



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

Apparition d'un concept en biologie cellulaire: le lysosome

Leyens, Stéphane

Award date:
1986

[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

**APPARITION D'UN CONCEPT EN
BIOLOGIE CELLULAIRE :
LE LYSOSOME**

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

LEYENS Stéphane

Avant toutes choses, je tiens à exprimer mes remerciements aux Professeurs Remacle et Fourez pour l'aide qu'ils m'ont apportée tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier tout spécialement Bernard Feltz pour ses précieux conseils .

Je remercie également les Professeurs C. de Duve et H. Beaufay de m'avoir consacré une partie de leur temps .

Enfin, ma reconnaissance est adressée à tous les membres du département de Biochimie Cellulaire pour leur accueil .

TABLE DES MATIERES

<u>1 INTRODUCTION</u>	1
<u>2 LA DECOUVERTE DES LYSOSOMES</u>	3
Introduction	4
Localisation de la glucose-6-phosphatase	5
Localisation d'autres ferments et conclusions	10
La phosphatase acide	13
La nature des granules cytoplasmiques	18
La raison du manque d'activité de l'enzyme	18
Etude comparative de la liaison à des granules cytoplasmiques de la phosphatase acide, de la glucuronidase et de la cathepsin	21
De nouveaux granules cytoplasmiques	22
Les lysosomes	28
La centrifugation en gradient de densité	28
Identification morphologique des lysosomes	30
<u>3 LA TECHNIQUE</u>	33
Introduction	33
La centrifugation en milieu homogène	36
1° Principe	36
2° Evolution de la technique	38
3° La fraction "L"	39
La centrifugation en gradient de densité	41
1° Historique	41
2° Principe	41
3° La préparation du gradient	44
4° Les centrifugeuses	45
5° Avantages de la centrifugation en gradient de densité	47
Analyses des différentes fractions	49
Les quatre fractions	51
1° La fraction nucléaire	51

2° La fraction mitochondriale	51
3° La fraction microsomiale	53
4° La fraction soluble	55
Centrifugation fractionnée : applications	56
Les techniques en laboratoire	57
<u>4 LES LYSOSOMES DANS L'HISTOIRE DE LA BIOLOGIE</u>	60
Historique	60
Le concept de lysosome	63
La digestion intracellulaire	65
<u>5 LES LYSOSOMES : UNE NOUVEAUTE EN BIOLOGIE</u>	69
Introduction	69
Lysosome et biodégradation	70
Lysosome et pathologie	71
Lysosome et la révolution biologique	82
<i>PARTIE</i>	
<u>6 NAISSANCE D'UN CONCEPT</u>	83
Introduction	84
La grille d'analyse de Whitley	85
Analyse de la recherche	87
1 Avant 1949	87
2 Le changement de domaine en 1949	89
3 Le développement de la recherche	92
4 Les deux postulats de travail	96
5 La phosphatase acide	97
Modélisation	99
<u>7 CONCLUSION</u>	104
<u>8 BIBLIOGRAPHIE</u>	107

INTRODUCTION

En 1974, le Professeur Christian de Duve fut récompensé par un Prix Nobel pour ses recherches, qui débutèrent peu après la seconde guerre mondiale et qui allaient permettre de progresser dans la connaissance de l'organisation et du fonctionnement cellulaire.

Le centre de ses recherches fut et est toujours le "lysosome", un organite cellulaire qu'il mit en évidence dans les années 50, dans son laboratoire de Chimie Physiologique de l'Université Catholique de Louvain.

La création du concept de lysosome est fondamentale dans la compréhension de la structure, du fonctionnement et de certaines pathologies cellulaires. Grâce au modèle que C. de Duve a construit de cet organite, le mécanisme de digestion intracellulaire - observée depuis plus d'un siècle - se voyait enfin expliqué ainsi que de nombreuses affections cellulaires ou tissulaires.

Ce modèle, aussi important qu'il soit, n'est jamais qu'un modèle : c'est une représentation de la réalité, sans être la réalité. Et sa construction est décidée par un homme (ou un groupe d'hommes) qui est influencé par le "contexte" dans lequel il travaille.

Dans ce mémoire, je vais tenter de montrer quels facteurs ont influencé la recherche qui a mené à la "découverte" des lysosomes et quelle importance a eu celle-ci en biologie cellulaire.

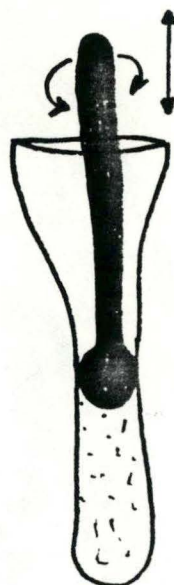
J'ai divisé ce travail en cinq parties : la première est consacrée à l'"historique" du déroulement de la recherche, depuis 1949 jusqu'à 1955. Dans la seconde partie, je traite de l'aspect technique de la recherche : le principe de celle-ci, son évolution au cours de la recherche, les problèmes qu'elle pose. Ensuite, je parle de l'"insertion" du concept de lysosome dans l'histoire de la biologie. La partie suivante est consacrée aux conséquences qu'eut cette découverte ; enfin, une petite analyse de l'influence du contexte intellectuel et institutionnel sur le déroulement de la recherche, et de la modélisation cloturera ce mémoire.

LA DECOUVERTE DES LYSOSOMES

Ce travail avait été effectué suivant l'étude enzymologique classique de l'époque : dispersion du tissu provenant de foie de rat par le "high speed waring blender" en présence d'eau distillée, sans tenir compte de l'organisation cellulaire, et ensuite purification de l'enzyme réalisée entre autres par précipitation isoélectrique . Mais, chose étrange, une fois précipitée à pH 5, l'enzyme ne pouvait être remise en solution quelque soit le pH du tampon . Cette curieuse propriété rappela au Professeur de Duve deux articles écrits par Albert Claude : "Fractionation of mammalian liver cells by differential centrifugation " a et b, en 1946 dans lesquels il montrait qu'à pH 5 il y avait agglutination de gros et petits granules cellulaires . Immédiatement vint l'idée que la glucose-6-phosphatase était liée à pareils granules et donc impossible à redissoudre . Ainsi fut prise la décision de déterminer cette structure subcellulaire par la méthode décrite par Albert Claude : la centrifugation fractionnée . Pour cela il fallut équiper la centrifugeuse du laboratoire d'une tête à grande vitesse de type "M.S.E "qui permit d'atteindre des vitesses de rotation de 18.000 trs/min et ainsi de séparer noyaux, mitochondries et microsomes (contrairement à la tête de type "Corda " qui ne permettait que l'isolation des noyaux) . (de Duve C. , 1969)

LOCALISATION DE LA GLUCOSE-6-PHOSPHATASE

Le principe de la centrifugation fractionnée est le suivant : l'organe à analyser (foie de rat en l'occurrence) est maintenu dans une solution isotonique de 0° C avant d'être passé à travers un tamis métallique afin d'éliminer le plus gros de la trame conjonctivo-vasculaire et de permettre une homogénéisation plus facile . Cette dernière est effectuée soit au Waring-Blender, soit au mortier sans addition de sable, soit enfin grâce à l'homogénéisateur de Potter-Elvehjem . L'homogénéisation a pour but d'obtenir un mélange homogène des structures subcellulaires : il s'agit de rompre les membranes cellulaires tout en conservant le plus de structures subcellulaires intactes . Le principe est basé sur les forces de cisaillement qui étirent le tissu dans un sens puis dans l'autre (schéma) jusqu'au déchirement des membranes .

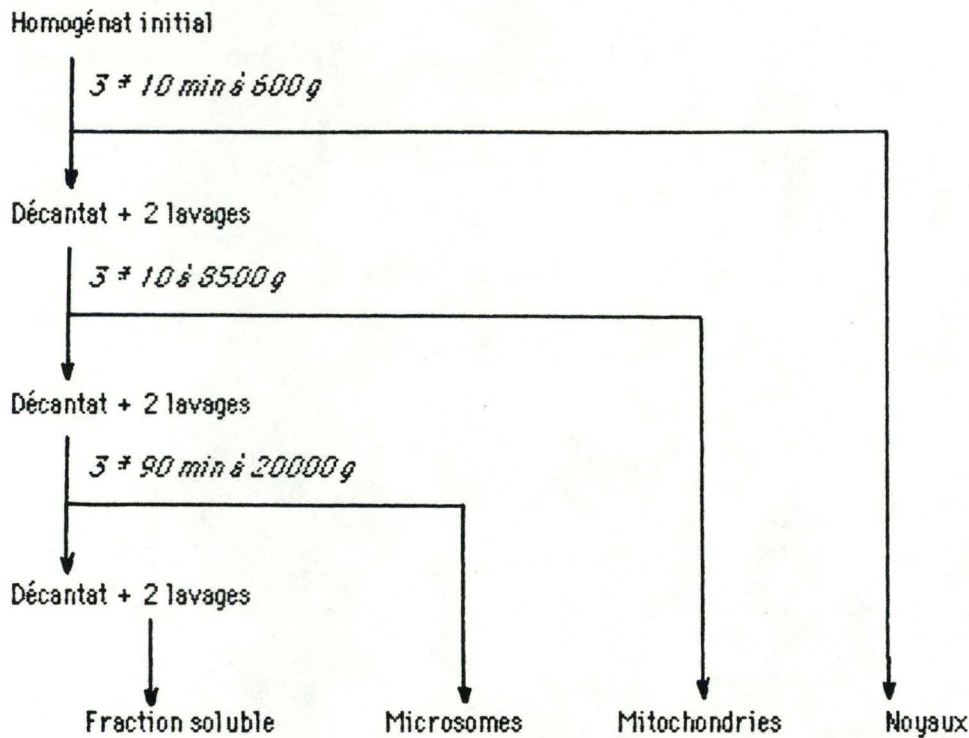


Mouvement rotatif et axial:

les membranes vont ainsi se déchirer

Le liquide d'homogénéisation était une solution de saccharose 0,25 M légèrement alcalinisée par l'addition de KHCO_3 . Pratiquement on homogénéise une première fois, on centrifuge peu de temps (2 minutes à 2000 g) et le sédiment obtenu est réhomogénéisé avec une nouvelle quantité de liquide . Cette opération est répétée une seconde fois . Ensuite toutes les fractions sont combinées et portées à un volume correspondant à un multiple donné du poids du tissu traité (souvent 20 fois) . On obtient ainsi l'homogénat initial . Peut alors commencer la centrifugation fractionnée .

Trois séries de centrifugation fournissent les quatre fractions . Il s'agit chaque fois de centrifuger pendant une période différente, avec un g différent . Chaque sédiment est soigneusement réhomogénéisé et lavé deux fois ; les liquides de lavage sont ajoutés au décantat de la première centrifugation . Cette technique est basée sur les différences de vitesse de sédimentation entre les différentes populations de particules subcellulaires . Plus la vitesse de sédimentation d'un type de granules cytoplasmiques est grande, moins grande doit être la vitesse de centrifugation et celle-ci doit être appliquée moins longtemps (cfr. chapitre "TECHNIQUE") .



d'après (Hers H.G. , Berthet.J , Berthet.L, et de DUVE C. , 1951)

Une fois la centrifugation fractionnée terminée, la détermination d'activité enzymatique dans les différentes fractions est effectuée . Pour chaque type d'enzyme, il existe une méthode spécifique pour la détermination de l'activité . (Hers H.G., Berthet J., Berthet L. et de Duve C. , 1951) et (de Duve C. , 1971)

Les premières analyses ont été faites sur la glucose-6-phosphatase qu'ils étudiaient précisément . Mais l'équipe de Christian de Duve s'est également intéressée à la localisation cellulaire de toute une série de ferments : phosphatase alcaline, hexose diphosphatase, phosphoglucomutase, phosphorylase et hexokinase . Tous les résultats ont été publiés dans un même article en 1951 (Hers, Berthet,J.,Berthet,L., et de Duve, 1951)

Les résultats sur la glucose-6-phosphatase, qui les intéressaient plus spécialement, étaient les suivants :

TABLEAU II.

RÉPARTITION DE LA GLUCOSE-6-PHOSPHATASE DU FOIE.
 Activités enzymatiques exprimées en p. 100 de l'activité totale.

Expérience	x 1	x 2	3	4	x 5	6	x 7
Animal	Rat	Rat	Rat	Cobaye	Cobaye	Rat	Lapin
Homogénéisation	Potter	Potter	Potter	Potter	Potter	Blendor	Mortier
Liquide	Sacch. +ABC	Sacch. +KHCO ₃	Sacch. +KHCO ₃	Sacch. +KHCO ₃	Sacch. +KHCO ₃	Sacch.+ABC	KCl+KHCO ₃
Homogénéisat initial .	100	100	100	100	100	100	(2) 100
Noyaux.....	25	6	} 5	} 5	} 6	} 24	—
Mitochondries	17	13					18
Microsomes (1)	47	67	88	87	77	76	85
Fraction soluble	4	6	11	6	10	1	3
Récupération.....	93	92	104	98	93	101	106

(1) Microsomes lavés 1 fois dans l'expérience n° 1, 2 fois dans l'expérience n° 2, non lavés dans les autres expériences.
 (2) L'homogénéisat initial correspond à l'« extrait » de CLAUDE [5], c'est-à-dire à une suspension préparée par broyage de la pulpe tissulaire au mortier (sans addition de sable) et élimination simultanée des cellules intactes et des noyaux par une centrifugation préliminaire.

d'après (Hers H.G., Berthet J., Berthet L., et de Duve C., 1951)

Les résultats indiquent clairement que la majeure partie de la glucose-6-phosphatase est associée à des granules cytoplasmiques, ce qui explique ce qu'ils cherchaient: l'insolubilisation irréversible à pH 5.

Dans 5 expériences sur 7, la fraction "microsomes" contient plus de 75 % de l'activité de l'homogénat initial (considérée comme l'activité totale). Ce chiffre est minimum car il se produit une inactivation au cours de longues centrifugations et de lavages des microsomes (ce qui explique une plus faible activité dans les expériences 1 et 2)

Ce qui est moins clair c'est la présence de glucose-6-phosphatase dans les autres fractions : deux éléments permettent de supposer qu'il s'agit entièrement de contamination

1° si l'activité glucose-6-phosphatasique du noyau et des mitochondries était due à la présence de gros granules porteurs de l'enzyme, on devrait admettre qu'il s'agit de granules très fragiles puisque dans certaines expériences on ne les retrouve qu'en très faible quantité (expériences 3, 4 et 5) . Or ni l'utilisation du Waring- Blender (expérience 6) , cependant très mutilant pour les noyaux et les mitochondries, ni un plus grand nombre de lavages ne réussissent à appauvrir en ferments les grosses fractions particulières . Au contraire les facteurs qui semblent influencer l'activité de la fraction

"mitochondries" et "noyaux" sont le mode de séparation et la force ionique du milieu d'homogénéisation . En effet l'activité est très faible dans les expériences où les fractions ont été séparées en bloc (expériences 3, 4 et 5) et plus élevée dans les expériences où elles ont été isolées séparément (expériences 1 et 2) . De même , dans un milieu de force ionique peu élevée (expériences 3, 4 et 5) la contamination est faible ; par contre elle est plus forte dans un milieu de force ionique plus élevée (expériences 1, 6 et 7) . Or ces deux facteurs sont responsables de l'agglutination des microsomes entre eux et avec les plus grosses particules . Ceci semble donc montrer que l'activité des fractions mitochondriale et nucléaire est due à une contamination de ces fractions par des microsomes agglutinés .

2° L'activité de la fraction soluble est probablement due à la présence de microsomes minuscules non sédimentables dans les conditions utilisées. L'existence de tels microsomes a d'ailleurs été montrée par Chantrenne, Barnum et Huseby .

En conclusion de Duve supposa que la glucose-6-phosphatase se trouve intégralement liée aux microsomes dans la cellule intacte . Ici il s'opposa à Swanson qui, elle, préconisait que la glucose-6-phosphatase était en partie liée aux mitochondries, en partie libre dans la fraction soluble .

LOCALISATION D'AUTRES FERMENTS ET CONCLUSIONS

La même étude fut effectuée pour les autres enzymes et l'équipe du Professeur de Duve conclut à l'association des enzymes avec les diverses fractions comme mentionné ci-dessous :

phosphatase alcaline d'intestin dans microsomes
 de rein dans microsomes
 glucose-6-phosphatase de rein dans microsomes
 d'intestin dans microsomes
 phosphoglucomutase de foie dans la fraction soluble
 hexodiphosphatase de foie dans la fraction soluble
 phosphorylase de foie en partie dans la fraction soluble
 hexokinase de foie en partie dans la fraction soluble
 de rein en partie dans la fraction soluble

De cette première étude sur la localisation intracellulaire des enzymes réalisée par le laboratoire de chimie physiologique de Louvain, le Professeur de Duve a pu tirer trois conclusions essentielles.

La première concerne le but même du travail : une partie au moins de la phosphorylase, de l'hexokinase et de la phosphohexokinase et la totalité de la phosphoglucomutase, de la glucose-6-phosphatase et de l'hexose diphosphatase se situent à l'extérieur des mitochondries.

Deuxièmement, une série de conclusions peut être faite sur le principe de cette étude, la centrifugation fractionnée. D'abord, si la méthode de séparation en trois fractions paraît légitime, il faut remarquer que celle-ci est imparfaite : il y a de trop gros microsomes et de trop petites mitochondries pour pouvoir les séparer complètement par une technique basée sur les différences de vitesses de sédimentation. Ensuite il y a lésion des structures subcellulaires due principalement à l'homogénéisation. L'agglutination de granules semble inévitable dans cette technique et serait due à l'acidification et la force ionique élevée du milieu.

Enfin la troisième conclusion - et sûrement la plus fondamentale pour la suite de la recherche - est la mise en place de deux postulats de travail . Le premier est le postulat de l'homogénéité biochimique des fractions . Il suppose que tous les membres d'une population subcellulaire donnée contiennent le même bagage enzymatique . Le second est le postulat de la localisation unique selon lequel un enzyme donné appartient à un seul site de la cellule .

Ces deux postulats sont le fruit de l'étude de la localisation intracellulaire des enzymes qui vient d'être faite : une fois les contaminations et erreurs expliquées, on peut admettre qu'un enzyme a une localisation unique dans la cellule et que les organites d'une même famille contiennent les mêmes enzymes .

Mais une réflexion plus fondamentale a poussé de Duve à créer ces deux postulats: "... plus la complexité et la taille d'aggrégats moléculaires d'une cellule vivante augmente, plus la variabilité individuelle augmente également . Des molécules individuelles d'une protéine donnée ont plus de possibilités de différer l'une de l'autre que des molécules de glucose . De même, nous pouvons nous attendre à trouver plus de degrés de liberté et donc une plus grande dispersion dans la population chez des ribosomes que chez des protéines et plus encore chez des mitochondries . Heureusement, cette variabilité, qui aurait pu rendre notre tâche impossible, est en fait restreinte par les contraintes moléculaires de structure et de fonction . Les structures moléculaires ne sont pas des agrégats fortuits de macromolécules . Leur assemblage est dirigé par une combinaison du déterminisme génétique et de la simple stoechiométrie chimique (...) Les différences morphologiques par lesquelles nous reconnaissons les membres de populations distinctes proviennent de différences chimiques correspondantes . Nous pouvons prolonger ce raisonnement jusqu'au niveau fonctionnel, et ce n'est pas sans raison que l'on peut penser que des entités subcellulaires qui sont morphologiquement et chimiquement différentes aient des fonctions différentes, en d'autres termes contiennent des enzymes différents . Bien sûr maintenant nous savons que cela est vrai dans un certain nombre de cas mais ce que je voudrais faire remarquer c'est qu'on aurait pu le prédire il y a 15 ans . L'ordre que nous voyons dans l'arrangement interne des cellules, l'harmonie que nous constatons dans leur comportement, ne peut pas provenir d'un chaos biochimique .

Ces considérations forment la base de ce que j'ai appelé le postulat de l'homogénéité biochimique (...)

Un second postulat qui a été aussi très utile, bien que moins essentiel que le précédent, est celui de la localisation biochimique. Ici aussi nous devons nous attendre à des exceptions, mais l'avantage de prendre la localisation unique comme hypothèse de travail est que nous pouvons accepter la localisation multiple seulement quand nous sommes forcés par une évidence expérimentale. Le contraire ne peut être vrai." (de Duve C., 1965)

A ces trois conclusions de recherche on peut ajouter des "trucs" concernant la technique découverts au cours des recherches. Il s'agit, par exemple de différences de molarité d'un tampon pour mesurer l'activité d'une enzyme suivant les cas ; de procéder à un lavage ou non de la fraction microsomes ; ou encore l'utilisation préférentielle de l'homogénéisateur de Potter et Elvehjem au mortier sans addition de sable (qui ne détruit pas plus de la moitié des cellules) et au Waring-Blender (qui détruit la plupart des organites subcellulaires) .

Bref après cette première approche avec la technique toute récente de Albert Claude, le laboratoire de Louvain commençait à dominer le domaine et était prêt à poursuivre leur étude sur la localisation cellulaire d'enzymes .

LA PHOSPHATASE ACIDE

Les résultats qu'allaient obtenir les chercheurs avec l'acide phosphatase étaient beaucoup moins convaincants, du moins à première vue ...

La marche opérationnelle suivie était, à quelques détails près, la même que pour la glucose-6-phosphatase. Pour mesurer l'activité de l'enzyme, ils déterminaient le phosphore inorganique libéré dans une solution contenant un même volume de préparation enzymatique (dans un tampon 0,25 M sucrose) et de solution substrat, laquelle se composait d'un tampon 0,16 M ABC et d'une solution de glycérophosphate de sodium 0,1 M ajusté à pH 5. Les premiers résultats obtenus ne furent pas du tout concordant avec ce qui était attendu. En effet l'activité de l'homogénat préparé avec le Potter dans une solution 0,25 M sucrose était seulement un dixième de l'activité mesurée avec un homogénat dû au Waring-Blender dans une solution d'eau distillée. Et en plus, la somme des activités des différentes fractions étaient le double de l'activité de l'homogénat soit 20 % de l'activité avec le Waring-Blender. Il était trop tard ce jour-là pour que Jacques Berthet et Lucie Dupret ne recommencent ces expériences dont les résultats semblaient être dus à des erreurs de manipulation.

Ils décidèrent de garder les fractions au réfrigérateur et de recommencer les mesures plus tard avec du substrat frais. Ceci fut fait cinq jours plus tard et les résultats furent bien plus satisfaisants : l'activité de l'homogénat préparé au Potter-Elvehjem correspondait à plus de 80 % de l'activité après homogénéisation au Waring-Blender et dans de l'eau distillée, et l'activité des fractions recouvrait 85 % de celle de l'homogénat. Le grand mérite des chercheurs fut de ne pas considérer les premiers résultats comme faux et dus à des erreurs de manipulation. (Berthet J. et de Duve C., 1951) et (de Duve C., 1969)

Table 1. Cellular distribution of acid phosphatase activity in fresh and aged preparations

(Fractionation of a 0.25M-sucrose homogenate of rat liver.)

Fraction	Acid phosphatase activity* (mg. P/g. original tissue/10 min.)	
	Fresh preparations	After 5 days at 2°
Initial homogenate	0.16 (100)	1.34 (100)
Nuclei, washed twice	0.04 (25)	0.16 (12)
Mitochondria, washed twice	0.10 (63)	0.70 (52)
Microsomes, washed once	0.09 (56)	0.15 (11)
Final supernatant	0.09 (56)	0.14 (10)
Recovery	0.32 (200)	1.15 (85)

* Figures in brackets show activity distribution as percentage.

d'après (Berthet.J et de Duve C. , 1951)

L'équipe de de Duve conclut deux choses de ces expériences . Dans un homogénat frais préparé dans une solution isotonique de sucrose par la méthode de Potter-Elvehjem, l'activité de la phosphatase est faible et l'enzyme semble associée à grande partie à la fraction mitochondriale . Dans un homogénat âgé, l'activité est grande et ne semble plus beaucoup liée à la fraction mitochondriale (tableau 2) puisque 85 % de l'activité se retrouve dans le surnageant après une première centrifugation et 11 % des 15 % restant se retrouve également dans le surnageant après resuspension du précipité et recentrifugation .

Ils déduisirent alors que le faible taux d'activité dans la préparation fraîche était dû à une liaison de l'enzyme avec les mitochondries et que l'augmentation de l'activité et la libération de l'enzyme reflétaient deux aspects d'un même phénomène . Cette conclusion fut établie grâce à la réalisation de nombreuses expériences dont je vais en décrire une partie ici . (Berthet.J et de Duve C. , 1951)

L'effet de l'homogénéisation

L'homogénéisation au Waring-Blender a pour conséquence une préparation à haute activité . Dans ces préparations, l'activité est surtout importante dans le surnageant

après une centrifugation de 10 minutes à 8500 g . Ceci est dû au fait que le Waring-Blender abîme beaucoup les particules subcellulaires et donc permet la libération de l'enzyme des mitochondries . Par contre l'utilisation de l'homogénéisateur Potter-Elvehjem réduit très fort cet effet bien qu'une faible activité est présente dans le surnageant . A chaque homogénéisation, une quantité d'enzyme est libérée .

Table 4. Liberation of acid phosphatase by the Potter-Elvehjem homogenizer

(Suspension of washed mitochondria submitted to three successive homogenizations, each of 2 min. duration. Before the experiment and after each run, a sample of the suspension is taken and centrifuged 10 min. at 20,000 g. Enzyme tests performed on the supernatants. The total activity, determined after exposure to the Waring blender, was 0.93 mg. P/g. original tissue/10 min.)

Number of homogenizations	Soluble acid phosphatase activity	
	mg. P/g. original tissue/10 min.	Percentage of total
0	0.038	4
1	0.063	7
2	0.10	11
3	0.20	21.5

d'après (Berthet.J et de Duve C. , 1951)

L'effet du milieu d'homogénéisation

Le milieu d'homogénéisation joue un rôle dans la vitesse de libération de l'enzyme . Les mêmes échantillons sont homogénéisés dans différents milieux ; ensuite on y mesure l'activité enzymatique . La plus basse correspond à une préparation où la quantité d'enzymes liées aux mitochondries est la plus grande . Les résultats furent les suivants :

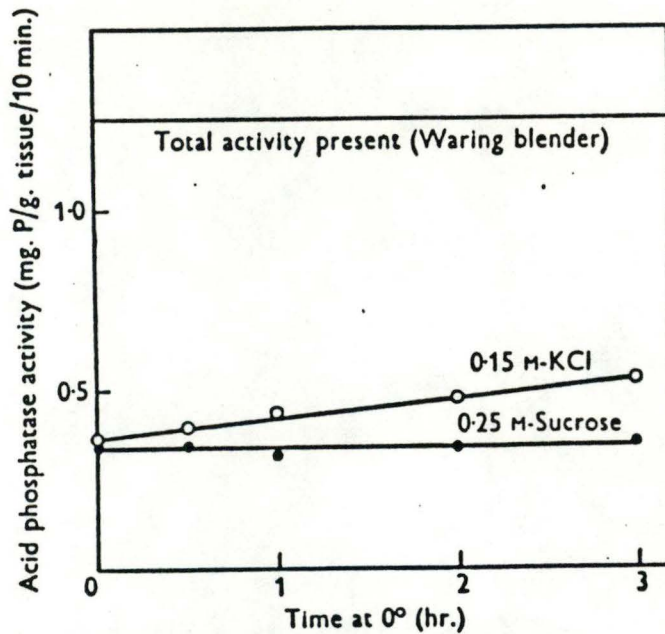


Fig. 1. Influence of KCl on spontaneous activation. Rat-liver pulp divided in two parts. Part 1 homogenized with 0.25 M-sucrose; part 2 with 0.15 M-KCl. The two homogenates kept at 0° and assayed regularly for acid phosphatase activity.

d'après (Berthet.J et de Duve C. , 1951)

Ils conclurent donc que le meilleur milieu pour avoir une stabilité de la liaison mitochondrie - phosphatase acide est une solution de sucrose 0,25 M.

Différence de mesure entre l'activité enzymatique "libre" et "liée"

La quantité totale de phosphatase acide dans la préparation est donnée par la mesure du phosphate inorganique libéré après homogénéisation au Waring-Blender. Pour mesurer l'activité liée (la quantité d'enzymes liées) il faut faire la différence entre l'activité totale et l'activité libre d'une préparation homogénéisée au Potter, en prenant la précaution qu' il n'y ait pas d'activation au cours des mesures. Pour éviter cette activation, l'équipe de de Duve a étudié le taux de libération dans différentes conditions de dosage .schéma

Les expériences montrent que l'activité initiale des préparations contenant une partie d'enzymes liées peut être mesurée dans les conditions standards (38° C) pour autant que le temps d'incubation n'excède pas 10 à 20 minutes ; on peut par contre la mesurer sans problème à 0° C .

La distribution quantitative de la phosphatase acide dans le foie .

Le tableau 6 (ci-dessous) donne les quantités d'enzymes totales, libres et liées dans chaque fraction. Les surnageants des centrifugations de la fraction "mitochondries"

ont été décantés et ressoumis à une centrifugation de 10 minutes à 8500 g donna une nouvelle fraction : "la fraction intermédiaire" qui servira pour la séparation de la fraction "microsomes" (centrifugation 90 minutes à 20000 g) .

Les résultats montrent que l'homogénat initial contient 83 % d'enzymes liées contre 17 % de libre . La plus grande partie de la phosphatase acide est liée à la fraction mitochondriale (surtout) ainsi qu'à la fraction intermédiaire et microsomiale .

Table 6. *The quantitative cytological distribution of acid phosphatase*

Fraction	Acid phosphatase activity					
	Fresh preparations (free enzyme)		Frozen preparations (total enzyme)		Difference (bound enzyme)	
	P*	%	P*	%	P*	%
Initial homogenate	265	17.1	1550	100	1285	82.0
Nucléi, washed twice	31	2	95	6.1	64	4.1
Mitochondria, washed once	87	5.6	950	61.3	863	55.7
Intermediary fraction, unwashed	33	2.1	190	12.2	157	10.1
Microsomes, washed twice	45	2.9	150	9.7	105	6.8
Final supernatant	134	8.6	103	10.5	29	1.9
Recovery	330	21.2	1548	99.8	1218	78.6

* $\mu\text{g. P/g. original tissue/10 min.}$ All percentages calculated on the total activity, 1550 $\mu\text{g. P/g. tissue/10 min.}$

d'après (Berthet.J et de Duve C. , 1951)

Ces chiffres doivent être considérés en tenant compte des effets de dommage dus à l'homogénéisation et au fractionnement et suggèrent que dans une cellule intacte l'ensemble de la phosphatase acide est liée aux fractions mitochondriale et microsomiale . La présence d'enzymes dans les autres fractions s'explique par une contamination due à une rupture de mitochondries et de microsomes et à l'absorption de l'enzyme par les autres fractions .

A la suite de ces expériences, J.Berthet et C.de Duve conclurent qu'une grande part - et dans la cellule intacte probablement la totalité - de la phosphatase acide est liée à un granule cytoplasmique .

Trois questions se posèrent alors aux chercheurs :

- 1° quelle est la nature du lien entre l'enzyme et le granule
- 2° quelle est la raison du manque d'activité de l'enzyme sous forme liée
- 3° quelle est la nature des granules contenant la phosphatase acide

Ce qui était nouveau dans l'étude de la phosphatase acide, c'était cette latence enzymatique, le fait qu'il semblait qu'il faille un endommagement des granules cytoplasmiques soit par l'âge, soit par la congélation pour que l'enzyme soit active.

LA NATURE DES GRANULES CYTOPLASMIQUES

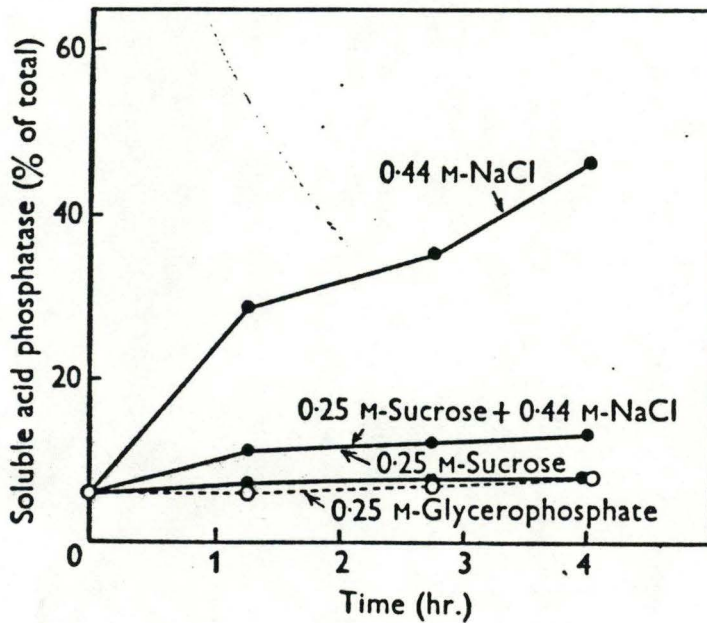
D'après les résultats obtenus (tableau 6), il apparaissait que les granules portant l'enzyme faisaient partie de la fraction mitochondriale. Mais une importante partie des enzymes semblait liée à la fraction microsomiale. Plusieurs explications de ces résultats furent avancées : la plus simple était que lors de la décantation du surnageant après la deuxième série de centrifugation (donnant la fraction mitochondriale), des mitochondries étaient resolubilisées et venaient donc contaminer la fraction microsomiale. Une autre explication était qu'une partie des mitochondries pouvait se casser en plus petits granules, contenant toujours la phosphatase acide mais ne sédimentant plus à 8500 g pendant 20 minutes. Enfin on peut l'expliquer par le fait qu'une population de mitochondries peut contenir de petits granules qui ne peuvent sédimenter avec la fraction mitochondriale. Cette troisième hypothèse rejoignait celle avancée par Chantrenne (1947), pour qui la distinction entre fraction mitochondriale et microsomiale n'était que virtuelle et qu'il existait un spectre continu de granules.

Bref, ils conclurent que la phosphatase acide était liée à des granules cytoplasmiques dont la taille est fort variable (des mitochondries aux microsomes), retenant ainsi la troisième explication comme la plus probable. (Berthet J., de Duve C., 1951)

LA RAISON DU MANQUE D'ACTIVITE DE L'ENZYME

Les expériences précédentes montrèrent que la fraction mitochondriale gardée dans une solution à basse température (0°) de sucrose 0,25 M retenait la phosphatase acide sous forme liée et de manière stable. Le détachement de l'enzyme pouvait être provoqué par une homogénéisation au Waring-Blender, par une incubation prolongée à 38°, par des congélations et décongélations répétées, ou encore par la nature de la solution utilisée. Et

c'est ce phénomène qui fut alors étudié par C. de Duve, J. Berthet, L. Berthet et F. Appelmans (1951). Les résultats (cfr. graphique ci-dessous) donnaient le taux de libération de P inorganique dans différentes solutions.



d'après (Appelmans F., Berthet J., Berthet L., de Duve C., 1951)

Ce graphique montre la grande stabilité du complexe phosphatase acide - mitochondrie (forme inactive de l'enzyme) dans une solution de sucrose 0,25 M et le relâchement brutal de l'enzyme dans l'eau distillée. Il montre également que l'enzyme est rapidement relâchée en présence de solution saline bien qu'elle ne soit pas responsable de l'insolubilité du complexe : en effet, il semble que ce soit l'absence de sucrose qui provoque la libération de l'enzyme (courbe sucrose 0,25 m + NaCl 0,44 M comparée aux courbes de solution saline seule).

L'équipe de chercheurs conclua que la libération de l'enzyme était la conséquence d'une différence de pression osmotique et de la désintégration de la mitochondrie et que la grande différence des effets des solutions salines en présence ou absence de sucrose étaient due au fait que le sucrose permet de maintenir une pression osmotique dans le milieu alors que le NaCl ne le peut pas.

Il a déjà été mentionné que dans un homogénat, la phosphatase acide a peu ou même pas du tout d'activité envers son substrat (glycérophosphate) à pH 5 et dans les conditions de stabilité . Ce fait n'implique pas nécessairement que l'enzyme liée est inactif par lui-même . Il se pourrait que la phosphatase acide soit empêchée d'agir sur son substrat parce que celui-ci ne peut pénétrer dans la mitochondrie . Si cette hypothèse était vraie elle devait être vérifiée par le remplacement du sucrose par du glycérophosphate 0,25 M qui, s'il ne pouvait pénétrer dans la mitochondrie, pouvait maintenir la pression osmotique de la solution . Ce fut vérifié et l'hypothèse acceptée .

NATURE DU LIEN ENTRE LA PHOSPHATASE ACIDE ET LA MITOCHONDRIE

Pour étudier ce point J.Berthet, L.Berthet, F.Appelmans et C.de Duve (1951) appliquèrent différents facteurs chimiques et physiques à des fractions mitochondriales : effet de la température, du pH, de la solution utilisée . Il en résulta que la stabilité la plus grande était obtenue à faible température, dans une solution de sucrose ou de glycérophosphate 0,25 M à pH compris entre 5,5 et 6,5 . Par contre une addition de saponine ou de déoxycholate (détergents), une solution d'eau distillée ou de sels, augmente la libération de l'enzyme .

Le fait que l'homogénéisation au Waring-Blender et des congélations suivies de décongélations causent la libération de la phosphatase acide montra que la liaison de l'enzyme requiert une certaine intégrité structurelle du granule cytoplasmique, mais ne permit pas de définir la structure de ce granule .

Comme déjà montré dans le paragraphe précédent, ces granules se comportent comme des systèmes osmotiques . Dès lors on pouvait supposer que ces granules possédaient les principales caractéristiques d'un système osmotique, à savoir une barrière capable de réguler la concentration de solutés à l'intérieur et à l'extérieur et la présence d'une solution intérieure contenant des composants osmotiquement actifs pour lesquels la barrière est imperméable . Et le plus simple modèle correspondant à cette description est celui d'un sac entouré d'une membrane semi-perméable .

Par ce modèle, ils purent expliquer l'effet des différents agents déstabilisateurs du complexe enzyme - mitochondrie .

— le Waring-Blender blesse la membrane

— l'absence de substances osmotiquement efficaces (sucrose, glycérophosphate) dans le milieu induit un éclatement des granules du à une différence de pression osmotique trop élevée

— les détergents dissocient les complexes lipo-protéiques de la membrane

— les congélations et décongélations répétées agissent de différentes manières : soit en dénaturant l'architecture de la membrane, soit en déchirant la membrane à cause de la formation de cristaux de glace

Il est à noter que si jusqu'à présent j'ai utilisé le terme "mitochondrie" pour désigner les granules portant la phosphatase acide, c'est que cette enzyme se retrouve en majeure partie dans la fraction mitochondriale .

ETUDE COMPARATIVE DE LA LIAISON A DES GRANULES CYTOPLASMIQUES DE LA PHOSPHATASE ACIDE, DE LA GLUCORONIDASE ET DE LA CATHEPSIN

Dans cette étude le laboratoire de Louvain allait montrer le parallélisme des propriétés des trois enzymes . (R.Gianetto et C.de Duve, 1955)

Les expériences furent réalisées sur des fractions mitochondriales lavées deux fois et maintenues dans une solution de sucrose 0,25 M . L'activité de la phosphatase acide fut déterminé par la libération de phosphate inorganique en la présence de glycérophosphate . La glucoronidase fut étudiée par la méthode de Talalay, Fishman et Huggins (1946) modifiée par Kerr et Levy (1951) . Le volume total d'incubation (2 ml) contenait du phénolphthalein glucoronide 0,00125 M (substrat) et un tampon acétate 0,075 M à pH 5,2 . La réaction était stoppée par l'addition d'une solution de glycine, NaCl et Na_2CO_3 , pH 10,7 . La solution finale était clarifiée par une filtration ou centrifugation à grande vitesse et la quantité de phénolphthalein déterminée au colorimètre . Enfin l'activité de la cathepsin fut mesurée dans une solution contenant, pour un volume total de 3 ml, 0,00026 M d'hémoglobine et un tampon acétate 0,17 M à pH 5, du sucrose 0,25 M et l'enzyme . La réaction était stoppée en ajoutant 5 ml d'acide trichloroacétique glacé . Les produits de la dégradation étaient mesurés par le réactif de Folin-Ciocalteu .

Toute une série d'expériences fut faite pour comparer les propriétés des trois enzymes : dégradation mécanique des fractions au Waring-Blender, activation des enzymes par gels et dégels successifs, activation osmotique, par les sels, par la chaleur, ...

De pareilles expériences avaient déjà été faites pour étudier le lien phosphatase acide - granule cytoplasmique. Les résultats montrèrent la similitude des propriétés de ces trois enzymes : ils sont tous trois enfermés dans un granule cytoplasmique et n'ont une activité considérable que si ce granule est endommagé ; de plus les conditions pour obtenir cette activité sont les mêmes pour les trois enzymes : homogénéisation au Waring-Blender, gels et dégels, incubation dans une solution hypotonique. Bref il semblait que ces trois enzymes appartenaient au même granule cytoplasmique.

DE NOUVEAUX GRANULES CYTOPLASMIQUES

Jusqu'à ce stade de la recherche, l'équipe de Professeur de Duve avait montré que la phosphatase acide était liée à des granules cytoplasmiques que l'on retrouvait dans la fraction mitochondriale mais aussi, en moindre partie, dans la fraction microsomiale. De plus, cette enzyme avait la particularité d'être inactive vis-à-vis de son substrat tant que les granules la portant étaient intacts. Ces derniers se comportaient comme des systèmes osmotiques, entourés d'une membrane semi-perméable. Mais jusqu'alors rien ne prouvait qu'ils avaient affaire à des granules différents des mitochondries ou des microsomes. Ce fut dans les recherches qui suivirent que la clef de la découverte des lysosomes se trouvait.

C'était en 1954 et F.Appelmans, R.Wattiaux et C.de Duve (1955) cherchaient pourquoi la phosphatase acide se trouvait dans les fractions mitochondriales et microsomiales alors que la cytochrome oxydase était typiquement mitochondriale. Pour clarifier ce point ils firent une série d'expériences, comparant phosphatase acide et cytochrome oxydase. La mesure de l'activité de la phosphatase acide se faisait au spectrophotomètre : l'enzyme préparée dans un tampon phosphate 0,005 M à pH 7,4 réagissait avec une solution $1,7 \cdot 10^{-5}$ M de cytochrome réduit dans un tampon phosphate 0,03 M à pH 7,4. La baisse de densité optique était mesurée à 550 m. L'activité respiratoire - typiquement mitochondriale elle aussi et permettant de localiser les

mitochondries dans les différentes fractions - correspondait à la consommation d' O_2 d'une solution contenant du glutamate de sodium 0,008 M, de de fumarate de sodium 0,008 M, de l'adénosine triphosphate 0,001 M, de $MgCl_2$ 0,001 M, un tampon de phosphate de potassium 0,02 M à pH 7,4 et du sucrose 0,25 M à laquelle était ajoutée l'enzyme . La mesure était réalisée dans l'appareil de Warburg .

Le comportement de sédimentation de la phosphatase acide fut comparé à celui de l'activité respiratoire ou de la cytochrome oxydase . Pour ce faire, des fractions mitochondriales furent soumises à différentes forces de centrifugation dans la M.S.E. Les sédiments étaient alors analysés pour leur activité respiratoire, la cytochrome oxydase et la phosphatase acide libre et liée:

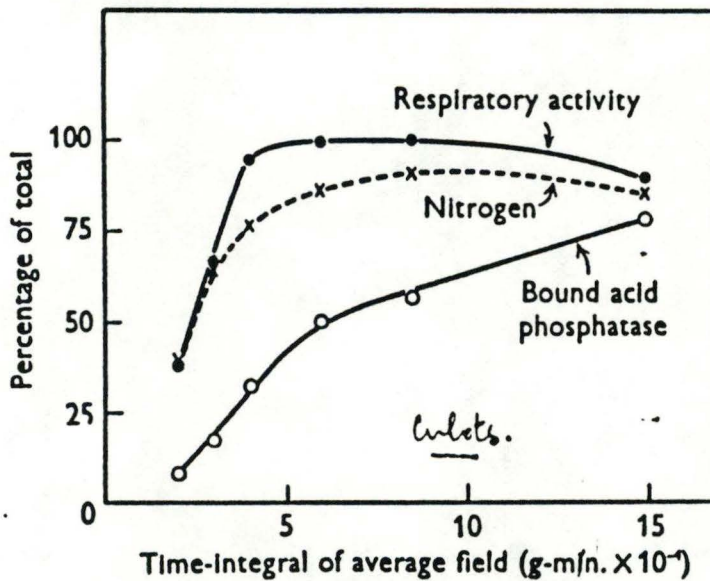


Fig. 1. Sedimentation curves of nitrogen, respiratory activity and bound acid phosphatase of a mitochondrial suspension. Original preparation: unwashed mitochondria, isolated in the M.S.E. superspeed attachment by 200 000 g-min. ($S_{min.} = 3600 S$) and diluted 1:10 in 0.25 M sucrose. From this suspension, 7.5 ml. portions were centrifuged at increasing average field-time values (see abscissa) in the M.S.E. centrifuge. The sediments were collected and analysed. The results are expressed as percentage of the total amounts present in the same volume of the original suspension.

d'après (Appelmans F., Wattiaux R., de Duve C., 1955)

Les résultats indiquaient que l'activité respiratoire se trouvait totalement dans le culot après une centrifugation de 50000 g alors qu'à cette même force la moitié de la phosphatase acide liée n'avait pas encore sédimenté .

A ceci s'ajoutèrent d'autres observations dues au hasard . En effet, F.Appelmans devait préparer des fractions mitochondriales mais la tête à haute vitesse M.S.E. de la centrifugeuse était cassée . Dès lors C.de Duve lui conseilla d'utiliser la centrifugeuse Corda, qui tourne moins vite et dans laquelle les tubes sont placés tangentiellement et non radialement par rapport au cercle de centrifugation . Il fallait centrifuger plus longtemps vu que la vitesse était beaucoup moins grande : ceci aurait du lui permettre d'obtenir une bonne fraction mitochondriale . Mais les fractions obtenues de la sorte étaient exemptes de phosphatase acide, bien que mitochondriales . Dès lors un schéma nouveau de centrifugation fut mis au point pour séparer la fraction contenant les enzymes de la respiration et la phosphatase acide . (de Duve C., 1969)

Le noyau était séparé du reste de la même manière qu'avant . Ensuite la centrifugeuse utilisée pour le reste de la centrifugation fractionnée était la "Spinco n° 40" . Une fraction de mitochondries lourdes est isolée en centrifugeant à 33000 g/min. et est lavée deux fois sous les mêmes conditions . Les trois surnageants obtenus sont réunis et centrifugés à 250000 g/min. pour séparer la fraction des mitochondries légères , qui est aussi lavée deux fois . Les microsomes sont obtenus en centrifugeant les surnageants restant à 300000 g/min.

Une autre méthode fut également testée, méthode déjà utilisée par Hogeboom, Schneider et Palade (1948) : la "layering technique" . La centrifugeuse est une "Spinco n° 20" . Dix ml d'extrait cytoplasmique dans du sucrose 0,25 M sont placés dans le tube de la centrifugeuse . Ensuite 90 ml de sucrose 0,3 M sont introduits dans le fond du tube sous la couche de l'extrait cytoplasmique et la centrifugation se fait comme décrite précédemment , toutefois sans les lavages . Les résultats furent ceux-ci :

Table 3. *Subfractionation by layering procedure*

For details of experimental procedure, see text.

Fraction	Percentage of activity of extract			Ratio, bound phosphatase: cytochrome oxidase
	Cytochrome oxidase	Total acid phosphatase	Bound acid phosphatase*	
Cytoplasmic extract	100	100	100 (73)	1
Heavy sediment	88	30	34 (25)	0.39
Light sediment	14	41	51 (37)	3.6
Final supernatant	1.5	26	16 (12)	10.7
Recovery	103.5	97	101 (74)	0.98

* Figures in brackets show bound activity as percentage of total activity of extract.

d'après (Appelmans F., Wattiaux R., de Duve C., 1955)

Les résultats de ces expériences étaient en parfait accord avec ceux de Novikoff, Podber, Ryan et Noe (1953) qui avaient décrit la dissociation partielle entre la phosphatase acide et la succinoxidase. Toutefois il y avait le problème de l'hétérogénéité des deux fractions obtenues. Pour l'expliquer il y avait la possibilité d'artéfacts : la cytochrome oxydase et la succinoxidase sont fermement attachées aux mitochondries, il y avait donc peu de chance qu'elles soient responsables d'artéfacts. Par contre la phosphatase acide peut facilement se détacher et donc contaminer une autre fraction ; mais les mesures furent faites sur la phosphatase acide liée (différence entre forme libre et activité totale). Dès lors l'hétérogénéité semblait être due non pas à une contamination d'enzymes mais aux granules eux-mêmes. Novikoff l'expliquait par le fait que les granules portent les deux enzymes mais en proportion variable. de Duve, lui, proposa l'hypothèse selon laquelle il y a deux types de granules : les uns contenant la phosphatase acide, les autres la cytochrome oxydase ; l'hétérogénéité observée étant dès lors due à une séparation incomplète des deux types de granules.

Cette hypothèse suivait son postulat de travail : l'homogénéité biochimique des constituants cellulaires (cfr. précédemment) et allait s'avérer être la bonne. La technique des lavages et la "layering technique" permettaient de purifier les deux fractions mitochondriales. Ainsi dans les meilleures conditions ils obtinrent une fraction lourde contenant 1/3 de l'activité respiratoire sans phosphatase acide ou encore une

fraction lourde contenant 70 % de cytochrome oxydase et moins de 10 % de phosphatase acide .

De tels résultats suggéraient que la fraction mitochondriale classique (les "vraies" mitochondries) contenait des enzymes oxydatives mais pas de phosphatase acide et était représentée par la fraction mitochondriale lourde , contaminée par des granules différents des vraies mitochondries et contenant la phosphatase acide . De plus d'après les résultats de sédimentation, on put calculer la taille de ces nouveaux granules : 0,25 à 0,8 s'ils ont une densité basse (1.10) et 0,13 à 0,4 si leur densité est élevée (1.30) .

Il semblait ainsi que ces granules étaient plus proches des mitochondries que des microsomes de par leurs propriétés de sédimentation et le fait qu'on pouvait aisément séparer phosphatase acide et glucose-6-phosphatase, typiquement microsomiale . Il restait à savoir si ces granules correspondaient à une forme spécialisée de mitochondries ou à une entité cytologique nouvelle . Les corps cellulaires qui s'en rapprochaient le plus étaient les "gouttes" isolées par Strauss (1954) dans le rein, dans lesquelles se trouvent un peu de succinoydase et beaucoup de phosphatase acide . Ces gouttes furent étudiées histologiquement par Olivier (1948) qui remarqua leur augmentation de taille lors d'injection de blanc d'oeuf et en conclua qu'elles étaient impliquées dans la résorption de protéines .

Enfin ces résultats furent aussi d'un intérêt théorique pour la centrifugation fractionnée : deux enzymes différents peuvent être présents dans une même fraction et appartenir à deux structures cytologiques entièrement différentes .

Le nouveau schéma de centrifugation fractionnée grâce auquel la fraction mitochondriale classique est divisée en deux sous-fractions permet l'étude de la répartition cellulaire de toute une série d'enzymes . Ceci fut fait en comparant la distribution d'un enzyme dans différentes fractions à celle d'enzymes de référence : la cytochrome oxydase pour la mitochondrie, la phosphatase acide pour les nouveaux granules et la glucose-6-phosphatase pour les microsomes . Les résultats sont donnés dans le tableau ci-dessous (d'après (de Duve C., Pressman B.C., Gianetto R., Wattiaux R., Appelmans F., 1955)) :

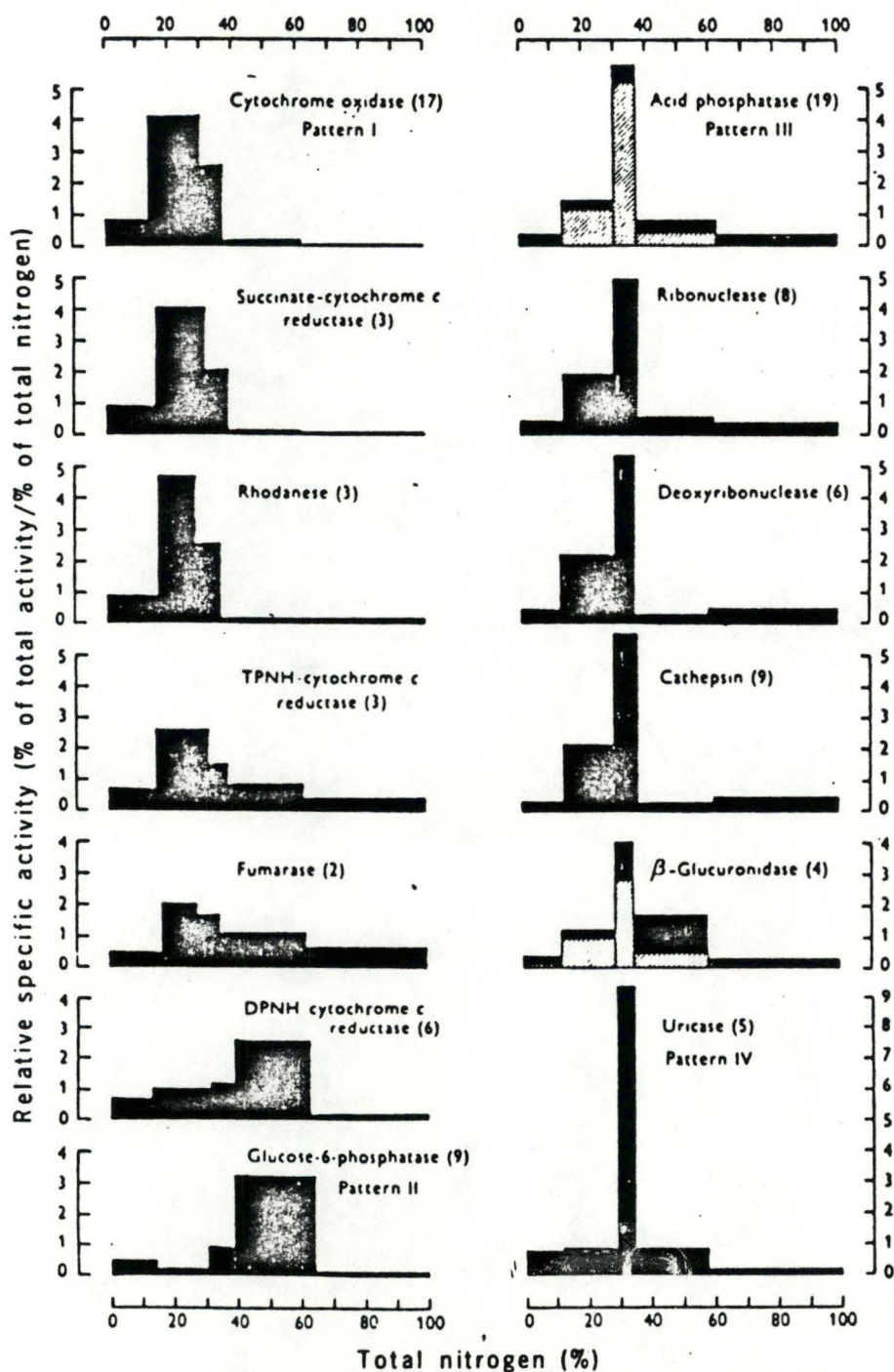


Fig. 5. Distribution patterns of enzymes in rat liver fractions separated by five-fraction procedure shown in Fig. 4. Pattern I, shared by three enzymes, represents the distribution of mitochondria; pattern II (glucose 6-phosphatase), that of microsomes. In between, in the left column, are complex combinations of patterns I and II. Pattern III is shared by five lysosomal acid hydrolases, except for β -glucuronidase which has an additional microsomal component. Pattern IV belongs to the peroxisomal urate oxidase. The numbers of determinations are given in parentheses. Details are given in the original report. [Source: (7)]

L'urate oxydase avait la même répartition que la phosphatase acide mais n'en avait pas les mêmes propriétés : latence, activité élevée lorsque solubilisée ... Dès lors, peut-être appartenait-elle à un quatrième groupe de granules, de la même taille que les granules à phosphatase acide ?

LES LYSOSOMES

Le fait que tous les enzymes appartenant à ces nouveaux granules étaient des enzymes hydrolytiques avec un pH optimum acide, agissant chacun sur un substrat différent donnait à ces granules une fonction purement lytique . C' est pourquoi le nom de "lysosome" leur fut donné, qui signifie : corps lytique . (de Duve C., 1969)

Ainsi un nouvel organe cellulaire était mis à jour : le lysosome . Mais chose des plus curieuses, on savait qu'ils renfermaient des enzymes hydrolytiques, on connaissait leur taille et leur propriétés osmotiques mais on ne les avait jamais vu ! - du moins en sachant que c'était des lysosomes - . A ce moment, le lysosome était un concept biochimique .

LA CENTRIFUGATION EN GRADIENT DE DENSITE

Malgré la découverte primordiale de l'existence d'organites cellulaires distincts des mitochondries, les lysosomes, deux grands problèmes subsistaient : d'une part la fraction L (L pour lysosome) montrait encore une importante activité de la cytochrome oxydase et laissait donc supposer qu'elle était largement contaminée par des mitochondries . D'autre part, rien ne permettait d'affirmer que l'urate oxydase était bien une enzyme lysosomiale . Dans les deux cas, le recours à une technique de séparation plus fine des organites allait résoudre le problème .

Jusqu'alors seule la centrifugation en milieu homogène était utilisée pour la localisation subcellulaire des enzymes, mais elle semblait ici incapable de surmonter ces problèmes . C'est alors que le Professeur de Duve et son équipe se tournèrent vers la centrifugation en gradient de densité (cfr. chapitre technique) . Cette nouvelle méthode

Les résultats montrèrent que le milieu influence le comportement des particules . Les oxydases et catalases se stabilisent à des densités soit légèrement plus faibles, soit légèrement plus élevées que les mitochondries (série de gauche), dans des milieux différents ; chose beaucoup moins évidente pour les lysosomes (série de droite) vu leur grande diversité et dispersion de densité . Les hydrolases acides se dissocient nettement des oxydases et catalases tant par leur comportement différent suivant le milieu que par leur séparation dans différents gradients . (Beaufays H., 1966)

On appela peroxysomes le troisième organite "mitochondriale" contenant les oxydases et catalases .

IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE DES LYSOSOMES

Ce travail fut réalisé grâce à l'aide de Alex Novikoff (A.B.Novikoff, H.Beufay, et C.de Duve , 1956) qui avait déjà travaillé sur la phosphatase acide et la succinoxidase, entre autres . Ici, il s'agissait de réaliser des fractions assez riches en lysosomes et ensuite de les observer au microscope électronique .

Les méthodes pour purifier la fraction lysosomiale furent variées . Dans deux expériences la méthode mise au point par le laboratoire de Louvain fut utilisée . Dans une troisième, la fraction L fut resuspendue et recentrifugée plusieurs fois à 30000 g/min. par le "Spinco n° 40" en ayant soin chaque fois d'enlever les particules les plus lourdes . Le surnageant final fut précipité en centrifugeant à 250000 g/min. C'est ce culot qui fut utilisé .

Dans une quatrième expérience, la méthode déjà utilisée par Pressman fut choisie : les lysosomes ayant une densité plus grande que les mitochondries et les microsomes, c'est cette propriété qui est utilisée pour la purification . Il s'avéra que les résultats étaient moins bons que dans les autres expériences .

Enfin, dans une cinquième expérience était rajouté à la solution de l'homogénat du polyvinylpyrrolidone 7.3 % qui stabilise la structure des organites . Mais les résultats furent encore moins bons .

Les préparations microscopiques furent réalisées comme suit : aux fractions fut rajouté du tétr oxyde d'osmium ; ensuite elles furent placées au réfrigérateur avant d'être enrobées dans du n-butylméthacrylate . Enfin, les coupes ont été réalisées .

Après les observations, les lysosomes furent identifiés comme étant les "corps denses" observés sur les préparations . En effet :

- 1° les fractions riches en lysosomes sont également riches en "corps denses"
- 2° les dimensions des "corps denses" sont du même ordre que celles calculées pour les lysosomes
- 3° les "corps denses" sont formés d'une cavité entourée d'une membrane ,modèle proposée pour les lysosomes

LA TECHNIQUE

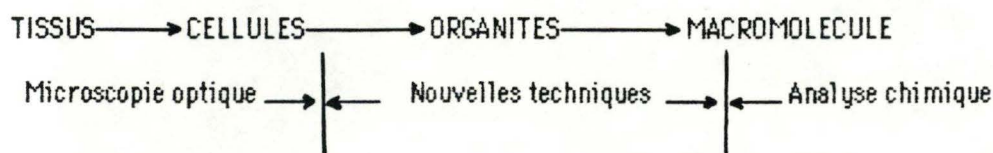
TECHNIQUE

INTRODUCTION

La découverte des lysosomes est un bel exemple pour juger de l'importance d'une technique et d'une méthode de travail dans la recherche scientifique . D'abord parce que la technique - la centrifugation fractionnée - a été presque l'unique outil de travail du Professeur de Duve : c'est grâce à cette technique que les lysosomes furent découverts . Ensuite parce que l'étude de la cellule par la centrifugation fractionnée était relativement récente et était encore, à l'époque où le laboratoire de Louvain commença à l'étudier, en pleine évolution ; et plus précisément, c'est en trouvant un nouveau schéma d'application de cette technique (la cinquième fraction, la fraction L) que C. de Duve put isoler les nouveaux granules cytoplasmiques dont on soupçonnait l'existence . C'est donc en modifiant un élément purement technique que l'isolement des lysosomes a été fait .

Mais avant de parler plus en détail de la centrifugation fractionnée, il serait bon de la situer parmi les autres moyens d'approche de la cellule et d'en connaître ses avantages et ses limites .

Jusqu'aux années 30-40, la connaissance de la cellule vivante était limitée par deux frontières, entre lesquelles se trouvait un domaine tout à fait inexploré : la frontière supérieure correspondant au pouvoir de résolution du microscope optique, la limite inférieure aux techniques chimiques d'analyse des constituants cellulaires . La découverte de nouvelles techniques d'étude allait permettre à cette époque d'explorer ce domaine inconnu . Ces techniques étaient de deux types : les unes permettant une visualisation de constituants se rapprochant de la taille des macromolécules, tandis qu'avec les autres la séparation et l'analyse chimique d'entités microscopiques (organites cellulaires) devenaient possible . Ainsi s'ouvrait un large champ d'exploration de la cellule aux scientifiques de l'époque .



*ce n'est pas vraiment
la phase III*

La principale méthode pour visualiser des constituants de taille voisine des macromolécules était la cytochimie, alors que la centrifugation fractionnée permettait la séparation et l'analyse des organites cellulaires.

La visualisation cytochimique, dont le principe est de marquer des composants cellulaires (lipopolysaccharide, DNA, enzymes...) à l'aide d'un colorant, d'un agent fluorescent ou d'un autre marqueur et d'ensuite observer sa localisation cellulaire au microscope, s'adresse plutôt au morphologiste puisqu'elle rend visible des enzymes ou autres composants biochimiques dans une coupe de tissu. La préservation de la morphologie du tissu et des cellules est primordiale et implique une moindre précision biochimique. La principale limite de cette technique concerne les enzymes elles-mêmes qui n'ont pas toutes la propriété d'être marquées. Ainsi cela demande énormément de travail pour trouver un marqueur approprié, spécifique, et ayant un degré de résolution assez élevé pour marquer telle enzyme. Dès lors la visualisation cytochimique permet l'étude de peu d'enzymes mais dans un grand nombre de tissus différents.

Par contre la centrifugation fractionnée est une approche chimique. Elle sacrifie la morphologie des cellules et des tissus au profit d'une étude chimique et analytique des organites cellulaires plus précise. Cette technique s'applique à la plupart des enzymes ou autres constituants biochimiques mais est restreinte quant au nombre de tissus différents pouvant être étudiés. En effet, alors que la préparation du matériel pour le microscope est quelque chose de bien connu quel que soit le tissu étudié, le fractionnement à l'époque ne se fait que sur quelques rares tissus : foie, rein, cerveau, ... Mais il semble bien plus intéressant de connaître beaucoup sur peu de tissus différents que l'inverse : savoir que les lysosomes de tous les tissus contiennent des hydrolases acides est de moindre importance que de savoir qu'elles sont ces hydrolases acides, dans quelles conditions elles sont actives, ... pour la compréhension du vivant. Ceci est un des avantages de la centrifugation fractionnée qui permet une analyse biochimique plus poussée des composants cellulaires.

En fait ces deux approches ont des buts différents : celui de la cytochimie est de visualiser dans un tissu ou une cellule un constituant connu et déterminé alors que dans la

centrifugation fractionnée il s'agit de préciser les caractéristiques biochimiques d'organites déterminés - comme nous l'avons vu, la recherche de Duve est une exception à cette règle puisque la centrifugation fractionnée a permis de mettre en évidence deux organites cellulaires jusqu'alors inconnus : lysosomes et peroxysomes .

Il est à noter que parallèlement à la centrifugation se développaient à l'époque d'autres techniques biochimiques telles l'électrophorèse et la chromatographie .

Maintenant on peut se demander pourquoi le Professeur de Duve a choisi, parmi ces différentes techniques toutes récentes et ayant chacune ses avantages et ses défauts, la centrifugation :

" si j'ai préféré la centrifugation fractionnée à la cytochimie, c'est dû en premier lieu à ma formation : je suis un biochimiste et non un morphologiste, et la cytochimie est typiquement une technique de morphologiste . Ensuite la cytochimie nécessite une méthodologie extrêmement rigoureuse pour que le marquage soit spécifique . Or à l'époque de mon choix, les techniques de marquage cellulaire étaient loin d'être convaincantes et les résultats les plus fantaisistes pouvaient être obtenus . Enfin, la troisième raison de mon choix est tout simplement la curiosité : la lecture de deux articles d'Albert Claude sur l'agglutination d'enzymes sur des particules, après centrifugation, m'intrigua et me fit définitivement opter pour la centrifugation fractionnée ." (de Duve, C., 1965), (de Duve, C., 1971) et (de Duve, C., 1964)

Dans ce chapitre, je vais d'abord exposer le principe et l'évolution de la centrifugation en milieu homogène . Ensuite je parlerai de la centrifugation en gradient de densité, son principe, les problèmes de préparations et ses avantages . Après je discuterai de l'analyse des différentes fractions et de leur composition ; enfin j'expliquerai les différentes applications d'une telle technique .

très
pas à sa
place !!

Comme moi
j'ai osé lire
qui nait!

LA CENTRIFUGATION EN MILIEU HOMOGENE

1° PRINCIPE

Un homogénat de tissu est soumis à une centrifugation : les différentes particules de cet homogénat migrent suivant le champ centrifuge à une vitesse donnée par la formule de Svedberg :

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

où v est la vitesse radiale de la particule en cm/sec

ω est la vitesse angulaire en rad/sec

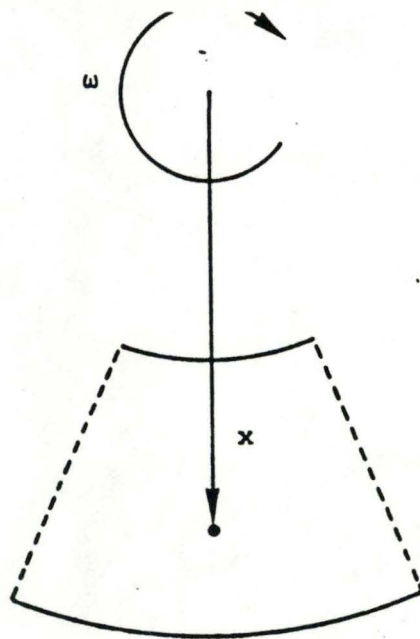
x est la distance radiale de la particule en cm

ϕ son volume en cm^3

ρ_p sa densité en g/cm^3

ρ_m la densité du milieu en g/cm^3

f le coefficient de friction en g/sec



Sedimentation velocity

$$\frac{dx}{dt} = s \omega^2 x$$

x = Radial distance (cm)

ω = Angular velocity ($\text{rad} \times \text{sec}^{-1}$)

s = Sedimentation coefficient of particle (sec)

For spherical particle of radius r (cm) and of density ρ_p ($\text{g} \times \text{cm}^{-3}$)

In medium of density ρ_m ($\text{g} \times \text{cm}^{-3}$) and of viscosity η (poises)

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

d'après (de Duve C., 1975)

La vitesse de migration de la particule dépend du milieu (f, ρ_m), de la particule (ϕ, ρ_p), x, f) et de la vitesse de rotation (ω). Dès lors en connaissant les paramètres du milieu

et la vitesse de rotation, on pourra déduire les caractéristiques des particules et les différencier les unes des autres .

Toutefois dans ce type de centrifugation, on s'arrange pour que certaines particules sédimentent au fond du tube . Dès lors, ce n'est pas la vitesse de migration qui sera le paramètre le plus usité mais le coefficient de sédimentation :

$$s = \frac{dx}{dt} / \omega^2 x = \frac{\phi (l_p - l_m)}{f}$$

Ce coefficient est une grandeur de temps : il s'exprime donc en secondes . Il est à noter que contrairement à la vitesse de migration, ce coefficient de sédimentation ne dépend plus que du milieu et de la particule et non plus de la vitesse de rotation de la centrifugeuse . Le Svedberg est une unité conventionnelle qui correspond à 10^{-13} sec .

Le principe consiste à centrifuger un homogénat de tissu à vitesse choisie et dans un milieu donné . Ces deux paramètres étant fixes, les différences de vitesses de migration entre différentes particules exprimeront des différences de volume et de densité entre ces différentes particules .

Sachant, pour le cas d'une particule sphérique, que :

$$\phi = 4/3 r^3 \pi$$

$$\text{et } f = 6 r \pi \eta$$

avec r = rayon de la particule

η = viscosité du milieu

dès lors :

$$v = \frac{2 r^2 (l_p - l_m) \omega^2 x}{9 \eta}$$

on remarque que les particules les plus volumineuse ($r >$) et les plus denses ($l_p >$) migreront plus vite que les plus petites et moins denses . On peut voir que le rayon des particules (volume) a plus d'impact sur la vitesse que la densité de la particule . Ainsi

en modifiant le temps ou la vitesse de centrifugation, on peut sédimenter telles particules plus "grosses" que d'autres .

La forme de la particule intervient également dans le coefficient de sédimentation .

Exemple : cas d'une particule ellipsoïde :

on a :

$$f = (6\pi\eta r) * \Theta$$

$$\text{avec } \Theta = f * \left(\frac{r_1}{r_2} \right)$$



$$\text{dès lors, } v = \frac{2r^2 (l_p - l_m) \omega^2 x}{9\eta \Theta}$$

Θ est donc un facteur de freinage de la particule . (de Duve C., 1963), (de Duve C., 1965), (Beaufays H., 1966), (de Duve C., 1971) et (de Duve C., 1975)

2° EYOLUTION DE LA TECHNIQUE

La centrifugation fractionnée date du 19^e siècle : en 1871, Friedriesch Miescher utilisait déjà cette technique pour isoler les noyaux de cellules qu'il avait homogénéisées . Plus tard Svedberg utilisait la centrifugation pour déterminer les poids moléculaires de grosses molécules .

Pourtant le nom de centrifugation fractionnée est associé à celui d'Albert Claude alors que celui-ci ne l'utilisa qu'une septantaine d'années après Miescher . Tout le mérite d'Albert Claude fut de modifier le moyen d'utilisation de cette technique .

Avant A.Claude, le but de la centrifugation fractionnée était d'obtenir des fractions les plus pures possibles à partir de l'homogénat initial : le rendement du fractionnement n'importait pas, seule la pureté d'une fraction intéressait les chercheurs, fractions plus ou moins pures dont ils cherchaient les caractéristiques physiques, chimiques, dont ils déterminaient l'appareil enzymatique, le métabolisme ... Leur étude avait pour but la connaissance approfondie d'un organe déterminé . Ce type d'approche est appelé fractionnement préparatif .

Albert Claude apporta un renouveau en biologie cellulaire grâce aux modifications qu'il fit à cette technique . Il proposa un nouveau schéma d'étude des composants cellulaires à partir du fractionnement par centrifugation d'un tissu : il ne s'agit plus

d'isoler une fraction la plus pure possible (fractionnement préparatif) pour en étudier les propriétés mais on adopte un autre type d'approche : le fractionnement analytique. Dans cette méthode c'est l'aspect quantitatif des résultats qui est prépondérant . Si, par exemple, on travaille sur l'activité d'une enzyme, on s'efforce d'exprimer l'activité enzymatique d'une fraction donnée en fonction de l'activité de l'homogénat entier qui correspond à l'activité totale (du moins dans la plupart des cas) . Ce n'est plus l'étude des propriétés d'une fraction qui est le plus important mais la répartition de ces propriétés dans les différentes fractions .

Albert Claude va tenter d'associer le fractionnement quantitatif au fractionnement préparatif : cela aboutira au schéma maintenant classique des quatre fractions : noyaux, mitochondries, microsomes et fraction soluble . Ce type de fractionnement est appelé pseudo-préparatif . En effet, ce n'est pas purement analytique car il cherche à avoir quatre fractions les plus pures possibles tout en conservant l'approche quantitative d'analyse de ces fractions . (de Duve C., 1963), (de Duve C., 1971) et (Beaufays H., 1966)

3° LA FRACTION "L"

La technique utilisée par Christian de Duve était celle d'Albert Claude . Ce dernier, de passage au laboratoire de chimie physiologique de Louvain, avait même donné quelques conseils et "trucs" de manipulation . Pourtant, il aura fallu à C.de Duve apporter des modifications au schéma classique des quatre fractions pour isoler les lysosomes . Ces changements ont été faits plus ou moins par hasard, en changeant la tête du rotor (cfr. "La découverte des lysosomes") . Ainsi en ayant modifié la vitesse de rotation, le temps de centrifugation, le placement des tubes de centrifugation par rapport à l'axe du rotor, une fraction contenant peu de cytochrome oxydase mais beaucoup de phosphatase acide fut isolée : la séparation entre mitochondries et lysosomes était faite .

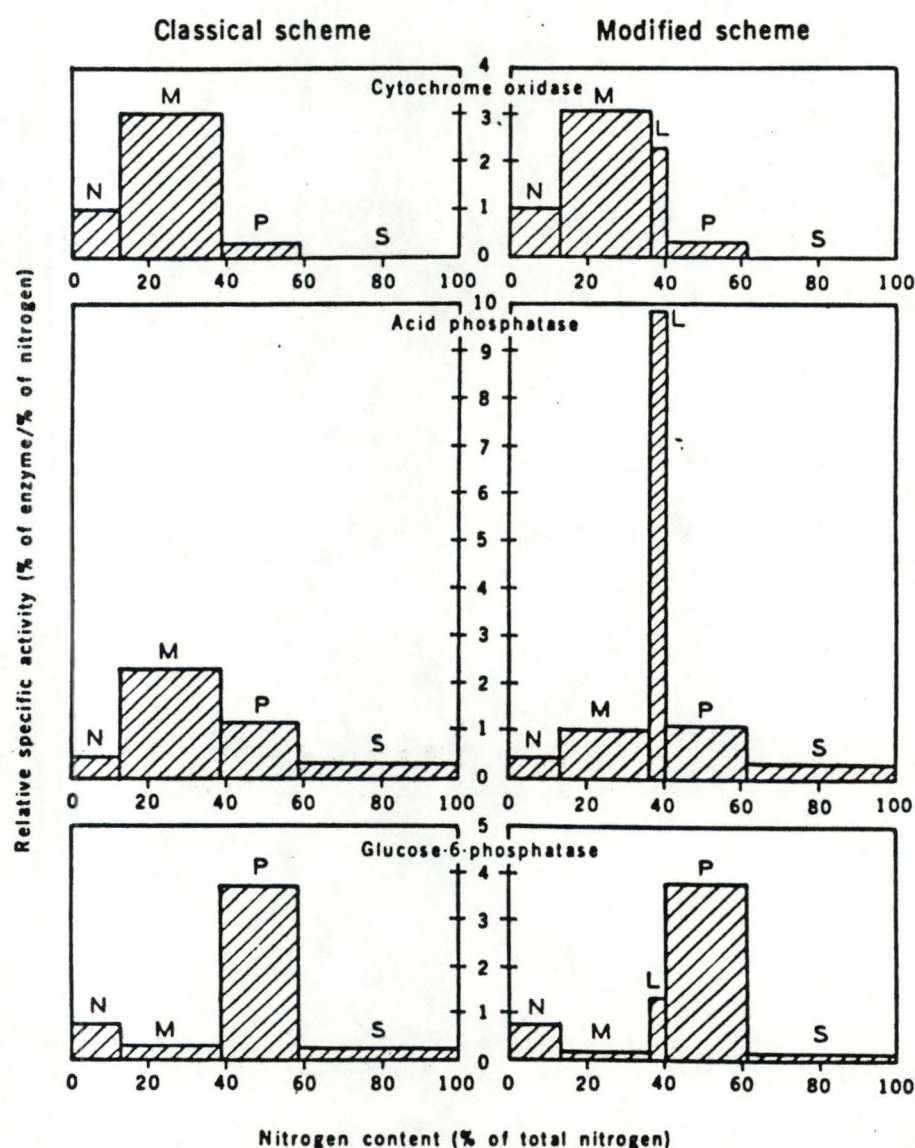


Fig. 4. Enzyme distributions represented in histogram form. The relative specific enzyme content (percentage of activity divided by percentage of protein) of the fractions is plotted against their relative protein content, inscribed cumulatively from left to right in their order of isolation (decreasing sedimentation coefficient): nuclear (*N*), mitochondrial (*M*), microsomal (*P*), and supernatant (*S*), in classical four-fraction scheme; and nuclear (*N*), heavy mitochondrial (*M*), light mitochondrial (*L*), microsomal (*P*), and supernatant (*S*), in modified five-fraction scheme (6). Although very crude, the similarity with frequency distribution curves of polydisperse populations can be recognized. Distinction of three populations, now known to consist of mitochondria (cytochrome oxidase), lysosomes (acid phosphatase), and endoplasmic reticulum fragments (glucose 6-phosphatase), is enhanced by use of five-fraction scheme. [Source: (44)]

D'après (de Duve 1975)

Pourtant les résultats n'étaient pas encore satisfaisants : la fraction lysosomiale contenait encore beaucoup de cytochrome oxydase et une enzyme n'ayant pas la propriété de latence : l'urate oxydase (cfr. "La découverte des lysosomes") . Pour résoudre le problème posé par la présence de ces enzymes, la centrifugation en milieu homogène se montra limitée, il fallut recourir à la centrifugation sur gradient de densité .(de Duve C., 1969) et (Beaufays H., 1966)

LA CENTRIFUGATION SUR GRADIENT DE DENSITE

1° HISTORIQUE

La première équilibration de densité fut réalisée - semble-t-il - par Gallilé . Celui-ci plongea une boule de cire de densité ajustée au moyen de cailloux dans une colonne de liquide formée d'eau douce superposée à de l'eau salée . La boule s'immobilisait à l'interface de ces deux couches . L'explication de ce phénomène, qui est d'ailleurs celle de toute équilibration sur gradient de densité, est donnée par le principe d'Archimède . La différence entre la masse de la boule de cire et la masse du liquide qu'elle déplace - différence positive ou négative - est appelée masse d'Archimède . L'attraction terrestre agissant sur cette masse engendre la montée ou la descente de cette boule de cire jusqu'à arriver à un endroit où la masse du liquide égale la masse de la boule, c'est-à-dire où la densité du liquide déplacé égale la densité du corps : à ce moment, plus aucune force n'agit sur la boule, elle s'immobilise .

En, 1937, un danois, Linderstrom-Lang, va utiliser la même technique pour déterminer la densité de gouttelettes d'eau ; cependant il utilisa un gradient continu de solvants organiques non miscibles à l'eau .

Mais c'est Behrens qui permit d'ouvrir un champs d'application plus étendu à cette technique qui souffrait d'un gros défaut : les corps placés dans cette colonne devaient être assez lourd pour pouvoir vaincre les forces de viscosité qui ralentissent très fort la progression du corps . La solution fut la centrifugation qui accélérât la vitesse de progression des particules . C'est également Behrens qui fractionna une cellule par cette technique . La centrifugation fractionnée sur gradient de densité venait ainsi rejoindre la centrifugation sur milieu homogène, déjà bien développée alors depuis Svedberg en 1926 . (Beaufays H., 1966)

2° PRINCIPE

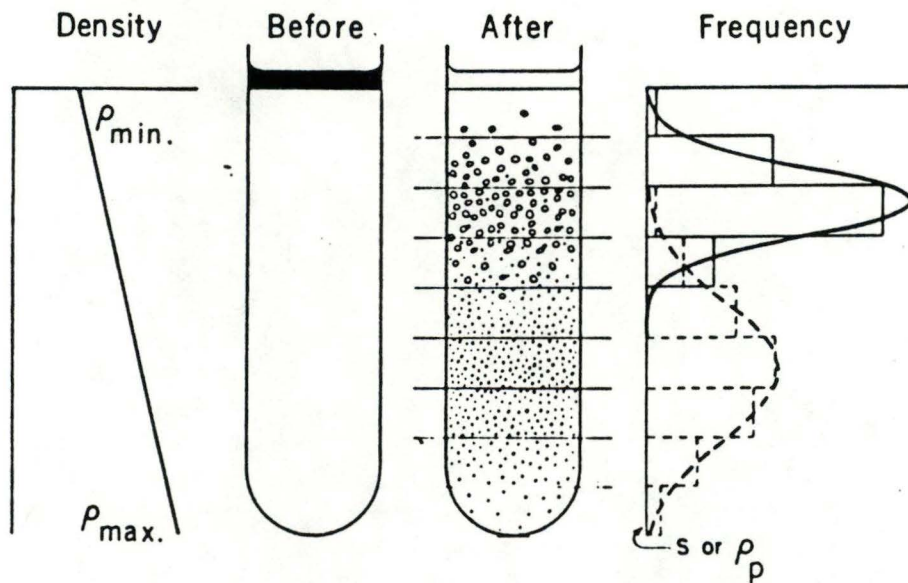
Il existe deux grandes variétés de centrifugation sur gradient de densité : la centrifugation isopycnique et la centrifugation différentielle .

En centrifugation isopycnique, le gradient couvre un large intervalle de densité dont les limites se situent en dessous et au dessus des densités d'équilibre des particules . La centrifugation est effectuée pendant une longue période jusqu'à ce que les particules soient arrivées à un équilibre . Une fois la centrifugation terminée, les particules sont réparties selon leur densité dans le gradient . Une série d'analyses peut être faite et on peut construire un graphe de fréquence en fonction de la densité .

En centrifugation différentielle, le facteur permettant la séparation des particules n'est plus la densité (centrifugation isopycnique) mais la vitesse de sédimentation (comme la centrifugation en milieu homogène) . Pour cela, le gradient couvre un petit intervalle, les particules étant toujours plus denses que le milieu . Celles-ci migrent donc toutes en direction centrifuge et on s'arrange pour avoir une sédimentation incomplète .

1° Soit la disposition des particules est uniforme dans le gradient et la sédimentation progresse comme une centrifugation en milieu homogène . Toutefois le gradient introduit des complications impliquant une sédimentation variable pour des particules identiques mais présentes à des distances radiales différentes . Cette technique est analytique mais ne permet guère la séparation de populations de particules .

2° Soit l'homogénat est placé en une couche mince au dessus du gradient et la progression des particules d'une même population est homogène : le résultat est une distribution zonale de celles-ci . C'est la technique de choix pour séparer les différentes populations. (de Duve C., 1963), (de Duve C., 1965), (de Duve C., 1975) et (Beaufays H., 1966) .



1. Differential sedimentation

Gradient: *Shallow stabilizing, $\rho_{max} < \rho_{p min}$*

Centrifugation \rightarrow *Incomplete sedimentation*

Abscissa of frequency distribution: *Sedimentation coefficient*

2. Density equilibration

Gradient: *Steep, $\rho_{max} > \rho_{p max}$*

Centrifugation: *Prolonged, high speed*

Abscissa of frequency distribution: *Equilibrium density*

Fig. 8. Schematic representation of density gradient centrifugation, with initial top layering of the sample. Two forms, based on differences in sedimentation coefficient and density, respectively, are shown. Diagram at the right pictures frequency distribution of particles or markers as a function of tube height. Conversion to frequency distributions of sedimentation coefficients or densities generally requires readjustment of ordinate and abscissa values, leaving surface area of each block (percentage of content in fraction) unchanged. For details of calculations, see (10). [Source: (59)]

d'après (de Duve C., 1975)

3° LA PREPARATION DU GRADIENT

Cette préparation est utilisée pour les centrifugeuses à rotor à godets basculants.

Pour une utilisation analytique, il est préférable d'avoir une relation linéaire entre la densité et le volume cumulé correspondant :

$$\rho = \rho_1 + \frac{V}{V_2} (\rho_2 - \rho_1)$$

où :

ρ_1 est la densité minimale

ρ_2 la densité maximale

V_2 le volume final

V le volume cumulé correspondant à la densité

On a :

$$\frac{d\rho}{dV} = \frac{\rho_2 - \rho_1}{V_2}$$

qui est un gradient constant.

Il existe deux méthodes pour créer de tels gradients.

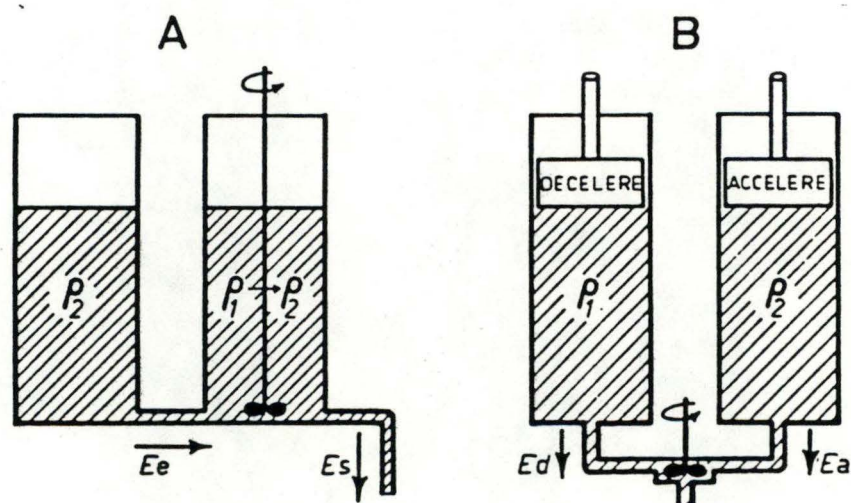


Fig. 1 — Principes des machines servant à la préparation des gradients de densité.

d'après (Beaufays H., 1966)

Dans le système A, l'appareil est composé d'un réservoir et d'une chambre de mélange. Le gradient créé à la sortie, sera constant si $E_e = E_s/2$. Pour cela il existe des appareils à trois canaux au débit identique : un entre le réservoir et la chambre de

mélange et deux qui évacuent cette chambre à mélange . Malheureusement cet appareillage se prête mal à la préparation de petits volumes , chose nécessaire dans le cas de centrifugation fractionnée .

Le système B comprend deux réservoirs, chacun rempli d'un liquide de densité différente, et d'une chambre à mélange très petite . Les débits de liquide de densité et vers la chambre de mélange décélèrent et accélèrent respectivement . Pour obtenir un gradient constant, le débit total doit être maintenu constant alors que l'accélération et la décélération doivent être uniformes .

Ces deux principes sont le plus couramment utilisés pour la construction de machines à gradients . La construction de telles appareillages comportent des problèmes techniques dont je ne parlerai pas ici mais qui sont en partie repris par H.Beaufays (1966).

4° LES CENTRIFUGEUSES

A. Les rotors à godets basculants

C'est ce système de centrifugation qui fut utilisé par C.de Duve et son équipe pour séparer les trois sous-fractions de la fraction mitochondriale : mitochondries, lysosomes et peroxysomes . Malheureusement, ce type de centrifugation comporte de nombreux défauts inhérents à l'appareillage . Le plus important de ces défauts est l'existence de courants de convection dont l'origine est soit la forme des tubes dont les parois ne sont pas parallèles au champ de force centrifuge qui détermine la trajectoire des particules - ce qui implique une plus grande concentration des particules près des faces latérales qu'au centre et la chute du liquide vers une zone plus dense - soit l'inertie du liquide lors du basculement des godets - cette inertie du liquide s'oppose à l'accélération ou la décélération et peut provoquer des tourbillons par des forces appelées forces de Coriolis - . De plus la longueur des tubes imposent de longues durées de centrifugation pour l'équilibration isopycnique . Enfin les différentes opérations de préparation de gradients, de démarrage, d'arrêt, de séparation des fractions sont complexes .

Ces différents inconvénients ont poussé Beaufays et Anderson - entre autres - , chacun de leur côté, à créer un nouveau type de rotor .

B. Centrifugation en cellule annulaire

Ce rotor, pour éviter les défauts cités ci-dessus, est constitué d'une cellule annulaire dont les parois latérales ne s'opposent en rien à la trajectoire des particules et qui peut être remplie et vidée pendant la rotation . La cellule du rotor de Beaufays ne comprend qu'une paroi radiale . La profondeur radiale est de 1 cm, la capacité de la cellule de 50 cm^3 , la vitesse de rotation dépasse 35000 tours/min . Le remplissage et la vidange se font à moins de 10000 tours/min à l'aide d'un dispositif amovible . Ceci se fait par un conduit unique qui, arrivant dans l'arbre du rotor puis faisant angle droit s'ouvre au niveau du rayon minimum de la cellule. Le remplissage et l'étalement en couche isopycnique sont favorisés par la force centrifuge : la vidange est possible en introduisant dans la cellule, lors de la décélération, une solution dense sous pression qui contrecarre la pression centrifuge du système . Cette vidange est contrôlée par un régulateur qui synchronise la récolte des différentes fractions . (Beaufays H., 1966)

5° AVANTAGES DE LA CENTRIFUGATION EN GRADIENT DE DENSITE

La centrifugation différentielle en gradient de densité est une méthode plus "fine" que la centrifugation en milieu homogène : se basant sur la même caractéristique, la vitesse de sédimentation, elle permet toutefois une meilleure séparation des particules .

Quant à la centrifugation isopycnique, son intérêt vient du fait qu'elle se base sur la densité des particules pour la séparation de celles-ci . De plus, le milieu de suspension influence la densité des particules, d'une manière propre à chacune d'elles, phénomène lié à leurs propriétés physico-chimiques, augmentant ainsi la différence de leur comportement lors de la centrifugation et une meilleure séparation des différentes populations .

Les centrifugations en gradient de densité peuvent être réalisées soit dans un rotor analytique, soit dans un rotor préparatif . Chacune de ces méthodes offre des possibilités différentes reprises dans le tableau ci-dessous .

TABLEAU I
Modalités de la centrifugation en gradient de densité

Rotor	Analytique	Préparatif	
Formation du gradient	Par le champ centrifuge	Par le champ centrifuge	Préétabli
Mode de séparation	Densité	Densité	Densité Vitesse de sédimentation
Distribution initiale de la préparation	Uniforme	Uniforme	Uniforme Couche mince
Analyses	Indice de réfraction Absorption de lumière (Autoradiographie)		Quelconques
Avantages	Haute précision Facilité		Variété des analyses Usage préparatif, ou analytique

La technique appliquée au rotor analytique permet d'obtenir des conditions de sédimentation presque idéales mais le gradient doit se former au cours de la centrifugation et cela prend plusieurs heures . La centrifugation zonale y est impossible, la préparation devant être incorporée au milieu . Enfin, les seules méthodes d'analyse sont les méthodes optiques et, à la rigueur, autoradiographiques .

Par contre, le rotor préparatif évite ces inconvénients : gradients préétablis qui peuvent être quelconques, disposition zonale de la préparation et surtout multitudes d'analyses physico-chimiques .

L'ANALYSE DES DIFFERENTES FRACTIONS

Au début le principal outil d'analyse des différentes fractions était le microscope . Le fractionnement (préparatif) était dès lors une approche morphologique et cytologique de la cellule . A l'époque, les résultats obtenus étaient plus que douteux en raison du pouvoir de résolution des instruments disponibles alors : comment discriminer des particules proches du pouvoir de résolution du microscope ?

Avec Albert Claude, l'analyse chimique des fractions a pris le pas sur cette analyse morphologique . Il fut en effet constaté que certaines enzymes étaient largement concentrées dans une fraction spécifique . A l'aide de deux postulats, créés par C. de Duve, l'analyse biochimique allait devenir un outil très fiable et pratique : le postulat de localisation simple et celui d'homogénéité biochimique , dont j'ai déjà parlé .

Grâce à ces hypothèses de travail, il suffit de trouver une enzyme marqueur pour chaque population de particules pour repérer ces dernières . C'est cette méthode qui a permis de déceler les lysosomes et les peroxysomes, au sein des fractions mitochondriales et microsomiales : ces deux populations de particules portent des enzymes spécifiques, dont respectivement la phosphatase acide et l'urate oxydase .

Ces deux postulats ne sont toutefois pas entièrement vrais : pour celui de la simple localisation, un contrexemple est celui des enzymes synthétisées par les ribosomes attachés au réticulum endoplasmique qui vont migrer jusqu'à la membrane plasmique, en passant par différentes vésicules ; ou encore le contrexemple d'enzymes présentes dans différents organites sous différents isoenzymes . Quant au postulat de l'homogénéité biochimique il n'est pas vérifié quand il s'agit d'enzymes membranaires dont la quantité présente varie avec la taille de la particule . Malgré ces quelques contrexemples, ces deux hypothèses furent un outil de travail extraordinairement performant .

Le principe de l'analyse chimique est d'ajouter aux fractions le substrat de l'enzyme considérée, de laisser réagir pendant un certain temps et de mesurer la quantité de produit final (ou secondaire) au spectrophotomètre - le plus souvent - . Cette quantité de produit est proportionnelle à la concentration d'enzymes dans certaines conditions .

Des méthodes utilisant des substrats libérant un produit fluorescent (exemple : dérivés de 4-méthyl umbelliférol) permettent des mesures plus sensibles et nécessitent donc une moins grande quantité de la fraction par la réaction . Ces méthodes sont très intéressantes du fait que le fractionnement du tissu a permis d'ouvrir la cellule à toutes les analyses chimiques et biochimiques connues . Le plus gros problème pour ces analyses est d'ordre purement technique puisqu'il réside dans le fait que la quantité de matériel préparé est souvent petite et ne suffit pas aux différentes analyses que l'on peut faire : les analyses utilisant des méthodes sensibles de détection comme la fluorométrie, l'utilisation de marqueurs radioactifs se sont développées pour répondre à ce besoin .(de Duve C., 1963), (de Duve C., 1965), et (de Duve C., 1971)

LES QUATRES FRACTIONS (de Duve C., 1971)

Depuis les premiers fractionnements réalisés par Albert Claude, de nombreux renseignements ont été apportés sur la composition précise des quatre fractions du schéma classique qui à l'époque de Claude se résumait, à peu de chose près, à noyaux, réticulum endoplasmique, mitochondries et surnageant cytoplasmique .

1° LA FRACTION NUCLEAIRE

Cette fraction renferme principalement deux composants : les noyaux et les membranes cytoplasmiques, mais aussi quelques mitochondries et d'autres composants cytoplasmiques .

Il existe une série de méthode pour isoler les noyaux : celle de Behrens (1932) utilisant des solvants hydrophobes, la méthode du sucrose - calcium de Hogeboom, Schneider et Striebich (1952), celle de Chauveau (1956) qui permet grâce à une solution dense en sucrose, d'empêcher raisonnablement la contamination des composants cytoplasmiques et la méthode la plus employée maintenant utilisant des solvants aqueux . Le principal problème est la diffusion des enzymes nucléaires à travers les enveloppes du noyau .

L'étude des membranes cytoplasmiques, isolées par centrifugation fractionnée, a montré leur grande richesse en protéines, sphingomyéline et cholestérol .

2° LA FRACTION MITOCHONDRIALE

Elle est composée des mitochondries, des lysosomes et des peroxysomes . Albert Claude pensa d'abord à des granules de sécrétion puis à un mélange de tels granules et de mitochondries . Par après Hogeboom (1948) les identifia comme étant des mitochondries et enfin, par après, on reconnut leur rôle dans les oxydations . Pour obtenir des fractions pures il faut recourir à la centrifugation en gradient de densité .

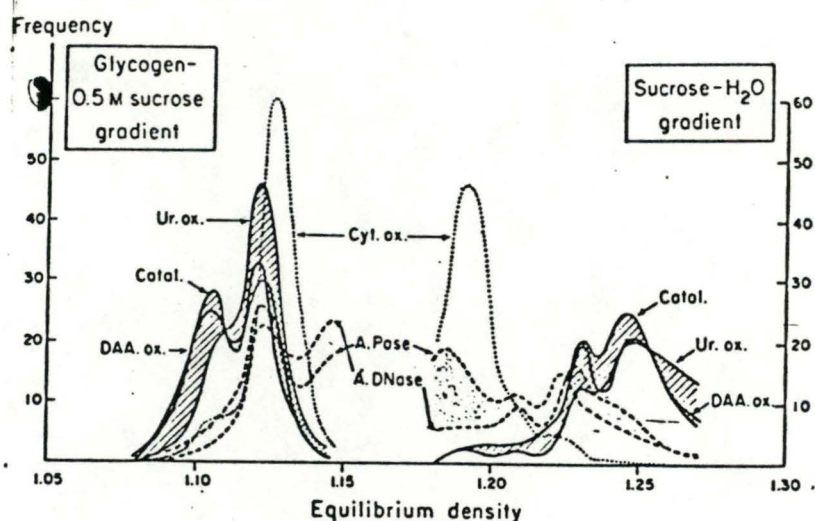
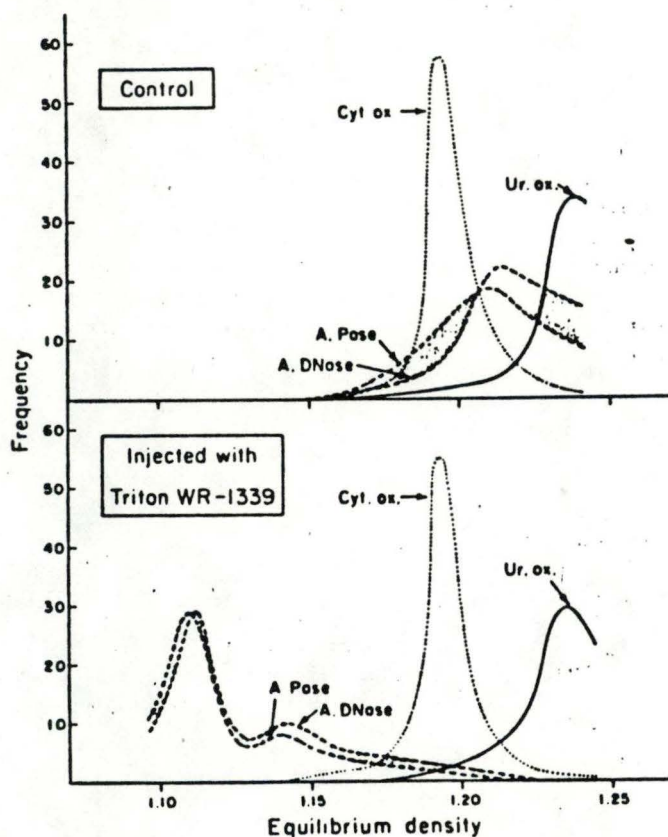


FIG. 4. Frequency distribution of equilibrium densities. Mitochondrial fractions from rat liver equilibrated in a gradient of glycogen (initially linear from 0 to 30.6 g. per 100 g. water) in 0.5 M sucrose, and in a linear gradient of sucrose (from 59.7 to 117.0 g. per 100 g. water). Results of Beaufay *et al.* (1964).

d'après (de Duve C., 1971)

On peut même, après choc osmotique, isoler la membrane externe du reste de la mitochondrie et étudier ainsi la répartition des enzymes dans la mitochondrie . Beaucoup d'intérêt fut aussi accordé au DNA et ribosomes mitochondriaux .

La purification des lysosomes est compliquée étant donnée leur grande variabilité de taille et de forme . Les plus beaux résultats furent obtenus par Tappel (1968, 1968 et 1969) . R.Wattiaux (1956) a étudié l'effet du Triton sur la densité des lysosomes, ce qui fut utilisé par Trouet (1964) pour les isoler . Les désavantages d'une telle méthode est qu'elle introduit des produits extérieurs dans les lysosomes qui peuvent altérer ses propriétés . La séparation de la membrane lysosomiale , après l'avoir déchirée et libérée de son contenu, a permis de localiser quelques enzymes sur celle-ci .



Par contre l'isolation des peroxysomes est plus aisée et peut atteindre 95 % grâce à l'élimination des lysosomes au Triton WR-1339. La séparation du corps cristallide de la fraction soluble a également été réalisée.

Exceptés quelques particules microsomiales et débris de membrane, seuls ces trois organites sont présents dans cette fraction.

3° LA FRACTION MICROSOMIALE

Le réticulum endoplasmique constitue le principal composant de cette fraction : ceci était déjà soupçonné par Claude (1947) et a été vérifié par Palade et Siekevitz (1956). Des méthodes furent mises au point pour isoler le réticulum endoplasmique et ensuite séparer le "lisse" du "rugueux". A Louvain la séparation fut faite sur gradient de densité en 15 sousfractions. L'analyse biochimique fut faite pour huit molécules différentes.

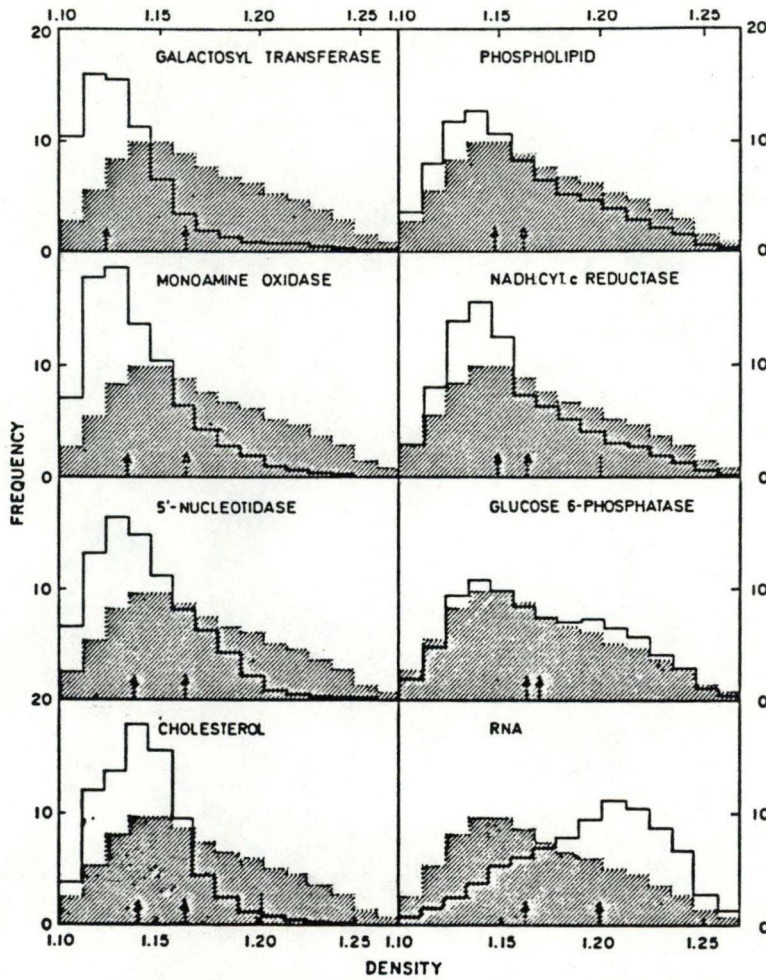


FIGURE 11 Subfractionation of microsomal fraction by isopycnic centrifugation through sucrose gradient containing 3 mM imidazole, pH 7.4. Centrifugation for 3 hr at 35,000 rpm in Beaufay rotor. Graphs show density distributions of cholesterol, phospholipids, RNA, and marker enzymes for different cytological components of microsomal fraction. Shaded area repeated on each graph is density distribution of protein. Arrows show median densities. Results of Amar-Costesec et al. (4) and unpublished results of M. Wibo.

d'après (de Duve C., 1971)

La première constatation fut que le RNA (provenant des ribosomes des RER) recouvre en grande partie la distribution des protéines, ce qui implique une mauvaise séparation entre REL et RER . De plus l'augmentation de ribosomes des fractions de plus forte densité ne correspond pas à une augmentation des vésicules rugueuses mais bien à une augmentation des ribosomes sur les vésicules en portant . Dès lors on peut déduire qu'il n'y a pas de différence nette entre RER et REL mais une continuité dans l'augmentation du nombre de ribosomes sur les vésicules.

Pour les enzymes, il n'y a guère de différence entre RER et REL . Par contre, le rapport phospholipide/protéine diminue lorsque la densité augmente et on constate qu'il y a tout un groupe d'enzymes qui suit les phospholipides (dinucléotide:cytochrome

réductase, nicotinamide adenine dinucléotide phosphate, cytochrome c réductase, cytochrome b5, cytochrome P450, aminopyrine déméthylase), alors qu'un autre groupe suit les protéines (glucose-6-phosphatase, nucléoside diphosphatase, estérase, glucoronyl transférase).

.La moitié des membranes plasmique appartient à la fraction nucléaire et l'autre moitié à celle-ci . Les enzymes marqueurs de la membrane plasmique se retrouvent dans les fractions à plus haute densité et sédimentent plus vite que les enzymes du réticulum endoplasmique .

Un autre constituant de la fraction microsomiale est l'appareil de Golgi . Une enzyme spécifique de cet organe est la N-acétylglucosamine : galactosyl transférase .

Nous avons vu que l'on peut dissocier la mitochondrie de sa membrane externe que l'on retrouve dans cette fraction-ci ; il en est de même pour les ribosomes et particules de glycogène sans oublier les petites mitochondries, lysosomes et peroxysomes .

4° LA FRACTION SOLUBLE

Enfin ici on retrouve des éléments des éléments des autres fractions qui n'ont pas sédimenté ainsi que le liquide cytoplasmique comprenant des ribosomes et des macromolécules .

CENTRIFUGATION FRACTIONNEE : APPLICATIONS

La centrifugation fractionnée fut une révolution en biologie cellulaire . Elle n'aurait même permis "que" de découvrir, isoler et caractériser les lysosomes et peroxysomes - les conséquences d'une telle découverte sont si extraordinaires - qu'elle a fait progresser d'un grand pas la compréhension de la cellule vivante .

Mais comme je l'ai déjà souligné auparavant, elle a ouvert un domaine tout à fait inexploré aux biologistes (voir les quelques exemples donnés au paragraphe précédent) . Que ce soit en l'utilisant de manière préparative - ce qui a permis l'isolation, la visualisation et la caractérisation physico-chimique de nombreux constituants cellulaires - ou de manière analytique, cette technique a été largement exploitée dans l'étude de la cellule :

en immunologie où elle a contribué à la caractérisation immunologique des membranes microsomiales et plasmiques (Beaufays et Berthet , 1969) ou encore à la compréhension biochimique du tissu lymphoïde (Bill et Bowers , 1967)

en microbiologie , par l'étude des différents types de lysosomes dans le protozoaire *Tetrahymena pyriformis* par Muller (1968) . De même qu'en mettant en évidence un nouveau type de granules cytoplasmiques chez le protozoaire *Trichomonas* Capable de convertir pyruvate en acétate, dioxyde de carbone et hydrogène : les hydrogénosomes .(de Duve C. 1975)

Une autre application, réalisée par le laboratoire de C. de Duve, est la caractérisation physico-chimique des particules subcellulaires, basés sur un modèle mathématique de celles-ci. Cet exemple a été développé par C. de Duve (1965) et par H. Beaufay (1966) .

C'est quelques petits exemples ne sont qu'un petit échantillon des différentes découvertes qu'a permises cette technique et ne font que s'ajouter à la découverte des lysosomes, qui a été largement développé, et à la répartition intracellulaire de nombreux enzymes .

LES TECHNIQUES EN LABORATOIRE

Pour terminer ce chapitre sur la technique, je voudrais parler du type d'organisation du laboratoire qui est décisif quant à l'efficacité avec laquelle sont réalisées les expériences et est utilisée la technique; et parler aussi de l'utilisation même de la technique, depuis le principe reçu d'Albert Claude jusqu'au travail de laboratoire concret qui occupait C. de Duve .

Christian de Duve a travaillé beaucoup avec des étudiants en médecine, qui à partir de leur candidatures désiraient faire de la recherche en laboratoire . Du fait du manque d'expérience et de connaissance, ces jeunes chercheurs étaient pratiquement incapables de mener à bien toute une recherche et de prendre des initiatives . Dès lors C. de Duve a passé de longs moments au laboratoire à manipuler avec ces étudiants . Mais la jeunesse et l'inexpérience de ceux-ci n'était pas la principale raison de sa présence fréquente dans les laboratoires . Pour lui un Professeur doit être capable, autant que ses assistants, de se servir du matériel de recherche . "Ce n'est qu'en connaissant les limites et les possibilités de l'appareillage utilisé qu'une interprétation des résultats et donc l'acceptation ou la réfutation d'une hypothèse sont possibles ."

Il semble ainsi indispensable - du point de vue de C. de Duve du moins - que le Professeur ne décroche pas de la recherche "pratique", du laboratoire pour devenir un chef de recherche presque exclusivement théorique, se détachant plus ou moins des problèmes techniques de la manipulation . Cette vue rejoint la seconde :

Comment applique-t-on pratiquement une méthode et une technique dont on connaît le fonctionnement général et le principe de ce fonctionnement ? Une chose m'a frappé en parcourant les publications du laboratoire, c'est le mode opératoire explicité en première partie, dans le *Biochemical Journal* . Cela m'a frappé par les nombreux détails techniques : l'utilisation de telle solution plutôt qu'une autre pour l'homogénéisation d'un tel organe ; la centrifugation à telle vitesse pendant autant de temps ... J'ai cité dans la première partie quelques modes opératoires, de manière assez exhaustive - chose qui peut paraître inutile dans l'ensemble du travail - , pour montrer le "pas" qu'il y a entre le principe général d'une technique et son application concrète au laboratoire .

pour franchir ce "pas", il n'y a pas de 'recette' universelle : c'est un mélange de logique et d'empirisme qui aboutit à un mode opératoire adéquat et qui est dicté par une bonne connaissance du matériel et de la technique utilisés .

Il y a un siècle, le chercheur était un biologiste pur qui pour mener sa recherche devait pouvoir manier des pipettes, un microscope ... et ça se limite à peu près là .

Maintenant, des techniques très sophistiquées font partie intégrante de la recherche - en biochimie du moins - et impliquent une autre notion du chercheur .

La recherche théorique sur papier n'est rien sans de bonnes mains pour réaliser l'expérience . Ceci était déjà vrai il y a un siècle mais ce qui est nouveau c'est d'abord la complexité du matériel à utiliser ; ensuite un biologiste doit pouvoir devenir un physicien (comme l'a fait H.Beaufays) pour répondre aux exigences de la technique à utiliser .

L'évolution de la biologie ces dernières 40 années est en ce sens paradoxale qu'elle exige une hyperspécialisation dans un domaine (les connaissances étant de plus en plus étendue) et, à la fois, des compétences (tout à fait extérieures au domaine strict de la biologie) de technicien, voire ingénieur, capable de comprendre et de contrôler la technique .

LES LYSOSOMES DANS L'HISTOIRE DE LA BIOLOGIE

Bien que Christian de Duve fut le premier à isoler et définir clairement les lysosomes, c'est longtemps avant lui que ceux-ci furent observés pour la première fois . De nombreux scientifiques s'étaient déjà penchés sur le problème des vacuoles digestives et de la digestion cellulaire, en créant un tas de théories et de nouveaux mots pour tenter d'expliquer et de décrire ce mécanisme vital complexe, qui n'a trouvé d'explication valable que depuis quelques années .

HISTORIQUE

C'est vers 1830 que Ehrenberg aperçut dans le cytoplasme d'organismes microscopiques, qu'il allait appeler "infusoires polygastriques", des "estomacs", vésicules qui avaient ingéré les colorants qu'il avait mis dans le milieu . Mais Ehrenberg, disposant de faibles moyens techniques, laissa parler son imagination et crut voir tout un minuscule système digestif de type mammifère dans ces infusoires .

Plus tard, Von Prowasek en 1898, en étudiant les Paramécies, distingua des vacuoles digestives et des granulations colorables qu'il appela "Fermentkörnchen" (paquets d'enzymes) dont il pensa qu'ils étaient déversés dans les vacuoles digestives ; et il pensait bien puisque ce phénomène fut observé en 1905 par Nireinstein . Les mêmes observations furent faites par Volkonsky qui appela "progastrioles" les vacuoles digestives libres qui deviennent, lors du déversement des enzymes en elles, "gastroles" .

C'est Metchnikoff le premier qui reconnut la digestion intracellulaire, pareille à celle des Protozoaires, chez les organismes pluricellulaires, en étudiant le planaire *Geodermus bilineatus* . Plus tard, s'intéressant à l'embryologie des organismes primitifs, il parla d'un stade intermédiaire entre blastula et gastrula qu'il appela "phagocytella", caractérisé par l'activité de cellules amiboïdes . C'est lui qui introduisit la notion de phagocytose, en parlant de la digestion intracellulaire des animaux primitifs . Enfin, en

observant une larve d'étoile de mer où des cellules se déplaçaient, il eut l'idée géniale que pareilles cellules étaient impliquées dans les mécanismes de défense de l'organisme . Il piqua une larve avec une aiguille et vit un tas de cellules amiboïdes se presser vers l'endroit de la blessure . Metchnikoff venait de découvrir l'inflammation, réaction contre l'invasion de corps étrangers . Mais cette théorie fut contestée par Kosh notamment qui avait observé la capture de microbes par les leucocytes mais qui voyait en ceux-ci non pas comme Metchnikoff des ennemis du corps étranger mais bien des protecteurs permettant leur prolifération . Ce n'est que bien plus tard que Kosh admit son erreur .

Metchnikoff continua son étude sur la phagocytose et s'efforça de déterminer les différentes cellules y étant impliquées : les microphages, contenant des enzymes appelées microcytases, les macrophages contenant les macrocytase et les leucocytes . Il s'intéressa également au rôle physiologique de la phagocytose dans la régression tissulaire et était convaincu qu'il s'agissait bien de digestion intracellulaire et que les "cytases" - les enzymes digestives - n'étaient libérées dans le milieu que quand les cellules étaient souffrantes ; il appela ce phénomène "phagolysis" .

Disciple de Darwin, Metchnikoff voyait dans ces cellules phagocytaires les descendantes directes des protozoaires douées de digestion intracellulaire . Et contrairement à Krunkenberg, qui croyait que la digestion intracellulaire était une propriété typique du protoplasme vivant, complètement différente de la digestion extracellulaire chimique, Metchnikoff reconnut ces deux phénomènes comme similaires .

Il essaya même d'isoler les cytases, chose qui fut réalisée plus tard par Mesnil (les actino-diastrases) et par Mouton (les amibo-diastrases) .

Les granulations des leucocytes posèrent de gros problèmes : Metchnikoff n'a jamais observé la dégranulation et pensait qu'il s'agissait de résidus de la digestion . Ehrlich pensa, lui, que c'était des produits du métabolisme des leucocytes qui étaient déversés dans le milieu extérieur, se basant sur les travaux de Kanthack et Hardy qui avaient décrit la décharge des leucocytes lors du contact avec des bacilles . Mais personne n'eut l'idée d'une sécrétion intracellulaire . Il fallut d'ailleurs attendre 1962 pour que Hirsch explique

correctement le déversement des agents bactéricides et enzymes lytiques dans les vacuoles intracellulaires .

La possibilité d'incorporer et de rejeter des colorants pour une cellule était un outil pour reconnaître les cellules phagocytaires dans l'organisme . Ehrlich fut d'ailleurs un pionnier de la technique des colorants vitaux et célèbre pour son "rouge neutre", un des colorants les plus usités . Cette technique permit à Aschoff de développer son concept de système réticulo-endothélial . Mais pour lui, le fait de pouvoir phagocyter n'était pas un critère d'appartenance à ce système . "Il n'y a pas une cellule fixe dans un organisme animal incapable, dans certaines circonstances, de digérer d'autres cellules, des corps étrangers ou des parasites . La fréquence et la densité de la phagocytose sont les facteurs décisifs (d'appartenance à ce système)". Aschoff fut donc le premier qui pensa que les lysosomes (qu'il ne connaissait bien sûr pas sous ce nom) était une caractéristique, un organe de toute cellule vivante . ?

La technique des colorants vitaux prit de plus en plus d'importance et fut utilisée pour déterminer les différents types de cellules phagocytaires .

Plus tard deux systèmes furent distingués dans la plupart des cellules : le chondriome, correspondant aux mitochondries, et le vacuome designant l'appareil vacuolaire .

Un autre terme fut encore employé par Gérard et Cordier en 1934 pour désigner la résorption et le stockage de colorants dans les tubes contournés du rein : arthrocytosis . (de Duve C., 1969), (de Duve C., 1980)

LE CONCEPT DE LYSOSOME

La découverte des lysosomes allait permettre de mieux comprendre tout ce système vésiculaire de la cellule, observé depuis plus d'un siècle, et de construire un modèle cohérent de ce qui fut appelé "vacuome".

Pourtant ce n'allait pas être si simple que ça : en effet le lysosome est un concept biochimique : il représente une particule formée d'une membrane semi-perméable de composition lipoprotéinique et remplie d'enzymes hydrolytiques dont l'activité optimale se situe à un pH proche de 5.

Mais ce concept biochimique peut couvrir plusieurs entités morphologiques distinctes ; de plus il ne représente pas une entité physiologique propre . Ce même problème se présente pour le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les microsomes . Seuls les mitochondries et les polysomes correspondent à une vraie entité fonctionnelle .

Le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les microsomes et les lysosomes font partie d'un réseau de saccules et de vésicules ayant des rapports entre eux : pour décrire ce complexe, de Duve et Wattiaux (1966) réintroduisirent le terme "vacuome" qui rassemble ces différents organites cellulaires . Avant de parler plus précisément des lysosomes, je vais décrire ce système vésiculaire et y situer les lysosomes .

Le vacuome représente donc l'ensemble des "membrane-bounded spaces" de la cellule à l'exception des mitochondries . Il existe un canal de passage entre les différentes vésicules qui peut se défaire et se refaire continuellement . Ce canal est le résultat de fusions entre membranes de deux vésicules et il va jusqu'à l'extérieur de la cellule via la membrane plasmique . Du matériel peut donc circuler dans ce système, depuis le réticulum endoplasmique jusqu'à l'extérieur de la cellule . Le vacuome est le siège d'importantes transformations biochimiques, que ce soit d'anabolisme ou de catabolisme .

L'anabolisme comprend la synthèse de macromolécules à sécréter à partir des ribosomes attachés au réticulum endoplasmique rugueux puis transférés au réticulum lisse puis au Golgi pour terminer dans des grains de sécrétion . La formation des lysosomes primaires est du même type .

Le catabolisme implique la digestion lysosomiale dont je parlerai plus loin .

Dans ce système, il semble y avoir une barrière car si des molécules peuvent à partir du RER quitter la cellule, le contraire n'est pas vrai . Cette propriété divise le vacuome en deux espaces : un espace endoplasmique correspondant au réticulum endoplasmique et un espace exoplasmique ; la barrière entre les deux étant infranchissable dans le sens extérieur-intérieur .

La partie du vacuome qui nous intéresse est l'espace exoplasmique, lequel comprend les lysosomes . L'espace exoplasmique a trois fonctions principales .

La première est le stockage de produits soit synthétisés dans la cellule, soit endocytés . Les produits endogènes sont stockés dans les grains de zymogènes, les lysosomes primaires et d'autres grains de sécrétion .

La seconde fonction est la sécrétion de ces granules . Quand il s'agit de matériel endocyté qui retourne d'où il venait on parle de "régurgitation" ; si il passe dans un autre espace que celui d'où il provenait, il y a "diacytosis". Il est à noter que la sécrétion de lysosomes primaires est rare : cas des spermatozoïdes lors de la fécondation ou des ostéoclastes : c'est la "lyocytosis".

Enfin la troisième fonction est l'interaction qu'il existe entre les différentes vésicules . Ce phénomène explique la digestion . (de Duve C., 1969)

LA DIGESTION INTRACELLULAIRE

On distingue deux types de digestion intracellulaire : une où le matériel hydrolysé est d'origine extérieur à la cellule, l'hétérophagie, l'autre où il est d'origine intracellulaire, l'autophagie.

De plus, on classifie les lysosomes en plusieurs groupes : les lysosomes primaires, les prélysosomes, les lysosomes secondaires et les postlysosomes .

Les lysosomes primaires

Ce sont les plus petits lysosomes (20 à 50 nm de diamètre) qui contiennent des enzymes hydrolysants mais aucun substrat . Ils proviennent d'un bourgeonnement de l'appareil de Golgi, du côté "trans" . Les vésicules ainsi formées sont coiffées de clathrine qui va s'en dissocier pour former le lysosome primaire .

L'origine de ces enzymes est le réticulum endoplasmique rugueux sur lequel ils sont synthétisés par les ribosomes, et passent dans la lumière avant de migrer vers l'appareil de Golgi .

Les prélysosomes

On appelle prélysosomes les corps ne contenant que les substrats et qui vont fusionner avec les lysosomes primaires . Dans le cas d'hétérophagie on les nomme hétérophagosomes (ou endosomes) et ils proviennent d'une phagocytose ou pinocytose de la membrane plasmique . Ils sont donc entourés d'une simple membrane .

Lors d'autophagie, les structures à détruire entrent directement dans le lysosomes par bourgeonnement de la membrane lysosomiale vers l'intérieur ou sont entourées préalablement par une membrane de l'appareil de Golgi (autophagosomes.) avant que la vésicule ainsi formée ne fusionne avec un lysosome (autolysosomes ,voir plus loin).

Les lysosomes secondaires .

Il s'agit de lysosomes résultants de la fusion de lysosomes primaires et de prélysosomes . On distingue deux types de lysosomes secondaires : les hétérolysosomes lors d'hétérophagie, et les autolysosomes lors d'autophagie .

Lorsqu'un hétérolysosome est déjà formé, il peut encore fusionner avec un autre endosome, ou "autophager des constituants de la cellule . L'activité est en effet maintenue et de plus ce lysosome secondaire peut encore recevoir des enzymes "frais" par fusion avec un lysosome primaire . Les hétérophagosomes se distinguent aisément par la présence dans ceux-ci d'organites ou de membranes, leur donnant un aspect myéloïde .

Les postlysosomes .

Ces lysosomes sont plus communément appelés corps résiduels . Ce sont les lysosomes secondaires ayant fini leur digestion et contenant les résidus non-digestibles . La plupart des produits de digestion ont diffusé dans le cytoplasme et sont ainsi récupérés par la cellule pour son métabolisme .

Le rôle de la digestion intracellulaire

Chez les organismes unicellulaires, le rôle de la digestion intracellulaire est de nourrir la cellule . Mais chez les organismes pluricellulaires, ce n'est que rarement le cas .

Le rôle de l'hétérophagie est multiple : elle peut avoir une fonction nutritive (prise du fer ou du cholestérol qui sont portés par des protéines) , mais en général son rôle sert l'organisme entier plutôt que la cellule individuelle : défense immunitaire (macrophages et leucocytes) , régulation par destruction (des hormones qui viennent de transmettre leur message à la cellule) , turnover de constituants extracellulaires (ostéoclastes) , réabsorption (les protéines au niveau du tube rénal qui sont réabsorbées et digérées en

acides aminés), ou encore activité de synthèse (production de thyroxin à partir de thyroglobulin dans les lysosomes thyroïdien).

Lorsque la cellule manque de nourriture, elle peut pratiquer l'autophagie pour se nourrir . Mais cette fonction permet également le turnover de la cellule , ou encore la régulation des produits de sécrétion (crinophagie). (de Duve C., 1963), (Alberts B., 1983) et (de Duve C., 1984)

LES LYSOSOMES : UNE NOUVEAUTE EN BIOLOGIE

INTRODUCTION

La découverte du laboratoire du Professeur de Duve à Louvain n'était pas une fin en soi mais plutôt un moyen ; moyen de connaître les mécanismes vitaux de la cellule mais aussi d'un organisme entier . Alors que le concept de lysosome était établi, qu'il était décrit morphologiquement, chimiquement, et plus ou moins fonctionnellement, il allait attirer de nombreux chercheurs qui allaient se servir de cet outil pour comprendre certains phénomènes vitaux .

De par son rôle de biodégradeur, le lysosome était une grande nouveauté en biologie : alors que la plupart des recherches de biologie cellulaire était consacrée aux phénomènes de synthèse (structure de l'ADN, ADN ARN Protéines,...) à l'étude descriptive de la cellule ou au métabolisme, le lysosome semblait faire tâche noire dans ces processus créateurs de la vie : son rôle est de digérer les macromolécules, les composants cellulaires, la cellule parfois, bref de détruire . Pourtant ce rôle est aussi important que n'importe quelle autre fonction cellulaire . La compréhension de la biodégradation lysosomiale allait apporter des éléments fondamentaux en biologie cellulaire et surtout en pathologie .

Mais en plus, à côté de la découverte fondamentale, les recherches du Professeur de Duve allaient participer à la "Révolution Biologique", plus par la méthode de recherche que par la découverte .

LYSOSOME ET BIODEGRADATION

La découverte et l'étude du rôle des lysosomes permirent de progresser dans la compréhension de la digestion intracellulaire, de la phagocytose ou de la pinocytose. Mais en plus de ces progrès en biologie cellulaire, elles ont amené une nouvelle vision des processus vitaux. Alors que la biodégradation était plus considérée comme un phénomène que comme un processus, comme une imperfection que comme une qualité, maintenant on comprend mieux le rôle d'un tel processus qui est une véritable activité biologique et non une fragilité face à l'entropie.

"Imaginez, écrit C. de Duve dans une élogie à la biodégradation (de Duve.C, 1973), imaginez un instant ce qui se serait produit il y a quelques quatre milliards et demi d'années, au moment où débutèrent sur notre globe les synthèses protéiques, si les dégradations prébiotiques n'étaient apparues presque en même temps. C'est l'époque où, selon Urey, Miller, Fox et beaucoup d'autres, les radiations et décharges électriques faisaient naître d'une atmosphère riche en protomolécules organiques les premiers acides aminés, les premières purines et pyrimidines, les premiers sucres; où ces molécules se condensaient de diverses manières pour former notamment les premiers centres catalytiques et se fermaient les premières boucles de rétroaction.

Que serait-il advenu de toute cette frénésie de polymérisation qui agitait le monde si elle ne s'était doublée presque en même temps d'une fièvre lytique ? Si aux côtés des premières synthétases n'avaient pris naissance les premières hydrolases ? Certes pas la vie, une chape inerte où se seraient immobilisées progressivement les réserves de carbone de la planète. Non pas une biosphère mais une "plastosphère" comparable à celle que le génie humain commence à élaborer."

Et puis une fois les premiers prébiotiques formés, c'est bien par un processus de biodégradation de macromolécules ou d'autres organismes vivants que la cellule allait se nourrir, trouver ses constituants et l'énergie ; d'abord en excréant les hydrolases à l'extérieur, ensuite par hétérophagie, processus qui allait conduire à l'évolution des vacuoles digestives jusqu'aux lysosomes.

On voit que la biodégradation a été l'activité complémentaire et indispensable de la synthèse que ce soit au cours de la formation des premiers organismes ou pour leur procurer l'énergie, et les constituants nécessaires pour effectuer des travaux, grandir, se multiplier et ainsi évoluer .

Bien que la synthèse apparait comme un caractère beaucoup plus noble, la vie est une véritable balance entre synthèse et biodégradation . (d'après (de Duve C., 1973) et (de Duve C., 1980))

LYSOSOMES ET PATHOLOGIE

En 1949, lorsque, pour la première fois, le lysosome se manifesta dans le laboratoire de C. de Duve, celui-ci travaillait avec Géry Hers, Jacques Berthet et Lucie Dupret sur l'effet de l'insuline dans la synthèse du glycogène . A partir de cette date, de ce groupe seul G. Hers continua à temps plein la recherche sur le métabolisme du glycogène, les autres bifurquant sur la centrifugation fractionnée, tout en publiant encore fréquemment sur le rôle de l'insuline .

Quinze années plus tard, Géry Hers (1964) s'intéresse à une maladie due à l'accumulation de glycogène dans les cellules : la glycogénose. Plus spécialement il étudie la glycogénose de type II qu'il reconnaitra être une maladie lysosomiale . Ainsi les recherches des uns permettent d'expliquer celles des autres et ce dans le même laboratoire .

C'est en raison de cette curieuse coïncidence que j'ai choisi de parler de la glycogénose de type II comme exemple d'application du concept de lysosome pour la compréhension de phénomènes pathologiques .

Intermédiaire

0

La glyco-génose de type II

Cette maladie fut la première fois décrite par J.C. Pompe en 1932 qui observa chez une fillette décédée à sept mois, une surcharge de glycogène dans tous les tissus observés . Depuis lors, d'autres cas ont été observés mais ne faisant pas tous partie de ce type de glyco-génose . Dans ce chapitre, je ne parlerai que du cas de la maladie de Pompe laissant tomber les autres cas atypiques . Toutes les glyco-génoses sont dues à une déficience enzymatique dans le métabolisme du glycogène .

L'examen clinique d'un patient atteint de cette maladie met en évidence la bouche entrouverte, le teint pâle et des signes d'insuffisance cardio-respiratoire . On note également une cardiomégalie ainsi qu'une hépatomégalie toutefois discrète . Des signes d'atteintes du système nerveux central et sympathique peuvent apparaître : fausse déglutition, troubles digestifs . Un caractère marquant est l'hypotonie musculaire . Les altérations des muscles squelettiques, du muscle cardiaque et du système nerveux entraîne la mort au cours de la première année par insuffisance cardio-respiratoire . Contrairement aux autres glyco-génoses, l'enfant ne fait pas d'hypoglycémie . L'examen radiographique montre une hypertrophie du coeur . (de Barsy T., 1976)

Caractéristiques biochimiques de la glyco-génose de type II

La concentration de glycogène dans les tissus est bien supérieure à la normal . Dans le muscle, elle atteint $8.9 \% \pm 2.6$ du poids humide contre $0.9 \% \pm 0.6$ chez un individu normal . Dans le foie, elle est de $8.7 \% \pm 2.5$ alors que la normale est inférieure à 6% , dans le coeur $11.4 \% \pm 2.85$ contre 1% normalement . La structure du glycogène accumulé est normale .

Grâce à l'injection de maltose radioactif (^{14}C maltose) chez un homme, G. Hers a pu montrer que la glyco-génose de type II était caractérisée par un manque total de maltase acide (Fig. 1) (Hers H.G., 1964)

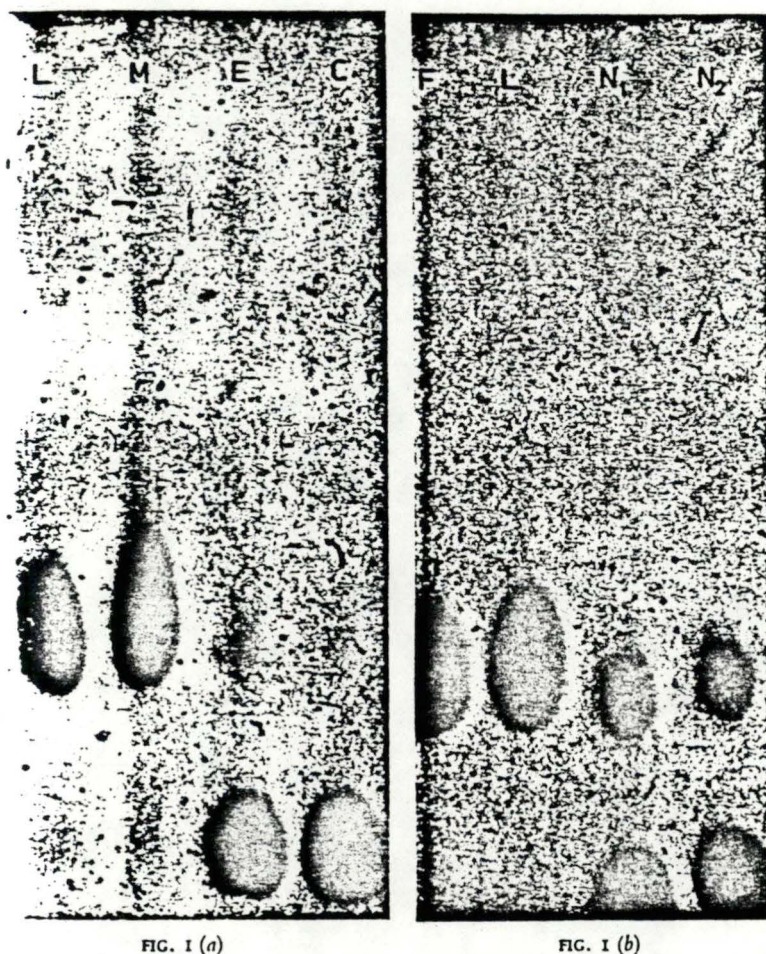


FIG. 1. Hydrolysis of maltose by human liver (a) and heart (b) homogenates. Tissue (5 mg.) was incubated for 4 hours at pH 4 and 37°C with [¹⁴C]maltose. The resulting mixture was analysed by paper chromatography: upper spot, [¹⁴C]maltose; lower spot, [¹⁴C]glucose. Cases L and F are typical type II glycogenosis; case M is a similar case but without cardiomegaly; cases E and C are other forms of glycogen disease; N₁ and N₂ are normal subjects (from Hers, 1961).

d'après (Hers H.G., 1964)

Cette maltase acide a pu être identifiée comme étant une α - glucosidase . En effet, cette exoglucosidase est capable d'hydrolyser un grand nombre de glucosides naturels, dont le glycogène et le maltose . Il s'agit d'une hydrolyse des liaisons α -1,4 glucosidiques . L'optimum de pH pour la réaction d'hydrolyse est de 4.0 . (Fig. 2)

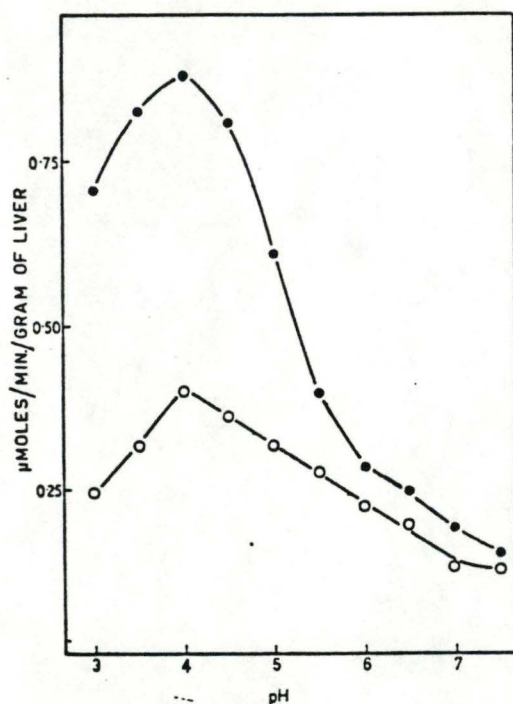


FIG. 2. Influence of pH on the hydrolysis of maltose and glycogen by human liver extract. The activity is expressed as μ mole of maltose hydrolysed or μ mole of glucose formed from glycogen. Substrates: ●, maltose; ○, glycogen (from Hers, 1963).

d'après (Hers H.G., 1964)

Outre son activité hydrolytique, l'enzyme transfère des groupes glucosyls provenant de maltose radioactif sur le glycogène .

En plus de cette α -glucosidase acide présente dans les lysosomes, l'étude de cette enzyme par la centrifugation fractionnée sur gradient de densité a révélé la présence dans les fractions microsomiale et soluble d'une α -glucosidase neutre, non déficiente chez les individus souffrants de glycogénose de type II .(Fig. 3) (Hers H.G., 1964) et (de Barsy, Th., 1976)

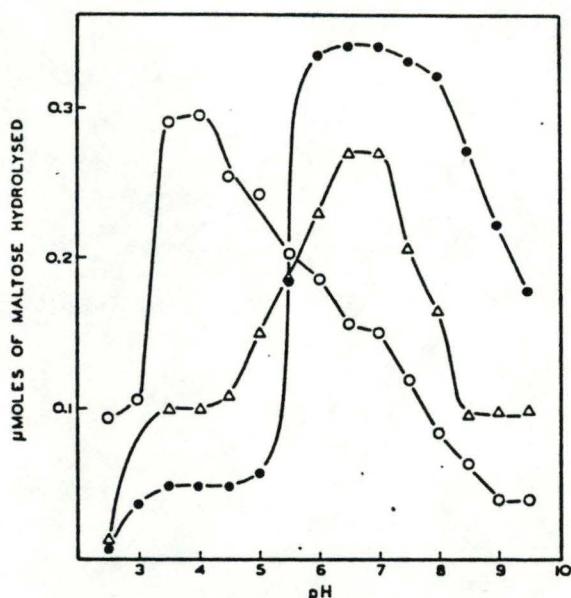


FIG. 4. pH dependence of maltose hydrolysis by rat-liver fractions. The activities are expressed as μ moles of maltose hydrolysed/min. by an amount of each fraction corresponding to 1 g. of fresh liver. \circ , Mitochondrial fraction; \bullet , microsomal fraction; Δ , soluble fraction (from Lejeune, Thinès-Sempoux and Hers, 1963).

d'après (Hers H.G., 1964)

Explication de la pathogénéité de la glycogénose de type II (de Barsy Th., 1976)

L'action hydrolytique de l' α -glucosidase acide n'intervient que partiellement dans le catabolisme du glycogène (fig. ci-dessous). La plus grande partie de ce catabolisme se faisant par voie phosphorolytique . Toutefois l' α -glucosidase acide joue un rôle essentiel en cas d'hypoglycémie . Pour l'illustrer, plusieurs expériences ont été réalisées et montrent que l'autophagie de glycogène se passe à des moments bien précis de la journée chez le rat normal (Pfeifer, 1970 et 1971), juste après la naissance de la souris (Jezequel, 1965) ou encore lorsqu'il y a insuffisance hormonale (diabète par exemple) (Orci, 1970).

La déficience en α -glucosidase acide entraîne l'accumulation de glycogène entré dans les lysosomes par autophagie ; seule l'autophagie est concernée car il n'y a pas de

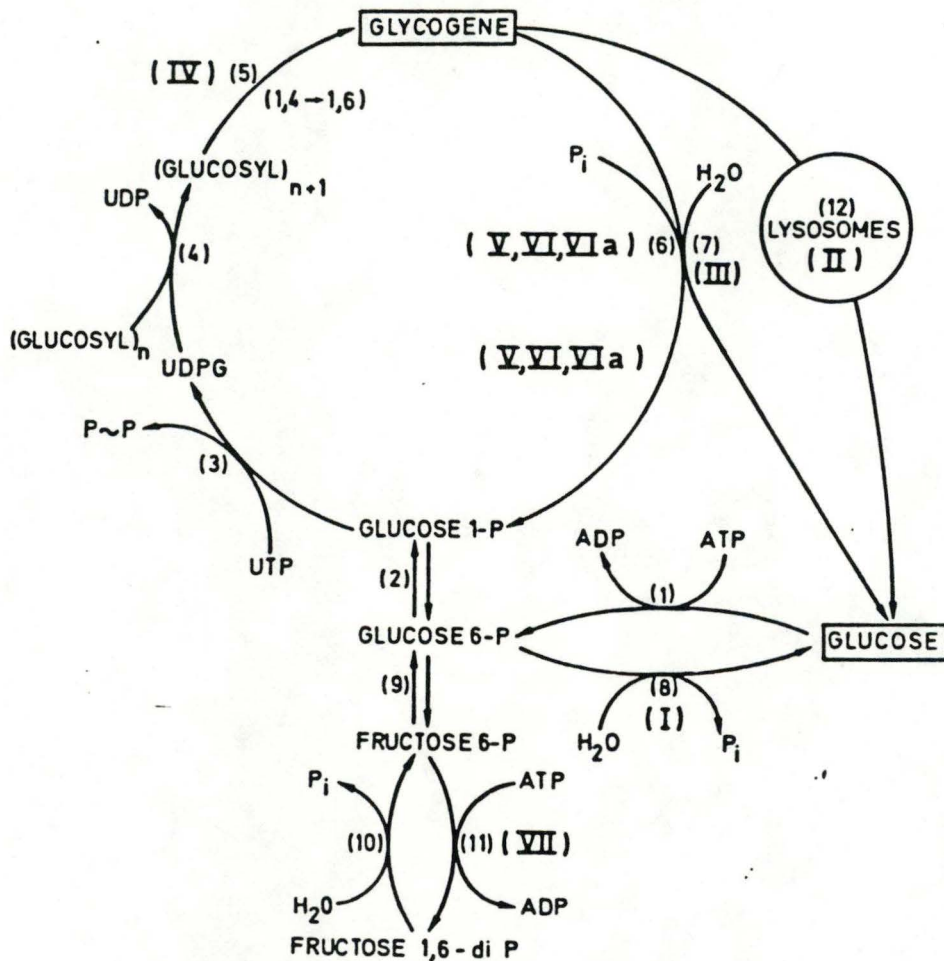


Schéma I : Représentation du métabolisme du glycogène. Les chiffres romains réfèrent au type de glycogénose et les chiffres arabes à l'enzyme responsable de la réaction. (1) glucokinase, (2) phosphoglucomutase (3) UDPG-pyrophosphorylase, (4) glycogène synthétase (5) enzyme ramifiant, (6) phosphorylase, (7) amylo-1,6-glucosidase, (8) glucose 6-phosphatase, (9) hexose-phosphate isomérise, (10) fructose-diphosphatase, (11) phosphofruktokinase, (12) α -glucosidase acide.

D'après (de Barsy, Th., 1976)

glycogène circulant dans le plasma sanguin . Il en résulte un gonflement des lysosomes qui va occasionner des perturbations des fonctions cellulaires et créer la maladie .

Cette glycogénose de type II est bien lysosomiale car Baudhuin, Hers et Loeb (1964) ont montré par des observations au microscope électronique de foie d'enfant atteint de la maladie la présence d'amas de glycogène entouré d'une membrane, cas unique à la glycogénose de type II ; les autres glycogénoses étant caractérisées par l'accumulation de glycogène libre dans le cytoplasme .

Etude expérimentale de la glycogénose de type II

On ne connaît pas d'espèces animales ayant la glycogénose de type II, si ce ne sont de rares cas . Dès lors il a fallu induire la maladie à des cultures de fibroblastes ou à des animaux . Pour ce qui est des cultures on y introduit soit du tréhalose qui inhibe l' α -glucosidase acide soit des anticorps spécifiques dirigés contre l'enzyme . Sur les animaux on a essayé l'injection intraveineuse de turanose, inhibiteur de l'enzyme (Lejeune et al., 1963) mais l'inhibition est insuffisante pour accumuler du glycogène dans les lysosomes . Dès lors, on a eu recours à l'utilisation d'anticorps spécifiques . Lorsque ceux-ci sont injectés tels quels, l'inhibition est insuffisante . Après traitement à la neuraminidase, la technique des anticorps n'a pas eu un meilleur rendement (le rôle de la neuraminidase est de démasquer une unité β -galactose aux anticorps ; les hépatocytes ayant des récepteurs pour ces protéines ainsi modifiées, l'endocytose est facilitée) . L'utilisation de vecteurs lipidiques (liposomes) a été également un échec . Bref, il faut s'en tenir aux cultures de fibroblastes .

Les expériences effectuées sur ces cultures modifiées sont positives : l' α -glucosidase isolée à partir de plasma sanguin peut être captée par les cellules et corriger la déficience enzymatique . On est donc en possession d'un outil thérapeutique . (de Barsy Th., 1976)

Thérapeutique chez l'homme

D'après les résultats obtenus sur les cultures de cellules, l'injection de l'enzyme déficiente pourrait apporter une solution à la maladie. Pour la maladie de Pompe, on utilise un extrait d'*Aspergillus niger* (Baudhuin, 1964). L'injection intraveineuse est suivie d'une absorption surtout au niveau du foie et très peu dans les régions les plus atteintes. L'infusion de plasma et de leucocytes, ayant pour but d'augmenter l'activité enzymatique dans le plasma et d'éliminer des produits en excès, marche dans certains cas mais est loin d'être efficace. Dans la maladie de Fabry (augmentation du taux de céramide trihexoside suite à un manque de α -glucosidase), caractérisée par une insuffisance rénale, une greffe de rein a donné de très bons résultats (Phillipart et al., 1972) : non seulement le rein fonctionne normalement mais certains symptômes sont atténués. L'explication donnée est soit la diffusion de l'enzyme déficiente à partir du nouveau rein dans tout l'organisme, soit la filtration du produit d'excès circulant par le rein.

Autres maladies lysosomiales

La pathologie où interviennent les lysosomes est tellement vaste - il suffit de s'en référer au nombre des publications faites sur ce sujet - que je vais me limiter ici à reprendre les différents mécanismes de pathologie cellulaire et d'en donner l'un ou l'autre exemple.

1/ Le premier mécanisme est une rupture lysosomiale qui entraîne une lésion cellulaire. Lorsqu'une telle rupture se produit, les hydrolases acides sont libérées dans la cellule et peuvent y provoquer de gros dégâts. La rupture lysosomiale correspond au déchirement ou la déstabilisation de la membrane. Ce déchirement peut être dû à des produits endocytés par la cellule. Allison (1969) a montré que des particules de silice ingérées par la cellule peuvent endommager la membrane lysosomiale et provoquer différentes pneumoconioses. Dans d'autres cas, il a pu être montré qu'il s'agit d'exotoxines bactériennes libérées lorsque celles-ci se trouvaient à l'intérieur du lysosome. De nombreux agents liposolubles agissent différemment : il s'incorporent dans la membrane lysosomiale et la déstabilisent ; ce sont certains stéroïdes, des vitamines et

d'autres composés médicamenteux . Un excès de vitamine A induit des altérations du cartilage pareilles à celles produites par un traitement à la papaïne (protéase végétale). D'autres expériences similaires, suggèrent la libération dans le cartilage d'une enzyme lysosomiale ayant le même effet que la papaïne . Cette libération serait due à une déstabilisation de la membrane lysosomiale .

Les conséquences de la libération des hydrolases acides dans la cellule sont soit la mort de celle-ci par digestion massive des constituants fonctionnels, soit des lésions non léthales . La cassure chromosomique par la DNase lysosomiale ou la dérégulation de certains gènes par des protéases pourraient être cause de transformation cellulaire et de cancer .

Le traitement à la cortisone empêche ou diminue l'effet déstabilisateur de la vitamine A, du tétrachlorure de carbone, de streptolysine ou des U.V. Ainsi la cortisone empêche les altérations cartilagineuses d'individus en état d'hypervitaminose A . La quantité de vitamine A requise "in vitro" est tellement grande qu'on peut mal imaginer que chaque lysosome, "in vivo", soit coiffé par ces stéroïdes . Le mécanisme pourrait être différent : la protection "in vitro" pourrait concerner des membranes statiques, alors qu' "in vivo", ce sont des membranes dynamiques dont la seule protection des endroits critiques est nécessaire.

2/ Lésions cellulaires par surcharge des lysosomes : ce cas recouvre les thésaurismoses congénitales dont Hers a élucidé le mécanisme (cfr. § précédent) .

Les bactéries de la lèpre et de la tuberculose résistent à l'attaque lysosomiale et s'accumulent dans les macrophages .

L'accumulation de résidus indigestes dans les lysosomes serait propre au vieillissement et jouerait un rôle dans la sénescence de ces cellules (ex. lipofuscine)

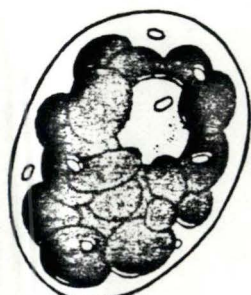
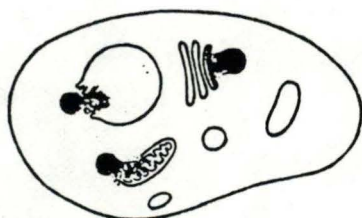
3/ Un troisième type d'affection est la lésion tissulaire par décharges d'enzymes lysosomiales dans le compartiment extracellulaire . Dans ce type d'affection, se retrouve l'altération du cartilage suite à une hypervitaminose A . Un tel phénomène, cette fois-ci normal, explique la résorption du tissu osseux lors de la croissance .

Dans les processus d'inflammation , des mécanismes semblables ont un rôle important à jouer .

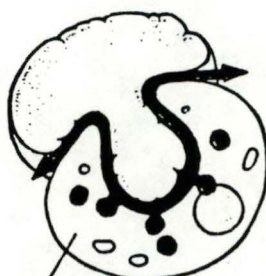
(de Duve C., 1970), (de Duve C., 1984)

Digestive pathology of cells: the three great lysosomal syndromes.

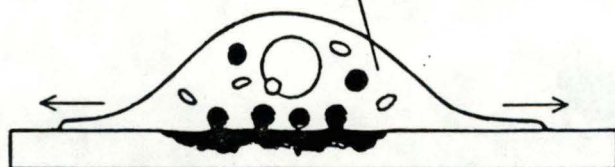
Intracellular discharge



Overloading



Extracellular discharge



LYSOSOME ET LA REVOLUTION BIOLOGIQUE

Après la seconde guerre mondiale, commença une période faste pour la biologie : découverte sur découverte, le monde de la cellule, en particulier, allait se dévoiler à une vitesse prodigieuse . C'est ce qui est appelé la "révolution biologique" .

Cette révolution n'est certes pas due à la naissance à la même époque d'un plus grand nombre de super-génies . Elle est due presque exclusivement au progrès technique qui eut lieu à ce moment . En effet après la seconde guerre mondiale, toute une série de techniques furent mises au point : les radioisotopes, les chromatographies, les électrophorèses, ... , et la centrifugation fractionnée .

Le laboratoire de Louvain participa à cette révolution biologique de par ses recherches : la découverte des lysosomes permit de comprendre un mécanisme étudié depuis plus d'un siècle : la digestion intracellulaire . Mais cette découverte est plutôt le résultat de la "révolution technique" . Et, à cette révolution " technique" qui est la base de la révolution "biologique", C. de Duve et ses collaborateurs y participèrent activement . Comme on l'a vu leur recherche fut l'une des premières grosses applications de la centrifugation fractionnée et permit de perfectionner cette technique, toute jeune à l'époque .

La création de l'ICP (Institut International de Pathologie Cellulaire et Moléculaire) en 1966 à Bruxelles, entre autres par de Duve, est le "fruit" de la révolution biologique : comme son nom l'indique, l'ICP étudie la pathologie au niveau cellulaire et moléculaire et réunit, pour ce faire, les techniques et sciences nées de cette révolution microbiologie, immunologie, virologie, biochimie .

How
e.g. model?

LA NAISSANCE D'UN CONCEPT

INTRODUCTION

l'originalité est
" esprit critique "

Quand on a lu la première partie de ce travail, " La découverte des lysosomes ", peut-être cette découverte paraît-elle évidente et le mérite des chercheurs petit . En effet les différentes expériences ne pouvaient aboutir qu'aux lysosomes : ils existaient, ils se sont "manifestés" lors des premières expériences, il ne restait plus qu'à continuer logiquement ces expériences dans ce sens : les isoler, les décrire, chercher leur rôle ... et le concept était créé .

Dans ce chapitre je vais tenter de montrer qu'il en est tout autrement, que la recherche scientifique est autre chose qu'une collection et une interprétation de résultats, qu'elle s'inscrit dans un contexte institutionnel et intellectuel ; que la création d'un concept est quelque chose de décidé par un homme (ou un ensemble d'hommes) et n'est dès lors pas "évidente" (qui s'impose à l'esprit avec une telle force qu'il n'est besoin d'autres preuves pour connaître la réalité) . Le concept n'est qu'une représentation de la réalité, représentation dont la création est fonction de contraintes institutionnelle, financière, technique, théorique ou encore culturelle .

Dans ce chapitre je vais d'abord expliquer une grille d'analyse de recherche qui a été construite par Whitley ; ensuite je reprendrai le fil de la recherche de de Duve en essayant d'appliquer cette grille d'analyse et de voir quelle contrainte a joué dans la recherche et quand .

Ensuite, je parlerai des problèmes qui entourent la création d'un concept et d'un modèle théorique . A partir de là, on pourra imaginer une approche du problème (les lysosomes) qui aurait pu amener un autre concept et un autre modèle de la réalité .

A. LA GRILLE D'ANALYSE DE WHITLEY (Knorr-Cetina, K.D., Krohn, R. et Whitley, R., 1980)

R.Whitley distingue deux contextes dans lesquels se situe l'investigation scientifique : le contexte institutionnel et le contexte intellectuel . Il préconise que les différents éléments des deux contextes soient utilisés comme grille de lecture : il s'agira de repérer les moments décisifs de la recherche où ces éléments interviennent et dans quelle mesure ils ont de l'importance .

1/ Le contexte intellectuel

R.Whitley reconnaît quatre composantes du contexte intellectuel: les postulats du domaine qui délimitent l'ensemble des phénomènes sur lesquels la recherche est orientée ; c'est l'arrière- fond général de la recherche .

Les procédures formatives caractérisent l'élaboration de questions précises donnant lieu, à partir de l'arrière-fond général, à la formulation d'une recherche ponctuelle spécifique .

Les techniques déterminent l'ensemble des procédures utilisées .

Enfin, les procédures interprétatives se réfèrent à la manière d'interpréter les résultats et à leur signification pour la suite de la recherche .

Whitley parle aussi du degré de formalisation de ces composantes - c'est-à-dire le degré de précision et de clarté avec lesquels ils sont définis - et de degré d'intégration qui traduit l'effet d'un des composants sur les autres . Plus les composants sont liés, s'impliquent mutuellement, plus le degré d'intégration est grand . L'auteur constate et pose l'hypothèse que, plus le degré de formalisation est élevé, plus le degré d'intégration l'est également .

2/ Le contexte institutionnel

"R.Whitley considère que l'institutionnalisation des normes et procédures intellectuelles s'effectue essentiellement sous la forme d'engagement intellectuel dans un champ donné de recherche et l'acquisition de compétences dans ce domaine . Le développement et la reproduction de ces engagements intellectuels sont le résultat de trois types différents d'institutions : "le système d'éducation et de formation scientifique, la structure des occasions d'emploi et de carrière, le système de publication et de reconnaissance."" (B.Feltz, 1986)

Le rôle du "système d'éducation et de formation" est clair : pour entreprendre une recherche , il faut avoir les compétences dans le domaine de cette recherche ; ainsi ces compétences, qui sont fonctions du type de formation reçue, vont déterminer le domaine et le mode de recherche . "La structure des occasions d'emploi et de carrière" va influencer la recherche dans la mesure où le chercheur oriente sa recherche en fonction du financement et des occasions d'emploi disponibles . Enfin, "le système de publication et de reconnaissance", de par sa procédure de sélection des articles par le "referee system", "oriente l'attention des scientifiques sur des matières et approches particulières et structure ainsi les formes de la recherche scientifique ".(Feltz, B. 1986)

B. ANALYSE DE LA RECHERCHE

B1 AYANT 1949.

Le contexte institutionnel

Une des composantes du contexte institutionnel de la grille de Whitley - la structure des offres d'emploi et de carrières - englobe le problème du financement de la recherche .

Or il existe dans toute recherche scientifique une contrainte financière : il faut de l'argent pour subsidier une recherche et cet argent il faut le trouver, soit à l'intérieur de l'organisme où la recherche se fait (l'université dans ce cas), soit à l'extérieur : que ce soient des firmes privées (exemple : Lilly Research Laboratories), des organismes nationaux (ex. : FNRS) ou internationaux (ex. : Rockefeller Foundation), c'est dans pareilles institutions qu'il faut aller chercher l'argent . Le projet de recherche, la technique utilisée, le personnel employé et le déroulement de la recherche sont des facteurs dépendants de ces contraintes financières .

Au laboratoire de Chimie Physiologique de Louvain, une partie des subsides - une somme dérisoire - provenait de l'Université de Louvain et une autre, plus importante, d'une firme pharmaceutique américaine : Lilly Research Laboratories .

Un des premiers travaux de C. de Duve fut de comparer l'insuline produite par "Lilly" à de l'insuline suédoise . La conclusion fut que l'insuline "Lilly" n'était pas pure et contenait du glucagon . Ces recherches furent - semble-t-il - appréciées par la firme américaine qui décida de verser chaque année (pendant 10 ans) la somme de 5000 dollars et ce, sans aucune condition . Ceci signifie qu'aucun projet de recherche ne devait être fourni à Lilly pour obtenir cet argent . Ce fut évidemment un gros avantage pour le Professeur de Duve qui de ce fait gérait cette somme à son gré et orientait la recherche comme il le désirait .

Le contexte institutionnel de Whitley, du moins dans sa composante de structure d'emploi, joue ici le rôle minimum qu'il puisse jouer : seule la somme d'argent peut influencer la recherche ; elle l'influence en limitant financièrement le personnel (C. de

Duve était aidé dans son laboratoire par des étudiants en médecine qui ne lui coûtaient rien) et les moyens techniques . Mais cette somme est livrée d'office, la démarche d'acquisition est inexistante .

Ainsi, il y a très peu de lien entre contexte institutionnel et intellectuel de par cette situation .

Ce facteur minimum jouera un rôle capital dans la suite .

N.B. Un mécénat pur - comme le faisait Lilly pour Louvain - est devenu quelque chose de très rare sinon d'inexistant, du moins en Europe . L'influence des structures des occasions d'emplois et de carrières est dès lors d'un autre ordre et devient très importante . Pour l'illustrer, j'ai choisi de parler d'un cas plus actuel.

Au laboratoire de Biochimie Cellulaire des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix à Namur, il faut distinguer le coût du personnel du coût de fonctionnement .

Sur 17 personnes y travaillant, 5 sont payées par l'université, 12 par des organismes extérieurs : I.R.S.I.A., F.N.R.S., Politique Scientifique, S.P.P.S. et enfin des firmes pharmaceutiques . Soit des concours sont organisés ou des projets sont à remettre qui permettent de "sélectionner" les chercheurs qui seront subsidiés .

Pour ce qui est du fonctionnement, il faut compter qu'un tiers à une moitié du budget est fourni par l'université, et un demi à deux tiers par les firmes pharmaceutiques et la Politique Scientifique . Par fonctionnement, on entend le coût du matériel technique, des produits utilisés et du matériel d'expérimentation (culture de cellules, animalerie)

Il est clair qu'ici le degré de liberté pour le choix de recherche et la procédure de recherche est infiniment plus petit . José Remacle, qui dirige ce laboratoire, doit concilier recherche fondamentale et recherche appliquée, exigée par les firmes pharmaceutiques et le S.P.P.S., dans une proportion de moitié-moitié.

Ce domaine du contexte institutionnel va influencer fortement le choix et l'organisation de recherche, non seulement à cause de la somme d'argent disponible, mais par décision des institutions qui finance la recherche et accepte ou non le projet et le déroulement du travail .

Dans un tel laboratoire, le chercheur est également plus dépendant du "système de publication et de reconnaissance" qui intervient à deux niveaux différents: d'abord au

niveau de l'institution qui finance qui exige des projets de recherche (sous forme de publication avec sélection par le "referee system") ainsi que des publications des résultats qui, par le même "referee system", seront "jugés" valables ou non et seront déterminants pour la suite du financement ; ensuite au niveau de la reconnaissance et de la divulgation des résultats dans le "monde des sciences" (publication dans une revue scientifique) où le même système de sélection joue .

Cette situation implique une politique de travail qui permet, dans le même laboratoire, d'entreprendre une recherche fondamentale avec une recherche appliquée . Pour J. Remacle, c'est le choix du "domaine de recherche" qui est important pour concilier ces deux types de recherche : il faut essayer de choisir un domaine de recherche fondamental qui a un avenir appliqué potentiel ; ainsi, si certaines applications apparaissent au cours d'une recherche fondamentale, le laboratoire pourra se baser sur celles-ci pour le financement ultérieur.

Ici, en se référant à Whitley, on dira qu'il y a un haut degré d'intégration entre contexte institutionnel et, à la fois, postulats du domaine et techniques .

Le contexte intellectuel

Le postulat du domaine est très peu formalisé : à cette époque, on ne connaît rien ou presque rien du fonctionnement de l'insuline sur la synthèse du glycogène . De la cellule on en connaissait la structure générale (la plupart des organites, le noyau centralisant l'information) sans toutefois en connaître beaucoup de son fonctionnement .

B2 LE CHANGEMENT DE DOMAINE EN 1949

En décembre 1949, le groupe de Louvain va se tourner vers un tout autre centre d'intérêt : la localisation intracellulaire d'enzymes par la centrifugation fractionnée . Au départ il étudie la glucose-6-phosphatase, qui est impliquée dans la synthèse du glycogène : celle-ci ne peut plus être resolubilisée après précipitation à pH acide . Cette curieuse propriété rappelle à C. de Duve deux articles d'Albert Claude qui y décrivait l'agglutination de petits et de gros granules, empêchant ainsi leur solubilisation .

Ici, on peut parler d'opportunisme mentionné par Karin D. Knorr-Cetina. Celle-ci, pour expliciter ce qu'elle appelle "opportunisme", "évoque l'attitude des bricoleurs qui sont "attentifs aux opportunités matérielles qu'ils rencontrent à un endroit donné et les exploitent pour réaliser leurs projets." Cet opportunisme porte tant sur le choix du matériel que sur les idées de recherche ..." (Feltz B., 1986) L'opportunisme se réfère à un phénomène aléatoire uniquement : "j'ai besoin de matériel d'expérimentation ; un chercheur du laboratoire emploie le matériel A et il a mis la technique d'utilisation au point ; je suis "opportun" et j'emploie ce matériel A, sans que celui-ci convienne nécessairement mieux que le matériel B."

Or dans le cas qui nous occupe ici, il y a plus que de l'opportunisme : il y a analogie entre les propriétés qu'Albert Claude décrit et celles que C. de Duve observe . On peut parler de rapprochement opportuniste entre ses expériences et les articles de Claude .

A partir de ce rapprochement opportuniste, de Duve va émettre une hypothèse : "la glucose-6-phosphatase est liée à des granules semblables à ceux décrits par A. Claude" . Et la suite est l'ensemble des expériences qui vont permettre d'évaluer cette hypothèse (voir plus loin).

Puis ils poursuivent avec d'autres enzymes, qui eux - et de Duve le savait - ne jouaient aucun rôle dans cette synthèse . Et c'est le comportement inhabituel d'un de ces ferments qui va entraîner les chercheurs dans ce nouveau domaine .

Le contexte institutionnel

Comme je l'ai déjà mentionné plus haut, la "structure des offres d'emploi et de carrière" intervient peu au laboratoire de Louvain: si des raisons poussent le Professeur de Duve à changer d'orientation de recherche, il ne doit pas se "justifier" à la Lilly Research Laboratories . C'est bien le cas ici : C. de Duve va opter pour la centrifugation fractionnée sans qu'il n'y ait d'influence financière venant d'une institution . Seule la technique le pousse à ce changement .

La première composante citée par Whitley du contexte institutionnel - le système d'éducation - va influencer le choix de la méthode de travail et de la technique . C. de Duve a une formation d'enzymologiste ; il va donc continuer d'utiliser les enzymes comme base de son travail mais en introduisant une nouvelle technique qui est la centrifugation fractionnée .

Précisons que ce changement de programme est beaucoup plus difficile dans les conditions d'un laboratoire fonctionnant comme celui de Biochimie Cellulaire à Namur, où plus de la moitié du financement est fait par des institutions exigeant des projets précis ainsi que des résultats concluants.

Le contexte intellectuel

Pour déterminer la localisation cellulaire, il n'existe pas des tas de moyens différents : la centrifugation fractionnée et la cytochimie sont les deux techniques de pointe de l'époque pour ce domaine de recherche.

La technique n'est pas très formalisée ("jeune" technique) et bien intégrée aux postulats du domaine (la localisation intracellulaire d'enzymes) et aux procédures formatives (Glucose-6-phosphatase).

La technique joue un rôle décisif dans ce changement de domaine : c'est elle qui attire C. de Duve à prolonger la localisation intracellulaire d'enzymes par celle-ci plus loin que le domaine du glycogène.

Ainsi la recherche a été assez fortement influencée par le contexte intellectuel de l'époque.

L'arrière-fond théorique n'était pas très important : Claude avait défini quatre catégories d'organites cellulaires, sans que ceux-ci soient clairement définis. Ceci est en relation avec la connaissance générale de la cellule, dont la structure générale n'est pas encore clairement établie (j'entends par structure générale l'ensemble des organites et les rapports qu'il peut exister entre eux). La mise en évidence d'enzymes dans les différentes fractions était au point pour quelques enzymes. C'est plus ou moins avec ces seuls éléments théoriques que C. de Duve a commencé ses recherches. Les postulats du domaine étaient donc peu formalisés.

Malgré ces diverses influences, le choix du changement est assez hautement contextuel : c'est par curiosité - comme il le dit lui-même - que C. de Duve a décidé de localiser l'enzyme qu'il venait de déterminer (la glucose-6-phosphatase) et s'il a poursuivi dans ce domaine, c'est parce que, dit-il :

Kom x!

?

"...une enzyme (la phosphatase acide) qui se cache ainsi c'est tellement passionnant que j'ai mis "au frigo" l'insuline ..."

C'est peut-être par curiosité que C. de Duve a changé de domaine, mais il est clair que cette curiosité a été "allumée" par la technique nouvelle . La phosphatase acide qui se cache, c'est passionnant, mais c'est la technique qui a permis de mettre en évidence ce phénomène .

La composante "technique" du contexte intellectuel est décisive dans ce tournant de la recherche .

B3 LE DEVELOPPEMENT DE LA RECHERCHE

Les expériences "pour voir", C. de Duve il n'y croit pas .

"La première étape d'une recherche scientifique, c'est de se mettre à son bureau et de faire le plan des expériences à faire pour mettre en évidence ce que l'on cherche . Il faut émettre des hypothèses ."

Dès lors ses travaux seront une suite d'hypothèses et d'évaluation de celles-ci .

La formulation des hypothèses

La première hypothèse faite par le laboratoire de Louvain fut que la glucose-6-phosphatase est liée à des granules cytoplasmiques . Dans la suite de la recherche toute une série d'hypothèses du même type concernant d'autres enzymes seront faites .

D'après Yatonabé (1969), qui a développé la logique de l'induction dans "Deduction and induction" , l'activité scientifique peut-être comparée à un mouvement hélicoïdal : la première moitié d'un tour de spire représente l'inférence inductive, où, partant de propositions expérimentales particulières, on arrive à une proposition théorique générale ou hypothèse ; l'autre moitié représente une inférence déductive qui, partant de l'hypothèse mène à une proposition expérimentale particulière . La représentation hélicoïdale est préférée à l'image du cercle pour rendre compte du décalage temporel .

"La règle générale est la plupart du temps extraite de faits expérimentaux passés et appliquée à un cas futur, non encore testé, dans le but de prédire les résultats expérimentaux qui seront obtenus." (Feltz B., 1986)

Pour Watanabé, il y a deux processus dans l'inférence inductive : l'abduction, qui est la création ou production de nouvelles hypothèses d'après des faits expérimentaux, et l'induction ou évaluation des hypothèses .

L'étude de l'abduction est, d'après Watanabé, impossible : certains pensent à une "conception mystique" de celle-ci, réservée à certains génies, pour d'autres des critères purement esthétiques en sont à la base . Bref, une analyse logique de ce processus n'est pas possible .

Dans le cas présent, la création de l'hypothèse est faite en rapport à des expériences déjà décrites avant (les articles d'Albert Claude)

L'évaluation des hypothèses

Dans l'induction, il y a deux types d'évaluation :

"Une hypothèse, seule ou en conjonction avec un fait connu, donne lieu par déduction à une prédiction (proposition expérentielle) sur le résultat d'une expérience bien définie . Le résultat de cette expérience fournit la base pour une évaluation "évidentielle". Toutes autres considérations en dehors de, ou antérieures à, ces données expérentielles directes obtenues dans de telles expériences, sont appelées "extra-évidentielles" ." (Feltz B., 1986)

Il y a cinq types de facteurs extra-évidentiels :

1/ la présence d'hypothèses compétitives . Le choix d'une hypothèse par rapport à d'autres influence l'évaluation qu'on en fait, qui ne dépend plus dès lors ~~(que)~~ de l'expérience. *seule!*

2/ le fait d'introduire une hypothèse dans une théorie implique qu'elle doit respecter la cohérence de la théorie et influence la valeur qu'on lui donne .

3/ "la préférence pour certains prédicats est manifeste . Il est universellement reconnu qu'une hypothèse utilisant des prédicats plus simples est préférée"

4/ La valeur accordée à une hypothèse dépend de facteurs circonstanciels telle, par exemple, la notoriété de la personne défendant cette hypothèse .

5/ les expériences parallèles influencent également l'évaluation des hypothèses .

Quand ces différents facteurs sont précisés, Watanabé commence l'évaluation même de l'hypothèse qui se base sur la confirmation ou non de celle-ci par une ou plusieurs expériences . Elle est dite confirmée quand le fait prédit par l'hypothèse a bien lieu . Une telle procédure d'analyse d'évaluation des hypothèses est appelée "règle de Nicod". ← *Levontun!*

Mais la confirmation d'une hypothèse n'implique pas qu'elle est vraie . On parlera alors de "confirmabilité" ou "degré de confirmation" qui traduit le fait que plus d'expériences confirment l'hypothèse plus il est vraisemblable que celle-ci soit vraie . A partir de là, des fonctions exprimant le degré de confirmation sont créées : (H, B) mesurant le degré de confirmation évidentielle, dépendant uniquement de H (l'ensemble des hypothèses) et de B (les évidences), et $q(H_1)$ qui exprime l'évaluation globale de l'hypothèse, appelé "crédibilité", fonction de H, B, X (les facteurs extra-évidentiels) et A (les conditions auxiliaires qui interviennent dans le déroulement et l'interprétation de l'expérience). La quantité $q(H_1)$ doit satisfaire les postulats de probabilités . On envisage un ensemble d'hypothèses (H_1, H_2, H_3, \dots) portant sur le même phénomène . La crédibilité $q(H_1)$ est une probabilité de l'hypothèse H_1 et doit dépendre des évidences B .

Pour la première hypothèse (concernant la localisation de la glucose-6-phosphatase), l'analyse d'évaluation peut être ceci :

Les hypothèses:

H_1 la glucose-6-phosphatase est liée à des granules cytoplasmiques

H_2 la glucose-6-phosphatase n'est pas liée à des granules cytoplasmiques

les propositions expérientielles:

e₁ la glucose-6-phosphatase se retrouve après centrifugation dans une fraction "granulaire"

e₂ la glucose-6-phosphatase se retrouve après centrifugation dans la fraction soluble

Ici, on peut accorder un haut degré de confirmation à H₁ : e₁ a été confirmée dans une grande mesure.

Pour ce qui est de la crédibilité, les éléments dont je disposais ne m'ont pas permis de l'évaluer : comme seuls facteurs évidentiels, je peux citer des expériences parallèles qui ont été effectuées sur d'autres organes, dans des conditions différentes ou encore: l'introduction de l'hypothèse dans un ensemble d'hypothèses - une théorie - y respecte la cohérence de celle-ci: les organites (granules cytoplasmiques) comprennent un appareil enzymatique.

L'intérêt d'un modèle d'évaluation des hypothèses comme celui-ci est de se rendre compte des mécanismes qui justifient une évaluation positive ou négative : évaluation "évidentielle" et "extra-évidentielle".

La position de de Duve sur la validation d'une hypothèse est claire :

"Il ne faut pas faire des expériences pour montrer que notre hypothèse est vraie, car, dans ce cas-là, on fausse les données, on met tous les atouts de son côté . Ce qu'il faut, c'est essayer de montrer qu'elle est fausse et tant qu'on y aura pas réussi, on peut l'accepter ."

Cette "philosophie de l'expérimentation" sera le mot d'ordre de C. de Duve dans toute sa recherche et lui permettra d'éviter des erreurs d'appréciation de ces hypothèses.

de Duve

B4 LES DEUX POSTULATS DE TRAVAIL

Les expériences suivantes s'intéressaient à la localisation intracellulaire de quelques enzymes, avec le même schéma d'évaluation d'hypothèse que pour la glucose-6-phosphatase . Il est à noter que depuis le changement de domaine, le contexte était pratiquement invariant : même influence du contexte intellectuel et institutionnel .

A la suite de ces quelques expériences l'équipe du Professeur de Duve allait tirer une série de conclusions : la première concernait la localisation des enzymes étudiées ; la seconde, la légitimation de la technique, qui n'était pas parfaite . (cfr. 1^o partie) Enfin la troisième conclusion mena à l'élaboration de deux hypothèses, fondamentales dans le fait qu'elles ont modifié le contexte intellectuel dans sa composante des "procédures interprétatives" . En effet ces deux hypothèses furent décisives dans la manière d'interpréter les résultats et la signification qu'elles eurent dans la suite de la recherche . Je crois qu'ici nous touchons un point absolument crucial de toute la recherche .(cfr. 1^o partie pg.25 : la différence d'interprétation avec Novikoff)

Evaluation

C. de Duve acceptera ces hypothèses comme valables et basera la suite de ses interprétations sur celles-ci . Pourtant, comme évaluation "évidentielle" il y a seulement les résultats de localisation de quelques enzymes .

L'évaluation de l'hypothèse "localisation simple" est un bel exemple du rôle d'une hypothèse comme postulat de travail . En formulant celui-ci, C. de Duve s'attendait à des exceptions," mais l'avantage de prendre la localisation simple comme hypothèse de travail est que nous pouvons accepter la localisation multiple seulement quand nous sommes forcés par une évidence expérimentale . Le contraire ne peut être vrai ." (de Duve C., 1965)

Si on s'en réfère à Popper, des observations discordantes avec des hypothèses sont cruciales et falsifient celles-ci . Par contre, Barbour (1974), qui réagit à cette position dans l' "Evaluation des théories", pense que, pour importantes qu'elles soient, les observations discordantes n'ont pas le rôle décisif que leur accorde Popper . Cette position

est celle prise par C. de Duve, qui malgré les exceptions attendues, n'a pas rejeté ce postulat . (les exceptions ont été citées dans "Analyse des différentes fractions" du chapitre "technique")

Le statut de l'hypothèse est ici mis en cause : elle ne doit pas être vraie dans l'absolu ; elle doit être acceptable dans le domaine étudié et permettre la progression de la théorie , quitte à reconnaître par après des exceptions à celle-ci .

B5 ETUDE DE LA PHOSPHATASE ACIDE

La "procédure interprétative" des résultats est ici importante .

Lorsqu'ils ont reconnu une anomalie (l'inactivité de l'enzyme dans les jeunes préparations), une interprétation trop hâtive aurait pu être que la manipulation avait été mal faite . Mais ici on retrouve la position nette de C. de Duve sur l'évaluation d'une hypothèse : "il faut essayer de montrer qu'on a tort".

Sa première hypothèse dans le cas de la phosphatase acide, -elle n'est pas citée explicitement mais on peut le supposer - était que son activité allait apparaître de la même manière que pour les autres enzymes . N'étant pas le cas, il conserve les fractions au frigo pour recommencer les dosages d'enzymes plus tard . Ceux-ci refaits et en accord avec sa "supposée" première hypothèse, en essayant de valider celle-ci, de Duve aurait probablement rejeter les premiers résultats comme dus à des erreurs de manipulation . Ce ne fut pas le cas grâce à sa conception d'évaluation des hypothèses : "ne jamais mettre tous les atouts de son côté et essayer de montrer qu'on a tort". Or ici, si ma supposition de choix d'hypothèse est juste, il avait tort .

Cette expérience et son interprétation des résultats montre l'importance de la procédure interprétative .

Ensuite pour expliquer la localisation double de l'enzyme (microsomes et mitochondries), trois hypothèses sont envisagées ; on remarque l'effet de l'évaluation "extra-évidentielle" des expériences parallèles : celles de Chantrenne reconnaissant un spectre de granules et non deux classes distinctes . C'est l'hypothèse rejoignant celle de Chantrenne qui sera retenue .

Une fois cette hypothèse retenue (celle des granules se situant à cheval sur les microsomes et les mitochondries), les chercheurs étudièrent le système enzyme-granule, étude qui allait les mener à la création du modèle et du concept de lysosome.

C. MODELISATION

D'après Jean-François Malherbe (1985), la démarche scientifique est caractérisée par l'interaction entre les opérations théoriques et les opérations expérimentales et est constituée par un va-et-vient entre ces deux opérations . Les hypothèses avancées par le savant suggèrent une ou des expériences pour les démentir ou les confirmer . La formulation des hypothèses doit être telle qu'elle permette d'imaginer des plans d'expériences pour évaluer celles-ci : la recherche ne doit pas être un ensemble d'expériences faites au hasard ; il est indispensable d'avoir une vue préalable du problème . Dans les expériences, l'essentiel n'est pas l'observation faite mais ce qui précède, c'est-à-dire les conditions dans lesquelles elle est faite, et ce qui suit ou l'interprétation des résultats : une observation n'a pas de sens si elle ne se rapporte pas à une question précise .

Le stade ultime de la recherche (d'une recherche donnée car nous verrons que la théorie induit une autre recherche), c'est la formulation d'une théorie, dont le rôle est de mettre de l'ordre dans les faits observés et interprétés . Mais le but d'une théorie est plus que cela : "C'est plutôt la carte d'un territoire partiellement exploré. Sa fonction est souvent heuristique c'est-à-dire qu'elle guide l'explorateur vers d'autres découvertes . Les théories sont donc remarquables en ce qu'elles (...) guident et stimulent une recherche intelligente." (?)

La théorie va donc servir non seulement à décrire ce qui a été observé mais à prédire, à découvrir de nouveaux faits, à aller plus loin dans la connaissance du domaine à explorer . C'est le guide la recherche future .

Le rapport entre théorie, modèle et réalité nous est expliqué par M. Bunge (1967) dans the "Scientific Research" :

"un ensemble d'hypothèses scientifiques est une théorie scientifique si et seulement si il réfère à une matière factuelle donnée sous-jacente et si chaque membre de l'ensemble est soit un énoncé initial (axiome, énoncé subsidiaire ou données) soit une conséquence logique d'un ou de plusieurs énoncés initiaux . (...) Les théories scientifiques portent sur des modèles idéaux qui sont supposés représenter, selon un mode plus ou moins

symbolique et avec une certaine approximation, certains aspects du système réel - jamais tous. (...) C'est pourquoi bien que les théories factuelles sont souvent appelées modèles, il est plus vrai de dire que les théories factuelles impliquent des modèles et que ces modèles plutôt que les théories elles-mêmes, sont supposés représenter les référents de la théorie. Une théorie comme un tout renvoie à un système ou plutôt à une classe de systèmes, et le modèle impliqué dans la théorie représente le système. "Les théories décrivent donc le fonctionnement du modèle qui représente le système." (Feltz, B., 1986)

Celui-ci représente le domaine dans lequel se vérifient les propositions de la théorie. Le modèle est une idéalisation de la réalité, ne retenant que quelques facteurs de la réalité pour expliciter ce qui a été observé. Ainsi un modèle doit répondre à une double exigence : représenter le mieux possible ce qui est ou ce qui se passe dans la réalité et être clair et pratique, ce qui implique une simplification de la réalité. La création d'un modèle engage, par ce fait, la personnalité de son créateur : c'est lui qui décide quels facteurs sont à impliqué(s) dans le modèle.

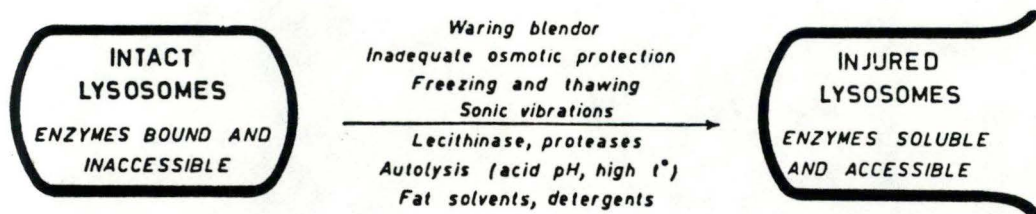
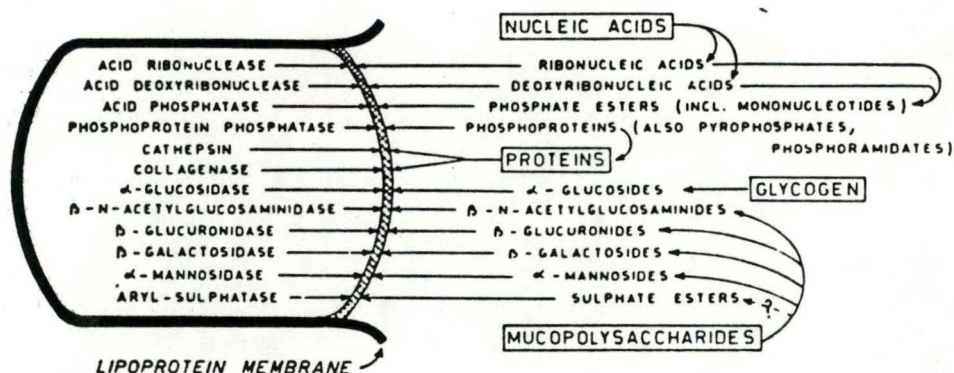
Dès lors un modèle n'est pas unique ou absolu : il dépend du modélisateur, des facteurs que celui-ci croit être décisifs, de l'approche qu'il a du problème, du but qu'il poursuit en créant son modèle, ... Prenons un simple exemple : un géographe veut faire une carte d'un pays. Cette carte sera un modèle de la géographie du pays. Le modèle sera déterminé en partie par la réalité, le pays : c'est le pôle objectif ; et en partie par le but poursuivi par le géographe : créer une carte pour les automobilistes ou pour des promeneurs ; ou encore par les facteurs qui lui paraissent importants : la nature du sol, la démographie, le relief, ... : c'est le pôle subjectif. Le géographe devra faire un compromis entre une bonne approche de la réalité et la facilité d'utilisation de sa carte.

N.B. La différence entre modèle et théorie est parfois assez problématique. Si l'on veut distinguer les deux dans le cas des lysosomes, on pourrait dire que la théorie est la somme de ces trois hypothèses :

- 1/ Des enzymes lytiques sont attachés à des granules cytoplasmiques
- 2/ ce complexe enzyme-granule a la propriété appelée "latence enzymatique"
- 3/ les granules se comportent comme des systèmes osmotiques

Et le modèle :

! b.99
#



d'après (de Duve, C., 1980)

Mais assurément, la différence est peu évidente.

Le modèle et le concept des lysosomes ont été créés à la suite d'expériences sur les propriétés du lien granule-phosphatase acide. Ces expériences montrèrent que les granules porteurs de l'enzyme se comportaient comme des systèmes osmotiques (cfr. 1^o partie).

A partir de ces données, C. de Duve a créé un modèle de ce nouveau granule : un sac entouré d'une membrane semi-perméable et rempli d'enzymes lytiques.

Le pôle objectif de ce modèle est l'ensemble des caractéristiques observées qui s'y retrouvent. Le pôle subjectif est double (du moins d'après les renseignements dont je disposais). (par subjectif il faut entendre le fait que le concept et le modèle ne découlent pas directement de ce qui est observé et de la réalité mais est quelque chose de construit ; et la construction implique l'intervention d'un personnage, qui est le scientifique)

La première composante de ce "pôle" est la simplicité. Ce modèle est le plus simple pour représenter un système osmotique tel que ces granules. La littérature philosophique reconnaît la simplicité comme un critère d'évaluation positive d'une théorie ou d'un

modèle . On constate que de Duve rejoint cette vue : ainsi si on tient compte de x facteurs de la réalité pour la construction de modèles, le plus simple de ceux-ci sera retenu .

La seconde composante de ce pôle est l'analogie . La plupart des systèmes osmotiques connus, dans le monde vivant en tout cas, se présente sous la forme décrite plus haut ; on peut penser que par association d'idée, de Duve ait immédiatement imaginé le lysosome sous cette forme : c'est le principe de métaphore dans l'innovation des théories, qui a été développé par Lichnerowicz (1977) qui implique dans la recherche scientifique la personnalité et la "culture" du modélisateur .

Il est essentiel de se rendre compte ici que les "évidences expérimentales" n'impliquaient absolument pas cette unique représentation du lysosome : le choix de celle-ci est en grande partie dû au pôle subjectif, c'est-à-dire au choix du modélisateur .

Ce modèle "collait" bien à la réalité biochimique des lysosomes ; plus tard, lorsqu'on le visualisa pour la première fois, il s'avéra qu'il "collait" également à la réalité morphologique .

Le lysosome n'est pas une entité fonctionnelle distincte : il fait partie d'un réseau de saccules et de vésicules avec lesquelles il est en perpétuelle interaction, formant des canaux entre eux : c'est un système dynamique . Avoir déterminé cet ensemble de membranes se modifiant continuellement par quelques noms désignant des vésicules, est un choix déterminé avant tout par le savant, guidé par un désir de simplicité, par un sens pratique bref par sa personnalité .

Le lysosome est venu s'insérer dans l'ancien concept de "vacuome" , avec le Golgi, le réticulum endoplasmique et les grains de sécrétion . Dans la cellule qui se dévoilait de plus en plus aux scientifiques, le concept (représentation mentale et abstraite d'un objet) de "vacuome" n'avait plus sa place : trop général et trop flou pour représenter quelque chose qui devenait de plus en plus précis dans la connaissance du savant, il a perdu son utilité et a été remplacé par des concepts plus précis et plus pratiques : car, comme on l'a vu, le but d'une théorie est de permettre de progresser dans l'étude d'un domaine : le côté pratique d'un concept est donc essentiel car il est un outil de travail pour la suite de cette étude .

La création d'un modèle et d'un concept est fortement déterminée par l'approche que le chercheur a eu du problème étudié . Imaginons qu'un cytologiste ait repéré sur des coupes des granules différents des grains des sécrétion, du Golgi et du réticulum . Il décide de les étudier et les répertorie suivant des critères morphologiques : taille et aspect du contenu par exemple . A la suite de ses recherches, il a déterminé trois types de granules : des petits au contenu homogène, des plus gros au contenu hétérogène et dense et des plus gros encore au contenu hétérogène mais plus diffus . On peut imaginer que ce chercheur ait, après avoir plus ou moins déterminé leur contenu et leur origine (les petits du Golgi, les moyens des vésicules d'endocytose et les gros probablement de la fusion des deux précédents), créé trois concepts qui sont maintenant rassemblés sous celui de lysosomes . C. de Duve avait choisi comme critère principal leurs propriétés biochimiques, ce cytologiste leur similitude morphologique et lieu d'origine (il est à noter que ce cas est peu probable vu la grande diversité morphologique des lysosomes)

Le "système digestif" de la cellule aurait pu nous apparaître sous une toute autre forme, si ce n'était pas le biochimiste C. de Duve, en 1955, qui avait découvert les lysosomes .



Ki

CONCLUSION

Le concept de lysosome - comme on peut se l'imaginer en lisant certains livres de biologie - n'est pas apparu du jour au lendemain, en 1949, à la suite d'une expérience révélant la latence enzymatique. Il est le fruit de six années de recherche ; mais bien plus encore, la création de ce concept est inscrite dans l'histoire de la biologie cellulaire : elle dépend des précédents de cette histoire et en influence la suite. Et elle se passe à une époque précise de cette histoire, époque dont le contexte général marquera celle-ci.

Depuis plus d'un siècle, la digestion intracellulaire, dans laquelle était impliqué le système vésiculaire de la cellule, intrigua bon nombre de scientifiques. Pour essayer de le décrire et de le comprendre, une multitude de termes et de concepts furent proposés : vacuoles digestives, gastriole, vacuome, ... Mais le processus de la digestion intracellulaire ne fut jamais clairement compris. Le concept de lysosome allait venir à la suite de tous ces concepts et permettre enfin de comprendre ce mécanisme de destruction.

Parallèlement à cette évolution "théorique" (de la digestion intracellulaire), se fit l'évolution d'une technique, dont le principe était vieux mais qui avait des applications pratiques en biologie depuis peu : la centrifugation fractionnée. Ces deux évolutions allaient se rejoindre au laboratoire de C. de Duve : la technique permettant la découverte des lysosomes, et ainsi de progresser dans la compréhension de la digestion intracellulaire, et cette recherche impliquant un développement de la technique.

La technique fut capitale dans cette recherche : non seulement elle était la base du travail mais c'est elle qui attira C. de Duve à s'intéresser à la localisation intracellulaire d'enzymes.

Une fois lancé dans ce domaine de recherche, le déroulement de celle-ci fut déterminé d'une part par le "contexte général", c'est-à-dire principalement le système institutionnel dans lequel le travail se faisait et le contexte intellectuel : l'"état" de la théorie cellulaire, qui formait l'arrière-fond théorique sur lequel les chercheurs se basaient, et les techniques d'étude.

D'autre part, la recherche, se sont des personnes qui l'entreprennent, qui l'orientent et en déterminent ainsi partiellement le résultat . Les procédures interprétatives des résultats et l'évaluation des hypothèses, l'organisation du travail en laboratoire, le perfectionnement des techniques, faire preuve d'opportunisme, ... sont autant de facteurs déterminant l'issue finale de la recherche et dépendant des personnes qui la réalisent .

Mais bien plus encore, la personnalité du chercheur est impliquée lors de la construction d'un modèle . Après six années de travail, l'équipe du Professeur de Duve avait réuni une série d'hypothèses qui laissaient supposer qu'on était en présence d'un nouveau granule cytoplasmique, et en fit un modèle : la création de celui-ci fut dictée entre autres par une recherche de simplicité et un rapprochement à d'autres systèmes osmotiques connus . C'était un choix de C. de Duve .

Le travail ne fut pas limité par le seul intérêt fondamental : une description plus détaillée de la cellule vivante . De par sa fonction, le lysosome allait être un tremplin pour l'étude de différents mécanismes impliqués, par exemple, dans la pathologie cellulaire et est, à l'heure actuelle, le centre de travaux et de recherches dans le domaine médical (à l'ICP entre autres, que dirige C. de Duve) .

Le concept de lysosome n'est pas apparu comme une évidence en "observant" la cellule vivante et n'a pas que l'intérêt "esthétique" de la connaissance du vivant : il a été construit par un groupe d'hommes et s'est introduit dans la théorie cellulaire qui est la base théorique permettant de progresser dans la compréhension de la structure, du fonctionnement et de la pathologie de la cellule .

BIBLIOGRAPHIE

APPELMANS, F. et de DUVE, C. (1955)

Further observations on the binding of acid phosphatase by rat-liver particles

Biochemical Journal, 59, 426-433

APPELMANS, F., WATTIAUX, R., et de DUVE, C. (1955)

The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat-liver

Biochemical Journal, 59, 438-445

BARBOUR, I.G. (1974)

Myths, models and paradigms. The nature of scientific and religious language.

S.M.C. Press LTD, London

BEAUFAY, H. (1966)

La centrifugation en gradient de densité : applications à l'étude des organites subcellulaires

Université Catholique de Louvain, Louvain et The Rockefeller University, New-York.

BERTHET, J. et de DUVE, C. (1951)

The existence of a mitochondria-linked, enzymically inactive form of acid phosphatase in rat-liver tissue

Biochemical Journal, 50, 174-181

BERTHET, J., BERTHET, L., APPELMANS, F. et de DUVE, C. (1951)

The nature of the linkage between acid phosphatase and mitochondria in rat-liver tissue

Biochemical Journal, 50, 182-189

BUNGE, M. (1967)

Scientific Research

Springer - Verlag - Berlin - Heidelberg - New-York

de BARSY, Th. (1976)

La glycogénose type II : Approche thérapeutique.

OYEZ, Louvain

de DUVE, C., GIANETTO, R., APPELMANS, F. et WATTIAUX, R. (1953)

Enzymatic content of the mitochondria fraction

Nature, 172, 1143-1144

de DUVE, C. (1971)

Tissue Fractionation : Past and Present

The Journal of Cell Biology, Vol. 50, No. 1, 20-50

de DUVE, C. (1965)

The separation and characterization of subcellular particules

The Harvey Lectures, series 59

de DUVE, C. (1984)

A guided tour of the living cell

Vol 1, 62-78

Scientific American Books, Inc., New-York

de DUVE, C. (1975)

Exploring Cells with a Centrifuge

Science, 59, 186-194

de DUVE, C. (1980)

Le lysosome : essai d'une esquisse historique et évolutive

Arch. Biol. (Bruxelles), 91, 175-191

de DUVE, C. (1970)

Le rôle des lysosomes en pathologie cellulaire

Journal Sandoz des Sciences médicales, 9, 200-208

de DUVE, C. (1973)

Eloge de la biodégradation

Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, 3-4, 156-162

de DUVE, C., BERTHET, J., BERTHET, L. et APPELMANS, F. (1951)

Permeability of mitochondria

Nature, 167, 389-390

de DUVE, C., PRESSMAN, C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R. et APPELMANS, F. (1955)

Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue

Biochemical Journal, 60, 604-617

de DUVE, C. (1964)

Principles of tissue fractionation

Journal of theoretical biology, 6, 33-59

de DUVE, C. (1963)

The lysosome

Reprinted from Scientific American, 156

de DUVE, C. (1969)

" The lysosome in retrospect " in Lysosomes in biology and pathology, 1

Ed. North Holland/American Elsevier

FELTZ, B. (1986)

Les démarches analytique et systémique en biologie. Tome 2 : Une étude épistémologique comparative de deux recherches

U.C.L, Institut Supérieur de Philosophie, Louvain-la-Neuve

HERS, H.G., BERTHET, J., BERTHET, L. et de DUVE, C. (1951)

Le système hexose phosphatasique

Bull. Sté. Chim. Biol., 33, 21-41

HERS, H.G. (1964)

Glycogen storage disease, type II

Ciba Symposium on Control of Glycogen Metabolism, 354-363

HERS, H.G. (1964)

Etude enzymatique des glycogénoses

Annales de biologie clinique, 22, 49-58

HERS, H.G. (1964)

Type II glycogenis. A lysosomal disease

1st meeting of the Federation of European Biochemical Societies, London. Abstract of papers, 115

GIANETTO, R. et de DUVE, C. (1955)

Comparative study of the binding of acid phosphatase, α -glucuronidase and cathepsin by rat-liver particles

Biochemical Journal, 59, 433-438

KNORR-CETINA, K.D. (1981)

The Manufacture of Knowledge. An Essay on the Constructivist and Contextual Nature of Science

Pergamon Press

KNORR-CETINA, K.D., KROHN, R. et WHITLEY, R. (1980)

The social process of scientific investigation

Reidel Publishing Company, Dordrecht - Boston, 297-321

LICHTNEROWICZ, A., PERROUX, F. et GADOFFRE, G. (1980)

Analogie et connaissance. Tome 1 : Aspects Historiques

Maloine, Paris

MALHERBE, J.F. (1985)

"La volonté du savant" in : Le langage théologique à l'âge de la science.

Cerf, Paris, 127-155

NOVIKOFF, A.B., BEUFAY, H. et de DUVE, C. (1956)

Electron microscopy of lysosome-rich fractions from rat liver

Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 2, 179-184

WATANABE, S. (1969)

Deduction and induction, in : Knowing and guessing. A formal and quantitative study .

Wiley, J. and Sons, New-York - Sidney - Toronto