



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude du transport de la cathepsine C vers les lysosomes dans des cellules d'hépatomes 7777 en culture

Burge, Vincent

Award date:
1989

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

250 889



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

ETUDE DU TRANSPORT DE LA
CATHEPSINE C VERS LES
LYSOSOMES DANS DES CELLULES
D'HEPATOMES 7777 EN CULTURE.

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

Vincent Burge

Année 1988-1989

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

Facultés des Sciences

rue de Bruxelles 61, B-5000 NAMUR

Tél. 081-22.90.61 Télex 59222 facnam-b Téléfax 081-23.03.91

ETUDE DU TRANSPORT DE LA CATHEPSINE C VERS LES LYSOSOMES DANS DES CELLULES D'HEPATOMES 7777 EN CULTURE.

BURGE Vincent

Résumé .

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons étudié le transport d'une enzyme lysosomale, la cathepsine C, dans des cellules d'hépatome 7777 de Morris. Le fractionnement subcellulaire par centrifugation isopycnique en gradient de saccharose de cellules marquées à la [³⁵S] méthionine a permis de suivre le transfert des précurseurs de l'enzyme, de leur site de synthèse, au niveau du réticulum endoplasmique, vers les lysosomes, via l'appareil de Golgi et le "trans Golgi network". Durant ce transfert, il est apparu que les précurseurs de la cathepsine C se trouvaient associés, de manière temporaire, à des membranes.

La possibilité d'une voie alterne, indépendante du mannose-6-phosphate a été envisagée pour le transfert de la cathepsine C vers les lysosomes d'hépatome 7777 de Morris .

Abstract .

In this work, the transfert of the lysosomal enzyme, cathepsin C, was studied in Morris hepatoma 7777 cells. Subcellular fractionation by isopycnic centrifugation in sucrose gradients of cells labelled with [³⁵S] methionine has allowed to follow the transfer of the precursors of the enzyme, from their site of synthesis, at the endoplasmic reticulum, to lysosomes, via the Golgi apparatus and the "trans Golgi network". During the transfer it has been observed, that the precursors of cathepsin C are transiently associated to membranes.

The possibility of an alternative mechanism for the transport of enzymes to lysosomes, independent of the mannose-6-phosphate has been considered .

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Septembre 1989

Laboratoire de Chimie Physiologique

Promoteur: Prof. R. WATTIAUX.

Remerciements

Mes plus vifs remerciements s'adressent tout d'abord aux Professeurs R.Wattiaux et S.Wattiaux-De Coninck pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire et pour leurs éclaircissements judicieux tout au long de cette année.

Je remercie tout aussi vivement le Docteur Francis Mainferme pour m'avoir guidé, aidé et encouragé durant ce mémoire, ainsi que pour sa disponibilité et sa patience à mon égard.

Il me faut également remercier Mesdames M.F Medart-Leruth et A. Lejeune-Dautreloix pour leur aide précieuse pendant mes longues manipulations.

Merci au Docteur M.M Gonze, dont les conseils furent toujours les bienvenus.

Je n'oublierai pas de signaler Monsieur Fr. Dubois et M. Savels pour leur présence indispensable dans ce laboratoire.

C'est à toutes les personnes du laboratoire de Chimie Physiologique que j'exprime ma reconnaissance pour l'accueil qu'elles m'ont réservé, m'ayant ainsi permis de vivre un des plus beaux moments de ma vie universitaire.

Ma gratitude s'adresse particulièrement à O. Laloux, Th. Coche, I. Knott, D. Prozzi et J.P Cassart pour m'avoir aidé dans le travail de dactylographie.

C'est du fond du coeur que je remercie mes parents, Schul, Jean-Marc et toutes les personnes qui ont vécu à mes côtés pendant mes années d'études.

Ce mémoire est dédié à Olivier De frère.

CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	1
A. Les lysosomes.....	1
- Les lysosomes primaires.....	2
- Les lysosomes secondaires.....	2
- Les corps résiduels.....	3
- La fonction hétérophagique.....	3
- La fonction autophagique.....	4
B L'endocytose.....	5
C Biosynthèse des enzymes lysosomales.....	6
D. Voies alternes de transport des enzymes lysosomales.....	10
E. Biosynthèse de la cathepsine C.....	11
F. But du travail.....	13
CHAPITRE II: TECHNIQUES EXPERIMENTALES.....	15
A Culture de cellules.....	15
B Marquage des cellules.....	15
1) Le jeune cellulaire.....	15
2) Le marquage long.....	16
3) Le "Pulse" ou marquage bref.....	16
4) La "Chasse".....	16
C Le fractionnement par centrifugation différentielle.....	17
1) Lavage des cellules et préparation de l'homogénat.....	17
2) Le fractionnement proprement dit.....	17
D. La centrifugation isopycniq.....	18
E. Les extractions.....	19
F. L'immunoprécipitation.....	20
1) La préabsorption.....	20
2) L'immunoprécipitation proprement dite.....	21
G. Electrophorèse en gel de polyacrylamide(SDS Page).....	21
H. La fluorographie.....	22
I. Dosage des enzymes de référence.....	23
CHAPITRE III : RESULTATS.....	24
A. Etude de la biosynthèse et du transport de la cathepsine c par centrifugation isopycniq.....	24
1) Distribution des enzymes de référence.....	24
2) Distribution en gradient de densité des polypeptides apparentés à la cathepsine C après un marquage long.....	25
3) Distribution en gradient de densité des polypeptides apparentés à la cathepsine C, au cours d'expériences de marquage en "pulse-chase".....	26
4) Discussion.....	28
B. ASSOCIATION DE LA CATHEPSINE C A DES STRUCTURES MEMBRANAIRES.....	30
1) Extraction séquentielle des fractions ML+P.....	30
2) Discussion.....	32
C) Etude de l'association membranaire de la cathepsine C par centrifugation isopycniq.....	33

1)Extraction séquentielles sur les fractions du gradient.....	33
2) Discussion	36
CHAPITRE IV : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	40
BIBLIOGRAPHIE.....	43

CHAPITRE I : INTRODUCTION.

A. Les lysosomes.

Les lysosomes, constituant le compartiment digestif principal des cellules d'eucaryotes, sont responsables de la dégradation de matériel extracellulaire internalisé par endocytose et de matériel intracellulaire ingéré par autophagie.

Le concept de lysosomes s'est développé grâce à l'intégration de données biochimiques et morphologiques (De Duve et Wattiaux, 1966; De Duve, 1983).

Biochimiquement, les lysosomes ont d'abord été définis comme des entités contenant un certain nombre d'hydrolases acides. Plus tard, l'examen en microscopie électronique de fractions enrichies en phosphatase acide permet l'identification des lysosomes comme des particules denses aux électrons, séparées du cytoplasme par une membrane simple (Novikoff *et al*, 1956).

Actuellement, plus de cinquante enzymes lysosomales ont été découvertes; on retrouve des protéases, des nucléases, des glycosidases, des sulfatases, des lipases, et des phosphatases, pouvant dégrader pratiquement toutes les catégories de macromolécules biologiques (Holtzman, 1976).

Nombre de ces enzymes sont libérées dans le milieu environnant quand l'organite est physiquement ou chimiquement détruit. Dans ce cas, on peut affirmer que ces hydrolases sont déjà sous forme soluble avant la rupture de la membrane. D'autres hydrolases ne sont libérables que plus difficilement et ne peuvent être directement solubilisées dès la rupture membranaire. Dans ces conditions, on peut dire qu'elles font partie de la membrane ou qu'elles y sont liées par liaison de type faible. La couche sous-jacente à la membrane formant le halo clair pourrait jouer un rôle de protection contre les hydrolases acides présentes à l'intérieur des lysosomes (Sheeler et Bianchi, 1980).

Parmi les enzymes membranaires, on retrouve β - glucocérébroside, la glucosidase et la sialidase. La phosphatase acide, la glucuronidase et la cathepsine D peuvent être parfois présentes dans la membrane. L'activité des enzymes est optimale aux alentours de pH 5, ce qui correspond au pH existant dans l'organite (Reijngoud et Tager, 1973; Ohkuma et Poole, 1978). Mego a démontré que le maintien du gradient de pH est dû à une pompe électrogénique insérée dans la membrane qui, après hydrolyse de l'ATP, libère des protons à l'intérieur des lysosomes (Mego, 1979).

Du point de vue morphologique, les lysosomes présentent une grande diversité de taille et de forme, ce qui contribue à rendre leur identification difficile. Ils contiennent du matériel dense aux électrons et peuvent prendre l'aspect de petites vésicules arrondies, de 0,1 à 0,8 μ (Sheeler et Bianchi, 1980), de grandes vacuoles, en particulier lorsque l'autophagie est importante, voire de structures tubulaires (Nichols, 1982) aussi bien dans les cellules saines que dans le cas de certaines affections telle que la maladie de Gaucher.

Suivant leur état, on distingue également, en microscopie électronique, les lysosomes primaires, les lysosomes secondaires, les corps résiduels ou télolyosomes.

-Les lysosomes primaires

Ce sont des vésicules de bourgeonnement originaires de la face trans de l'appareil de Golgi, qui présentent une réaction positive histochimique pour la phosphatase acide. Ce sont des organites qui n'ont pas encore participé à des réactions de digestion.

-Les lysosomes secondaires

Structures dans lesquelles les hydrolases sont présentes avec le matériel, à dégrader, en dégradation ou dégradé (Novikoff et Holtzman, 1976). Les lysosomes secondaires sont formés à partir de lysosomes primaires ayant fusionnés soit avec des vacuoles hétérophagiques soit avec des vacuoles autophagiques. Les vacuoles hétérophagiques sont des phagosomes formés par endocytose, les vacuoles autophagiques

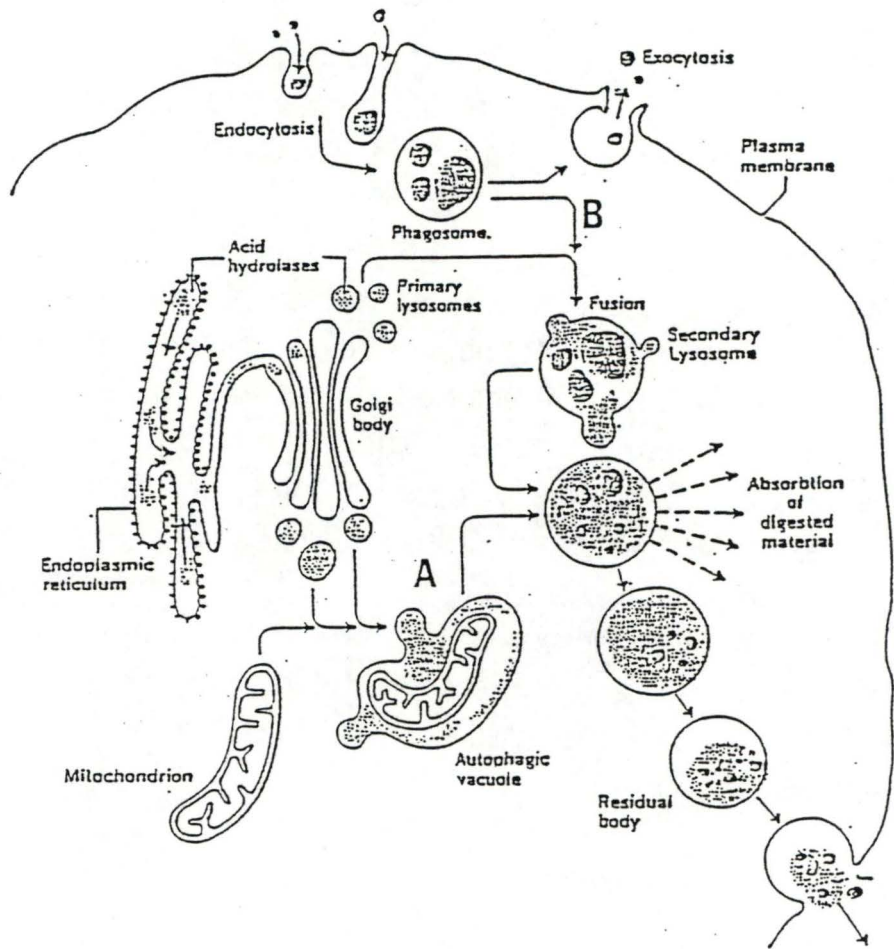


Fig.1 : Shéma général de la fonction autophagique(A) et hétérophagique(B).

contiennent des éléments propres au cytoplasme cellulaire isolés par une membrane.

-Les corps résiduels

Les substances endocytées, et une partie des organites autophagocytés qui ne seront pas digérés dans les lysosomes secondaires, vont être retenus temporairement dans des vacuoles résiduelles. Ces lysosomes forment alors des structures appelées corps résiduels.

Comme il a été signalé plus haut, les lysosomes forment principalement un système de digestion intracellulaire comparable, à l'exception de sa discontinuité, au tube digestif des organismes évolués.(De Duve et Wattiaux, 1966). On distingue 2 types de fonctions possibles(**Fig. 1**):

-La fonction hétérophagique.

Une fois la fusion entre lysosome et phagosome réalisée, les diverses hydrolases vont agir sur leur substrat spécifique. On retrouvera ainsi dans les lysosomes secondaires différentes molécules de petite taille utiles à la cellule, et des produits inutilisables. On peut se demander quels sont les substrats de ces hydrolases?

De façon générale, on retrouvera des polymères ou des composés complexes comprenant des protéines, du DNA et RNA, des polysaccharides, des lipides, des phosphates et des hydrates de carbone situés sur des glycoprotéines ou des glycolipides.

L'hydrolyse de ces macromolécules n'est pas le fait d'une seule enzyme mais de l'action concertée de plusieurs hydrolases. Prenons pour exemple le cas d'une protéine. L'hydrolyse initiale est effectuée par les cathepsines D et E, clivant la protéine en plusieurs fragments de taille variable. Ces peptides résiduels seront hydrolysés en dipeptides et acides aminés par les cathepsines A, B, C et l'arylamidase. Il sera possible à ces acides aminés de traverser la membrane lysosomale soit par diffusion passive ou facilitée, soit par le transport actif et d'intervenir dans le métabolisme cellulaire, au niveau du cytoplasme. Quant aux corps résiduels ils pourront fusionner avec la membrane plasmique, et être rejetés par exocytose.

-La fonction autophagique

Cette fonction a pour rôle de digérer les constituants cytoplasmiques propres à la cellule.

Une fois isolés du cytoplasme par une membrane, certains organites vont fusionner avec les lysosomes primaires pour être ensuite hydrolysés. C'est ainsi que l'on va retrouver dans les vacuoles autophagiques des mitochondries, du réticulum endoplasmique lisse et rugueux, assurant ainsi leur turn-over.

Les lysosomes interviennent dans un grand nombre de processus biologiques. On peut citer :

- la nutrition
- la lyse cellulaire pendant la différenciation et la métamorphose
- la destruction des globules rouges âgés et des cellules mortes
- la kératinisation de la peau
- la sécrétion d'hydrolase par le spermatozoïde pour permettre la pénétration de l'ovule lors de la fécondation
- la résorption de l'os par les ostéoclastes.

Les enzymes lysosomales sont aussi impliquées dans la destruction d'agents infectieux tels les bactéries et virus entrés dans la cellule par phagocytose, ainsi que dans la dégradation d'hormones, le transport de protéines et de lipides comme par exemple les lipoprotéines de faible densité (L.D.L). Ces dernières pénètrent dans la cellule par endocytose via un récepteur spécifique (Golstein et al, 1985)

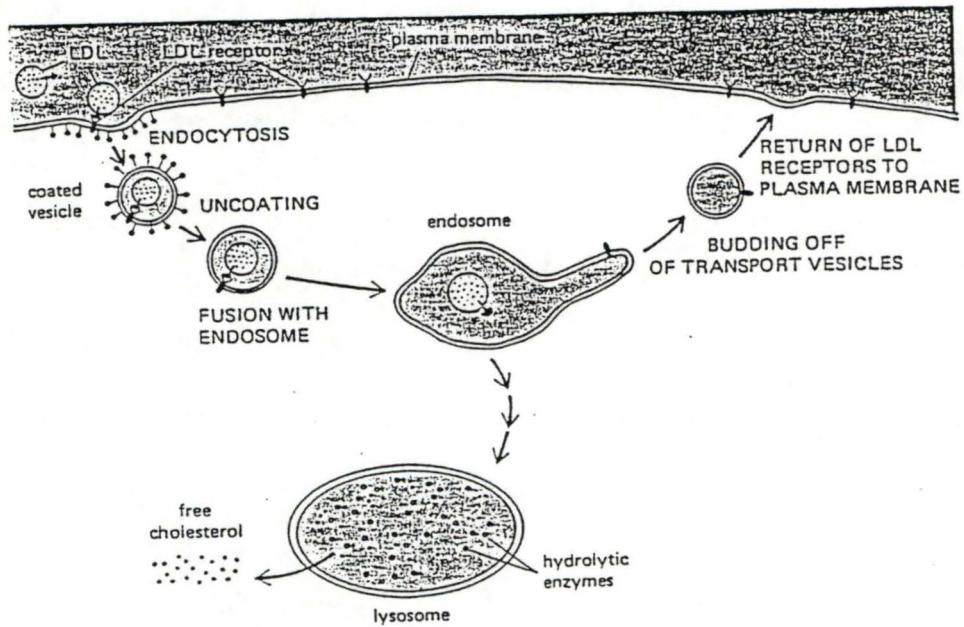


Fig.2 : Schéma de l'endocytose adsorptive par récepteurs (exemple des L.D.L).

B L'endocytose

Comme on vient de le voir, la fonction lysosomale implique fréquemment l'internalisation de substances externes, par la cellule. Les petites molécules hydrophobes peuvent traverser la double couche lipidique de la membrane plasmique par diffusion simple ou facilitée.

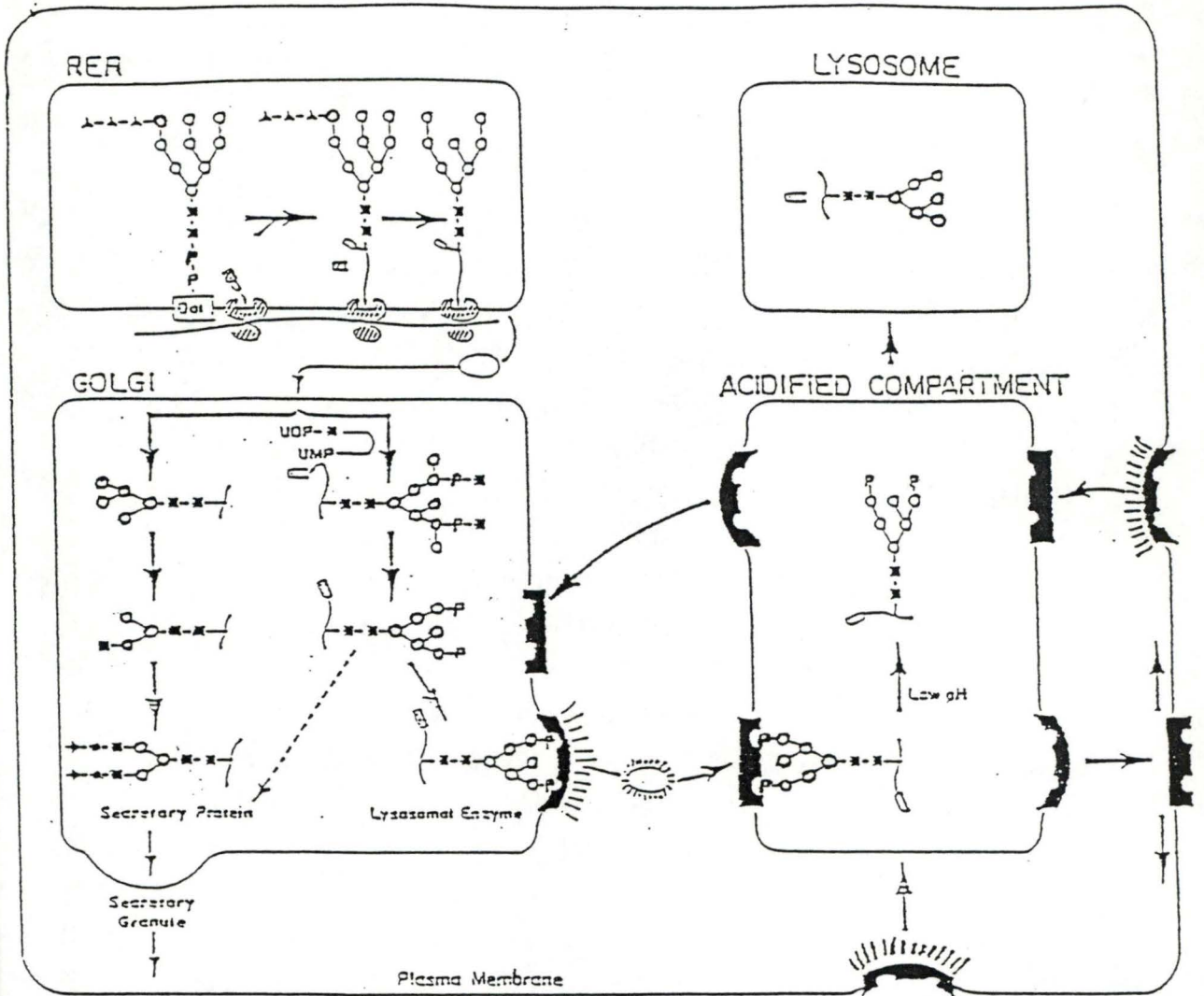
Pour faire entrer dans le cytoplasme les molécules hydrophiles ou des ions, la cellule doit faire appel à des mécanismes particuliers impliquant l'action de "transporteurs".

L'entrée des macromolécules biologiques dans la cellule se fait grâce au phénomène d'endocytose. On distingue 2 types d'endocytose:

- La pinocytose (ou endocytose), qui consiste en l'ingestion de substances solubles. On connaît 2 types d'endocytose différentes. On distingue tout d'abord l'endocytose adsorptive par récepteurs. La capture des molécules à internaliser se fait suite à l'interaction de ces molécules avec des récepteurs spécifiques situés sur la face extracellulaire de la membrane plasmique. Il s'agit d'un mécanisme permettant à la cellule de capter et de concentrer des molécules biologiques spécifiques, telles que, par exemple, la transferrine, les lipoprotéines à faible densité (LDL)... Dans le second type d'endocytose, appelé endocytose fluide, la cellule ingère, au hasard, une portion de matériel extracellulaire qui se retrouve enfermée par une invagination de la membrane plasmique. La pinocytose est un mécanisme courant chez de nombreuses cellules.

-La phagocytose est, à l'opposé, réservée à certaines cellules spécialisées, tels les macrophages. Elle consiste en une ingestion de particules plus volumineuses comme des microorganismes ou des débris cellulaires.

Le cycle de l'endocytose débute à hauteur des régions spécialisées dans la membrane plasmique, qui sont des zones de dépression de celle-ci recouvertes du côté cytoplasmique de structures denses aux électrons constitué de clathrine (coated pits). Les "coated pits" ont une existence



- Galactose
- ▲ Glucose
- N-Acetylglucosamine
- P Phosphate
- ◆ Ac sialique
- Mannose

Fig.3 : Schéma général de la voie de synthèse des enzymes lysosomales Mannose -6- phosphate dependant et des protéines de sécrétion.

très brève, puisque très rapidement à partir de là, se forment par invagination progressive de la membrane des vésicules recouvertes ou "coated vesicles".

Les vésicules d'endocytose, ayant perdu leur couverture de clathrine fusionnent ensuite dans un compartiment prélysosomal avec les endosomes qui eux-mêmes délivrent leur contenu dans les lysosomes. Dans le cas particulier de l'endocytose adsorptive par récepteur, c'est dans le compartiment endosomal que se produit la dissociation entre les molécules exogènes internalisées et leur ligand correspondant, du fait de l'acidité du contenu endosomal.

A la **Fig.2**,est reproduit un schéma de l'endocytose adsorptive par récepteurs appliqué aux L.D L.

C Biosynthèse des enzymes lysosomales

Les enzymes lysosomales, ainsi que les protéines de sécrétion et les protéines de la membrane plasmique, sont synthétisées sur des polysomes associés au reticulum endoplasmique rugueux (R.E.R) ,(voir **Fig.3**) .

Chacune de ces protéines présentent à son extrémité N-terminale un peptide "signal" constitué de 15 à 20 acides aminés hydrophobes. Cette séquence "signal" interagit avec une particule de nature ribonucléoprotéique la "signal recognition particle" ou "S.R.P". Ce complexe se fixe sur la membrane du RE via une autre protéine, la "docking protéin"; le transfert vectoriel et co-translationnel de la chaîne polypeptidique naissante, à travers la membrane du RE, dans la lumière de celui-ci, peut dès lors se produire (Walter et al, 1984).Puisque les protéines de sécrétion de la membrane plasmique et des lysosomes suivent la même voie de synthèse,elles se retrouvent toutes en mélange dans le RER . Des mécanismes de tri interviendront plus tard, pour diriger ces protéines vers leur destination finale.

Les enzymes lysosomales ainsi que les protéines de sécrétion et les protéines de la membrane plasmique sont N-glycosylées, de manière co-

traductionnelle, également, au niveau des résidus ASN, lorsque la séquence consensus ASN-X-Thr ou Ser est présente. La glycosylation consiste en un transfert, en bloc sur la chaîne peptidique, d'un oligosaccharide, préformé (composé de 2 résidus de N-acétylglucosamine, 9 résidus mannose et 3 résidus glucose) et porté par un intermédiaire lipidique, le dolichol pyrophosphate, inséré dans la membrane du RER.

Dans le RER, la séquence "signal" est éliminée; de plus le "façonnage" de la partie hydrocarbonée des protéines néosynthétisées commence. Elle débute par l'excision de 3 résidus glucose et d'un résidu mannose. Les protéines sont ensuite transportées, par l'intermédiaire de vésicules, vers le Golgi où d'autres modifications post-traductionnelles s'opèrent. De plus, c'est au niveau du Golgi que seront triées les protéines selon leur destination, c'est à dire, soit vers les granules de sécrétion, soit vers la membrane plasmique, soit vers les lysosomes.

Durant leur passage à travers le Golgi les résidus hydrocarbonés des protéines de sécrétion et de la membrane plasmique sont transformés en oligosaccharides complexes, par addition de N-acétylglucosamine, de galactose et d'acide sialique principalement.

Bien que, dans certains cas, les chaînes d'hydrates de carbone portées par les précurseurs d'enzymes lysosomales peuvent subir des modifications semblables, la modification la plus importante subie par celles-ci consiste en l'acquisition de résidus mannose 6 phosphate. Cette modification implique l'intervention de 2 enzymes. Dans une première étape, l'UDP-N-acétylglucosamine-lysosomal enzyme N-acétylglucosamine-phosphotransférase transfère une N-acétylglucosamine 1-phosphate à partir d'UDP-N-acétylglucosamine sur un résidu mannose pour former un intermédiaire phosphodiester. Cette enzyme se situe à l'endroit critique du mécanisme de tri dépendant du mannose-6 phosphate, car elle doit pouvoir reconnaître spécifiquement les enzymes à destination lysosomales. Il a été proposé que la phosphotransférase reconnaît un "domaine" particulier, qui est commun à toutes les enzymes lysosomales, mais absent dans les glycoprotéines non lysosomales. La nature de ce domaine est encore inconnu à l'heure actuelle, mais on pense que la conformation aurait un rôle à jouer.

Ensuite, la N -A acétylglucosamine -1 - phosphodiester - N - acétylglucosaminidase enlève la N -acétylglucosamine, libérant ainsi un groupe phosphate en position 6 du mannose.

Le mannose-6-phosphate ainsi formé constitue l'élément majeur de reconnaissance des enzymes lysosomales. Il présente une grande affinité pour des récepteurs spécifiques au mannose-6-phosphate présents dans le Golgi, de telle sorte que les enzymes lysosomales vont être dérivées de la voie des protéines de sécrétion.

Deux récepteurs au mannose-6-phosphate ont été isolés et purifiés. Tous deux sont des glycoprotéines transmembranaires. L'un présente un poids moléculaire de 215 Kd (Hoflack and Kornfeld, 1985), l'autre de 46 Kd (Varki and Kornfeld, 1985). Le récepteur 46 Kd requiert la présence de cations bivalents pour interagir avec les résidus mannose-6-phosphate. Les deux récepteurs perdent toute affinité pour leurs ligands à des pH voisins de 5,5. Cette propriété est comme on va le voir extrêmement importante dans le mécanisme de transfert.

Le complexe récepteur-ligand quitte l'appareil de Golgi par l'intermédiaire de vésicules "recouvertes" et se retrouve dans un compartiment prélysosomal dans lequel la dissociation du ligand se produit suite à l'acidification du contenu de ce compartiment.

Le récepteur recycle vers le Golgi pour se fixer à d'autres précurseurs, tandis que les enzymes lysosomales sont acheminées finalement vers les lysosomes. Un faible pourcentage des enzymes lysosomales (5 à 20%) est sécrété par les cellules, avant d'atteindre les lysosomes. Une partie de ces enzymes peut se fixer sur le récepteur à mannose-6-phosphate qui se trouve sur la membrane plasmique et être internalisée vers les lysosomes par endocytose. Les pools intra- et extra-cellulaires des récepteurs au mannose-6-phosphate sont en équilibre et s'échangent rapidement (Vladutiu et al, 1979).

En plus des modifications apportées aux résidus hydrocarbonés, les enzymes lysosomales subissent un re façonnage important de leur chaîne peptidique. Les enzymes sont synthétisées sous forme de préproenzymes et possèdent une double extension N-terminale (Skudlarek et al, 1984). La préséquence ou séquence "signal" est éliminée dans le R.E.R. immédiatement après le transfert du polypeptide à travers la membrane de celui-ci. La proséquence, quant à elle, est éliminée, selon les enzymes, sur

une période qui s'étend de quelques heures à plusieurs jours. Des coupures protéolytiques supplémentaires peuvent encore se produire dans certains cas, notamment au niveau de la portion C-terminale (Erikson and Blobel, 1983).

Le façonnage protéolytique débute dans les prélysosomes et s'achève une fois l'enzyme libérée dans les lysosomes (Gieselman et al, 1984).

L'appareil de Golgi est un système de lamelles superposées constitué de quatre compartiments les Golgi, cis, médian, trans et le "trans Golgi network" (Griffith and Simons, 1986).

Un système de vésicules transporte les protéines néosynthétisées du R.E.R. vers le compartiment cis du Golgi. Les protéines de sécrétion et de la membrane plasmique passent à travers le Golgi médian et trans, pour se retrouver dans différents types de vésicules à hauteur du "trans Golgi network", pour être dirigées vers leur destination finale.

Bien que les protéines lysosomales reçoivent leur marqueur mannose-6-phosphate dans le Golgi cis, l'endroit précis où elles se fixent au récepteur au mannose-6-phosphate est encore sujet à discussion.

Brown et Farquahr (1984), s'appuyant sur des données immunohistologiques observent une concentration du récepteur au mannose-6-phosphate dans le Golgi cis et proposent que le complexe ligand-récepteur se forme à cet endroit et quitte le Golgi à ce niveau également. D'autres auteurs (Vladutiu, 1983) ayant observé la présence de chaînes oligosaccharidiques complexes (porteuses de galactose et d'acide sialique) au niveau de protéines lysosomales, considèrent que celles-ci doivent traverser le Golgi et sortir à hauteur du "trans Golgi network", puisque l'addition de galactose et d'acide sialique ne peut se faire que dans le trans Golgi (Vladutiu, 1983). Comme les récepteurs au mannose-6-phosphate ne sont jamais détectés dans les lysosomes, les vésicules "couvertes" transportant des précurseurs des enzymes lysosomales, à partir du Golgi, doivent fusionner avec des éléments d'un compartiment prélysosomal, dans lequel un abaissement de pH provoquera la dissociation des enzymes du récepteur, qui sera quant à lui recyclé vers le Golgi.

Brown et al (1986) ainsi que Kornfeld (1987), considèrent que ce compartiment prélysosomal fait partie du système endosomal et que de ce fait, il existe à un moment donné une convergence entre les voies biosynthétique et d'endocytose du transport vers les lysosomes.



D. Voies alternes de transport des enzymes lysosomales.

Bien que la voie au mannose-6-phosphate soit un mécanisme important de ciblage des enzymes lysosomales, il est clair que d'autres mécanismes doivent exister.

Cela est en effet apparu évident après des observations faites chez des patients atteints de mucopolysaccharidose II ("I-cell disease") ou III ("pseudo-Hurler polydystrophy"). Les cellules de ces patients sont déficientes en phosphotransférase, ce qui a pour conséquence que les enzymes lysosomales ne peuvent ni recevoir le marqueur mannose-6-phosphate ni se fixer au récepteur spécifique (Mueller et al, 1983).

Les fibroblastes de ces patients sécrètent les enzymes lysosomales au lieu de les envoyer vers les lysosomes. Par contre, dans d'autres cellules, telles que les hépatocytes, les cellules de Kupfer et les leucocytes possèdent un taux d'activité d'enzymes lysosomales quasiment normal, bien qu'elles soient également déficientes en phosphotransférase.

D'autre part, des enzymes telles que la β -glucocérébrosidase et l'acétyl - CoA - a - D -glucosamine - N - acétyltransférase, protéines membranaires ne sont pas phosphorylées et donc sont dirigées vers les lysosomes par un mécanisme indépendant du mannose-6-phosphate.

Récemment, on a mis en évidence divers cas où d'autres enzymes lysosomales sont temporairement associées à des membranes durant leur transport.

La phosphatase acide dans des cellules BHK transfectées par du cDNA codant pour cette enzyme est synthétisée sous forme d'un précurseur polypeptidique transmembranaire glycosylé de 60 Kd. Ce précurseur est transporté endéans les 30 minutes vers le Golgi où il subit un remaniement de sa partie hydrocarbonée, par la formation d'oligosaccharides complexes. Les vésicules se détachant du "trans Golgi network" transportent ces précurseurs vers les lysosomes, sur une période de plusieurs heures. Durant cette période et avant que le transfert dans les lysosomes n'ait

lieu, les précurseurs effectuent un va-et-vient continu entre la membrane plasmique et un compartiment prélysosomal. Le précurseur est solubilisé après coupure protéolytique une fois que celui-ci atteint les lysosomes. On ne détecte pas de mannose-6-phosphate sur ce précurseur.

Une activité de protéase acide dans les endosomes de macrophage chez le lapin fut identifiée par Diment et Stahl (1985). Suite à l'utilisation d'anticorps spécifiques, cette enzyme s'est révélée être la cathepsine D. Elle serait présente dans les endosomes sous forme membranaire et dans les lysosomes sous forme soluble. La cathepsine D est synthétisée sous forme d'un précurseur membranaire inactif. La forme inactive est transformée en enzyme active, toujours associée à la membrane. Par la suite, il y aura après quelques heures, libération de l'enzyme soluble dans les lysosomes (Diment and Stahl, 1988). Ces observations n'excluent pas bien entendu l'intervention du tri via le récepteur au mannose-6-phosphate, mais il est toutefois certain qu'il existe une association de l'enzyme à la membrane dans les endosomes et probablement dans le Golgi.

Il reste encore à savoir quel type d'interaction s'établit entre la cathepsine D et la membrane des endosomes. Il se pourrait que l'association de la cathepsine D se fasse par l'intermédiaire d'une séquence d'ancrage du type KDEL (K: lysine, D: asparagine, E: glutamine, L: leucine) présente à l'extrémité C-terminale de l'enzyme; cette séquence étant nécessaire pour la rétention des protéines dans le R.E .

E. Biosynthèse de la cathepsine C.

La cathepsine C ou dipeptidylaminopeptidase I (DAP.I) est une exopeptidase lysosomale . Son action enzymatique consiste en l'hydrolyse de dipeptides à partir de l'extrémité N-terminale de peptides.

Au laboratoire, on mesure son activité en la faisant agir sur des substrats synthétiques du type dipeptidyl naphtylamide .Elle présente, une spécificité relativement étendue; cependant, son activité enzymatique est maximale lorsque l'acide aminé du dipeptide impliqué dans la liaison peptidique à rompre est l'arginine . Elle est par contre totalement inhibée si cet acide aminé est la proline .

Comme tout enzyme lysosomale, son activité enzymatique est maximale en milieu acide, aux alentours de pH 5-6 .

Son activité requiert des ions Cl^- et son centre catalytique implique un groupement thiol.

La cathepsine C est une enzyme multimérique, mais sa composition en sous-unités n'a pas encore été complètement élucidée.

D'après Mc Donald et al (1969), l'enzyme serait composée de huit sous-unités, organisées en deux tétramères, contenant chacun trois polypeptides de poids moléculaire de 18 kd et un polypeptide de poids moléculaire trois fois plus faible soit de 6 kd .

De part son activité exoprotéolytique, cette enzyme peut s'employer dans des travaux de détermination de séquences d'acides aminés.

Des études sur la biosynthèse et le transport de la cathepsine C dans des monocouches d'hépatocytes et dans des cellules d'hépatome 7777 de Morris en culture, ont été entreprises au laboratoire.

Les précurseurs de la cathepsine C apparaissent en un mélange complexe de polypeptides dont les poids moléculaires vont de 59 à 67 Kd. Les formes intermédiaires et la forme mature de l'enzyme (18 Kd) apparaissent 2 à 3 heures après la synthèse dans les hépatomes 7777 (Mainferme et al., 1985), tandis que dans les hépatocytes les formes natives (18 et 6 Kd) sont déjà détectables entre 1 et 2 heures après la synthèse. Il est à remarquer que le récepteur au mannose-6-phosphate de 215 Kd, cation indépendant est absent dans les cellules 7777. Le récepteur de 46 Kd, cation dépendant est présent.

La méthode de fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle a été employée pour suivre le transport de la cathepsine C vers les lysosomes dans les deux types cellulaires cités (Mainferme et Wattiaux, 1988,1989). Dans les deux cas, on observe, au cours d'expériences de marquage en pulse chase, la présence des précurseurs de la cathepsine exclusivement dans la fraction microsomale, constituée de vésicules de RE et de Golgi, aux temps de chasse courts, soit peu de temps après leur synthèse. Plus tard, après 30 min de chasse pour les hépatocytes et une heure pour les cellules de 7777, on observe un transfert de ces précurseurs dans les vésicules de plus grande taille qui sédimentent dans la fraction mitochondriale légère. Dès ce moment, commence à

apparaître les formes natives de 18 et 6 kd suite au "façonnage protéolytique".

Dans le cas des hépatocytes, le transfert des polypeptides vers des organites plus lourds dans la fraction mitochondriale lourde, se poursuit, contrairement aux cellules d'hépatome 7777, dans lesquelles la quasi totalité des polypeptides apparentés à la cathepsine C se maintient dans la fraction mitochondriale légère .

F. But du travail

L'étude de la biosynthèse de la cathepsine C, enzyme lysosomale, s'inscrit dans le cadre d'une contribution à l'étude de la biogenèse des lysosomes. Deux aspects importants de ce processus ont retenu notre attention pour guider ce travail de mémoire.

Pour étudier le phénomène de transport des précurseurs de l'enzyme depuis leur lieu de synthèse, le R.E, jusqu'à leur destination finale, les lysosomes, nous avons employé la technique de fractionnement subcellulaire par centrifugation isopycniqne en gradient de saccharose de cellules marquées métaboliquement à la [³⁵S] méthionine, suivie de l'immunoprécipitation des polypeptides apparentés à la cathepsine C et de leur analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS.

On trouve pratiquement aucune donnée dans la littérature sur l'emploi de cette méthodologie dans les études de la biosynthèse d'enzymes lysosomales. La méthode jusqu'ici exclusivement utilisée fait appel aux gradients de percoll, qui ne permettent que la séparation de granules denses (lysosomes, mitochondries) et de granules légers (RE, Golgi, endosomes).

Nous avons donc tenté d'explorer les possibilités qu'apporte dans ce domaine la centrifugation en gradient de saccharose de densité 1,05 à 1,32 g/ml.

En second lieu, il nous a semblé intéressant de voir si au cours de leur transfert du RE vers les lysosomes, les précurseurs de la cathepsine C ne pouvaient pas, être associés, de manière transitoire, à une structure membranaire. Nous avons pour cela suivi un schéma expérimental, consistant en une succession d'extractions de fractions subcellulaires provenant de cellules marquées à la [³⁵S] méthionine , inspiré de données

fournies par Diment et al (1988) et destiné à en extraire différentiellement les divers constituants avant de les soumettre à l'analyse par SDS-PAGE.

CHAPITRE II: TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES.

L'étude de la biosynthèse et du transport de la cathepsine C a été réalisée sur des cellules d'hépatome 7777 de Morris en culture. Ce type d'expérience s'étale sur plusieurs jours, et se divise en sept étapes, à savoir:

- Le marquage métabolique à la [³⁵S] méthionine, soit en marquage long (16 heures), soit en "Pulse-Chase".
- La préparation d'une fraction "ML+P" par centrifugation différentielle.
- La centrifugation isopycniqne sur gradient de saccharose.
- Des extractions succesives, soit à partir des fractions du gradients, soit directement des culots de la fraction "ML+P".
- L'immunoprécipitation.
- L'électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS (SDS PAGE) et fluorographie.

A Culture de cellules.

Les cellules proviennent d'un clone de l'hépatome 7777 de Morris isolé par Vedel et al (1983).

En culture, elles poussent sous forme de monocouche dans des boîtes de Falcon de 75 cm². Le milieu de culture est le Milieu Eagle Minimum (MEM) contenant des antibiotiques (auréomycine, streptomycine et pénicilline), des acides aminés non-essentiels, du sérum de veau foetal à 7.5% et 3.3 gr de NaHCO₃ par litre. La culture cellulaire se fera à une température de 37°C dans une atmosphère de 5% en CO₂.

B Marquage des cellules.

1) Le jeune cellulaire.

Avant toute expérience de marquage, on maintient les cellules dans un milieu déficient en méthionine afin de réduire le pool intracellulaire de

méthionine libre et aussi d'assurer une incorporation efficace de la méthionine radioactive au cours du marquage.

Les cellules sont pour se faire, incubées, après rinçage dans 5 ml de milieu Dulbecco ne contenant pas de méthionine (Dulbecco méthionine -), durant une heure à 37°C, dans une atmosphère de 95% d'oxygène et de 5% de CO₂.

2) Le marquage long.

On enlève le milieu de jeune pour le remplacer par le milieu de marquage obtenu à partir du Dulbecco méthionine - utilisé dans la première étape, auquel on a ajouté de la ³⁵S méthionine et du sérum de veau foetal dialysé (FCS)(10%).

On introduit de 3 à 5 ml de ce milieu dans la boîte, ce qui fait 0.5 mCi (18,5 MBq) par boîte, en prenant soin de saturer l'atmosphère de la même manière que dans l'étape de jeune.

La boîte est placée à l'étuve à 37°C durant 10 heures minimum, en atmosphère de 95% d'oxygène et de 5% de CO₂.

3) Le "Pulse" ou marquage bref.

On enlève le milieu de jeune, pour le remplacer par le milieu de marquage obtenu à partir du milieu Dulbecco méthionine -, auquel on a ajouté de la [³⁵S] méthionine. Les protéines néosynthétisées seront ainsi marquées pendant un laps de temps déterminé. On introduit 2 ml, contenant 1 mCi (37 MBq) par boîte et on sature l'atmosphère comme expliqué ci-dessus. La boîte est placée pendant 20 min à 37°C.

4) La "Chasse".

Le milieu de chasse est, en fait du Dulbecco méthionine - auquel on additionne de la méthionine non radioactive (1,5%) en excès et du sérum de veau foetal (FCS) dialysé 10%. La chasse, va nous permettre de suivre au cours du temps les modifications subies par les protéines (glycosylation, déglycosylation, protéolyse) ainsi que leurs localisations dans les différents organites. Après avoir retiré le milieu de "Pulse", on introduit 5 ml de milieu de chasse. On sature l'atmosphère en 95% air et 5% de CO₂ et on place la boîte pendant le temps désiré à l'étuve.

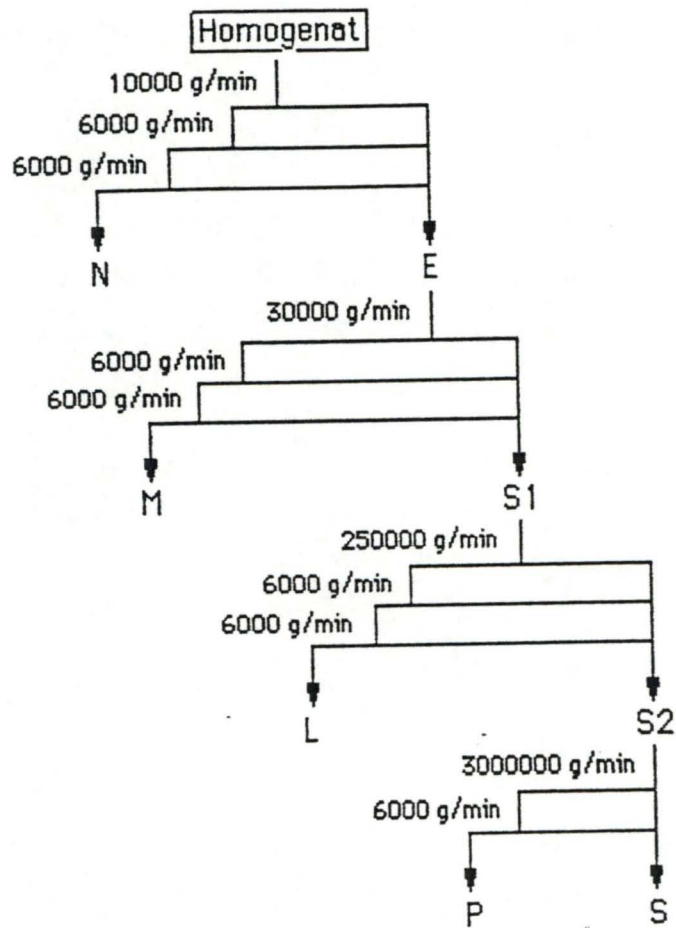


Fig.4 : Schéma classique du fractionnement par centrifugation différentielle selon De Duve et al(1955).

C Le fractionnement par centrifugation différentielle.

1) Lavage des cellules et préparation de l'homogénat.

Il faut prendre garde de toujours travailler à une température proche de 0°C, dans un premier temps pour arrêter le métabolisme cellulaire et pour éviter d'endommager les structures subcellulaires. Les cellules débarrassées de leur milieu de chasse sont lavées avec du PBS 10 mM et ensuite avec de l'EDTA 1mM, saccharose 0.25 M. Elles sont ensuite décollées de la boîte au moyen d'un "Rubber policeman" et suspendues dans du saccharose 0.25 M, imidazole pH 7.4 Une première centrifugation de 5 min à 500 RPM permet de sédimenter les cellules.

2) Le fractionnement proprement dit.

Le culot de cellules est resuspendu dans du saccharose 0.25 M, imidazole pH 7.4 et les cellules sont homogénéisées par six passages dans un homogénéiseur de Dounce. Le passage du piston doit être très lent, pour éviter la rupture des noyaux et la gélification du milieu par la libération de l'ADN.

L'homogénat est soumis à une centrifugation différentielle semblable à celle décrite par de Duve et al (1955), pour le foie de rat (**Fig.4**). Cette opération a pour but de séparer les différents organites subcellulaires en essayant d'avoir un minimum de détérioration vu que les analyses qui suivront cette centrifugation réclament des organites intacts.

La centrifugation différentielle est basée sur le principe de la sédimentation. La suspension de particules est centrifugée à la vitesse qui produira une sédimentation complète des granules possédant le plus haut coefficient de sédimentation. La taille de la particule a donc beaucoup d'importance, et plus elle est petite plus la vitesse du rotor devra être élevée. On va ainsi récupérer un culot et un surnageant. Ce dernier subit une nouvelle centrifugation à vitesse plus élevée donnant un nouveau culot et un nouveau surnageant. On répète cette opération plusieurs fois, jusqu'à

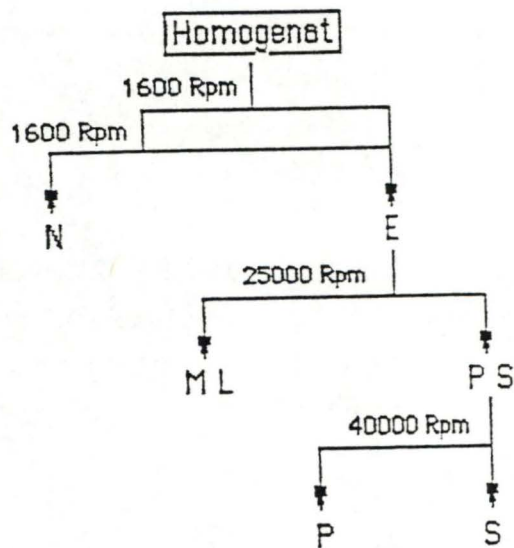


Fig 5 : Schéma du fractionnement par centrifugation différentielle utilisé dans nos expériences .

l'obtention successive de cinq fractions hétérogènes, enrichies en certains types d'organites.

- La fraction "N": elle contient principalement les noyaux, les débris cellulaires, plus quelques cellules intactes ayant résisté à l'homogénéisation.

- La fraction "M": appelée fraction mitochondriale lourde, enrichie en mitochondries, lysosomes et peroxyosomes en quantité appréciables.

- La fraction "L": ou fraction mitochondriale légère qui est enrichie en lysosomes et peroxyosomes.

- La fraction "P": microsomale, qui va contenir une grande partie des éléments du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, ainsi que quelques fragments de membranes plasmiques.

- La fraction "S": appelée "fraction soluble", qui va contenir tous les éléments non sédimentables des cellules.

Le schéma classique de fractionnement décrit par de Duve et al a été modifié comme l'illustre la **Fig.5**.

Après deux centrifugation à 1600 RPM, on obtient un surnageant "E" et un culot "N". La fraction "E" est recentrifugée dans des tubes en polycarbonate à parois épaisse à 25 000 RPM dans un rotor 40; ce qui nous donnera, après un temps de centrifugation fonction du volume, une fraction commune de "ML" en culot et un surnageant "S". Les culots de la fraction "ML" et "P" sont resuspendus et homogénéisés dans du saccharose 0.25 M, imidazole pH 7.4.

Si la fraction de "MLP" se fait en deux étapes, c'est pour ne pas soumettre les lysosomes à une centrifugation à 40 000 RPM, ce qui pourrait causer leur altération, suite à la pression hydrostatique qui se développe dans ces conditions.

D. La centrifugation isopycniq

Grâce à ce type de centrifugation, nous allons pouvoir séparer les particules subcellulaires d'après leur densité.. Les organites sédimentent dans un gradient linéaire de saccharose jusqu'à ce qu'elles atteignent la zone correspondant à leur propre densité pour s'y équilibrer. Le gradient

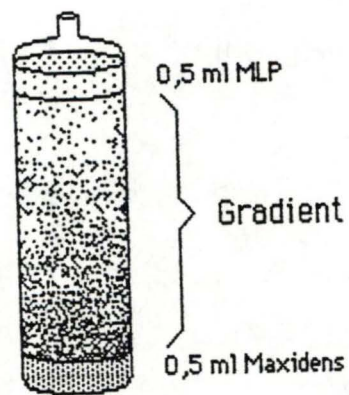


Fig.6 :Schéma d'un tube quick seal avant la centrifugation .

sera préparé à partir de deux solutions de saccharose 0,25 M de densité différente :

- 4,1 ml d'une solution de saccharose 0,25 M de densité 1,05 g/ml
- 4,1 ml d'une solution de saccharose 0,25 M de densité 1,32 g/ml

remarque : on dispose 0,5 ml de maxidens dans le fond d'un tube Quick seal avant de déposer le gradient.

Il ne reste plus qu'à placer 0,5 ml de la fraction MLP au sommet du gradient. On centrifuge à 40000 RPM pendant trois heures dans un rotor vertical (VTi 65) (schéma du tube avant centrifugation, **Fig. 6**).

Le tube est ensuite sectionné en 12 fractions dont on mesure le poids, la densité et la hauteur exacte de la coupe.

Par temps de marquage, on utilise 6 à 8 boîtes de 75 cm², soit 90-120 10⁶ cellules, correspondant à 120-160 mg de protéines. Les fractions proviennent de deux gradients. Une immunoprécipitation sera directement réalisée sur 1/3 du volume tandis que les 2/3 restant seront dilués pour diminuer la concentration en saccharose. Après sédimentation, par centrifugation de 35 min au rotor 40, les culots seront congelés. Ils subiront après décongélation des extractions séquentielles.

E. Les extractions.

Les extractions consistent à resuspendre les culots dans divers solvants afin d'en extraire différentiellement certains constituants. Nous avons dans notre cas procédé à trois types d'extraction et cela soit directement sur les culots de la fraction MLP soit sur les culots de la centrifugation décrite ci-dessus plus les premières sections du gradient.

Le premier traitement est une congélation-décongélation suivie d'un choc hypotonique, qui nous permettra de récupérer dans le surnageant tout ce qui est soluble dans les vésicules.

Pour cela, on resuspend le culot dans 0,5 ml d'une solution de tris 50 mM pH 7,4 / mannose -6-phosphate 5 mM contenant des inhibiteurs de protéases (iodoacétamine 0,5 mM (IAA), EDTA 0,1 mM, phényl méthylsulfonyl fluoride 0,1 mM (PMSF), aprotinine 10 µU/ml et leupeptine 4,0 mM. Le mannose-6-phosphate va se fixer sur les récepteurs

spécifiques, rentrant en compétition avec les protéines possédant des résidus mannose-6-phosphate, ce qui empêchera ces derniers de s'y lier. On centrifuge l'homogénat pendant 35 min à 40000 RPM, ce qui nous donnera un premier surnageant. Les culots vont subir la deuxième extraction, qui libérera les protéines périphériques. On resuspendra les culots dans 0,5 ml de bicarbonate de sodium 10 mM pH 10,6 contenant les inhibiteurs de protéases en concentration identique à celle décrite ci-dessus. On obtiendra un second surnageant après une centrifugation de 35 min à 40000 RPM. Le pH de ce surnageant sera ramené à 7,4 par du tris 0,5 M pH 7,4 pour l'immunoprécipitation. La troisième extraction va lyser les membranes et par conséquent libérer les protéines membranaires. Les culots de la dernière centrifugation seront resuspendus dans 0,5 ml d'une solution contenant du tris PO4 pH 7,4 / triton X-100 0,2 % et des inhibiteurs de protéases en concentration toujours identique à celle décrite ci-dessus. Après une centrifugation de 35 min à 40000 RPM, on récupère le dernier surnageant.

F. L'immunoprécipitation

On va additionner au premier tiers des fractions du gradient les inhibiteurs de protéases (IAA 5 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1mM, Tris 50 mM pH 7,4, triton X-100 0,1 %, aprotinine 100 µU/ml, leupeptine 40 mM). On porte le volume à 1 ml avec de l'eau distillée. Viendra ensuite une centrifugation à 30000 RPM pendant une heure. Le surnageant ainsi obtenu pourra, comme les trois autres, faire l'objet d'une préabsorption.

1) La préabsorption.

Elle est nécessaire pour éliminer les protéines qui se fixeraient de manière non spécifique sur la protéine A-sépharose qui sera utilisée par la suite pour récupérer les complexes cathepsine C-anticathepsine C. Les fractions seront gardées 2 X 30 min à 4°C en présence de 15 µl de protéine A sépharose.

2) L'immunoprécipitation proprement dite.

Après élimination des culots de protéine A sépharose, on ajoute 0,8 fois le volume de l'échantillon de PBS contenant de la sérum albumine bovine à 0,5 %, du désoxycholate à 0,5 %, du triton 1 % et du sodium dodécyl sulfate 0,2 % (immunomix 0,2 % SDS).

On additionne ensuite 2 μ l d'anticorps.

Remarque : Les anticorps contre la cathepsine C utilisés ont été purifiés à partir d'immunsérum de lapin, par chromatographie sur DEAE cellulose.

Après 16 h, on additionne la quantité optimum de protéine A sépharose à chaque tube, soit 20 μ l de suspension 1/3 .

On laisse réagir 30 min à 4°C.

Après deux minutes de centrifugation, on se débarrasse du surnageant et on lave les culots de protéine A sépharose-anticathepsine C-cathepsine C, successivement par 1 ml d'immunomix 0,2 % SDS, 1 ml d'immunomix 2 M KCl ne contenant plus de SDS, 1 ml de solution contenant du SDS 0,1 %, NaCl 0,56 M et du Nonidet P40 0,05 % pH 8,6 . On termine par deux lavage au PBS dilué 10 X .

On additionne à chaque culot 35 μ l d'eau distillée et 35 μ l de solubilisateur non réducteur :

SDS 0,005 %
bleu de bromophénoïl 0,06 %
glycérol 20 %
tris HCl 0,25 M, pH 6,8

On chauffe les tubes pendant 5 min à 100°C.

On décante, et on analyse les surnageants par SDS PAGE.

G. Electrophorèse en gel de polyacrylamide(SDS Page)

Ce type d'électrophorèse va permettre de séparer les protéines en solution en fonction de leur poids moléculaire (PM). En effet, les modifications subies par les polypeptides entraînent une différence de PM.

Les protéines dénaturées et chargées négativement sont déposées sur un gel de polyacrylamide 15 %.

On place les échantillons au niveau de la borne négative, la positive se situant à l'opposé. Dès que le courant sera établi, les protéines migreront vers la borne positive avec une distance de migration inversement proportionnelle à son PM (Laemmli, 1970).

Le tampon d'électrophorèse se compose de 0,62 % Tris, 2,88 % glycine, 0,1 % SDS.

On arrivera à déterminer le PM de ces protéines en faisant migrer en même temps une solution étalon contenant différentes protéines de poids moléculaire connu : phosphorylase b (Mr : 93000)

serum albumine bovine modifiée (Mr : 61000)

ovalbumine (Mr : 46000)

anhydrase carbonique (Mr : 30000)

cytochrome C (Mr : 12300)

Il existe en effet une relation directe entre la distance parcourue par les protéines et le log PM. Nous pourrions établir une droite d'étalonnage en mesurant les diverses distances de migration des protéines-étalon. A partir de cette droite, la connaissance de distance de migration pour des protéines inconnues nous permettra de déterminer leur PM.

H. La fluorographie.

Une fois la migration terminée, les gels seront traités pour la fluorographie.

Les gels seront déshydratés par trois passages dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO). On imprègne le gel d'un scintillant, qui est le diphenyloxazole 0,27 %. Ce dernier est précipité en passant le gel dans un bain d'eau de ville. Les gels seront séchés et placés dans des cassettes étanches à la lumière entre deux films radio.

Il resteront à -80°C pendant une période suffisante pour impressionner les films, à partir desquels on tirera des photos présentées dans les résultats.

I. Dosage des enzymes de référence.

Afin d'étudier le transport de la cathepsine C, il faut pouvoir associer les polypeptides immunoprécipités à partir des fractions de gradient à divers types de structures cellulaires.

Pour ce faire, un système de référence est nécessaire. Parallèlement aux gradients réalisés sur des cellules marquées, des gradients froids ont été réalisés sur des cellules n'ayant pas incorporé de traceur radioactif, mais ayant subi les mêmes traitements que lors d'un marquage.

Des enzymes de référence ont été dosées sur les fractions des gradients froids.

Conditions des dosages des différents enzymes marqueurs :

1. La cathepsine C a été mesurée comme marqueur des lysosomes selon la méthode de Jadot (1984), au moyen de glycyl-arginyl-naphtylamide à pH 6,0.

On mesure la naphtylamine libérée par colorimétrie .

2. La NADPH cytochrome C réductase comme marqueur du RE a été mesurée suivant la réduction du cytochrome C au spectrophotomètre suivant la méthode de Beaufay et al. (1974).

3. La galactosyltransférase a été déterminée par mesure de carbone 14 galactose sur l'ovalbumine selon la méthode de Beaufay et al. (1974).

Les résultats seront fournis sous forme d'histogrammes, présentant la fréquence de chaque activité en fonction de la densité de chaque fraction.

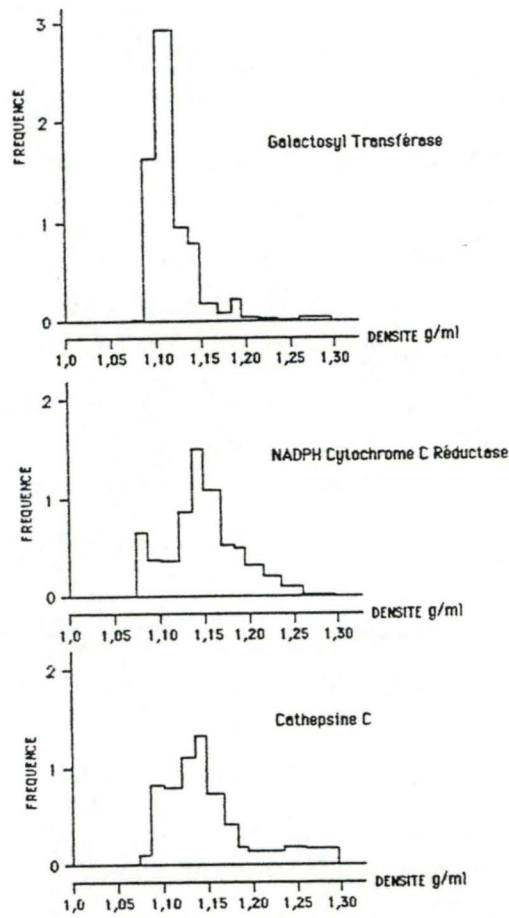


Fig.7 : Distribution en gradient de saccharose (1,05 à 1,32 g/ml) d'enzymes marqueurs d'une ML+P provenant de cellules d'hépatome 7777 de Morris .

CHAPITRE III : RESULTATS

A. Etude de la biosynthèse et du transport de la cathepsine c par centrifugation isopycniq

Dans le but d'étudier la biosynthèse et le transport de la cathepsine C, nous avons procédé à des expériences de marquage sur des hépatomes 7777 de Morris. Ces "pulse-chase" et marquages longs ont été suivis d'une centrifugation différentielle qui a fourni la fraction ML+P, enrichie en lysosomes, appareil de Golgi, et réticulum endoplasmique (R.E). Ensuite, un gradient isopycniq de saccharose a permis de répartir les granules en fonction de leur densité, afin de déterminer la localisation de l'enzyme et de ses précurseurs durant différentes périodes de temps après leur synthèse, en comparant leur distribution à celle d'enzymes de référence .

C'est la première fois que ce type d'approche expérimentale est utilisé pour étudier la biosynthèse d'une enzyme lysosomale.

1) Distribution des enzymes de référence

Des gradients froids ont été réalisés à partir de ML+P provenant de cellules non marquées . A partir de ceux-ci, nous avons déterminé la distribution de l'activité des trois enzymes de référence.

Les distributions de la galactosyl transférase (marqueur du Golgi) de la NADPH cytochrome C réductase (marqueur du R.E) et de la cathepsine C (marqueur des lysosomes) sont reproduites à la **Fig.7** .

On observe que La galactosyl transférase se répartit autour d'une densité de 1,12 g/ml, tandis que la NADPH cytochrome c réductase s'équilibre dans une région de densité de 1,15-1,16 g/ml .

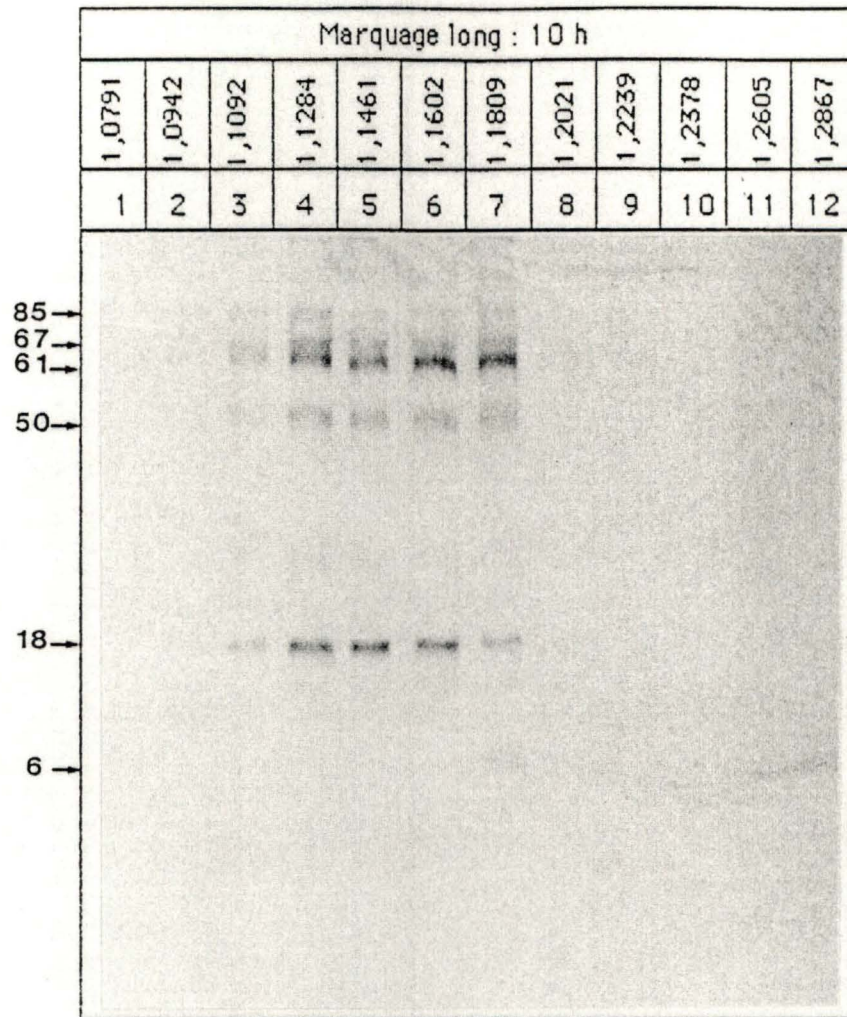


Fig.8 :Distribution en gradient de saccharose (1,05 à 1,32 g/ml) des peptides apparentés à la cathepsine C après marquage durant 10 h .

CHAPITRE III : RESULTATS

A. Etude de la biosynthèse et du transport de la cathepsine c par centrifugation isopycniq

Dans le but d'étudier la biosynthèse et le transport de la cathepsine C, nous avons procédé à des expériences de marquage sur des hépatomes 7777 de Morris. Ces "pulse-chase" et marquages longs ont été suivis d'une centrifugation différentielle qui a fourni la fraction ML+P, enrichie en lysosomes, appareil de Golgi, et réticulum endoplasmique (R.E). Ensuite, un gradient isopycniq de saccharose a permis de répartir les granules en fonction de leur densité, afin de déterminer la localisation de l'enzyme et de ses précurseurs durant différentes périodes de temps après leur synthèse, en comparant leur distribution à celle d'enzymes de référence .

C'est la première fois que ce type d'approche expérimentale est utilisé pour étudier la biosynthèse d'une enzyme lysosomale.

1) Distribution des enzymes de référence

Des gradients froids ont été réalisés à partir de ML+P provenant de cellules non marquées . A partir de ceux-ci, nous avons déterminé la distribution de l'activité des trois enzymes de référence.

Les distributions de la galactosyl transférase (marqueur du Golgi) de la NADPH cytochrome C réductase (marqueur du R.E) et de la cathepsine C (marqueur des lysosomes) sont reproduites à la **Fig.7** .

On observe que La galactosyl transférase se répartit autour d'une densité de 1,12 g/ml, tandis que la NADPH cytochrome c réductase s'équilibre dans une région de densité de 1,15-1,16 g/ml .

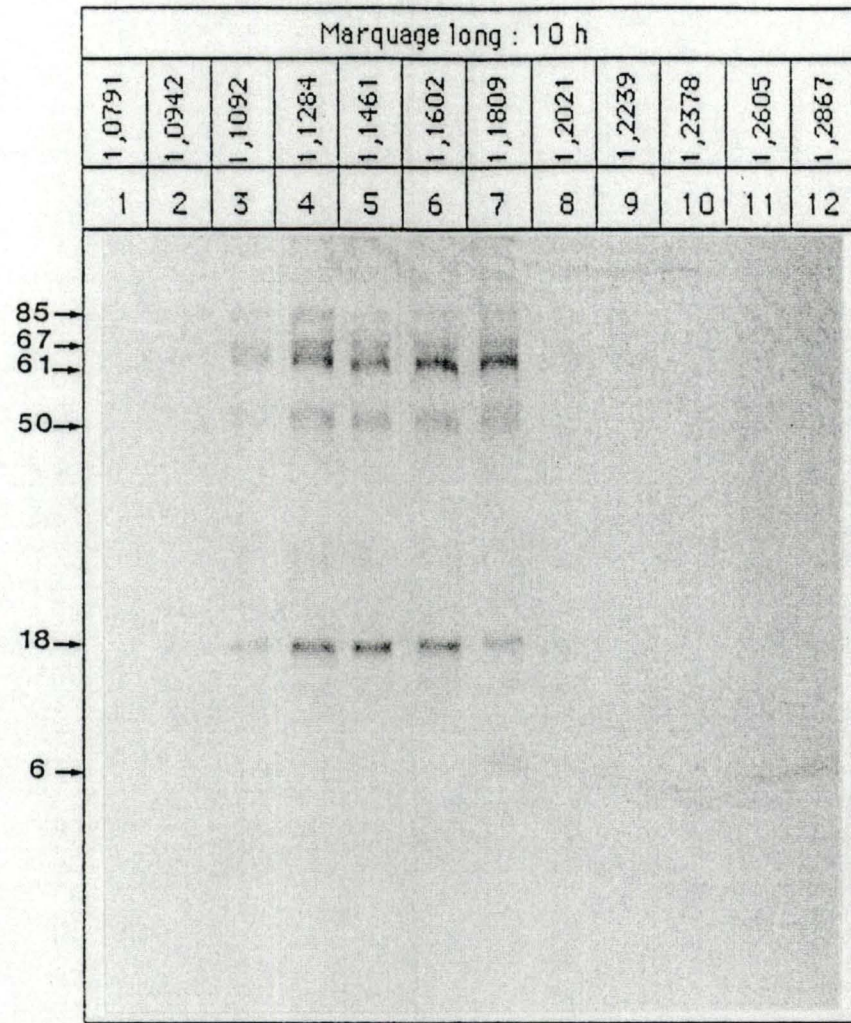


Fig.8 :Distribution en gradient de saccharose (1,05 à 1,32 g/ml) des peptides apparentés à la cathepsine C après marquage durant 10 h .

La cathepsine C, présente une distribution relativement étalée dans une zone de densité de 1,14 - 1,15 g/ml . On observe une très nette différence du comportement des lysosomes des cellules d'hépatomes de Morris 7777 par rapport aux lysosomes de foie de rat normal, qui s'équilibrent à une densité supérieure à 1,20 g/ml. Les lysosomes de l'hépatome 7777 de Morris sont donc nettement plus légers que les lysosomes de foie de rat normal .

2) Distribution en gradient de densité des polypeptides apparentés à la cathepsine C après un marquage long

Dans une première approche, les cellules d'hépatome 7777 ont été marquées en continu durant une période de plusieurs heures, en présence d'une faible quantité de [³⁵S] méthionine.

Dans de telles conditions toutes les formes polypeptidiques immunologiquement apparentées à la cathepsine c, présentes à un moment ou l'autre dans les cellules, sont marquées. La fraction ML+P préparée comme il a été décrit dans le chapitre "techniques expérimentales", a été centrifugée en gradient de saccharose de densité 1,05 g/ml à 1,32 g/ml. Après centrifugation, le gradient a été sectionné en 12 fractions. Après traitements appropriés, selon le protocole décrit dans les techniques expérimentales, les polypeptides reconnus par les anticorps anti-cathepsine c, ont été analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE); le gel d'électrophorèse a ensuite été révélé par fluorographie.

La **Fig.8** , obtenue par un marquage de 10 heures montre la distribution des polypeptides apparentés à la cathepsine c

Les polypeptides principaux présentent des poids moléculaires de 67, 61, 50 et 18 kd. Deux polypeptides moins importants apparaissent également à 85 et 93 kd. Les polypeptides sont répartis entre les fractions 2 et 7 du gradient (densité: 1,0942 à 1,1809 g/ml), ce qui correspond à la zone où se retrouvent les activités des enzymes de référence. Il est à remarquer que dans les dernières fractions où sont

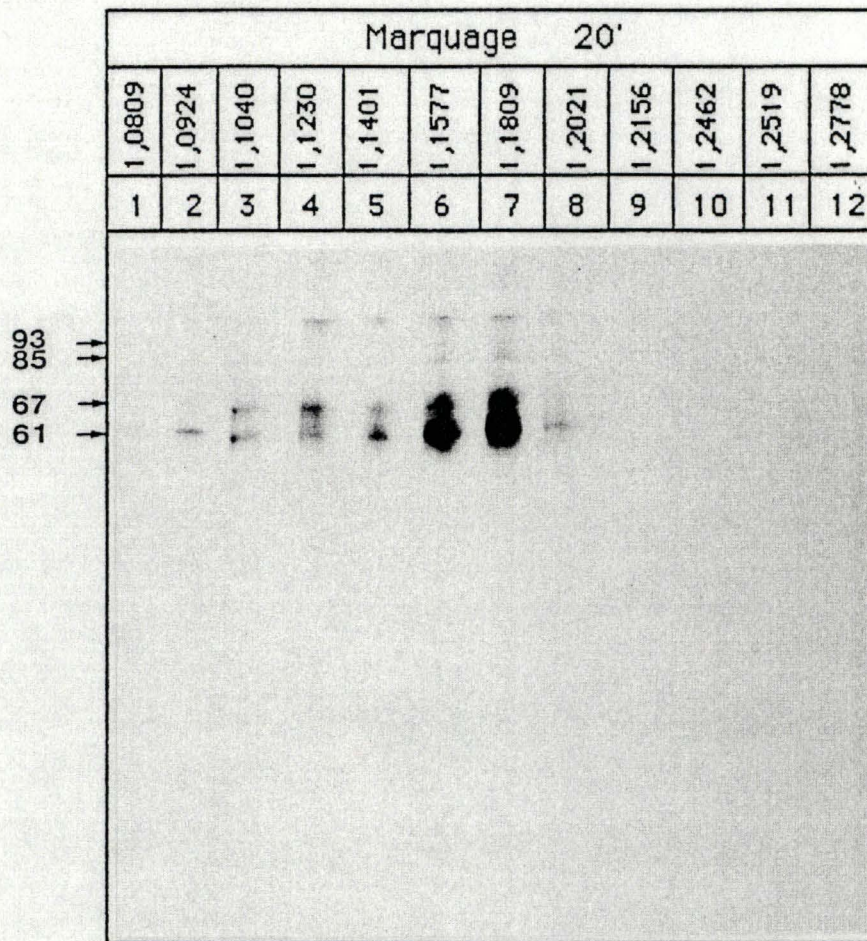


Fig.9 :Distribution en gradient de saccharose (1,05 à 1,32 g/ml) des précurseurs de la cathepsine C après un marquage de 20 minutes .

détectés les polypeptides (fraction 7 principalement), un produit de 6 kd apparaît également.

3) Distribution en gradient de densité des polypeptides apparentés à la cathepsine C, au cours d'expériences de marquage en "pulse-chase"

Au cours d'une deuxième série d'expériences nous avons soumis à la centrifugation isopycnique des fractions ML+P, provenant de cellules d'hépatome 7777 marquées en pulse-chase.

En d'autres termes, les cellules ont été marquées dans une brève période (20 minutes de pulse) en présence d'une forte concentration de méthionine radioactive. Les cellules ont été ensuite maintenues durant des périodes allant de 30 minutes à 6 heures, en présence de milieu de chasse, contenant une grosse quantité de méthionine non-radioactive. Dans ces conditions, d'une part, seuls les polypeptides synthétisés durant la période de 20 minutes de marquage ont incorporé de la [³⁵S] méthionine et de ce fait seront les seuls à être détectés après immunoprécipitation et fluorographie. D'autre part, l'analyse de ces polypeptides marqués après différents temps de chasse permet d'observer leur devenir au cours du temps, et aussi bien du point de vue des modifications apportées à leur structure moléculaire que du point de vue de leur localisation subcellulaire.

Durant une période de marquage de 20 minutes, deux polypeptides apparaissent en quantité importante: un de 61 kd, l'autre de 67 kd. On distingue également à l'état de traces, deux autres polypeptides de 90 et 85 kd (**FIG.9**).

Bien que l'on retrouve des polypeptides dans les fractions 2 à 8 du gradient, la majeure partie des 61 kd et 67 kd est localisée dans les fractions 6 et 7 de densité 1,1577 et 1,1809 g/ml.

Ces polypeptides s'équilibrent donc dans le gradient dans une zone de densité qui, si l'on se réfère à la distribution des enzymes de référence, correspond à la région où l'on retrouve l'activité de la NADPH cytochrome c réductase, enzyme marqueur du réticulum endoplasmique,

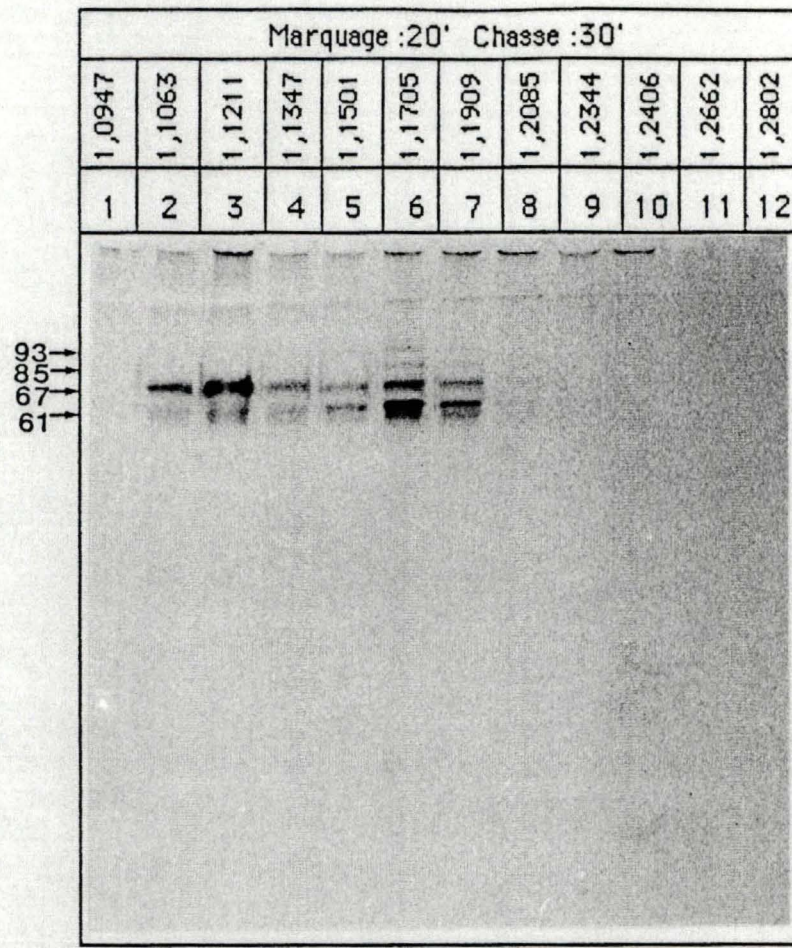


Fig.10 :Distribution en gradient de saccharose (1,05 à 1,32 g/ml) des précurseurs de la cathepsine C après un marquage de 20 minutes et un temps de chasse de30 minutes .

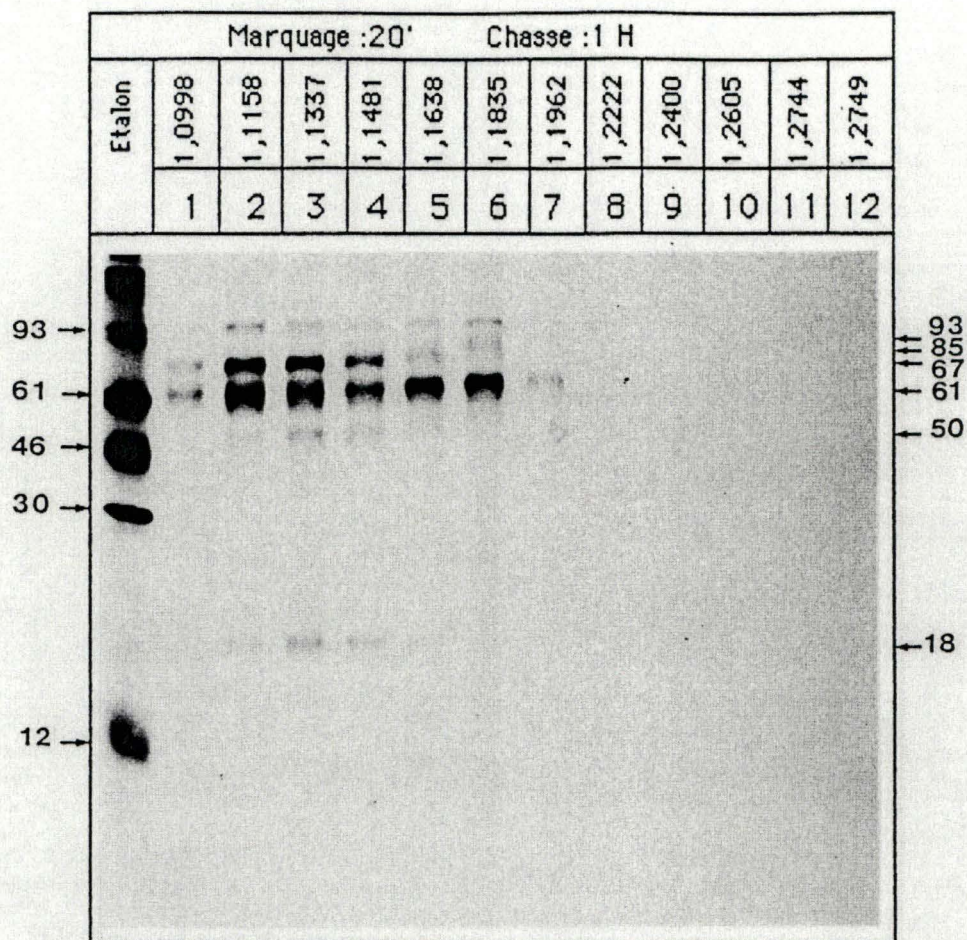


Fig.11 :Distribution en gradient de saccharose (1,05 à 1,32 g/ml) des précurseurs de la cathepsine C après un marquage de 20 minutes et un temps de chasse d'une heure .

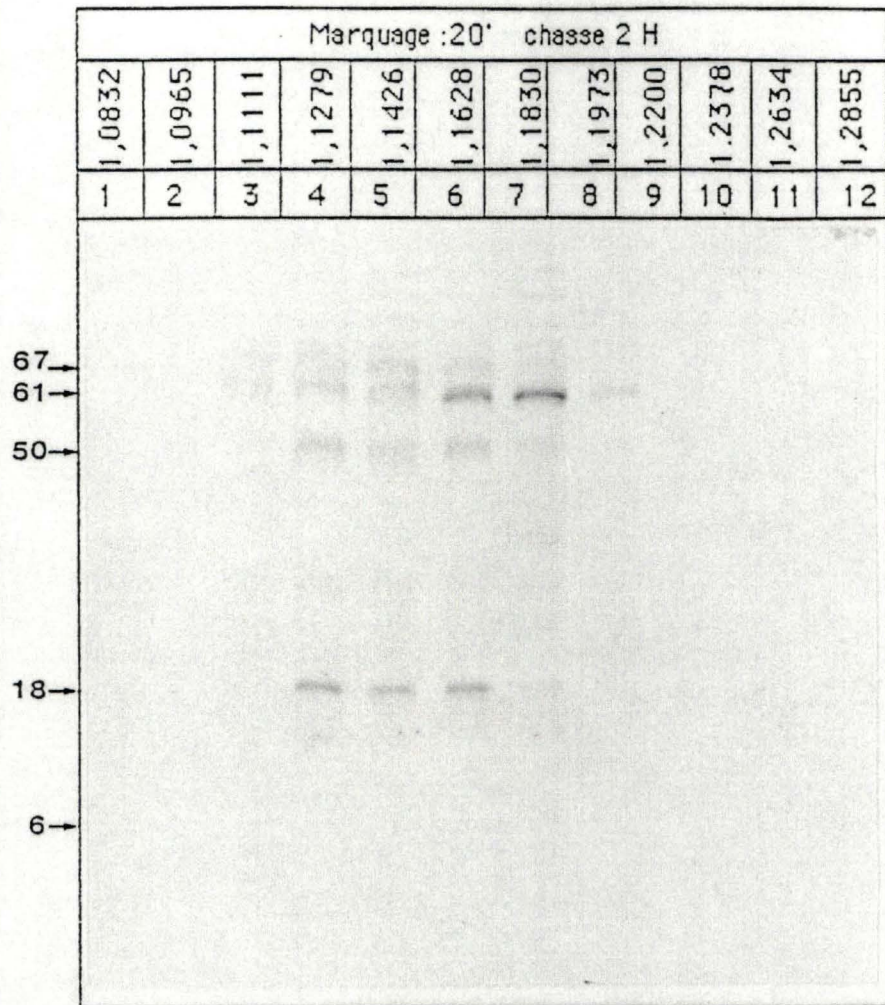


Fig.12 :Distribution en gradient de saccharose (1,05 à 1,32 g/ml) des précurseurs de la cathepsine C après un marquage de 20 minutes et un temps de chasse de 2 heures .

site de la synthèse des protéines lysosomales, membranaires et de sécrétion .

Après 30 minutes de chasse (**Fig.10**), les polypeptides de 61 et 67 kd se retrouvent toujours dans les fractions correspondant au reticulum endoplasmique, mais également de manière très nette dans des zones de plus faible densité, qui d'après la distribution de la galactosyl transférase correspondent à la zone d'équilibration de l'appareil de Golgi.

On remarque donc, une redistribution vers les régions légères, mais celle-ci n'est pas symétrique . En effet, le 61 kd semble se maintenir en plus grande proportion dans les zones de haute densité (1,1835 g/ml) tandis que le 67 kd se retrouve principalement dans les zones plus légères de densité (1,1211 g/ml).

Après une heure de chasse, on retrouve le peptide de 61 kd (**Fig.11**) dans les fractions 2 à 6. (densité 1,1158 à 1,1835 g/ml). Le polypeptide de 67 kd, quant à lui est localisé presque exclusivement aux densités de 1,1158-1,1337 g/ml, et présente une distribution très semblable à celle de la galactosyl transférase, en accord avec ce qui est observé après 30' de chasse.

C'est à partir de ce temps de chasse que l'on voit apparaître dans les fractions 2, mais surtout 3 et 4, des polypeptides de taille plus faible à 50 kd et à 18 kd. Cette forme de 18 kd correspond à la sous-unité native de l'enzyme (Mc Donald et al 1969).

Ces formes intermédiaires de 50 et natives de 18 kd sont présentes dans les fractions plus lourdes (densités 1,13, 1,14 g/ml) que celles contenant les éléments du Golgi (1,12 g/ml) et qui correspondent à la zone d'équilibration des lysosomes dans les hépatomes 7777 de Morris. Sur cette figure sont également présentes les protéines étalons de poids moléculaire connus .

Après 2 heures de chasse (**Fig.12**), la diversité des polypeptides est importante. On retrouve le 61 kd réparti de la fraction 3 à 7, et le 67 kd de la fraction 4 à 7. Il en est de même pour le 18 et le 50 kd. Les polypeptides disparaissent des fractions légères pour se retrouver principalement dans les fractions de densité 1,14 à 1,19 g/ml, ce qui

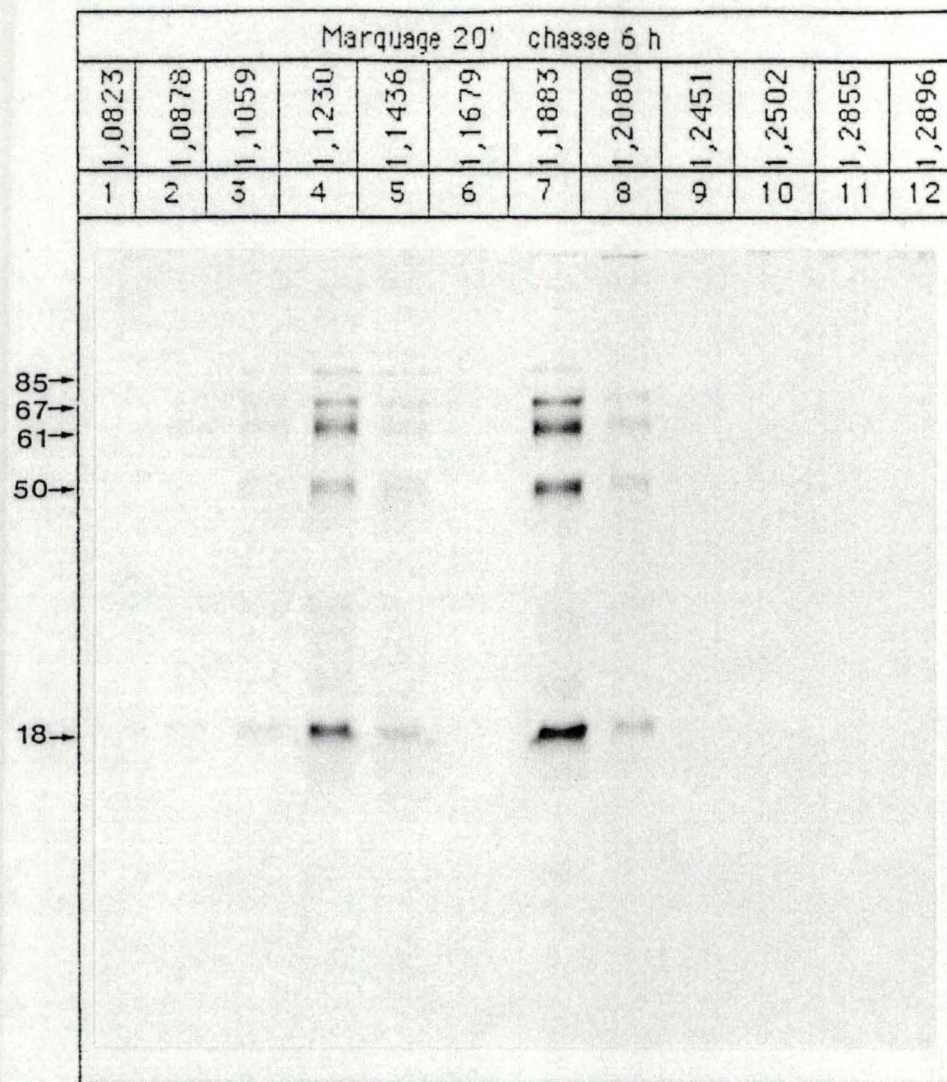


Fig 13 :Distribution en gradient de saccharose (1,05 à 1,32 g/ml) des précurseurs de la cathepsine C après un marquage de 20 minutes et un temps de chasse de 6 heures .

correspond de nouveau à la densité de distribution de la cathepsine C . Ce déplacement correspond également à l'apparition des formes intermédiaires et natives de l'enzyme .

Des peptides mineurs se retrouvent également dans les fractions 4,5,6,7 à des kd de 26, 20, 15, et 6 kd.

Le peptide de 6 kd pourrait être considéré comme une seconde sous-unité de l'enzyme mature . En effet Mc Donald et al (1969) ont proposé sur base d'électrophorèse SDS-PAGE et d'analyse de groupes N-terminaux l'existence de sous-unités, dont la plus petite fraction a un poids moléculaire 3 fois plus faible que la grosse.

Après 6 heures de chasse (**Fig.13**), on n'observe pas de modification importante par rapport au temps de chasse 2h. En effet la majeure partie des peptides se retrouve dans les fractions 3 à 8, correspondant à des densités de 1,13 à 1,22.g/ml . Les peptides les plus importants sont toujours les formes 61, 67, 50 et 18 kd, surtout présents dans les fractions 4, 5, 7, 8. Le 85 kd se retrouve dans la fraction 4, 5, 7, idem pour les 15, 20 et 26 kd.

L'absence de polypeptides marqués au niveau de la fraction 6 est due à une perte accidentelle de l'échantillon correspondant au cours du traitement pour l'immunoprécipitation.

4) Discussion

Après 20 minutes de synthèse, les précurseurs de la cathepsine C, c'est à dire les peptides de 61kd et 67kd, sont associés à des vésicules qui se révèlent correspondre au réticulum endoplasmique, site de synthèse des protéines lysosomales.

Des immunoprécipitations sur des fractions obtenues par centrifugation différentielle de cellules de 7777 marquées en pulse chase ont montré qu'à aucun moment on ne pouvait retrouver des précurseurs de la cathepsine C dans le cytoplasme (Mainferme et Wattiaux, 1988).

Trente minutes après la synthèse, ces 2 peptides migrent partiellement vers le Golgi. Le phénomène s'accroît au cours du temps,

jusqu'à 1 heure de chasse. On observe très distinctement à ce moment une distribution préférentielle du polypeptide de 67 kd dans le Golgi par rapport à un peptide de 61 kd qui tend à se répartir plus ou moins uniformément dans la zone de densité 1,1158 à 1,1835.

Bien que ne disposant pas d'arguments expérimentaux à ce sujet, nous serions enclin à penser que le polypeptide de 67 kd pourrait provenir du 61 kd, suite à la formation d'oligosaccharides complexes.

Cette hypothèse irait dans le sens des données citées plus haut, et serait en faveur de l'idée que les précurseurs des enzymes lysosomales traversent tout l'appareil de Golgi avant de quitter celui-ci à hauteur du "trans Golgi network", puisque c'est dans le trans Golgi que s'effectue la dernière réaction de glycosylation produisant les oligosaccharides complexes, notamment l'addition de galactose et d'acide sialique.

Des formes façonnées de la cathepsine C commencent à apparaître à partir d'une heure de chasse, dans les régions de densité intermédiaire (1,13 ; 1,14). Deux heures après la synthèse des polypeptides de haut poids moléculaire, les formes de 50 et 18 kd sont nettement visibles, et sont associées aux lysosomes, indiquant par là, que des modifications protéolytiques se produisent une fois le transfert dans les lysosomes effectué. Six heures après la synthèse, plus aucune modification n'apparaît.

La centrifugation isopycnique a permis d'établir une séquence temporelle relativement fine du processus de transport des précurseurs de la cathepsine C vers les lysosomes. Elle révèle un passage du R.E vers le Golgi, puis vers les lysosomes qui se superpose parfaitement à la séquence établie par Mainferme et Wattiaux (1988), par centrifugation différentielle (cfr introduction), puisque après une brève période de marquage, des précurseurs sont associés aux RE et au Golgi sédimentés dans la fraction P, et que le transfert vers les organites plus gros dans la fraction L ainsi que l'apparition de formes "façonnées" se produit 1 à 2 heures après la synthèse des polypeptides.

B. ASSOCIATION DE LA CATHEPSINE C A DES STRUCTURES MEMBRANAIRES.

Comme nous l'avons souligné dans l'introduction, 2 cas d'association temporaire de précurseurs d'enzymes lysosomales à des membranes ont été décrits dans la littérature.

Il s'agit de la phosphatase acide, exprimée dans les cellules BHK transfectée par un cDNA codant pour cette enzyme (Waheed et al 1988) et de la cathepsine D dans les macrophages de lapin (Diment et al 1988).

Le deuxième objectif de ce travail a été de rechercher si la cathepsine C au cours de son transport dans les cellules d'hépatome 777 de Morris, ne pouvait pas, elle aussi, se trouver associée à des structures membranaires.

1) Extraction séquentielle des fractions ML+P.

Pour ce faire le schéma expérimental décrit par Diment et al (1988) a été suivi en partie.

Dans les expériences décrites ci-dessous, des fractions ML+P ont été préparées à partir de cellules marquées par un pulse de 20' et récoltées après différents temps de chasse.

Les fractions ML+P ont ensuite subi divers traitements destinés à libérer successivement les constituants des organites présents dans ces fractions, selon la nature de ces organites et selon le mode d'association, des précurseurs ou enzymes à ceux-ci.

Après congélation, les ML+P ont été soumis à un choc hypotonique afin de libérer les polypeptides solubles dans la lumière des organites. Ces extractions ont été réalisées en présence de mannose-6-phosphate et d'EDTA afin de rompre les éventuelles associations de polypeptides aux récepteurs de mannose-6-phosphate, qui sont des protéines trans membranaires.

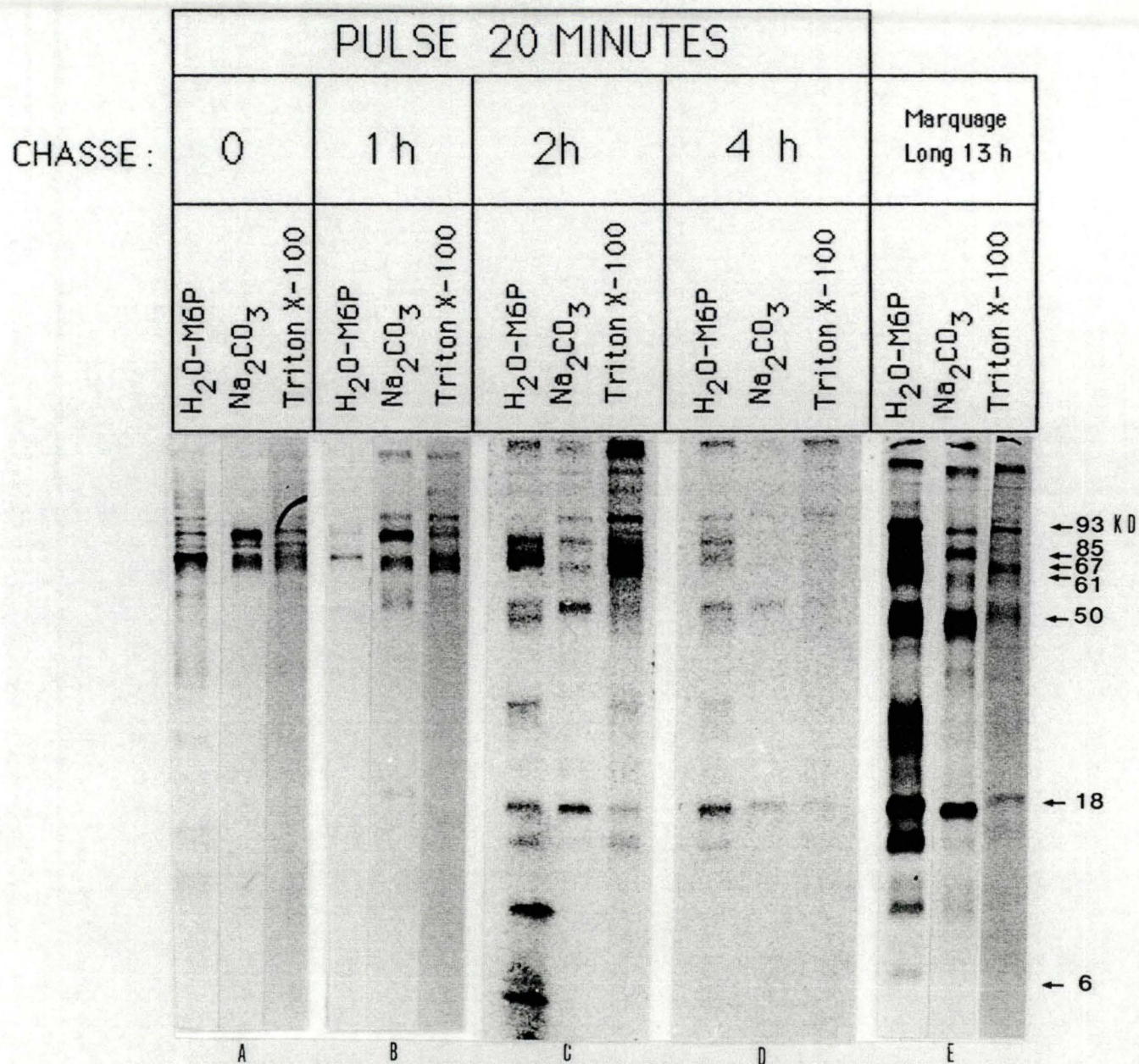


Fig.14 :Extractions successives (choc hypotonique , carbonate , triton X-100)sur des fractions ML+P , à des temps de chasse différents et pour un marquage long.

Les culots résiduels ont été extraits au carbonate à PH 10,6 .Ce traitement a pour effet de transformer les membranes entourant les vésicules en un feuillet membranaire plan, et de rompre les interactions des protéines périphériques avec les constituants membranaires (Fujiki et al).

Au cours d'une troisième étape, les polypeptides membranaires associés de manière intrinsèque aux membranes ont été solubilisés par extraction au triton X-100 (cfr techniques expérimentales pour les détails techniques).

La **Fig.14 a**, montre qu'un choc hypotonique sur les culots de ML+P au temps de chasse 0, permet la solubilisation d'une partie du précurseur de 61 kd présent dans la cellule, ainsi qu'une faible quantité de 67 kd.

L'extraction au carbonate met en évidence 3 peptides de 67, 63, 61 kd, et celle au triton nous donne les 3 mêmes peptides.

En comparant la proportion de polypeptides mis en évidence dans chaque extraction, il apparaît que le 61 kd est préférentiellement extrait par choc hypotonique tandis que le 67 kd l'est au carbonate et au triton X-100 . Le 61 kd est donc soluble tandis que le 67 kd semble associé à une membrane.

Après une heure de chasse, il y a très peu de matériel marqué extrait par choc hypotonique . De légères traces de 61 et 67 kd apparaissent malgré tout.(**Fig.14 b**)

Au carbonate, on distingue facilement des polypeptides de 85, 67, 61, 50 et 18 kd. Le triton libère quant à lui 3 peptides de 85, 67, 61 kd. En d'autres termes après une heure de chasse, seul un peu de 61 kd est soluble. Le reste nécessite soit du carbonate soit du triton X-100 pour être solubilisé .

Suite à une chasse de 2 heures, le choc hypotonique libère une proportion importante de polypeptides, dont les principaux se retrouvent à 67, 61, 50, 18, et 6 kd. (**Fig.14 c**)

L'extrait au carbonate contient une faible proportion de polypeptides. Seuls les 50 et 18 kd apparaissent. Dans l'extrait au triton

X-100 ,on retrouve les polypeptides de 85, 67, 61 kd en quantité appréciable. On distingue également dans ce dernier extrait des traces de 18, 20, 26 et 50 kd. Il apparait clairement que les formes façonnées et un certain pourcentage de formes de haut poids moléculaire sont solubles tandis que le 85 et 67 kd est extrait au triton X-100 , ce qui indiquerait bien la nature membranaire .

Après 4 heures, les 85, 67, 61, 50, 26, 18 et 15 kd sont solubilisés par choc hypotonique. Les 50 et 16 kd apparaissent très faiblement dans l'extraction au carbonate . Il ne reste pratiquement plus rien dans l'extrait au Triton X-100 . Visiblement, pratiquement tous les peptides sont solubles après 4 heures de synthèse.; de plus aucun de ceux-ci ne subsistent , dans le surnageant après extraction au triton X-100 . (Fig. 14d)

Le marquage long de 13 heures nous confirme l'observation puisque les peptides de 93, 85, 67, 61, 50, 26, 18, 15, 11 et 7 kd sont libérés par choc hypotonique. Dans l'échantillon au carbonate on retrouve principalement du 50 et du 18 kd, tandis qu'après extraction au triton X-100, on retrouve, en proportion extrêmement faible, l'éventail complet des polypeptides. (Fig. 14e)

2) Discussion

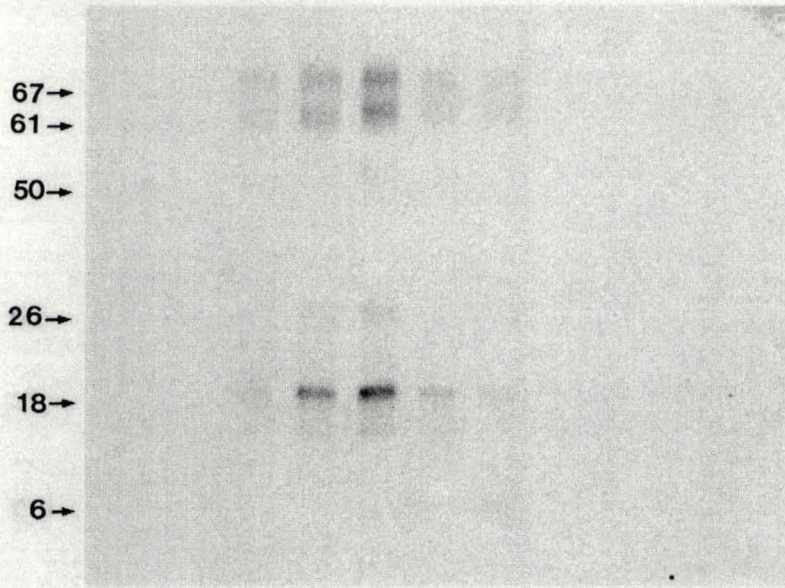
Les données indiquent , qu'au moins un polypeptide (67 kd) n'est pas libérable par choc hypotonique en présence de mannose-6-phosphate, pendant environ une heure après la synthèse .

Le précurseur de 61 kd quant à lui, est soluble durant un temps court après sa synthèse, puis s'associerait également à une membrane.

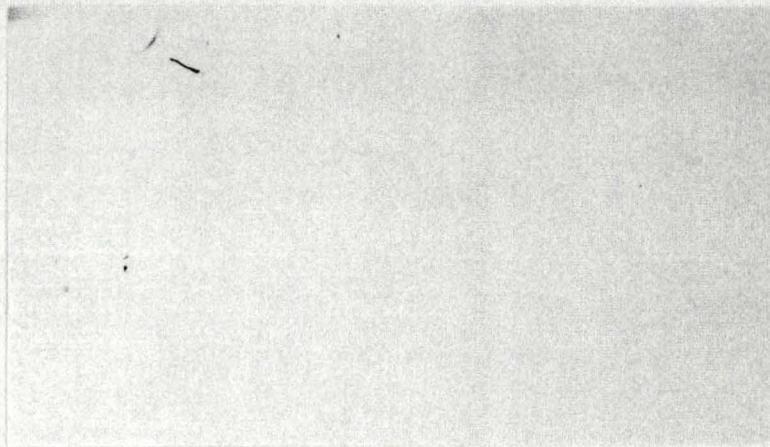
Comme c'est le Na_2CO_3 qui est responsable de la libération de ces polypeptides, on peut penser que soit l'association membranaire est relativement faible et qu'il ne doit pas y avoir d'insertion de polypeptides dans une membrane, à proprement parler, soit que ces polypeptides sont dans des vésicules résistant à la congélation et au choc hypotonique, et exigent un traitement au carbonate pour libérer leur contenu .

Marquage long 10 H

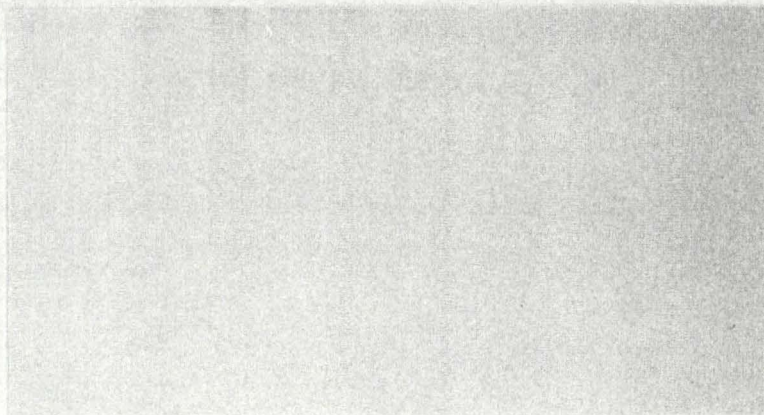
1,0791	1,0942	1,1092	1,1284	1,1461	1,1602	1,1809	1,2021	1,2239	1,2378	1,2605	1,2867
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12



Congélation -décongélait
choc hypotonique.



Na₂CO₃
pH 10,6



Triton X-100

Fig.15 :Extractions successives des précurseurs de la cathepsine C (choc hypotonique , carbonate , triton X-100)sur des fractions d'un gradient de saccharose (1,05 à 1,32 g/ml) après un marquage long de 10 heures .

Cependant, il faut remarquer qu'à 2 heures de chasse, bien qu'une quantité appréciable de polypeptides, en particulier ceux de faible poids moléculaire soit libérée par choc hypotonique, une proportion au moins aussi importante de formes de haut poids moléculaire, ne se libère que par extraction au triton, ce qui dans ce cas, serait en faveur d'une association intrinsèque.

Après 4 heures de chasse et plus, quasiment tous les polypeptides sont solubilisés après choc hypotonique.

Il est remarquable de constater que la libération en masse de polypeptides par traitement de congélation-décongélation, suivi d'un choc hypotonique, correspond au moment où l'on sait, à partir des expériences précédentes, qu'ils ont atteint les lysosomes. On admet donc qu'à ce moment tous les peptides apparentés à la cathepsine C sont solubles.

Afin de confirmer ces résultats, et d'essayer de déterminer à quel niveau interviendrait l'association, temporaire, des précurseurs de la cathepsine C, à une membrane, nous avons réalisé la série d'expérience suivante, consistant à extraire de la même manière des fractions obtenues après centrifugation en gradient de densité de la préparation de ML+P marquées.

C) Etude de l'association membranaire de la cathepsine C par centrifugation isopycnique

1) Extraction séquentielles sur les fractions du gradient

Pour l'expérience illustrée à la **Fig.15**, les cellules d'hepatome 7777 de Morris ont été marquées durant 10 heures en présence de 0,5 mCurie (18,5 MBq) de [³⁵S] méthionine . Une fraction ML+P a ensuite été préparée et soumise à la centrifugation isopycnique dans un gradient de saccharose de densité 1,05 à 1,32 g/ml durant 3 heures à 40 000 r.p.m. au rotor VTi 65

Les 12 fractions obtenues après section du tube contenant le gradient, ont été diluées par addition de saccharose 0,25 M imidazole 1mM

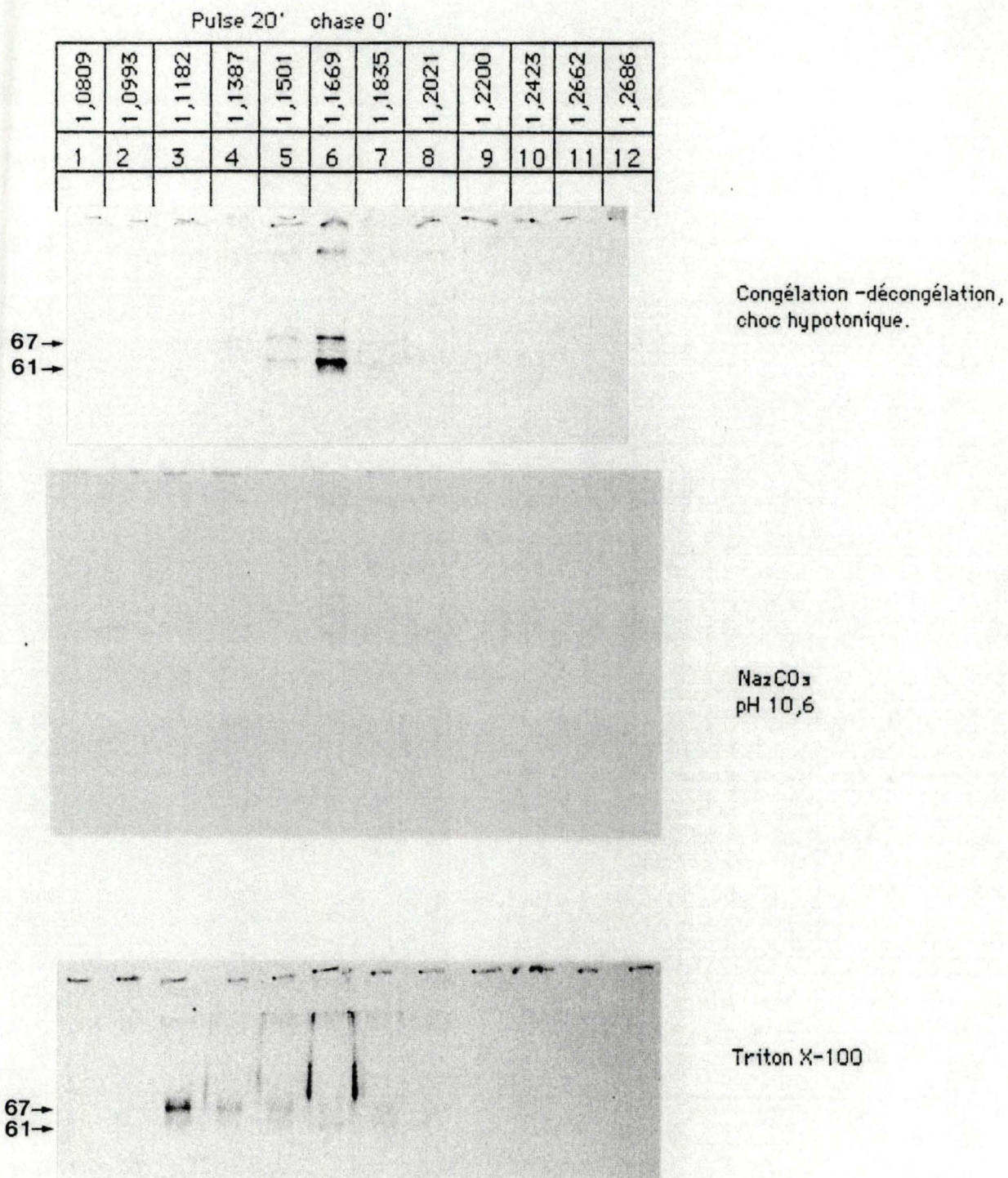


Fig.16 :Extractions successives des précurseurs de la cathepsine C (choc hypotonique , carbonate , triton X-100)sur des fractions d'un gradient de saccharose (1,05 à 1,32 g/ml) après un temps de marquage de 20 minutes .

pH 7,4 et d'eau afin de réduire la concentration en saccharose des fractions les plus lourdes du gradient. Les organites présents dans chacune de ces fractions diluées ont été sédimentés par centrifugation à 39 000 r.p.m durant 35 minutes afin d'obtenir des culots sur lesquels les divers traitements à savoir la congélation-décongélation suivie d'un choc hypotonique en présence de mannose-6-phosphate et d'EDTA, par le NA_2CO_3 pH 10,6, et par le triton X-100 ont pu être réalisés.

Les trois gels reproduits à la **Fig.15** ont été mis en exposition sur des films radio à -70°C durant une même période de temps, afin de permettre la comparaison de l'intensité des bandes d'un gel à l'autre. Il en sera de même pour toutes les expériences présentées ultérieurement. Cette figure indique au dessus du premier gel le numéro de chaque coupe et la densité de la fraction correspondante .

Le panneau supérieur correspond au traitement congélation-décongélation plus choc hypotonique, le panneau central à l'extraction au carbonate, et le panneau inférieur à l'extraction au triton X-100.

La **Fig.15** nous montre qu'après un marquage de 10 heures, la grosse majorité des polypeptides (68, 61, 50, 26, 18, 6 kd) sont solubilisés par le traitement consistant en une congélation suivie d'un choc hypotonique. Au cours d'une expérience contrôle et partie d'une fraction ML+P non marquée, le dosage de la cathepsine C dans les trois extractions a montré que 97% de celle-ci est bien libérée par le choc hypotonique .

Aucun polypeptide n'est détecté par l'extraction au carbonate; après extraction au triton X-100, on observe que de très faibles traces de polypeptides dans la région de 67,61,et 85 kd .

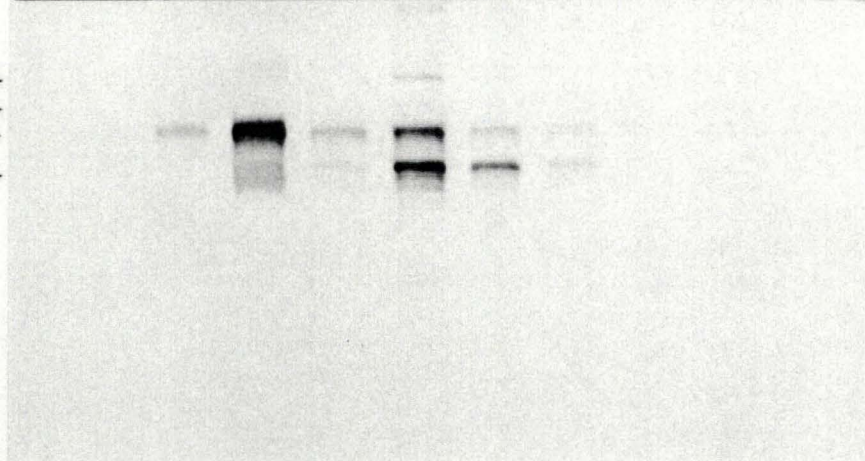
La distribution dans le gradient des formes, solubilisées par la congélation-décongélation-choc hypotonique, apparentée à la cathepsine C correspond à celle que nous avons décrites précédemment (c.f.r **Fig.8**), puisque les peptides se retrouvent dans une zone de densité de 1,1284 à 1,2021 g/ml .

A la **Fig.16** sont représentés les résultats obtenus pour les cellules ayant été marquées en pulse durant 20 minutes, en présence d'une mCurie (37 MBq) de ^{35}S méthionine. Conformément aux résultats précédents, on retrouve pour ce bref temps de marquage, deux polypeptides à 61 kd et 67

20' Pulse 30'chase

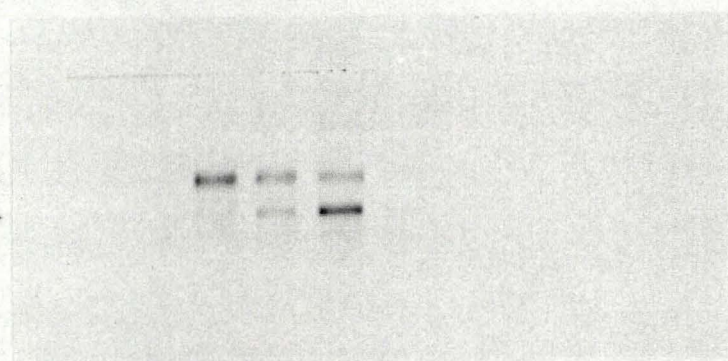
1,0692	1,0791	1,0919	1,1134	1,1294	1,1426	1,1633	1,1788	1,1967	1,2184	1,2434	1,2767
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

93 →
85 →
67 →
61 →



Congélation -décongélation,
choc hypotonique.

67 →
61 →



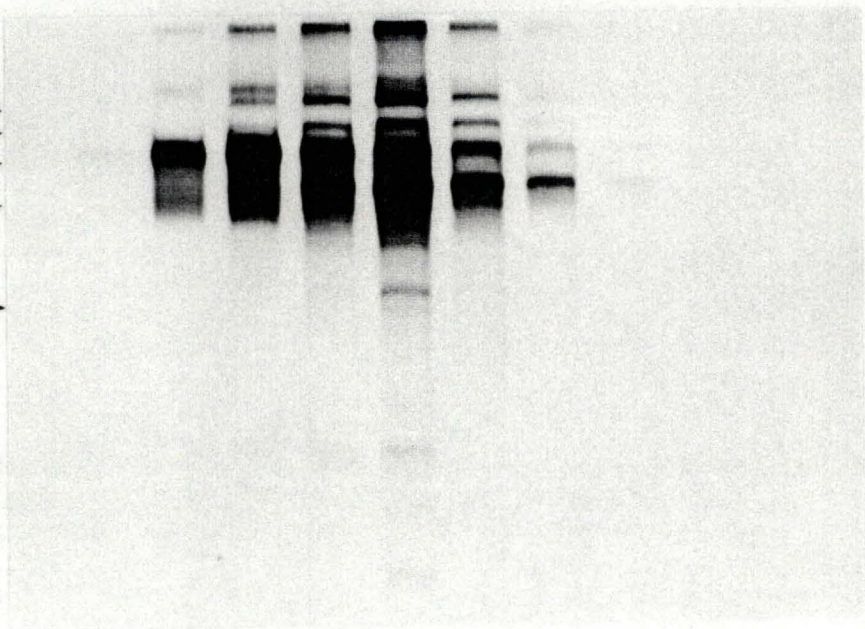
Na₂CO₃
pH 10,6

93 →
85 →
67 →
61 →

50 →

18 →

6 →



Triton X-100

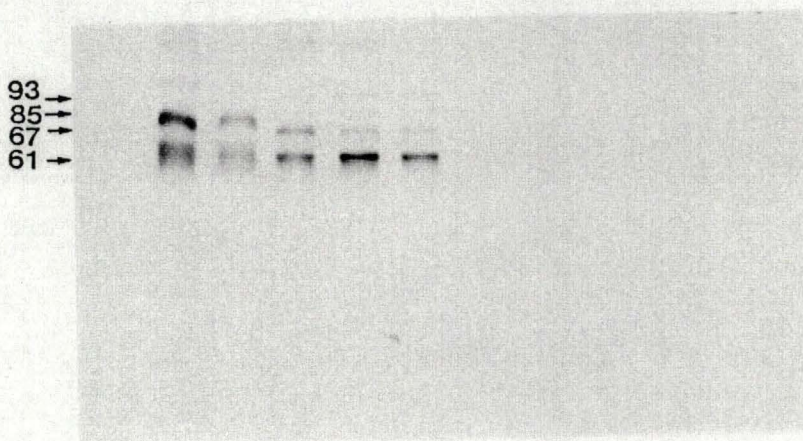
Fig 17 :Extractions successives des précurseurs de la cathepsine C (choc hypotonique , carbonate , triton X-100)sur des fractions d'un gradient de saccharose (1,05 à 1,32 g/ml) après un marquage de 20 minutes et un temps de chasse de 30 minutes .

20' Pulse 1h chase

1,0998	1,1158	1,1337	1,1481	1,1638	1,1835	1,1962	1,2222	1,2400	1,2605	1,2744	1,2749
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12



Congélation -décongélation
choc hypotonique.



Triton X-100

Fig.18 :Extractions successives des précurseurs de la cathepsine C (choc hypotonique, triton X-100)sur des fractions d'un gradient de saccharose (1,05 à 1,32 g/ml) après un marquage de 20 minutes et un temps de chasse de 1 heure .

kd. L'étape de congélation-choc hypotonique libère des peptides de 61 kd et 67 kd dans les fractions 5 et 6, correspondant à une densité de 1,1501 à 1,1669 g/ml, donc associés au reticulum endoplasmique.

L'extraction au carbonate libère une très faible quantité de polypeptides de 61 et 67 kd dans la fraction 6. L'extraction au triton X-100 laisse apparaître des peptides en quantité appréciable dans les fractions 3, 4, 5, 6 et 7, avec cependant une prépondérance du polypeptide de 67 kd dans la fraction 3 de densité 1,1182 g/ml.

La même démarche après 30 minutes de chasse (**Fig.17**) nous donnera dans l'extraction hypotonique des peptides dans les fractions 3 à 9 (densité: 1,1059 à 1,2185 g/ml). Un peptide de 67 kd est présent principalement dans les fractions 3 et 4. Le 61 et 67 kd se retrouvent dans une région de plus haute densité, fraction 6: 1,1690 g/ml.

L'extraction au carbonate met en évidence un profil semblable à celui qui est obtenu pour le choc hypotonique, mais la quantité de matériel immunoprécipité est nettement plus faible.

Par extraction au triton X-100, la quantité de polypeptides des immunoprécipités est beaucoup plus importante que pour les deux autres extractions. Ils sont répartis des fractions 3 à 8. Les 93, 67 et 61 kd sont évidemment présents dans toutes ces fractions, avec une prédominance dans la fraction 6 (densité : 1,1690g/ml) pour le 61 kd et dans les fractions 3, 4, 5 (densité : 1,1059 à 1,1426 g/ml) pour le 67 kd.

Les traces du polypeptide de 18 kd sont visibles dans la fraction 4, 5 et 6 (densité : 1,1245 à 1,1690 g/ml).

A l'examen de ces trois gels, il apparaît que l'extraction au triton X-100 libère une proportion de matériel marqué, plus importante que l'ensemble obtenu par les deux premières extractions réunies.

Après une heure de chasse (**Fig.18**), l'extraction par choc hypotonique libère des polypeptides dans les fractions: 2, 3, 4, 5, 6, correspondant à des densités de 1,1158 à 1,1835 g/ml. Le polypeptide commun à toutes ces fractions est le 61 kd, avec quelques traces de 67 kd. L'extraction au triton X-100 quant à elle, libère également le 61 kd, mais aussi le 67 kd avec des traces de 85 et 93 kd. Tous ces peptides se retrouvent dans les fractions 2 à 6, c'est-à-dire dans un interval de densité allant de 1,09 à 1,16 g/ml.

Pulse 20' chase 2H

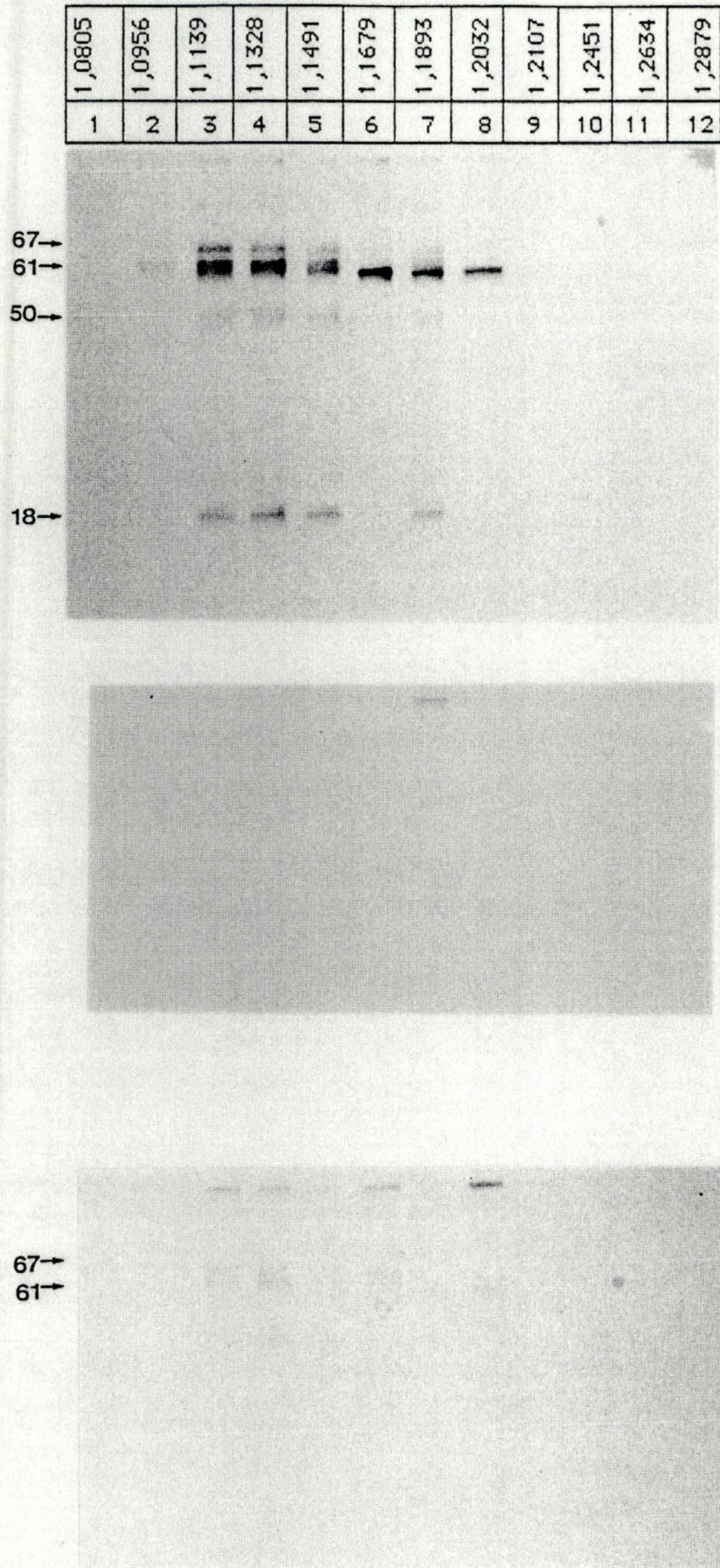
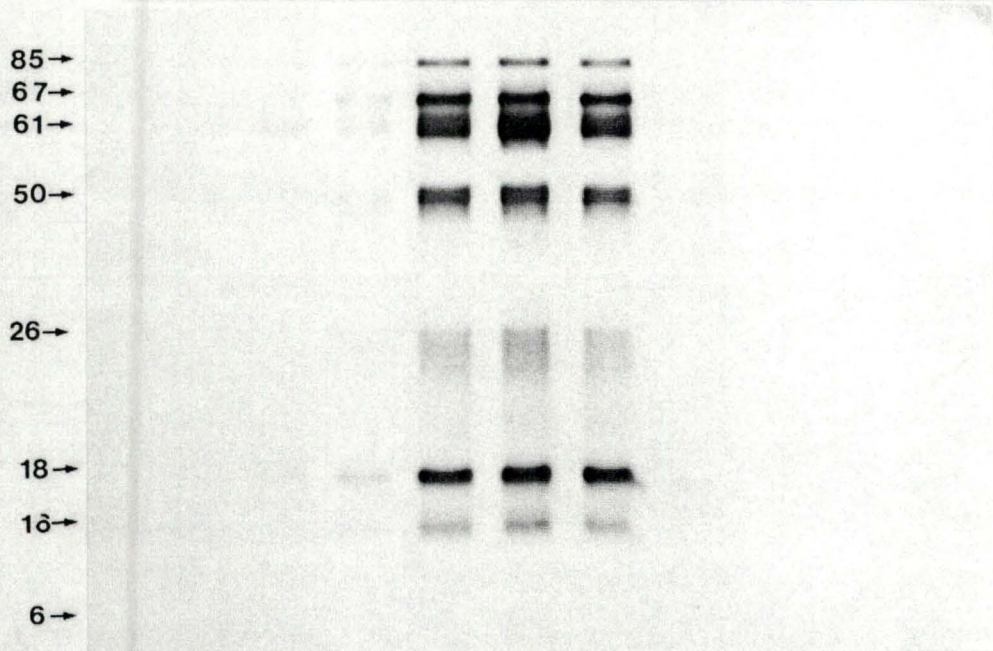


Fig.19 :Extractions successives des précurseurs de la cathepsine C (choc hypotonique , carbonate , triton X-100)sur des fractions d'un gradient de saccharose (1,05 à 1,32 g/ml) après un marquage de 20 minutes et un temps de chasse de 2 heures .

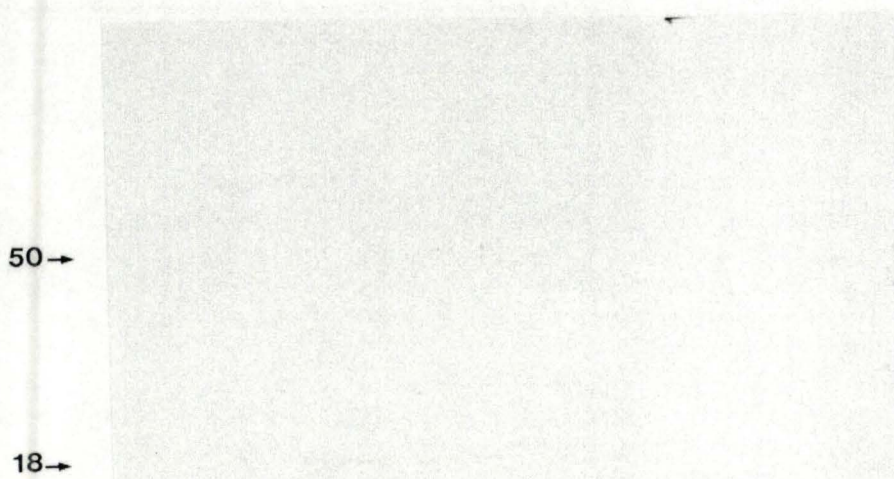
Marquage 20' chasse 6 H											
1,0823	1,0878	1,1059	1,1230	1,1436	1,1679	1,1883	1,2080	1,2451	1,2502	1,2855	1,2896
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12



Congélation -décongélation,
choc hypotonique.



Na_2CO_3
pH 10,6



Triton X-100

Fig.20 :Extractions successives des précurseurs de la cathepsine C (choc hypotonique , carbonate , triton X-100)sur des fractions d'un gradient de saccharose (1,05 à 1,32 g/ml) après un marquage de 20 minutes et un temps de chasse de 6 heures .

En proportion l'extraction au triton X-100 libère nettement plus de matériel que le premier traitement. Ici également, on observe donc qu'il faut recourir au triton X-100 pour libérer la plus grosse partie des polypeptides apparentés.

Après 2 heures de chasse (**Fig 19**), on observe de grandes différences dans la récupération des polypeptides selon les procédés d'extraction. On voit en effet, qu'après 2 heures de chasse, l'extraction hypotonique sur le gradient libère des peptides dans les fractions 3, 4, 5, 6 et 8. On retrouve le 67 kd, le 61 kd, le 50 kd et le 18 kd dans les fractions 3 à 8, ce qui correspond à des densités de 1,1158 à 1,1973. Le profil est semblable à celui qui a été obtenu précédemment pour cette même période de chasse (c.f.r: **Fig.12**). L'extraction au carbonate ne libère plus de matériel, sauf une trace de 61 kd dans la fraction 6.

Par extraction au triton X-100, on observe encore également, la présence de faibles quantités de formes de haut poids moléculaire.

Dans ce cas-ci, nous devons donc admettre que le traitement par choc hypotonique a été suffisant pour libérer la grosse majorité des polypeptides reconnus par les anticorps anti-cathepsine C.

Après 6 heures de chasse (**Fig.20**), on observe une situation comparable vu que le choc hypotonique solubilise la majorité des peptides. Les 85, 67, 61, 25, 18 et 15 kd se retrouvent dans les fractions 3, 4, 5, 6 et 7, aux densités de 1,1059 à 1,1679 g/ml. Ce profil est tout à fait conforme aux données obtenues précédemment.

L'extraction au carbonate ne libère qu'une faible quantité de polypeptides (61 et 67 kd) dans les fractions 5, 6 et 7. Ceci confirme les résultats obtenus pour l'expérience de 2 heures de chasse (**Fig.19**), puisqu'aucun polypeptide ne subsiste pour l'extraction au triton X-100, indiquant donc qu'ils ont tous été solubilisés par le choc hypotonique.

Le polypeptide de 15 kd pourrait provenir d'une déglycosylation. En effet, par traitement à l'endo F, le polypeptide de 18 kd est commuté en forme de 15 kd (Mainferme et Wattiaux, 1988).

2) Discussion.

Après 10 heures de marquage en continu (**Fig.15**), on solubilise la quasi totalité des précurseurs (61 et 67 kd) et de formes matures (18 et 7 kd) de la cathepsine C, suite à un cycle de congélation et un choc hypotonique en présence de mannose-6-phosphate et d'EDTA, afin de prévenir toute interaction aux récepteurs au mannose-6-phosphate de 46 kd (le récepteur de 215 kd est absent dans les cellules de 7777). Cela est parfaitement compréhensible puisque ces formes sont localisées dans les lysosomes, structures particulièrement sensibles à ces traitements .

Après un temps de marquage de 20 minutes (**Fig.16**), les polypeptides néosynthétisés correspondant à la cathepsine C sont extraits des fractions de manière différente .

En effet, dans les fractions du gradient correspondant au reticulum endoplasmique le peptide de 61 kd et dans une moindre mesure le polypeptide de 67 kd sont solubles, au sein des vésicules de R.E, tandis qu'un pourcentage appréciable de 67 kd, associé au Golgi serait fermement associé à une membrane puisqu'on ne peut l'extraire qu'au triton X-100 .

A des temps croissants après leur synthèse, les polypeptides semblent s'ancrer de manière importante dans une membrane. C'est ce que montrent les **Fig.17 et 18** pour des temps de chasse de 30 minutes et 1 heure. En effet, durant cette période le triton X-100 s'avère nécessaire pour libérer la grosse majorité des polypeptides .

Il semble donc possible, à partir de ces résultats, d'envisager un stade pour lequel les précurseurs de la cathepsine C sont associés de manière "intrinsèque" à une membrane. Cette association serait effective, déjà au niveau du Golgi et pourrait durer jusqu'à un stade ultérieur du transport, soit les vésicules de transport soit les endosomes. Les données expérimentales disponibles ne permettent évidemment pas de répondre à cette question .

Pour les périodes de chasse encore plus longues (2 h et 6 h) (**Fig.19 et 20**), on observe la libération de tous les peptides par congélation-décongélation et choc hypotonique, indiquant par là, la présence de polypeptides à l'état soluble dans des vésicules sensibles à la congélation et au choc hypotonique, bien qu'après 2 heures, une quantité non

négligeable soit encore présente dans l'extrait obtenu après traitement au triton X-100 .

Cette libération des formes lysosomales à partir de 2 heures de chasse correspond parfaitement au timing de transfert dans les lysosomes établi auparavant par les méthodes de centrifugation différentielle et isopycnique, indiquant que la livraison des précurseurs aux lysosomes a lieu environ 2 heures après leur synthèse (Mainferme et Wattiaux, 1988) .

Un processus analogue à celui qui a été mis en évidence pour la cathepsine D par Diment et al (1988) pourrait également intervenir dans la cellule d'hépatome 7777 de Morris. On serait ici en présence d'un troisième cas, où interviendrait une voie biosynthétique alterne, des enzymes lysosomales impliquant l'insertion temporaire dans une membrane de leurs précurseurs, peu de temps après leur synthèse .

Il faut souligner que l'intervention d'un stade membranaire au cours du transport de précurseurs d'enzymes vers les lysosomes s'observe aussi bien dans un système où le récepteur au mannose-6-phosphate (215 kd) est fonctionnel (la cathepsine D dans les macrophages de lapin) que dans un système où le mécanisme de reconnaissance via le récepteur au mannose-6-phosphate est déficient (la cathepsine C dans les hépatomes 7777 de Morris).

La question, reste ouverte, de savoir si ce phénomène ne constitue qu'un élément intégré dans le mécanisme impliquant le récepteur au mannose-6-phosphate, ou s'il constitue, en soi, un mécanisme de ciblage d'enzymes vers les lysosomes .

Cette dernière éventualité serait d'autant plus plausible que l'on sait que ces protéines de la membrane des lysosomes, sont transportées, via un système membranaire indépendant du mannose-6-phosphate et, que de plus, elles contiennent des résidus d'oligosaccharides complexes (Barriocanal et al, 1986); et le cas a été envisagé pour le peptide précurseur de 67 kd de la cathepsine C.

La nature de l'interaction entre le(s) précurseur(s) et la membrane sera à élucider. Diment et al (1988) en restent à des spéculations mais

tendent à considérer qu'il s'agit de l'insertion pure et simple d'une partie de la séquence (qui serait de type K.D.E.L) dans la membrane .

A cet égard, afin de savoir quel type d'interaction pourrait s'établir entre le précurseur de la cathepsine C et une membrane, il faut souligner que dans les résultats fournis dans ce travail, un désaccord apparaît entre les expériences d'extractions successives réalisées sur les fractions ML+P (cfr **Fig: 14**) et sur les fractions du gradient .

En effet, si les extractions par choc congélation/hypotonique, réalisées sur ML+P et sur les fractions de gradient après 20 minutes de chasse libèrent des peptides, principalement le 61 kd, c'est le carbonate en milieu alcalin qui libère le 67 kd à partir de la ML+P, et le triton X-100 sur les fractions du gradient. Après 1 heure de chasse, les polypeptides, de 61 kd et de 67 kd ne sont pas ou peu solubilisés par choc hypotonique, mais le sont par le carbonate à partir de la fraction ML+P, alors que sur les fractions du gradient, ils le sont par le triton .

La raison de cette différence n'apparaît pas clairement dans l'état actuel des données . Il se pourrait que les procédés d'extraction présentent des efficacités différentes suivant le type et la composition en fraction, ou que le traitement au carbonate, constitue un lavage supplémentaire sur ce qui est normalement soluble, à partir de la fraction ML+P.

Il n'en est pas moins vrai que l'interaction entre les précurseurs et la membrane est réelle, et qu'il ne peut s'agir de l'interaction entre les précurseurs et leur récepteur au mannose-6-phosphate puisque les expériences ont été pensées de manière à empêcher ce type d'interaction .

Etant donné, la forte proportion relative de polypeptides récupérés dans les extraits au triton X-100 dans certaines expériences ainsi que la subsistance des polypeptides de haut poids moléculaire dans l'extrait au triton X-100 après 2 heures de chasse, alors que toutes les formes "façonnées" sont solubles, il semble plausible de considérer que les précurseurs de la cathepsine C, soient réellement associés, de manière intrinsèque, à des vésicules membranaires durant leur transport vers les lysosomes .

CHAPITRE IV : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Nous nous étions fixé, dans ce mémoire, le but d'approfondir les études réalisées sur la biosynthèse de la cathepsine C, enzyme des lysosomes, et plus particulièrement nous intéresser à son transport vers ces organites .

L'application de la centrifugation isopycnique en gradient de saccharose (technique qui n'a jamais été utilisée dans ce domaine) sur des fractions ML+P de cellules d'hépatome 7777 de Morris, nous a permis de localiser les différents précurseurs de la cathepsine C dans les organites subcellulaires à différents moments de leur synthèse .

C'est ainsi que nous avons montré que les précurseurs néosynthétisés de la protéine se retrouvent sous forme de polypeptides de 61 kd et 67 kd dans des organites dont les densités correspondent à celle du reticulum endoplasmique .

Ces précurseurs se retrouvent de 30 à 60 minutes après synthèse, à des densités plus légères, correspondant à la zone d'équilibration de l'appareil de Golgi. Le polypeptide de 67 kd pourrait d'après les données de gradients, être produit à partir du polypeptide de 61 kd par formation d'oligosaccharides complexes, ce qui impliquerait que les précurseurs de la cathepsine C traversent tout l'appareil de Golgi, avant de quitter celui-ci à hauteur du "trans Golgi network" .

Au delà d'une heure de synthèse, les formes natives de la cathepsine C apparaissent. Elles se retrouvent dans une zone de densité légèrement plus élevée que le Golgi, là où s'équilibrent les lysosomes des cellules d'hépatome 7777 de Morris. Ces lysosomes présentent une caractéristique tout à fait particulière, en ce sens qu'ils sont beaucoup plus légers que les lysosomes de foie de rat normal ou d'hépatocytes cultivés en monocouche. De ce fait, le transfert des précurseurs et l'apparition des formes natives après "façonnage" protéolytique dans les lysosomes est quelque peu obscurci, par le recouvrement de la distribution des granules dans lesquels s'opère le transfert .

Des séries d'extractions séquentielles sur des fractions ML+P ou sur des fractions provenant du gradient de saccharose ont montré que les précurseurs de la cathepsine C se retrouvaient, pour une période transitoire, sous forme membranaire .

Cela se manifeste de manière évidente à partir de 30 minutes après leur synthèse et semble durer, jusqu'à plus de 2 heures après synthèse. Il semblerait que les précurseurs s'associent aux membranes, lors de leur passage à travers le Golgi, pour redevenir soluble lors du transfert vers les lysosomes .

On sait que dans le cas des hépatomes 7777 de Morris, le récepteur au mannose-6-phosphate de 215 kd cation indépendant est absent .Existerait-il un lien entre l'absence du 215 kd chez les hépatomes et le fait que le transport des précurseurs soit membranaire ? On pourrait croire en effet que ce mécanisme mis en oeuvre par ces cellules était présent pour pallier à un manque de récepteurs au mannose-6-phosphate .

Cependant, comme les premières observations de ce phénomène ont été réalisées sur des cellules où le système de reconnaissance via le mannose-6-phosphate est fonctionnel, il est concevable d'envisager l'association membranaire comme une voie de ciblage alterne (Diment et al, 1988) .

On pourrait envisager une analogie entre cette voie et la voie de transit des protéines de la membrane des lysosomes. Celles-ci sont transférées, associées à des structures membranaires, par un mécanisme indépendant du mannose-6-phosphate. De plus, ces protéines sont porteuses de chaînes d'oligosaccharides complexes . Or, ainsi qu'on le suppose plus haut, le précurseur de la cathepsine C de 67 kd serait également porteur d'oligosaccharides complexes. On disposerait donc d'un argument supplémentaire en faveur d'un mécanisme de transfert de la cathepsine C vers les lysosomes par une voie analogue à celle des protéines membranaires .

Ces données ouvrent la voie à de nombreux travaux de recherche .

Il serait en effet intéressant comme preuve directe de la présence d'oligosaccharides complexes sur le 67 kd, de réaliser des marquages de cellules en présence d'acide sialique radioactif .

Pour confirmer ces données, il serait important d'obtenir des données d'immunoprécipitation quantitatives, après extractions séquentielles .

Il serait également utile d'étendre ces études aux hépatocytes, d'une part puisque les lysosomes de foie de rat normal, s'équilibrent à des densités nettement plus élevées que dans les hépatomes, ce qui permettrait de mieux visualiser les processus de "façonnage" et de transport et puisque d'autre part, dans ces cellules, le récepteur au mannose-6-phosphate est fonctionnel.

Enfin, il pourrait s'avérer intéressant de rechercher des séquences d'insertion membranaire, dans la structure primaire de l'enzyme, obtenue après clonage de celle-ci.

BIBLIOGRAPHIE

- Barriocanal, J.G., Bonifacino, J.S., Yuan, L. and Sandoval, I.V.
Biosynthesis, glycosylation, movement through the Golgi system, and transport to lysosomes by an N-linked carbohydrate-independent mechanism of three lysosomal integral membrane proteins.
J. Biol. Chem. 261, 16755-16763, 1986.
- Beaufay, H., Amar-Cortese, A., Feytmans, E., Thinès-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M. and Berthet, J.
Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. I. Biochemical methods.
J. Cell Biol., 61, 188-200, 1974.
- Beaufay, H., Amar-Cortese, A., Feytmans, E., Thinès-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M. and Berthet, J.
Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. III. Subfractionation of the microsomal fraction by isopycnic and differential centrifugation in density gradient.
J. Cell Biol., 61, 213-231, 1974.
- Brown, W.S., Farquhar, M.G.
The mannose-6-phosphate receptor for lysosomal enzymes is concentrated in "cis" Golgi cisternae.
Cell. 36, 295-307, 1984.
- Brown, W., Goodhouse, J., and Farquhar, M.G.
Mannose-6-phosphate receptors for lysosomal enzymes cycle between the Golgi complex and endosomes.
J. Cell. Biol. 103, 1235-1247, 1986.
- De Duve, C.
Lysosomes revisited.
Eur. J. Biochem. 137, 391-397, 1983.

De Duve, C., Pressman, B.C., Giannetto, R., and Appelmans, F.
Tissue fractionation studies.6. Intracellular distribution patterns of
enzymes in rat liver tissue.
Biochem.J., 60, 604-617, 1955.

De Duve, C., and Wattiaux, R.
Function of lysosomes
Ann.Rev.Physiol., 28, 435-492, 1966.

Diment, S., Leech, M.S., Stahl, P.D.
Cathepsin D is membrane-associated in macrophage endosomes.
J. Biol. Chem., 253, 6901-6907, 1988.

Diment, S., and Stahl, P.
Macrophage endosomes contain proteases which degrade endocytosed protein
ligands.
J. Biol. Chem., 260, 15311-15317, 1985.

Erikson, A.H., and Blodel, G.,
Carboxyl-terminal proteolytic processing during biosynthesis of the
lysosomal enzymes β -glucuronidase and cathepsin D.
Biochemistry, 22, 5201-5205, 1983.

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

Gieselmann, V., Hasilik, A., and Von Figura, K.
Tartrate-inhibitable acid-phosphatase.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 365, 651-660, 1984.

Goldstein, J.L., Brown, M.S., Anderson, R.G.W., Russell, D.W. and Schneider,
W.J.
Receptor mediated endocytosis : concepts emerging from the LDL receptor
system.
Ann. Rev. Cell. Biol., 1, 1-39, 1985.

Griffith, G., and Simons, K.

The trans Golgi network sorting at the exit site of the Golgi complex.
Science, 234, 438-443, 1986.

Holtzman, E.

Lysosomes: A Survey, in Cell Biology Monographs vol.3, 1-28.

Edits., Alfert, Berkeley, Calif. W. Beermann, Tübingen G. Rudkin,
Philadelphia, Pa. W. Sandritter, Freiburg i. Br. P. Sitte, Freiburg i. Br., New
York, 1976.

Hoflack, B. and Kornfeld, S.

Purification and characterization of a cation-dependent mannose-6-
phosphate receptor from murine P38801 macrophages and bovine liver.
J. Biol. Chem., 260, 12008-12014, 1985.

Jadot, M., Colmant, C., Wattiaux-DeConinck, S and Wattiaux, R.

Intralysosomal hydrolysis of glycol-L-phenylalanine 2-naphtylamide.
Biochem. J., 219, 965-970, 1984.

Kornfeld, S.

Trafficking of lysosomal enzymes.
Faseb J. 1, 462-468, 1987.

Laemmli, U.K.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head
bacteriophage T4.
Nature., 227, 680-684, 1970.

Mainferme F., Wattiaux R. and Von Figura K.

Synthesis, transport and processing of cathepsin C in Morris hepatoma
7777 and rat hepatocytes.
Eur. J. Biochem. 263, 6901-6907 1985

Mainferme F. and Wattiaux R.

Biosynthesis of cathepsin C in Morris hepatoma 7777.
4th International Congress of cell Biology, Montreal, Canada
-Abstract P 9.5.2, 1988

Mainferme F. and Wattiaux R.

Biosynthesis of cathepsin C in rat hepatocytes and in Morris hepatoma 7777.

19th FEBS Meeting, Rome, Italy

-Abstract Mo 229, 1989.

McDonald, J.K., Zeitman, B.B., Reilly, T.J. and Ellis, S.

Two observations on the substrate specificity of cathepsin C (dipeptidyl aminopeptidase I).

J. Biol. Chem., 244, 2693-2709, 1969.

Mego, J.L.

The ATP-dependent proton pump in lysosome membranes. Still a valid hypothesis.

FEBS Letters, 107, 113-116, □1979.

Mueller, O.T., Honey, N.K., Little, L.E., Miller, D.L. and Shows, J.B.

Mucopolipidosis II and III. The genetic relationships between two disorders of lysosomal enzyme biosynthesis.

J. Clin. Invest., 72, 1016-1023, 1983.

Nichols, B.A.

Uptake and digestion of horseradish peroxidase in rabbit alveolar macrophages.

Lab. Invest. 47, 235-246, 1982.

Novikoff, A.B., Beaufay, H., and de Duve, C.

Electron microscopy of lysosomes rich fractions from rat liver.

J. Biochem. Biophys. Cytol. 2, 179, 1956.

Novikoff, A.B., and Holtzman, E.,

Lysosomes, in "Cells and Organelles", second edition, 136-152.

Edts: Holt, Rinehart, Winston. 1976.

Ohkuma, S., and Poole, B.

Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agent.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3327-3331, 1978.

Pohlmann, R., Krentler, C., Schmidt, B., Schröder, W., Lorkowski, G., Culley, J., Mersmann, G., Geier, C., Waheed, A., Gottschalk, S., Grzeschik, K.H., Hasilik, A., and Von Figura .

Human lysosomal acid phosphatase: cloning, expression and chromosomal assignment .

EMBO J. 7, 2343-2350, 1988 .

Reijngoud, D.J., and Tager, J.M.

Measurement of intralysosomal pH .

Biochem. Biophys. Acta., 297, 174-178, 1973.

Sheeler, P., Bianchi, D.E.

Lysosomes and microbodies, in Cell Biology: Structure, Biochemistry, and Function, 403-415.

John Wiley and Sons, New-York, 1980.

Skudlarek, M.D., Novak, E.K., Swank, R.T.,

Processing of lysosomal enzymes in macrophages and kidney.

Dingle, T.D., Dean, R.T., Sly, W., eds.

Lysosomes in biology and pathology, vol 7, Amsterdam .

Elsevier Science; 17-43, 1984 .

Varki, A. and Kornfeld, S.

The spectrum of anionic oligosaccharides released by endo- β -N-acetylglucosaminidase H from glycoproteine. Structural studies and interactions with the phosphomannonyl receptor.

J. Biol. Chem., 258, 2808-2818, 1985.

Vladutiu, G.D.

Effect of co-existence of galactosyl and phosphomannosyl residues on β -hexosaminidase on the processing and transport of the enzyme in mucopolidosis I fibroblasts.

Biochem. Biophys. Acta, 760, 363-370, 1983.

Vladutiu, G.D., and Rattazzi, M.

Excretion-remptake route of β -lysoaminidase in normal and I cell disease cultured fibroblasts.

J.Clin.Invest, 63, 595-601, 1979.

Waheed, A., Gottschalk, S., Hille, A., Krentler, C., Pohlmann, R., Braulke, T., Hauser, H., Geuse, H., and Von Figura, K.

Human lysosomal acid phosphatase is transported as a transmembrane protein to lysosomes in transfected baby hamster kidney cells.

EMBO J. 7, 2351-2358, 1988.

Walter, P., Gilmore, R., Blobel, G.

Protein translocation across the endoplasmic reticulum.

Cell. 38, 5-8, 1984.