

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Influence d'une ischémie sur la membrane des lysosomes de foie de rat

de Potesta, Isabelle

*Award date:*  
1985

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

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

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

#### Take down policy

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



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX  
NAMUR  
FACULTÉ DES SCIENCES

---

INFLUENCE D'UNE ISCHEMIE DEFINITIVE SUR LA  
MEMBRANE DES LYSOSOMES DE FOIE DE RAT

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

DE POTESTA ISABELLE

Au terme de cette année, je tiens à remercier tout particulièrement  
le Professeur R. Wattiaux de m'avoir accueillie dans son  
laboratoire de Chimie Physiologique;

Madame S. Wattiaux-De Coninck de m'avoir guidée, avec patience  
tout au long de ce travail;

Monsieur F. Dubois pour sa continuelle disponibilité et sa  
perpétuelle bonne humeur;

Monsieur M. Jadot pour ses conseils judicieux;

Madame M. Soret qui a bien voulu dactylographier ce mémoire

Et enfin toutes les personnes qui ont contribué de près ou  
de loin à ce travail ainsi que tout le personnel du département de  
Chimie Physiologique pour l'atmosphère qui a régné tout au long  
de cette année.

## TABLE DES MATIERES.

### 1. INTRODUCTION.

#### 1.1 Généralités

#### 1.2 Ischémie et hypoxie.

1.2.1. Altération de la régulation du volume cellulaire

1.2.2. Altération du métabolisme énergétique.

1.2.3. Conséquences au niveau des structures subcellulaires.

#### 1.3 Ischémie et lysosomes.

1.3.1. Caractérisation des lysosomes.

1.3.2. Effet de l'ischémie sur les lysosomes.

#### 1.4. Objet du travail.

### 2. MATERIEL ET METHODES.

#### 2.1. Centrifugation différentielle.

#### 2.2. Mesures enzymatiques.

2.2.1. Mesures de la latence enzymatique.

2.2.2. Mesures enzymatiques

### 3. RESULTATS.

3.1. Distribution de la cathepsine C et de la phosphatase acide après centrifugation différentielle.

3.2 Libération de la cathepsine C au cours du temps d'incubation à 37°C et à pH=5 en présence de GAN, comme substrat.

3.3 Comportement de la cathepsine C en présence de GPN comme substrat.

3.3.1. Activité libre de la cathepsine C en présence de concentrations croissantes en GPN.

3.3.2. Activité libre de la cathepsine C en présence de GPN. Influence du temps d'incubation et de la température.

3.3.3. Comportement de la cathepsine C en présence de GAN et de GTN.

3.4. Comportement de la cathepsine C en présence de GAN et de GTN à pH=6.

4. DISCUSSION.

5. ADDENDUM .

6. BIBLIOGRAPHIE.

## CHAPITRE I: INTRODUCTION

### 1.1. Généralités

### 1.2. Ischémie et hypoxie

1.2.1. Altération de la régulation du volume cellulaire

1.2.2. Altération du métabolisme énergétique

1.2.3. Conséquences au niveau des structures subcellulaires

### 1.3. Ischémie et lysosomes

1.3.1. Caractérisation des lysosomes

1.3.2. Effet de l'ischémie sur les lysosomes

### 1.4. Objet du travail

## CHAPITRE 1: INTRODUCTION

### 1.1. Généralités

Les lésions qui découlent de l'ischémie sont parmi les causes les plus importantes de décès en Europe et aux Etats-Unis. C'est le cas notamment de l'infarctus du myocarde, des thromboses et des traumatismes hémorragiques.

Les altérations subcellulaires constituent la base de tous les processus pathologiques. Quelle que soit la cause (ischémie, toxine, virus, empoisonnement etc...) qui est à l'origine de la perturbation de son homéostasie, la cellule présente au cours du temps, le même schéma de modifications biochimiques et structurales.

Pendant un temps qui varie selon le type de la cellule atteinte, l'agent perturbateur, la nature et l'intensité de son action, les altérations cellulaires restent réversibles. Toutefois, au-delà d'une certaine limite, (le point de non retour) les lésions ne peuvent plus régresser et la cellule est destinée à mourir.

Une ischémie complète est une situation capable de produire rapidement un dommage irréversible: dans un neurone en trois à quatre minutes, dans une cellule du myocarde en quinze à vingt minutes. Si le flux sanguin est restauré avant le point de non retour, la cellule peut récupérer ses fonctions normales.

Si l'ischémie persiste jusqu'au point de non retour, la cellule commence à s'endommager irréversiblement jusqu'à la mort cellulaire. Elle entre alors dans la phase de nécrose, phase de dénaturation et d'hydrolyse des composants cellulaires.

Mort et nécrose sont donc clairement distinctes: la mort signifie la perte de la réversibilité, la nécrose se réfère à des réactions de dégradations se passant après la mort.

Quelques types de lésions ne sont pas immédiatement léthales pour la cellule et provoquent un changement de structure et de fonction. Elles rendent la cellule différente de son état normal, cependant ces modifications sont compatibles avec la maintenance de l'homéostasie cellulaire.

Plusieurs altérations peuvent dans ce cas se produire: accumulation de lipides dans la cellule, formation de lysosomes autophagiques et de corps résiduels pigmentés dans le cytoplasme, dilatation du réticulum endoplasmique, modification des microtubules avec inhibition de la division mitotique et de la migration cellulaire, atrophie ou hypertrophie de la taille cellulaire.

### 1.2. Ischémie et hypoxie

L'ischémie se définit comme étant une réduction du flux sanguin de manière partielle ou complète dans les cellules ou tissus.

L'hypoxie est définie comme une réduction partielle de la concentration en oxygène dans les cellules ou tissus. Une coupure totale de l'apport en oxygène est appelée anoxie.

L'ischémie diffère de l'hypoxie par le fait que non seulement il y a diminution de l'apport d'oxygène mais encore le flux sanguin est réduit, ce qui provoque un ralentissement du transport des nutriments vers la cellule et une accumulation des déchets du métabolisme cellulaire.

Les changements qui apparaissent au niveau cellulaire lors de l'ischémie peuvent se résumer en trois points:

- altération du métabolisme énergétique
- altération de la régulation du volume cellulaire
- libération des hydrolases acides.

#### 1.2.1. Altération de la régulation du volume cellulaire

Dans la cellule des mammifères, la composition ionique intracellulaire diffère grandement de celle du fluide extracellulaire: le milieu intracellulaire inclut une concentration élevée de protéines chargées négativement.

La membrane plasmique permet le transport passif d'ions intracellulaires et extracellulaires.

Le maintien de différences de concentrations ioniques résulte d'une balance délicate entre transport passif et transport actif des ions.

Plus précisément, cette balance dépend de l'intégrité de la membrane plasmique, de l'intégrité du système de transporteurs, du gradient électrochimique et du flux d'énergie.

Des changements dans chacun de ces facteurs entraînent des altérations dans le volume cellulaire.

Le transport sodium/potassium est la clef de la régulation intracellulaire du volume.

Si les mécanismes de transport sont altérés, ceci conduit à une augmentation du volume intracellulaire et par là-même de la pression hydrostatique.

Si le phénomène continue, le volume cellulaire continue à augmenter jusqu'à rupture de la membrane plasmique.

Etape      Lysosomes      Noyaux      Cytoplasme      Mitochondries      Membrane plasmique      RE      Manifestations cliniques

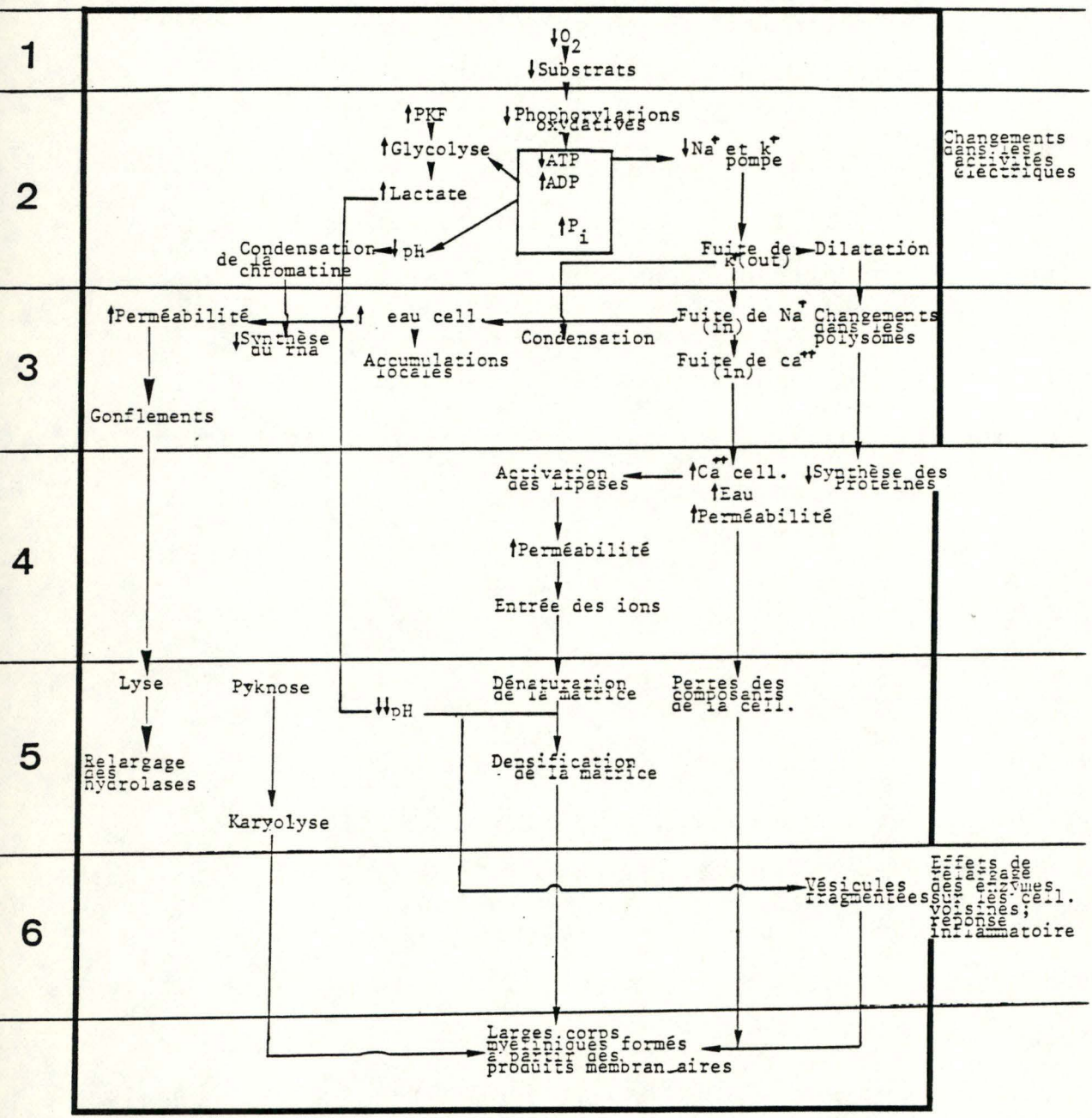


Figure 1 : Sequence hypothétique des événements se déroulant au cours de l'ischémie.

(Trump B.T., et al, 1975)

### 1.2.2. Altération du métabolisme énergétique

La fonction principale de la mitochondrie est la fourniture et le stockage de l'énergie sous forme de composés à haute énergie. Ceci nécessite l'apport de substrats et d'oxygène.

Le système de transport des électrons et les facteurs couplants sont associés aux sous-unités de la membrane interne.

La structure mitochondriale est étroitement liée avec sa fonction. Aussi, des différences dans le taux de respiration, de phosphorylations, des augmentations d'ions, d'eau sont reflétées par des changements ultrastructuraux. Lors de l'ischémie, le volume de la mitochondrie augmente.

Ce changement est appelé "swelling" et est un phénomène qui depuis quelques années est connu pour se passer dans les cellules lésées.

De l'apport d'ATP dépend non seulement l'état structural et fonctionnel des mitochondries mais aussi toutes les fonctions requérant de l'énergie.

### 1.2.3. Conséquences au niveau des structures subcellulaires

Les observations et l'expérimentation, tant sur le matériel humain qu'animal, ont permis de dresser une chronologie des détériorations causées dans la cellule et pouvant entraîner la mort. (figure 1)

Dans un premier temps, l'ischémie provoque une soudaine réduction de la pression partielle en oxygène dans le milieu extracellulaire et le cytoplasme.

Le premier effet de cette décroissance est un abaissement du taux des phosphorylations oxydatives amenant une contraction

de la matrice mitochondriale ainsi qu'une activation de la phosphofructokinase et de la glycolyse.

Les métabolites de la glycolyse, notamment le lactate, ne peuvent être évacués suite à l'absence de circulation sanguine. Cette accumulation de lactate à laquelle s'ajoute une augmentation du phosphate inorganique amène rapidement une chute de pH intracellulaire.

La cellule commence à ressentir les effets du manque d'ATP.

Les pompes sodium/potassium de la membrane cellulaire sont altérées et cela entraîne que les flux passifs d'ions ne sont plus contrebalancés. Le potassium fuit à travers les membranes tandis que le sodium et le calcium s'accumulent dans la cellule.

Cependant, les réserves extracellulaires ne s'étant pas renouvelées par un apport sanguin, l'entrée des ions  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Na}^+$  ne peut combattre l'hypotonicité créée par la fuite de potassium.

Reflétant une perte de la régulation de volume, le réticulum endoplasmique se dilate, signe de l'étape secondaire de l'ischémie. Le mécanisme de dilatation n'est pas connu et le mouvement des ions dans le réticulum n'a pas été identifié.

Simultanément, le pH faible s'accompagne d'une condensation de chromatine du noyau, cette condensation étant réversible. La condensation de chromatine est associée avec la diminution de la synthèse du RNA nucléaire. Ceci n'a néanmoins aucune conséquence immédiate sur la cellule. En effet, si la circulation n'est pas réadmise, la cellule mourra et se nécrosera longtemps avant que la diminution de la synthèse de RNA ait un effet.

A ce moment, les mitochondries, le golgi, les lysosomes

et les autres organelles montrent quelques altérations. Par la suite, les polysomes restent attachés au RER dilaté mais se décomposent en sous-unités; normalement, les sous-unités sont maintenues entre elles et fixées à la membrane grâce à un mécanisme dépendant d'énergie. La fragmentation des polysomes s'accompagne d'une synthèse défectueuse de protéines.

Dans un deuxième temps, le volume aqueux de la cellule augmente et on observe la formation à la surface de la cellule de vacuoles remplies d'eau (blebs) en nombre croissant au fur et à mesure que l'on approche du point de non retour.

Dans une troisième étape, la mitochondrie est condensée, le réticulum endoplasmique reste dilaté, l'entièreté de la cellule est gonflée avec une diminution du sodium, du chlore et une augmentation du potassium. Une augmentation de la concentration en  $Ca^{++}$  active la formation des phospholipases endogènes. Leur action sur les phospholipides membranaires amène une augmentation de la perméabilité.

Jusqu'à ce stade et bien qu'elles aient subi des changements très importants tels la condensation de la matrice, les mitochondries n'ont pas encore perdu leur intégrité fonctionnelle. Un renversement est toujours possible; il suffit de réadmettre dans le milieu extracellulaire l'oxygène qui lui faisait défaut. Les mitochondries se remettront à phosphoryler, les pompes à fonctionner, les réserves de glucose seront restaurées.

Mais si le manque d'oxygène continue à se faire sentir, on arrive au point de non retour, c'est à dire le moment où la cellule sera définitivement endommagée.

A cette étape, la synthèse des protéines est sévèrement inhibée.

Les lysosomes sont gonflés et clairs bien que l'on n'observe pas de fuites dans la membrane lysosomiale.

Les mitochondries sont de plus en plus gonflées, la membrane interne est parfois interrompue, leur contenu dense floccule.

Les lysosomes se rompent et libèrent leurs hydrolases dans un milieu dont le pH favorise leur action. La digestion des composants cellulaires est largement entamée et la cellule se dégrade.

Enfin, au dernier stade, le noyau subit l'action d'enzymes lytiques et sera finalement détruit.

La cellule est dans sa phase nécrotique appelée cytolypse. De nouvelles structures commencent à se former: de grandes masses lamellaires, des figures myéliniques, des protusions en forme de tubes.

L'augmentation des concentrations cellulaires en  $Ca^{++}$  provoque également la formation de savons calciques par complexation avec les phospholipides et les acides gras endogènes. C'est le cas notamment dans le tissu adipeux: le phénomène est appelé nécrose graisseuse. (Trump et al, 1975)

### 1.3. Ischémie et lysosomes

#### 1.3.1. Caractérisation des lysosomes

Les lysosomes furent découverts par des méthodes biochimiques et leur première définition fut donc biochimique (de Duve C., 1969).

Les lysosomes sont des organelles intracellulaires contenant des hydrolases acides qui jouent un rôle dans le turn over cellulaire (Lefer A.M., 1975). Les hydrolases acides sont capables de digérer protéines, lipides, hydrates de carbone, acides

nucléiques.

Une cinquantaine d'enzymes hydrolytiques ont été détectés dans les lysosomes. Tous ces enzymes sont des glycoprotéines à l'exception de la cathepsine B et du lysozyme (Bainton D.F., 1981)

Pour que le système lysosomal opère normalement, la membrane lysosomiale doit rester intacte et ainsi empêcher le relargage des hydrolases acides dans le cytoplasme de la cellule. Le maintien de la membrane lysosomiale intacte nécessite habituellement de l'énergie provenant du métabolisme oxydatif. C'est pourquoi, il n'est pas surprenant d'observer une libération des hydrolases lysosomiales à partir des cellules ischémisées (Pefer A.M., 1976).

L'activité des hydrolases est liée au pH acide. Deux mécanismes sont proposés pour maintenir et réguler le pH nécessaire à l'activité optimale des hydrolases:

1°) une pompe à protons liée à une ATPase localisée dans la membrane lysosomiale et

2°) l'équilibre de Donnan (Tager J.M., 1977).

Le turn over des protéines de la membrane lysosomiale est plus rapide que le turn over moyen des protéines du foie. Ceci indiquerait selon Schneider D.L. (1982), une activité élevée de la fonction membranaire, fonction encore mal connue jusqu'à présent.

Le temps de demi-vie des protéines de la membrane lysosomiale est de 1,2 jours et de 1,75 jours pour les protéines de la membrane plasmique. Les protéines contenues dans la membrane lysosomiale seraient sensibles à l'inactivation protéolytique

HYALOPLASME

MEMBRANE LYSOSOMALE

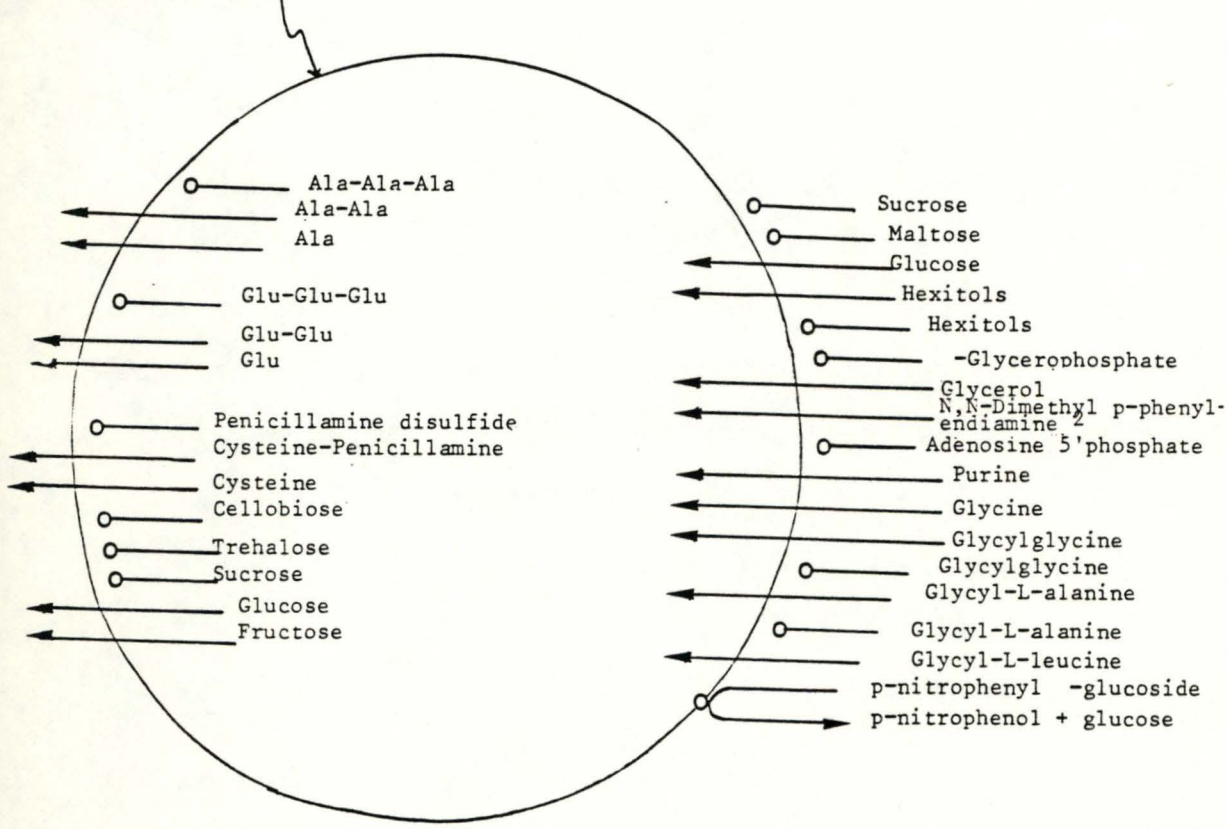


Figure 2 : Perméabilité de la membrane aux solutés contenus dans le milieu et dans le lysosome.

(Baccino F.M., Zuretti M.F., 1976)

← : molécules perméables.  
 ○ : molécules imperméables  
 Ala: Alanine , Glu: Glutamate.

des protéases endogènes. Une explication de ce turn over rapide serait que les protéines de la membrane lysosomiale sont rapidement resynthétisées à cause de leur sensibilité aux hydrolases lysosomiales.

Schneider a fait une étude sur la composition de la membrane lysosomiale et l'a comparée à la membrane plasmique.

La membrane lysosomiale apparaît avoir une composition unique et caractéristique.

Les principales différences entre les deux membranes sont les suivantes:

- 1°) la composition en protéines est différente
- 2°) la membrane lysosomiale est enrichie en glycoprotéines autres que celles de la membrane plasmique et appauvrie en cholestérol
- 3°) les deux membranes possèdent une activité 5'AMPase et ATPase

Schneider en déduit qu'il n'y a aucun mélange entre les composants des deux types de membranes et que les protéines de la membrane lysosomiale ne sont pas originaires de la membrane plasmique (Schneider D.L., 1982).

Cependant, d'autres études ont démontré la présence de protéines de la membrane plasmique dans la membrane des lysosomes (Muller et al, 1980 a et b)

Une partie de la membrane plasmique pourrait être internalisée durant la formation de la vésicule d'endocytose.

Les propriétés de perméabilité de la membrane lysosomiale à certains composés (voir figure 2) sont importantes pour le maintien d'un microenvironnement intérieur adéquat, pour le maintien de la direction du flux de composés intra et extraly-

sosomiaux, pour protéger les composants cellulaires de la dégradation par les hydrolases (Baccino F.M. et Zuretti, M.F., 1976).

L'étude de la perméabilité de la membrane des lysosomes peut se faire de trois manières différentes et complémentaires:

- 1°) étude de la latence enzymatique
- 2°) étude de la sédimentabilité des enzymes lysosomiaux
- 3°) études morphologiques (Tager J.M., 1977).

### 1.3.2. Effet de l'ischémie sur les lysosomes

C'est sur les lysosomes de coeur que la plupart des études ont été faites. En effet, pathobiologiquement, c'est l'infarctus du myocarde qui est le plus important.

De plus, les hydrolases acides relarguées par les lysosomes sont premièrement transportées via le système lymphatique au système circulatoire où elles exercent une grande variété d'actions délétères. Quelques uns de ces effets produisent des dommages dans la microcirculation provoquant une hypotension et réduisant le flux sanguin nutritif dans certains tissus. Ce phénomène s'appelle "un choc circulatoire" (Pefer A.M., 1976).

Nous avons choisi le modèle du foie ischémique car il comporte plusieurs avantages: homogénéisation et isolement des fractions subcellulaires sont bien codifiés et comparativement faciles. Le modèle du foie permettrait de mettre en évidence le taux de destruction artéfactuelle des lysosomes, ainsi que des modifications dues à une réadmission insuffisante de la circulation.

De plus dans le foie, il n'existe pas de dommage mécanique du tissu ischémié par les forces contractiles comme dans le cas du coeur.

Enfin, les résultats obtenus jusqu'à ce jour sur le foie ischémié peuvent se résumer de la façon suivante:

Des études microscopiques démontrent que les hépatocytes peuvent être sujets à une ischémie d'une heure sans modification histologique importante.

Pour des périodes plus longues d'ischémie, on constate une augmentation progressive dans l'apparition de la mort cellulaire (Glaumann H., 1981).

Au cours de l'ischémie, les lysosomes libèrent leurs hydrolases dans un milieu dont le pH favorise l'action lytique. Toute une discussion s'est engagée autour de cet événement. En effet, la question est de savoir si la rupture des lysosomes est à l'origine ou est la conséquence des modifications menant à la mort cellulaire. Ceci est évidemment un point important dans l'élucidation du mécanisme de la mort cellulaire.

De premières études biochimiques ont montré que l'activité non sédimentable des enzymes lysosomiaux augmente après un temps d'ischémie relativement court ( de Duve C., 1959).

Récemment, des auteurs ont démontré que la perte de latence des hydrolases lysosomiales causée par l'ischémie est dans certaines conditions réversible après réadmission du sang. (Bassi et Bernelli-Zazzera, 1964 - Chien et Farber, 1977)

D'autre part, après une heure d'ischémie suivie du rétablissement de la circulation pendant vingt heures, une grande majorité des cellules récupèrent. Après deux heures d'ischémie et rétablissement de la circulation pendant vingt heures, il s'établit des lésions irréversibles. La cellule est histologiquement morte.

Si on examine le comportement des lysosomes dans ces conditions, on remarque que les activités libres de la phosphatase acide et de la  $\beta$ -galactosidase sont élevées dans un homogénat de foie après une ou deux heures d'ischémie. Néanmoins, ces deux enzymes tendent à récupérer leur latence normale durant la première heure de la recirculation. Donc cette première augmentation est réversible. (Wattiaux R. et Wattiaux-De Coninck S., 1981)

Cependant, si une ischémie de deux heures est suivie d'une recirculation de vingt heures, cette fois une seconde augmentation des enzymes relarguées est observée.

Et ce second pic de l'activité libre est irréversible. Ceci indique qu'il s'agirait d'un relargage des enzymes lysosomiaux dans la cellule. Ce relargage peut être expliqué par la théorie du paradoxe du calcium et de l'oxygène (Grinwald P.M. et Nayler W.G., 1981).

D'autre part, la réversibilité des atteintes lysosomiales observée après une période ischémique se limitant à une heure indique que l'augmentation n'est probablement pas due à un relargage dans la cellule. Schématiquement, on peut supposer que l'ischémie permettrait l'augmentation d'un facteur "A" déstabilisant les lysosomes qui les rendrait sensibles à une rupture lors de l'homogénéisation.

La réadmission supprimant la facteur "A", du moins partiellement, permettrait au facteur "B" de causer une altération irréversible des lysosomes.

Aussi, le rôle joué par les lysosomes dans les altérations cellulaires causées par l'ischémie reste incertain (Wattiaux R. et Wattiaux-De Coninck S., 1984)

### 1.5. Objet du travail

C'est donc pour lever certains points d'interrogation sur le relargage des enzymes lysosomiaux et par conséquent sur la perméabilité de la membrane lysosomiale au cours de l'ischémie que nous avons entamé ce mémoire.

Pour notre travail, nous avons essayé de déterminer si la stabilité de la membrane lysosomiale était modifiée au cours de l'ischémie et ce, en mesurant des changements éventuels de l'activité libre d'une enzyme de ces organelles, la cathepsine C.

Dans une première partie, nous avons étudié l'évolution de l'activité libre de cette enzyme en fonction du temps d'incubation à 37°C et ce avec des préparations fraîches de foie non ischémié et de foie ischémié. Le substrat de l'enzyme est la glycyllarginine $\beta$ naphthylamide (GAN).

Dans une seconde partie, nous référant aux observations de Jadot et al. (1984), nous avons étudié la sensibilité des lysosomes à la glycylyphénylalanine $\beta$ naphthylamide (GPN) suivant que ces granules proviennent du foie non ischémié et ischémié.

Dans un troisième temps, nous avons étudié l'évolution de l'activité libre de la cathepsine C en fonction de la concentration de différents substrats à 37°C. Ces différents substrats sont le GAN, GPN et le glycylltryptophane $\beta$ naphthylamide.

## CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

2.1. Centrifugation différentielle

2.2. Mesures enzymatiques

2.2.1. Mesures de la latence des enzymes lysosomiales

2.2.2. Mesures enzymatiques

## CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

Pour nos homogénats, nous avons utilisé des rats Wistar mâles d'environ 200 à 300 gr, à jeûn depuis la veille.

L'abdomen de l'animal est ouvert sous anesthésie à l'éther et une pince de Dieffenbach est posée sur le hyle du lobe gauche du foie.

Après un temps déterminé, l'animal est tué par décapitation et saigné. On prélève alors le lobe ligaturé et un autre lobe comme témoin.

Les fragments sont pesés dans du saccharose 0.25M à 0°C et homogénéisés. Pour cette homogénéisation, nous avons utilisé un homogénéiseur de Dounce.

Dans un tel homogénéiseur, les forces de cisaillement exercées sur le tissu par le passage du piston se font en un seul point, ce qui rend le procédé beaucoup moins lésant, comparé à un homogénéiseur de Potter. Les Dounce sont accompagnés de deux types de pistons: un "Loose" et un "Tight".

Pour homogénéiser, on passe 5 fois au piston "Loose" et 2 fois au piston "Tight".

### 2.1. Centrifugation différentielle

La séparation des organelles est basée sur la formule de Svedberg: Toute particule sphérique soumise à un champ centrifuge subit un déplacement dont la vitesse est égale à:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{2r^2 (\rho_p - \rho_m) \omega^2 x}{9\eta}$$

où x représente la distance par rapport à l'axe de rotation (cm)

$\omega$  la vitesse angulaire (radian.sec<sup>-1</sup>)  
 t le temps de centrifugation (sec)  
 r le rayon de la shère (cm)  
 $\rho_p$  la densité de la particule (g.cm<sup>-3</sup>)  
 $\rho_m$  la densité du milieu (g.cm<sup>-3</sup>)  
 $\eta$  la viscosité du milieu (poises)

Il est généralement admis que les organites cellulaires se comportent comme des particules sphériques.

Les organites sont séparés les uns des autres principalement à cause de leurs différences de taille.

En effet la vitesse est proportionnelle au carré du rayon de la particule.

La densité intervient, elle, d'une façon moins importante mais non négligeable, notamment dans la séparation de deux organelles de même diamètre.

Pour faciliter et pour mieux décrire le comportement d'une particule en centrifugation, on définit un coefficient de sédimentation répondant à l'équation:

$$s = \frac{v}{\omega^2 x} = \frac{2r^2 (\rho_p - \rho_m)}{9\eta}$$

La vitesse de sédimentation devient donc:

$$v = s\omega^2 x$$

Elle croît linéairement le long du tube puisque x augmente au fur et à mesure que la particule migre vers le fond de celui-ci.

Si l'on tient compte de l'accélération que subit une particule dans le champ gravifique, la force centrifuge est égale à:

$$g = \frac{\omega^2 x}{981}$$

A partir de ces équations, de Duve et al (1955) ont établi un

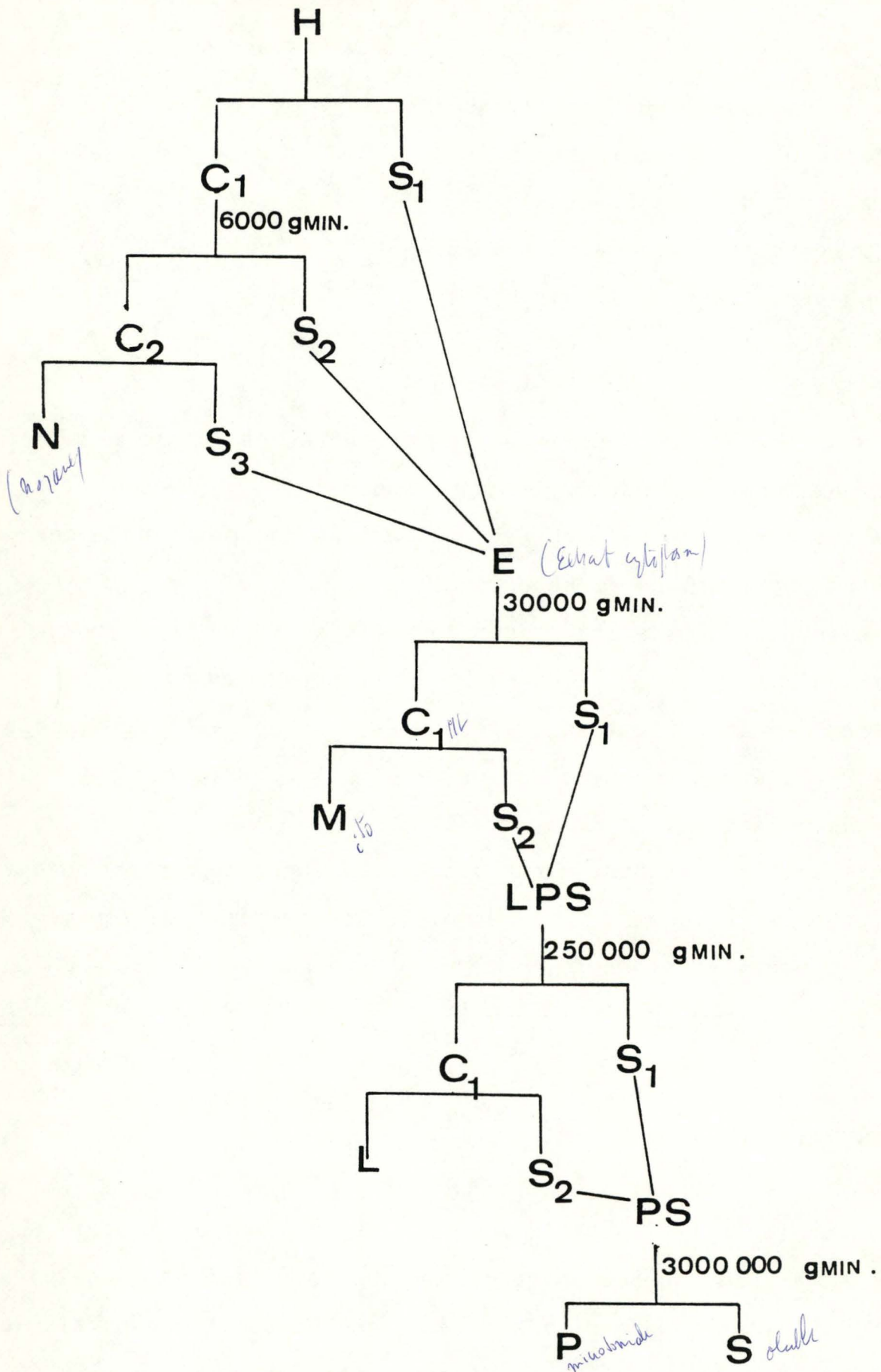


Figure 3 :Schéma de centrifugation différentielle en milieu homogène basé sur la méthode de de Duve et al (1955).

Gmin correspond à  $t_{g_{av}} dt = \frac{t w_i^2}{981} \cdot R_{av} dt$

où t=le temps de centrifugation;  $g_{av}$ =le champ moyen à la distance radiale  
 $R_{av}$ =la distance moyenne cād

$$\frac{R_{min} + R_{Max}}{2}$$

schéma de centrifugation différentielle en milieu homogène (figure 3) que nous avons utilisé .

Pratiquement, nous avons procédé de la façon suivante: le foie est homogénéisé en trois fois. Après la première homogénéisation (5 passages au "loose"), l'homogénat est centrifugé à 10 000 gmin dans une centrifugeuse International . Une grosse partie du surnageant est prélevée grâce à une pipette à décanter.

Le culot est réhomogénéisé (2 passages au piston "Tight") et lavé dans le même milieu.

La centrifugation se fait à 6000 gmin seulement puisque la viscosité du milieu a diminué suite à l'élimination d'une partie des particules.

Le culot obtenu est homogénéisé une troisième fois (2 passages au piston "tight"), lavé et recentrifugé de la même façon.

Le culot obtenu est resuspendu dans du saccharose 0.25 M. Il constitue la fraction N principalement enrichie en noyaux.

Les surnageants obtenus lors des trois premières centrifugations sont regroupés. Il forment la fraction E ou extrait cytoplasmique qui est ensuite fractionné à l'aide d'une ultracentrifugeuse Spinco équipée d'un rotor 40.

On le centrifuge une première fois à 250 000 gmin. Le surnageant est décanté à fond.

Le sédiment est lavé une fois et recentrifugé de la même façon.

Le culot formé est resuspendu, il constitue la fraction ML.

Enfin, les derniers surnageants sont soumis à une centrifugation de  $3.10^6$  gmin, pour donner la fraction microsomiale et la fraction soluble S.

## 2.2. Mesures enzymatiques

### 2.2.1. Mesures de la latence des enzymes lysosomiales

Lorsqu'on essaye de déterminer si les lysosomes sont modifiés dans une cellule pathologique, on se réfère fréquemment à l'état de latence dans lequel se trouvent certaines de leurs enzymes dans un homogénat ou mieux, une préparation de granules isolés à partir de cet homogénat.

Pour ce faire, on détermine l'activité libre, l'activité non sédimentable, l'activité totale d'une ou plusieurs hydrolases lysosomiales.

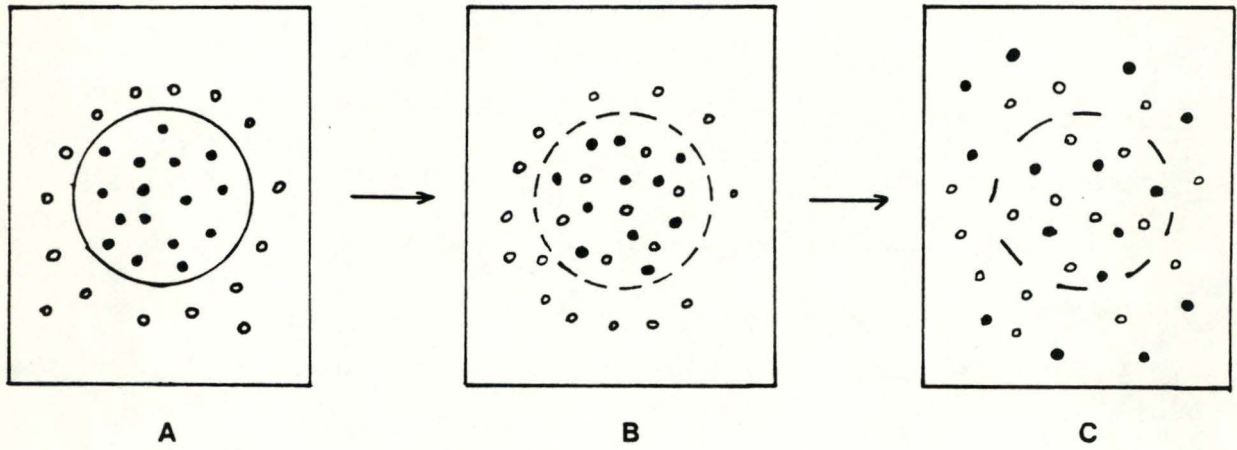
Rappelons que les enzymes lysosomiales sont normalement séparées de leurs substrats exogènes par une membrane imperméable à ces substrats. Il en résulte que "in vitro", si la plupart des lysosomes sont intacts, l'activité de ces enzymes est faible. Cette activité porte le nom d'activité libre.

Elle correspond essentiellement à l'activité des enzymes libérées de certains lysosomes dont la membrane a été détruite au cours de l'homogénéisation ou de la centrifugation et donne une mesure de la perméabilité de la membrane au substrat.

L'activité totale est obtenue lorsque la membrane des lysosomes est suffisamment rompue pour que leurs enzymes aient un accès non limité à leurs substrats.

L'activité non sédimentable correspond à la proportion d'une hydrolase lysosomiale libérée à partir de l'organelle dans un milieu extérieur et ne pouvant de ce fait être sédimentée par une centrifugation .

On comprend que ce taux d'activité libre ou non sédimentable peut donner une idée de l'état de la membrane des lysosomes.



**ENZYMES**



**SUBSTRATS**

Figure 4 : Conceptualisation graphique de la latence enzymatique.

A: La membrane est imperméable au substrat.

B: La membrane est librement perméable au substrat.

C: les hydrolases sont relarguées dans le milieu extérieur.

Généralement, du moins en ce qui concerne les lysosomes du foie, l'activité libre est déterminée en incubant des granules à 37°C dans un milieu isotonique de saccharose 0.25M pendant un temps qui ne dépasse pas 10 minutes.

Dans ces conditions, les lysosomes normaux ne souffrent pas de l'incubation et la réaction reste linéaire.

Lorsque le temps d'incubation se prolonge, on peut voir une activation de l'enzyme prendre place, résultant d'une progressive altération de la membrane lysosomiale. Nous avons comparé la réponse de lysosomes normaux et ischémiés à un tel traitement. Ces deux types d'activité sont schématisés dans la figure 4.

#### 2.2.2. Mesures enzymatiques

Nous avons mesuré les activités de deux enzymes lysosomiales,

1°) la cathepsine C

2°) la phosphatase acide

Nous décrirons les méthodes techniques dans l'addendum et l'approche méthodologique au fur et à mesure que nous décrirons les résultats.

La dipeptidylpeptidase I (DPPI) est mieux connue sous le nom d'exopeptidase lysosomiale ou cathepsine C.

La localisation de la cathepsine C fut démontrée par Bouma et Gruber (1966) et fut ensuite confirmée par des méthodes de centrifugation et d'immunocytochimie.

L'action de la DPPI est d'enlever le N-terminal dipeptide à partir du peptide ou du substrat modèle avec une grande spécificité.

Le résidu N-terminal lysine ou N-terminal arginine empêche l'activité de la cathepsine C.

Néanmoins, ces résidus se trouvant dans une penultième position rendent le substrat particulièrement sensible.

Ainsi, la glycyllarginine $\beta$ naphthylamide est plus rapidement hydrolysée que la glycyllphénylalanine $\beta$ naphthylamide.

Le résidu N-terminal peut avoir un groupement  $\alpha$  amino libre mais ne peut pas être dans une configuration D, ou être une proline.

La proline en position 2 exclut toute activité de la cathepsine C.

Pratiquement, le GAN est un bon substrat spécifique; il libère la naphthylamide détectable de manière fluorimétrique.

La DPPI, enzyme avec un groupe thiol catalytique requiert également la présence d'ions (5mM de  $\text{Cl}^-$  ou  $\text{Br}^-$ ) pour avoir une pleine activité.

L'activité hydrolytique de la DPPI est maximale à pH5-6 (Barret A.Y. and Heath M.F., 1977).

### CHAPITRE III: RESULTATS

- 3.1. Distribution de la cathepsine C et de la phosphatase acide après centrifugation différentielle
- 3.2. Libération de la cathepsine C au cours d'une incubation à 37°C et pH 5 en présence de glycyllarginine- $\beta$ -naphthylamide (GAN) comme substrat
- 3.3. Comportement de la cathepsine C en présence de glycyllphénylalanine- $\beta$ -naphthylamide (GPN) comme substrat
  - 3.3.1. Activité libre de la cathepsine C en présence de concentrations croissantes en GPN
  - 3.3.2. Activité libre de la cathepsine C en présence de GPN. Influence du temps d'incubation et de la température
  - 3.3.3. Hydrolyse intralysosomiale du GPN
- 3.4. Comportement de la cathepsine C en présence de glycyllarginine- $\beta$ -naphthylamide (GAN) et de glycylltryptophane- $\beta$ -naphthylamide (GTN) à pH 6

## CHAPITRE III: RESULTATS

3.1. Distribution de la cathepsine C et de la phosphatase acide après centrifugation différentielle.

L'activité non sédimentable des hydrolases lysosomiales augmente dans les homogénats de foie soumis à une ischémie définitive (de Duve C. et Beaufay H., 1959; Wattiaux R. et Wattiaux De Coninck S., 1981) l'augmentation étant d'autant plus élevée que le temps d'ischémie est élevé. Ce phénomène peut résulter d'une certaine libération d'hydrolases lysosomiales dans la cellule ou (et) d'une susceptibilité plus grande des lysosomes aux procédés d'homogénéisation et de centrifugation. Le deuxième facteur joue certainement un rôle important. En effet, la quantité d'hydrolase acide (phosphatase acide,  $\beta$ -galactosidase) retrouvée dans la fraction non sédimentable (S) d'un homogénat d'un lobe hépatique soumis à deux heures d'ischémie, dépend du type d'homogénéisation utilisé. Cette proportion est sensiblement moins élevée lorsque l'homogénéisation du tissu se pratique avec un homogénéiseur de Dounce plutôt qu'avec un homogénéiseur de Potter (Wattiaux et al. résultats non publiés). Or le premier type d'homogénéiseur est moins traumatisant pour les structures subcellulaires que le second.

Envisageant de déterminer la stabilité des lysosomes dans certaines conditions, en utilisant la cathepsine C comme marqueur de ces organites, nous avons établi la distribution de cette enzyme après centrifugation différentielle d'homogénats provenant de lobes non ischémiés ou soumis à une ischémie

	Nombre d'expériences	Valeurs absolues E+N	Pourcentage d'activité enzymatique					
			N	ML	P	S	Récupération	
LOBE TEMOIN								
- Cathepsine C	9	56,17 ± 9,11	10,80 ± 2,83	68,55 ± 4,23	16,13 ± 3,23	3,97 ± 0,38	96,30 ± 4,00	
- Phosphatase acide	9	10,02 ± 2,27	10,72 ± 2,27	57,47 ± 5,08	21,21 ± 4,10	10,68 ± 4,03	101,30 ± 7,06	
- Protéines	9	188,60 ± 7,30	19,29 ± 4,87	26,16 ± 3,19	26,50 ± 3,13	28,06 ± 4,74	96,90 ± 5,02	
LOBE LIGATURE UNE HEURE								
- Cathepsine C	3	43,80 ± 5,90	16,10 ± 2,97	58,90 ± 3,90	18,80 ± 5,40	5,83 ± 1,70	98,30 ± 5,85	
- Phosphatase acide	3	8,35 ± 3,12	16,06 ± 2,99	47,80 ± 2,80	22,20 ± 3,80	13,17 ± 3,10	98,03 ± 12,95	
- Protéines	3	218,60 ± 5,22	24,17 ± 4,61	27,20 ± 0,50	20,30 ± 1,50	27,70 ± 2,10	97,30 ± 1,50	
LOBE LIGATURE DEUX HEURES								
-Cathepsine C	3	41,84 ± 5,04	16,60 ± 2,05	56,14 ± 2,40	15,40 ± 4,20	11,80 ± 1,95	100,20 ± 4,90	
- Phosphatase acide	3	8,03 ± 0,96	16,50 ± 2,43	42,60 ± 1,13	20,20 ± 2,56	20,36 ± 0,86	109,30 ± 3,51	
- Protéines	3	121,11 ± 11,90	39,19 ± 1,80	23,73 ± 0,90	14,35 ± 2,96	22,16 ± 2,26	95,06 ± 7,11	

TABLEAU 1: Distribution intracellulaire de l'activité de la cathepsine C  
et de la phosphatase acide après une et deux heures de ligature.

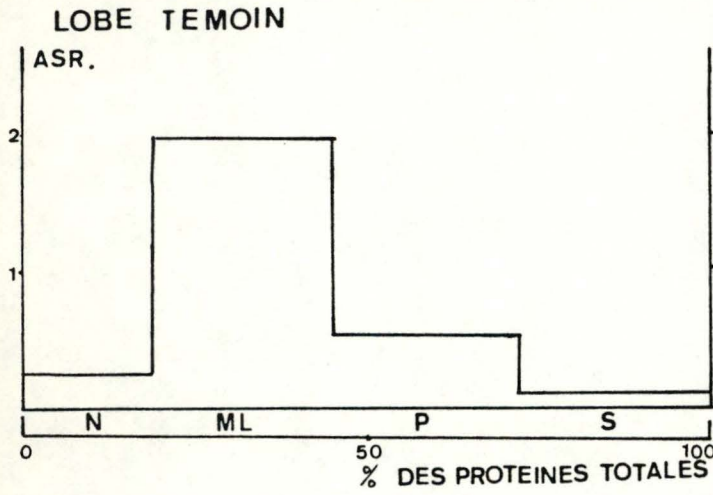
Les valeurs absolues sont données en mg/g pour les protéines et en unités/g pour les enzymes de référence. .

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type.

L'activité enzymatique trouvée dans chaque fraction est exprimée en pourcent de l'activité de l'homogénat (E+N).

La récupération représente l'activité enzymatique de la somme des fractions N, M L, P et S, rapportée à l'activité enzymatique de E+N.

# CATHEPSINE C.



# PHOSPHATASE ACIDE

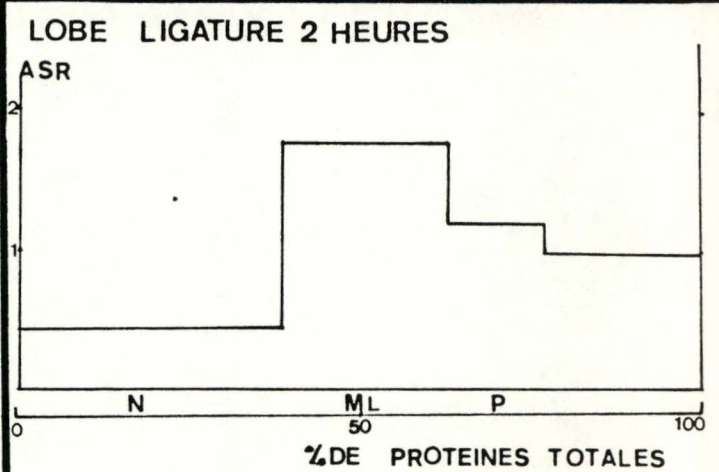
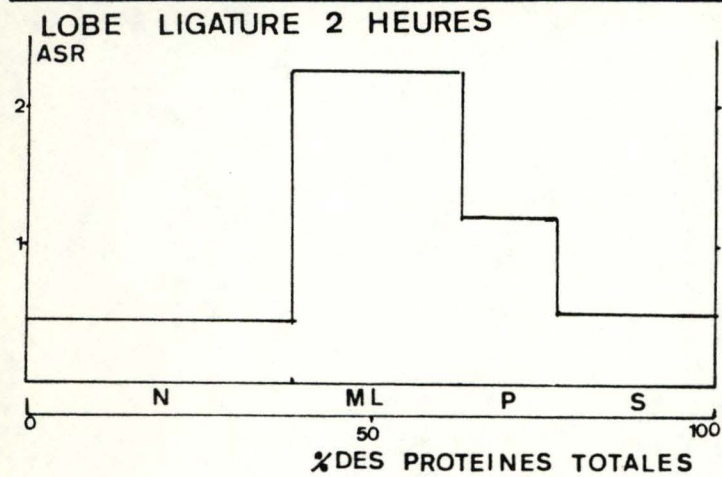
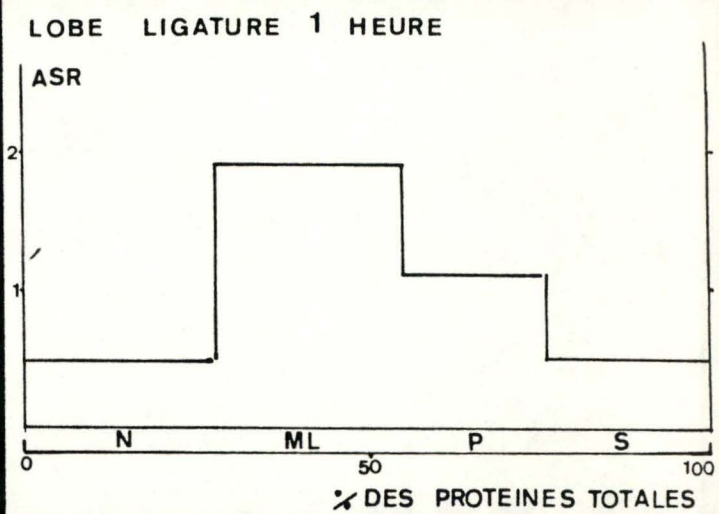
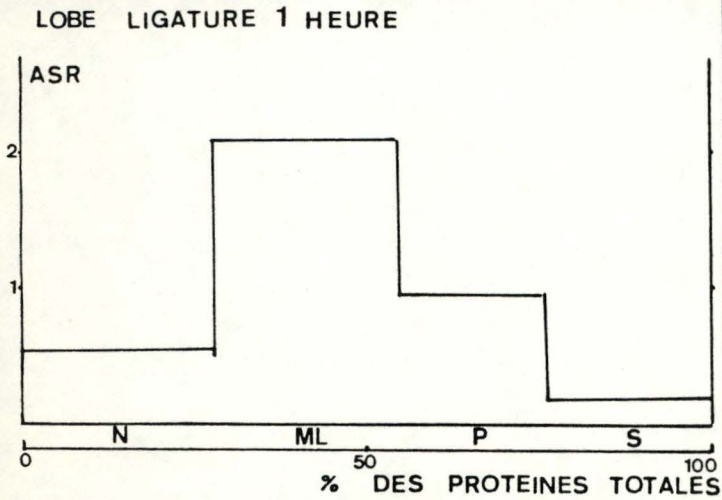
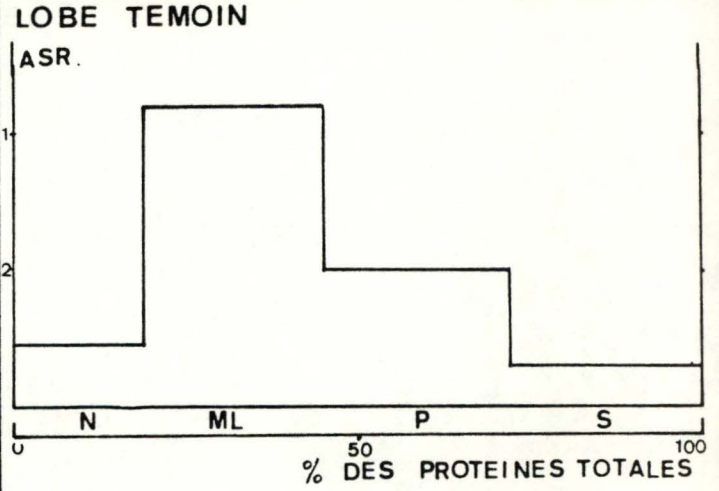


Figure 5 : Distribution de la Cathepsine C et de la phosphatase acide  
après centrifugation différentielle:

Pour le lobe témoin

pour le lobe ligaturé 1 heure.

Pour le lobe ligaturé 2 heures.

de une ou deux heures. L'homogénéisation est réalisée avec l'appareil de Dounce. Comme le montre le tableau 1 et la figure 5 , la proportion d'enzyme non sédimentable augmente dans l'homogénat de tissu ischémié mais d'une façon modérée. Le pourcentage de l'enzyme associé à la fraction mitochondriale totale est de plus de 80% de ce que l'on trouve après fractionnement du tissu non ischémié. De ce fait, l'utilisation de cette fraction comme source de lysosomes (qui se fait fréquemment) est tout aussi justifiée, qu'elle provienne d'un foie ischémié pendant une à deux heures ou d'un foie non ischémié. Les expériences que nous allons rapporter ont été effectuées en utilisant des fractions mitochondriales totales.

### 3.2. Libération de la cathepsine C au cours d'une incubation à 37°C et pH 5 en présence de glycyllarginine- $\beta$ -naphthylamide (GAN) comme substrat.

Les lysosomes normaux ne libèrent pas d'enzymes lorsqu'ils sont incubés à 37°C à pH 5, en milieu isotonique lorsque le temps d'incubation ne dépasse pas 10 minutes. L'altération de la membrane de ces organelles pourrait donc se traduire par une moins bonne stabilité de ces derniers lors d'un traitement dans les mêmes conditions. Nous avons comparé le comportement des lysosomes de foie non ischémié et de foie ischémié lors d'une incubation à 37°C en déterminant l'activité de la cathepsine C en fonction du temps, dans les conditions de détermination de l'activité totale et de l'activité libre. La cathepsine C a été choisie du fait de la possibilité d'utiliser de très courts temps d'incubation vu l'activité de cette

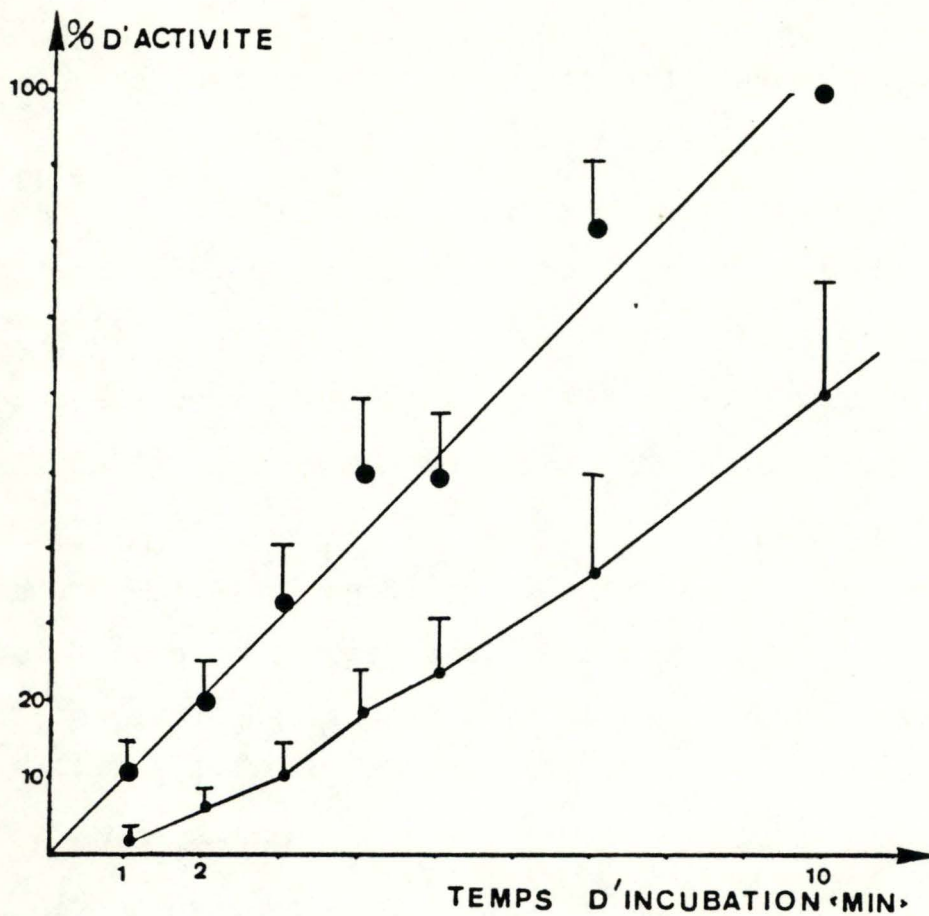


Figure 6: Influence du temps d'incubation sur les activités libres de la Cathepsine C, mesurées à pH=5 et à 37°C.

*Lobe islémié  
10/12/20*

Le substrat de la cathepsine c utilisé, est le GAN.  
Les activités libres sont exprimées en pourcents des activités totales.

- ◐: Activité libre
- : Activité totale.

Le nombre d'expériences réalisées est égal à 3 pour le lobe ligaturé et le lobe témoin.

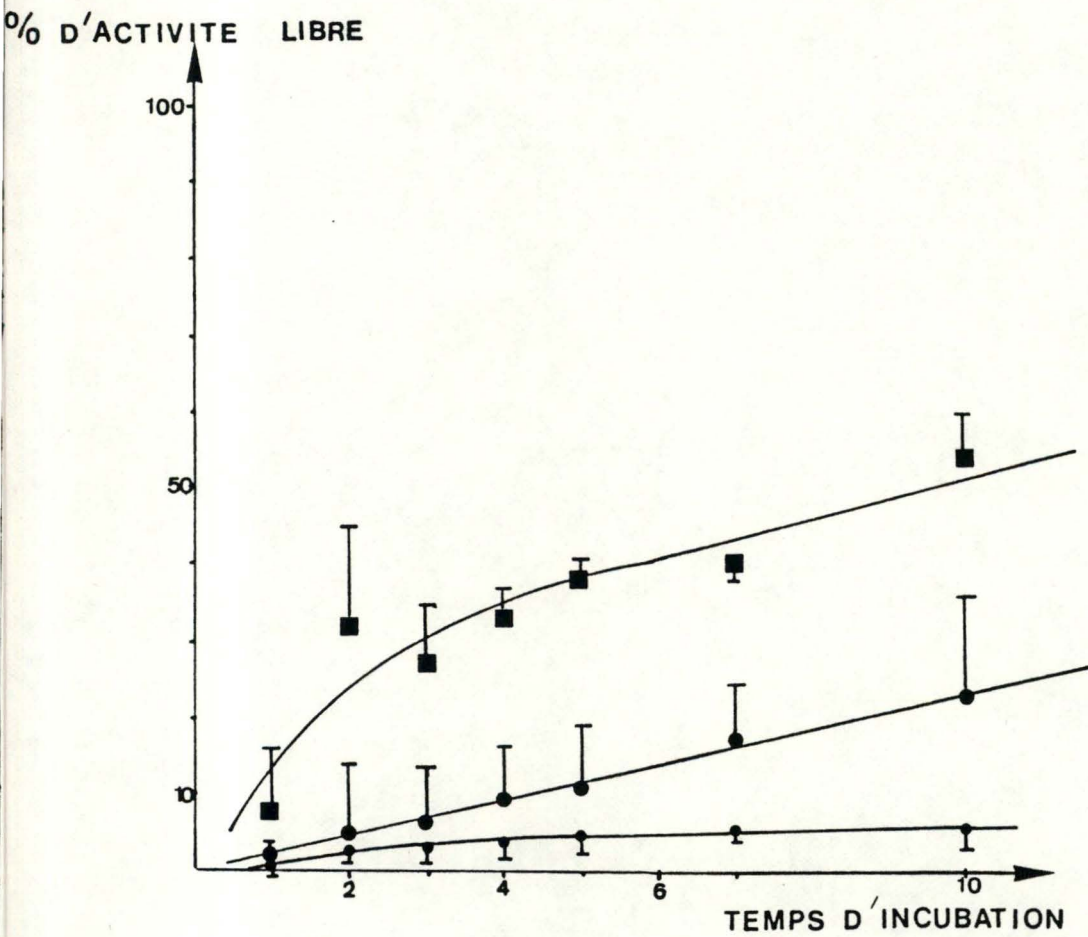


Figure 7 : Influence du temps d'incubation sur les activités libres de la Cathepsine C, mesurées à pH=5 et à 37°C.

Le substrat de la cathepsine c utilisé est le GAN.

Les activités libres sont exprimées en pourcents des activités totales.

- : Lobe témoin
- : Lobe ligaturé 1 heure.
- : Lobe ligaturé 2 heures.

Le nombre d'expériences réalisées est égal à 3 pour le lobe témoin et le lobe ligaturé.

enzyme et la sensibilité du procédé de mesure utilisé. Le substrat est la glycyllarginine-~~ph~~naphthylamide qui, à pH 5, est incapable de traverser une membrane lysosomiale intacte.

La figure 6 illustre un premier type de résultats obtenus sur des granules provenant de lobes hépatiques ischémiés pendant deux heures. L'activité totale évolue d'une façon linéaire en fonction du temps. Par contre, l'activité libre évolue suivant une courbe traduisant la présence d'enzyme libre en quantité croissante en fonction du temps. On peut donc dire que dans les préparations de lysosomes provenant de lobe ischémié, un relargage progressif de l'enzyme se produit dû à une déstabilisation de la membrane des organelles.

La figure 7 rassemble les résultats d'une série d'expériences. Elle présente l'évolution de l'activité libre exprimée en pourcents de l'activité totale. Les mesures ont été effectuées sur des préparations provenant de lobes non ischémiés; ischémiés une heure; ischémiés deux heures. La proportion d'activité libre est faible jusqu'à 10 min. dans le lobe non ischémié et ne se modifie que peu au cours du temps d'incubation. La proportion d'activité libre, initialement faible, augmente progressivement au cours du temps d'incubation pour les lysosomes provenant des lobes ischémiés, le phénomène étant le plus marqué quand l'ischémie a duré deux heures. Il est bien à noter qu'au début de l'incubation, la proportion d'activité libre est quasi normale, ce n'est qu'au cours des minutes suivantes qu'elle augmente.

Ces résultats indiquent clairement que les lysosomes

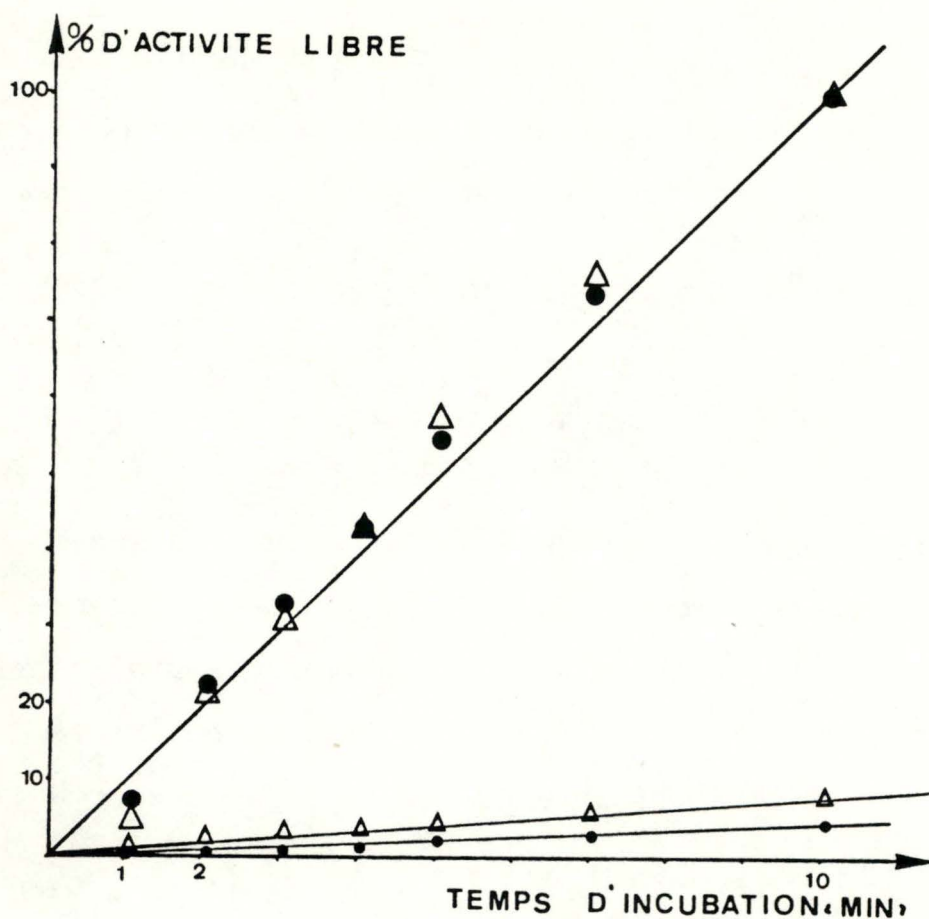


Figure 8 :Influence du temps d'incubation sur les activités libres de la Cathepsine C,mesurées à pH=5 et à 37°C. Le substrat de la cathepsine C utilisé est le GAN. Les activités libres sont exprimées en pourcents des activités totales.

- :Activité libre du lobe témoin.
- :Activité totale du lobe témoin.
- △:Activité libre du lobe ligaturé 2 heures et dont la circulation a été rétablie pendant 2 heures.
- △:Activité totale du lobe ligaturé 2 heures et dont la circulation a été rétablie pendant 2 heures.

de foie ligaturé sont nettement moins stables dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées. Toutefois, les lysosomes avant l'incubation ont une membrane apparemment comparable à celle des lysosomes normaux quant à sa perméabilité au GAN. Cela laisse supposer que dans la cellule ischémisée, les enzymes des lysosomes, du moins jusqu'à deux heures d'ischémie, sont encore bien inclus dans les organelles. La mesure classique de l'activité libre sur les lysosomes de foie ischémisé donne une idée fautive de la situation. En effet, comme nous l'avons dit, cette mesure se fait après une incubation de 10 minutes. Si pendant cette incubation, les lysosomes de foie normal restent intacts, il n'en n'est pas de même pour les lysosomes de foie ischémisé; ils se détériorent pendant ce temps, relativement court. Cela signifie que l'activité libre de ces lysosomes, mesurée après dix minutes est élevée. Toutefois, cette valeur élevée provient d'un processus de détérioration qui s'est produit "in vitro" résultant évidemment d'un état anormal de ces lysosomes.

Nous avons également fait un premier essai visant à déterminer la réversibilité éventuelle de l'altération lysosomale les rendant plus sensibles à l'incubation à 37°C. La figure 8 montre comment évolue l'activité libre de la cathepsine C, quand les lysosomes proviennent d'un lobe non ischémisé et d'un lobe ischémisé pendant deux heures et où l'on a rétabli la circulation pendant deux heures. Manifestement, dans ces conditions, l'évolution de l'activité libre est semblable pour les deux types de lysosomes, les organites des lobes ischémisés ont apparemment récupéré une stabilité normale.

### 3.3. Comportement de la cathepsine C en présence de glycylyphénylalanine- $\beta$ -naphthylamide (GPN) comme substrat.

Comme l'ont montré les travaux de Jadot et al. (1984), la glycylyphénylalanine- $\beta$ -naphthylamide (GPN) provoque une rupture de la membrane des lysosomes lorsque ceux-ci sont incubés à 37°C et à pH 6 en présence de ce composé. Ce phénomène résulte d'une pénétration du GPN sous sa forme non protonée dans le lysosome où il est rapidement hydrolysé par la cathepsine C en dipeptide et en naphthylamine chargés qui ne peuvent que difficilement traverser la membrane du granule. En résulte un déséquilibre osmotique entre le milieu intralysosomal et le milieu extérieur provoquant une entrée d'eau dans le lysosome, un gonflement et une rupture de l'organite. Le processus que nous venons de décrire est donc directement lié à la pénétration d'une substance dans le lysosome et par conséquent à la perméabilité de sa membrane.

Il nous a paru intéressant dans une étude concernant la membrane des lysosomes de foie ischémié de déterminer le comportement de ces organites en présence de GPN. Nos expériences se divisent en deux groupes. Dans une première série, nous avons déterminé l'évolution de l'activité libre de la cathepsine C en fonction de la concentration variable en GPN, et l'influence du temps d'incubation et de la température sur l'activation de l'enzyme en présence d'une concentration fixe en GPN. Dans une deuxième série d'expériences, nous avons essayé de mesurer l'hydrolyse intralysosomiale du GPN suivant la méthode proposée par Jadot et al. (1984).

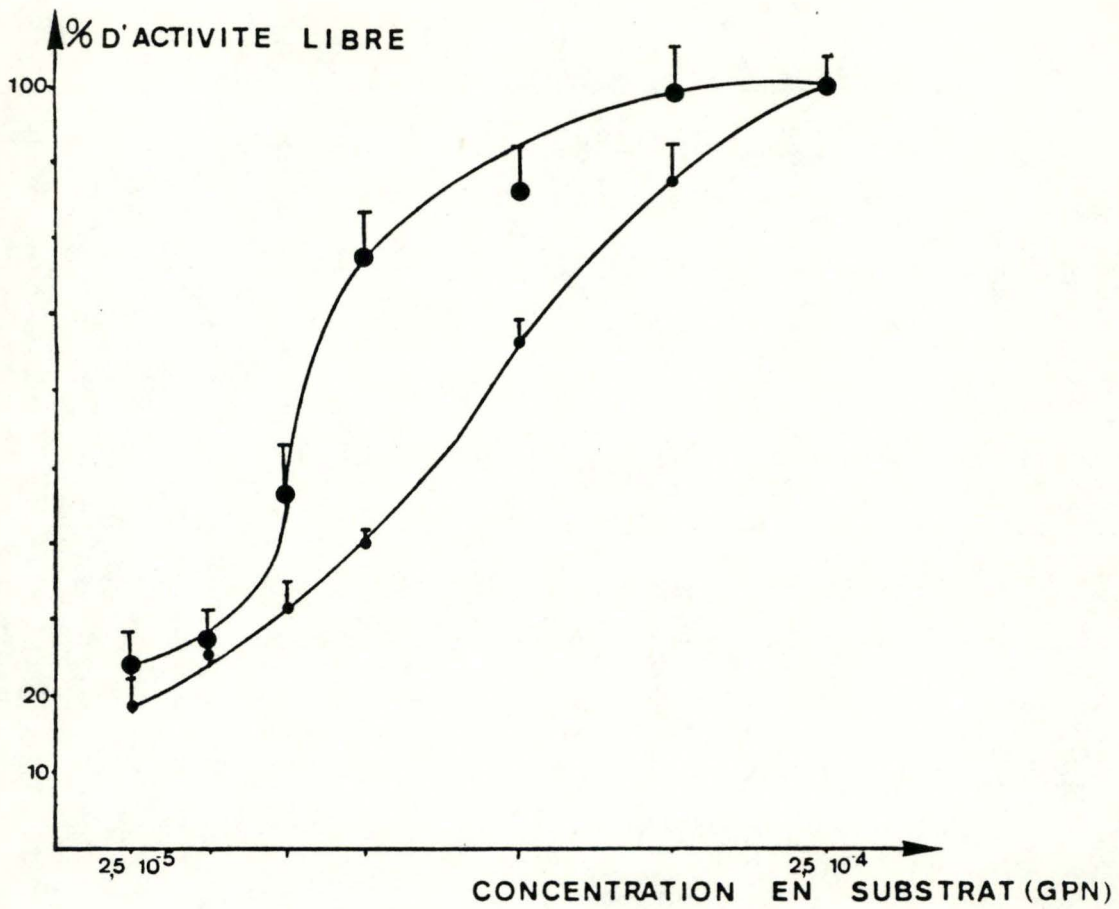


Figure 9 :Influence de la concentration en substrat sur l'activité libre de la cathepsine c,mesurée à pH=6 et à 37°C. Le substrat de la cathepsine c utilisé est le GPN. Les activités libres sont exprimées en pourcents des activités totales.

○:Lobe témoin

●:Lobe ligaturé 1 heure.

Le nombre d'expériences réalisées est égal à 3 pour le lobe ligaturé et le lobe témoin.

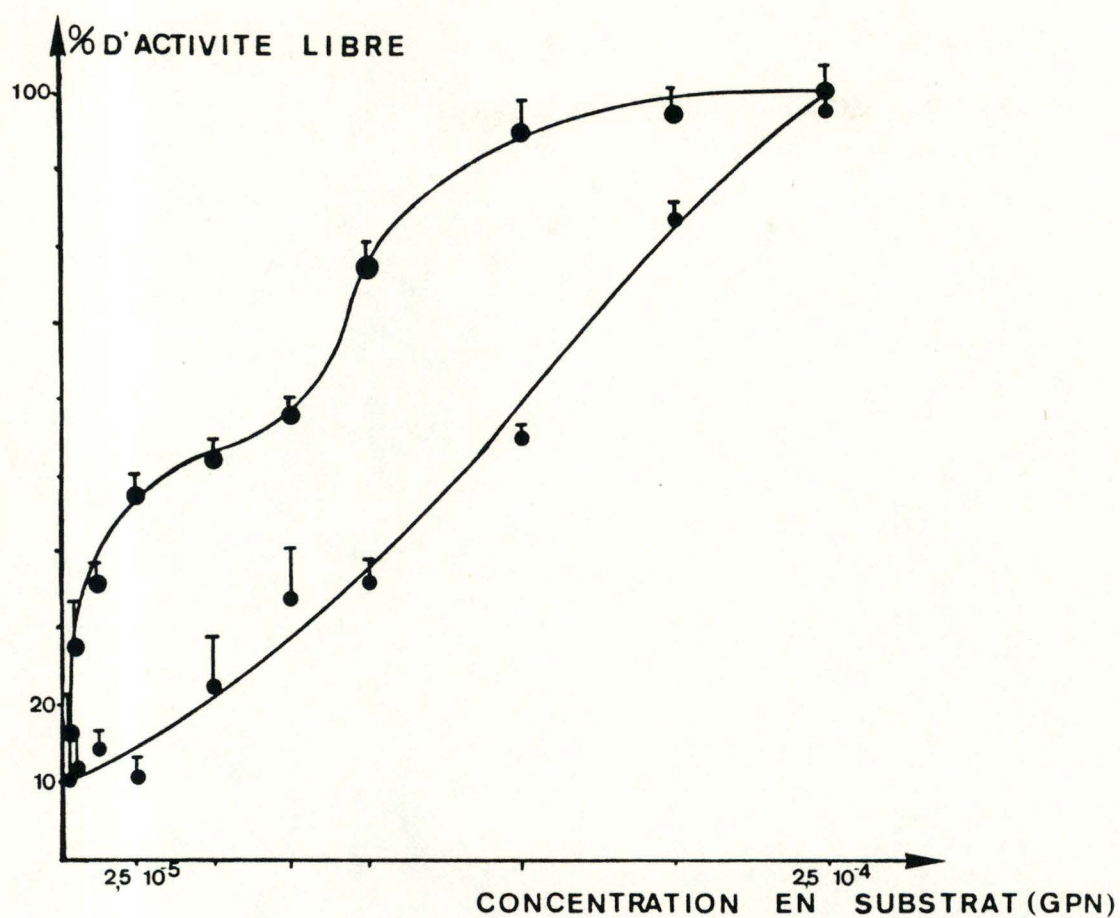


Figure 10: Influence de la concentration en substrat sur les activités libres de la cathepsine c, mesurées à pH=6 et à 37°C. Le substrat de la cathepsine c utilisé, est le GPN. Les activités libres sont exprimées en pourcents des activités totales.

○: Lobe témoin

●: Lobe ligaturé 2 heures.

Le nombre d'expériences réalisées est égal à 3 pour le lobe témoin et le lobe ligaturé.

### 3.3.1. Activité libre de la cathepsine C en présence de concentrations croissantes en GPN.

Dans ces expériences, les fractions mitochondriales totales ont été incubées en présence de GPN, la concentration variant de  $2.5 \times 10^{-6}$  à  $2.5 \times 10^{-4}$  M, et ce pendant 10 minutes. Comme le montrent les figures 9 et 10, l'activité libre de la cathepsine C augmente en fonction de la concentration en GPN dans le milieu, pour atteindre une valeur égale à l'activité totale pour des concentrations de l'ordre de  $2.5 \times 10^{-4}$  M.

La courbe d'activation est nettement décalée vers la gauche lorsque les lysosomes proviennent de lobes ischémiés, traduisant une instabilité plus grande de ces organites en présence de dipeptidyl naphthylamide. C'est ainsi que pour obtenir une activité libre égale à 50% de l'activité totale, une concentration en GPN de  $1.25 \times 10^{-4}$  M est nécessaire pour les lysosomes normaux, une même activation est observée à une concentration égale à  $0.8 \times 10^{-4}$  M après une ischémie de une heure et égale à  $0.4 \times 10^{-4}$  M après une ischémie de deux heures. (Notons que la courbe d'activation observée après deux heures d'ischémie pourrait être biphasique et correspondre à la réponse de deux populations de lysosomes ).

### 3.3.2. Activité libre de la cathepsine C en présence de GPN. Influence du temps d'incubation et de la température.

Dans ces expériences, les lysosomes ont été incubés pendant des temps croissants, à des températures de 0°C, 12°C, 17°C, 22°C, 27°C et 37°C en présence de GPN à une concentration

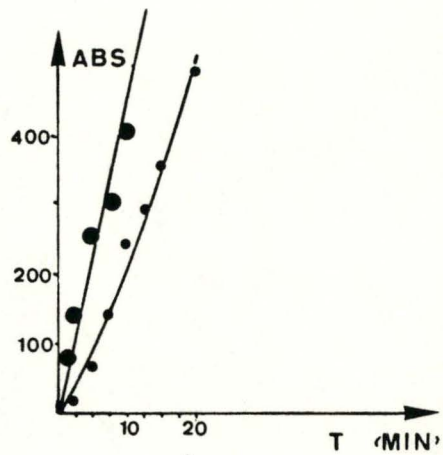
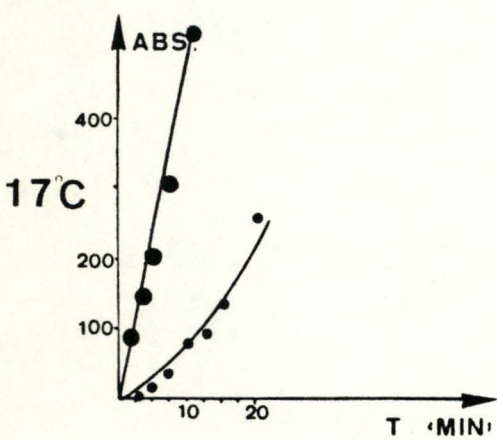
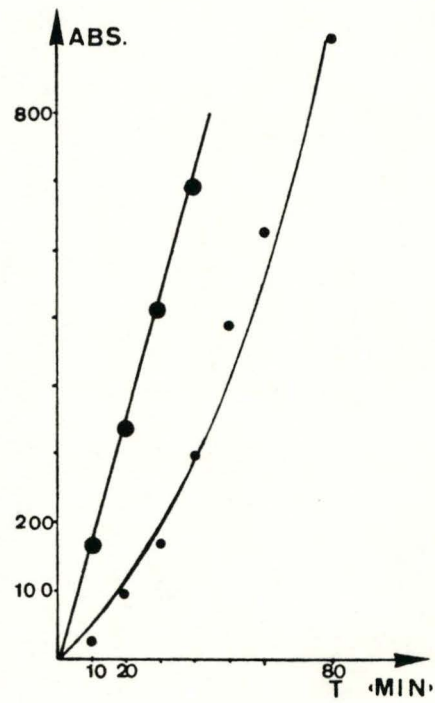
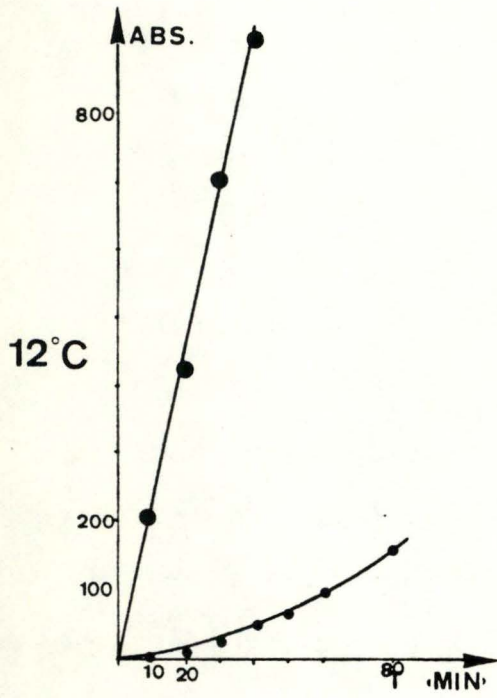
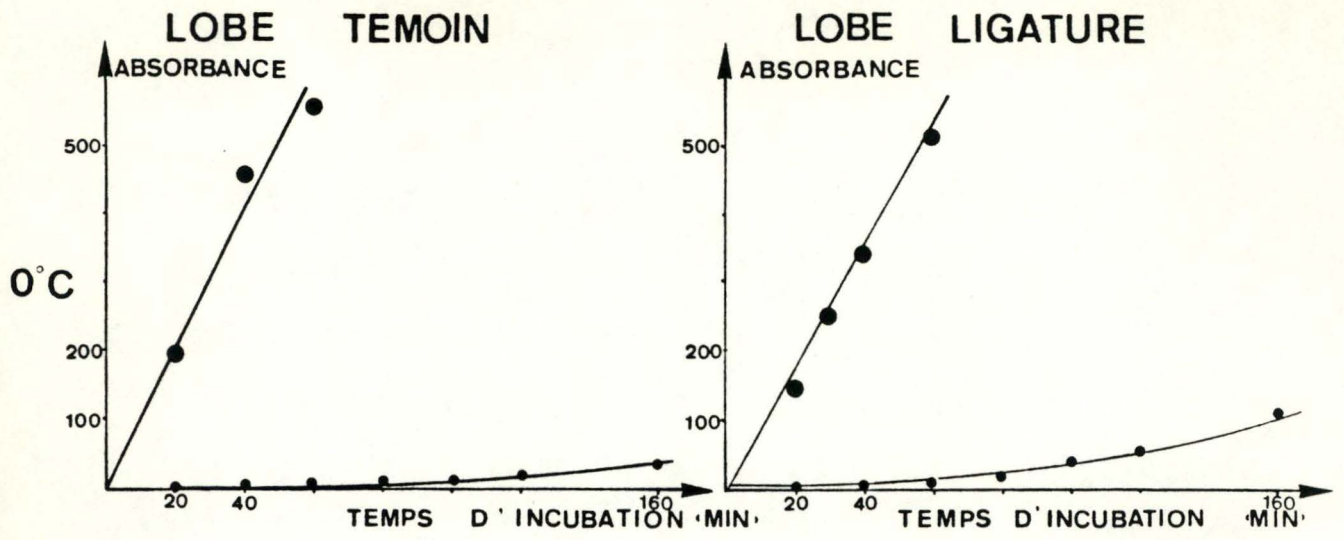


Figure 11a.

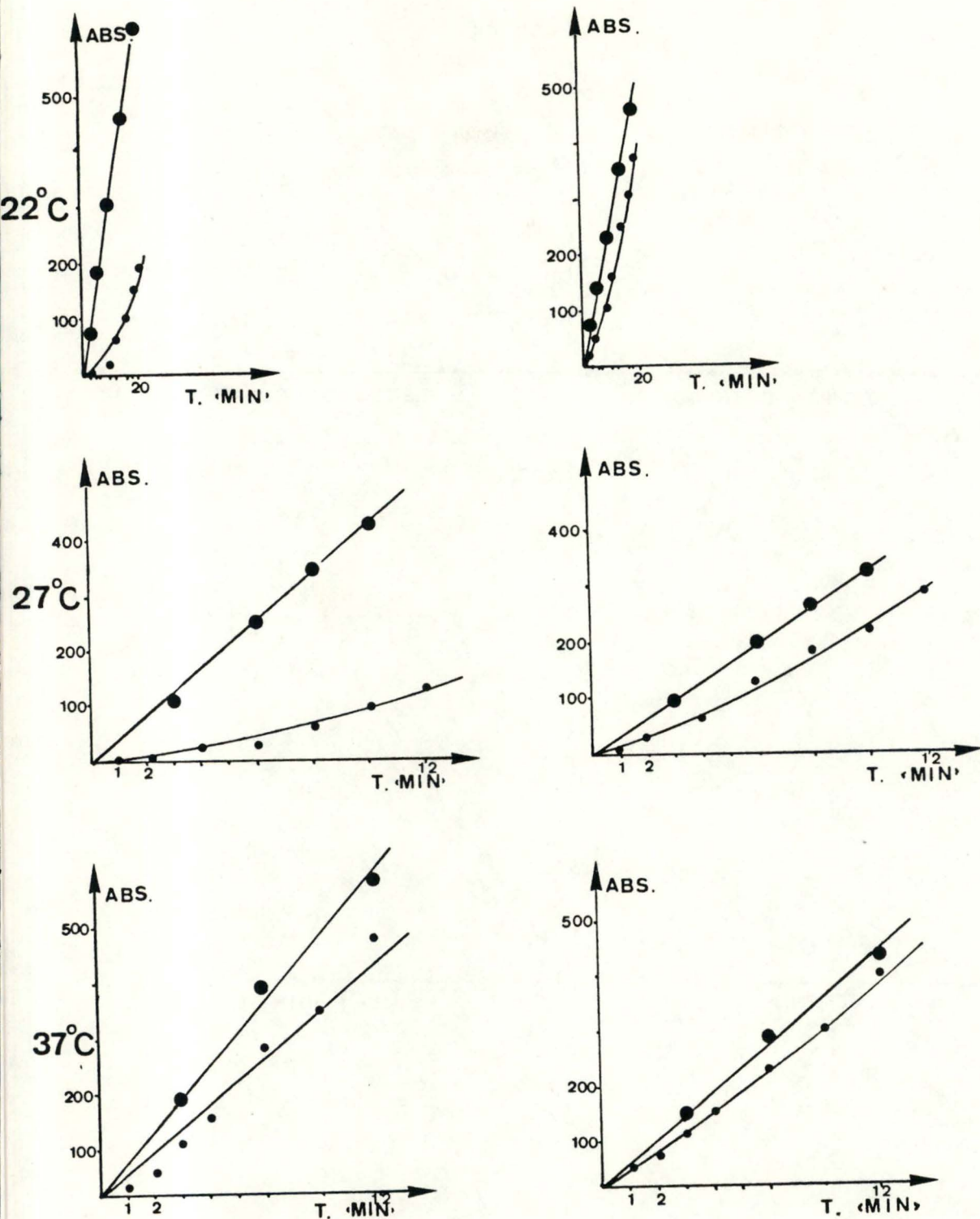


Figure 11 b.

Figures 11 a et 11 b: Influence de la température et du temps d'incubation sur les activités libres et totales de la Cathepsine C, mesurées à pH=6, pour le lobe témoin et le lobe ligaturé. Le substrat de la Cathepsine C est le GPN.

- : Activité libre.
- : Activité totale.

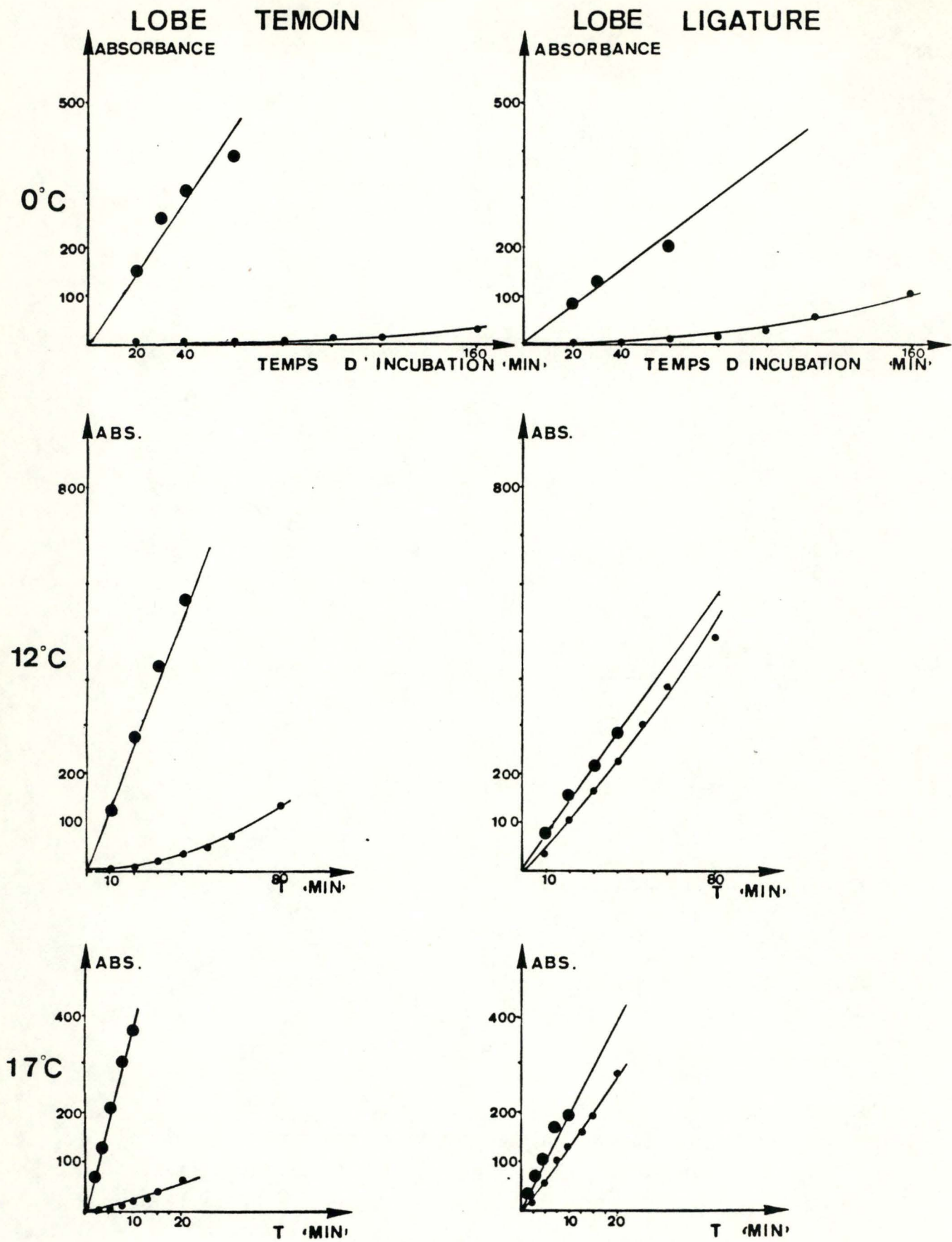


Figure 12 a.

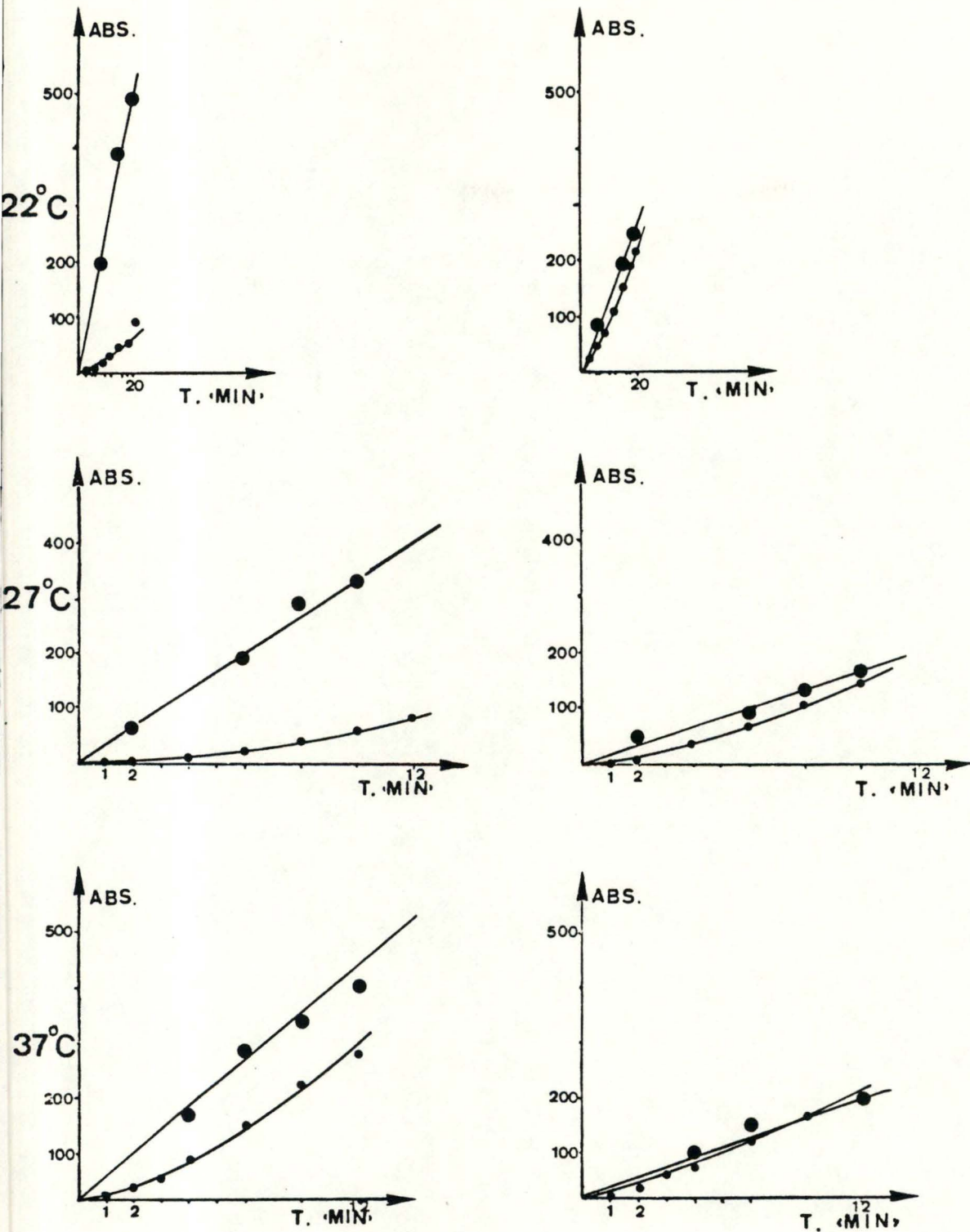


Figure 12 b.

Figures 12a et 12b: Influence de la température et du temps d'incubation sur les activités libres et totales de la cathepsine c, mesurées à pH=6, pour le lobe témoin et le lobe ligaturé 2 heures. Le substrat de la cathepsine c utilisé, est le GPN.

- : Activités libres
- : Activités totales.

$2.5 \times 10^{-4}$  M. Les conditions d'incubation étaient soit celles des mesures d'activité libre, soit celles des mesures d'activité totale. Les résultats sont représentés dans les figures 11 et 12. A  $0^{\circ}\text{C}$ , l'activité libre reste très faible pendant toute la durée de l'incubation, que ce soit pour le lobe ischémié ou pour le lobe témoin. Cela indique clairement que les lysosomes présents dans l'homogénat, après une ou deux heures d'ischémie, sont des lysosomes intacts, du moins dont la membrane est suffisamment imperméable ~~que~~ pour fortement limiter l'entrée du GPN. Lorsque la température augmente, on constate que la cathepsine libre du lobe témoin s'accroît comme l'on décrit Jadot et al. (1984), pour finalement atteindre à  $37^{\circ}\text{C}$ , des valeurs égales à celles des activités totales. Un même processus est observé pour la préparation provenant des lobes ischémiés; toutefois, aux températures basses ( $12^{\circ}\text{C}$ ,  $17^{\circ}\text{C}$ ) l'activation de la cathepsine C est beaucoup plus marquée. Les lysosomes de foie ischémié sont beaucoup plus sensibles à l'augmentation de température que les lysosomes de foie normal. Cette différence est accentuée lorsque l'ischémie se prolonge. Si l'on compare par ex. le comportement à  $12^{\circ}\text{C}$ , l'activation est plus rapide après deux heures d'ischémie qu'après une heure, et est considérablement plus prononcée ~~que~~ pour la préparation provenant du lobe non ischémié.

### 3.3.3. Hydrolyse intralysosomiale du GPN.

Jadot et al. (1984) ont montré qu'il était possible de mettre en évidence une hydrolyse intralysosomiale du GPN de deux façons, soit en supprimant l'activateur de l'enzyme (chlorohydrate de thioéthanolamine) dans le milieu, soit en

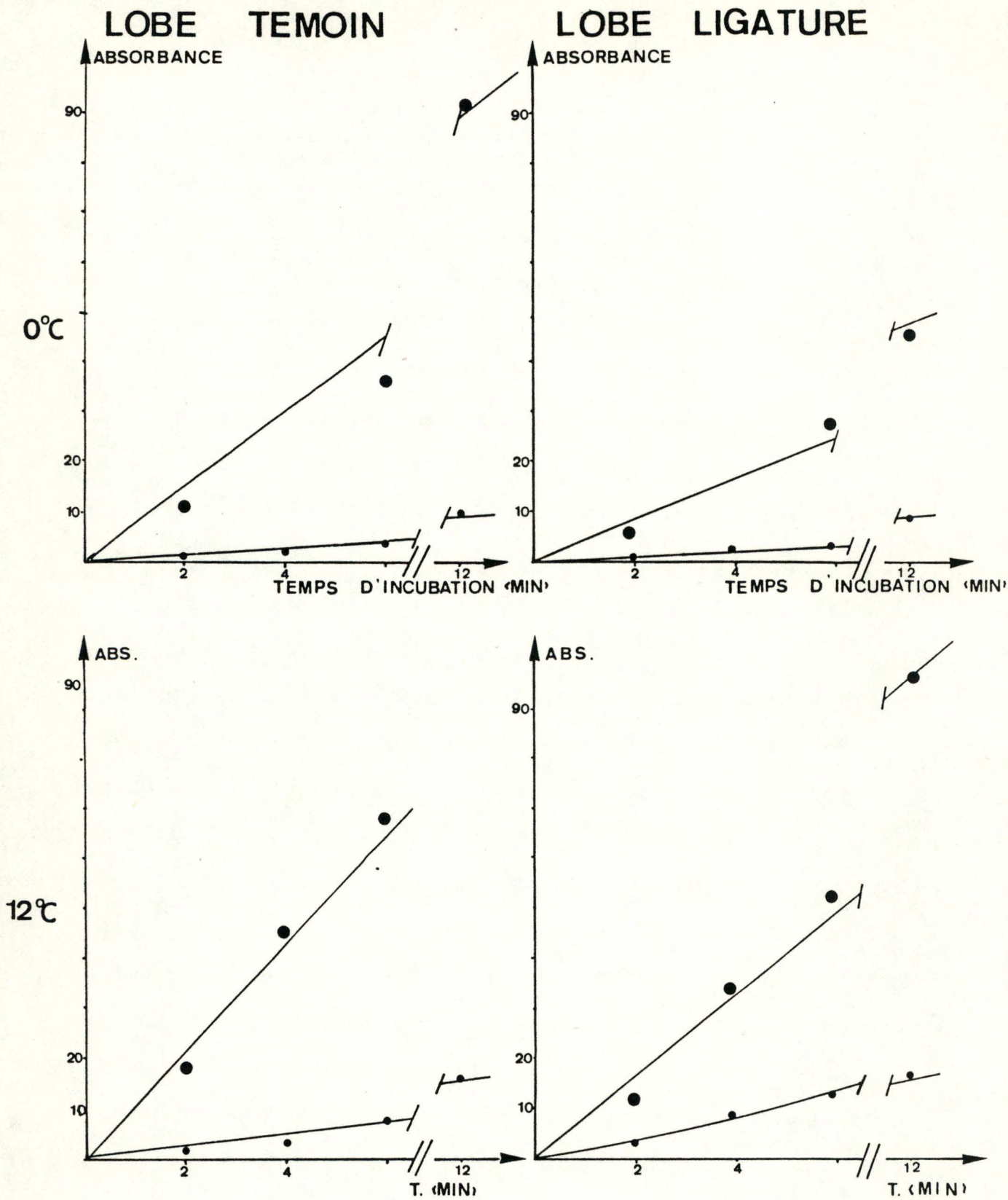
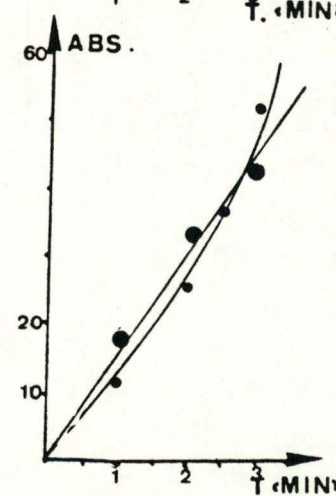
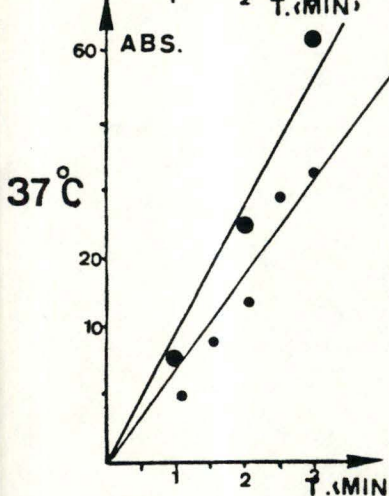
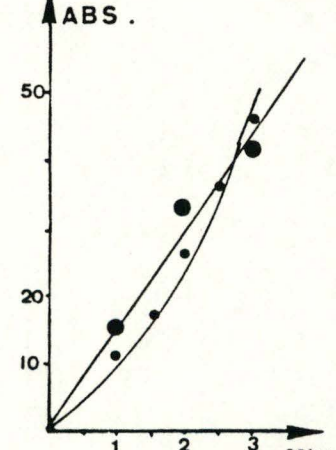
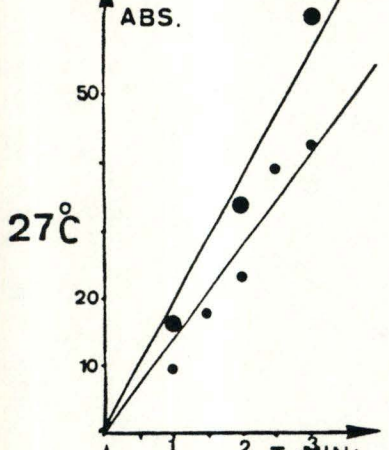
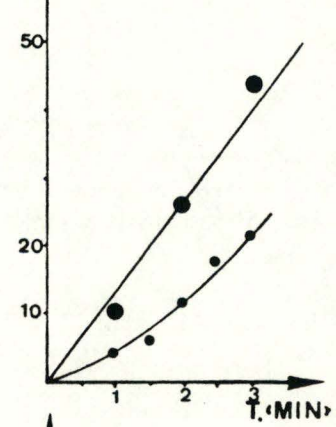
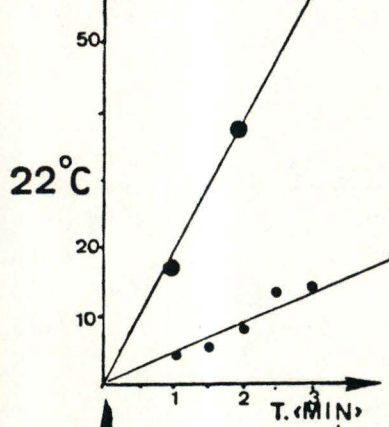
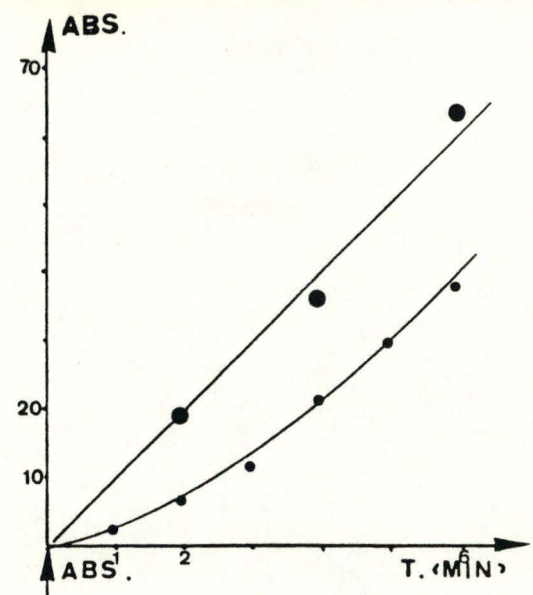
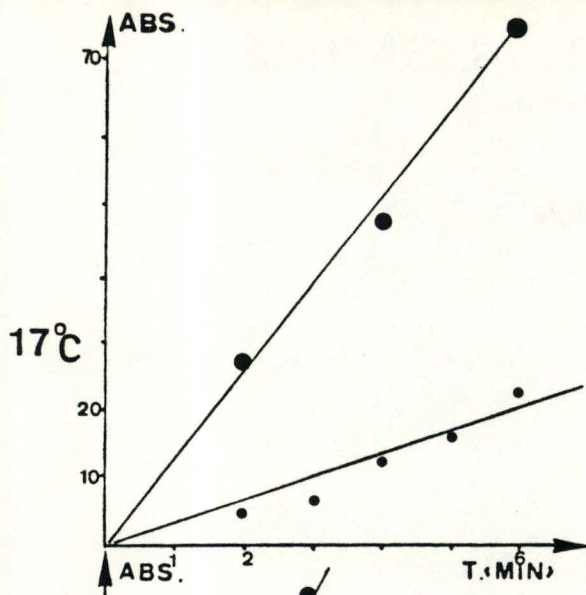


Figure 13 a.



Figures 13 a et 13 b: Mesure de l'activité intralysosomiale: Influence de la température et du temps d'incubation sur l'activité libre et totale de la cathepsine c, mesurées à pH=6 et en l'absence d'activateur. Le substrat utilisé, est le GPN. Le lobe a été ligaturé pendant 1 heure.

○: Activité libre                      ●: Activité totale.

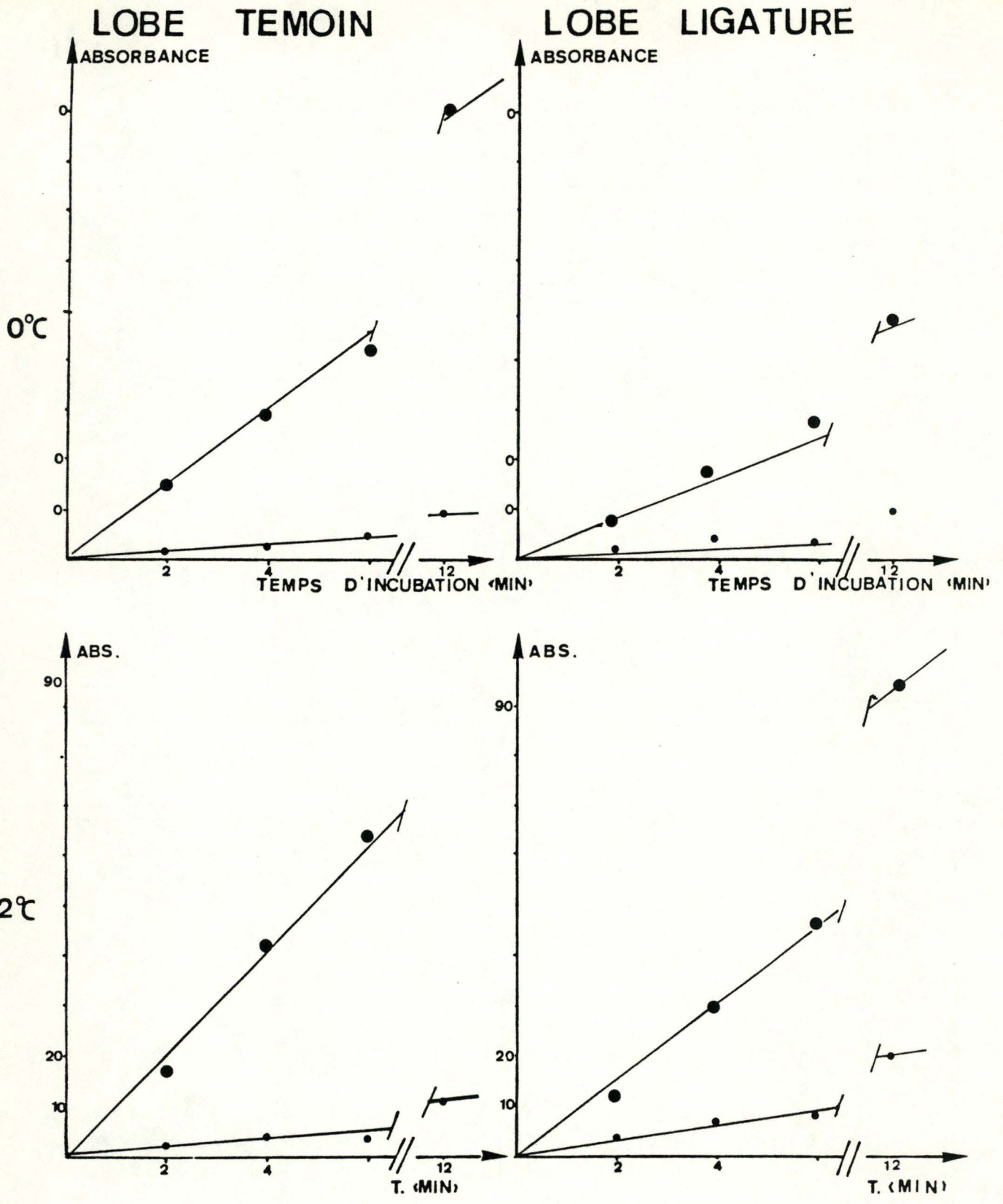
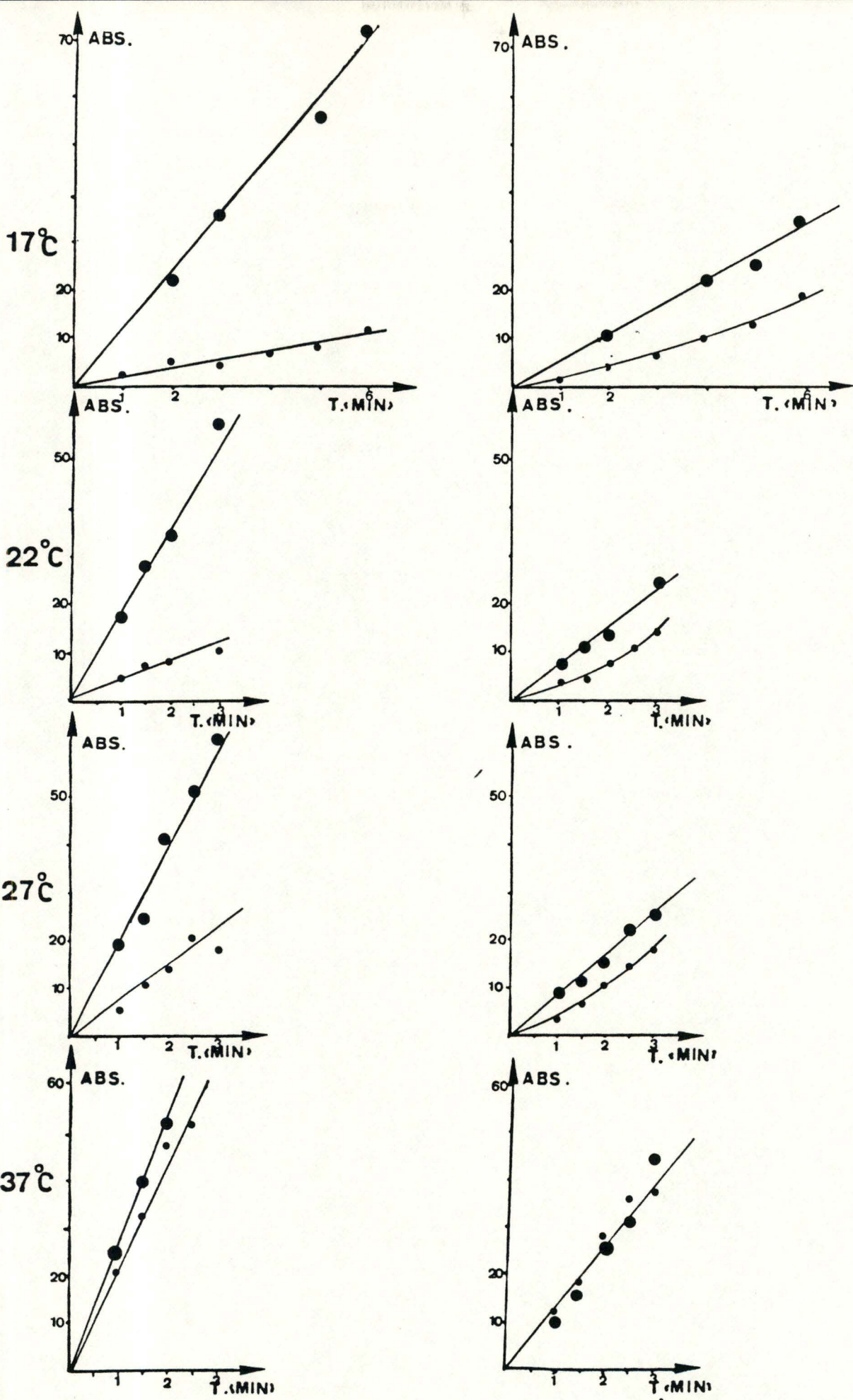


Figure 14 a.



Figures 14a et 14b: Mesure de l'activité intralysosomiale: Influence de la température et du temps d'incubation sur l'activité libre et totale de la cathepsine c, mesurées à pH=6 et en l'absence d'activateur. Le substrat utilisé, est le GPN. Le lobe a été ligaturé pendant 2 heures.

○: Activité libre

●: Activité totale.

ajoutant du  $Zn^{++}$  dans ce milieu. Le principe de ces méthodes est le suivant. La rupture des lysosomes par le GPN provient comme nous l'avons vu d'une hydrolyse intralysosomiale du composé. En diminuant considérablement la vitesse d'hydrolyse, grâce à une suppression de l'activateur de la cathepsine C, on peut pendant un temps relativement court, mettre en évidence l'hydrolyse intralysosomiale du GPN sans rupture du lysosome. D'autre part, le  $Zn^{++}$  est un puissant inhibiteur de la cathepsine C (Misaka E. et Tappel A.L., 1971) et ne peut que faiblement diffuser à travers la membrane du lysosome. (Reijngoud D.J. et Tager J.M., 1977)

Si l'on ajoute du  $Zn^{++}$   $10^{-4}$  M dans le milieu d'incubation, l'enzyme accessible au  $Zn^{++}$ , donc situé en dehors des lysosomes est fortement inhibé, alors que l'enzyme intralysosomal sera beaucoup moins. Il est possible ainsi, de mettre en évidence pendant un temps court, l'activité intralysosomiale de la cathepsine C, avant que les lysosomes soient rompus.

Les figures 13 et 14 rapportent les activités libre et totale de la cathepsine C, l'incubation se réalisant à différentes températures en absence de chlorhydrate de thioléthanolamine. Les déterminations ont été faites sur les lobes témoins et sur les lobes ischémiés pendant une heure. (figure 13) et deux heures (figure 14). En accord avec ce qu'ont démontré Jadot et al. (1984) l'activité libre mesurée à  $0^{\circ}C$  est faible par rapport à l'activité totale. Le rapport de ces activités

augmente en fonction de la température jusqu'à atteindre une valeur proche de 1 à  $37^{\circ}C$ . Il est à noter que dans ces

# LOBE TEMOIN

# LOBE LIGATURE

Cathepsine C

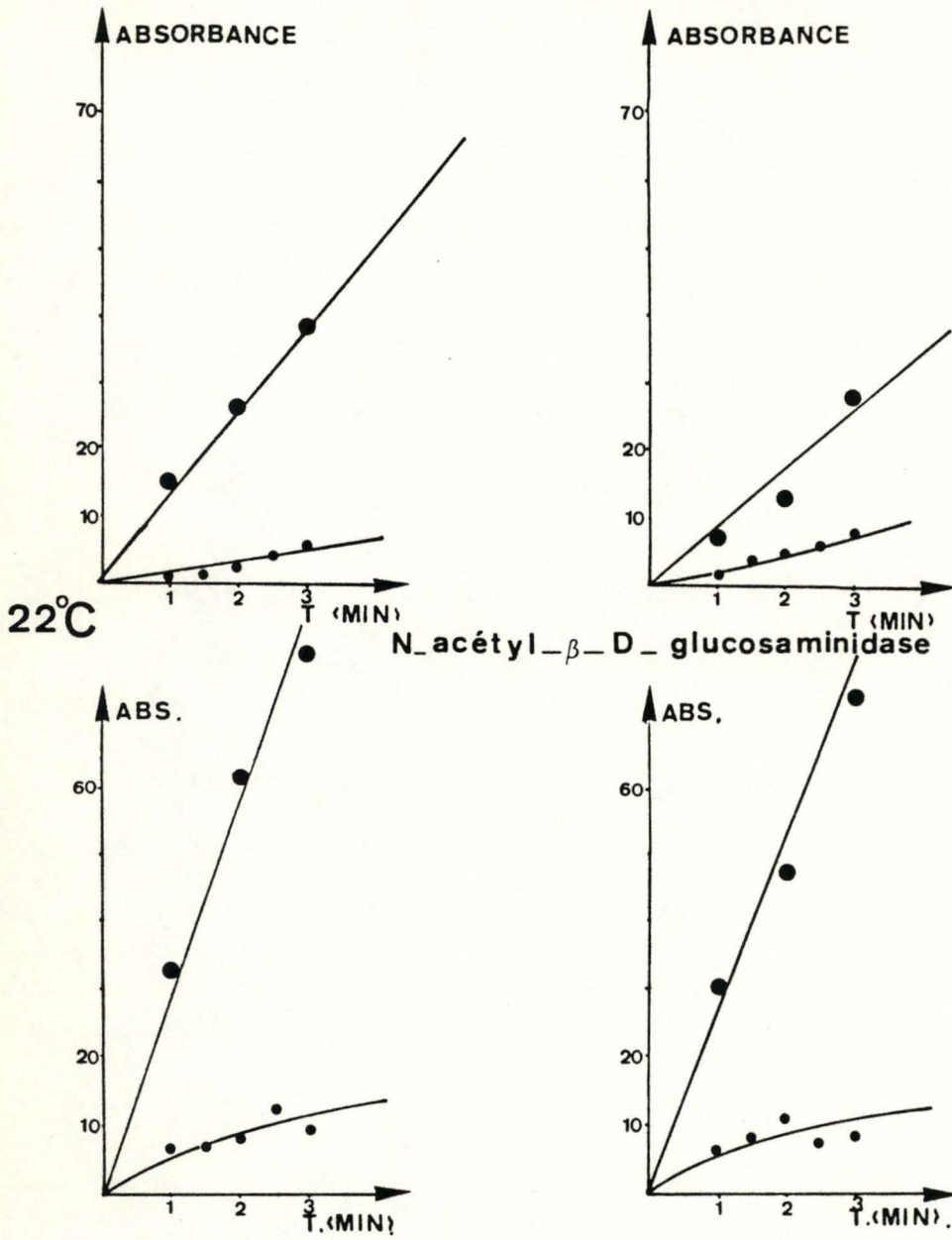


Figure 15 : Dosage simultané de la cathepsine C et de la N-acetyl -β-D-glucosaminidase pour le lobe témoin et le lobe ligaturé 1 heure.

Cathepsine C

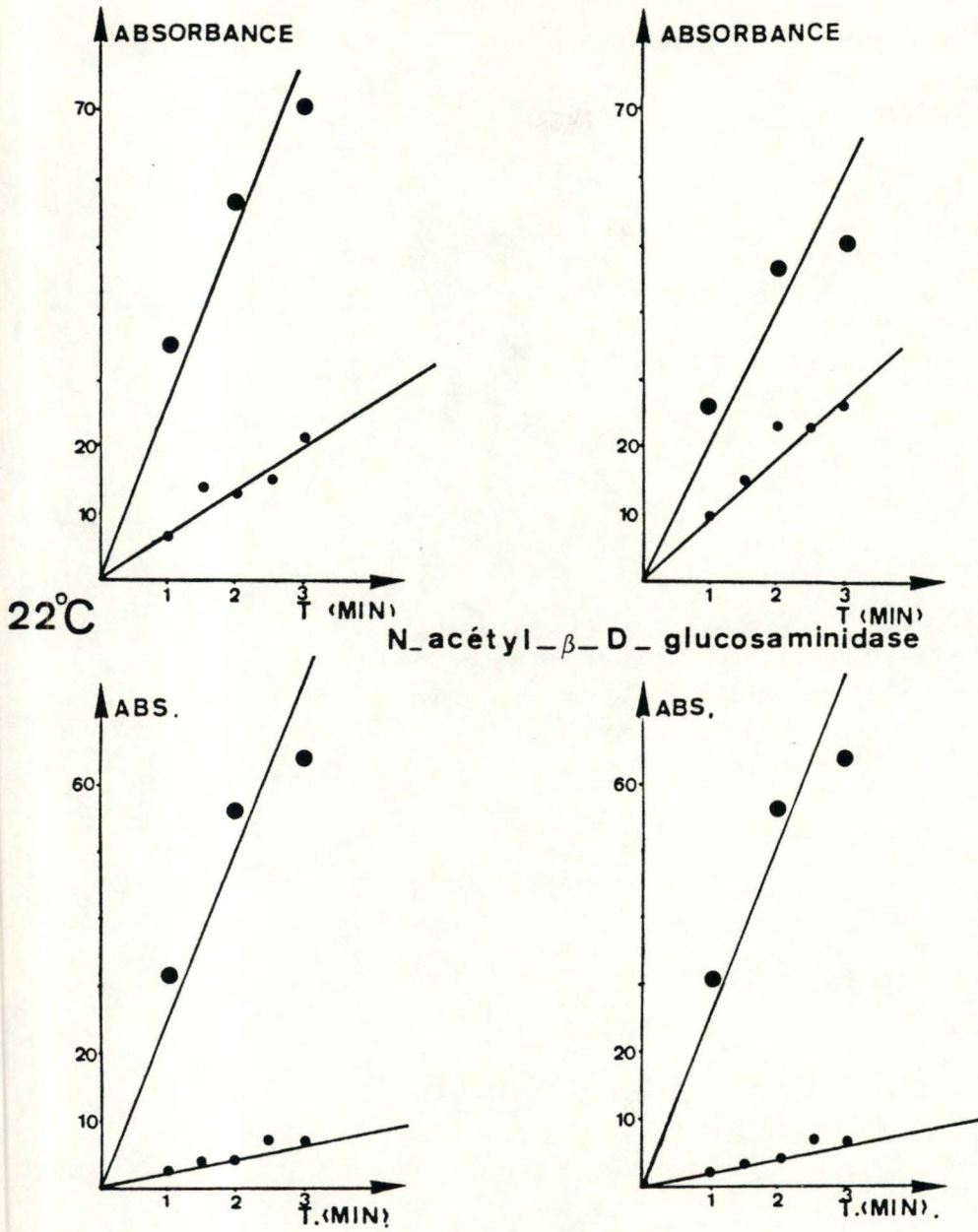


Figure 16: Dosage simultané de la cathepsine C et de la N-acétyl-β-D-glucosaminidase pour le lobe témoin et lobe ligaturé 2 heures.

conditions, la plupart des lysosomes sont intacts. Par conséquent, la quasi similitude des activités libre et totale à 37°C par exemple, ne peut provenir que de l'accessibilité à l'intérieur des lysosomes, de la cathepsine C au GPN. Les résultats sont les mêmes pour le lobe témoin de l'expérience rapportée à la figure <sup>13</sup>14. L'augmentation de température provoque également une élévation du rapport activité libre/activité totale lorsque les lysosomes proviennent des lobes ischémiés. Toutefois, cet accroissement est beaucoup plus marqué aux faibles températures. De plus il n'est pas linéaire, ce qui pourrait provenir du fait que les lysosomes du foie ischémié se rompent beaucoup plus rapidement avec dans ces conditions une égalisation des activités libres et totales.

Comme l'on montré Jadot et al.(1984), l'activité libre très élevée à 37°C observée avec le GPN, en absence d'activateur, n'est pas due à une rupture des lysosomes, mais bien à une pénétration du substrat dans les granules et à sa lente hydrolyse. En effet, l'activité libre d'une autre enzyme lysosomale, la N-acétyl- $\beta$ -D- glucosaminidase, n'est pratiquement pas modifiée dans ces conditions. Nous avons mesuré l'activité libre de cette hydrolase au cours d'une incubation des granules à 22°C en présence de GPN, tout en déterminant l'activité libre de la cathepsine C. Les granules provenait de lobes ischémiés pendant une et deux heures et de lobes témoins. Comme le montrent les fig. 15 et 16, à cette température, l'activité libre de la cathepsine C reste faible pendant les temps d'incubation utilisés, pour les lysosomes originaires des lobes témoins. Elle est nettement plus élevée quand ceux-ci proviennent

# LOBE TEMOIN

# LOBE LIGATURE

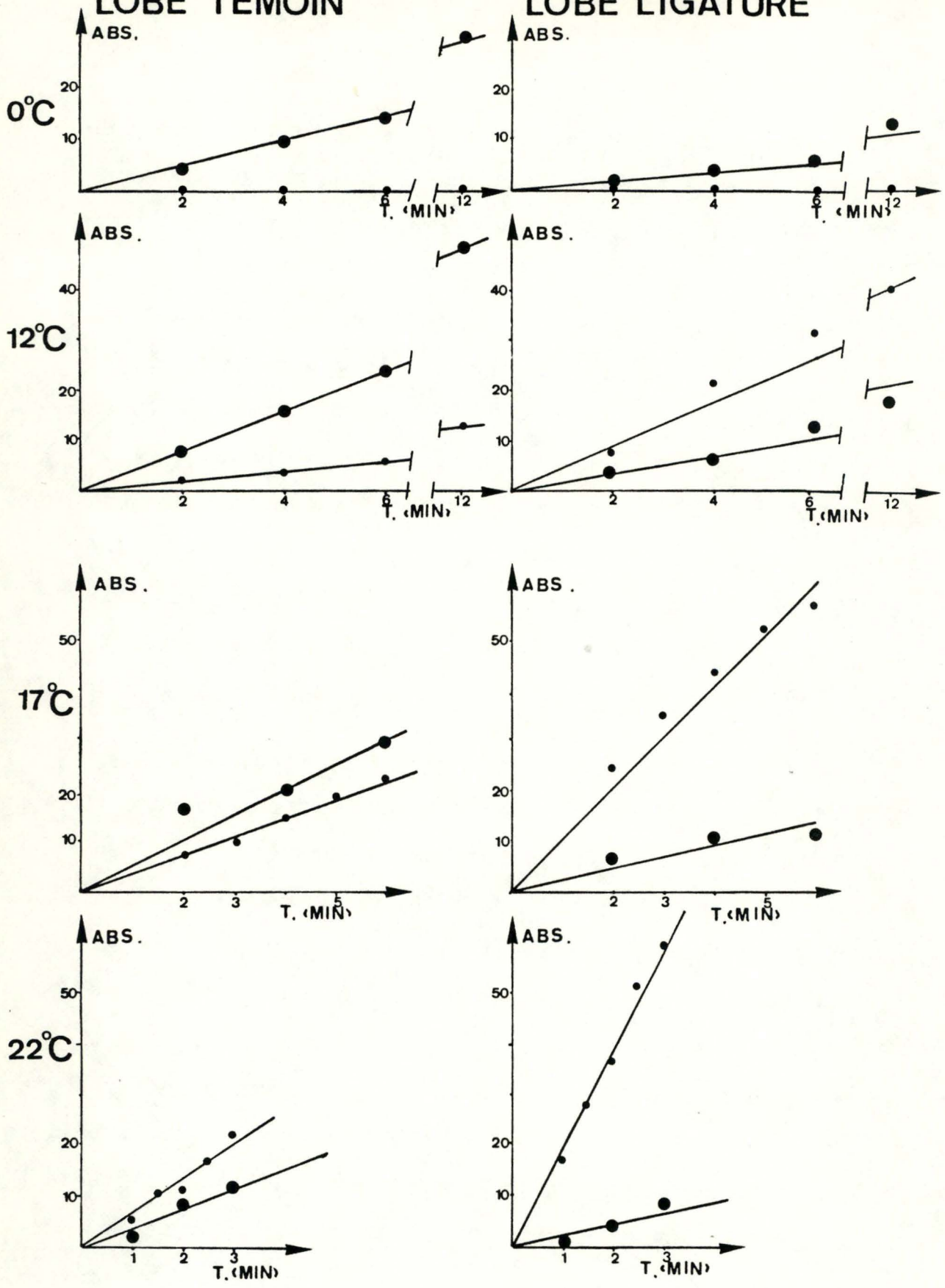


Figure 17 a.

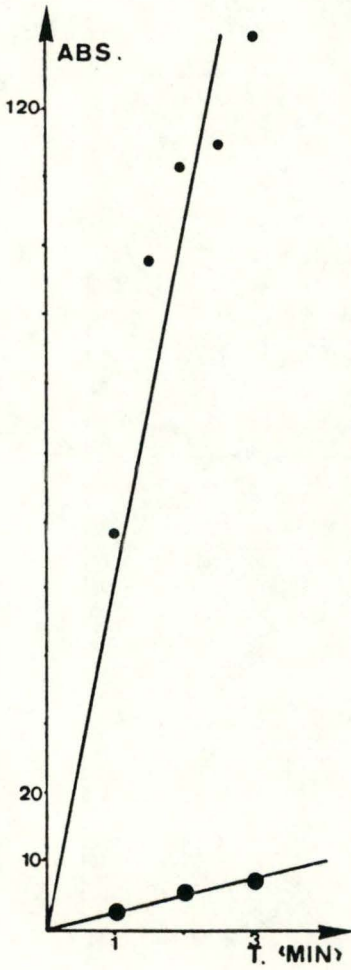
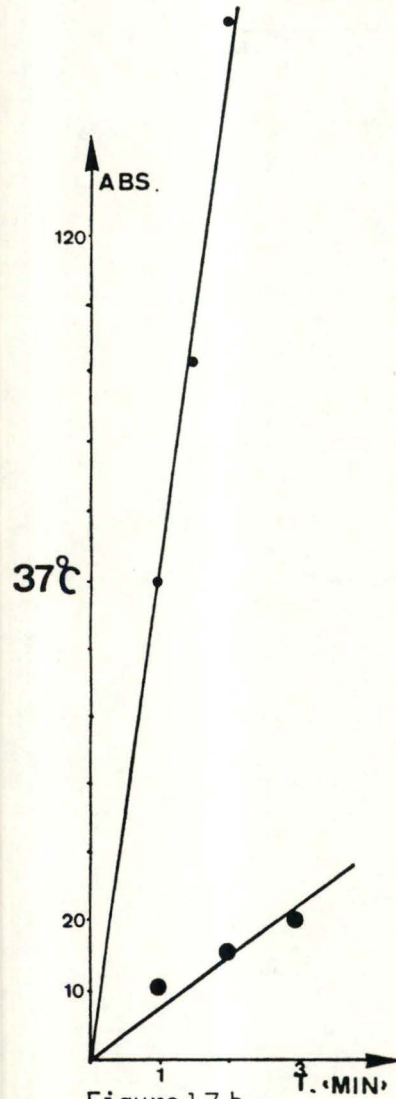
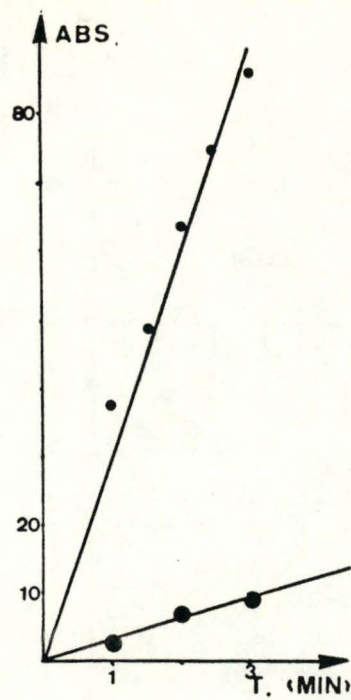
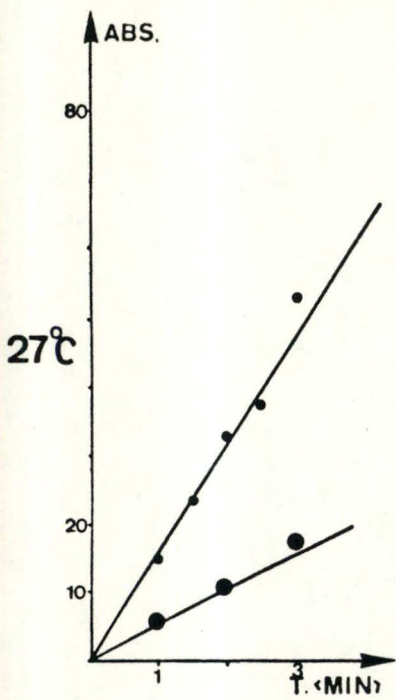


Figure 17 b.

Figures 17 a et 17 b: Mesure de l'activité intralysosomiale: Influence de la température et du temps d'incubation sur l'activité libre et totale de la cathepsine c, mesurées à pH=6 et en présence de  $Zn SO_4$ .

Le substrat de la cathepsine c utilisé, est le GPN.

Le lobe a été ligaturé 1 heure.

- : Activité libre.
- : Activité totale.

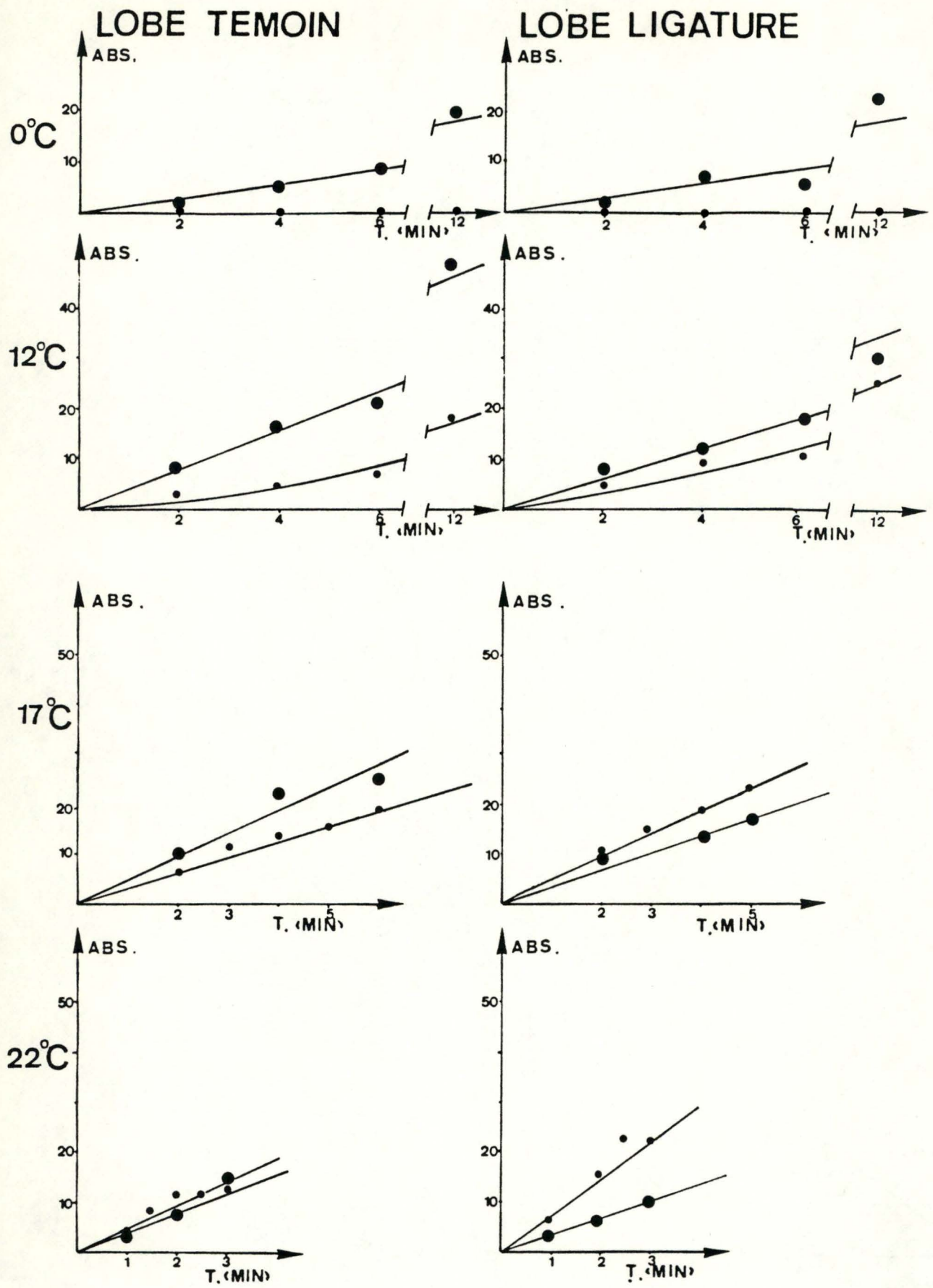


Figure 18 a.

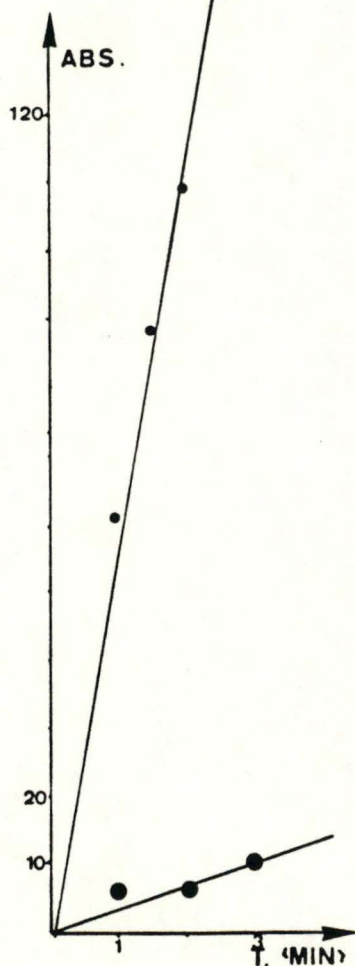
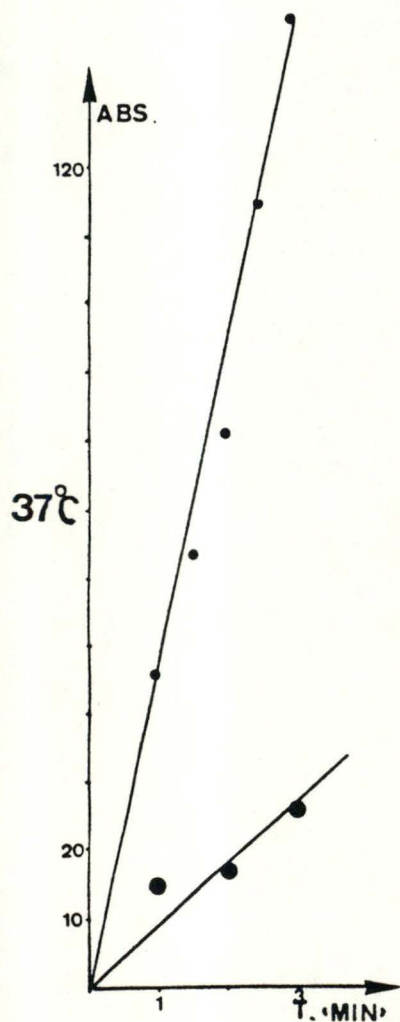
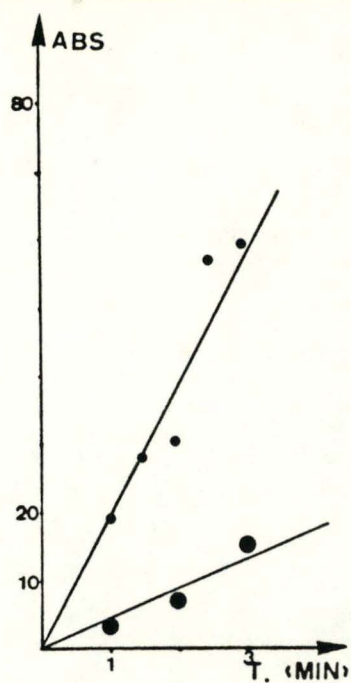
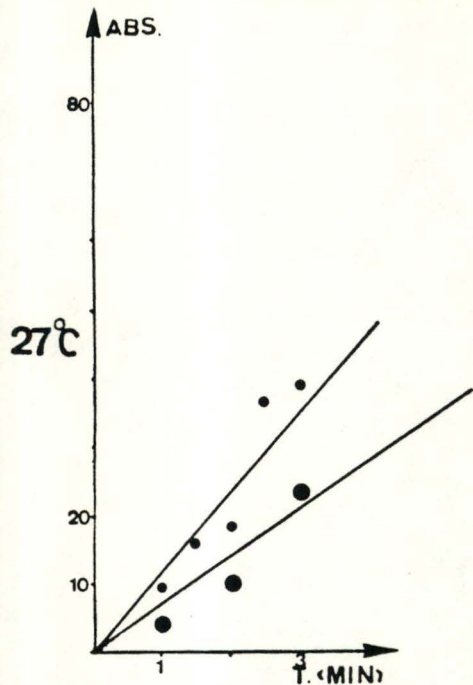


Figure 18 b.

Figures 18 a et 18 b: Mesure de l'activité intralysosomiale: Influence de la température et du temps d'incubation sur l'activité libre et totale de la cathepsine c, mesurées à pH=6 et présence de  $Zn SO_4$ .

Le substrat de la cathepsine C utilisé, est le GPN.

Le lobe a été ligaturé 2 heures.

○: Activité libre.

●: Activité totale.

de lobes ligaturés. Dans tous les cas, l'activité libre de la N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase est comparable pour le lobe témoin et pour le lobe ischémié. Il semble donc que l'augmentation d'activité libre de la cathepsine C à cette température, pour les préparations issues des lobes ligaturés, ne soit pas due à une rupture des lysosomes au cours de l'incubation mais à une augmentation de la perméabilité de la membrane au GPN non chargé.

Les figures 17 et 18 illustrent les résultats obtenus lorsque les mesures des activités libre et totale de la cathepsine C se font en présence de  $\text{ZnSO}_4$   $10^{-3}$  M à différentes températures. Pour bien comprendre l'évolution du phénomène, référons-nous d'abord aux températures extrêmes que nous avons utilisées:  $0^\circ\text{C}$  et  $37^\circ\text{C}$  pour les lobes non ischémiés. A  $0^\circ\text{C}$ , l'activité libre est pratiquement nulle; cela provient du fait que à cette basse température, le GPN ne diffuse que très peu à l'intérieur du lysosome et par conséquent, l'activité libre provient essentiellement de la faible quantité de cathepsine C à l'état libre, à l'extérieur des lysosomes; en présence de  $\text{Zn}^{++}$ , cette activité est tellement réduite qu'elle est à peine décelable. A  $37^\circ\text{C}$ , un phénomène tout à fait inverse est apparent, l'activité libre est beaucoup plus élevée que l'activité totale. A cette température en effet, (voir pour comparaison les figures 13 et 14), le GPN pénètre dans le lysosome et son hydrolyse, à l'abri du  $\text{Zn}^{++}$  est nettement plus importante que l'hydrolyse qui se produit lorsque la totalité de la cathepsine C a été libérée (conditions de l'activité totale) et est totalement inhibée parce que acces-

sible au  $Zn^{++}$  présent dans le milieu. On peut constater que le passage d'un comportement à l'autre de l'activité libre se fait progressivement quand la température augmente.

A 0°C, on n'observe pas de différence entre le lobe ischémié et le lobe normal, l'évolution avec la température se fait dans le même sens pour les deux préparations mais avec une augmentation relative de l'activité libre par rapport à l'activité totale, plus marquée aux faibles températures pour les granules provenant du lobe ischémié; la différence étant plus importante lorsque l'ischémie a été maintenue pendant deux heures.

#### 3.4. Comportement de la cathepsine C en présence de glycyllarginine $\beta$ naphthylamide (GAN) et de glycylltryptophane $\beta$ naphthylamide (GTN), à pH 6.

L'action lésante des dipeptidyl-naphthylamides sur les lysosomes dépend de la structure du composé et du pH. C'est ainsi que les lysosomes sont stables, en présence de GPN, à pH 5 alors que - nous l'avons vu - leur membrane se rompt à pH 6. Cela est dû au fait que la proportion de forme non protonée du composé, seule capable de traverser la membrane lysosomiale, est plus grande à pH 6 qu'à pH 5. Quant à la structure de ces substances, deux facteurs au moins interviennent: le degré d'hydrophobicité des résidus et la taille de la molécule.

Nous avons testé l'action de deux dipeptidyl-naphthylami-

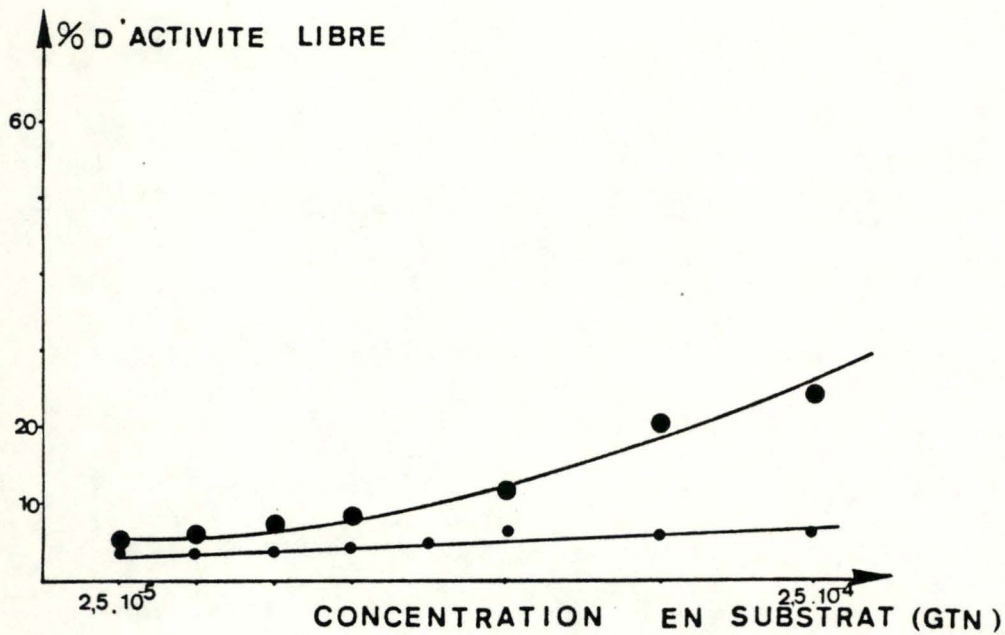
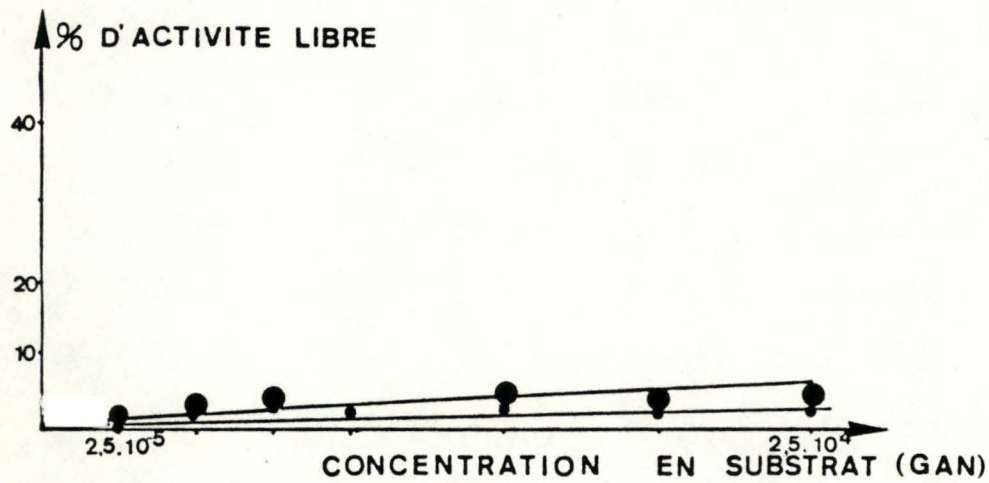


Figure 19: Influence de la concentration en substrat sur l'activité libre de la cathepsine C, mesurée à pH=6 et à 37°C. Les substrats de la cathepsine C utilisés, sont le GAN et le GTN. Les activités libres sont exprimées en pourcents des activités totales.

- : Lobe témoin .
- : Lobe ligaturé 1 heure.

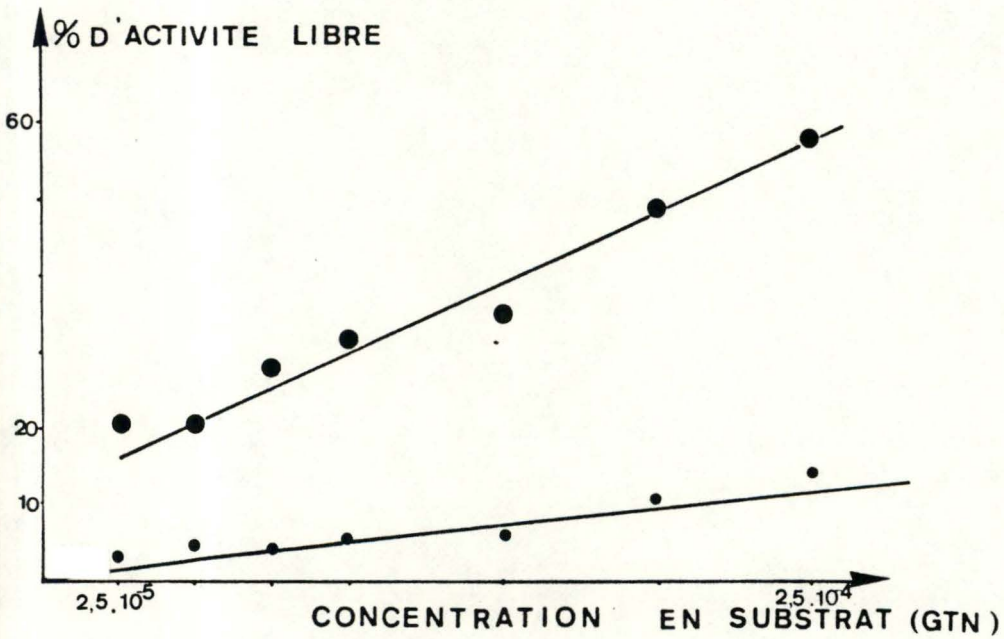
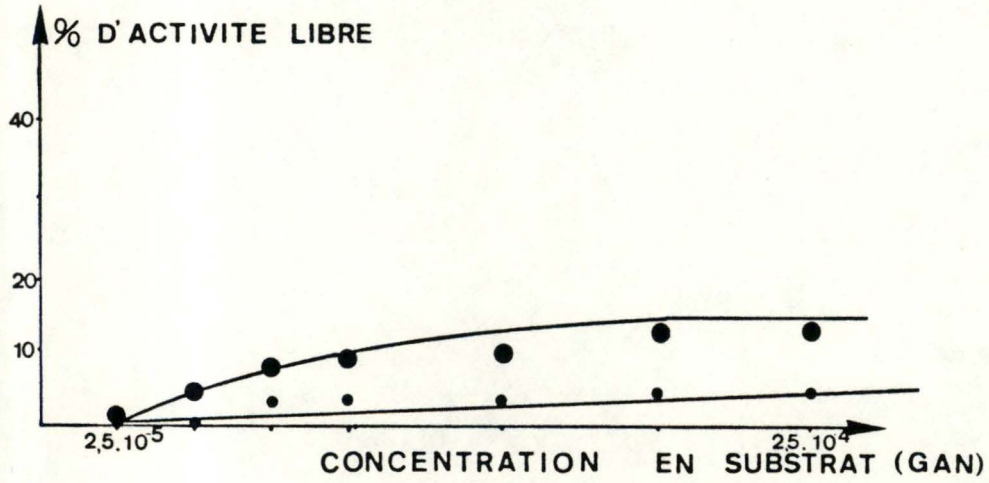


Figure 20: Influence de la concentration en substrat sur l'activité libre de la cathepsine C, mesurée à pH=6 et à 37°C. Les substrats de la cathepsine C utilisés, sont le GAN et le GTN. Les activités libres sont exprimées en pourcents des activités totales.

- : Lobe témoin.
- : Lobe ligaturé 2 heures.

des autres que le GPN à pH 6: il s'agit du GAN (que nous avons utilisé comme substrat à pH 5) et le GTN, d'une taille plus grande que le GPN mais également relativement hydrophobe. Les expériences ont été réalisées sur des préparations provenant d'un lobe ischémié pendant une et deux heures et d'un lobe non ischémié. Comme le montrent les fig. 19 et 20 le GAN aux concentrations utilisées, n'affecte quasi pas l'activité libre de la cathepsine C, pour le lobe témoin. Une faible augmentation s'observe pour la préparation du lobe ligaturé. Le GTN n'exerce que peu d'effet sur l'activité libre du lobe témoin; par contre, il provoque une augmentation considérable de l'activité libre du lobe ligaturé, illustrant de nouveau la plus grande sensibilité des lysosomes de foie ischémié aux dipeptidyl-naphtylamides.

CHAPITRE IV: DISCUSSION

## CHAPITRE IV: DISCUSSION

Comme nous l'avons rappelé dans l'introduction, pour détecter une altération éventuelle des lysosomes au cours d'un processus pathologique, on se réfère fréquemment à des mesures de l'activité libre de une ou plusieurs hydrolases contenues dans ces organites.

Toutefois, un problème d'interprétation se pose lorsque une augmentation de cette activité est observée par des déterminations sur homogénats ou préparations de granules. En effet, cette augmentation peut provenir d'une susceptibilité plus grande des organelles aux manipulations expérimentales: homogénéisation, centrifugation, incubation pour les tests enzymatiques etc...Elle peut également traduire une véritable rupture de la membrane lysosomiale dans la cellule.

Les expériences antérieures sur le foie ischémié ont montré que l'activité libre d'enzymes lysosomiales était augmentée après ischémie (Wattiaux R. and Wattiaux-De Coninck S., 1984) sans toutefois qu'il soit permis de préciser quelle était la cause immédiate de cette augmentation: rupture des lysosomes dans la cellule ou susceptibilité plus grande de ceux-ci aux manipulations expérimentales.

Nous croyons que nos travaux illustrent clairement que c'est cette deuxième interprétation qu'il faut considérer. En effet, l'activité libre de la cathepsine C à pH 5, avec le GAN comme substrat, est quasi normale au début de la période d'incubation à 37°C. (Il est à noter que l'homogénéiseur utilisé est un Dounce et non un Potter).

A ce moment donc, les lysosomes ont une membrane suffisamment intacte pour empêcher le GAN d'entrer dans les lysosomes et les enzymes d'en sortir. Lorsque l'incubation se prolonge pendant un temps (quelques minutes) qui n'affecte pas les lysosomes du foie normal, la membrane des lysosomes ischémiés n'est plus capable d'assurer son rôle de barrière de perméabilité. Les lysosomes de foie ischémié sont donc moins stables que les lysosomes de foie normal. Nous avons montré que cette instabilité résulte d'une susceptibilité plus grande à la température de 37°C de la membrane lysosomiale.

On peut donc conclure de cette première partie du travail que la membrane des lysosomes est affectée par l'ischémie au point de la rendre plus fragile "in vitro".

Les essais que nous avons faits avec le GPN illustrent d'une autre façon, plus fine, que la membrane des lysosomes est modifiée dans le foie ischémié. En effet, ces expériences concernent plus directement la perméabilité de cette membrane puisque l'effet de ce dipeptidyl-naphthylamide sur les lysosomes dépend de sa pénétration dans l'organite.

Tout d'abord, la rupture de la membrane des lysosomes se produit à des concentrations plus faibles en GPN, lorsque ces granules proviennent du foie ischémié. Tenant compte du mécanisme par lequel agit ce composé, l'interprétation la plus plausible est que la membrane des lysosomes de foie ischémié est plus perméable au GPN que celle de lysosomes normaux. On ne peut toutefois pas exclure qu'intervienne également une sensibilité plus grande au choc osmotique, responsable "in fine" de la rupture des granules. Que la perméabilité de

la membrane lysosomiale soit toutefois concernée est fortement suggéré par les expériences où nous avons mesuré l'activité intralysosomiale de la cathepsine C. En effet, que le procédé de mesure mette à profit l'absence de chlorohydrate de thioléthanolamine ou la présence de  $Zn^{++}$ , dans les deux cas nous avons observé que les lysosomes deviennent perméables au GPN à des températures plus basses s'ils proviennent du foie ischémié. Les expériences où simultanément ont été mesurées l'activité libre de la cathepsine C et celle de la N-acétyl- $\beta$ D-glucosaminidase montrent bien qu'il ne s'agit pas d'un phénomène résultant de la sensibilité plus grande des lysosomes ischémiés à la température.

L'effet du GTN à pH 6 est une indication additionnelle que la perméabilité de la membrane lysosomiale est altérée au cours de l'ischémie. Cette molécule, vraisemblablement du fait de sa taille, ne peut traverser la membrane des lysosomes normaux à une vitesse suffisante pour provoquer, comme le GPN, une rupture de ces organites; au contraire, elle induit une rupture des lysosomes de foie ischémié, ce qui suppose qu'elle traverse beaucoup plus facilement la membrane de ces lysosomes

Nos résultats sont en accord avec les observations de Wattiaux R. et Wattiaux-De Coninck S. (1981), montrant que les modifications d'activités libres d'enzymes lysosomiales induites par l'ischémie restent jusqu'à un certain point réversibles, même après deux heures d'ischémie quand la circulation est rétablie. En effet, nous avons montré que ces modifications ne résultent pas d'une réelle rupture de la membrane lysosomiale dans

la cellule ischémique. On comprend mieux dans ces conditions les possibilités de réversibilité de la lésion membranaire.

Ajoutons que dans la seule expérience d'ischémie transitoire que nous avons réalisée, nous avons observé un retour des lysosomes à une stabilité apparemment normale lors d'une incubation à 37°C, du moins pendant deux heures.

Nos observations ne permettent évidemment pas de situer le point de non retour ni de préciser en quoi consiste la lésion de la membrane lysosomiale causée par l'ischémie et ni ce qui augmente la perméabilité de cette membrane. C'est l'analyse de membranes purifiées qui permettra d'apporter plus de précision et de plus, nous renseignera sur la ou les perturbations intracellulaires provoquées par l'ischémie (augmentation du  $\text{Ca}^{++}$  cytoplasmique, chute de l'ATP,...) capables d'induire ces altérations membranaires.

ADDENDUMDOSAGE DE LA CATHEPSINE CSolutions stocks et produits

## Produits:

Glycylarginyl- $\beta$ -naphthylamide (GAN) PM: 383

Tampon acétate 0.2 M pH 5

Saccharose 0.25 M

Saccharose 0.50 M

Mercaptoéthylamine (aminoethane-thiol)

Triton X100 2%

Etalon naphthylamine 0.25 m/ml

TCA 10%

NaNO<sub>2</sub> 1%

Ammonium amidosulfonate 0.5% dans H<sub>2</sub>O

Alcool absolu dans H<sub>2</sub>O

Naphthylethylene diamine 1% dans H<sub>2</sub>O

## Solutions stocks:

## Substrats:

GAN 0.5 mM soit 19.15 mg dans 50 ml de tampon acétate 0.2 M pH 5 et dans 50 mL de sucrose 0.50 M.

## Activateurs:

## - activité libre:

Mercaptoéthylamine 0.05 M soit 56.8 mg dans 5ml de tampon acétate 0.2 M pH 5 et 5 ml de sucrose 0.5 M.

## - activité totale:

Mercaptoéthylamine 0.05 M soit 56.8 ml dans 5 ml

de tampon acétate 0.2 M pH 5, 2.5 ml de sucrose M et 2.5ml de triton 2%.

### Composition des tests

Par test:

0.5 ml de GAN

0.1 ml d'activateur libre ou total

0.45 ml de sucrose 0.25 M

---

0.95 ml par test

### Protocole

1. Pipeter 0.95 ml de mixture dans les tubes à centrifuger pour Janetzki
2. Mettre à préincuber 5 minutes à 37°C
3. Démarrer la réaction en ajoutant 0.05 ml de préparation enzymatique et mélanger. Déclancher le chronomètre à ce moment.  
Ajouter les différentes fractions enzymatiques de minute en minute et arrêter la réaction après 10 minutes d'incubation
4. Fixer avec 0.5 ml de TCA 10%
5. Fixer les blancs
6. Ajouter la préparation enzymatique aux blancs
7. Centrifuger à la Janetzki pendant 5 minutes
8. Prélever 1 ml de surnageant
9. La révélation se fait par le dosage de la naphthylamine
  - prélever 1 ml de surnageant
  - ajouter successivement:
    - 1 ml de  $\text{NaNO}_2$  à 0.1% et mélanger au Vortex 15 secondes

1 ml d'ammonium amidosulfonate et mélanger 15 secondes au Vortex

1 ml d'alcool absolu et mélanger 15 secondes au Vortex

1 ml de NED 1% dans H<sub>2</sub>O et mélanger 15 secondes au Vortex  
10. Lire au spectrophotomètre à 580 nm après 15 à 30 minutes

### Résultats

Nombre d'unités de naphthylamine libérée par minute et par gr de foie =

$$\frac{(\text{lecture-blanc}) \times 1.5 \times \text{dil } 1^\circ \times \text{dil } 2^\circ \times 0.025}{10 \times \text{vol enz.} \times \text{valeur étalon}}$$

### Dilution de l'enzyme pour l'incubation

E (10)

N (5)

ML (5)

P (5)

S (20) .2

### DOSAGE DES PROTEINES

#### Solutions stocks et produits

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%

Tartrate de NaK 2%

Folin dilué 2 fois

Solution étalon à 100 g/ml de sérum albumine

### Protocole

1. Prendre 0.5 ml d'échantillon dilué

0.5 ml d'H<sub>2</sub>O pour les blanc

0.5 ml d'étalon

2. Ajouter 0.5 ml de NaOH 1N à température de laboratoire.  
Attendre 30 minutes ou plus.
3. Préparer extemporanément la mixture alcaline composée de:
  - 100 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
  - 1 ml de tartrate
  - 1 ml de  $\text{CuSO}_4$
4. Ajouter 0.5 ml de mixture alcaline  
Vortex  
Attendre 15 minutes
5. Ajouter 0.5 ml de Folin dilué deux fois  
Mélanger au Vortex  
Déclancher le chronomètre à ce moment-là
6. Lire au spectrophotomètre à 540 nm après 30 minutes

### Résultats

Nombre de mg de protéines/gr de foie=

$$\frac{(\text{lecture-blanc}) \times \text{dil} \times 0.2}{(\text{lecture étalon-blanc}) \times 0.5}$$

### Dilution pour l'incubation

E (10).80  
N (5) .50  
ML (5) . 75  
P (5) . 60  
S (20) . 20

DOSAGE DE LA PHOSPHATASE ACIDESolutions stocks et produits

## Produits:

$\beta$ -glycérophosphate de sodium PM 306.12  
 Acide acétique PM 60  
 Acétate de sodium PM 81.03  
 Triton X100  
 TCA 15.5% 1.5ml  
 Molybdate d'ammonium 0.5 ml PM 1235.86  
 AANS 1-amino-hydroxy-naphtosulfonate 3.5 mM  
 PM 239.25

Porter à 3.5L - 30 g de  $\text{NaHSO}_3$   
 et filtrer - 0.5 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$   
 - 0.1 g d'acide aminonaphtosulfonique

Etalon phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 mole/ml PM 136.06

## Solutions stocks:

Mixture d'incubation:	Par test
$\beta$ -glycérophosphate 0.5 M	0.20 ml
Tampon acétate 1 M pH 5	0.1 ml
Triton X100 2%	0.1 ml
$\text{H}_2\text{O}$	<u>0.6 ml</u>
	1 ml

Protocole

1. Pipeter 1 ml de mixture dans 22 tubes à centrifuger pour Janetzki

2. Suivant la quantité de solution enzymatique, compter avec  $H_2O$  de façon à ce que le volume final soit égal à 2 ml
3. Mettre à préincuber 5 minutes à  $37^{\circ}C$
4. Démarrer la réaction en ajoutant la préparation enzymatique et mélanger. Déclancher le chronomètre à ce moment  
Ajouter les différentes fractions enzymatiques de temps en temps et arrêter la réaction après 20 minutes d'incubation.
5. Fixer avec 1.5 ml de TCA 15.5%
6. Fixer les blancs
7. Ajouter la préparation enzymatique aux blancs
8. Centrifuger à la Janetzki 5 minutes
9. Prélever 1 ml de surnageant
10. La révélation se fait par le dosage du phosphate inorganique:
  - prélever 1 ml de surnageant
    - 1 ml d' $H_2O$  pour les blancs
    - 1 ml d'étalon 0.5 mole/ml
  - ajouter 0.5 ml de molybdate à 2.5% dans  $H_2SO_4$  5N  
Vortex
  - Ajouter de minute en minute 3.5 ml de solution réductrice AANS  
Vortex
  - Lire après 10 minutes à 650 nm

### Résultats

U/g de tissu=

$$\frac{(\text{lecture-blanc}) \times 0.5 \times \text{dil. enz} \times 0.5 \times 2.5}{(\text{Etalon-blanc}) \times \text{vol. enz.} \times 30}$$

Dilution des enzymes pour l'incubation

E(10) incuber 0.1 ml  
 N(5) incuber 0.2 ml  
 ML(5) incuber 0.05 ml  
 P(5) incuber 0.2 ml  
 S(20) incuber 0.2 ml

DOSAGE SIMULTANE DE LA CATHEPSINE C SANS ACTIVATEUR ET DE LA N-ACÉTYL- $\beta$ -D-GLUCOSAMINIDASESolutions stocks et produits

Glycylphénylalanine- $\beta$ -naphthylamide (GPN)  
 Paranitrophényl-N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminide PM 342.3  
 Tampon acétate 0.2 M pH 6  
 Saccharose 0.25 M  
 Saccharose 0.50 M  
 Triton X100 2%  
 TCA 10%  
 NaNO<sub>2</sub> 1%  
 Ammonium amidosulfonate 0.5% dans H<sub>2</sub>O  
 Alcool absolu  
 Naphthylethylène diamine 1% dans H<sub>2</sub>O  
 Tampon glycine carbonate 0.15 M pH 10  
 NaOH 0.5 N

Solutions stocks:

Substrats:

GPN 0.5 mM soit 17.37 mg dans 50 ml de tampon acétate 0.2 M pH 6 et dans 50 ml de saccharose 0.50 M

Paranitrophényl-N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminide 10 mM soit 68.5 mg dans 20 ml de saccharose 0.25 M

Composition des tests

## Activité libre:

0.8 ml de GPN

0.8 ml de paranitrophényl-N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminide

0.3 ml de saccharose 0.25 M

## Activité totale:

0.8 ml de GPN

0.8 ml de paranitrophényl-N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminide

0.05 ml de triton 2%

2.95 ml de saccharose 0.25 M

1.90 ml par test

Protocole

1. Pipeter 1.9 ml de mixture dans les tubes à centrifuger pour Janetzki
2. Mettre préincuber 5 minutes à 37°C
3. Démarrer la réaction en ajoutant 0.1 ml de ML 1/2 et mélanger. Déclancher le chronomètre à ce moment. Ajouter les différentes fractions enzymatiques de minute en minute et arrêter la réaction selon le plan d'incubation
4. Fixer avec 0.5 ml de TCA 10%
5. Fixer les blancs  
Ajouter la préparation enzymatique aux blancs
6. Centrifuger à la Janetzki pendant 5 minutes
7. Prélever 1 ml de surnageant
8. Révéler la naphthylamide (idem que pour le dosage de la cathepsine C)

9. Prélever 1 ml de surnageant

10. Révéler le paranitrophénol:

- ajouter 1 ml de tampon glycine carbonate 0.15 M  
pH 10 et du NaOH 0.5 N

- Vortex

- Lire à 400 nm

BIBLIOGRAPHIE

- BACCINO F.M. et ZURETTI M.F. (1976): Permeability of rat liver lysosomes membranes  
Panminerva Medica 18 n°11-12 472-491
- BARRETT A.J. and HEATH M.F. (1977): Lysosomal enzymes in "Lysosomes" (J.T. Dingle eds)  
North-Holland Publishing Compagny Amsterdam-New York-Oxford.
- BASSI M. and BERNELLI-ZAZZERA A. (1964)  
Exp. Mol. Pathol. 3 332 - 350
- BOUMA J.M.W. and GRUBER M. (1966): Intracellular distribution of cathepsin B and cathepsin C in rat liver.  
Biochim. Biophys. Acta 113 350-358
- de DUVE C., PRESSMAN B.C., GIANETTO R., WATTIAUX R., APPELMANS F. (1955)  
Biochem. J. 60 604-617
- de DUVE C. and BEAUFAY H. (1959): Influence of ishaemia on the state of some bound enzymes in rat liver  
Biochem. J. 73 610-619
- de DUVE C. (1969): in "Lysosomes in Biology and Pathology" (J.T. Dingle and H.B. Fell, eds) Vol 1 "3-40  
North-Holland Publ. Amsterdam

- FARBER J.L., MD and EL-MOFTY S.K., DDS (1975): The biochemical pathology of liver cell necrosis  
Am. J. Pathol. 81 237-250
  
- FARBER J.L. and YOUNG E.E. (1981): Accelerated phospholipid degradation in anoxic rat hepatocytes  
Archives of Biochemistry and Biophysics 211 n°1  
312-320
  
- GLAUMANN H. and MARZELLA L. (1981): Effects of in vivo liver ishaemia on microsomes and lysosomes  
Virchows Arch.(Cell Pathol) 36 1-25
  
- GRINWALD P.M. and NAYLER W.G. (1981): Calcium entry in the calcium paradox  
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 13  
876-880
  
- JADOT M. COLMANT C. WATTIAUX-DE CONINCK S. and WATTIAUX R.  
(1984) : Intralysosomal hydrolysis of glycyl-L-phenylalanine-2-naphthylamide  
Biochemical J. 219 965-970
  
- LEFER A.M. (1976): The rôle of lysosomes in circulatory shock  
Life Sciences 19 1803-1810
  
- McDONALD J.K., ZEITMAN B.B., REILLY, T.J. and ELLIS S.  
(1969)  
J. Biol. Chem. 244 2693-2709
  
- MISAKA E. and TAPPEL A.L. (1971)  
Comp. Biochem. Physiol. B. 38 651-662

- MULLER W.A., STEINMAN R.M. and COHN Z.A. (1980 a)  
J. Cell. Biol. 86 292-303
- MULLER W.A., STEINMAN R.M. and COHN Z.A. (1980 b)  
J; Cell. Biol. 86 304-314
- REIJNGOUD D.J. and TAGER J.M. (1977)  
Biochim. Biophys. Acta 472 419-449
- SCHNEIDER D.L. and BURNSIDE J. (1982): Characterisation of  
the membrane proteins of rat liver lysosomes.  
Biochem. J. 204 525-534
- TRUMP B.F. and GLAUMANNB. (1975): Studies on the pathogene-  
sis of ischemic cell injury.  
Virchows Arch. B. Cell Path. 19 303-323
- TRUMP B.F., MD and ARSTILA A.V., MD (1975): Cellular reaction  
to injury in  
"Principles of Pathobiology" (La Via M.F. and Hill R.B.,  
J R eds) 9-96  
New York-Oxford University Press
- VAES G. (1966)  
Méthods Enzymol. 8 509-514
- WATTIAUX R. and WATTIAUX -DE CONINCK S. (1984): Effects of  
ischemia on lysosomes.  
International Review of Experimental Pathology 26  
85-105

- WATTIAUX R. and WATTIAUX DE CONINCK S. (1981)

Biochem. J. 196 861-865