmide contenant la séquence de LAMP-2 WT ou de LAMP-2 Δ TM de rat ont été fixées et perméabilisées avec du méthanol absolu puis avec de l'acétone 80%. Les protéines LAMP-2 ont été détectées avec l'anticorps monoclonal 10D10 et un anticorps secondaire couplé au fluorochrome ALEXA-488. Après montage dans le MOWIOL, le signal fluorescent a été observé avec un microscope à épifluorescence (Leica).

avec un anticorps monoclonal 10D10, obtenu dans notre laboratoire (Jadot et al., 1997; Jadot et al., 1996).

Lorsque nous examinons le profil électrophorétique du lysat des cellules transfectées avec LAMP-2 WT, nous observons une bande avec une masse moléculaire relative (M_r) de ~ 100 kDa. Cette bande est absente dans le lysat des cellules transfectées avec le vecteur vide (pcDNA 3.1) et présente la masse moléculaire attendue pour la forme glycosylée de LAMP-2. Cela prouve que l'anticorps 10D10 est bien spécifique de LAMP-2 de rat et qu'il ne reconnaît pas la forme endogène de LAMP-2 d'origine humaine, malgré les 67 % d'acides aminés identiques présents dans les deux protéines. Dans les cellules transfectées avec LAMP-2 ΔTM , cette bande de ~ 100 kDa est absente dans le lysat mais, par contre, elle apparaît dans le milieu de culture. Ces résultats suggèrent que la protéine LAMP-2 ΔTM est synthétisée et sécrétée par les cellules transfectées, comme nous l'attendions. Etant donné qu'elle n'apparaît pas dans le lysat cellulaire, nos résultats semblent indiquer que LAMP-2 ΔTM est sécrétée rapidement après sa biosynthèse. Il n'y a pas de différence au niveau de la masse moléculaire apparente des protéines entière (WT) et tronquée (ΔTM). Ce résultat n'est pas étonnant parce que le segment transmembranaire et la queue cytoplasmique des protéines LAMP-2 ne représentent que 35 acides aminés, soit 3,8 kDa. Sur ce gel d'électrophorèse, on peut également observer une bande d'environ 70 kDa dans les milieux des cellules transfectées. Cette bande correspond très probablement à l'albumine, provenant du sérum ou sécrétée par les cellules HepG2.

Par la suite, nous avons déterminé par immunofluorescence la distribution des protéines LAMP-2 (WT et ΔTM) de rat sur les différentes cellules transfectées. Pour cela, nous avons utilisé l'anticorps 10D10 comme anticorps primaire et un anticorps de chèvre conjugué à la sonde Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) comme anticorps secondaire. Rares sont les cellules qui expriment réellement LAMP-2 mais le signal semble spécifique parce qu'il n'est pas visible dans aucune cellule transfectée avec pcDNA 3.1. Dans les cellules exprimant LAMP-2 WT, on observe un marquage périnucléaire qui parfois illumine le pourtour de vésicules sphériques qui correspondent très probablement aux lysosomes et aux endosomes tardifs (**Fig. 3A**). Dans les quelques rares cellules exprimant la forme ΔTM de LAMP-2 de rat, le marquage paraît beaucoup plus diffus (**Fig. 3B**). Cela pourrait s'expliquer par la présence de la protéine tronquée dans la voie sécrétoire.

En conclusion de cette première série d'expériences, nous pouvons dire que les protéines LAMP-2 WT et ΔTM sont exprimées par les cellules HepG2 et que l'anticorps 10D10 reconnaît spécifiquement LAMP-2 de rat (et pas la protéine endogène d'origine humaine) aussi bien en Western Blot qu'en immunofluorescence. Contrairement à LAMP-2 WT qui rejoint probablement le compartiment endo/lysosomal, LAMP-2 ΔTM est sans doute rapidement sécrétée après sa biosynthèse puisqu'elle n'est pas détectée dans les lysats cellulaires en Western Blot et que seulement quelques cellules donnent un signal positif en immuno-épifluorescence. Pour tester cette hypothèse, il faudrait réaliser un marquage métabolique de type « pulse-chase » avec de la ^{35}S -méthionine, suivi d'une immunoprécipitation, d'une électrophorèse et d'une autoradiographie.

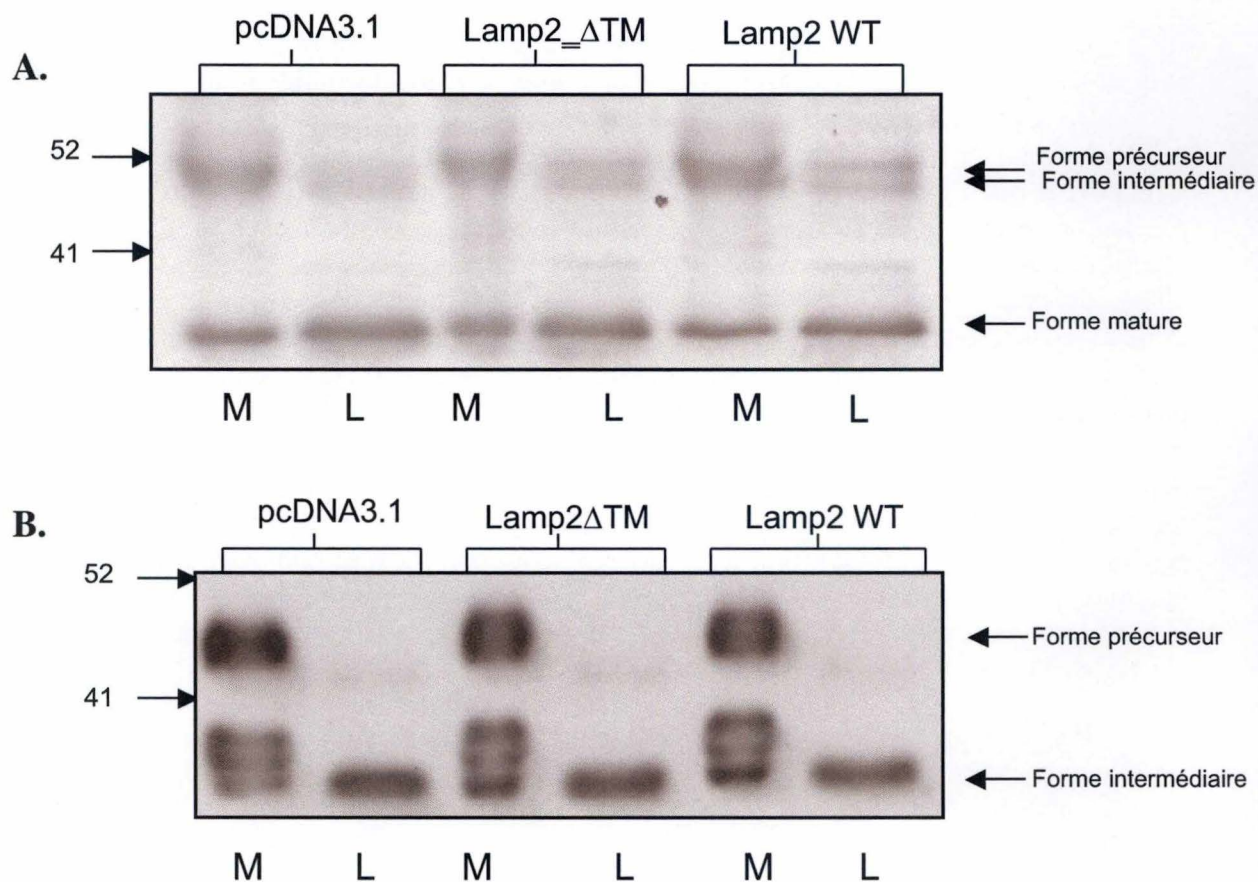


Fig. 4. Distribution de la cathepsine D (A) et de la cathepsine B (B) dans le lysat et le milieu de culture de cellules HepG2 après transfection transitoire. Des cellules transfectées avec le vecteur pcDNA 3.1 vide, ou avec le même vecteur contenant la séquence de LAMP-2 Δ TM ou LAMP-2 WT de rat ont été incubées pendant 24h dans du milieu de culture dépourvu de sérum. Ensuite, les protéines contenues dans le milieu ont été précipitées avec du TCA 10% tandis que les protéines intracellulaires ont été solubilisées dans du PBS/Triton 0,5% à 4°C. 2,5% du volume de milieu et de lysat (ce qui équivaut à environ 25 μ g de protéines) ont été analysés par Western blot avec un anticorps polyclonal anti-cathepsine D (fig.4.A) ou monoclonal anti-cathepsine B (fig.4.B) après séparation par SDS-PAGE en condition réductrice. Les bandes ont été obtenues par chemiluminescence sur des films autoradiographiques. M et L correspondent respectivement aux milieux et aux lysats.

1.2. Sécrétion des cathepsines B et D

Dans les cellules HepG2, les protéases lysosomales sont en partie sécrétées dans le milieu de culture, sous la forme de précurseurs (Mach et al., 1992 ; Rijnbout et al., 1991b). Lorsque le milieu est complété avec du sérum de veau fœtal, les précurseurs ne subissent pas de clivage protéolytique extracellulaire puisque le sérum renferme des inhibiteurs de protéases. Comme nous avons incubé les cellules en absence de sérum pendant 24h, il était important de vérifier si les précurseurs étaient intacts ou clivés dans le milieu de culture. Pour cela, nous avons choisi comme indicateurs, les cathepsines B et D, dont les étapes de maturation sont bien connues (Delbruck et al., 1994; Gieselmann et al., 1983; Schmid et al., 1999). De plus, la cathepsine D est souvent utilisée comme marqueur dans les études de trafic des hydrolases lysosomales (Hamer and Jadot, 2005; Rijnbout et al., 1991b; Zhu and Conner, 1994). Nous avons effectué les Western blots avec un volume de milieu correspondant à 2,5% du volume total et 25 μ g de protéines intracellulaires qui représentent également environ 2,5% du volume total de lysat. (**Fig.4 A et B**).

Pour les deux cathepsines, les cellules transfectées avec le vecteur pcDNA 3.1 vide ou avec le vecteur contenant la séquence de LAMP-2 WT et LAMP-2 Δ TM de rat, se comportent toutes de la même manière. A première vue, il n'y a pas d'augmentation de la sécrétion de ces enzymes lors de la transfection avec LAMP-2 Δ TM. Cela ne veut pas dire pour autant que LAMP-2 n'intervient pas dans le trafic intracellulaire d'autres hydrolases lysosomales. Rappelons par exemple que les cellules provenant de patients atteints de la « *I-cell disease* » sont capables de conserver un certain arsenal hydrolytique dans leurs lysosomes, même si une quantité importante d'hydrolases lysosomales sont sécrétées dans le milieu extracellulaire (Waheed et al., 1982). Cela indique que toutes les hydrolases ne semblent pas faire l'objet d'un ciblage M6P indépendant. Pour la cathepsine D, dans le lysat cellulaire, nous observons la présence d'un doublet qui correspond aux formes précurseur de 52 kDa et intermédiaire de 50 kDa (**Fig.4A**). La bande dans le bas du gel représente la forme mature de 31 kDa (Gieselmann et al., 1983; Rijnbout et al., 1991b). Dans le milieu, nous retrouvons les mêmes bandes mais en proportions différentes. Il est normal de constater que la forme mature représente la molécule prédominante dans le lysat alors que dans le milieu, le précurseur est abondamment sécrété comme décrit dans la littérature (Rijnbout et al., 1991b). Pour la cathepsine B, nous observons dans les lysats cellulaires, une bande à peine visible à ~43 kDa et une bande d'intensité plus élevée à ~30 kDa (**Fig.4B**). Cette dernière correspond à la forme intermédiaire. La forme mature n'est pas visible sur ce gel, elle a dû sortir du gel lors de la migration. Dans le milieu de culture, on retrouve une bande diffuse à ~45 kDa et un triplet à ~30 kDa. La première pourrait correspondre à différentes formes glycosylées de la cathepsine B tandis que le triplet pourrait provenir d'un clivage protéolytique des trois formes précurseurs.

Le fait que nous retrouvions les deux hydrolases sous différentes formes dans le milieu de culture suggère qu'elles ont subi des clivages protéolytiques, induits par des protéases naturellement sécrétées par les cellules et actives en absence des inhibiteurs sériques. Cela risque de compliquer sérieusement l'analyse protéomique que nous envisageons de faire sur les protéines sécrétées. Pour contourner le problème, nous avons refait l'expérience en collectant cette fois le milieu et le lysat de cellules incubées en présence de leupeptine (50 μ g/ml), un inhibiteur compétitif et réversible de cystéines protéases et de quelques sérines protéases (Knight, 1980). La leupeptine a été choisie parce que des travaux ont montré qu'elle inhibait le clivage de la forme intermédiaire de la cathepsine B en forme mature (Hanewinkel

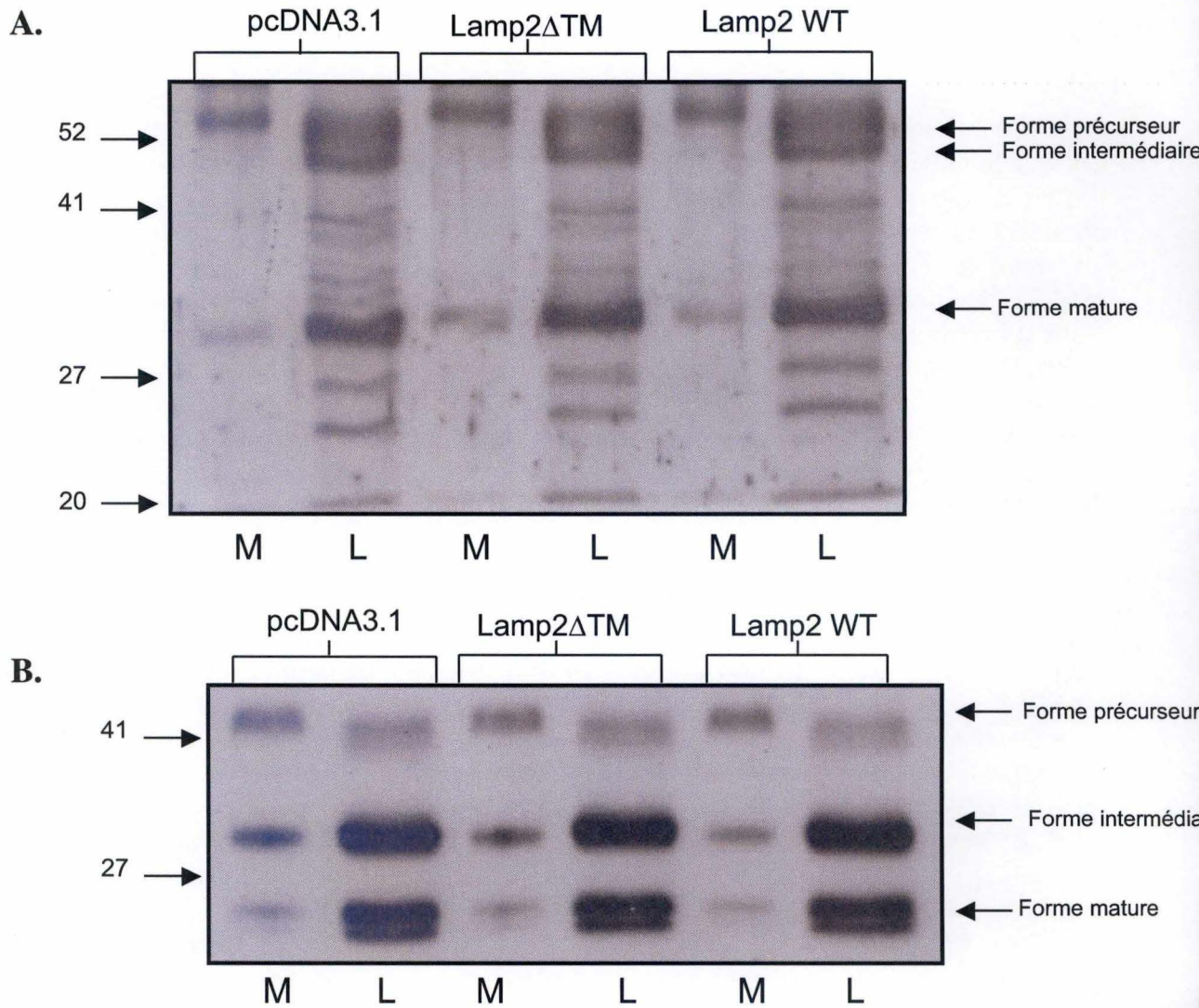


Fig. 5. Distribution de la cathepsine D (A) et de la cathepsine B (B) dans le lysat et le milieu de culture de cellules HepG2 transfectées de façon transitoire et traitées avec de la leupeptine. Des cellules transfectées avec le vecteur pcDNA vide, ou avec le même vecteur contenant la séquence de LAMP-2 Δ TM ou de LAMP-2 WT de rat ont été incubées pendant 24h dans du milieu de culture sans sérum, contenant de la leupeptine (50 μ g/ μ l). Ensuite, les protéines contenues dans le milieu ont été précipitées avec du TCA 10% tandis que les protéines intracellulaires ont été solubilisées dans du PBS/Triton 0,5% à 4°C. 2,5% du volume de milieu et de lysat ont été analysés par Western blot avec un anticorps anti-cathepsine D (fig.5.A) ou anti-cathepsine B (fig.5.B) après séparation par SDS-PAGE en condition réductrice. M et L correspondent respectivement aux milieux et aux lysats.

et al., 1987) et qu'elle inhibait le clivage de la procathepsine D en cathepsine D intermédiaire (Richo and Conner, 1991).

Dans ces conditions, nous retrouvons les trois formes (précurseur, intermédiaire, mature) de la cathepsine D dans les lysats cellulaires, à des Mr conformes à ceux décrits précédemment, respectivement 52 kDa, 50 kDa et 31 kDa (**Fig.5A**). Dans le milieu de culture, c'est la forme précurseur qui prédomine mais la forme mature est encore détectée bien que faiblement. Pour la cathepsine B (**Fig.5B**), nous observons dans les lysats, une bande minoritaire de 44 kDa et une majoritaire à 33 kDa ainsi qu'un doublet à environ 27 et 24 kDa qui représentent dans l'ordre, les formes précurseur, intermédiaire et matures. La bande de 24 kDa correspond probablement à la forme mature dont l'extrémité C-terminale a été clivée (Schmid et al., 1999). Il est évident que, dans les conditions utilisées ici, la leupeptine n'a pas empêché le clivage de la forme intermédiaire de 33 kDa en forme mature de 27 kDa, comme on l'espérait. Dans le milieu de culture, nous retrouvons également les trois formes de la cathepsine B mais les formes clivées sont présentes en quantité moindre.

Au vu des résultats mitigés, il ne nous semblait pas intéressant de prendre le risque d'une interférence de la leupeptine sur le trafic des hydrolases lysosomales. Nous avons renoncé à l'utiliser dans le cadre de nos expériences.

1.3. Expression de LAMP-2 humain

Nous nous sommes demandé si l'expression ectopique de la forme tronquée de LAMP-2 de rat pouvait modifier l'abondance et/ou le trafic intracellulaire de la protéine de LAMP-2 humain, exprimée naturellement par les cellules HepG2 (**Fig. 6**). En Western blot, on constate que, malgré l'expression de LAMP-2 WT de rat, la forme humaine de LAMP-2 ne se retrouve que dans les lysats cellulaires. De plus, il ne semble pas y avoir de diminution d'abondance de la forme humaine par rapport aux cellules transfectées avec pcDNA 3.1. Ces résultats suggèrent que ni la biosynthèse ni le transport intracellulaire de la protéine LAMP-2 endogène ne sont perturbés par l'expression de LAMP-2 WT de rat, dans ces conditions de transfection transitoire. Dans les cellules exprimant LAMP-2 Δ TM, l'intensité du signal semble plus faible que dans les cellules contenant LAMP2-WT ou pcDNA 3.1, ce qui suggère une diminution d'abondance de la protéine LAMP-2 endogène dans les cellules exprimant la forme tronquée de LAMP-2 de rat. Cependant, nous devons rester prudents parce que l'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et sans contrôle de charge.

2. Obtention de clones HepG2 stables

Avec les transfections transitoires, nous avons pu démontrer que la forme tronquée de LAMP-2 de rat était exprimée puis sécrétée dans le milieu de culture. Pour la suite de nos expériences, les transfections transitoires ne sont pas appropriées, d'une part, parce que le nombre de cellules effectivement transfectées est trop faible et, d'autre part, parce que dans les cellules positives, le taux d'expression peut éventuellement atteindre des niveaux qui dépassent les capacités de biosynthèse et de transport.

Étant donné que le plasmide pcDNA 3.1 possède un gène de résistance à la néomycine, nous avons sélectionné les cellules exprimant LAMP-2 Δ TM au cours d'un traitement de 3 semaines avec du G418 (800 μ g/ml), un antibiotique de la famille des

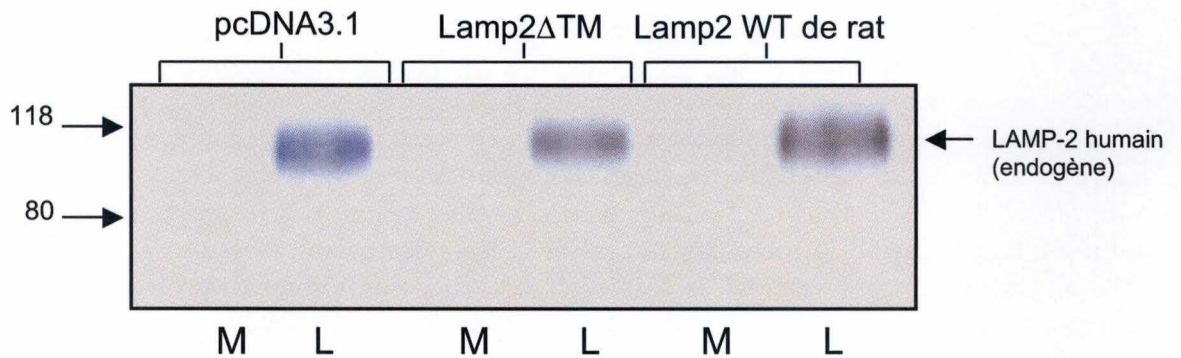


Fig. 6. Expression de LAMP-2 humain dans des cellules HepG2 transfectées de façon transitoire. Des cellules transfectées avec le vecteur pcDNA 3.1 vide, ou avec le même vecteur contenant la séquence de LAMP-2 Δ TM ou de LAMP-2 WT de rat ont été incubées pendant 24h dans du milieu de culture sans sérum. Ensuite, les protéines contenues dans le milieu ont été précipitées avec du TCA 10% tandis que les protéines intracellulaires ont été solubilisées dans dans du PBS/Triton 0,5% à 4°C. 2,5% du volume de milieu et de lysat (ce qui équivaut à environ 25 μ g) ont été dénaturés à 95°C en présence de SDS et de DDT puis déposés sur gel de polyacrylamide 10 %. Les protéines LAMP-2 humaines ont été révélées par Western blot en utilisant un anticorps commercial anti-LAMP-2 humain et un anticorps secondaire couplé à HRP. M et L correspondent respectivement aux milieux et aux lysats.

néomycines. Dans ces conditions, les cellules non transfectées se détachent et meurent, alors que les cellules qui ont incorporé le gène de résistance sont capables de survivre et de proliférer pour former de nouveaux amas. Pour obtenir des clones (e.g. des amas cellulaires provenant d'une cellule unique), il est possible d'utiliser des anneaux de clonage ou d'effectuer des dilutions limites. Nous avons choisi de réaliser des dilutions limites (de 10 en 10) dans des plaques 96 puits pour obtenir des clones. Quelques jours plus tard, nous avons observé attentivement les cellules au microscope à contraste de phase et nous avons sélectionné les puits où nous ne détectons qu'une seule cellule. Après plusieurs semaines de culture dans du milieu conditionné, nous avons vérifié l'expression des protéines LAMP-2 par Western Blot avec l'anticorps 10D10. Nous avons obtenu 5 clones pour le pcDNA 3.1 (F4, F2, F5, F12, F9 et H9), 3 clones pour LAMP-2 Δ TM (F3, G7 et G8) et 2 clones pour LAMP-2 WT (G5 et G7).

Pour la suite de nos expériences, nous avons gardé les lignées F2 et F5 (contenant le vecteur pcDNA 3.1) comme contrôles négatifs et les cellules des lignées F3 et G7 (exprimant LAMP-2 Δ TM) comme clones positifs. Les clones sélectionnés ont été congelés et décongelés, puis analysés à nouveau afin de vérifier s'ils gardaient leur capacité d'exprimer LAMP-2 de rat après décongélation. Au cours de nos travaux, nous nous sommes rendu compte que les clones F3 et G7 arrêtaient de sécréter la protéine LAMP-2 Δ TM après 5 à 6 passages. Deux explications peuvent être avancées. *Primo*, il ne s'agirait pas de vrais clones et les cellules négatives proliféreraient plus vite que les cellules positives. Cela nous paraît peu probable vu la procédure suivie. *Secundo*, la perte de l'expression de LAMP-2 pourrait être due à un changement de conformation au niveau de l'ADN. Par exemple, un réarrangement épigénétique de la chromatine pourrait modifier l'accès à notre gène d'intérêt et empêcher son expression. À la suite de cela, pour chacune de nos expériences, nous nous sommes assurés, par Western Blot que les cellules F3 ou G7 que nous utilisons exprimaient bien la protéine LAMP-2 de rat.

3. Distribution de LAMP-2 Δ TM, LAMP-1 et -2 humains dans les clones stables en présence ou en absence de sérum

La finalité de ce mémoire est de comparer le sécrétome des HepG2 LAMP-2 Δ TM et celui des HepG2 contrôles. Parmi les approches possibles pour collecter des protéines sécrétées par ces cellules, nous en avons envisagé deux :

- La première consiste à incuber des cellules dans du milieu dépourvu de sérum. Cela permet de réduire la contamination du sécrétome par les protéines sériques mais cela risque d'induire l'autophagie (Hendil et al., 1990) et d'augmenter la quantité de protéines sécrétées, adsorbées sur la membrane plasmique. De plus, en absence d'inhibiteurs de protéases sériques, il risque d'y avoir une accumulation de fragments peptidiques issus de la protéolyse.
- La seconde consiste à incuber des cellules dans un milieu contenant un minimum de sérum (par exemple 1%). Cela permettrait d'une part, d'éviter l'autophagie induite par la privation de sérum et d'autre part, d'inhiber l'activité d'une partie des protéases qui se trouvent dans le milieu. L'inconvénient est dans ce cas, la présence de protéines sériques qui risquent de masquer des différences d'abondance entre les 2 sécrétomes, surtout pour les protéines faiblement représentées.

A. Détection de LAMP-2 de rat

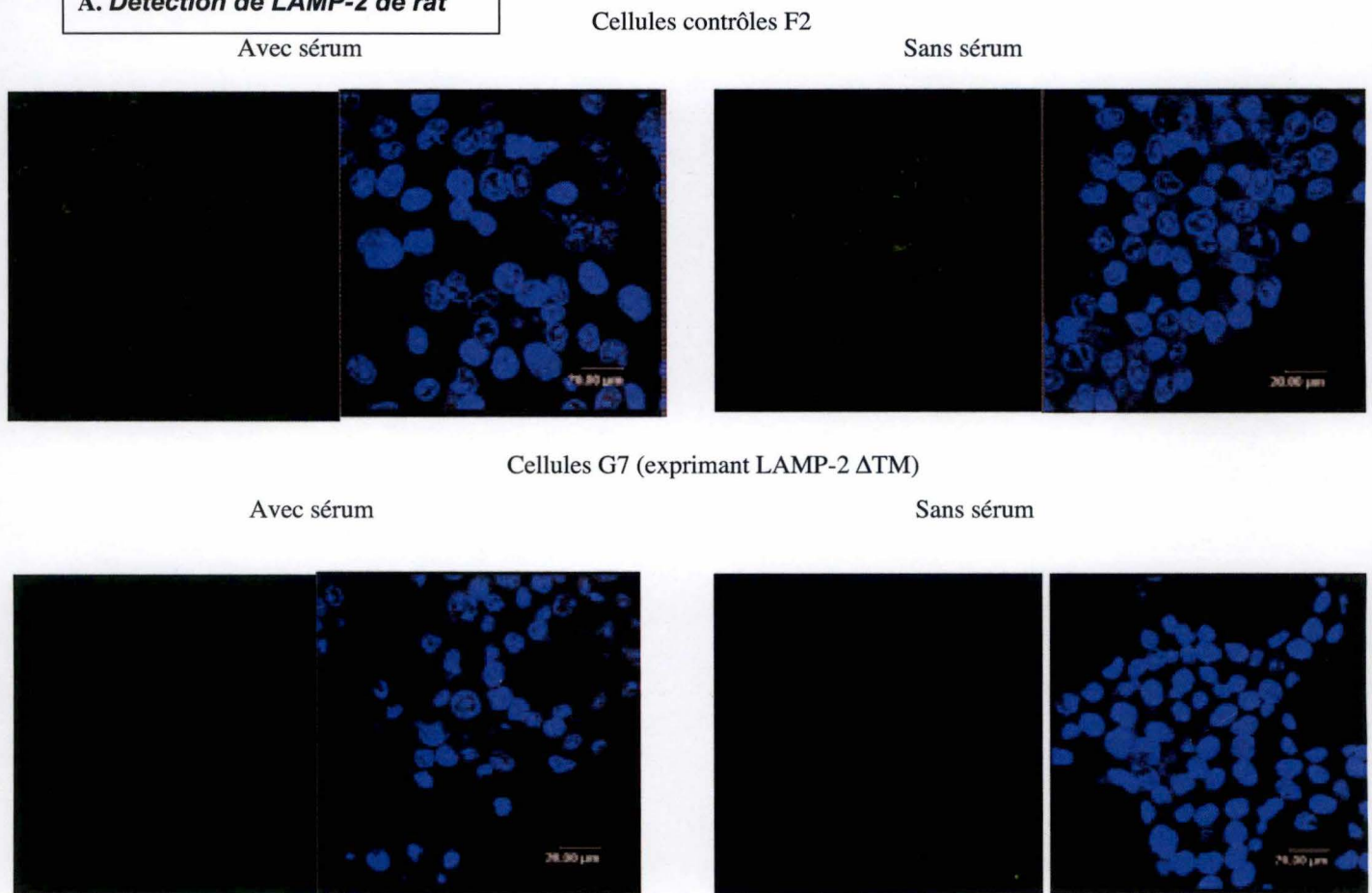
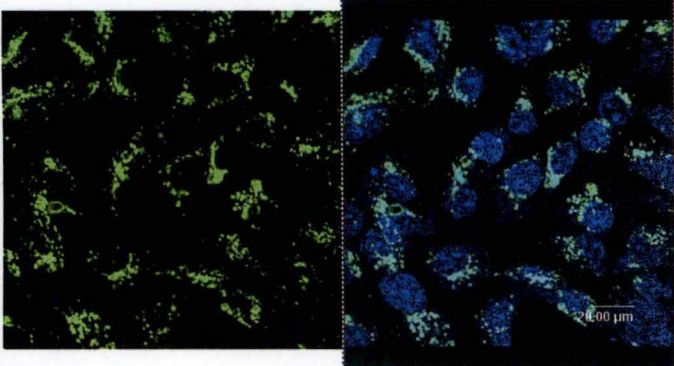


Fig. 7. Distribution de LAMP-1 humain, de LAMP-2 humain et de LAMP-2 Δ TM de rat dans des cellules HepG2 exprimant LAMP-2 Δ TM ou des cellules contrôles, en présence et en absence de sérum. Des cellules exprimant la forme tronquée de LAMP-2 de rat et des cellules contrôles ont été incubées pendant 24h en présence et en absence de sérum. Elles ont été fixées et perméabilisées avec du méthanol absolu puis avec de l'acétone 80%. Les protéines ont été détectées avec l'anticorps 10D10 (fig.7A), un anticorps anti-LAMP-1 humain (fig.7B) ou un anticorps anti-LAMP-2 humain (fig.7C) et ensuite avec un anticorps secondaire couplé au fluorochrome ALEXA-488. Après le montage dans le MOWIOL, le signal fluorescent a été observé avec un microscope confocal (Leica).

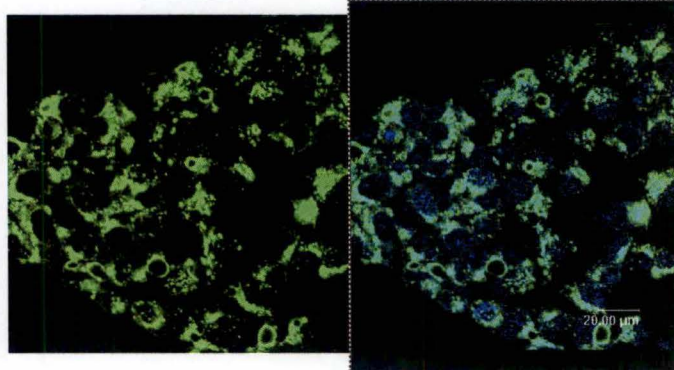
B. Détection de LAMP-1 humain

Cellules contrôles F2

Avec sérum

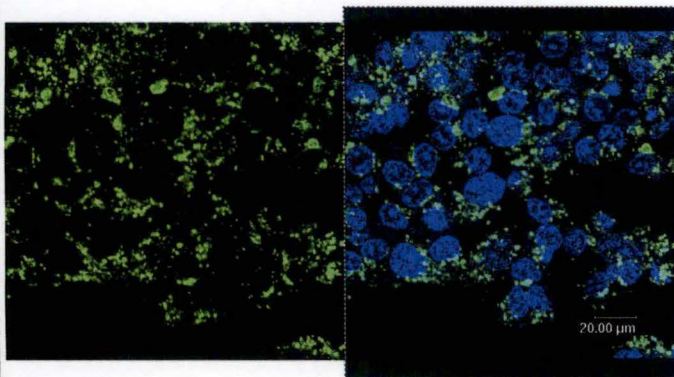


Sans sérum

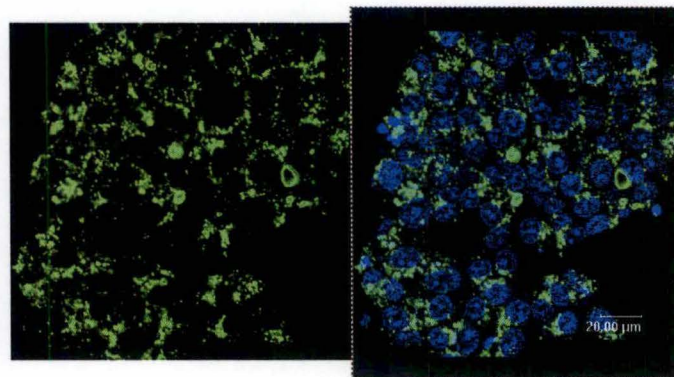


Cellules G7 (exprimant LAMP-2ΔTM)

Avec sérum



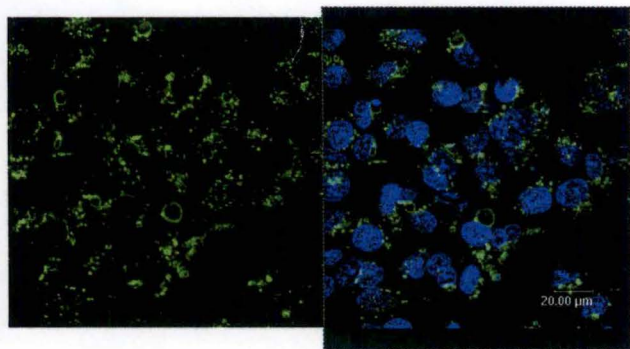
Sans sérum



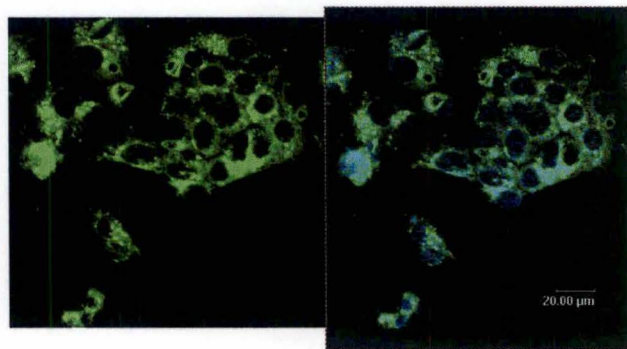
C. Détection de LAMP-2 humain

Cellules contrôles F2

Avec sérum

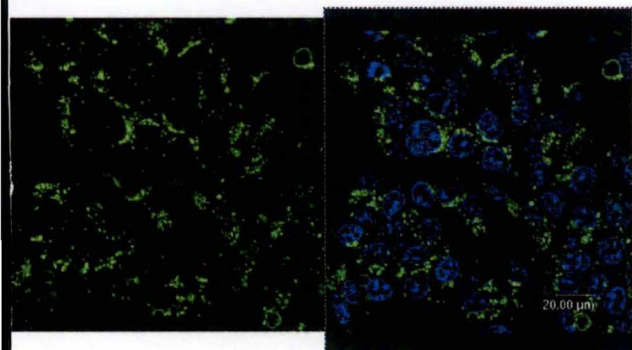


Sans sérum

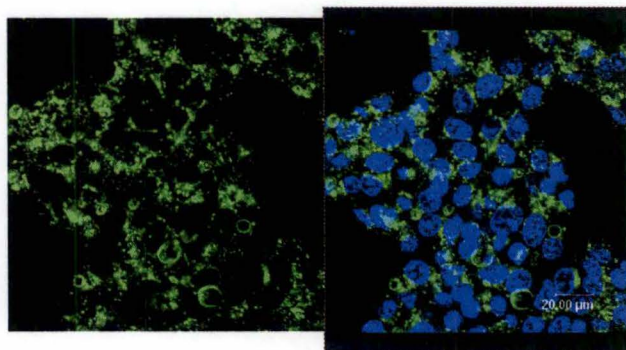


Cellules G7 (exprimant LAMP-2ΔTM)

Avec sérum



Sans sérum



Les deux approches présentent donc des avantages et des inconvénients. Nous avons réalisé des tests afin de trouver les conditions optimales en vue de l'analyse protéomique.

Dans un premier temps, nous avons examiné la morphologie des cellules incubées en présence et en absence de sérum et étudié la répartition des protéines LAMPs par microscopie fluorescente confocale. Connaissant le rôle de LAMP-2 dans la biogenèse des lysosomes et dans l'autophagie (Eskelinen et al., 2002; Tanaka et al., 2000), ces expériences étaient capitales. Rappelons en effet que les cellules dépourvues de LAMP-2 se caractérisent par une accumulation massive de vésicules issues de la voie autophagique. Des cellules HepG2 F2 (contrôle négatif) et G7 (exprimant LAMP-2 Δ TM) ont donc étéensemencées sur des lamelles et puis fixées avec du méthanol/acétone après 24h d'incubation en présence ou en absence de sérum. Ensuite, les lamelles ont été incubées avec l'anticorps primaire (10D10, anti-LAMP-1 humain ou anti-LAMP-2 humain) puis avec un anticorps secondaire de souris, couplé au fluorochrome Alexa Fluor 488 (Molecular Probes). Les noyaux ont été mis en évidence par une coloration au To-Pro-3.

Les cellules G7 ne présentent aucun marquage fluorescent avec l'anticorps 10D10 (**Fig.7A**). Pourtant, elles expriment la protéine puisqu'une expérience de Western Blot réalisée en parallèle, a permis de détecter LAMP-2 Δ TM dans le milieu de culture. De plus, l'anticorps a prouvé son efficacité en immunofluorescence dans des cellules transfectées de façon transitoire (Fig.3). Cependant, ces premières observations morphologiques avaient été réalisées avec un microscope à épifluorescence classique et seules quelques cellules présentaient un marquage. Pour les lignées stables, nous avons utilisé un microscope fluorescent confocal, les images sont donc obtenues à partir d'un seul plan focal. Il est donc raisonnable de penser que l'abondance des protéines LAMP-2 Δ TM dans un plan focal donné est trop faible pour atteindre le seuil de détection. Alternativement, les cellules transfectées de façon transitoire qui présentaient un marquage fluorescent diffus en épifluorescence classique surexprime la protéine à un taux vraiment très élevé. L'absence d'un signal intracellulaire en immunofluorescence confocale ne permet pas de tirer une conclusion mais en s'appuyant sur l'absence en Western blot de la bande de 100 kDa dans les lysats cellulaires, il semble que les protéines LAMP-2 Δ TM soient sécrétées dans le milieu de culture, rapidement après leur biosynthèse.

L'expression de LAMP-2 Δ TM de rat dans les cellules HepG2 incubées en présence de sérum 10 % ne semble pas perturber la distribution des endosomes tardifs et des lysosomes, comme le montrent les marquages avec les anticorps anti-LAMP-1 (**Fig7B**) ou anti-LAMP-2 (**Fig 7C**) humains. Dans les deux cas, le marquage met en évidence des structures sphériques périnucléaires et l'intensité du signal fluorescent semble similaire dans les cellules qui expriment LAMP-2 Δ TM (G7) et dans les cellules contrôles (F2).

Par ailleurs, il apparaît que, aussi bien dans les cellules F2 que G7, l'intensité du signal fluorescent est plus intense en absence qu'en présence de sérum dans le milieu de culture. Cela pourrait être dû à une augmentation du nombre de vacuoles d'autophagie induite par la privation de sérum puisque la membrane des vacuoles d'autophagie renferme des protéines LAMP-1/2. Comme LAMP-2 joue un rôle dans la formation des vésicules d'autophagie (Eskelinen et al., 2002; Tanaka et al., 2000) et dans l'autophagie médiée par les chaperonnes, un phénomène qui est stimulé en cas de jeûne (Cuervo et al., 2000), il n'est pas surprenant d'observer une augmentation de l'intensité du signal plus importante avec l'anticorps anti-

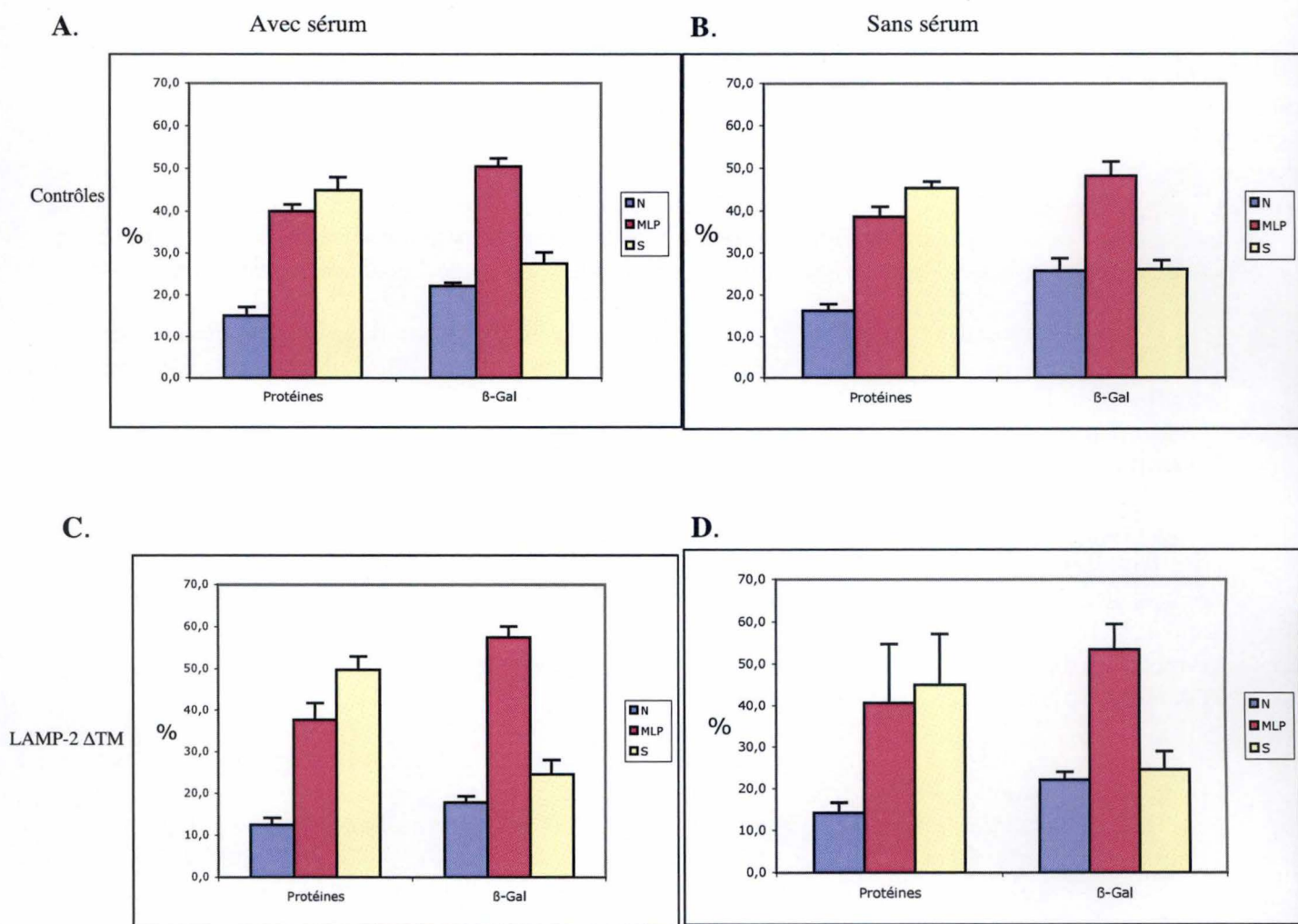


Fig. 8. Distribution des protéines et des lysosomes dans des cellules HepG2 exprimant LAMP-2 Δ TM et dans des cellules contrôles après incubation avec et sans sérum. Lors de trois expériences différentes, les cellules contrôles (A et B) et exprimant LAMP-2 Δ TM (C et D) ont été incubées pendant 24h en absence (B et D) ou en présence (A et C) de sérum 10%. Elles ont ensuite été homogénéisées dans du saccharose M/4 via 3 x 6 passages au Dounce et les homogénats ont été soumis une centrifugation à 500g pendant 10 min pour obtenir une fraction N (riche en noyaux et en membranes plasmiques). Le surnageant post-nucléaire a ensuite été soumis à une centrifugation de 200.000g pendant 15 min, de façon à obtenir une fraction MLP (contenant tous les compartiments cellulaires) et une fraction S (contenant principalement les éléments cytoplasmiques). Les figures représentent la moyenne \pm 1 SD de la distribution (en pourcentage) des protéines et de l'activité de la β -galactosidase .

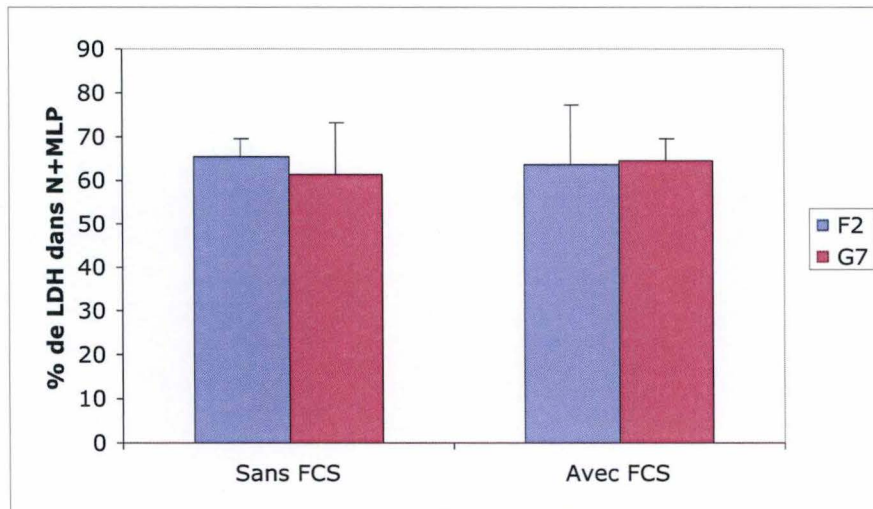


Fig. 9. Compartimentalisation de la LDH dans des cellules HepG2 exprimant LAMP-2 Δ TM (G7) et dans des cellules contrôles (F2) après incubation avec et sans sérum. Les cellules contrôles (F2) et les cellules exprimant LAMP-2 Δ TM (G7) ont été incubées pendant 24h en présence ou en absence de FCS 10%. Ensuite, elles ont été homogénéisées dans du saccharose M/4 via 3 x 6 passages au Dounce et les homogénats ont été soumis à une centrifugation à 500g pendant 10 min pour obtenir une fraction N (riche en noyaux et en membranes plasmiques). Le surnageant post-nucléaire a ensuite été soumis à une centrifugation de 200.000g pendant 15 min, de façon à obtenir une fraction MLP (contenant tous les compartiments des cellulaires) et une fraction S (contenant principalement les éléments cytoplasmiques). La figure représente en pourcentage, l'activité de la LDH se trouvant dans les compartiments N+MLP (moyennes \pm 1 SD, n= 3).

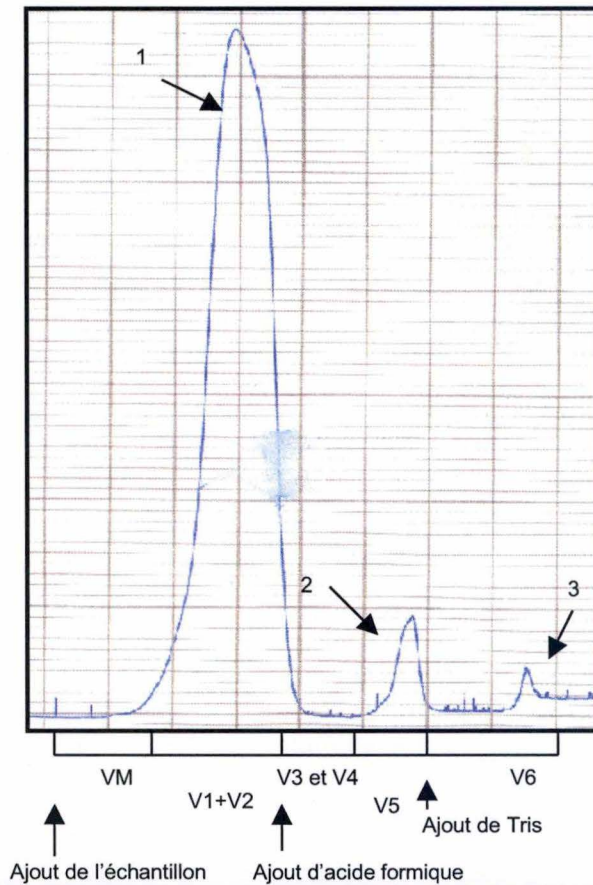
LAMP-2 qu'avec l'anticorps anti-LAMP-1. Il aurait été intéressant d'observer des différences entre les cellules contrôles et les cellules exprimant LAMP-2 Δ TM de rat mais ce n'est apparemment pas le cas.

4. Test d'autophagie sur les clones stables

Pour déterminer si la privation de sérum conduit à une stimulation de l'autophagie, nous avons mesuré le degré de compartimentalisation de la lactate déshydrogénase (LDH), comme décrit dans la littérature (Kopitz et al., 1990). La LDH est une enzyme principalement cytosolique qui peut dès lors être séquestrée dans des vacuoles d'autophagie où elle demeure active pendant un certain temps avant d'être dégradée par les enzymes lysosomales. La mesure de l'activité de la LDH dans des compartiments sédimentables permet donc d'obtenir une indication fiable du taux d'autophagie, à condition d'incuber les cellules avec des inhibiteurs de protéases (Kopitz et al., 1990).

Avant de réaliser ce test, nous avons essayé de mettre au point un protocole de fractionnement subcellulaire adapté aux cellules HepG2. Après plusieurs tentatives, nous avons suivi le protocole suivant. Nous avons homogénéisé les cellules dans du saccharose isotonique glacé par 3 x 6 passages dans un Dounce séparés par une étape de centrifugation à 540 g pendant 10 min pour obtenir une fraction nucléaire (fraction N, riche en noyaux et en membranes plasmiques) et une fraction post-nucléaire (contenant la majorité des organites et les éléments non sédimentables des cellules). Nous avons ensuite centrifugé la fraction post-nucléaire pendant 15 min à 200.000 g afin de récolter une fraction sédimentable (fraction MLP, contenant tous les compartiments membranaires) et une fraction non sédimentable (fraction S, contenant principalement les éléments cytoplasmiques). Nous avons dosé les protéines et mesuré l'activité de la β -galactosidase (β -gal), un marqueur des lysosomes, dans chacune des fractions récoltées. Ce protocole a été appliqué lors de trois expériences indépendantes, réalisées sur des cellules F2 et G7 incubées pendant 24h avec ou sans sérum. Les moyennes et les écarts-types des dosages de protéines et de β -galactosidase sont présentés à la **Fig. 8**. Quels que soient le clone et les conditions de culture, la distribution des protéines et celle de la β -galactosidase sont assez similaires : 10 à 20 % de protéines dans la fraction N et 20 à 25 % de β -galactosidase dans les fractions N et S. En ce qui concerne la distribution de la LDH (**Fig. 9**), nous n'observons pas de différence significative entre les cellules exprimant LAMP-2 Δ TM et les cellules contrôles ni entre les cellules nourries normalement et les cellules privées de sérum. Il semble donc qu'il n'y ait pas d'augmentation de l'autophagie lorsque les cellules sont incubées en absence de sérum ni lorsque les cellules expriment la protéine LAMP-2 Δ TM de rat. Cependant, le taux élevé d'activité LDH (environ 60 %) retrouvée dans les compartiments membranaires soulève la question de l'adsorption éventuelle de la LDH sur les membranes. Dans les expériences pilotes, Kopitz et al. (1990) ajoutaient du Tween 20, de l'albumine bovine (BSA) et du dithiothréitol (DTT) dans le milieu d'homogénéisation et de centrifugation pour éviter l'adsorption membranaire non spécifique des protéines cytosoliques. En réalité, ces ajouts avaient peu d'impact sur la LDH puisque par rapport à la condition basale, le % de LDH sédimentable diminuait seulement de 4 à 3 % (Kopitz et al., 1990). Alternativement, il est possible que des protéines cytosoliques soient libérées pendant le lavage des cellules avant homogénéisation, suite à la rupture de la membrane plasmique. Dans ce cas, l'activité LDH mesurée dans la fraction S serait évidemment sous-estimée. Enfin, nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse que, dans nos conditions de culture, les cellules HepG2 présentent un niveau basal d'autophagie déjà élevé et que la mise à jeun n'accentue pas le phénomène. Pour y voir plus clair, il faudrait cultiver des cellules HepG2 en présence de 3-méthyladénine, un inhibiteur spécifique de l'autophagie (Hendil et al., 1990; Kopitz et al., 1990) ou mieux observer les cellules en microscopie électronique.

A.



B.

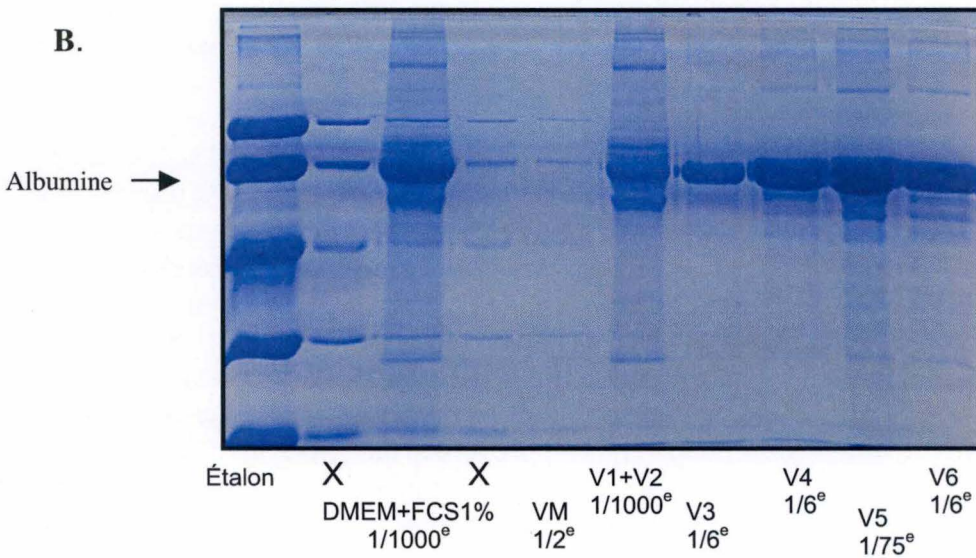


Fig. 10. Chromatographie d'affinité sur du milieu de culture. Après une incubation de 24h dans du milieu contenant 1% de FCS, nous avons passé le milieu de culture sur une colonne d'affinité contenant des anticorps de lapin anti-albumine bovine, fixés sur une matrice de sépharose. Nous avons récupéré des volumes correspondant au volume mort (VM), les volumes V1+V2 qui contiennent les protéines non retenues par la colonne et détectées par un spectrophotomètre UV (pic n°1 du A.), les volumes V3 et V4 obtenus après l'ajout d'acide formique 2%, le volume V5, qui contient l'albumine éluée (pic n°2) et le volume V6, obtenu après l'ajout de Tris 2M pH 8 (pic n°3). Les différents volumes ont ensuite été concentrés sur Amicon Ultra 15 et précipités au TCA 10%. Enfin, les protéines ont été dénaturées à 95°C en présence de SDS et de DDT puis déposées sur un gel de polyacrylamide 10% pour un SDS-PAGE. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie.

5. Elimination de l'albumine sérique par chromatographie d'affinité.

Lorsque l'on cultive des cellules dans un milieu enrichi en sérum, on ajoute de nombreuses protéines exogènes, la principale étant l'albumine. Par exemple, le sérum de veau fœtal additionné à notre milieu de culture à une concentration de 10%, contient 3,72 mg/ml de protéines dont 1,87 mg/ml d'albumine (Greiner Bio-One). L'apport de ces protéines sériques est nécessaire à la prolifération et la croissance des cellules mais dans le cadre d'une étude du sécrétome, cela risque de masquer des différences d'abondance potentielles de protéines sécrétées par les cellules G7 et F2. On pourrait également craindre une déformation du gel 2-D là où se trouve l'albumine. Pour résoudre le second problème, nous avons essayé de nous débarrasser de l'albumine sérique présente dans le milieu de culture en réalisant une chromatographie d'affinité.

Après une incubation de 24h dans du milieu contenant 1% de sérum, nous avons passé nos échantillons sur une colonne d'affinité contenant des anticorps de lapin dirigés contre l'albumine bovine et fixés sur une matrice de sépharose 4D. La séquence humaine de l'albumine présentant un fort taux d'homologie avec la séquence de l'albumine bovine, il est probable que l'albumine sécrétée par les cellules HepG2 soit également reconnue par les anticorps greffés sur cette matrice d'affinité. A la sortie de la colonne, nous avons récupéré des volumes correspondant au volume mort (VM) représentant le volume que contient la colonne avant la sortie des protéines non retenues, les volumes poolés V1+V2 qui contiennent les protéines non retenues par la colonne et détectées par un spectrophotomètre UV, les volumes V3 et V4 obtenus après l'ajout d'acide formique 2% (nécessaire pour l'élué de l'albumine), le volume V5, qui contient l'albumine éluée par l'acide formique et le volume V6, obtenu après l'ajout de Tris-HCl 2M pH 8, utilisé pour neutraliser le pH de la colonne et entraîner un maximum d'albumine qui ne serait pas encore éluée. La hauteur des pics d'albumine présentés à la **figure 10A** peut paraître faible par rapport au pic des protéines non retenues par les anticorps immobilisés sur la colonne. Cela est dû au fait que le phénol rouge contenu dans les milieux de culture présente une absorbance dans les UV. Par conséquent, la surface sous le premier pic n'est pas indicative de la quantité réelle de protéines.

Un des désavantages de la chromatographie, c'est la dilution des échantillons. Pour concentrer les protéines avant électrophorèse, nous avons procédé en deux étapes : d'abord nous avons effectué une centrifugation sur filtre Amicon Ultra-15 d'un *cut-off* de 10kDa (Millipore), puis nous avons précipité les protéines avec du TCA 10%. Les protéines contenues dans les différents volumes recueillis à la sortie de la colonne ont ensuite été séparées sur gel de polyacrylamide 10% et colorées au bleu de Coomassie pour déterminer si l'albumine avait été efficacement enlevée lors de la chromatographie d'affinité (**Fig.10B**). La bande d'intensité élevée que l'on aperçoit dans tous les échantillons (à l'exception du volume mort) correspond à l'albumine; sa masse moléculaire apparente et la comigration de cette bande avec l'albumine présente dans les étalons en attestent. Les bandes observées dans les pistes vides et la piste VM correspondent aux étalons qui ont diffusé dans le gel. Lorsque nous examinons les pistes V3 à V6, nous ne pouvons pas comparer l'intensité des bandes puisque nous n'avons pas déposé la même proportion d'échantillon mais il est évident qu'une quantité importante d'albumine a été éliminée lors de la chromatographie d'affinité. Néanmoins, il reste de l'albumine dans le milieu de culture puisque la bande d'environ 70 kDa est toujours massivement présente dans les volumes V1+V2 qui correspondent aux protéines non retenues par la colonne

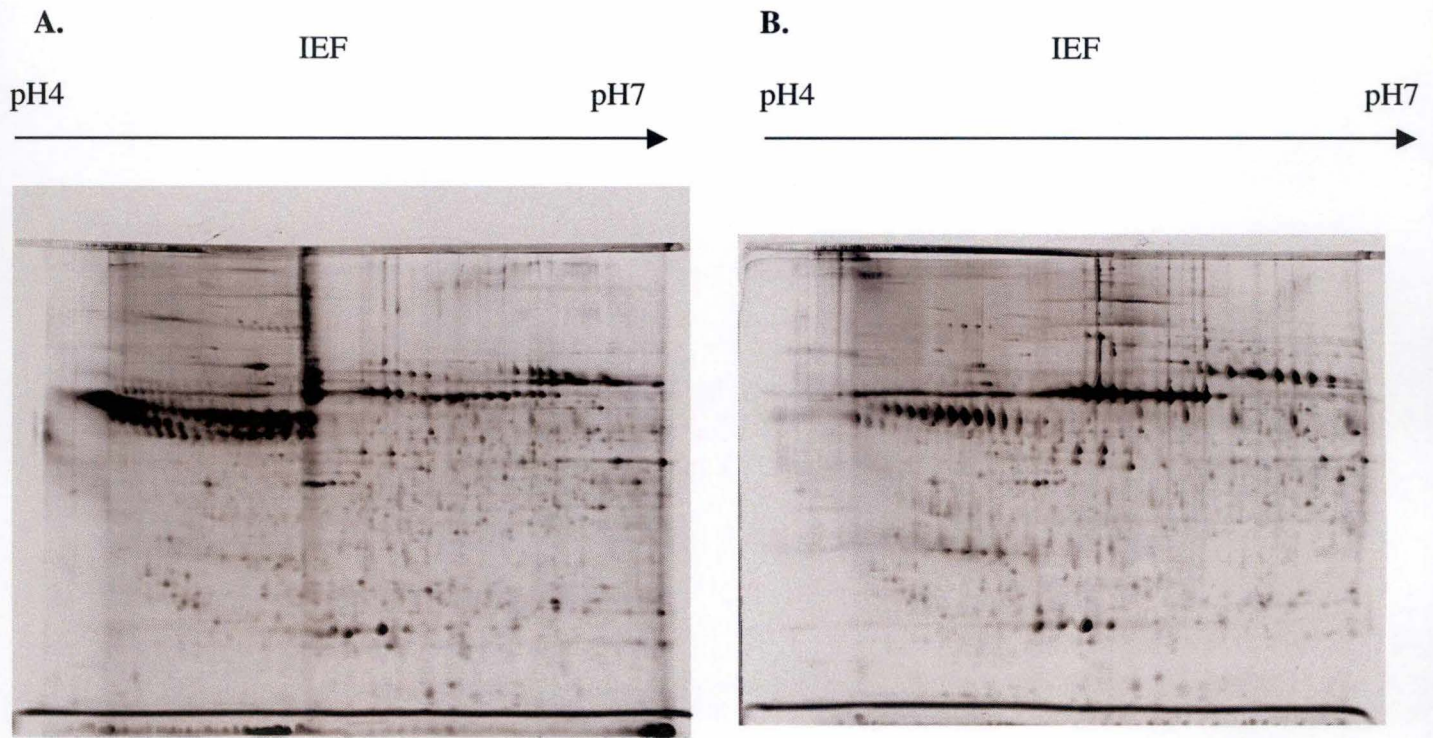


Fig.11. Gels 2D réalisés sur des milieux de culture de cellules HepG2 incubées avec du sérum 1% (A) ou sans (B) sérum. Le milieu contenant du sérum a été passé sur colonne de chromatographie. Dans les 2 conditions, les échantillons ont été concentrés sur un filtre Amicon Ultra 15, précipitées avec le kit *clean up* puis resuspendus dans un tampon de solubilisation. Les protéines ont été marquées avec Cy3 et soumises à une séparation en 2D : isoelectric focusing (IEF) (gradient de pH 4 -7) puis SDS-PAGE (gels 10%). Les gels ont été scannés au *Typhoon* (GE Healthcare).

Pour déterminer si cette quantité d'albumine pouvait perturber la migration des protéines sécrétées sur gel 2-D, nous avons comparé le profil électrophorétique sur gel 2-D de protéines sécrétées provenant de milieu contenant 1% de FCS et passé sur colonne d'affinité, avec celui de protéines sécrétées, contenues dans un milieu sans sérum. Dans les deux cas, les protéines ont été précipitées avec le kit *clean up* (GE Healthcare), resuspendues dans un tampon Tris/Urée pH 8,5 et marquée avec des sondes fluorescentes CY3 (GE Healthcare). Les protéines ont d'abord migré dans un gradient de pH allant de pH 4 à pH 7, en fonction de leur point isoélectrique (première dimension) et ensuite, dans un gel de polyacrylamide 10% en présence de SDS, en fonction de leur poids moléculaire (deuxième dimension). Les profils de distribution sont présentés à la **figure 11**. Ils ressemblent tous deux à des profils de secrétomes obtenus auparavant dans l'Unité de Recherche en Biologie Cellulaire et Moléculaire (URBC) des FUNDP à Namur (C. Gustin et E. Delaive, communications personnelles) ou publiés dans la littérature (Sanchez et al., 1995). Ils montrent dans les deux conditions (avec ou sans sérum) une bonne séparation des protéines. Toutefois, sur le gel contenant les protéines solubles récoltées en présence de FCS (à gauche), on observe une traînée verticale vers le milieu du gel. Celle-ci est probablement liée à présence d'albumine puisque'elle a un point isoélectrique d'environ 5-6. Dans ce gel, on observe également un plus grand nombre de spots (principalement dans 2^e tiers supérieur) par rapport au secrétome des cellules incubées en absence de sérum. Par comparaison avec un protéome de plasma bovin trouvé dans le serveur <http://www.expasy.ch>, ces spots supplémentaires pourraient correspondre à des inhibiteurs de protéases, à des agents anti-coagulants ou à des globulines présents dans le sérum.

Pour cette raison, dans le cadre de l'analyse comparative des secrétomes des cellules transfectées avec LAMP-2 Δ TM et celui des cellules contrôles, nous avons choisi d'incuber les cellules en absence de sérum. Cela nous permettra de charger sur les gels plus de protéines réellement sécrétées par les cellules et augmenter ainsi la probabilité d'observer des différences d'abondance entre les cellules contrôles et les cellules exprimant LAMP-2 Δ TM. Il est probable que cette privation de sérum stimule l'autophagie, comme le suggère l'examen morphologique des cellules en microscopie fluorescente confocale (**Fig. 7B et 7C**) mais cela n'a pas pu être mis en évidence avec les études de compartimentalisation de la LDH (**Fig. 9**).

6. Analyse par la technique du 2-D-DIGE des secrétomes de HepG2 incubées pendant 24h sans sérum

La technique d'analyse 2-D-DIGE consiste à marquer les protéines provenant de cellules tests et de cellules contrôles avec des sondes fluorescentes différentes (les cyanines qui se fixent sur les lysines), de les faire migrer ensemble dans un même gel de 2 dimensions, pour ensuite comparer la variation de l'abondance des protéines dans les 2 conditions expérimentales en mesurant l'intensité des spots.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons effectué 3 gels dans lesquels nous avons chargé des protéines provenant de milieux de culture de cellules LAMP-2 Δ TM et de cellules contrôles après incubation de 24h sans sérum et marquées avec les sondes Cy3 ou Cy5. Chaque gel contient en outre un standard, composé d'un mélange d'une même quantité de protéines provenant de chaque échantillon et marquées avec la sonde Cy2. Ce standard interne permet d'éliminer les variations entre gels, en normalisant par rapport à un gel « master ».

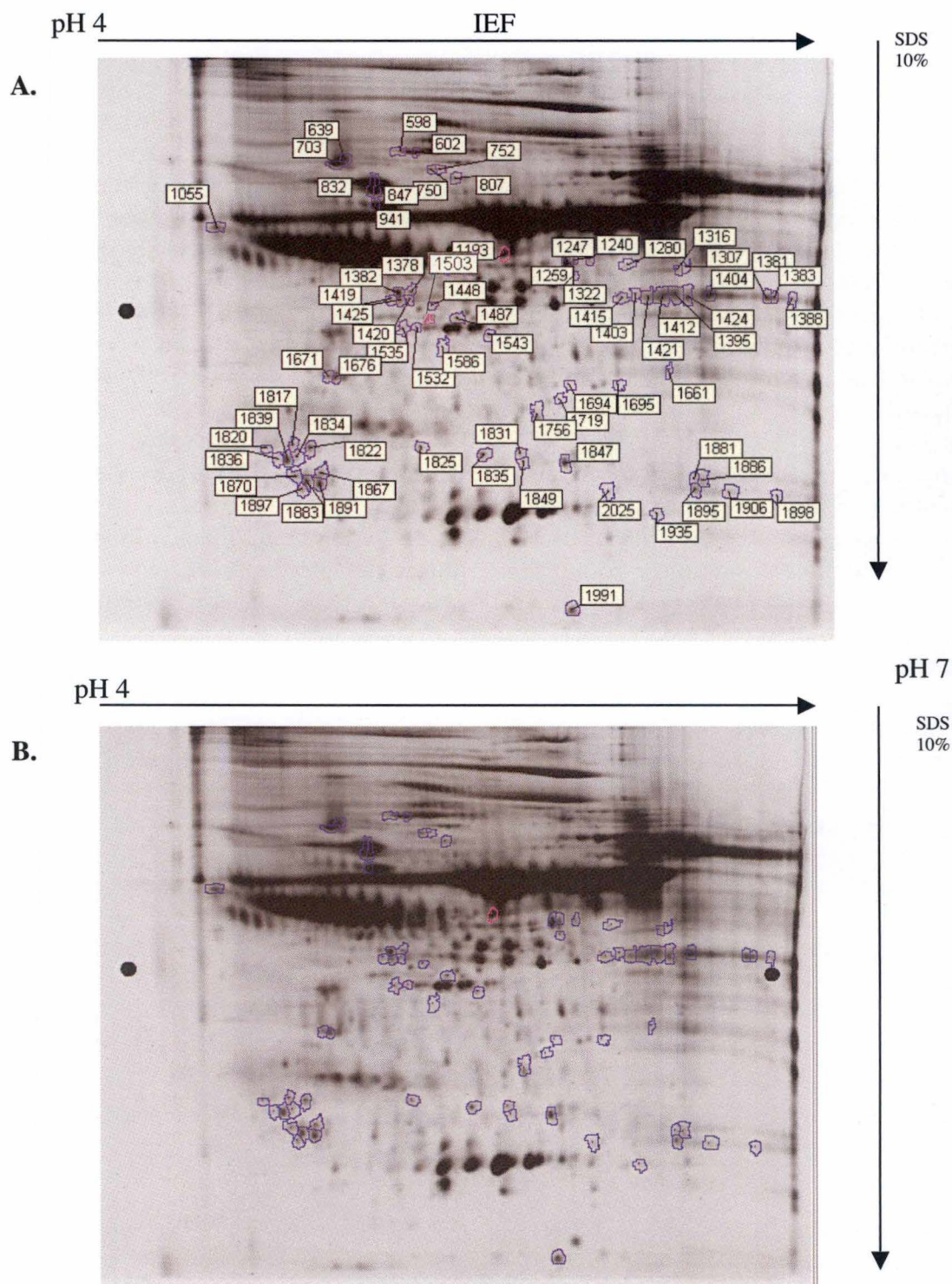


Fig.12. Gels 2D-DIGE de sécrétomes de cellules HepG2 contrôles ou exprimant LAMP-2 Δ TM de rat. Les échantillons des deux conditions ont été concentrés par centrifugation sur filtre Amicon (*cut-off* de 10 kDa) et par précipitation avec le kit *clean up*. Après solubilisation dans un tampon adéquat, les protéines ont été marquées avec des cyanines Cy3 et Cy5. 3 gels 2D ont été réalisés, chacun contenant des échantillons des cellules contrôles et tests ainsi qu'un contrôle interne marqué avec des cyanines Cy2. L'étude analytique a été réalisée par le programme DeCyder 6.5. Les spots d'intérêt (ceux présentant une augmentation d'abondance significative) ont été prélevés. Ils sont annotés sur l'image A. L'image B représente ce même gel sans les annotations.

Il est à noter que seulement un faible pourcentage des protéines est marqué et que l'ajout de cyanines (500 daltons) fait légèrement varier la masse moléculaire des protéines (plus ou moins en fonction de leur taille) et ne change pas leur point isoélectrique (PI).

Dans les expériences de 2-D-DIGE classiques, on effectue d'abord des gels dits analytiques, chargés avec 25 μg de protéines par condition. Ces gels contiennent une quantité suffisante de protéines pour effectuer une analyse de la variation d'intensité des spots mais si on veut par la suite récolter et identifier les protéines par spectrométrie de masse, il faut en général effectuer une deuxième série de gels (préparatifs). Ceux-ci sont chargés avec 2-4 fois plus de protéines et sont colorés avec du KryptonTM (Pierce). Les spots à prélever sont repérés par superposition des images correspondant aux gels préparatifs et analytiques, ce qui n'est pas toujours aisé. Nous avons opté pour une méthode alternative qui consiste à mélanger aux 75 μg de protéines provenant des cellules tests G7 et des cellules contrôles F2, marquées avec les cyanines (25 μg par condition + 25 μg pour le standard interne, comme pour un gel analytique) 40 μg de protéines non marquées provenant d'un mélange en quantité équivalente des 6 échantillons. L'étude analytique comparative s'effectue sur le faible pourcentage de protéines marquées avec les cyanines tandis que la localisation de la totalité des protéines est déterminée après coloration du même gel avec le Krypton. Cette approche est moins coûteuse, plus rapide et permet de récolter une quantité suffisante de protéines en vue de l'identification par spectrométrie de masse. L'analyse des gels à l'aide du programme DeCyder 6.5 (GE Healthcare) nous a permis de dresser une liste de 95 spots potentiellement intéressants. Nous avons retenu les spots présentant une augmentation d'abondance dans les cellules exprimant LAMP-2 ΔTM par rapport aux cellules contrôles de 3 fois ou plus, avec un seuil de confiance de 99,5% et de 2 fois ou plus, avec un seuil de confiance de 99,9%. Selon notre hypothèse, l'expression de LAMP-2 ΔTM pourrait entraîner une augmentation de la sécrétion de certaines protéines lysosomales, nous ne nous sommes donc pas intéressés aux spots dont l'intensité diminuait. Malgré l'approche utilisée, il n'a pas été facile de retrouver tous ces spots après coloration au Krypton. Finalement, de la liste initialement établie grâce au logiciel DeCyder, nous avons retrouvé et prélevé 71 spots, dispersés un peu partout sur les gels (**Fig.12, Tableau III**).

7. Identification des spots par spectrométrie de masse

Les spots récupérés ont été trypsinisés « *in gel* ». Les peptides obtenus à partir des 3 gels ont été analysés en spectrométrie de masse par MALDI-TOF (MALDI MX, Waters). Grâce au logiciel MASCOT (Matrix Science) qui interroge les banques de données, en l'occurrence une banque de génome humain (NCBI), 40 protéines ont pu être identifiées à partir des 71 spots prélevés. Celles-ci sont reprises dans le **Tableau IV**. Les spots qui ne sont pas repris dans cette liste n'ont pas pu être identifiés ou alors sans un degré de confiance suffisant.

Quand on parcourt cette liste des yeux, on peut s'étonner de l'absence de LAMP-2 ΔTM . Comme nous l'avons démontré, nos cellules G7 expriment et sécrètent une forme tronquée de LAMP-2 de rat. Comme son PI est de 2-4 et son PM de 100 kDa (Journet et al., 2000), LAMP-2 devrait se trouver dans le coin supérieur gauche des gels 2-D. C'est effectivement à cet endroit que J. Garin et M. Desjardins l'ont localisée lors d'une étude protéomique de phagosomes. Nous n'avons pas de spot correspondant à nos critères de sélection dans cette zone. Pourtant, LAMP-2 ΔTM est bien sécrétée puisque nous l'avons

N° position	T-Test	augmentation
598	0,00017	2,96
602	7.6 ^e -005	2,51
639	0,0044	3,83
703	0,00022	2,37
750	0,0023	3,58
752	0,0033	3,73
807	0,00026	3,44
832	0,0028	3,17
847	0,0044	3,09
941	0,00011	2,06
1055	0,0018	4,19
1193	0,00018	2,63
1240	0,00026	2,11
1247	0,00015	2,84
1259	0,00019	2,88
1280	0,00011	3,34
1307	0,0019	3,31
1316	0,0034	3,94
1322	0,0024	3,32
1378	0,00083	3,02
1381	0,00013	3,70
1382	0,00017	3,52
1383	0,0014	3,79
1388	0,00028	3,83
1395	0,0012	3,52
1403	0,0020	3,29
1404	0,0031	3,68
1412	0,0035	3,52
1415	0,00015	2,70
1419	0,0041	3,63
1420	0,00037	3,40
1421	0,00041	3,06
1424	0,0012	3,76
1425	0,0017	3,85
1448	0,00033	2,82
1487	0,00076	4,12
1503	3.1e-005	5,07
1532	0,00015	3,21
1535	0,00028	6,53
1543	0,0034	3,47
1586	3.7e-005	2,74
1661	0,0036	3,70
1671	0,00048	2,06
1676	0,00032	3,34
1694	0,00041	4,46
1695	8.8e-005	2,38
1719	0,0017	3,25
1756	0,00022	2,99
1817	0,0017	4,11
1820	0,00094	3,41
1822	0,0015	3,11
1825	0,0034	3,19
1831	0,0011	3,87
1834	0,0021	3,35
1835	0,0017	3,16
1836	9.2e-005	5,17
1839	0,0023	4,00
1847	0,0011	3,13
1849	0,00066	3,40
1867	0,0036	3,52
1870	0,0027	4,11
1881	0,0013	3,10
1883	0,0014	4,12
1886	0,0034	3,12
1891	0,0049	4,23
1895	0,0028	3,35
1897	0,0025	3,26
1898	0,0015	3,06
1906	0,0012	3,60
1935	0,0018	3,08
1991	0,00077	3,21
2025	0,00092	2,55

Tableau III : Liste des spots a piquer, les valeurs du T-test et le taux d'augmentation.

détectée par Western blot sur les milieux de culture. Plusieurs raisons peuvent expliquer l'absence de LAMP-2 Δ TM dans le sécrétome des cellules G7. *Primo*, pendant la préparation des échantillons, LAMP-2 Δ TM n'a peut-être pas été précipitée efficacement avec le TCA 10 % ou elle a été précipitée mais mal resuspendue dans le tampon de lyse. Signalons que l'abondante glycosylation des LAMPs (50% de leur masse moléculaire est constitué d'hydrates de carbone) constitue un obstacle à la précipitation par le TCA. *Secundo*, le gradient de pH utilisé ici pour la première dimension s'étend de pH 4 à pH 7. Comme le PI de LAMP-2 est de 2-4, il est possible que les différentes formes de LAMP-2 soient sorties du gel lors de la migration 1-D. *Tertio*, les protéines sont mal séparées dans cette région du gel et le programme DeCyder n'a pas pu détecter de spots à cet endroit ou le spot étant absent dans le sécrétome des cellules contrôles, il n'a pas pu les « matcher » avec le ou les spot(s) correspondants, présents dans le sécrétome des cellules tests. Dans les deux cas, il serait impossible de localiser LAMP-2.

Une deuxième constatation est qu'il n'y a pas de protéines lysosomales avérées dans la liste des protéines analysées. L'absence d'hydrolases acides sécrétées en plus grande quantité par les cellules exprimant LAMP-2 Δ TM ne signifie pas que LAMP-2 n'intervient pas dans le transport des hydrolases acides ou dans la biogenèse des lysosomes. Il n'est pas impossible que la quantité sécrétée soit trop faible pour atteindre le seuil de détection, d'autant plus qu'elles sont noyées parmi toutes les protéines solubles, présentes dans le milieu de culture.

Il est possible qu'elles soient clivées dans le milieu de culture et que les fragments peptidiques ainsi générés soient trop petits ou contiennent un nombre insuffisant de résidus lysine pour pouvoir être détectés et identifiés. Enfin, on ne peut pas exclure la possibilité d'une recapture des protéines lysosomales, éventuellement sécrétées suite à l'expression de LAMP-2 Δ TM, via des récepteurs au mannose 6-phosphate présents à la surface cellulaire.

Dans la liste, il y a beaucoup de protéines qui ne devraient pas être sécrétées mais qui sont quand même retrouvées dans le milieu de culture. Par exemple, des protéines nucléaires comme la nucléoline et la sous unité-1 de la protéine activatrice de SUMO1. On retrouve également plusieurs éléments du protéasome ainsi que plusieurs chaperonnes moléculaires. On pourrait imaginer que l'expression de LAMP-2 Δ TM dans les cellules HepG2 provoque une augmentation de la biosynthèse des protéines chaperonnes pour aider au repliement adéquat de cette protéine exogène hautement glycosylée et une augmentation de protéines appartenant au protéasome 26S aurait pour but de dégrader les protéines LAMP-2 Δ TM mal repliées. Toutefois, les protéines Hsp70 et Hsp90 sont des protéines chaperonnes qui agissent surtout sur des protéines cytosoliques (Ellgaard and Helenius, 2003). Par conséquent, il est difficile d'expliquer pourquoi ces protéines cytosoliques sont libérées dans le milieu extracellulaire et surtout pourquoi elles se retrouvent en plus grande quantité dans le milieu de culture des cellules exprimant LAMP-2 Δ TM que dans celui des cellules contrôles.

La seule protéine contenue dans la liste qui est impliquée dans le trafic intracellulaire des hydrolases acides est TIP47. En réalité, TIP47 intervient dans le retour des récepteurs au M6P des endosomes tardifs vers le Golgi (Diaz and Pfeffer, 1998). C'est une protéine cytosolique recrutée sur les membranes des endosomes par Rab9 et qui pourrait servir de protéine adaptatrice ou de protéine de recouvrement après interaction avec des motifs présents dans la queue cytoplasmique des MPRs et après oligomérisation de son domaine N-terminal (Diaz and Pfeffer, 1998). Il s'agit donc d'une protéine potentiellement intéressante dans le cadre de nos travaux sur le trafic de protéines lysosomales mais dont on peut s'étonner de la présence dans le milieu de culture.

Position	Nom	Localisation	Fonctions connues
598-602	Hsp 70	Cytoplasme, translocation vers les mitochondries et le RE	Protéine chaperonne en réponse à des stress cellulaire
639	Nucléoline	Noyau	Induit la décondensation de la chromatine ; jouerait un rôle dans la transcription du pre-ARNr et l'assemblage des ribosomes.
703	Précurseur de l'endoplasmine	Lumière du RE	Chaperonne qui intervient dans le clivage et le transport de protéines sécrétées.
750-752	ATPase du réticulum endoplasmique transitionnel	Cytoplasme et Noyau	Rôle dans formation des sacs du Golgi ; impliqué dans la formation du RE transitionnel ; impliqué dans un complexe qui envoie des protéines ubiquitinées au protéasome.
832-847	Hsp 90 alpha	Cytoplasme	Chaperonne moléculaire.
941	Bip protéine	Lumière du RE	Rôle de dans le repliement et l'assemblage des protéines multimériques à l'intérieur du RE.
941	Dipeptidyl peptidase 3	Cytoplasme	Clive Arg-Arg-beta-naphtylamide.
1055	Précurseur de la calreticuline	RE, cytoplasme, espace extracellulaire (sécrétée)	Chaperonne moléculaire du cycle calréticuline-calnexine ; interagit transitoirement avec les glycoprotéines monoglycosylées qui sont synthétisée dans le RE.
1193	T-complex protein 1 (TCP1), sous unité theta	cytoplasme	Chaperonne moléculaire, in vitro joue un rôle dans le repliement moléculaire de l'actine et de la tubuline.
1240-1247-1259	Protein disulfide isomerase	Lumière du RE	Catalyse le réarrangement des ponts disulfures des protéines.
1247	ATP synthase vacuolaire, sous unité B	Protéine membranaire périphérique	Sous-unité non catalytique du complexe V1 de l'ATPase vacuolaire.
1280	Tryptophan-tRNA ligase	Cytoplasme	Ligase.
1307-1316	TCP1 sous unité beta	Cytoplasme	Chaperonne moléculaire, in vitro joue un rôle dans le repliement moléculaire de l'actine et de la tubuline.
1322	Dipeptidase cytosolique non-spécifique	Cytoplasme	Peptidase.
1378-1382	Protein disulfide isomérase A5	Lumière du RE	Catalyse le réarrangement des ponts disulfures des protéines.
1381-1383-1388-1393-1395-1403-1404	Alpha enolase	Cytoplasme, Membrane cellulaire et Noyau.	Enzyme multifonctionnelle jouant un rôle dans la glycolyse, le contrôle de la croissance, la résistance à l'hypoxie, les réponses allergiques, est également récepteur et activateur du plasminogène et serait répresseur transcriptionnel et suppresseur de tumeur.
1404-1412-1415-1421	Rab GDP dissociation inhibitor 2	Cytoplasme et Membrane	Régule les réactions d'échange GDP/GTP de la plupart des protéines Rab en inhibant la dissociation du GDP.
1419-1420	26S protease regulatory subunit 4	Cytoplasme et Noyau	Impliqué dans la dégradation ATP indépendante des protéines ubiquitinées
1424	Erb3 binding protein 1	Cytoplasme et Noyau	Transduction du signal ; régulation de la croissance.
1448	26S proteasome subunit 6A	Cytoplasme et Noyau	Impliqué dans la dégradation ATP indépendante des protéines ubiquitinées
1487	Actine	Cytoplasme	Protéine impliquée dans différents types de motilité cellulaire
1503	Tip-47	Cytoplasme et Endosome	Requis pour le transport du récepteur du M6PR des endosomes vers le réseau transgolgien.

1532	Apolipoprotéine A-IV	Sécrétée	Peut avoir un rôle dans la sécrétion et le catabolisme des chylomicron et des VLDL
1535	Cytokératine 8	Cytoplasme	Activité structurale, rôle dans l'organisation et la biogenèse du cytosquelette
1543	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1	Cytoplasme et RE	Cochaperonne qui active l'activité ATPase de Hsp 90. Peut jouer un rôle dans le trafic du RE au Golgi.
1586	SUMO1 activating enzyme subunit 1	Noyau	Médie l'activation ATP-dépendante de SUMO1
1695	Acidic ribosomal protein P0	Cytoplasme	Équivalent fonctionnel de la protéine L10 de <i>E. Coli</i> .
1719	Sulfotransférase des sels biliaire	Cytoplasme	Catalyse la sulfations des stéroïdes et de l'acide biliaire dans le foie.
1756	Fibrinogen-like protein 1 precursor	Sécrétée	Activité mitogène des hépatocyte
1817	Tropomyosine 4	Cytoplasme	Dans les cellules non musculaires, se lie au filament d'actine pour stabiliser les filaments d'actine du cytosquelette
1822-1826	Tropomyosine 3	Cytoplasme	Idem
1825	Chloride intracellular channel protein 1	Membrane nucléaire, cytoplasme, membrane cellulaire	Agit comme un canal à ions chlore
1836-1839	14-3-3 protein epsilon	Cytoplasme	Protéine adaptatrice impliquée dans la régulation de voies de signalisation spécialisée et générale.
1844-1847	Proteasome activator PA28 alpha chain	Cytoplasme	Impliqué dans l'assemblage de l'immunoprotéasome.
1881	Phosphoglycerate mutase 1	Cytoplasme	Impliquée dans la glycolyse
1883	14-3-3 protein zeta	Cytoplasme	Protéine adaptatrice impliquée dans la régulation de voies de signalisation spécialisée et générale.
1886-1935	Proteasome endopeptidase complex	Cytoplasme et noyau	Elément du protéasome
1895	Antioxydant protein 2	Cytoplasme, lysosome, vésicule cytoplasmique.	Réponse au stress oxydatif et processus catabolique des phospholipides
1897	Sous-unité alpha 5 du protéasome	Cytoplasme et noyau	Elément du protéasome
1898-1906	Triosephosphate isomerase		Triose phosphate isomerase

Tableau IV : Tableau reprenant les spots analysés, leur nom, leur localisation et leurs fonctions connues.

Conclusions

IV. Conclusions

Il est généralement considéré que les hydrolases lysosomales néosynthétisées sont transportées jusqu'aux endo/lysosomes après interaction avec les récepteurs au mannose 6-P. Cependant, dans certains organes (dont le foie et les reins) des patients atteints de l'*I-cell disease*, qui sont dans l'incapacité de synthétiser le signal M6P, certaines enzymes telles que la β -galactosidase et la cathepsine D se trouvent dans les lysosomes en quantité normale. Il doit donc exister des mécanismes de transport des protéines lysosomales solubles, indépendants du mannose 6-P. A ce jour, ces mécanismes n'ont toujours pas été découverts, même si une association membranaire a souvent été proposée. Une autre question non résolue concerne les mécanismes de transport des hydrolases lysosomales vers les lysosomes.

Des travaux réalisés dans notre laboratoire ont démontré qu'à pH légèrement acide, les protéines lysosomales formaient des assemblages supramoléculaires de nature lipo-protéique, impliquant de nombreuses hydrolases lysosomales solubles mais aussi la participation d'une protéine membranaire : LAMP-2. L'agrégation de ces protéines lysosomales pourrait jouer un rôle dans le transport et la maturation des hydrolases acides, de la même façon que l'agrégation des granines dans le TGN assure leur transport vers la voie sécrétoire régulée.

L'objectif principal de ce mémoire était d'examiner le rôle de LAMP-2 dans le transport des hydrolases lysosomales. Nous aurions pu choisir d'étudier le trafic des hydrolases lysosomales dans des cellules (ou dans des tissus où l'expression de LAMP-2 est inhibée (siRNA ou souris KO). Par opportunisme, nous avons choisi une voie différente qui consiste à transfecter des cellules HepG2 avec une forme tronquée de LAMP-2 de rat et d'étudier leur sécrétome par la technique d'électrophorèse 2-D. Si LAMP-2 joue un rôle dans le transport des protéines lysosomales solubles, l'expression de cette protéine LAMP-2 dépourvue du segment transmembranaire et de la queue cytoplasmique (donc dépourvue de signal d'adressage aux lysosomes) devrait entraîner une sécrétion accrue des hydrolases acides dans le milieu de culture.

Dans un premier temps, nous avons transfecté des cellules HepG2 de façon transitoire pour nous assurer que la protéine LAMP-2 TM était exprimée et sécrétée dans le milieu de culture. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de Western blot et d'immunofluorescence avec un anticorps monoclonal (10D10) produit dans notre laboratoire. En immunofluorescence, dans les rares cellules positives, le signal fluorescent était diffus alors que dans les cellules transfectées avec LAMP-2 WT, le marquage mettait en évidence des vésicules sphériques périphériques, correspondant très certainement à des lysosomes (Figure 3). En Western blot, LAMP-2 n'apparaît pas dans les lysats cellulaires mais bien dans les milieux de culture (Figure 2). Ces résultats suggèrent que LAMP-2 Δ TM est comme attendu, exprimée par les cellules HepG2 transfectées et rapidement sécrétée après sa biosynthèse.

Ensuite, nous avons isolé des clones stables pour obtenir une plus grande homogénéité au niveau de l'expression de LAMP-2. Avant de réaliser l'étude protéomique des protéines sécrétées par les lignées stables, nous avons essayé de trouver les conditions optimales de culture cellulaire. D'un côté, nous savions que la présence de sérum dans le milieu de culture, même en faible quantité, risquait de réduire la pertinence de l'analyse protéomique et, d'un autre côté, que l'absence de sérum risquait d'induire l'autophagie. Il est possible d'éliminer une grande quantité d'albumine présente dans du milieu contenant du sérum 1% par chromatographie d'affinité, en utilisant une colonne sur laquelle sont immobilisés des anticorps anti-albumine bovine. Cependant, il en reste une quantité importante, comme le montre la figure 10.

Lorsque l'on incube des cellules HepG2 pendant 24h en absence de sérum, on induit probablement l'autophagie. En microscopie fluorescente confocale, nous avons en effet observé une augmentation de l'intensité des signaux LAMP-1 mais surtout LAMP-2 humains dans les cellules à jeun par rapport aux cellules nourries avec du milieu supplémenté avec du sérum 10% (Figures 7B-C). Comme les deux approches (absence ou présence de sérum 1%) présentent des inconvénients, nous avons décidé d'incuber les cellules en absence de sérum afin d'augmenter nos chances d'observer des variations d'abondance dans le sécrétome des cellules exprimant LAMP-2 Δ TM par rapport aux cellules contrôles.

L'expérience d'électrophorèse 2-D-DIGE n'a malheureusement pas mis en évidence une augmentation significative de la sécrétion de l'une ou l'autre protéines lysosomale avérée (Tableau II). Parmi les 40 protéines identifiées par spectrométrie de masse, seule la protéine TIP47 paraît être intéressante puisqu'elle est impliquée dans le transport rétrograde des récepteurs au mannose 6-P des endosomes tardifs vers le TGN. Cependant, sa présence dans le milieu de culture peut difficilement s'expliquer.

Références
bibliographiques

V. Références bibliographiques

Aguilar, R. C., Boehm, M., Gorshkova, I., Crouch, R. J., Tomita, K., Saito, T., Ohno, H. and Bonifacino, J. S. (2001). Signal-binding specificity of the mu4 subunit of the adaptor protein complex AP-4. *J Biol Chem* **276**, 13145-52.

Akasaki, K., Michihara, A., Mibuka, K., Fujiwara, Y. and Tsuji, H. (1995). Biosynthetic transport of a major lysosomal membrane glycoprotein, lamp-1: convergence of biosynthetic and endocytic pathways occurs at three distinctive points. *Exp Cell Res* **220**, 464-73.

Andrejewski, N., Punnonen, E. L., Guhde, G., Tanaka, Y., Lullmann-Rauch, R., Hartmann, D., von Figura, K. and Saftig, P. (1999). Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. *J Biol Chem* **274**, 12692-701.

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

Barois, N. and Bakke, O. (2005). The adaptor protein AP-4 as a component of the clathrin coat machinery: a morphological study. *Biochem J* **385**, 503-10.

Boman, A. L., Zhang, C., Zhu, X. and Kahn, R. A. (2000). A family of ADP-ribosylation factor effectors that can alter membrane transport through the trans-Golgi. *Mol Biol Cell* **11**, 1241-55.

Bonifacino, J. S. and Glick, B. S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**, 153-66.

Bonifacino, J. S. and Rojas, R. (2006). Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 568-79.

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

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

Buckmaster, M. J., Ferris, A. L. and Storrie, B. (1988). Effects of pH, detergent and salt on aggregation of Chinese-hamster-ovary-cell lysosomal enzymes. *Biochem J* **249**, 921-3.

Chanat, E. and Huttner, W. B. (1991). Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. *J Cell Biol* **115**, 1505-19.

Cook, N. R., Row, P. E. and Davidson, H. W. (2004). Lysosome associated membrane protein 1 (Lamp1) traffics directly from the TGN to early endosomes. *Traffic* **5**, 685-99.

Cuervo, A. M. and Dice, J. F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* **273**, 501-3.

Cuervo, A. M. and Dice, J. F. (2000). Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms. *J Cell Sci* **113 Pt 24**, 4441-50.

Cuervo, A. M., Gomes, A. V., Barnes, J. A. and Dice, J. F. (2000). Selective degradation of annexins by chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* **275**, 33329-35.

Cuervo, A. M., Mann, L., Bonten, E. J., d'Azzo, A. and Dice, J. F. (2003). Cathepsin A regulates chaperone-mediated autophagy through cleavage of the lysosomal receptor. *Embo J* **22**, 47-59.

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

Delbruck, R., Desel, C., von Figura, K. and Hille-Rehfeld, A. (1994). Proteolytic processing of cathepsin D in prelysosomal organelles. *Eur J Cell Biol* **64**, 7-14.

Dell'Angelica, E. C., Mullins, C. and Bonifacino, J. S. (1999). AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J Biol Chem* **274**, 7278-85.

- Dell'Angelica, E. C., Puertollano, R., Mullins, C., Aguilar, R. C., Vargas, J. D., Hartnell, L. M. and Bonifacino, J. S.** (2000). GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J Cell Biol* **149**, 81-94.
- Diaz, E. and Pfeffer, S. R.** (1998). TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell* **93**, 433-43.
- Diaz, E., Schimmoller, F. and Pfeffer, S. R.** (1997). A novel Rab9 effector required for endosome-to-TGN transport. *J Cell Biol* **138**, 283-90.
- Dittmer, F., Ulbrich, E. J., Hafner, A., Schmahl, W., Meister, T., Pohlmann, R. and von Figura, K.** (1999). Alternative mechanisms for trafficking of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient mice are cell type-specific. *J Cell Sci* **112** (Pt 10), 1591-7.
- Doray, B., Ghosh, P., Griffith, J., Geuze, H. J. and Kornfeld, S.** (2002). Cooperation of GGAs and AP-1 in packaging MPRs at the trans-Golgi network. *Science* **297**, 1700-3.
- Ellgaard, L. and Helenius, A.** (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 181-91.
- Eskelinen, E. L.** (2006). Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med* **27**, 495-502.
- Eskelinen, E. L., Illert, A. L., Tanaka, Y., Schwarzmann, G., Blanz, J., Von Figura, K. and Saftig, P.** (2002). Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Biol Cell* **13**, 3355-68.
- Eskelinen, E. L., Schmidt, C. K., Neu, S., Willenborg, M., Fuytes, G., Salvador, N., Tanaka, Y., Lullmann-Rauch, R., Hartmann, D., Heeren, J. et al.** (2004). Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts. *Mol Biol Cell* **15**, 3132-45.
- Eskelinen, E. L., Tanaka, Y. and Saftig, P.** (2003). At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol* **13**, 137-45.
- Forgac, M.** (1999). Structure and properties of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *J Biol Chem* **274**, 12951-4.
- Futter, C. E., Pearse, A., Hewlett, L. J. and Hopkins, C. R.** (1996). Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J Cell Biol* **132**, 1011-23.
- Gamp, A. C., Tanaka, Y., Lullmann-Rauch, R., Wittke, D., D'Hooge, R., De Deyn, P. P., Moser, T., Maier, H., Hartmann, D., Reiss, K. et al.** (2003). LIMP-2/LGP85 deficiency causes ureteric pelvic junction obstruction, deafness and peripheral neuropathy in mice. *Hum Mol Genet* **12**, 631-46.
- Ghosh, P., Dahms, N. M. and Kornfeld, S.** (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 202-12.
- Ghosh, P. and Kornfeld, S.** (2003). AP-1 binding to sorting signals and release from clathrin-coated vesicles is regulated by phosphorylation. *J Cell Biol* **160**, 699-708.
- Gieselmann, V., Pohlmann, R., Hasilik, A. and Von Figura, K.** (1983). Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultured human fibroblasts. *J Cell Biol* **97**, 1-5.
- Glickman, J. N. and Kornfeld, S.** (1993). Mannose 6-phosphate-independent targeting of lysosomal enzymes in I-cell disease B lymphoblasts. *J Cell Biol* **123**, 99-108.
- Gruenberg, J.** (2001). The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 721-30.
- Hamer, I. and Jadot, M.** (2005). Endolysosomal transport of newly-synthesized cathepsin D in a sucrose model of lysosomal storage. *Exp Cell Res* **309**, 284-95.
- Hanewinkel, H., Glossl, J. and Kresse, H.** (1987). Biosynthesis of cathepsin B in cultured normal and I-cell fibroblasts. *J Biol Chem* **262**, 12351-5.
- Hendil, K. B., Lauridsen, A. M. and Seglen, P. O.** (1990). Both endocytic and endogenous protein degradation in fibroblasts is stimulated by serum/amino acid deprivation and inhibited by 3-methyladenine. *Biochem J* **272**, 577-81.

Hirst, J., Lui, W. W., Bright, N. A., Totty, N., Seaman, M. N. and Robinson, M. S. (2000). A family of proteins with gamma-adaptin and VHS domains that facilitate trafficking between the trans-Golgi network and the vacuole/lysosome. *J Cell Biol* **149**, 67-80.

Holtzman, E. (1989). Lysosomes. NY-London: Plenum Press.

Honing, S., Griffith, J., Geuze, H. J. and Hunziker, W. (1996). The tyrosine-based lysosomal targeting signal in lamp-1 mediates sorting into Golgi-derived clathrin-coated vesicles. *Embo J* **15**, 5230-9.

Honing, S., Sandoval, I. V. and von Figura, K. (1998). A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *Embo J* **17**, 1304-14.

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

Huynh, K. K., Eskelinen, E. L., Scott, C. C., Malevanets, A., Saftig, P. and Grinstein, S. (2007). LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *Embo J* **26**, 313-24.

Itin, C., Ulitzur, N., Muhlbauer, B. and Pfeffer, S. R. (1999). Mapmodulin, cytoplasmic dynein, and microtubules enhance the transport of mannose 6-phosphate receptors from endosomes to the trans-golgi network. *Mol Biol Cell* **10**, 2191-7.

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

Jadot, M., Wattiaux, R., Mainferme, F., Dubois, F., Claessens, A. and Wattiaux-De Coninck, S. (1996). Soluble form of Lamp II in purified rat liver lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun* **223**, 353-9.

Jahraus, A., Storrie, B., Griffiths, G. and Desjardins, M. (1994). Evidence for retrograde traffic between terminal lysosomes and the prelysosomal/late endosome compartment. *J Cell Sci* **107** (Pt 1), 145-57.

Jensen, A. G., Chemali, M., Chapel, A., Kieffer-Jaquinod, S., Jadot, M., Garin, J. and Journet, A. (2007). Biochemical characterization and lysosomal localization of the mannose-6-phosphate protein p76 (hypothetical protein LOC196463). *Biochem J* **402**, 449-58.

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

Kaushik, S. and Cuervo, A. M. (2006). Autophagy as a cell-repair mechanism: activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol Aspects Med* **27**, 444-54.

Kaushik, S., Massey, A. C. and Cuervo, A. M. (2006). Lysosome membrane lipid microdomains: novel regulators of chaperone-mediated autophagy. *Embo J* **25**, 3921-33.

Knight, C. G. (1980). Human cathepsin B. Application of the substrate N-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-arginine 2-naphthylamide to a study of the inhibition by leupeptin. *Biochem J* **189**, 447-53.

Kollmann, K., Mutenda, K. E., Balleininger, M., Eckermann, E., von Figura, K., Schmidt, B. and Lubke, T. (2005). Identification of novel lysosomal matrix proteins by proteome analysis. *Proteomics* **5**, 3966-78.

Kolter, T. and Sandhoff, K. (2005). Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 81-103.

Kopitz, J., Kisen, G. O., Gordon, P. B., Bohley, P. and Seglen, P. O. (1990). Nonselective autophagy of cytosolic enzymes by isolated rat hepatocytes. *J Cell Biol* **111**, 941-53.

Kornfeld, S. (1987). Trafficking of lysosomal enzymes. *Faseb J* **1**, 462-8.

Kornfeld, S. and Mellman, I. (1989). The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* **5**, 483-525.

Kuronita, T., Eskelinen, E. L., Fujita, H., Saftig, P., Himeno, M. and Tanaka, Y. (2002). A role for the lysosomal membrane protein LGP85 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology. *J Cell Sci* **115**, 4117-31.

Le Borgne, R., Alconada, A., Bauer, U. and Hoflack, B. (1998). The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins. *J Biol Chem* **273**, 29451-61.

Lefrancois, S., May, T., Knight, C., Bourbeau, D. and Morales, C. R. (2002). The lysosomal transport of prosaposin requires the conditional interaction of its highly conserved d domain with sphingomyelin. *J Biol Chem* **277**, 17188-99.

Lefrancois, S., Zeng, J., Hassan, A. J., Canuel, M. and Morales, C. R. (2003). The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *Embo J* **22**, 6430-7.

Lichter-Konecki, U., Moter, S. E., Krawisz, B. R., Schlotter, M., Hipke, C. and Konecki, D. S. (1999). Expression patterns of murine lysosome-associated membrane protein 2 (Lamp-2) transcripts during morphogenesis. *Differentiation* **65**, 43-58.

Luzio, J. P., Poupon, V., Lindsay, M. R., Mullock, B. M., Piper, R. C. and Pryor, P. R. (2003). Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes. *Mol Membr Biol* **20**, 141-54.

Luzio, J. P., Rous, B. A., Bright, N. A., Pryor, P. R., Mullock, B. M. and Piper, R. C. (2000). Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci* **113** (Pt 9), 1515-24.

Mach, L., Stuwe, K., Hagen, A., Ballaun, C. and Glossl, J. (1992). Proteolytic processing and glycosylation of cathepsin B. The role of the primary structure of the latent precursor and of the carbohydrate moiety for cell-type-specific molecular forms of the enzyme. *Biochem J* **282** (Pt 2), 577-82.

Mann, M., Hendrickson, R. C. and Pandey, A. (2001). Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* **70**, 437-73.

Massey, A., Kiffin, R. and Cuervo, A. M. (2004). Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 2420-34.

Massey, A. C., Kaushik, S., Sovak, G., Kiffin, R. and Cuervo, A. M. (2006). Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5805-10.

McIntyre, G. F. and Erickson, A. H. (1991). Procathepsins L and D are membrane-bound in acidic microsomal vesicles. *J Biol Chem* **266**, 15438-45.

Meyer, C., Zizioli, D., Lausmann, S., Eskelinen, E. L., Hamann, J., Saftig, P., von Figura, K. and Schu, P. (2000). mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *Embo J* **19**, 2193-203.

Mullins, C. and Bonifacino, J. S. (2001). The molecular machinery for lysosome biogenesis. *Bioessays* **23**, 333-43.

Mullock, B. M., Perez, J. H., Kuwana, T., Gray, S. R. and Luzio, J. P. (1994). Lysosomes can fuse with a late endosomal compartment in a cell-free system from rat liver. *J Cell Biol* **126**, 1173-82.

Nakayama, K. and Wakatsuki, S. (2003). The structure and function of GGAs, the traffic controllers at the TGN sorting crossroads. *Cell Struct Funct* **28**, 431-42.

Ni, X., Canuel, M. and Morales, C. R. (2006). The sorting and trafficking of lysosomal proteins. *Histol Histopathol* **21**, 899-913.

Nielsen, M. S., Madsen, P., Christensen, E. I., Nykjaer, A., Gliemann, J., Kasper, D., Pohlmann, R. and Petersen, C. M. (2001). The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *Embo J* **20**, 2180-90.

Nishino, I. (2006). Autophagic vacuolar myopathy. *Semin Pediatr Neurol* **13**, 90-5.

Nishino, I., Fu, J., Tanji, K., Yamada, T., Shimojo, S., Koori, T., Mora, M., Riggs, J. E., Oh, S. J., Koga, Y. et al. (2000). Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* **406**, 906-10.

- Ohno, H. (2006). Clathrin-associated adaptor protein complexes. *J Cell Sci* **119**, 3719-21.
- Pfeffer, S. R. (1991). Mannose-6-phosphate receptors and their role in protein sorting along the pathway to lysosomes. *Cell Biophys* **19**, 131-40.
- Pohlmann, R., Boeker, M. W. and von Figura, K. (1995). The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins. *J Biol Chem* **270**, 27311-8.
- Probst, O. C., Ton, P., Svoboda, B., Gannon, A., Schuhmann, W., Wieser, J., Pohlmann, R. and Mach, L. (2006). The 46-kDa mannose 6-phosphate receptor does not depend on endosomal acidification for delivery of hydrolases to lysosomes. *J Cell Sci* **119**, 4935-43.
- Puertollano, R., Aguilar, R. C., Gorshkova, I., Crouch, R. J. and Bonifacino, J. S. (2001). Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science* **292**, 1712-6.
- Reddy, J. V., Burguete, A. S., Sridevi, K., Ganley, I. G., Nottingham, R. M. and Pfeffer, S. R. (2006). A functional role for the GCC185 golgin in mannose 6-phosphate receptor recycling. *Mol Biol Cell* **17**, 4353-63.
- Richo, G. and Conner, G. E. (1991). Proteolytic activation of human procathepsin D. *Adv Exp Med Biol* **306**, 289-96.
- Rijnboutt, S., Aerts, H. M., Geuze, H. J., Tager, J. M. and Strous, G. J. (1991a). Mannose 6-phosphate-independent membrane association of cathepsin D, glucocerebrosidase, and sphingolipid-activating protein in HepG2 cells. *J Biol Chem* **266**, 4862-8.
- Rijnboutt, S., Kal, A. J., Geuze, H. J., Aerts, H. and Strous, G. J. (1991b). Mannose 6-phosphate-independent targeting of cathepsin D to lysosomes in HepG2 cells. *J Biol Chem* **266**, 23586-92.
- Sanchez, J. C., Appel, R. D., Golaz, O., Pasquali, C., Ravier, F., Bairoch, A. and Hochstrasser, D. F. (1995). Inside SWISS-2DPAGE database. *Electrophoresis* **16**, 1131-51.
- Schmid, J. A., Mach, L., Paschke, E. and Glossl, J. (1999). Accumulation of sialic acid in endocytic compartments interferes with the formation of mature lysosomes. Impaired proteolytic processing of cathepsin B in fibroblasts of patients with lysosomal sialic acid storage disease. *J Biol Chem* **274**, 19063-71.
- Schroen, B., Leenders, J. J., van Erk, A., Bertrand, A. T., van Loon, M., van Leeuwen, R. E., Kubben, N., Duisters, R. F., Schellings, M. W., Janssen, B. J. et al. (2007). Lysosomal integral membrane protein 2 is a novel component of the cardiac intercalated disc and vital for load-induced cardiac myocyte hypertrophy. *J Exp Med* **204**, 1227-35.
- Seaman, M. N. (2005). Recycle your receptors with retromer. *Trends Cell Biol* **15**, 68-75.
- Seaman, M. N. (2006). Endosome sorting: GSE complex minds the Gap. *Nat Cell Biol* **8**, 648-9.
- Sleat, D. E., Jadot, M. and Lobel, P. (2007). Lysosomal proteomics and disease. *Proteomics* in press.
- Storrie, B. and Desjardins, M. (1996). The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? *Bioessays* **18**, 895-903.
- Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E. L., Hartmann, D., Lullmann-Rauch, R., Janssen, P. M., Blanz, J., von Figura, K. and Saftig, P. (2000). Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* **406**, 902-6.
- Taute, A., Watzig, K., Simons, B., Lohaus, C., Meyer, H. and Hasilik, A. (2002). Presence of detergent-resistant microdomains in lysosomal membranes. *Biochem Biophys Res Commun* **298**, 5-9.
- Waheed, A., Pohlmann, R., Hasilik, A., von Figura, K., van Elsen, A. and Leroy, J. G. (1982). Deficiency of UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase in organs of I-cell patients. *Biochem Biophys Res Commun* **105**, 1052-8.

Wassmer, T., Attar, N., Bujny, M. V., Oakley, J., Traer, C. J. and Cullen, P. J. (2007). A loss-of-function screen reveals SNX5 and SNX6 as potential components of the mammalian retromer. *J Cell Sci* **120**, 45-54.

Winchester, B. G. (2001). Lysosomal membrane proteins. *Eur J Paediatr Neurol* **5 Suppl A**, 11-9.

Yamaguchi, N. and Fukuda, M. N. (1995). Golgi retention mechanism of beta-1,4-galactosyltransferase. Membrane-spanning domain-dependent homodimerization and association with alpha- and beta-tubulins. *J Biol Chem* **270**, 12170-6.

Zhao, Q. and Morales, C. R. (2000). Identification of a novel sequence involved in lysosomal sorting of the sphingolipid activator protein prosaposin. *J Biol Chem* **275**, 24829-39.

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

Zhu, Y., Doray, B., Poussu, A., Lehto, V. P. and Kornfeld, S. (2001). Binding of GGA2 to the lysosomal enzyme sorting motif of the mannose 6-phosphate receptor. *Science* **292**, 1716-8.