



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Répartition intercellulaire d'une glycoprotéine de la membrane lysosomale, GP10D10, dans le foie de rat

De Waele, Laurence

Award date:
1988

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.

Département de Chimie Physiologique.

Promoteur : S. Wattiaux-De Coninck

REPARTITION INTERCELLULAIRE D'UNE
GLYCOPROTEINE DE LA MEMBRANE
LYSOSOMALE (GP10D10) DANS LE FOIE DE
RAT.

Laurence DE WAELE

ANNEE 1987-1988

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

Facultés des Sciences

rue de Bruxelles 61, B-5000 NAMUR

Tél. 081-22.90.61 Téléx 59222 facnam-b

Téléfax 081-23.03.91

REPARTITION INTERCELLULAIRE D'UNE GLYCOPROTEINE DE LA MEMBRANE LYSOSOMALE (GP10D10) DANS LE FOIE DE RAT.

LAURENCE DE WAELE

Résumé.

La détermination quantitative d'une glycoprotéine de la membrane lysosomale de foie de rat (GP10D10) a été mise au point par une technique immunochimique de compétition utilisant l'anticorps monoclonal 10D10.

La localisation intercellulaire de la GP10D10 dans le foie de rat a été établie grâce à la distribution, en gradients de densité de saccharose de cette protéine comparée à celle des enzymes marqueurs. Les modifications sélectives résultant de l'endocytose de Triton WR-1339 et de l'invertase ont permis de distinguer les différents types de lysosomes de foie de rat.

Abstract.

A method for the quantitative assay of a lysosomal membrane glycoprotein of rat liver (GP10D10) has been established, using the 10D10 monoclonal antibody in a competition immunochemical method.

Intercellular localization of rat liver GP10D10 has been investigated, by comparing the distribution of GP10D10 and marker enzymes in sucrose density gradients. Selective modifications resulting from the endocytosis of Triton WR-1339 and invertase have allowed to discriminate between the different kinds of rat liver lysosomes.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Septembre 1988

Laboratoire de Chimie Physiologique

Promoteur: Prof. S. WATTIAUX-DE CONINCK

R E M E R C I E M E N T S.

Ce travail terminé, je désire exprimer ma reconnaissance à la multitude de personnes qui, de près ou de loin, m'ont aidé à la réalisation de ce mémoire.

Je dois beaucoup aux professeurs S. Wattiaux-De Coninck et R. Wattiaux, qui m'ont guidé tout au long de cette année et qui ont toujours fait preuve de disponibilité à mon égard.

Je remercie M.M. Gonze et W. Duque Castrillon De Jésus qui ont produit et caractérisé les anticorps monoclonaux utilisés dans ce travail.

Je tiens à remercier le professeur J.P. Courtoy et C. Slomianny pour leur participation dans la réalisation des travaux immunocytochimiques et pour la gentillesse de leur accueil à l'ICP (Université Catholique de Louvain, Woluwé).

Je désire exprimer mes remerciements au professeur A. Depelchin qui m'a accueillie dans son laboratoire, ainsi qu'à J.J. Letesson qui a proposé la technique de dosage employée lors des travaux biochimiques et sans laquelle ce travail n'aurait pu être réalisé.

Je remercie également le professeur E. Schiffers et Mme B. Van Hassel-Cheuvart pour leur programme informatique de traitement des résultats, ainsi que le Docteur T.D. Zhong pour l'intérêt qu'il a manifesté à l'égard de mes travaux.

Je désire remercier F. Dubois et C. Didembourg pour l'aide expérimentée dont ils m'ont fait bénéficier très fréquemment, M.J. Vertez et M.F. Six pour leur aide compétante lors des expériences de microscopie, S. Misquith, M. Jadot et toutes les autres personnes qui travaillent au laboratoire de Chimie Physiologique.

Ma gratitude s'adresse particulièrement à mes parents, à Didier, à Pascal, à Joanna, à Françoise et à Catherine qui ont su m'encourager et me soutenir tout au long de cette année.

P L A N .

PLAN

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES.

INTRODUCTION.	1
CHAPITRE 1. ENDOCYTOSE. Généralités.	1
1. LA PHAGOCYTOSE.	1
2. LA PINOCYTOSE FLUIDE.	2
3. L'ENDOCYTOSE ADSORPTIVE OU MEDIEE PAR RECEPTEURS.	2
CHAPITRE 2. LES LYSOSOMES.	8
1. PROPRIETE DE LA MEMBRANE LYSOSOMALE.	8
2. COMPOSITION DE LA MEMBRANE LYSOSOMALE.	9
3. BIOGENESE DES LYSOSOMES.	11
4. MOUVEMENT DES PROTEINES DE LA MEMBRANE LYSOSOMALE.	11
CHAPITRE 3. ENDOCYTOSE DE L'INVERTASE ET DU TRITON WR-1339.	14
1. L'INVERTASE.	14
1.1. STRUCTURE DE L'INVERTASE.	14
1.2. DISTRIBUTION CELLULAIRE DANS LE FOIE DE RAT APRES UNE INJECTION D'INVERTASE.	14
1.3. ENDOCYTOSE DE L'INVERTASE.	15
2. LE TRITON WR-1339.	17
2.1. STRUCTURE DU TRITON WR-1339.	17
2.2. DISTRIBUTION CELLULAIRE DANS LE FOIE DE RAT APRES INJECTION DU TRITON WR-1339.	18
2.3. EFFET DU TRITON WR-1339 SUR LES LYSOSOMES.	18

3. UTILISATION DE L'INVERTASE ET DU TRITON WR-1339.	18
CHAPITRE 4. HETEROGENEITE CELLULAIRE DU FOIE DE RAT.	20
BUT DU TRAVAIL.	22
MATERIEL ET METHODES.	23
1. TECHNIQUE DE FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE DE FOIE DE RAT.	23
1.1. PRINCIPE.	23
2. L'ENZYME DE REFERENCE.	24
3. DOSAGES ENZYMATIQUES.	25
3.1. L'ACTIVITE TOTALE - L'ACTIVITE LIBRE.	25
3.2. LE PRINCIPE GENERAL DU DOSAGE ENZYMATIQUE.	25
3.3. LE DOSAGE DES PROTEINES.	26
3.4. L'ACTIVITE SPECIFIQUE - L'ACTIVITE SPECIFIQUE RELATIVE.	26
3.5. PRESENTATION GRAPHIQUE DES RESULTATS.	27
4. GRADIENT ISOPYCNIQUE OU GRADIENT D'EQUILIBRATION DE DENSITE.	27
5. PREPARATION DE MEMBRANES LYSOSOMALES.	28
5.1. PREPARATION DES LYSOSOMES.	28
5.2. PURIFICATION DES LYSOSOMES .	28
5.3. PREPARATION DES MEMBRANES.	28
5.4. DOSAGE ENZYMATIQUE ET PROTEIQUE.	29
6. MARQUAGE IN VIVO DE L'ANTICORPS 10D10 A LA METHIONINE S35.	29

7. MARQUAGE DE L'ANTICORPS A LA BIOTINE.	30
7.1. PURIFICATION DE L'ANTICORPS.	30
7.2. LA BIOTINE.	31
7.3. PRINCIPE DU MARQUAGE.	31
7.4. TEST DE L'ANTICORPS BIOTINYLE.	32
8. DOSAGES IMMUNOENZYMATIQUES QUANTITATIFS.	33
8.1. TITRATION DE L'ANTICORPS 10D10.	34
8.1.1. ELISA ou Enzyme Linked Immunosorbent Assay et SPRIA ou Solid Phase Radioimmuno Assay.	34
8.1.1.1. Test SPRIA.	34
8.1.1.2. Test ELISA.	34
8.1.1.3. Dosage de l'anticorps couplé à la biotine (le 10D10-B).	35
8.1.1.4. L'avantage du système Avidine / Biotine.	35
8.1.1.5. Résumé des méthodes de titration de l'anticorps 10D10.	35
8.2. DOSAGE DE L'ANTIGENE GP10D10 CONTENU DANS UNE FRACTION.	36
8.2.1. Principe.	36
8.2.2. Traitement des résultats.	36
8.3. MESURES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES.	38
8.3.1. La cathepsine C.	38
8.3.2. L'arylsulfatase.	38
8.3.3. La phosphodiesterase alcaline.	39
8.3.4. L'invertase.	39
9. SOLUBILISATION DES COMPOSANTS MEMBRANAIRES.	39
9.1. DESTABILISATION PAR DES DETERGENTS.	39
9.1.1. Le Triton X-114.	40
9.1.2. Le Nonidet P-40 (NP-40).	41
9.1.3. Le désoxycholate.	41

10. LOCALISATION IMMUNOCYTOCHIMIQUE DE LA GP10D10.	41
10.1. PREPARATION DES ANTICORPS.	42
10.2. PREPARATION DE L'ECHANTILLON.	42
10.3. DOUBLE MARQUAGE A LA FLUORESCENCE.	43
10.3.1. Principe.	43
10.3.2. Double marquage proprement dit.	44
10.4. MARQUAGE EN IMMUNOPEROXYDASE.	45
 R E S U L T A T S.	 46
 PARTIE 1. PURIFICATION DES LYSOSOMES.	 46
1.1. RESULTATS.	46
1.2. DISCUSSION.	46
 PARTIE 2. OPTIMISATION DU SIGNAL ENTRE L'AG FIXE ET L'AC MARQUE.	 48
2.1. MISE AU POINT DE LA TITRATION DE L'ANTICORPS RADIOACTIF (SPRIA).	48
2.1.1. Test SPRIA réalisé dans différentes conditions.	49
2.1.1.1. Conditions standards.	49
2.1.1.2. Effet de la quantité de protéines adsorbées .	49
2.1.1.3. Effet de la poly-L-lysine et de la glutaraldéhyde.	50
2.1.1.4. Discussion.	50
2.1.2. Extraction des protéines membranaires avec différents détergents : le Triton X-114, le Nonidet P-40 et le désoxycholate.	51
2.1.2.1. Introduction.	51
2.1.2.2. Extraction au Triton X-114.	51
2.1.2.3. Extraction par Lyse avec du tampon contenant du NP-40 .	53
2.1.2.4. Extraction par lyse avec du tampon contenant du NP-40 et du désoxycholate.	53
2.1.2.5. Discussion.	54

2.1.3. Comparaison de 3 types de boîtes : Titertek (Flow), Medium et High Binding (Nunc).	55
2.1.3.1. Comparaison des boîtes.	55
2.1.3.2. Effet de la poly-L-lysine associée ou non à la glutaraldéhyde.	56
2.1.3.3. Discussion.	56
2.1.3.4. Effet de la température.	57
2.1.3.5. Discussion.	58
2.1.3.6. Effet de la quantité d'antigène adsorbée au fond des puits High Binding (Nunc).	58
2.1.3.7. Effet de la vidange de la poly-L-lysine.	59
2.1.3.8. Conclusion.	59
2.2. MISE AU POINT DE LA TITRATION DE L'ANTICORPS 10D10D BIOTINYLE.	60
2.2.1. Marquage à la biotine de l'anticorps monoclonal 10D10.	60
2.2.2. Détermination de la concentration optimale de l'Avidine-peroxydase.	61
2.2.2.1. Résultats.	61
2.2.2.2. Discussion.	63
2.2.3. Détermination des conditions optimales de titration.	63
2.2.3.1. Effet de la poly-L-lysine.	64
2.2.3.2. Comparaison des boîtes.	64
2.2.3.3. Discussion.	64
2.2.4. Sensibilisation des puits avec du 10D10 non marqué.	65
2.2.5. Conclusion.	66
Partie 3. Mise au point du dosage de l'antigène GP10D10.	67
3.1. INTRODUCTION.	67
3.2. MISE AU POINT DU DOSAGE AVEC LE 10D10 S35 RADIOACTIF.	68
3.2.1. Résultats.	68
3.2.2. Discussion.	69

3.3. DOSAGE DE LA GP10D10 A L'AIDE DU 10D10 BIOTINYLE.	70
3.3.1. Résultats.	70
3.3.2. Discussion.	70
3.4. CONCLUSION.	71
Partie 4. Distribution de la GP10D10 dans un gradient de densité provenant d'une fraction ML de foie de rat.	72
4.1. INTRODUCTION.	72
4.2. DISTRIBUTION DE LA GP10D10 DANS LES FRACTIONS D'UN GRADIENT PROVENANT D'UN FOIE DE RAT TEMOIN.	74
4.2.1. Détermination de la dilution du 10D10 S35 à utiliser dans le test de compétition.	74
4.2.2. Les résultats.	74
4.2.3. Discussion.	75
4.3. DISTRIBUTION DE LA GP10D10 DANS LES FRACTIONS D'UN GRADIENT PROVENANT D'UN FOIE DE RAT AYANT RECU 3 HEURES AUPARAVANT UNE INJECTION D'INVERTASE	76
4.3.1. Détermination de la dilution du 10D10 radioactif à utiliser.	76
4.3.2. Les résultats.	76
4.3.3. Discussion.	77
4.4. DISTRIBUTION DE LA GP10D10 DANS LES FRACTIONS D'UN GRADIENT PROVENANT D'UN FOIE DE RAT AYANT RECU 4 JOURS AUPARAVANT UNE INJECTION DE TRITON WR-1339 .	78
4.4.1. Résultats.	78
4.4.2. Discussion.	79
4.5. DISTRIBUTION DE LA GP10D10 DANS LES FRACTIONS D'UN GRADIENT ML PROVENANT D'UN FOIE DE RAT AYANT RECU UNE INJECTION 4 JOURS AUPARAVANT DE TRITON	80
4.5.1. Résultats.	80

4.5.2. Discussion.	81
4.6. COMPARAISON DES DISTRIBUTIONS OBTENUES SUR LES DIFFERENTS GRADIENTS.	83
4.6.1. Témoin / invertase (3 H).	83
4.6.2. Témoin / Triton WR-1339.	84
4.6.3. Invertase (3 H) / Triton WR-1339 / invertase (15 H).	84
4.6.4. Triton WR-1339 / Triton WR-1339 et invertase (15 H).	85
4.7. CONCLUSIONS GENERALES DES RESULTATS BIOCHIMIQUES.	87
PARTIE 5. LOCALISATION IMMUNOCYTOCHIMIQUE DE LA GP10D10.	88
5.1. INTRODUCTION.	88
5.2. LES ANTICORPS UTILISES.	88
5.2.1. Caractéristiques de ces anticorps.	88
5.2.2. En immunofluorescence sur coupes à congélation.	89
5.2.3. En immunoperoxydase sur coupes Smith et Farquahr.	89
5.3. LES RESULTATS.	91
5.3.1. Immunofluorescence sur coupes à congélation.	91
5.4. CONCLUSIONS GENERALES ET CONFRONTATION DES RESULTATS BIOCHIMIQUES ET MORPHOLOGIQUES.	95

BIBLIOGRAPHIE.

I à VIII

APPENDICE TECHNIQUE.

1 à 21

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABBREVIATIONS UTILISEES

- AS** : Activité spécifique.
- ASR** : Activité spécifique relative.
- BNHS** : Biotinyl-N- Hydroxysuccinimide.
Biotine activée.
- CURL** : Compartiment de dissociation des récepteurs et des ligands.
- DOC** : Désoxycholate.
Acide biliaire utilisé pour déstabiliser les structures membranaires.
- EGF** : Epidermal Growth Factor.
Facteur de croissance synthétisé par les cellules épidermiques.
- ELISA** : Enzyme Linked Immunosorbant Assay.
Test immunoenzymatique quantitatif où l'antigène immobilisé réagit avec l'anticorps. Après lavage, l'anticorps fixé est reconnu par un autre anticorps couplé à la peroxydase.
- GPN** : Glycyl Phenyl-2 Naphtylamide.
C'est une substance qui, si elle est scindée par la cathepsine C, est capable de provoquer la rupture de la membrane de lysosomes
- GP10D10** : Glycoprotéine de la membrane lysosomale reconnue par l'anticorps 10D10.
- KD** : Kilodalton.
- LDL** : Low Density Lipoprotéin.
- Lys** : Préparation de membranes lysosomales.
- NP-40** : Nonidet P-40.
- nm** : nanomètre.
- NHS** : N-hydroxysuccinimide.
Activateur de la biotine.
- pl** : point isoélectrique.
- PBS** : Tampon Phosphate Salin.
pH 7,4 et 0,5 M NaCl.
- PBSO** : PBS contenant 1% d'ovalbumine.
- SPRIA** : Solid Phase Radioimmunoassay.
Test immunoenzymatique quantitatif où on utilise un anticorps radioactif.
- µg** : microgramme.
- µl** : microlitre.

- 10D10** : Anticorps monoclonal de souris, dirigé contre des membranes lysosomales de foie de rat purifiées.
C'est une Ig G1 qui reconnaît la GP10D10 de manière spécifique.
- 10D10S³⁵** : 10D10 marqué à la méthionine radioactive.
- 10D10-B** : 10D10 biotinylé.
- 15 d** : anticorps monoclonal anti-invertase de lapin, dirigé contre l'invertase purifiée sur colonne d'affinité.
- 17 A₃** : anticorps de souris anti-membrane plasmique de boeuf. Cette Ig G_{2A} reconnaît un antigène présent sur les lymphocytes T et les monocytes du boeuf.
- 8C11** : Ig G_{2a} de souris qui reconnaît chez les bovins un antigène CD-5 like sur la membrane plasmique des lymphocytes T, et sur la membrane plasmique des lymphocytes B dans les cas de leucémies lymphoïdes chroniques.

INTRODUCTION.

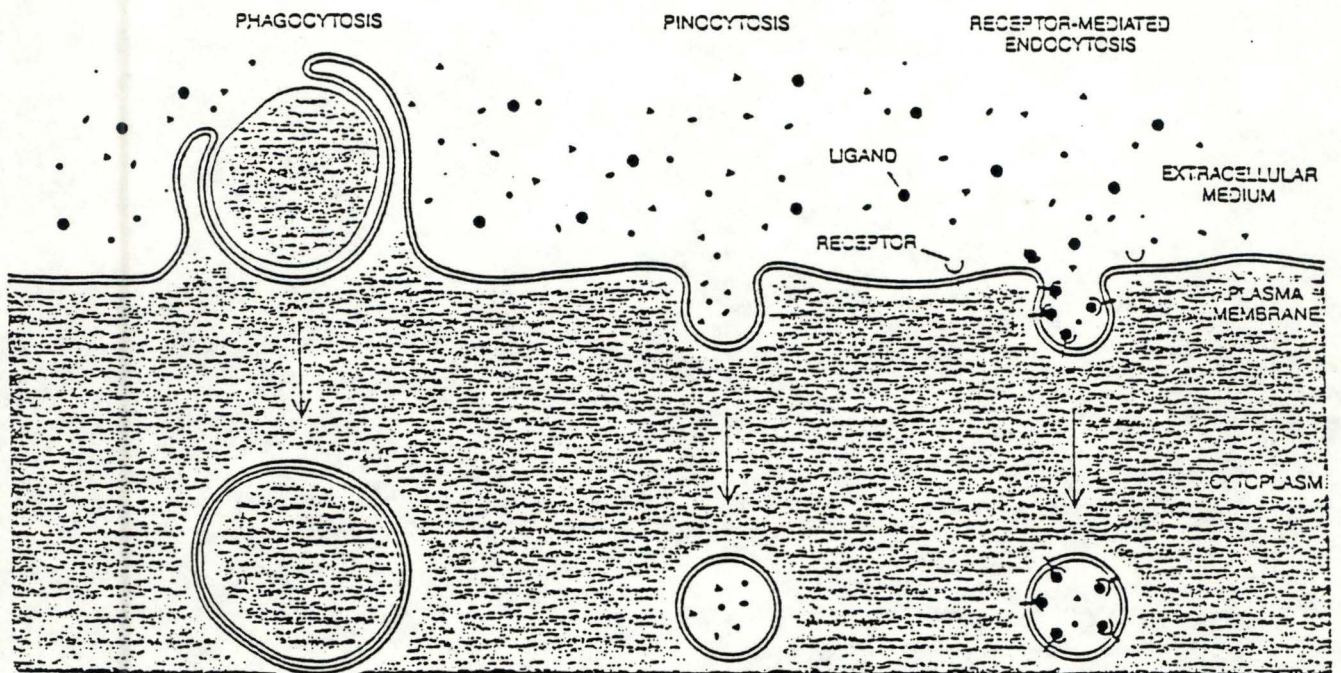


Fig. 1 : Les différents modes d'incorporation des molécules de poids moléculaire élevé. La phagocytose (à gauche) permet l'ingestion d'une grosse particule telle qu'une bactérie.

Une gouttelette du milieu extérieur pénètre dans la cellule par pinocytose (au centre).

Les molécules sont prélevées du milieu de manière sélective par endocytose médiée par récepteur (à droite) (10).

I N T R O D U C T I O N .

CHAPITRE 1. ENDOCYTOSE. Généralités.

Une des propriétés fondamentales des cellules vivantes est leur capacité de puiser dans l'environnement les différentes substances dont elles ont besoin. Ce sont des nutriments, des vitamines, des molécules effectrices telles que les hormones ou des facteurs de croissance, qui pénètrent dans la cellule.

Les petites molécules apolaires non chargées diffusent rapidement à travers la double couche lipidique; cependant, la membrane est une barrière difficile à franchir pour la plupart des petites molécules polaires et chargées.

Les cellules ont élaboré différents mécanismes passifs et actifs qui permettent l'internalisation de ces molécules; ce sont des canaux protéiques (Perméases), des protéines porteuses qui assurent la navette à travers la membrane cellulaire.

La membrane plasmique s'oppose également au passage des macromolécules et des particules agrégées. On retrouve différents modes d'incorporation de ces molécules de poids moléculaire élevé (1) (cfr fig. 1).

1. LA PHAGOCYTOSE.

La phagocytose permet l'ingestion de molécules volumineuses ou de particules agrégées (2). Cette propriété se manifeste principalement chez les protozoaires pour lesquels elle constitue un mode d'alimentation.

Chez les organismes pluricellulaires, ce phénomène ne se présente que chez certaines cellules spécialisées : ce sont les macrophages et les leucocytes polymorphonucléaires, qui luttent contre les micro-organismes envahisseurs.

Pour être phagocytée, la particule doit tout d'abord se fixer à la surface des phagocytes; ceux-ci présentent plusieurs récepteurs de surface (1).

TABLEAU 1 : RECEPTEURS SPECIFIQUES.

1. Pour les glycoprotéines.

A. Récepteurs pour les résidus N-acétylglucosamine/mannose

Ces récepteurs sont retrouvés à la surface des cellules non parenchymateuses du foie, notamment sur les cellules endothéliales (3) et les cellules de Kupffer (17). On note également leur présence sur les macrophages alvéolaires (3). Ils interviennent dans l'endocytose de l'invertase, du mannan (3) ainsi que de la β glucuronidase (18).

B. Récepteurs pour le mannose-6-Phosphate

Il existe 2 types de récepteurs phosphomannosyls, on les trouve à la surface des hépatocytes (3, 15), des fibroblastes en culture (18) et de la plupart des cellules. Ces récepteurs interviennent dans la reconnaissance et l'internalisation de glycoprotéines terminées par un mannose-6-Phosphate telles que les enzymes lysosomales (18).

C. Récepteurs pour le galactose

Identifiés sur les hépatocytes (19, 20, 21) et accessoirement sur les cellules de Kupffer (16), ils sont responsables de l'endocytose des asialoglycoprotéines.

D. Récepteurs pour le Fucose

Présents à la surface des hépatocytes, ces récepteurs permettent l'endocytose de protéines qui présentent un fucose terminal (22); par exemple la lactalbumine (3).

E. Récepteurs pour les mucopolysaccharides.

Des récepteurs pour l'acide hyaluronique ont été repérés sur les cellules non parenchymateuses du foie (23), ainsi que des récepteurs pour la chondroïtine sulfate (24).

2. Pour des substances autres que les glycoprotéines.

Les lipoprotéines de faible densité (LDL) sont endocytées grâce à la présence de récepteurs sur les fibroblastes, les cellules non parenchymateuses du foie ainsi que sur les hépatocytes (1).

Des récepteurs pour l'insuline et d'autres hormones telles que le glucagon, la prolactine, la transferrine (25), la leucoplasmine et la lactoferrine (26) se trouvent sur différents types de cellules, notamment les cellules hépatiques et sur les fibroblastes (27).

C'est aussi par endocytose médiée par récepteurs que certains virus pénètrent dans différents types cellulaires, ainsi que des toxines et immunotoxines (28).

On note sur les macrophages, les fibroblastes, les adipocytes et sur les hépatocytes en culture, la présence de récepteurs pour l' α_2 macroglobuline (29).

Les récepteurs pour les immunoglobulines, les complexes antigéniques et les composants du complément sont retrouvés sur les macrophages et sur les cellules de Kupffer (3), ils sont impliqués dans la disparition de ces molécules du plasma.

Les vacuoles de phagocytose ou phagosomes ont un diamètre supérieur à un micromètre. Elles contiennent des particules visibles au microscope optique.

La membrane de ces phagosomes provient de la membrane plasmique; elle présente des caractéristiques biochimiques comparables. On note la présence d'ectoenzymes de la membrane cellulaire : la 5' nucléotidase et la phosphodiesterase alcaline (2).

2. LA PINOCYTOSE FLUIDE.

C'est l'ingestion de fluides extracellulaires et de solutés dissous, dans une vacuole de pinocytose. Ce mécanisme n'est pas spécifique et sa capacité dépend de la concentration plasmatique (3). Les vésicules de pinocytose possèdent un diamètre de 0,1 à 0,3 micromètre, et ne peuvent être mises en évidence qu'en présence de marqueurs de la phase fluide tels que le saccharose qui ne se lie pas à la membrane (2).

3. L'ENDOCYTOSE ADSORPTIVE OU MEDIÉE PAR RECEPTEURS.

Les cellules qui présentent l'endocytose par récepteurs possèdent ces récepteurs à la surface de la membrane. Ce sont le plus souvent des protéines transmembranaires (4), qui présentent une affinité spécifique pour un ligand particulier, qu'elles peuvent extraire du milieu extracellulaire (1). Ce processus **saturable** (3) est beaucoup plus sélectif; la cellule incorpore le ligand de manière concentrée (1) et plus rapidement (3).

Un très grand nombre de molécules peut être fourni aux cellules en fonction du type de récepteurs de surface qu'elles possèdent. Une substance de structure bien déterminée s'accumulera préférentiellement dans les cellules qui présentent le récepteur adéquat.

On distingue deux types de récepteurs dans les cellules de mammifères (3):

- 1- les récepteurs pour un type particulier d'hydrate de carbone présent dans les glycoprotéines; c'est à ce type de récepteurs que nous nous intéressons particulièrement.
- 2- les récepteurs pour des structures autres que les glycoprotéines (cfr tableau 1).

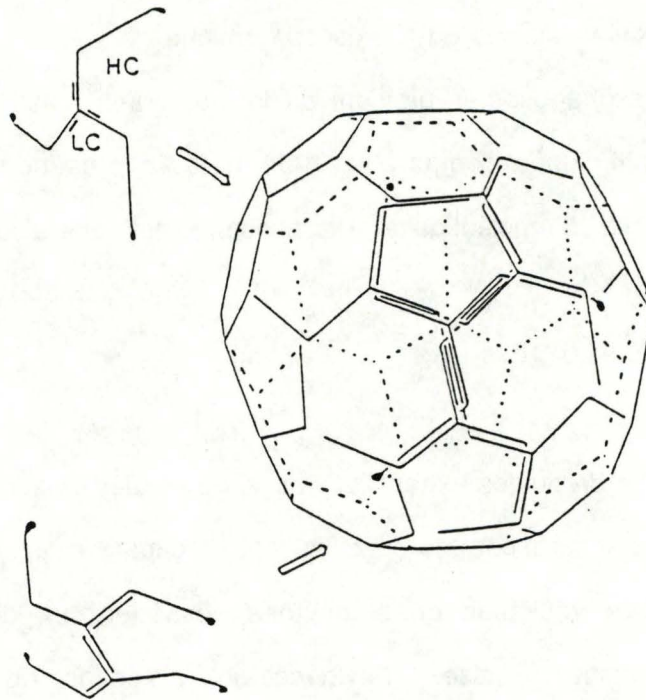


Fig. 2 : Diagramme des triskelions de clathrine et de leur arrangement dans les structures coatées (1).

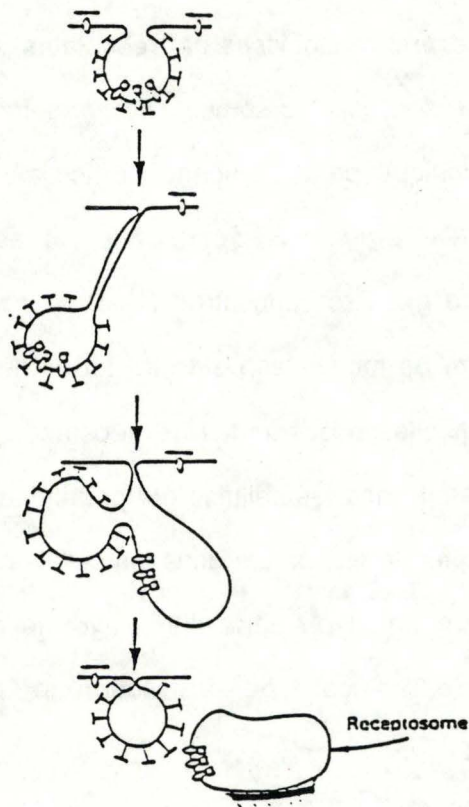


Fig. 3 : Mécanisme proposé pour la formation des coated pits de la membrane plasmique (4).

Certains récepteurs à la surface de la membrane sont mobiles; ils peuvent diffuser latéralement dans la bicouche lipidique, par exemple, les récepteurs pour l'EGF (Epidermal Growth Factor) (4).

Lorsque le ligand se fixe au récepteur, le complexe formé migre vers une région spécialisée de la membrane plasmique, où l'ingestion a lieu (2, 4).

Cette région, appelée **coated pit** ou **puits recouvert**, présente sur la face cytoplasmique une structure en forme de corbeille : c'est le **coat**.

Le coat est constitué principalement de clathrine, un polypeptide fibreux dont la masse moléculaire est de 180 000 daltons. D'autres protéines ont été identifiées, notamment deux polypeptides de 36 000 et 33 000 daltons, dénommés clathrine légère. L'assemblage de trois polypeptides de clathrine et de trois polypeptides de plus petite taille, constitue une structure à trois bras, un **triskelion** qui est l'unité de base de la construction complexe en forme de panier (1, 6) (cfr fig. 2)

Ces puits recouverts ont un diamètre de 1400 Angström et occupent 1 à 2 % de la surface cellulaire (2). Pastan et Willingham (5) attribuent à ces structures un rôle de trappe des complexes récepteurs-ligands (cfr fig. 3). En effet, la plupart des récepteurs sont distribués au hasard et se concentrent dans les puits seulement après la fixation du ligand. Il semble exister dans les "coated pits", un mécanisme de reconnaissance, peut-être basé sur le changement de configuration du récepteur après la liaison au ligand.

Les récepteurs à l'EGF (Epidermal Growth Factor) suivent ce modèle; cependant, certains récepteurs tels que ceux pour les LDL (Low Density Lipoproteins) **se trouvent dans les coated pits, alors qu'ils n'ont pas fixé le ligand**; il est probable que ces récepteurs présentent la structure "activée" reconnue par les coated pits, même en absence de ligand (5).

Lorsqu'un ligand tel que EGF (Epidermal Growth Factor) se fixe sur la membrane plasmique, on observe l'invagination des puits recouverts; on retrouve alors le ligand dans **les vésicules recouvertes** ou **les coated vesicles**. Elles sont entourées d'une construction en corbeille, analogue à celle des puits recouverts (4).

Une controverse subsiste sur la nature exacte et le sort des coated vesicles : on pense que ces vésicules recouvertes se détachent de la membrane plasmique et qu'elles perdent leur coat peu de temps après l'incorporation du ligand. Les vésicules formées, **les endosomes**, contiennent le ligand (5). La clathrine libérée dans le cytoplasme est récupérée ultérieurement pour former de nouveaux puits recouverts (4, 6). Cependant, Pastan et Willingham (4, 5) ont montré en analysant des coupes sériées, qu'il existait une communication entre la membrane plasmique et la vésicule coatée. Cette vésicule serait en fait le coated pit invaginé dans la cellule, l'aspect vésiculaire étant dû à l'incidence de coupe. Ils proposent le modèle de formation des endosomes décrit à la figure 3, mais cet aspect est controversé.

Les endosomes qui ont perdu la clathrine sont des vésicules isolées de 200 à 300 nanomètres (nm) de diamètre. Elles semblent vides, claires au microscope électronique; cependant, elle contiennent les complexes récepteurs-ligands. Leur membrane contient du cholestérol, comme la membrane plasmique dont elles proviennent (6, 2). Elles n'ont pas de clathrine et, hormis une ATPase membranaire responsable de l'acidification interne (6), on ne note pas, jusqu'à présent, d'activité enzymatique, notamment pour les enzymes lysosomales (8), quoique une certaine protéolyse y ait été observée (7). Pastan et Willingham (4) ont montré que les endosomes se déplacent par mouvements saltatoires sur les microtubules intracytoplasmiques (4).

Le pH intravésiculaire a pu être mesuré; on a noté que celui-ci s'approche du pH intralysosomal pour atteindre un pH de 4,5 à 5 (8, 2). On a démontré l'existence de pompes à protons ATP indépendantes et des canaux pour les anions dans les membranes des vésicules coatées et des endosomes; ces mécanismes sont responsables de l'acidification des vésicules (6).

L'acidification des endosomes est un phénomène important qui est impliqué dans le **recyclage des récepteurs** (9). Certains récepteurs échappent en effet à la dégradation lysosomale et sont recyclés afin de servir plusieurs fois (5, 6). Ce procédé économique permet à la cellule de présenter un nombre important de structures réceptrices (R) en dépit de l'incorporation continue du ligand (L) sous forme de complexe R-L (2, 12).

Le recyclage implique la dissociation du récepteur et du ligand, le pH acide des endosomes faciliterait ce processus (6, 9).

Lorsque la séparation se produit, les endosomes prennent une forme caractéristique, appelée **CURL** ou "compartment of uncoupling of receptor and ligand" (10); les endosomes deviennent plus grands et développent des extensions tubulaires enrichies en récepteurs; la lumière contient le ligand dissocié (6). Celui-ci se concentre ensuite dans la **portion vésiculaire** du CURL pendant que la **portion tubulaire** se charge des récepteurs, puis, se détache pour rejoindre la membrane cellulaire (10). Le mécanisme de concentration des récepteurs dans les tubules n'est pas connu (6).

Le **ligand libre** se retrouve alors dans des vésicules issues du CURL (11). Ces vésicules fusionnent entre elles et forment les **endosomes multivésiculaires** ou **multivesicular bodies (MVB)**, qui vont être délivrés aux lysosomes (6) pendant que les récepteurs retournent à la membrane plasmique (2, 9, 10, 13).

D'autres modes de recyclage ont été proposés pour certains récepteurs.

Geuze et Slot (11) pensent que le recyclage des récepteurs pour les asialoglycoprotéines et les ligands terminés par un mannose-6-phosphate s'effectue en passant par le **Golgi**. Ces auteurs ont montré que le nombre de ces récepteurs retrouvés au niveau du Golgi est largement supérieur à ce qui serait attendu si seuls les récepteurs nouvellement synthétisés passaient par cet organite (11).

Il faut remarquer que **certains récepteurs ne sont pas recyclés**; ils sont ainsi digérés en même temps que le ligand. Les récepteurs Fc des macrophages subissent ce sort (2, 12).

Le recyclage des récepteurs, s'il a lieu, s'accompagne de celui de la membrane incorporée lors du processus d'endocytose (13). Comme les récepteurs, la membrane se recycle à partir du CURL (2) ou à partir du Golgi où elle peut être utilisée dans le processus de l'exocytose (9).

La membrane plasmique ne doit pas être considérée comme une entité statique; elle est au contraire dynamique et en relation avec les autres organites cellulaires. M. Farquhar (9) a en effet démontré l'existence d'échanges entre la membrane cellulaire, les lysosomes et le

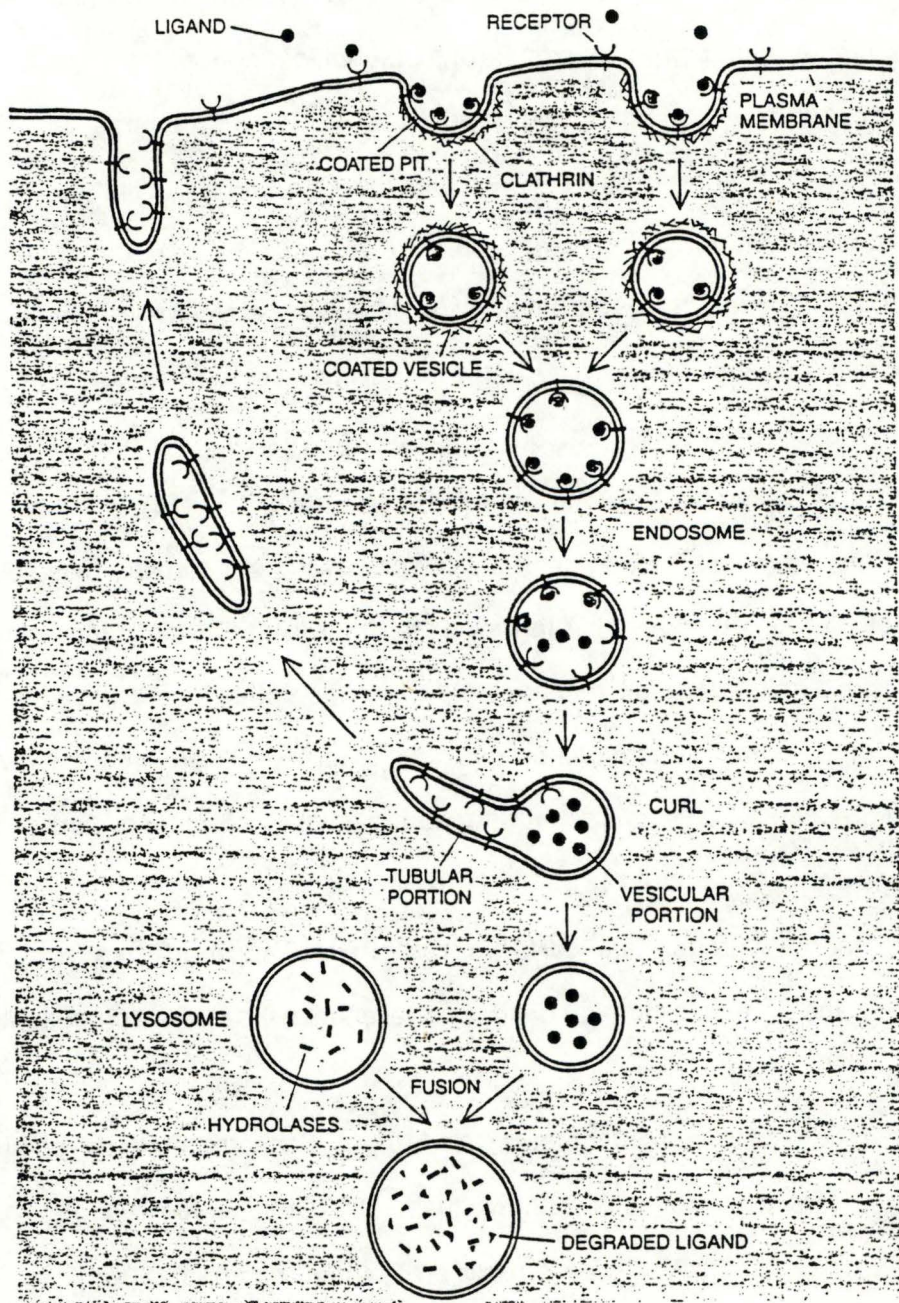


Fig. 4 : Schéma général du trajet intracellulaire des récepteurs et des ligands endocytés (10).

Golgi (9).

De manière générale, le trajet intracellulaire des ligands endocytés (cfr fig. 4) est le suivant :

- 1- Fixation des récepteurs et concentration dans les coated pits de la membrane (2).
- 2- Formation de l'endosome (5).
Séparation des récepteurs et des ligands dans le CURL (10).
- 3- La portion tubulaire du CURL retourne à la membrane (2); c'est le recyclage de la membrane plasmique et des récepteurs (13). Certains récepteurs sont recyclés en passant par le Golgi (11); la membrane peut également suivre cette voie et peut servir à l'exocytose dans les cellules sécrétrices (13); c'est un second mode de recyclage de la membrane plasmique.
- 4- Le ligand, contenu dans la portion vésiculaire du CURL, rejoint les lysosomes (2), pour y être digéré (8).

Nous nous attachons spécialement à l'étude de **l'endocytose de l'invertase**, une glycoprotéine qui, après injection intraveineuse, est éliminée du plasma et retrouvée au niveau des cellules endothéliales du foie ainsi que dans les cellules de Kupffer, mais en moindre proportion (14).

L'endocytose dans les **cellules endothéliales** s'effectue selon le schéma général décrit plus haut. Certaines caractéristiques particulières à ce type cellulaire ont cependant été observées par De Bruyn et ses coéquipiers (14), lors de leurs études **morphologiques** sur l'endocytose et le transport intracellulaire de l'albumine dans les cellules endothéliales du foie. Ces auteurs décrivent un transport des hydrolases acides vers les endosomes par des éléments tubulaires, **les tubules de transfert** (14). Le transport intracellulaire d'une substance endocytée par les cellules endothéliales ferait donc intervenir une population intermédiaire de lysosomes que l'on peut assimiler aux lysosomes de transfert décrits dans une étude **biochimique** lors de l'endocytose de l'invertase (15).

Les cellules de Kupffer, également impliquées dans la reprise de l'invertase

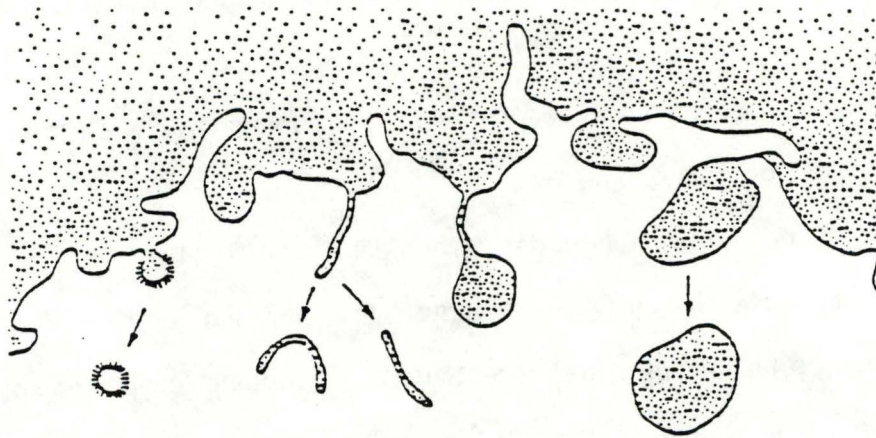


Fig. 5 : Diagramme qui résume les mécanismes d'incorporation de la peroxydase par les macrophages alvéolaires.

A gauche, on observe un coated pit typique qui se détache de la membrane plasmique pour former un coated vesicle de 110 nm de diamètre approximativement.

Des tubules lisses remplis de peroxydase apparaissent aussi à partir de la surface, se détachent et se retrouvent libres dans le cytoplasme.

Des pinosomes peuvent se former par fusion des vésicules et des tubules de pinocytose ou aussi par la voie de l'endocytose, ou encore par des invaginations qui accumulent la peroxydase comme montré à droite.

Les organelles issues de la pinocytose (coated vesicles, tubules de pinocytose et pinosomes) forment ensemble le compartiment pinocytique.

Vers le centre, on a décrit un tubule en continuité avec une vacuole de pinocytose. Une telle structure permet un trajet bidirectionnel lors des mouvements de membrane entre la membrane plasmique et les autres organelles (16).

injectée, présentent, elles aussi, des divergences avec le schéma général. Les structures endocytiques y sont différentes. B. Nichols *et al.* (16) a en effet montré, dans une étude morphologique sur l'endocytose de la peroxydase par les macrophages alvéolaires, qu'il existe des structures tubulaires de 30 à 60 nanomètres (nm) en continuité avec les endosomes, et qui fusionnent ensuite avec les lysosomes. Ces structures tubulaires ininterrompues mettent en relation la membrane plasmique et les lysosomes.

Contrairement aux endosomes, ces tubules et vésicules présentent une activité très intense pour la phosphatase acide. Ils permettent non seulement l'apport de particules aux lysosomes, mais également le relargage du contenu lysosomal (16) (cfr fig. 5).

CHAPITRE 2. LES LYSOSOMES.

Les lysosomes ont tout d'abord été définis biochimiquement, comme des structures contenant une grande quantité d'hydrolases acides, entourées par une membrane unique. La présence de cette membrane, suspectée au début suite à des expériences sur la latence des enzymes lysosomales, a ensuite été confirmée morphologiquement (30).

Les hydrolases acides qu'ils contiennent sont impliqués dans les nombreuses fonctions physiologiques des lysosomes. Ces fonctions sont variées : il s'agit de la digestion intracellulaire, du processing des antigènes et des produits de sécrétion, de la lutte contre les microorganismes envahisseurs ... (30, 31).

La membrane des lysosomes, en plus de son rôle structural, présente des spécialisations qui permettent : l'acidification du compartiment intralysosomal, l'interaction avec d'autres organites subcellulaires notamment les endosomes et la membrane plasmique, et le relargage des produits de digestion et des métabolites, de la lumière du lysosome vers le cytoplasme (31, 32).

1. PROPRIETE DE LA MEMBRANE LYSOSOMALE.

La membrane lysosomale présente une perméabilité sélective qui est à la base de la plupart des propriétés biochimiques et physiques des lysosomes (32).

Cette perméabilité explique les propriétés osmotiques des lysosomes : ils sont stables dans une solution iso-osmotique d'un soluté non perméant, mais éclatent rapidement dans une solution hypotonique (32).

de Duve *et al.* (33) ont proposé un modèle dans lequel les mitochondries et les lysosomes sont constitués de 3 espaces :

- 1- **l'espace librement accessible au saccharose** rempli de la solution de saccharose du milieu extérieur, de concentration identique.
- 2- **l'espace osmotique**, caractérisé par la quantité d'eau osmotique contenue dans la particule. Les peroxysomes ne possèdent pas cet espace.

DENSITY (g/ml)	OSMOLARITY (mOsm)		TYPE OF ORGANELLE		
	SUCROSE	METRIZ.	MITOCHONDRIA	LYSOSOMES	PEROXISOMES
1.034	264				
		65			
1.068	528				
		123			

Fig. 6 : Proportion relative des 3 espaces des mitochondries, des lysosomes et des peroxisomes en gradient de saccharose et de métrizamide. On remarque, en présence de métrizamide, que l'espace osmotique (en blanc) est fortement augmenté, alors que l'espace matriciel (en ligné) et l'espace librement accessible au saccharose (en pointillé) ne sont pas modifiés (33).

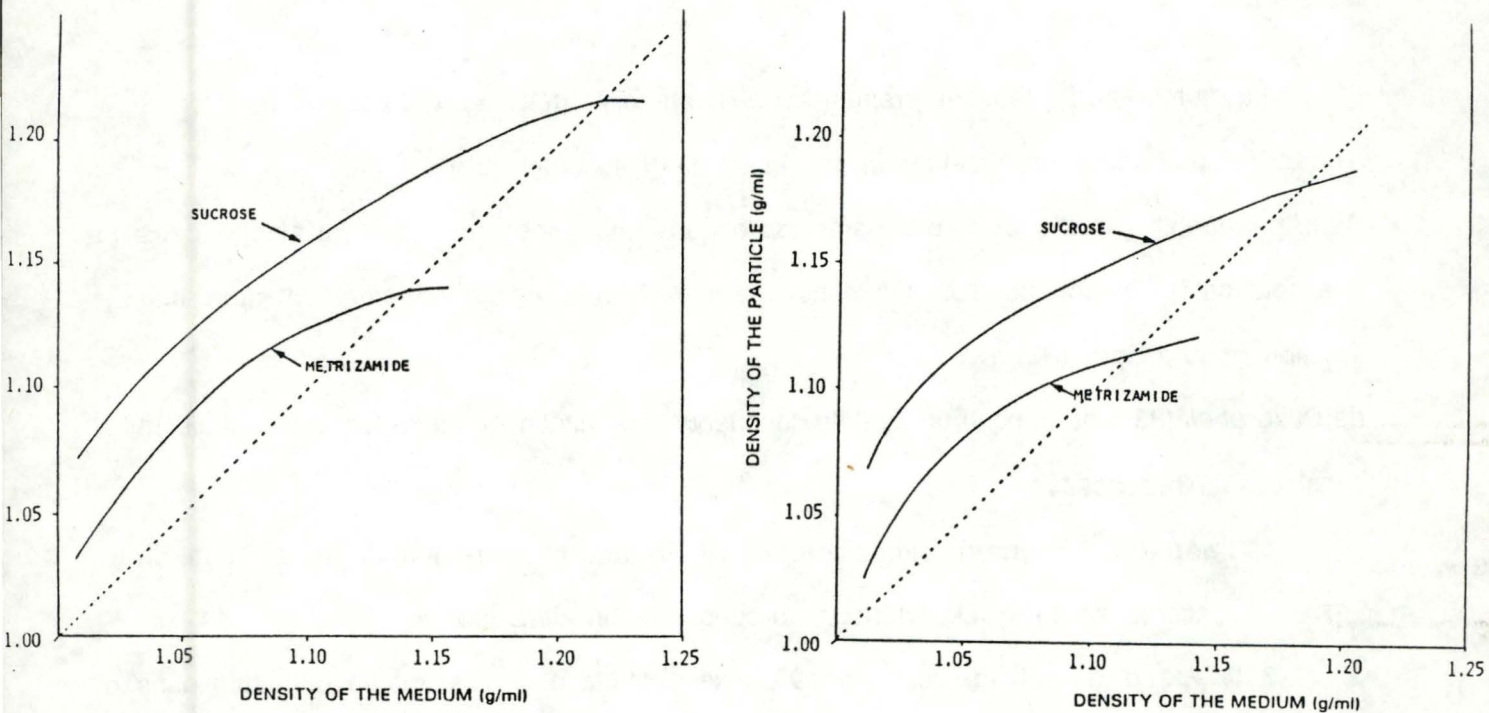


Fig. 7 : Changement de la densité des mitochondries (à gauche) et des lysosomes (à droite) de foie de rat en fonction de la densité des solutions de saccharose ou de métrizamide. Les courbes rencontrent la diagonale à la densité d'équilibre de la particule dans un gradient de saccharose ou de métrizamide (33).

-3- l'espace matriciel, qui contient les composants solides de la particule.

En utilisant une solution de métrizamide, une molécule qui, à densité égale, présente une osmolarité plus faible que le saccharose, l'espace osmotique des particules se trouve modifié, ainsi que leur densité car les granules sont allégés (cfr fig. 6 et 7).

La latence enzymatique est une propriété biochimique caractéristique des hydrolases acides, masquée par la membrane des lysosomes. Elle est mise en évidence par une augmentation de l'activité libre des enzymes lorsque la rupture de la membrane a lieu. Elle est également due à la perméabilité sélective de la membrane lysosomale, imperméable aux enzymes contenus dans les lysosomes et aux substrats de ces enzymes (32). La membrane lysosomale est une barrière qui empêche la fuite du contenu lysosomal dans le cytoplasme (30).

Les lysosomes présentent un pH intralysosomal égal à 5. Ce pH acide est essentiel à l'activité des hydrolases présentes (34). Le maintien de ce pH est dû à une ATPase insérée dans la membrane. On a longtemps attribué ce rôle à l'acide sialique présent à la face interne de la membrane lysosomale; celui-ci provoquerait un flux de cations dans les lysosomes, notamment des protons (35).

Cette hypothèse a été totalement abandonnée suite à la découverte d'une pompe à proton, la $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase dépendante, du même type que celle de la membrane plasmique. Cette ATPase présente 2 différences avec celle de la membrane plasmique : premièrement, elle n'est pas influencée par les inhibiteurs de l'ATPase plasmique et, deuxièmement, son pH optimal est de 5 au lieu de 8 pour la membrane plasmique (34).

2. COMPOSITION DE LA MEMBRANE LYSOSOMALE.

La composition lipidique de la membrane a été étudiée par chromatographie en phase gazeuse. Elle comporte principalement de la phosphatidyl éthanolamine, de la phosphatidyl choline, de la sphingomyéline et du cholestérol; des lipides neutres sont également présents. Cette composition ressemble peu à celle de la membrane plasmique, ce que montre le

LIPID	Plasma membrane	Tritosomal membrane	Lysosomal membrane	Mitochondria
Cholesterol/phospholipid	0.90	0.52	0.27	0.06
Material at solvent front	2.3 %	6.8 %	4.6 %	
Cardiolipin			4.6 %	11.2 %
Phosphatidyl ethanolamine (PE)	22.4 %	17.9 %	25.0 %	31.0 %
Phosphatidyl inositol	} 17.4 %	{ 9.9 % {	9.7 %	} 7.5 %
Phosphatidyl serine			3.0 %	
Phosphatidyl choline (PC)	34.8 %	33.5 %	41.1 %	50.5 %
Sphingomyelin	20.5 %	32.9 %	7.6 %	0
Lyso derivative of PE			2.9 %	0
Lyso derivative of PC	2.6 %	0	2.9 %	0

TABLEAU 2 : Analyse par chromatographie gaz-liquide de la composition en phospholipides de la membrane plasmique de tritosomes, de lysosomes normaux et de mitochondries (35).

tableau 2 (35).

La composition en protéines de la membrane a été étudiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (34, 35, 36).

Il apparaît que les membranes contiennent moins de 20% des protéines lysosomales; elles sont fortement enrichies en ATPase dont le rôle dans le maintien du pH intralysosomal a été proposé (32, 34). On suspecte la présence de transporteurs membranaires spécifiques lors du passage de certains métabolites (32).

Il est intéressant de noter la richesse de la membrane en hydrates de carbone. Ces sucres, notamment des hexosamines, du mannose, du galactose et de l'acide sialique (35, 37) sont liés aux protéines ainsi qu'aux lipides et forment un coat au niveau de la face interne de la membrane de lysosome. Ces hydrates de carbone sont à l'origine du halo translucide observé en microscopie électronique, qui sépare la membrane de la matrice du lysosome. Il faut également remarquer que ces sucres sont toujours dirigés vers l'intérieur du lysosome, même si la glycoprotéine qui le porte est transmembranaire (37).

Plusieurs protéines de la membrane lysosomale ont été identifiées par des méthodes immunologiques; elles appartiennent à une classe unique de glycoprotéines. En général, elles sont caractérisées par une petite chaîne polypeptidique (20-60 KD), par une très grande quantité d'oligosaccharides -N liés (plus de 18 par polypeptide), par quelques embranchements O-liés et un point isoélectrique très acide ($pI < 2-4$), dû à la présence d'un très grand nombre de résidus d'acides sialiques. Leur structure est probablement en relation avec leur capacité à survivre dans un environnement riche en hydrolases acides (38). Le tableau 3 répertorie la plupart des glycoprotéines membranaires qui ont été caractérisées, ainsi que leur localisation.

Très souvent, ces glycoprotéines sont transmembranaires (39, 41). Schneider *et al.* (36) observent que de nombreuses protéines de la membrane lysosomale ont une partie de séquence relativement courte, exposée au cytoplasme; on leur attribue le rôle de récepteurs intracellulaires.

Tableau 3 : Les principales glycoprotéines de la membrane lysosomale.

<u>Nomenclature</u>	<u>Masse</u>	<u>Localisation</u>	<u>Caractéristiques</u>	<u>Réf.</u>
Ig p 120 Ig p 100 Ig p 80	120 KD 100 KD 80 KD	sur les lysosomes, la membrane plasmique, les coated vesicles des cellules hépatiques et sur les phagosomes et lysosomes secondaires des macrophages.	- hautement glycosylée. - Ig 100 présente une analogie avec une ATPase de membrane lysosomale.	39 38, 40 38, 40
Lysosome associated proteins (Lamp)	105-115 KD	lysosomes de macrophages P388 et de cellules 3T3 d'embryons de souris.	- présente un précurseur de 92 KD et des formes matures de 110 à 140 KD.	41
Lamp-1	130-150 KD	idem	- 2 types de protéines analogues	42
Lamp-2	100-110 KD	idem.	- précurseurs du même type que Lamp-1.	42
Lysosomal integral membrane (Limp)				43
Limp I	35-50 KD	les 3 types sont localisés	- présence de précurseurs :	
II	74 KD	sur les lysosomes, le Golgi et le RER des cellules hépatiques.	de 27 KD. de 72 KD.	
III	90-100 KD		de 86 KD.	
LMP2-C ₅		Lysosomes et endosomes de cellules rénales de rat.	- présent sous 2 formes : monomériques (76-78 KD) et dimérique (150-170 KD). - précurseurs de 61 à 68 KD. - riche en cystéine.	44
CV24	100-120 KD	Lysosomes (80%), endosomes et membranes plasmiques (20%) de cellules de poulet.		31
10D10	94 KD	Lysosomes des cellules endothéliales et de Kupffer; également un peu sur les hépatocytes.	- présence de précurseurs.	51

3. BIOGENESE DES LYSOSOMES.

La biogenèse des **enzymes** est connue maintenant assez précisément. Synthétisées sur le réticulum endoplasmique rugueux, elles sont ensuite transmises à l'appareil de Golgi où deux récepteurs à mannose-6-phosphate (215 KD et 46 KD) les prennent en charge et les transportent dans un compartiment non lysosomal acide, avant d'être livrées aux lysosomes; le récepteur à mannose-6-phosphate est recyclé vers l'appareil de Golgi (45).

La biogenèse des **glycoprotéines** est moins bien connue. Ne présentant aucun résidu phosphate, ces protéines ne peuvent pas être reconnues par les récepteurs golgiens, cités ci-dessus.

La synthèse de ces glycoprotéines semble se dérouler de la même manière que pour les glycoprotéines plasmiques (38). Elles sont synthétisées sur le réticulum endoplasmique rugueux; elles subissent ensuite des glycosylations terminales lors de leur passage par le Golgi. On peut d'ailleurs suivre les étapes successives de la glycosylation : des précurseurs de poids moléculaires de plus en plus élevés apparaissent dans la cellule (43).

On ne note pas ou peu de glycoprotéines lysosomales au niveau de la membrane plasmique (46). Ceci implique qu'une ségrégation de protéines lysosomales et plasmiques s'est produite avant le transfert à la membrane cellulaire. On peut supposer que cette séparation s'est produite au niveau du Golgi trans, ou juste après la glycosylation (38).

4. MOUVEMENT DES PROTEINES DE LA MEMBRANE LYSOSOMALE.

On a longtemps pensé que les protéines de la membrane lysosomale provenaient de la membrane plasmique. Burnside et Schneider (34) ont montré que la composition de ces 2 types de membranes était très différente. Des études actuelles montrent pourtant que la membrane lysosomale est une structure dynamique en relation avec les endosomes notamment, lors du processus de l'endocytose. Il apparaît de plus en plus qu'il existe une relation entre la membrane plasmique et la membrane lysosomale, relation au cours de laquelle se produit un échange de matériel.

Muller *et al.* (47) ont mis en évidence l'existence d'un flux bidirectionnel en marquant les membranes phago-lysosomales de macrophages à l'aide de sphères en latex couplées à de la peroxydase.

Haylett et Thilo (48) ont marqué un glycoconjugué lié de manière covalente à la surface de macrophages et ont observé que cette protéine est réapparue à la surface de la membrane cellulaire après avoir transité par les lysosomes secondaires. Ils en concluent que les composants membranaires plasmiques et lysosomaux ne se mélangent pas et que les protéines sont rapidement recyclées.

Courtoy *et al.* (49), en utilisant des méthodes qui ne perturbent pas le flux membranaire, ont montré qu'une petite fraction d'un polypeptide de la surface cellulaire est internalisée de manière lente mais constante et apportée aux lysosomes.

Il semble dès lors qu'un trajet physiologique mette en continuité les différents composants cellulaires : la membrane plasmique et les lysosomes, mais également le Golgi, le réticulum endoplasmique, (49).

Cette manière nouvelle et **dynamique** de considérer la cellule permet d'expliquer la présence infime, au niveau des lysosomes purifiés, de deux enzymes marqueurs de la membrane plasmique (50).

L'utilisation des anticorps monoclonaux, qui reconnaissent de manière spécifique une glycoprotéine intrinsèque de la membrane lysosomale, permet de suivre les mouvements intracellulaires de ces protéines induits par l'endocytose.

J. Lippincott Schwartz *et al.* (31) ont suivi de cette manière l'antigène CV24, une glycoprotéine de la membrane lysosomale, présente également sur la membrane de cellules de poulet. Elle a mis en évidence la circulation apparemment rapide entre la surface cellulaire et les membranes intracellulaires. L'anticorps anti CV24 qui est mis en contact avec les cellules, est rapidement repris par une vésicule d'endocytose et transporté vers les lysosomes où il est détruit.

Ce processus se poursuit pendant un temps très long, ce qui suggère l'existence d'un pool antigénique intracellulaire, à partir duquel le recyclage a lieu.

Nous avons utilisé un anticorps, le 10D10, qui reconnaît un antigène de la membrane

des lysosomes, la GP10D10. Comme la plupart des protéines déjà décrites à la surface des lysosomes, la GP10D10 est une glycoprotéine transmembranaire de 94 KD (51).

Sa biogenèse serait semblable à celle des autres glycoprotéines de membrane des lysosomes, décrites jusqu'à présent; on note également la présence de précurseurs. L'immunocytochimie a permis de la localiser dans les cellules endothéliales et de Kupffer, au niveau des lysosomes.

On la retrouve également dans les hépatocytes mais en concentration moindre.

CHAPITRE 3. ENDOCYTOSE DE L'INVERTASE ET DU TRITON WR-1339.

1. L'INVERTASE.

1.1. STRUCTURE DE L'INVERTASE.

L'invertase est une enzyme qui scinde le saccharose en glucose et fructose. Elle est synthétisée par les levures de type Saccharomycès.

On distingue 2 formes d'invertase:

- a) La forme légère : elle ne contient pas de mannose; son poids moléculaire est de 135 KD, et elle est principalement retrouvée dans le cytoplasme; c'est l'invertase interne.
- b) La forme lourde : fortement glycosylée, elle présente 50% de mannose et 3% de glucosamine; son poids moléculaire est de 270 KD. On la trouve dans le périplasma et la paroi cellulaire; on l'appelle l'invertase externe (52,53).

L'invertase externe se compose de deux sous unités protéiques de 60 KD chacune, sur lesquelles se lient de manière covalente 9 chaînes d'oligosaccharides longues de 26 à 54 mannoses (54). Elle présente plusieurs isoenzymes de point isoélectrique (pI) compris entre 3.65 et de 3.32; cette microhétérogénéité est due à des liaisons phosphates sur les mannoses, responsables des propriétés acides de l'enzyme (53).

1.2. DISTRIBUTION CELLULAIRE DANS LE FOIE DE RAT APRES UNE INJECTION D'INVERTASE.

L'invertase de levure injectée en intra-veineuse à un rat est rapidement reprise par le foie. On la retrouve presque exclusivement dans les cellules non parenchymateuses. Ce sont surtout les **cellules endothéliales** qui la captent, grâce à la présence des **récepteurs** à mannose/N acétyl glucosamine (3).

Les **cellules de Kupffer** présentent des **récepteurs** analogues; ils sont cependant moins actifs (56,57). Les **hépatocytes** sont également capables d'incorporer l'invertase

(55); on propose différents modes d'incorporation :

- Tolleshaug *et al.* (56) observent que l'incorporation de l' invertase par les **hépatocytes** est un phénomène saturable qui fait intervenir des **récepteurs** à mannose. Ces récepteurs possèderaient des propriétés de liaisons analogues à celles des récepteurs de surface des cellules non parenchymateuses.
- Madnick *et al.* (57), quant à eux, soutiennent que la prise de l'invertase par les hépatocytes suit le mécanisme de la **pinocytose fluide**.

1.3. ENDOCYTOSE DE L'INVERTASE.

L'invertase externe injectée est relativement stable pendant l'endocytose. Sa structure, très riche en hydrates de carbone, semble la protéger de la dégradation (3). Cependant, après 1 à 2 jours, cette stabilité diminue suite à une hydrolyse progressive des sucres par les endo- et exo-glycosidases présentes dans les lysosomes. On observe en effet une diminution de la taille de l'invertase réextraite du foie. Cette déglycosylation est parallèle à une chute de l'affinité pour l'antisérum anti-invertase glycosylée; ceci signifie que l'invertase déglycosylée a subi une modification conformationnelle suite à la déglycosylation. Une déglycosylation lente se produit; elle est indispensable pour que la dégradation intralysosomale de la partie protéique ait lieu (3).

Par centrifugation différentielle en gradient de saccharose ou de Percoll, on a pu montrer que l'invertase endocytée par les cellules de foie est associée à 2 types de structures (15) : les compartiments prélysosomaux, dépourvus d'activité hydrolytique, et les lysosomes.

Le trajet suivi par l'invertase injectée serait donc:

Plasma --> Compartiment prélysosomal --> Lysosomes.

Pour des temps d'injection croissants, l'évolution de la distribution de l'invertase en **centrifugation différentielle** est nette (15). Dans le cas d'une dose forte (0.9 mg/100g

de poids corporel), l'invertase est associée à des granules qui sédimentent de plus en plus vite; leur taille devient donc de plus en plus élevée. D'abord retrouvée dans la fraction microsomale P, enrichie en vésicules de faible dimension, la distribution de l'invertase correspond à celle de la phosphodiesterase, qui est un marqueur de la membrane plasmique. L'invertase s'associe ensuite à des granules de la fraction L puis de la fraction M après 180 min d'injection.

Les résultats obtenus en **centrifugation isopycnique** montrent que l'invertase s'accumule dans les régions de fortes densité du gradient ($\pm 1,30$ g/ml). La distribution de l'invertase et celle de la **cathepsine C** dans son ensemble, ne coïncident pas pour des temps d'injection très longs. On en conclut que l'invertase s'accumule dans une population particulière de lysosomes, possédant une activité relativement faible de cathepsine C (15); par contre l'**arylsulfatase**, une autre enzyme lysosomale est distribuée d'une façon qui coïncide mieux avec celle de l'invertase accumulée pour un temps long (59). On sait que la cathepsine C se distribue surtout dans les lysosomes des hépatocytes (59), alors que l'arylsulfatase est surtout concentrée dans les lysosomes des cellules non parenchymateuses (58, 59). C'est donc par ce type de cellules, riches en récepteurs mannose N / acétylglucosamine, que l'invertase est captée, endocytée et stockée dans les lysosomes pendant un temps relativement long (15 heures), avant d'être éliminée progressivement; ces lysosomes se trouvent fortement alourdis (15, 59).

Le trajet emprunté dans la cellule par l'invertase endocytée est donc le suivant : incorporée dans la cellule après liaison à des récepteurs à mannose/N Acétylglucosamine et après invagination de la membrane plasmique (3), l'enzyme se retrouve dans les cellules non parenchymateuses, contenue dans une structure dérivée directement de la membrane plasmique, et qui sédimente dans la fraction P (3). Ces structures sont les **endosomes** (3) ou **vésicules de pinocytose** (15). Les endosomes livrent leur contenu aux lysosomes (3), après avoir transité par des granules de type prélysosomal (15), retrouvés en centrifugation différentielle dans la fraction ML. La sensibilité de ces granules au GPN est faible; le GPN, ou Glycyl Phenyl-2 Naphtylamide, est une substance qui, si elle est scindée

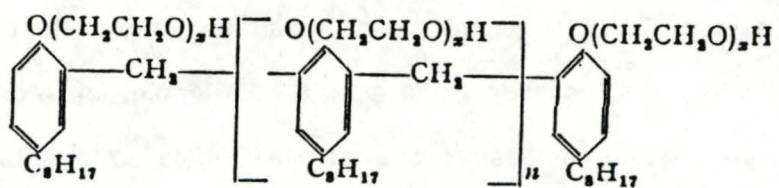


Fig. 8 : Structure du Triton WR-1339 (64).

par la cathepsine C, est capable de provoquer la rupture de la membrane de lysosomes (60). Ces granules sont donc démunis d'activité hydrolytique.

Au delà de 5 minutes d'injection, l'invertase est associée à des granules présentant une sensibilité au GPN et possédant donc une cathepsine C suffisamment active pour scinder le GPN : ce sont **les lysosomes**.

On a mis en évidence l'existence de 2 types de lysosomes :

- a) Les lysosomes de transfert : les seuls à contenir l'invertase injectée après 10 minutes.
- b) Les lysosomes de stockage : impliqués dans l'accumulation de l'invertase. Leur densité est très élevée (15), ce qui permet de les repérer dans un gradient de saccharose.

Les lysosomes de transfert ne semblent pas former une population homogène; l'invertase est associée à des granules dont la densité augmente progressivement pour finalement être fournie aux lysosomes de stockage (14, 15).

La distribution entre les endosomes et les lysosomes n'est pas nette (4).

Une fois arrivée dans les lysosomes, l'invertase est partiellement déglycosylée avant d'être soumise à la protéolyse (3).

2. LE TRITON WR-1339.

2.1. STRUCTURE DU TRITON WR-1339.

Le Triton WR-1339 est un détergent synthétique non-ionique; sa formule se trouve à la figure 8.

Il provoque chez l'animal injecté de profonds changements dans le métabolisme des lipides (61,62); il induit notamment une hypercholestérolémie (63).

2.2. DISTRIBUTION CELLULAIRE DANS LE FOIE DE RAT APRES INJECTION DU TRITON WR-1339.

Une fraction importante du Triton WR-1339 injecté à l'animal s'accumule dans les cellules parenchymateuses et non parenchymateuses du foie.

Dès 17 heures d'injection, le détergent se trouve associé intégralement aux lysosomes et s'y maintient plusieurs jours.

On explique la capture hépatique du Triton WR-1339 par le phénomène de pinocytose (64).

2.3. EFFET DU TRITON WR-1339 SUR LES LYSOSOMES.

Le Triton WR-1339 injecté modifie les propriétés biochimiques et morphologiques des lysosomes (65). Il induit une augmentation de leur stabilité à pH 5 et à 37°C (64).

Le changement de la densité d'équilibre des lysosomes est l'effet le plus important, induit par le détergent. Les lysosomes, dont la densité est comprise entre 1,21 et 1,22 g/ml, sont allégés en présence de Triton WR-1339 et se situent alors aux densités de 1,10 et 1,12 g/ml.

Cette modification biochimique peut s'expliquer par les changements morphologiques que subissent les lysosomes. Le détergent provoque une dilatation de ces organites dont le contenu apparaît clair, et la périphérie présente des granulations denses caractéristiques des lysosomes (63,64).

3. UTILISATION DE L'INVERTASE ET DU TRITON WR-1339.

Nous utilisons l'invertase et le Triton WR-1339 pour leur effet sur la densité des lysosomes.

L'invertase injectée s'accumule dans les lysosomes des cellules non parenchymateuses qu'elle allourdit à une densité de 1,30 g/ml (59). Le Triton WR-1339 que l'on injecte se retrouve dans les lysosomes de toutes les cellules hépatiques, qu'il allège à une densité

1,12 g/ml (63,64).

Ces 2 molécules induisent une modification de comportement des lysosomes en centrifugation isopycnique; cette modification nous intéresse particulièrement car elle nous permettra de localiser la membrane des lysosomes des différents types cellulaires dans un gradient suite au dosage de la GP10D10.

	Volume. %*	
	Per Cell	Per parenchyma
Nuclei:		
Hepatocyte	9.8 = 0.64	7.6 = 0.5
Endothelial cell	16.4 = 2.65	0.46 = 0.074
Kupffer cell	19.2 = 2.07	0.40 = 0.043
Fat-storing cell	20.8 = 2.49	0.29 = 0.035
Cytoplasmic matrix:		
Hepatocyte	57.9 = 0.80	45.0 = 0.62
Endothelial cell	66.9 = 0.99	1.87 = 0.03
Kupffer cell	60.9 = 1.56	1.28 = 0.03
Fat-storing cell	48.4 = 3.1	0.68 = 0.04
Mitochondria:		
Hepatocyte	28.52 = 0.50	22.03 = 0.39
Endothelial cell	4.26 = 0.39	0.12 = 0.011
Kupffer cell	4.52 = 0.38	0.09 = 0.008
Fat-storing cell	4.36 = 0.50	0.06 = 0.007
Lysosomes:		
Hepatocyte	0.82 = 0.16	0.64 = 0.12
Endothelial cell	6.86 = 1.10	0.19 = 0.03
Kupffer cell	13.57 = 0.84	0.29 = 0.02
Fat-storing cell	0.23 = 0.04	0.003 = 0.0006
Multivesicular bodies:		
Fat-storing cell	0.73 = 0.076	0.01 = 0.001
Autophagic vacuoles:		
Hepatocyte	0.23 = 0.059	0.18 = 0.046
Peroxisomes:		
Hepatocyte	2.44 = 0.14	1.89 = 0.11
Lipid droplets:		
Hepatocyte	0.37 = 0.16	0.29 = 0.13
Fat-storing cell	25.34 = 2.85	0.35 = 0.04
Pinocytotic vesicles:‡		
Hepatocyte	0.18 = 0.021	0.140 = 0.016
	<i>0.082</i>	<i>0.071</i>
Endothelial cell	5.50 = 0.78	0.150 = 0.02
	<i>2.51</i>	<i>0.077</i>
Kupffer cell	1.80 = 0.26	0.040 = 0.006
	<i>0.82</i>	<i>0.020</i>
Fat-storing cell	0.16 = 0.028	0.0022 = 0.0004
	<i>0.073</i>	<i>0.0011</i>

* Mean = SE; N = 5.

‡ Data corrected for section thickness effect indicated by italics.

TABLEAU 4 : Composition volumétrique des différents types cellulaires hépatiques (66).

CHAPITRE 4. HETEROGENEITE CELLULAIRE DU FOIE DE RAT.

Le foie est un organe constitué de différents types cellulaires. Le parenchyme hépatique se compose de cellules hépatiques, ou hépatocytes, et de cellules non parenchymateuses retrouvées dans les capillaires sinusoides du foie.

Trois types de cellules non parenchymateuses sont identifiées :

- les fat storing cells, ou cellules de stockage des graisses, sont considérées comme des cellules interstitielles; le stockage étant leur rôle essentiel.
- les cellules de Kupffer, qui sont nanties des fonctions des macrophages, et les cellules endothéliales sont retrouvées dans les capillaires sinusoides et représentent les cellules non parenchymateuses les plus importantes.

Les pourcentages relatifs de ces cellules dans le foie ont été déterminés par Blouin *et al.* (66).

Les hépatocytes représentent 78% du volume du foie alors que les cellules non parenchymateuses ne correspondent qu'à 6,3% répartis entre les 3 types de cellules : les cellules endothéliales (2,8%), les cellules de Kupffer (2,1%) et les fat storing cells (1,4%).

La composition volumétrique en organite de ces différents types cellulaires a été également déterminée; les valeurs sont reprises dans le tableau 4.

De cette étude, il apparaît que un hépatocyte ne comporte que peu de lysosomes par rapport à une cellule de Kupffer; cependant, les cellules parenchymateuses représentant la majeure partie du volume hépatique, les lysosomes parenchymateux occupent deux fois plus de volume que les lysosomes des cellules de Kupffer, beaucoup moins nombreuses dans le foie (66).

Les hydrolases lysosomales se distribuent de manière hétérogène dans le foie de rat (58). Les distributions de ces enzymes ne sont pas strictement superposables en centrifugation isopycniqne (69). On note par exemple une différence entre la distribution de l'arylsulfatase, concentrée surtout dans les cellules non parenchymateuses, et celle de la phosphatase acide (58) ou de la cathepsine C, toutes deux concentrées essentiellement dans les cellules parenchymateuses (15). Il apparaît également que les cellules de Kupffer sont

particulièrement riches en désoxyribonucléases acides, par rapport aux cellules parenchymateuses qui n'en possèdent presque pas (67, 68).

La répartition des hydrolases acides diffère donc pour les cellules parenchymateuses et non parenchymateuses.

BUT DU TRAVAIL.

L'anticorps monoclonal, le 10D10, qui reconnaît de manière spécifique la GP10D10, protéine de la membrane lysosomale, nous permettra de suivre les **mouvements de cette protéine au cours de l'endocytose de l'invertase et du Triton WR-1339**. Le Triton WR-1339 est endocyté par les cellules parenchymateuses et non parenchymateuses du foie (64), alors que l'invertase injectée est capturée principalement par les cellules endothéliales et de Kupffer (15). Cette conjoncture devrait nous permettre de suivre le sort de la membrane lysosomale, ou du moins d'une de ses glycoprotéines intrinsèques, au cours de l'endocytose de l'invertase et du Triton WR-1339.

Nous mettrons tout d'abord au point une méthode de dosage de l'antigène GP10D10; ensuite, nous essaierons de repérer le déplacement de la membrane des lysosomes en centrifugation isopycnique après injection d'invertase, qui alourdit les lysosomes des cellules endothéliales, et de Triton WR-1339, qui allège les lysosomes de tous les types de cellules du foie.

Nous tenterons enfin, à partir de ces résultats biochimiques, de déterminer à quel type cellulaire la GP10D10 appartient. Une approche morphologique par immunocytochimie (marquages simples et doubles) nous permettra de confronter les résultats obtenus par les 2 types d'approches.

MATERIEL ET METHODES.

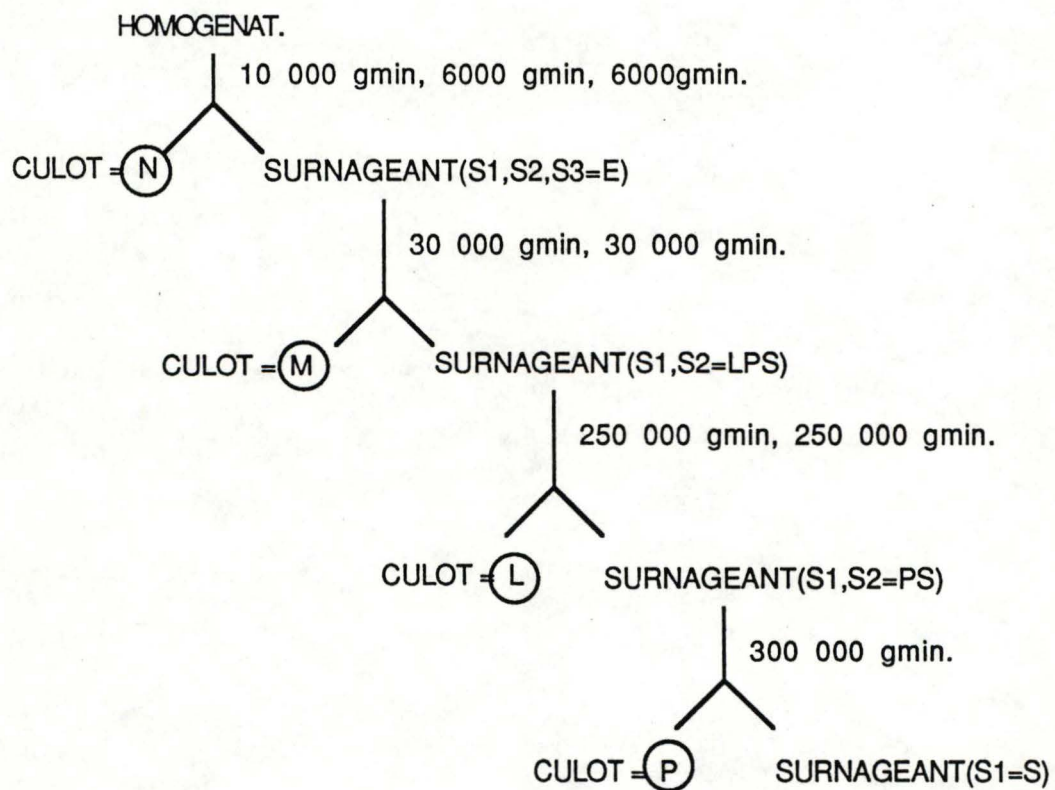


Fig. 9 : Schéma de fractionnement du foie de rat (69).

M A T E R I E L E T M E T H O D E S.

1. TECHNIQUE DE FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE DE FOIE DE RAT (fig. 9).

Cette technique est basée sur la sédimentation successive des particules à séparer dans un milieu homogène et isotonique (saccharose 0.25 M). La différence de coefficient de sédimentation dépend de la taille et de la densité de ces particules.

On obtient, au terme de ces étapes, des fractions plus ou moins enrichies en particules (69).

1.1. PRINCIPE.

Un rat Wistar mâle est mis à jeûn plus ou moins 20 heures avant son sacrifice. Le foie est prélevé, pesé et placé le plus rapidement possible dans du saccharose 0.25 M glacé; il est ensuite découpé et broyé dans un homogénéiseur de Potter.

Cet homogénat est alors soumis à des centrifugations successives permettant d'obtenir les 5 fractions suivantes qui sont enrichies en certains organites subcellulaires mais qui ne sont jamais pures (fig.9):

1. La fraction nucléaire (N).

C'est la première fraction obtenue ; elle est enrichie en noyaux mais contient également des débris cellulaires.

2. La fraction mitochondriale lourde (M).

Elle contient principalement des mitochondries mais on note aussi la présence de peroxyosomes et de lysosomes.

3. La fraction mitochondriale légère (L).

Elle est très riche en lysosomes et peroxyosomes; elle contient aussi des mitochondries.

4. La fraction microsomale (P).

Cette fraction contient des fragments de réticulum endoplasmique lisse et rugueux, de membrane plasmique et de l'appareil de Golgi et, accessoirement, des lysosomes, des peroxysomes et des mitochondries.

5. La fraction soluble (S).

On y retrouve des particules à petit coefficient de sédimentation qui n'ont pas sédimenté précédemment : ce sont essentiellement des protéines solubles.

En modifiant les conditions de centrifugation, on peut sédimenter plusieurs fractions à la fois; on prépare ainsi les fractions NM, ML, PS ...

Afin d'obtenir des préparations plus ou moins pures, on procède au lavage de chaque culot obtenu; cela signifie que ce culot est remis en suspension, puis centrifugé. Les grosses particules sédimentent à nouveau et les plus petites, qui auraient pu se trouver piégées dans le culot, se retrouvent dans le surnageant.

Il est évident que plus le nombre de lavages est grand, plus la préparation sera enrichie. Cependant, la séparation ne sera jamais totale, pour plusieurs raisons :

- le culot ne peut être lavé indéfiniment.
- le coefficient de sédimentation d'un organite n'est jamais une valeur singulière, ce qui entraîne un recouvrement plus ou moins important dans la distribution des particules, même si celles-ci ont une densité différente.

2. L'ENZYME DE REFERENCE.

C'est, selon la définition de de Duve (70), une enzyme localisée spécifiquement dans un type de granule et dont la concentration est supposée homogène dans la population de ce granule.

La mesure de l'activité de cette enzyme permet d'apprécier quantitativement la composition en granules des fractions obtenues après centrifugation différentielle. Par exemple, la

phosphatase acide et l'arylsulfatase sont des enzymes de référence des lysosomes.

3. DOSAGES ENZYMATIQUES.

3.1. L'ACTIVITE TOTALE - L'ACTIVITE LIBRE.

L'activité enzymatique mesurée au cours de ces tests est l'activité totale; l'enzyme a été totalement libérée de l'organite par l'utilisation de détergent (Triton X-100) qui déstabilise les structures membranaires. Le contact entre l'enzyme et le substrat est, dès lors, maximum.

Un dosage enzymatique, réalisé dans un milieu isotonique et sans Triton X-100, permet la mesure de l'activité libre de l'enzyme dans le milieu. Les conditions de dosage sont telles que les membranes ne sont pas altérées; cette mesure donne une idée de l'état de conservation des membranes limitant les organites subcellulaires.

3.2. LE PRINCIPE GENERAL DU DOSAGE ENZYMATIQUE.

Chaque fraction est incubée avec une quantité déterminée du substrat de l'enzyme à doser, dans des conditions du milieu (pH, concentration, ...) qui permettent la réaction.

Le produit formé après un temps déterminé est dosé le plus souvent par des méthodes colorimétriques ou fluorimétriques.

La mesure de l'absorbance permet de déterminer la quantité d'enzyme présente dans chacune des fractions; elle s'exprime en unité d'activité enzymatique : c'est la quantité d'enzyme qui libère une micromole de produit par minute, dans ces conditions d'incubation.

Pour chaque dosage, un bilan est réalisé. En rapportant à l'activité dans l'homogénat (E+N) la somme des activités enzymatiques obtenues dans chacune des fractions, on calcule la récupération. On peut ainsi apprécier les pertes, les inactivations ou les erreurs de

manipulation survenues lors du fractionnement.

3.3. LE DOSAGE DES PROTEINES.

On dénature les protéines de chaque fraction à l'aide de NaOH 0.5 N; on dose ensuite les groupements tyrosine par réaction avec le réactif de Folin. La coloration bleue obtenue est mesurable au spectrophotomètre. Elle est proportionnelle à la concentration en protéine, que l'on peut estimer en comparant l'absorbance mesurée à celle obtenue pour un étalon de sérum albumine à 0.4 mgr par ml.

3.4. L'ACTIVITE SPECIFIQUE - L'ACTIVITE SPECIFIQUE RELATIVE.

Après le fractionnement, on mesure l'activité de différentes enzymes de référence dans chacune des fractions, ainsi que la quantité de protéines.

Ces mesures permettent de calculer l'activité spécifique (AS) : c'est le rapport entre la quantité d'enzyme et la quantité de protéines présentes dans chacune des fractions.

$$AS = \frac{Q}{P} \quad \text{avec } Q = \text{quantité d'enzyme}$$

$$P = \text{quantité de protéines}$$

On peut également calculer l'activité spécifique relative (ASR) qui est le rapport entre l'AS de la fraction considérée et l'AS de l'homogénat (H=E+N).

$$ASR = \frac{Q/P}{\Sigma Q / \Sigma P} = \frac{\text{AS de la fraction}}{\text{AS de l'homogénat}}$$

La notion d'ASR donne une idée de la purification dans la fraction considérée, de l'organisme dont on mesure l'enzyme de référence.

3.5. PRESENTATION GRAPHIQUE DES RESULTATS.

On place en abscisse le pourcentage cumulé, ramené à 100%, de protéines pour les fractions rangées dans l'ordre N, M, L, P, S. En ordonnée, on reporte l'ASR obtenue pour chaque fraction. Le profil de distribution ainsi obtenu est propre à chaque organite subcellulaire.

Dans un tel histogramme, la hauteur des rectangles obtenus représente le degré de purification de l'enzyme dans la fraction considérée. La surface de chaque rectangle représente le pourcentage d'activité.

4. GRADIENT ISOPYCNIQUE OU GRADIENT D'EQUILIBRATION DE DENSITE.

Lorsqu'une particule est centrifugée dans un gradient de densité, elle migre dans le gradient et s'équilibre dans une zone déterminée de densité égale à la sienne; la vitesse de sédimentation de cette particule devient alors nulle. La distribution obtenue dans le gradient dépend de la densité des particules à séparer et de celle du milieu (69) .

Nous réalisons la séparation des organites en déposant au sommet d'un gradient de saccharose, 0.5 ml d'une fraction ML préparée dans du saccharose 0.25 M glacé, à partir d'un foie de rat normal ou traité avec du Triton WR-1339 et/ou avec de l'invertase.

Les densités du gradient s'étendent de 1.09 à 1.26 gr/ml et les particules sont soumises à une vitesse de centrifugation de 39 000 rpm durant 2 H 30 min.

Après centrifugation, le gradient est sectionné en plusieurs fractions. On mesure alors la densité moyenne de chacune d'elle; on calcule ensuite la dilution ainsi que les densités limites de chaque section.

La représentation des résultats après un dosage enzymatique consiste en une série de rectangles correspondant chacun à une fraction du gradient.

La hauteur du rectangle représente la fréquence, c'est-à-dire le pourcentage d'activité dans la fraction par rapport à la somme des activités retrouvées dans toutes les fractions, divisé par l'incrément de densité de la fraction considérée.

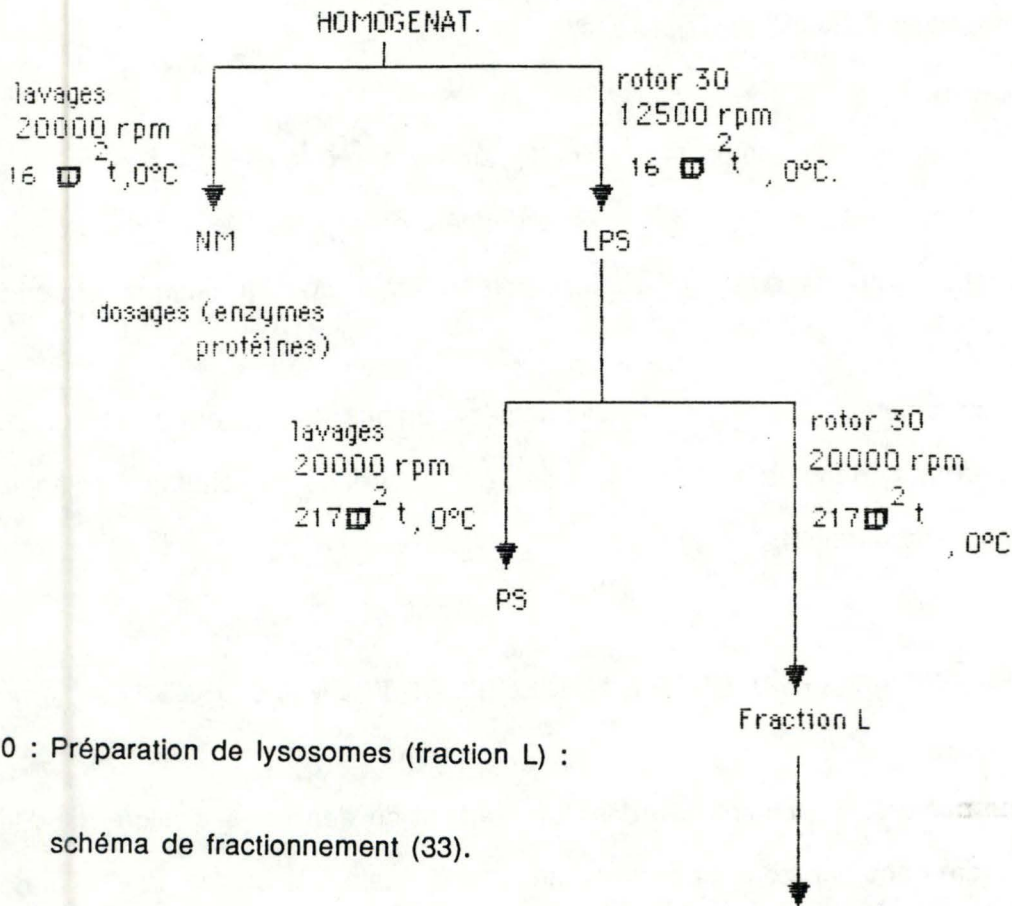


Fig.10 : Préparation de lysosomes (fraction L) :

schéma de fractionnement (33).

Dépôt sur le gradient de métrizamide.

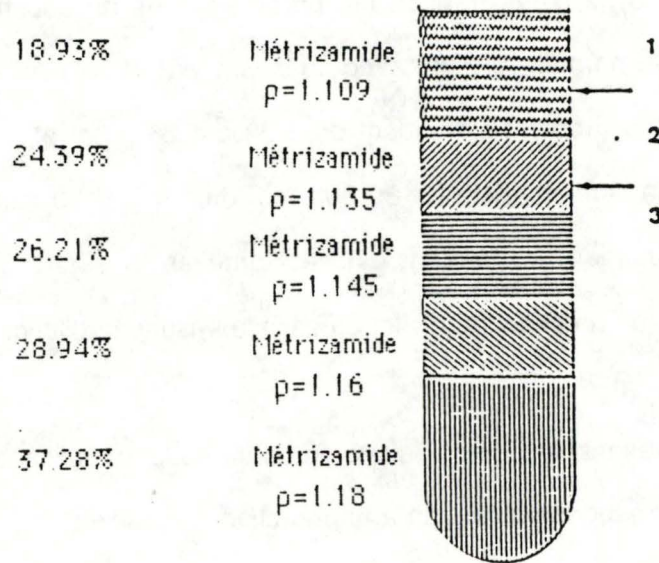


Fig. 11 : Représentation schématique du gradient de métrizamide utilisé pour purifier des lysosomes. Le tube est sectionné et on recueille la fraction 2 (lysosomes purifiés)(33).

5. PREPARATION DE MEMBRANES LYSOSOMALES.

5.1. PREPARATION DES LYSOSOMES (fig. 10).

Une fraction L est préparée à partir d'un homogénat de foie de rat. Le schéma de fractionnement utilisé se trouve à la figure 10.

5.2. PURIFICATION DES LYSOSOMES (fig. 11).

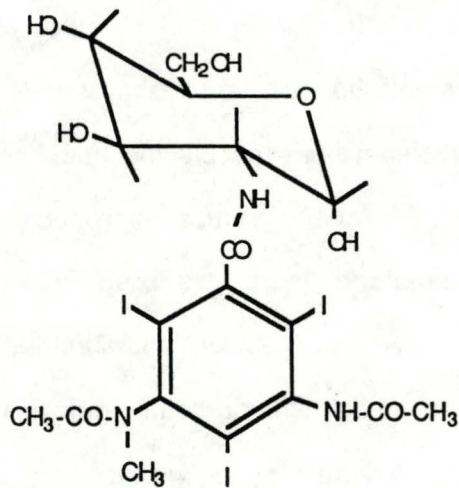
Les membranes sont obtenues à partir de lysosomes purifiés sur un gradient discontinu de métrizamide (71) (cfr fig. 11).

La métrizamide est une molécule iodée (cfr fig. 12) qui présente, pour une solution de densité identique, une plus faible osmolarité que le saccharose; le milieu rendu hypo-osmotique allège les lysosomes en augmentant leur espace osmotique. Les lysosomes sont ainsi séparés des autres organites et notamment des peroxysomes qui n'ont pas d'espace osmotique. Les mitochondries sont les contaminants majeurs des préparations lysosomales; leur élimination est favorisée par l'utilisation d'une fraction mitochondriale légère (L) moins riche en mitochondries qu'une fraction mitochondriale totale (ML). Cette élimination est encore accrue par le dépôt de l'échantillon au fond du gradient. Les mitochondries plus sensibles à l'effet de la pression hydrostatique s'équilibrent à une densité plus grande. La purification de lysosomes par cette méthode est de l'ordre de 70 sur base de l'activité de la phosphatase acide (33). *Détails pratiques dans l'appendice technique.*

5.3. PREPARATION DES MEMBRANES.

Les lysosomes purifiés sont dilués environ 6 fois dans de l'eau. Dans ce milieu hypotonique, les lysosomes éclatent. Les membranes sont recueillies par centrifugation et portées à la dilution 0.2 dans du tampon PBS, pH 7,4. *Détails pratiques dans l'appendice technique.*

METRIZAMIDE



2-amino-2-deoxyglucose

Tri iodobenzene dérivé
(MW: 789)

Fig. 12 : Structure de la métrizamide.

5.4. DOSAGE ENZYMATIQUE ET PROTEIQUE.

La phosphatase acide, une enzyme de référence des lysosomes (58), et les protéines sont dosées sur chaque fraction obtenue afin de mettre en évidence les pertes possibles au cours des étapes de la purification et de la préparation des membranes.

Les fractions testées sont : E NM L PS

F₁ F₂ F₃

Lys S₁ (surnageant)

La métrizamide interfère avec le réactif de Folin utilisé pour le dosage des protéines (33). Ce dosage débute donc par la précipitation des protéines à l'aide d'1 ml de TCA 10%; dans ces conditions, la métrizamide ne précipite pas. Le culot obtenu après centrifugation est mis en suspension dans du NaOH 0.5 N pendant 30 minutes. La procédure du dosage des protéines suivant la technique de Folin décrite dans l'appendice technique peut alors être appliquée.

Détails pratiques dans l'appendice technique.

6. MARQUAGE IN VIVO DE L'ANTICORPS 10D10 A LA METHIONINE S³⁵.

Le 10D10 est un anticorps monoclonal dirigé contre une protéine des membranes lysosomales purifiées suivant la technique décrite ci-dessus; cet anticorps a été produit et caractérisé par M.M. Gonze (51). Il est synthétisé par des cellules d'hybridomes; ces cellules sont issues de la fusion de plasmocytes de rate de souris et de cellules cancéreuses. L'hybridome présente la capacité de synthèse d'anticorps des plasmocytes et l'immortalité des cellules cancéreuses.

Ces cellules sont mises en culture à raison de $4 \cdot 10^6$ cellules dans 2 ml de milieu de jeûne (sans méthionine) pendant 1 heure à 37°C. On ajoute ensuite la méthionine S³⁵ à la culture pendant 6 heures à 37°C. La méthionine, un acide aminé, est utilisée par les cellules d'hybridomes lors de la synthèse de l'anticorps. L'anticorps relargué dans le milieu de culture est donc radioactif. On le recueille en centrifugeant le milieu; les cellules

sédimentent en un culot qui sera éliminé, et le surnageant est dessalé sur une colonne Séphadex PD10 contre du tampon PBS.

7. MARQUAGE DE L'ANTICORPS A LA BIOTINE.

7.1. PURIFICATION DE L'ANTICORPS.

Le marquage de protéines à la biotine demande une forte concentration de ces protéines. C'est pour cette raison que l'on prépare l'anticorps à marquer à partir d'ascite recueilli après injection intrapéritonéale d'hybridomes producteurs de 10D10, à des souris traitées au préalable au para tétraméthyl pentadécane 2,6,10,14 (72); en effet, dans le cas d'un anticorps monoclonal, l'ascite peut contenir jusqu'à 10 mgr de protéines par ml (73). La purification s'effectue à l'aide d'une colonne de protéine A couplée au sépharose.

La protéine A est un composant de la paroi de Staphylococcus aureus; elle présente une forte affinité pour les immunoglobulines surtout les IgG qu'elle lie préférentiellement par leur fragment Fc.

L'affinité de la protéine A pour une immunoglobuline dépend non seulement de l'espèce, de la classe et de la sous-classe de l'anticorps mais également du pH et de la force ionique du milieu. C'est en modifiant ces 2 paramètres que nous effectuons la purification. Les étapes de la purification sont suivies par la mesure de la densité optique. La fixation à la protéine A s'effectue à pH 8,9. A ce pH, les IgM et les IgA se fixent mal; on observe donc un premier pic d'élution qui correspond aux molécules non retenues.

Lorsque la fixation a pris fin et que la densité optique a repris sa valeur de base, les IgG étant fixées sur la colonne, on réalise l'élution; selon la classe de l'IgG, le pH du tampon d'élution est différent : le pH sera de 4 pour les IgG 2b, de 5 pour les IgG 2a et de 6 pour les IgG1, dont le 10D10.

Après purification, on teste l'anticorps par ELISA et on dose les protéines.

Il est ensuite possible de régénérer la colonne, en employant un tampon de pH 3; les immunoglobulines non relarguées précédemment se désorbent alors (73).

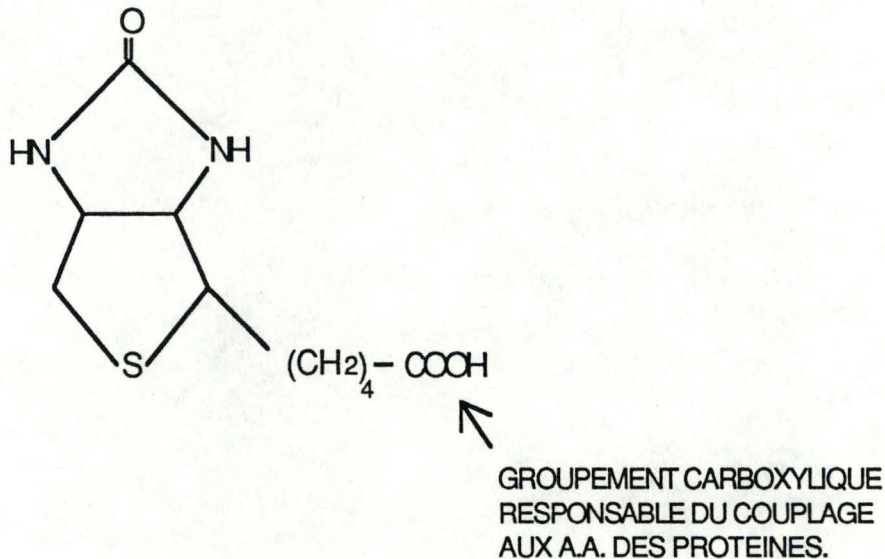
La concentration optimale pour un marquage à la biotine étant relativement élevée (10 mg/ml), il faudra concentrer la solution contenant l'anticorps ainsi purifié (74).

Détails pratiques dans l'appendice technique.

7.2. LA BIOTINE.

La biotine est un des 12 facteurs hydrosolubles du complexe de la vitamine B; c'est aussi un coenzyme pour les enzymes impliquées dans des réactions de carboxylation (74).

La biotine est un haptène qui peut être couplée aux anticorps sans modifier les fonctions immunologiques de ceux-ci (75). Sa structure est la suivante (74) :



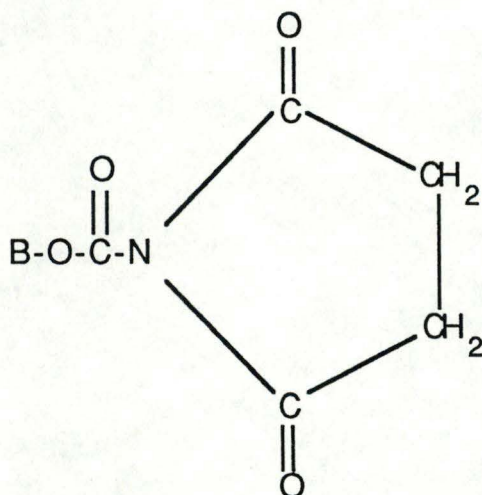
7.3. PRINCIPE DU MARQUAGE.

La biotine possède un groupement carboxylique qui peut être activé en ester par le N-hydroxysuccinimide (NHS).

La biotine estérifiée, la biotiny-N-hydroxysuccinimide (BNHS), peut être facilement conjuguée à une protéine en réagissant avec les groupements -NH₂ des acides aminés.

Les étapes du marquage (74) sont les suivantes :

1. Activation de la biotine en BNHS.

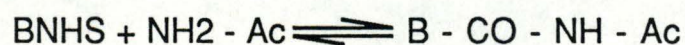


Structure de la biotine activée.

Rq : La biotine activée est disponible sur le marché; elle se conserve déshydratée.

2. Biotinylation de l'anticorps.

La biotinylation de l'anticorps s'obtient par la réaction entre la BNHS et un groupement amine de l'anticorps, ce qui forme un composé stable.



Détails pratiques dans l'appendice technique.

7.4. TEST DE L'ANTICORPS BIOTINYLE.

Lorsque le marquage de l'anticorps est effectué, on le teste par ELISA et on mesure la quantité de protéines. On effectue également ce test sur les différentes fractions recueillies au cours des étapes du couplage.

- Les fractions testées sont :
1. l'Ascite.
 2. le premier pic (molécules non retenues).
 3. l'anticorps purifié.
 4. l'anticorps après dialyse.
 5. l'anticorps concentré.
 6. l'anticorps biotinylé.

8. DOSAGES IMMUNOENZYMATIQUES QUANTITATIFS.

Ces méthodes permettent de doser avec une bonne précision l'anticorps contenu dans une préparation. Cette titration est basée sur l'affinité de l'anticorps monoclonal pour l'antigène préalablement fixé sur le fond de boîtes de titration; le fond en polystyrène joue le rôle d'un adsorbant en phase solide (76).

Après lavage des plaques au PBS pH 7,4 , les sites non occupés par l'antigène sont saturés avec de la sérum albumine bovine (BSA) à 1% préparée dans du PBS. La BSA possède la propriété de s'adsorber sur le polystyrène. Cette saturation est une étape importante, qui empêche l'adsorption non spécifique des préparations testées.

Pour mettre en évidence une éventuelle adsorption non spécifique, nous faisons des blancs. Ils sont réalisés dans des conditions tout à fait analogues aux tests, mais l'antigène, càd les membranes lysosomales, est absent. Ces blancs sont soustraits de la valeur de ces tests. Ils permettent d'une part de mettre en évidence une adsorption non spécifique éventuelle et, d'autre part, ces blancs soustraits de la valeur des tests donnent une mesure précise permettant d'éliminer l'influence des réactifs intervenant dans le dosage.

8.1. TITRATION DE L'ANTICORPS 10D10.

8.1.1. ELISA ou Enzyme Linked Immunosorbent Assay et SPRIA ou Solid Phase Radioimmuno Assay.

L'ELISA et le SPRIA sont 2 types de tests qui ont été réalisés pour doser l'anticorps 10D10.

Ces 2 dosages s'effectuent sur les membranes adsorbées sur les plaques de titration. Après saturation, l'anticorps est déposé et réagit avec l'antigène pendant 1 heure à 37°C.

8.1.1.1. Test SPRIA.

L'anticorps utilisé dans le test SPRIA est radioactif, marqué à la méthionine S³⁵. Lorsque la réaction avec l'antigène a eu lieu, la plaque est lavée au PBS pH 7,4; chaque puit est ensuite découpé et la radioactivité mesurée dans un compteur à scintillation.

Détails pratiques dans l'appendice technique.

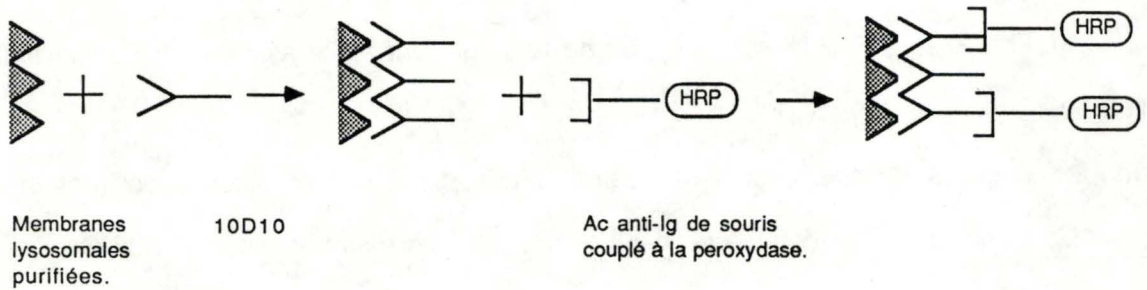
8.1.1.2. Test ELISA.

L'anticorps que l'on désire doser réagit pendant une heure avec l'antigène. La plaque est ensuite lavée avec du PBS pH 7,4 et un second anticorps (Fab) est déposé; le Fab est un fragment d'anticorps de lapin dirigé contre les anticorps de souris; il reconnaît donc le 10D10. Ce deuxième anticorps est couplé à de la peroxydase; le dosage du 10D10 se réalise par la mesure de l'activité de la peroxydase; la lecture à 405 nm se réalise au lecteur de plaques MR 600 Microplate reader (Dynatech Laboratories).

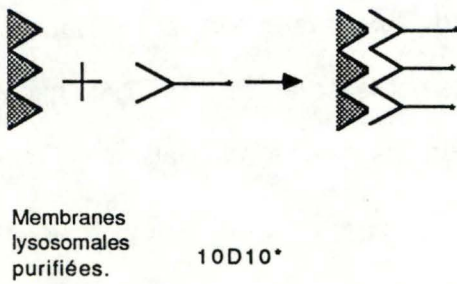
Détails pratiques dans l'appendice technique.

DOSAGE D'ANTICORPS.

1. Principe de l'ELISA.



2. SPRIA.



3. Dosage du 10D10-B

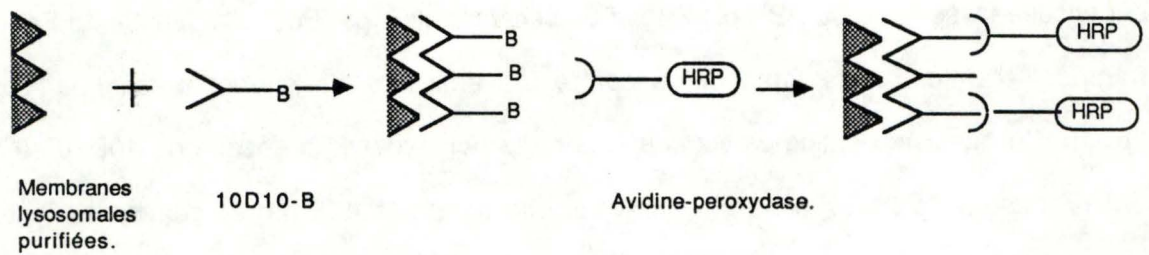


Fig. 13 : Méthodes de titration de l'anticorps (76).

8.1.1.3. Dosage de l'anticorps couplé à la biotine (le 10D10-B).

Il s'agit d'une variante du test ELISA. L'anticorps à doser est couplé à la biotine. Il est incubé avec les membranes lysosomales adsorbées. L'avidine couplée à la peroxydase remplace la Fab-Peroxydase; elle reconnaît les groupements biotine fixés à l'anticorps. On dose donc l'anticorps en mesurant l'activité de la peroxydase fixée.

L'avidine et la biotine réagissent pour former un complexe très stable, pourtant non covalent (75), caractérisé par une constante de dissociation (K_d) de 10^{-5} M (74). L'avidine est une glycoprotéine isolée du blanc d'oeuf composé de 4 sous-unités de 15 600 daltons chacune et possédant un pI de 10,5 (75).

On note la présence de 4 sites de fixation pour la biotine. Ces sites sont enfoncés dans la structure de l'avidine et accueillent la biotine qui, par sa petite taille (75), s'y faufile pour s'y fixer (74).

8.1.1.4. L'avantage du système Avidine / Biotine.

D'une part, l'anticorps biotinylé ne perd pas ses capacités de fixation sur l'antigène, même si plusieurs groupements - NH_2 sont biotinylés.

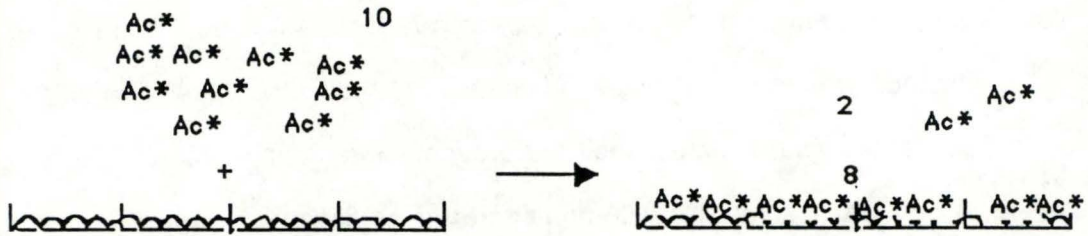
D'autre part, les enzymes telle la peroxydase, couplées à l'avidine gardent toute leur activité. On peut donc s'attendre à ce qu'un grand nombre de molécules de biotine fixées à l'anticorps réagisse avec un grand nombre de molécules d'avidine, elle-même couplée à plusieurs molécules de peroxydase. Cette **amplification** notable du signal avec le système Avidine / Biotine rend le dosage plus sensible (77).

C'est également pour cette raison que ce système est de plus en plus utilisé en immunocytochimie, pour localiser des antigènes de surface par exemple (78,79).

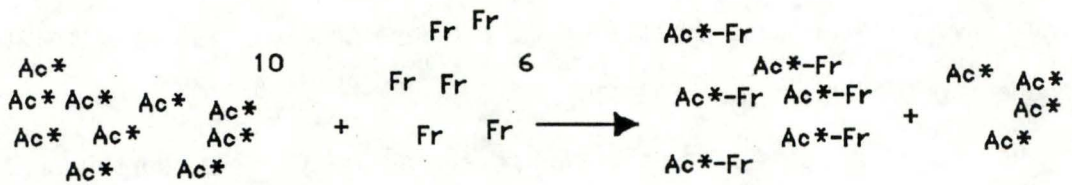
8.1.1.5. Résumé des méthodes de titration de l'anticorps 10D10.

cfr fig. 13. *Détails pratiques dans l'appendice technique.*

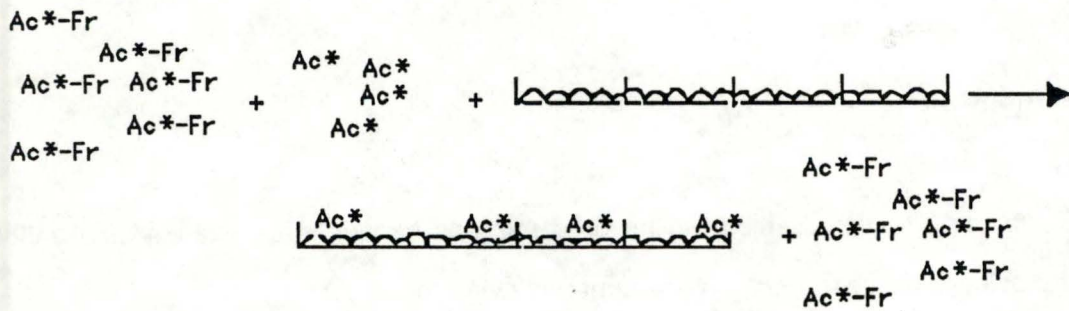
1. Contrôle en absence de fraction isolée à doser



2. Préincubation de la fraction à doser (Fr)



3. Incubation du produit de la préincubation en présence de membranes lysosomales adsorbées dans le fond des puits.



4. Lavage des boîtes multipuits.

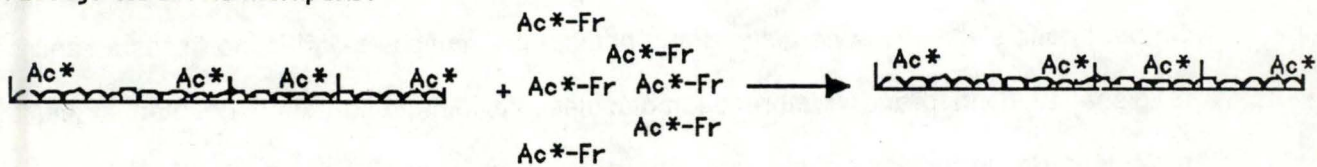


Fig. 14 : Dosage de l'antigène GP10D10 présent dans une fraction, par la technique de compétition(76).

La fraction contenant l'antigène est préincubée avec le 10D10*, puis déposée sur des puits où sont préadsorbées des membranes de lysosomes.

La quantité de 10D10* qui se fixe est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène présent dans la fraction à analyser; cette quantité dépend elle-même de la dilution de la fraction. Lorsque la dilution est très grande, la radioactivité fixée est maximale, par contre, lorsque elle est moindre, on mesure un signal moins important sur le fond des puits (voir traitement des résultats).

Les conditions de titration peuvent varier d'une expérience à l'autre; elles sont mentionnées dans les légendes des figures.

8.2. DOSAGE DE L'ANTIGENE GP10D10 CONTENU DANS UNE FRACTION.

Notre but est de doser la GP10D10 dans des fractions de gradient. Pour la mise au point du test, des membranes de lysosomes purifiés ont été utilisées comme source d'antigène.

8.2.1. Principe.

C'est un test de compétition qui est à la base de ce dosage (76); les étapes de ce dosage se trouvent à la figure 14.

Ce test consiste à préincuber (étape -2-) les fractions contenant l'antigène avec l'anticorps marqué; après liaison de l'anticorps marqué avec l'antigène présent dans les différentes fractions à analyser, l'anticorps non lié est mis en présence d'un excès de membranes de lysosomes préadsorbées sur le fond de puits de la boîte de titration (étape -3-).

L'anticorps fixé au fond des puits est séparé de celui qui est fixé sur les fractions à analyser et est mesuré.

Plus la quantité d'antigène contenue dans les fractions du gradient est importante, plus faible sera la quantité d'anticorps marqué fixé sur les puits (étape -5-).

Les conditions optimales de ce test ont été déterminées expérimentalement; elles seront mentionnées dans les légendes des figures.

8.2.2. Traitement des résultats.

Le dosage, par la technique de compétition, de la GP10D10 contenue dans des fractions de gradient nous permet d'exprimer la relation existant entre la radioactivité fixée au fond

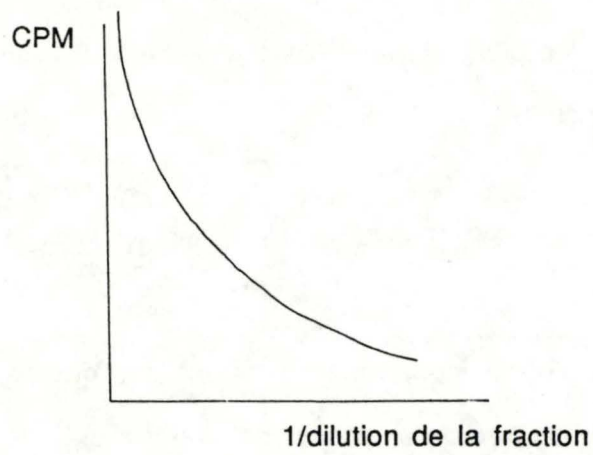


Fig. 15 a : Relation entre la quantité de CPM et la dilution de la fraction (exponentiellement décroissante)

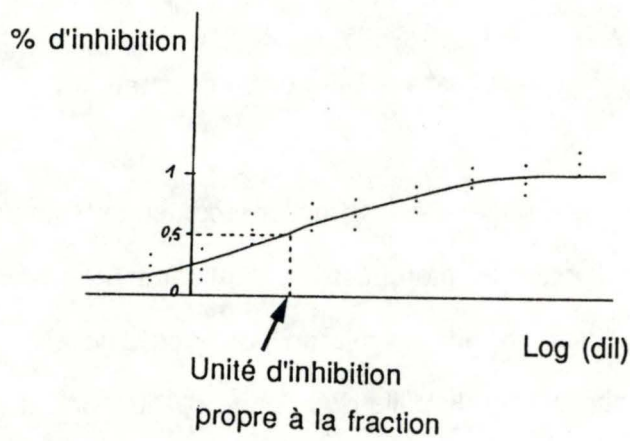


Fig. 15 b : La fonction Probit exprime la relation existant entre pourcentage d'inhibition et le logarithme de la dilution de la fraction. Elle est ajustée à partir des points expérimentaux.

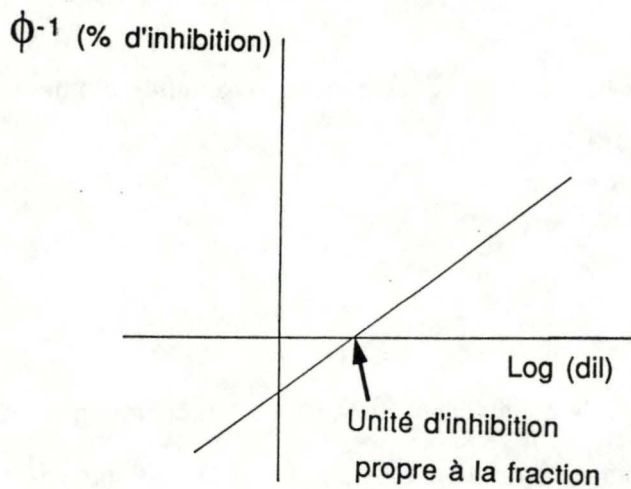


Fig. 15 c : Transformation des variables pour linéariser la fonction Probit et déterminer l'unité d'inhibition propre à la fraction.

des puits et l'inverse de la dilution des fractions. On obtient un comptage maximal lorsque les dilutions sont les plus importantes et ces comptages sont les plus faibles lorsque les fractions sont peu diluées; c'est ce que montre la figure 15 a.

On peut caractériser chaque fraction par une valeur propre à chacune d'elles calculée à partir des données expérimentales; c'est l'unité d'inhibition qui correspond à la dilution permettant d'obtenir 0,5 d'inhibition.

Les valeurs expérimentales obtenues (CPM) présentent une dispersion très importante surtout pour les faibles dilutions; c'est pour cette raison que l'on calcule le pourcentage d'inhibition (fig. 15 b) qui est directement proportionnel à la quantité de GP10D10 présente dans la fraction. Si l'antigène est présent en très forte concentration, le pourcentage d'inhibition sera important, proche de 100%; par contre, il sera égal à 0% si la fraction n'en contient pas. Pour les valeurs intermédiaires, le pourcentage d'inhibition se calcule selon la formule :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Max} - \text{Valeur}}{\text{Max} - \text{Min}}$$

avec Max = valeur maximale obtenue pour le test (obtenue lorsque la fraction ne contient pas de GP10D10 ou est très fortement diluée)

Min = valeur minimale obtenue pour le test (obtenue lorsque la fraction est riche en GP10D10 ou est peu diluée).

Valeur = valeur mesurée lors du test pour chacune des dilutions des fractions.

La relation qui existe entre le pourcentage d'inhibition calculé et la dilution peut être exprimée par une fonction Probit; c'est une fonction statistique définie par deux paramètres qui exprime de manière adéquate un grand nombre de relations biologiques. Il suffit donc d'estimer les paramètres qui donnent la fonction Probit la mieux ajustée aux données expérimentales pour en déduire l'unité d'inhibition (fig. 15 b).

Pour faciliter cet ajustement, on peut linéariser la relation Probit en appliquant aux

pourcentages d'inhibition l'inverse de la fonction de distribution d'une loi Normale centrée réduite, Φ^{-1} (% d'inhibition) (fig. 15 c).

Dans ce nouveau système d'axes, l'unité d'inhibition est donnée par l'abscisse de l'intersection entre l'axe des abscisses et la relation linéaire obtenue par simple régression.

8.3. MESURES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES.

8.3.1. La cathepsine C.

La cathepsine C est un marqueur des lysosomes des cellules parenchymateuses principalement.

C'est une exopeptidase qui clive le substrat, le glycyL-arginyl-naphtylamide en glycyL-arginyl et naphtylamine, à 37°C et à pH 5 (15).

On dose ensuite la naphtylamine libérée avec du nitrite de sodium, qui transforme le groupement aminé en sel de diazonium; le sulfamate, qui élimine l'excès de nitrite, est utilisé. Enfin, on ajoute le Naphtyléthylènediamine, ce qui forme un composé coloré bleu qui est lu à 580 nm.

Détails pratiques dans l'appendice technique.

8.3.2. L'arylsulfatase.

C'est également une enzyme des lysosomes, mais principalement localisé dans les cellules non parenchymateuses (80,81,82).

L'arylsulfatase en présence de son substrat, le paranitrocatéchol sulfate, clive le lien entre le paranitrocatéchol et le sulfate, lorsque l'incubation se réalise à 37°C et à pH 5. Le paranitrocatéchol prend une coloration brunâtre en milieu alcalin; la lecture se fait à 510 nm.

Détails pratiques dans l'appendice technique.

8.3.3. La phosphodiesterase alcaline.

C'est un enzyme marqueur de la membrane plasmique. En présence de son substrat, le thymidine 5' monophosphateparanitrophényl diester, à 25°C, elle hydrolyse la liaison entre la thymidine 5' monophosphate et le paranitrophényl; le paranitrophénol libéré en milieu alcalin (pH 9,6) se colore en jaune; la lecture se fait à 400 nm.

Détails pratiques dans l'appendice technique.

8.3.4. L'invertase.

Cette enzyme clive le saccharose en glucose et fructose (83).

Le Ba(OH)₂ et le ZnSO₄ sont ajoutés pour stopper la réaction, et le glucose libéré est dosé.

Le glucose libéré est incubé à 37°C et à pH 8 en présence de glucose oxydase, de peroxydase et de O-dianisidine; après l'incubation, on mesure l'adsorbance à 450 nm.

Dans les expériences en gradient de densité, nous dosons parallèlement, la cathepsine C, l'arylsulfatase, enzymes marqueurs des lysosomes, ainsi que la phosphodiesterase alcaline, marqueur de la membrane plasmique. Et dans le cas où le gradient est réalisé à partir d'un foie de rat ayant reçu une injection d'invertase, celle-ci est également dosée.

Détails pratiques dans l'appendice technique.

9. SOLUBILISATION DES COMPOSANTS MEMBRANAIRES.

L'architecture membranaire est stabilisée par des liens non covalents de nature hydrophobe que les détergents sont à même de rompre.

9.1. DESTABILISATION PAR DES DETERGENTS.

Les détergents possèdent une région fortement polaire et une longue chaîne

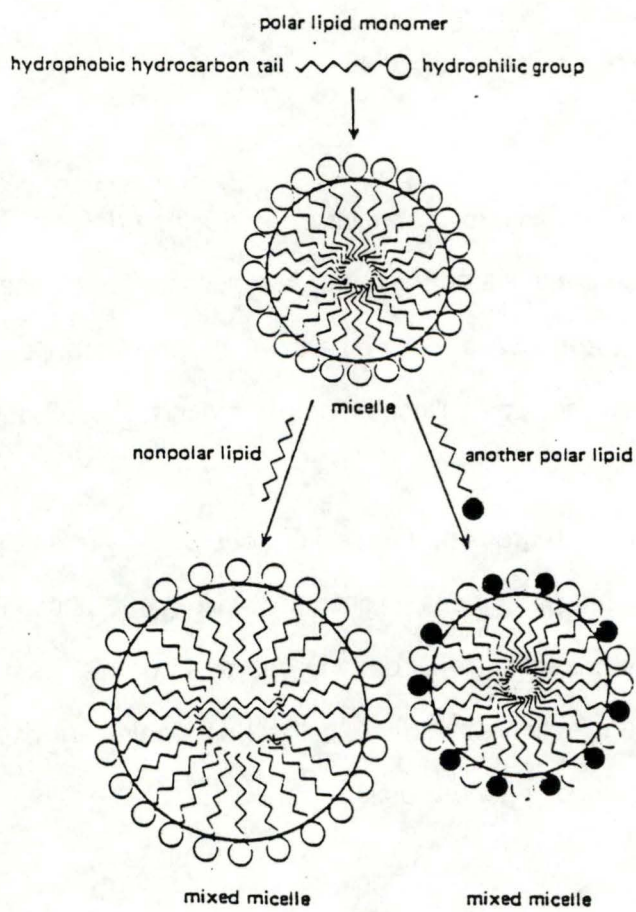


Fig. 16 : Formation de micelles en présence d'un détergent (84).

hydrocarbonée non polaire; en solution aqueuse, ils forment des micelles. Si des molécules lipidiques entrent en contact avec le détergent en solution, elles sont incorporées dans les micelles. Les lipides non polaires sont contenus au centre de la structure alors que les lipides polaires sont intégrés dans les micelles (cfr fig. 16) (84).

Le mécanisme de solubilisation des membranes cellulaires est probablement identique.

Nous avons utilisé deux types de détergents : d'une part, un détergent non ionique, le Triton X-114, qui ne porte aucune charge et qui forme donc des micelles neutres; et, d'autre part, deux détergents anioniques, qui portent une charge négative sur le groupement polaire. Ce sont le Nonidet P-40 (NP-40) et le désoxycholate.

9.1.1. Le Triton X-114.

Ce détergent non ionique solubilise les composants membranaires et forme des micelles mixtes qui contiennent notamment les protéines transmembranaires (84).

La séparation des constituants solubilisés est facilitée par une propriété particulière des solutions de Triton X-114; en effet, à une température bien déterminée, le cloud point, on observe une séparation de phase. Les protéines membranaires extraites sont alors contenues dans la phase détergente, séparées des protéines hydrophiles qui sont contenues dans la phase aqueuse (85).

Après traitement des membranes lysosomales, les phases aqueuses et détergentes sont testées par ELISA ainsi que des membranes non traitées, ceci afin de comparer la capacité de l'anticorps à reconnaître l'antigène présent en phase détergente ou aqueuse.

On réalise également une extraction à blanc, dont les phases aqueuse et détergente sont également testées par ELISA afin de mettre en évidence l'influence des composants du milieu d'extraction lors de la mesure.

9.1.2. Le Nonidet P-40 (NP-40).

Ce détergent provoque la solubilisation des membranes plasmiques avec une efficacité proche de 100% (84).

Nous avons utilisé un tampon de lyse qui contenait ce détergent. Les protéines sont ensuite précipitées à l'acétone puis centrifugées; le culot obtenu est suspendu dans du PBS, puis déposé sur les plaques Titertek (Flow). Nous effectuons ensuite un test ELISA.

9.1.3. Le désoxycholate.

Le désoxycholate est un sel de l'acide cholique, un acide biliaire produit par la dégradation du cholestérol. Il agit comme les détergents anioniques (84).

Les membranes sont traitées avec du tampon de lyse contenant du Nonidet P-40 et du désoxycholate (DOC). Dans cette expérience, la précipitation des protéines n'a pas été réalisée.

Différentes dilutions de la solution protéique ainsi que des membranes non lysées sont testées en SPRIA.

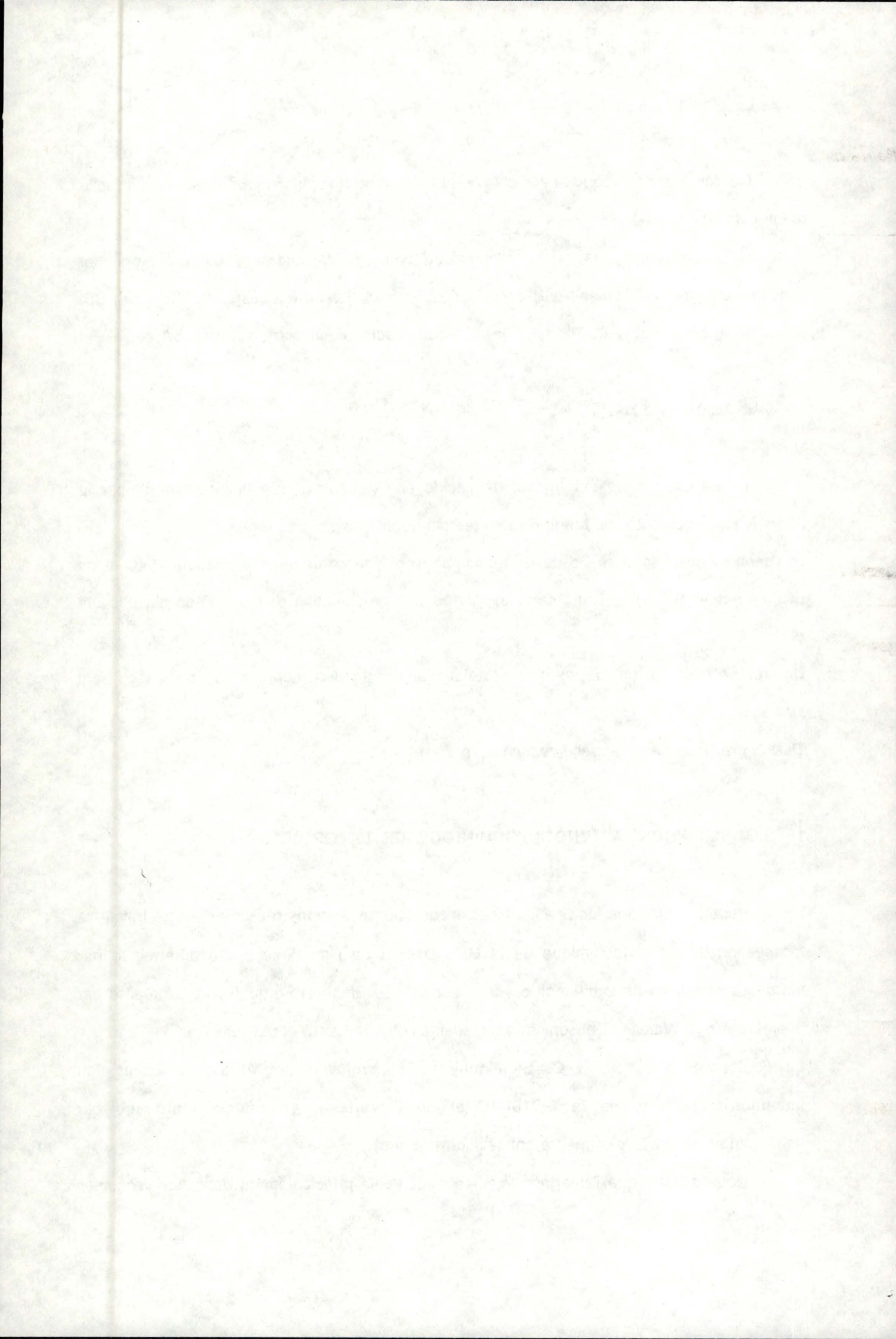
Détails pratiques dans l'appendice technique.

10. LOCALISATION IMMUNOCYTOCHIMIQUE DE LA GP10D10.

Parallèlement à la localisation biochimique que nous avons réalisée dans ce travail, la localisation immunocytochimique de la GP10D10 et de l'invertase a été déterminée par marquage simple et en immunoperoxydase sur coupes Smith et Farquahr, travail réalisé par le professeur S. Wattiaux-De Coninck et Mesdames M.J. Dehassé et M.F. Six.

Le docteur P. Courtoy et C. Slomianny (UCL, Woluwé) ont étudié la localisation immunocytochimique de la GP10D10 et de l'invertase, en double marquage par immunofluorescence sur coupes à congélation (0,5 μ m).

Nous savons que l'invertase injectée s'accumule principalement dans les lysosomes



des cellules non parenchymateuses du foie (15). En utilisant un anticorps anti-invertase en même temps que le 10D10, nous pouvons observer la localisation de ces deux marqueurs.

10.1. PREPARATION DES ANTICORPS.

On a utilisé, en immunoperoxydase et marquage simple, le 10D10 purifié à partir d'ascite sur une colonne de protéine-A sepharose, le 10D10 marqué à la biotine et le 15 d, un polysérum de lapin anti-invertase purifiée sur colonne d'affinité.

Le 10D10 biotinylé et le 15 d ont été utilisés lors des expériences de double marquage par immunofluorescence sur coupes à congélation.

Le 10D10 purifié a été préparé selon la technique décrite au point 7.1.

L'anticorps 10D10 a été biotinylé selon la technique décrite au point 7.3.

L'anticorps 15 d anti-invertase purifiée a été obtenu par William Duque Castrillon De Jesus par immunisation de lapins.

La purification de l'anticorps 15 d à partir de l'antisérum de lapin a été réalisée sur une colonne d'affinité.

Pour préparer cette colonne d'affinité, l'invertase (Σ igma de type VII) a été purifiée sur colonne DEAE Cellulose, selon la technique décrite par Trimble et Malley (54). Seule la fraction riche en hydrate de Carbone a été couplée sur du Sépharose 6B Epoxy (Pharmacia).

Le polyserum anti-invertase de lapin a été déposé au sommet de cette colonne d'affinité.

L'élution a été réalisée en pH acide et les fractions recueillies testées par ELISA. Les fractions les plus riches en anticorps anti-invertase ont été retenues pour les tests immunocytochimiques.

10.2. PREPARATION DE L'ECHANTILLON.

Un rat **Wistar** mâle a reçu une injection d'invertase (0,9 mg/100 g de poids corporel). Rapidement après le sacrifice, le foie est perfusé par la veine porte par du NaCl 9 ‰.

Pour l'**immunoperoxydase**, le foie est fixé par perfusion de formol 4% en présence de glutaraldéhyde 0,1% pendant 3 min., ensuite avec du formol 4% pendant 9 min.

Après fixation, l'échantillon est immobilisé sur la table de l'appareil Smith et Farquahr au moyen d'agar; il est alors découpé en languettes de 25 μm , qui sont refixées durant 4 heures au moyen du fixateur formol 4% dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4. 5 à 6 rinçages et lavages se font ensuite au moyen de tampons contenant du Saccharose 4% et du cacodylate 0,1 M.

Afin d'inhiber la peroxydase endogène et l'interférence due à l'hémoglobine, les échantillons sont rincés 3 fois au PBS puis incubés 10 min dans du méthanol H_2O_2 0,3%; ils sont ensuite rincés au PBS et puis incubé dans un mélange qui contient de la phenyl hydrazine (100 mg dans 100 ml de PBS) en présence de 1 μl de H_2O_2 .

Pour l'**immunofluorescence** sur coupes à congélation, le fixateur est le suivant : 5% formaldéhyde et 0,1% glutaraldéhyde en tampon phosphate cacodylate 0,1 M pH 7,4. Après 6 lavages, 5 min en tampon PBS, le foie est découpé et les échantillons sont immergés pendant une heure à température ambiante, dans un cryopréservateur : Sucrose 2,3 M en PBS. Ces échantillons sont ensuite déposés sur des supports et congelés dans l'azote liquide; ils sont conservés dans des cryules à -180 °C jusqu'à leur utilisation. Les échantillons ainsi préparés sont coupés, à l'aide de couteaux en verre, à -100°C sur un ultracryotome type Reichert Ultracut II. Les coupes à congélation, de 0,5 μm sont récupérées sur du sucrose 2,3 M en PBS puis déposées sur des grilles de Nickel 100 membranées (au Formvar préparé dans le chlorofome) et carbonées.

Ces grilles sont déposées sur des gouttes de tampon PBS et 1% ovalbumine (PBSO) durant une heure, pour éliminer le sucrose 2,3 M en PBS.

10.3. DOUBLE MARQUAGE A LA FLUORESCENCE.

10.3.1. Principe.

Le double marquage en immunofluorescence permet de localiser sur une même coupe,

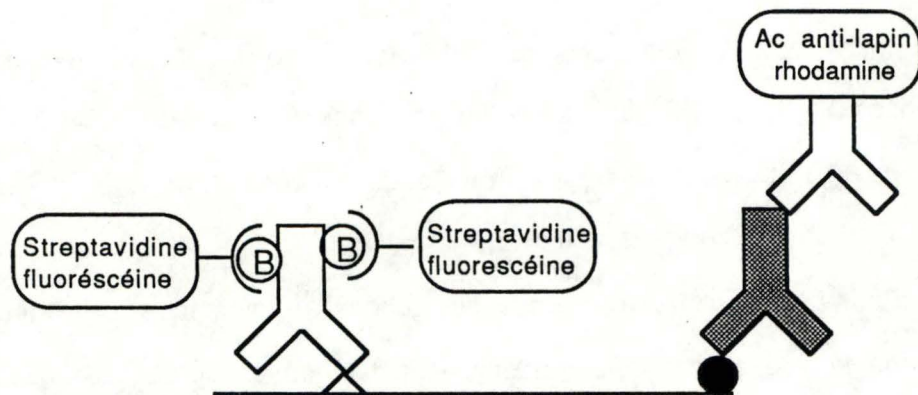


Figure 17 : Double marquage en immunofluorescence (86).

Les antigènes du tissu sont reconnus par les anticorps spécifiques (le 15 d pour l'invertase et le 10D10-B pour la GP10D10). Ces anticorps spécifiques sont eux-mêmes reconnus par des molécules couplées à des fluorophores; le 15 d est reconnu par un Ac anti-lapin couplé à la rhodamine et le 10D10-B réagit avec de la streptavidine couplée à de la fluorescéine.

deux antigènes différents à l'aide de deux anticorps différents. Les deux premiers anticorps utilisés doivent appartenir à deux espèces différentes (par exemple un anticorps de souris et l'autre de lapin);

Généralement, on utilise 2 autres anticorps qui sont couplés à deux molécules fluorescentes différentes; dans ce cas-ci, nous utilisons la fluorescéine et la rhodamine. Ces seconds anticorps sont dirigés contre les protéines d'espèces différentes; l'un reconnaît les protéines de souris et l'autre reconnaît les protéines de lapin.

Dans ces conditions, les risques de réactions croisées sont assez importants. Ces reconnaissances croisées sont éliminées dans le cas où un des premiers anticorps utilisés est marqué à la biotine (fig.17).

Dans ce cas, on utilise lors de la seconde incubation de l'avidine ou streptavidine (molécule qui présente des propriétés semblables à celles de l'avidine, mais qui a moins tendance à l'adsorption non spécifique), couplée à une molécule fluorescente; la streptavidine reconnaît de manière spécifique la biotine et ne réagit pas avec l'anticorps non biotinylé.

10.3.2. Double marquage proprement dit.

Le double marquage se déroule de manière séquentielle; cependant, les résultats obtenus sont identiques lorsque le marquage se déroule de manière simultanée.

Les coupes sont incubées avec l'anticorps anti-invertase 15 d (dilué 50 fois) pendant 4 heures à température normale.

Elles sont lavées ensuite 3 fois dans du PSO (tampon phosphate 0,5 M NaCl, contenant 1% ovalbumine) puis incubées pendant 4 heures à température normale avec le 10D10 biotinylé dilué 50 fois.

Elles sont lavées 3 fois puis incubées 1 heure à température normale, avec l'anticorps anti-lapin couplé à la rhodamine (dilué 100 fois). Après lavage, les coupes sont incubées 1 heure à température normale avec la Streptavidine couplée à la fluorescéine. Des contrôles sont effectués; il s'agit de coupes incubées uniquement avec la streptavidine couplée à la fluorescéine.

Les coupes sont ensuite examinées avec un Zeiss Axiophot équipé pour l'épifluorescence optique. La longueur d'onde d'excitation est de $485 \text{ nm} \pm 10$ (475-495 nm), et d'observation à 520-560 nm, pour la fluorescéine. Pour la rhodamine, la longueur d'onde d'excitation est de $545 \text{ nm} \pm 15$ (530-560) et l'observation se fait à une longueur d'onde de 590 nm ou plus.

10.4. MARQUAGE EN IMMUNOPEROXYDASE.

Les coupes sont incubées durant une heure à température normale puis la nuit à 4°C en boîte humide, soit avec l'anticorps 15 d dilué 1/100 (ou avec le 15 d 1/100 épuisé par l'invertase, comme contrôle); soit avec l'anticorps 10D10 dilué 1/20 ou 1/50.

Après rinçages au PBS, le deuxième anticorps est ajouté : on utilise du Fab-peroxydase (Biosys-France) à la dilution 1/700, cette incubation se fait durant 3 heures à température normale.

Après rinçages, la peroxydase est révélée suivant la technique classique de Karnovsky (87) durant le temps nécessaire pour obtenir un marquage suffisant.

R E S U L T A T S .

Tableau 5 : Purification de lysosomes.

Distribution des protéines et de la phosphatase acide après fractionnement et purification en gradient de métrizamide.

Protéines.

Préparation	NM	L	LM	PS	LM			Mb-L	S-L	Rec
					1	2	3			
Lys I	40.29	1.01	0.95	70.72	0	0.144	0.84	0.08	0.07	112.02
Lys II	38.92	2.63	2.71	51.21	0	0.19	1.74	0.08		92.7
Lys III	40.89	2.42	2.42	72.79	0	0.141	1.65	0.07	0.08	114.4
Lys IV	49.6	2.27	2.20	48.16	0	0.14	1.54	0.04	0.03	91.65
Lys V	43.15	1.85	1.85	75.55	0.17	0.17	1.79	0.08	0.07	120

Phosphatase acide.

Préparation	NM	L	LM	PS	LM			Mb-L	S-L	Rec
					1	2	3			
Lys I	36.8	16.1	14.99	22.09	0	10.73	4.67	4.34	3.20	74.9
Lys II	41.10	43	31.68	17.24	5.33	18.12	13.60	5.64	8.56	101.4
Lys III	33.82	26.53	26.53	19.83	0	10.94	13.01	3.24	5.46	80.20
Lys IV	44.58	18.89	18.89	10.96	0.98	11.82	7.72	5.60	4.08	74.4
Lys V	46.06	19.86	17.28	27.14	1.78	7.23	7.36	3.92	3.17	93

ASR de 2.

Préparation

Lys I	74.51
Lys II	95.37
Lys III	77.59
Lys IV	84.43
Lys V	42.53

La récupération est calculée à partir de NM, L et PS par rapport à H.

Les fractions 1,2,3,Mb-L et S-L sont dosées pour suivre les étapes de la préparation, mais n'interviennent pas dans le calcul de la récupération.

L est la fraction mitochondriale légère en milieu de saccharose 0,25 M.

LM est la fraction L en milieu de métrizamide.

LM comparé à L permet de voir si la métrizamide influence l'activité enzymatique.

1, 2 et 3 sont les fractions du gradient obtenues à partir de LM; 2 est la fraction de lysosomes purifiés, qui est ensuite scindée en Mb-L et S-L, fraction membranaire et soluble des lysosomes purifiés.

Les protéines sont exprimées en mg/g de foie.

Les valeurs reprises dans le tableau sont les pourcentages présents dans chaque fraction.

R E S U L T A T S.

Dans le but de localiser et de quantifier dans un gradient de densité la protéine de membranes lysosomales, la GP10D10 (partie 4), à l'aide de l'anticorps dirigé contre cette glycoprotéine, nous appliquons la technique de compétition décrite précédemment. Elle nécessite la production de membranes lysosomales purifiées (partie 1), la mise au point de la titration de l'anticorps 10D10 (partie 2) et du dosage de la GP10D10 (partie 3).

PARTIE 1. PURIFICATION DES LYSOSOMES.

L'anticorps que nous utilisons, le 10D10, est dirigé contre une protéine de la membrane lysosomale. On titre le 10D10 par un dosage immunoenzymatique en phase solide, en adsorbant l'antigène, donc les membranes lysosomales, sur le fond des puits des boîtes de titration.

Nous utilisons à cet effet des membranes de lysosomes purifiés. La purification des lysosomes s'effectue par centrifugation isopycniqne dans un gradient discontinu de métrizamide (71).

1.1. RESULTATS.

Nous avons réalisé 5 préparations et dosé pour chacune les protéines et une enzyme de référence des lysosomes, la phosphatase acide. La purification peut être déterminée par calcul de l'ASR; les résultats se trouvent rassemblés dans le tableau 5.

1.2. DISCUSSION.

La purification des lysosomes en milieu de métrizamide est une méthode efficace; les

préparations obtenues (fraction 2) contiennent entre 10 et 18% des lysosomes présents dans l'homogénat; ceci est déterminé par le pourcentage d'activité de la phosphatase acide; la purification moyenne est de 75 (remarquons que la préparation Lys V est moins purifiée que les autres).

Nos observations sont en accord avec la littérature (71); les préparations lysosomales obtenues par cette méthode, sont composées de 10 à 12% des lysosomes du foie de rat et présentent une purification de 60 à 80.

La préparation des membranes lysosomales se réalise en provoquant la rupture des lysosomes purifiés, en milieu hypotonique. On sépare les membranes (Mb-L) du contenu (S-L) par centrifugation, et on concentre la préparation membranaire à une dilution de 0,2; en d'autres termes, Mb-L provenant d'un gramme de foie de rat est resuspendu dans 0,2 ml de PBS.

Une partie relativement importante de la phosphatase acide est relarguée avec les autres hydrolases acides lors de la rupture des lysosomes; on observe cependant qu'une proportion non négligeable reste associée aux membranes lysées. A ce stade, comme il n'existe pas de marqueur de la membrane lysosomale, il est impossible d'apprécier la purification des préparations Mb-L.

Il est possible par contre de mesurer des contaminants membranaires provenant d'autres structures subcellulaires, ce que nous n'avons pas fait, nous basant sur les comparaisons de la purification de nos préparations "2" avec les données de la littérature (71).

PARTIE 2. OPTIMISATION DU SIGNAL ENTRE L'AG FIXE ET L'AC MARQUE.

Nous avons utilisé l'anticorps 10D10 marqué de 2 façons différentes : soit à la méthionine S^{35} repéré alors par un test SPRIA (Solid Phase Radioimmunoassay), soit à la biotine que nous déterminons alors par un test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) légèrement modifié.

Pour chacune de ces possibilités, les conditions optimales de titration de l'anticorps ont été déterminées.

Dans tous les cas, les blancs sont des puits contrôles, où les membranes lysosomales préadsorbées (l'antigène) sont remplacées par le milieu (PBS), mais toute la séquence des opérations est conservée, notamment la saturation des puits à la BSA.

Dans tous les cas, sauf notifications contraires, les valeurs des blancs sont soustraites des valeurs des tests et chaque résultat est une moyenne d'un triplicat.

2.1. MISE AU POINT DE LA TITRATION DE L'ANTICORPS RADIOACTIF (SPRIA).

1) Nous avons tout d'abord réalisé une titration de l'anticorps radioactif en SPRIA dans les conditions standards; dans ce cas, nous avons utilisé des boîtes Flow en PVC. Nous avons ensuite modifié ces conditions :

- présence de poly-L-lysine et de glutaraldéhyde
- modification de la quantité de protéines adsorbées.

2) Extraction de l'antigène membranaire à l'aide de différents détergents.

3) Comparaison de 3 types de boîtes multipuits; Flow et Nunc de deux types.

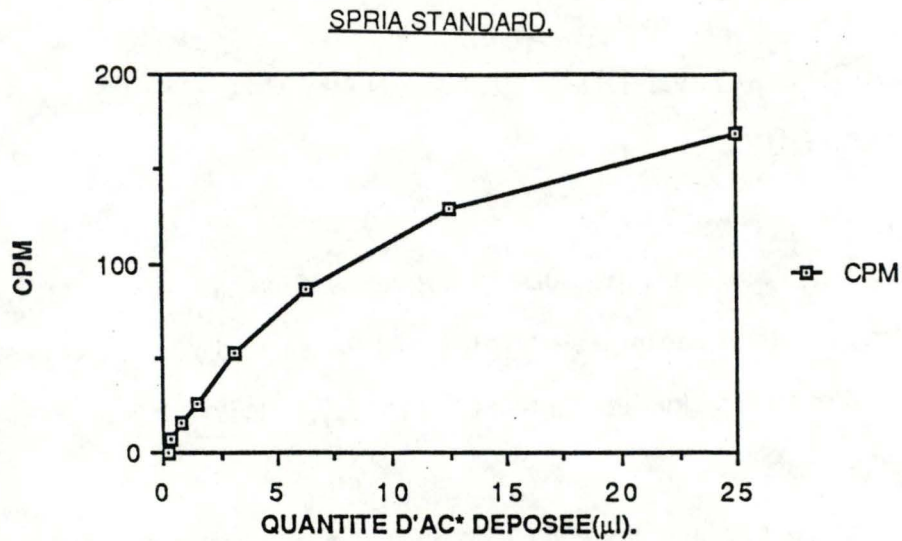


Fig. 18 : Titration de l'anticorps radioactif en SPRIA sur 3,8 μg de protéines lysosomales (Lys I); PBS pour les blancs.

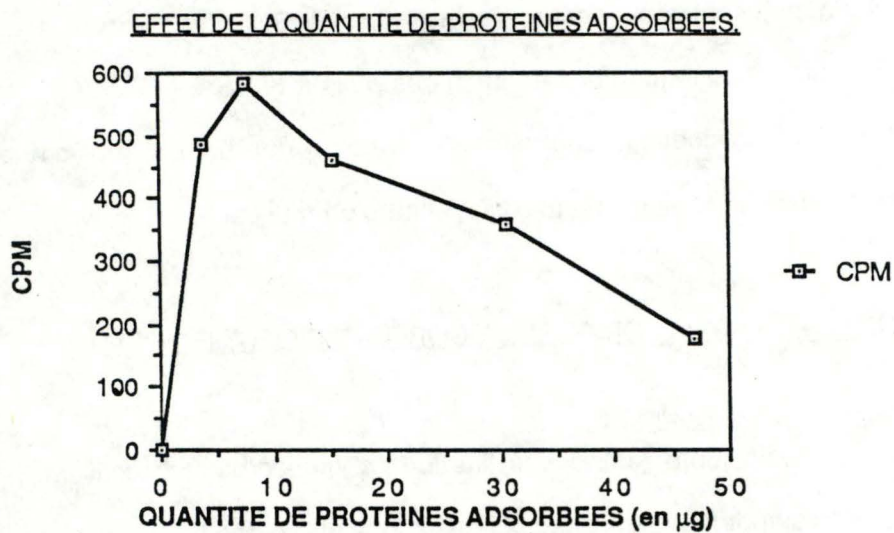


Fig. 19 : Test SPRIA réalisé sur différentes quantités de protéines lysosomales adsorbées sur les puits (de 3,8 à 46,9 μg par puits). L'anticorps est dilué 2 fois. (PBS pour les blancs)

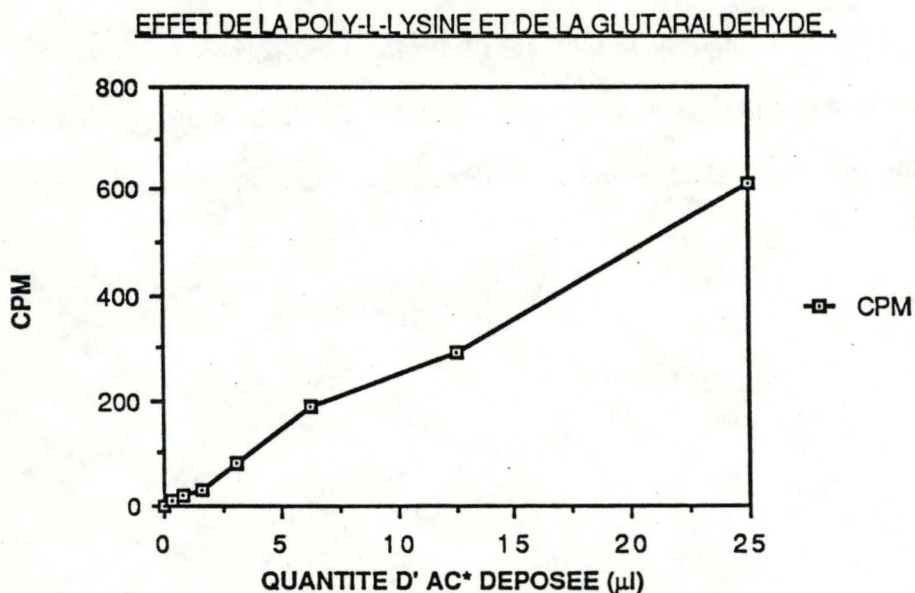


Fig. 20 : Titration de l'anticorps 10D10 radioactif en SPRIA sur 3,8 μg de protéines lysosomales, adsorbées en présence de poly-L-lysine (10 μg/ml) et de glutaraldéhyde (1% dans le PBS).

2.1.1. Test SPRIA réalisé dans différentes conditions.

2.1.1.1. Conditions standards (figure 18).

La figure 18 montre les résultats d'un SPRIA standard obtenu en déposant 3,8 µg de membranes lysosomales par puit dans 50 µl de PBS. La courbe évolue régulièrement et semble atteindre un plateau. Cependant, le nombre de CPM fixé sur les membranes du fond des puits est très faible, de 50 à 200 CPM, alors qu'au départ, nous déposons une quantité de 10D10 radioactif correspondant à 45.000 CPM; l'anticorps fixé correspond à environ 0,4% du total.

Pour obtenir un signal plus élevé, nous avons, d'une part, augmenté la quantité d'antigène déposée au fond des puits et, d'autre part, nous avons testé l'effet de la poly-L-lysine et de la glutaraldéhyde; la poly-L-lysine, un polypeptide chargé positivement, possède la propriété d'améliorer l'adsorption des cellules sur le PVC; la glutaraldéhyde pourra ponter les groupements aminés libres appartenant à l'antigène et à la poly-L-lysine (88,89).

2.1.1.2. Effet de la quantité de protéines adsorbées (figure 19).

Nous avons déposé de 3,8 à 46,9 µg de protéines lysosomales par puit. Le graphe obtenu à la figure 19 nous montre que la radioactivité détectée passe de 500 à 600 CPM lorsque la quantité de protéines déposée varie de 5 à 10 µg/50 µl. Cette augmentation de la radioactivité fixée n'est pas suffisante que pour permettre un test de compétition (voir plus loin); cependant, cette expérience nous permet de tirer une information intéressante en ce sens qu'il n'est pas utile de déposer plus de 10 µg par puit, car la quantité d'anticorps fixé est alors maximale.

2.1.1.3. Effet de la poly-L-lysine et de la glutaraldéhyde (figure 20).

Nous avons déposé 100 μ l de poly-L-lysine à 10 μ g/ml pendant 1 heure avant de déposer 3,8 μ g (50 μ l) de protéines de membranes lysosomales (volume total de 150 μ l). De la glutaraldéhyde (à 1% dans le PBS) est ensuite ajoutée. Après lavage au PBS, l'anticorps radioactif est titré par SPRIA.

La figure 20 nous montre une courbe qui évolue de manière régulière. Nous observons que le nombre de CPM fixé sur les membranes au fond des puits est plus élevé en présence de poly-L-lysine; nous obtenons en effet un maximum de 600 CPM alors que dans les conditions standards, nous obtenions pour le même anticorps et pour une dilution de 1/2 fois, une valeur de 170 CPM.

2.1.1.4. Discussion.

Remarque : Chaque figure est un tout en soi et comprend les contrôles adéquats. L'anticorps 10D10 a été adsorbé sur des puits saturés à la BSA en absence de membranes. Les blancs ainsi obtenus ont été soustraits des tests et les valeurs corrigées reportées dans les figures.

Cependant, les résultats ne peuvent pas, chaque fois, être quantitativement comparés d'une figure à l'autre : il est malaisé de reproduire exactement d'un jour à l'autre, les différentes étapes d'adsorption; de plus, l'anticorps radioactif utilisé ne résulte pas nécessairement du même marquage *in vivo*. Quand une comparaison peut être faite, nous le signalons.

Nous n'avons pas réussi, semble-t-il, à augmenter de façon significative l'adsorption de l'antigène, c'est-à-dire des membranes lysosomales purifiées.

La figure 19 nous montre qu'augmenter la concentration en protéines déposées sur le fond des puits n'augmente pas la quantité d'anticorps fixé; au contraire, il semble que l'on assiste à une désorption de l'antigène pour des concentrations élevées.

La technique d'adsorption des membranes en présence de poly-L-lysine et de glutaraldéhyde qui permet l'adsorption des cellules sur des puits (88,89), ne s'avère pas

Tableau 6 : Extraction au Triton X-114.

quantité de protéines déposées	phase aqueuse	phase détergente	membranes non traitées
50 µl	713	652	1280
40 µl	618	665	1150
30 µl	483	450	1270
20 µl	525	533	1230
10 µl	349	513	1220
<u>Extraction à blanc</u>			<u>Blancs</u>
50 µl	786	772	230

Protocole : test ELISA réalisé en adsorbant, pendant 1 nuit, différentes quantités des fractions suivantes : la phase aqueuse, la phase détergente et les membranes totales.

Une extraction à blanc a été réalisée c'ad qu'on remplace les membranes par du PBS qui subit les différentes étapes de l'extraction.

Les valeurs présentées sont les valeurs brutes sauf pour les membranes non traitées où les valeurs sont corrigées.

aussi efficace dans le cas des membranes lysosomales. Certes, la quantité d'anticorps fixé sur les membranes du fond des puits est plus élevée (on passe de 0,37% à 1,3% en présence de poly-L-lysine et de glutaraldéhyde) mais le signal obtenu n'est pas suffisant pour effectuer le dosage de l'antigène par le test de compétition.

2.1.2. Extraction des protéines membranaires avec différents détergents : le Triton X-114, le Nonidet P-40 et le désoxycholate.

2.1.2.1. Introduction.

On peut penser que l'antigène membranaire n'est pas présenté de manière adéquate à l'anticorps, lorsque des membranes totales sont adsorbées; en effet, l'épitope pourrait être plus ou moins enfoui dans la bicouche lipidique ou masqué à l'intérieur de vésicules dérivant de la préparation de membranes lysosomales.

Nous avons essayé d'extraire l'antigène en traitant les membranes purifiées à l'aide de détergents : le Triton X-114, le Nonidet P-40 contenu dans du tampon de lyse et le désoxycholate en présence du Nonidet P-40 contenus tous deux dans le tampon de lyse.

Les protéines extraites et contenues dans les deux phases issues de l'extraction au Triton X-114 sont adsorbées sur des puits et testées par ELISA (tableau 6, fig. 21).

Les protéines extraites par le tampon qui contient le Nonidet P-40 sont séparées du détergent par précipitation à l'acétone avant d'être adsorbées sur les puits; elles sont ensuite testées par SPRIA (fig. 22).

Les protéines extraites au Nonidet P-40 et au désoxycholate, tous deux présents dans le tampon de lyse ne sont pas séparées des détergents lors de la phase d'adsorption. Le test SPRIA est ensuite réalisé (tableau 7).

2.1.2.2. Extraction au Triton X-114 (figure 21 et tableau 6).

Lors d'une extraction de protéines membranaires au Triton X-114, nous obtenons

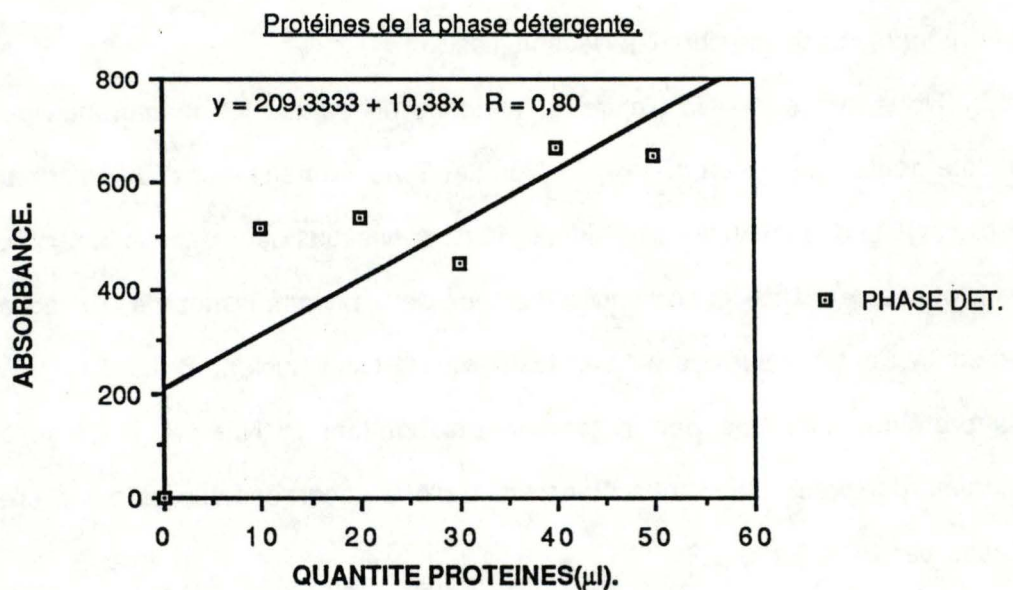
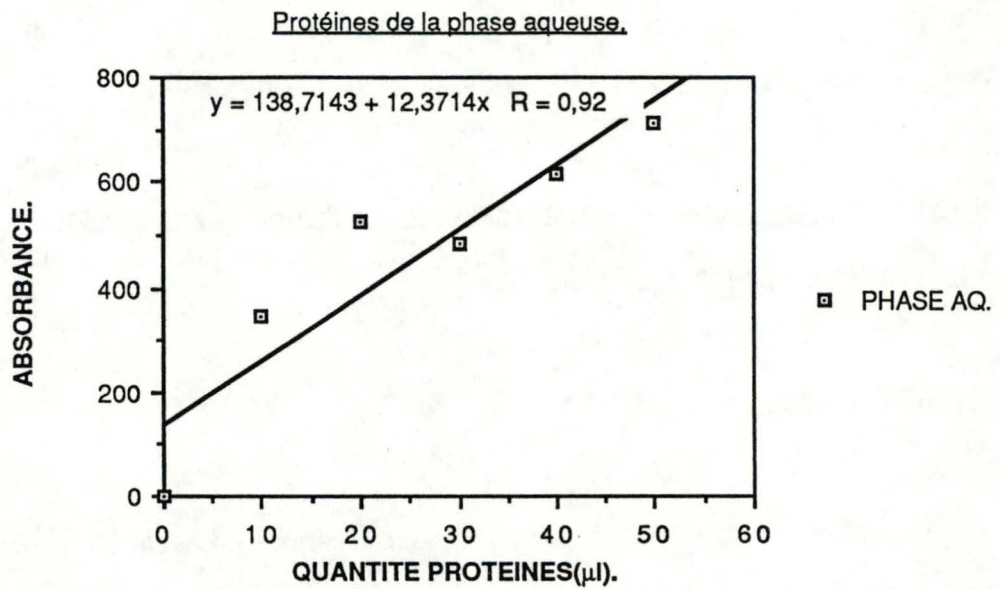


Fig. 21 : Extraction des protéines membranaires au Triton X-114. Test ELISA réalisé sur les phases aqueuse et détergente obtenues après l'extraction. Différentes quantités d'extrait protéique (de 10 à 50 μl d'extrait) sont adsorbées sur les plaques de titration Titertek (Flow).

Remarque : au départ 0,2 mg de protéines de la membrane lysosomale ont été traitées. Le volume final de la phase aqueuse et de la phase détergente était identique; les droites tracées sont donc comparables.

deux phases, chacune enrichie en un type particulier de protéines : la phase aqueuse riche en protéines hydrophiles; et la phase détergente où les protéines hydrophobes se trouvent fortement concentrées (85).

L'extraction des protéines lysosomales par ce détergent devrait nous permettre, non seulement de libérer l'antigène et favoriser une meilleure exposition des épitopes lors du test immunologique, mais encore de localiser la GP10D10 dans une des 2 phases et déterminer, par là, sa nature intrinsèque ou extrinsèque. Si on compare les 2 droites de la figure 21, qui sont estimées à partir de la dispersion des points pour la phase aqueuse et détergente, on observe que la pente de la droite est plus élevée dans la phase aqueuse ainsi que l'ordonnée à l'origine. Ces observations laissent supposer qu'il y aurait plus de protéines dans la phase aqueuse. D'autre part, on observe au tableau 6 les valeurs élevées obtenues lors du test ELISA sur le contrôle (l'extraction à blanc). Ces valeurs sont même plus importantes que celles obtenues pour les tests sur les phases aqueuses et détergentes.

On peut également remarquer que les valeurs obtenues pour les membranes non traitées sont nettement supérieures à ce que l'on obtient pour les 2 phases. De ces observations, on peut conclure que l'extraction au Triton X-114 ne permet certainement pas d'améliorer la fixation du 10D10, car le signal obtenu pour les membranes traitées n'est pas augmenté par rapport à celui mesuré pour les membranes non traitées. Il est tentant de dire, d'après les données de la figure 21, que la GP10D10 se trouve principalement dans la phase aqueuse, ce qui signifierait sa nature extrinsèque. Mais l'extraction à blanc, qui permet de mettre en évidence l'influence des composants du milieu d'extraction lors du test ELISA, donne des valeurs qui sont loin d'être négligeables; il semble donc que le dosage de l'anticorps sur l'antigène extrait pose d'importants problèmes et que les résultats obtenus ici sur les 2 phases sont probablement la traduction des interférences dues aux composants d'extraction. Malgré tout l'intérêt de la question, localiser la GP10D10 dans la phase aqueuse et donc confirmer sa nature extrinsèque serait une conclusion fort hasardeuse dans les conditions expérimentales de ce test.

LYSE DES MEMBRANES AVEC DU TAMPON DE LYSE QUI CONTIENT DU NP-40.

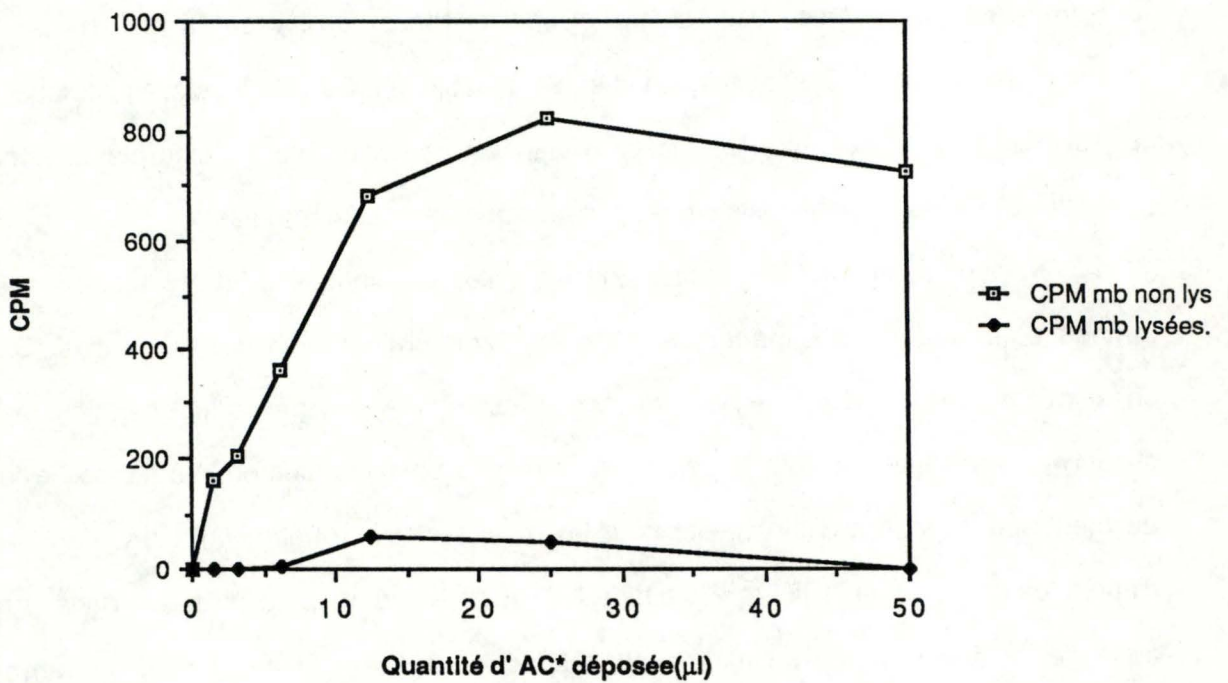


Fig. 22 : Extraction des protéines par lyse des membranes avec du tampon de lyse contenant du NP-40. Titration de l'anticorps radioactif en SPRIA. D'une part, les protéines extraites au tampon de Lyse et précipitées à l'acétone ont été déposées (à raison de 9 μg par puits). D'autre part, 1 μg de protéine de membrane non lysées ont été adsorbés (Lys II). Le PBS remplace les protéines lysosomales dans les blancs.

2.1.2.3. Extraction par Lyse avec du tampon contenant du NP-40 (fig. 22).

Les membranes lysosomales sont déstabilisées par traitement avec un tampon de lyse qui contient du Nonidet P-40 (NP-40). Ce détergent solubilise de manière efficace les membranes (84).

L'extrait est ensuite mélangé à de l'acétone, ce qui provoque la précipitation des protéines. Les protéines précipitées, qui sont séparées du détergent, sont alors testées par SPRIA, ainsi que des membranes non lysées à titre de contrôle (fig. 22).

La figure 22 montre de manière flagrante que les membranes lysées et soumises à l'action de l'acétone ne permettent pas la fixation de l'anticorps marqué.

2.1.2.4. Extraction par lyse avec du tampon contenant du NP-40 et du désoxycholate (Tableau 7).

Les membranes sont traitées de la même manière que lors de l'extraction précédente; le tampon de lyse est de composition identique, mais contient du désoxycholate en plus.

Après la lyse de quantités variables de protéines de membranes, l'ensemble est simplement centrifugé (5.000 rpm 10 à 15 min); le surnageant contient donc les protéines extraites et, le culot contient les résidus de membranes.

Le tableau 7 reprend les valeurs obtenues lors du test SPRIA où on a adsorbé des quantités variables de ce surnageant, correspondant à des quantités variables de protéines de membranes lysosomales présentes au départ.

Comparées aux valeurs de blancs que l'on obtient, les valeurs des tests y ressemblent fortement. Si nous nous rappelons que les blancs ne présentent pas d'antigène adsorbé, il est fort probable que l'antigène, extrait par le tampon de lyse, ne soit pas adsorbé sur les boîtes dans ces conditions.

En effet, nous pouvons être assuré que l'antigène est bien extrait car le même tampon de lyse est utilisé pour extraire les protéines de la membrane lysosomale qui sont, par la suite, mises en évidence par électrophorèse sur gel d'acrylamide (communication personnelle de

Tableau 7 : Extraction des protéines avec tampon de lyse contenant du désoxycholate.

<u>Dilution de l'Ac S³⁵</u>	<u>Quantité de protéines extraites.</u>				
	10 µg	5.5 µg	2.2 µg	1.1 µg	Blanc
1/2	84	84	83	102	103
1/4	70	77	66	63	80

Les valeurs présentées sont les valeurs brutes (blancs toujours > au test)

Protocole : test SPRIA effectué avec les dilutions 1/2 et 1/4 de 10D10 S³⁵ sur différentes quantités de protéines (de 10 µg à 1,1 µg) de membranes traitées de la manière suivante : les membranes sont lysées avec du tampon de lyse contenant du NP-40 et désoxycholate. Les détergents ne sont pas éliminés par précipitation à l'acétone.

Des blancs sont réalisés; il n'y a pas d'antigène au fond des puits et la saturation des sites non spécifiques a lieu ainsi que les autres manipulations du test.

M.M. Gonze).

2.1.2.5. Discussion.

L'extraction de l'antigène de la membrane des lysosomes par des détergents ne semble pas la technique adéquate pour augmenter le signal antigène-anticorps.

Ces méthodes, pourtant efficaces pour la membrane plasmique (84), sont peut être mal adaptées dans le cas de la membrane des lysosomes.

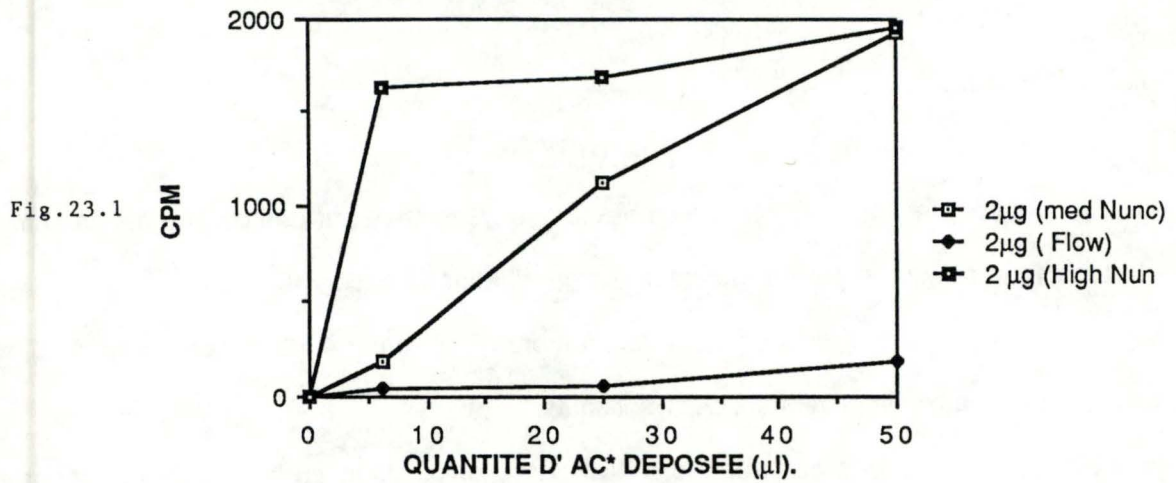
Les valeurs élevées obtenues lors de l'extraction à blanc au **Triton X-114** montrent l'interférence lors du test ELISA avec les composants du milieu d'extraction. Il est donc malaisé de tester les antigènes extraits. De plus, il est impossible d'avancer une hypothèse quant à la nature intrinsèque ou extrinsèque de la GP10D10 tant les conditions des tests semblent inadéquates.

Lors de l'extraction au tampon de lyse qui contient du **NP-40**, nous avons précipité les protéines à l'aide d'acétone, ce qui les sépare du détergent lors de l'adsorption. Lors de la lyse en présence du **désoxycholate et du NP-40**, les protéines adsorbées ne sont pas séparées du détergent. Dans les deux cas, nous n'obtenons pas d'adsorption de l'antigène; la précipitation à l'acétone d'un extrait au NP-40 ne semble pas améliorer l'adsorption membranaire.

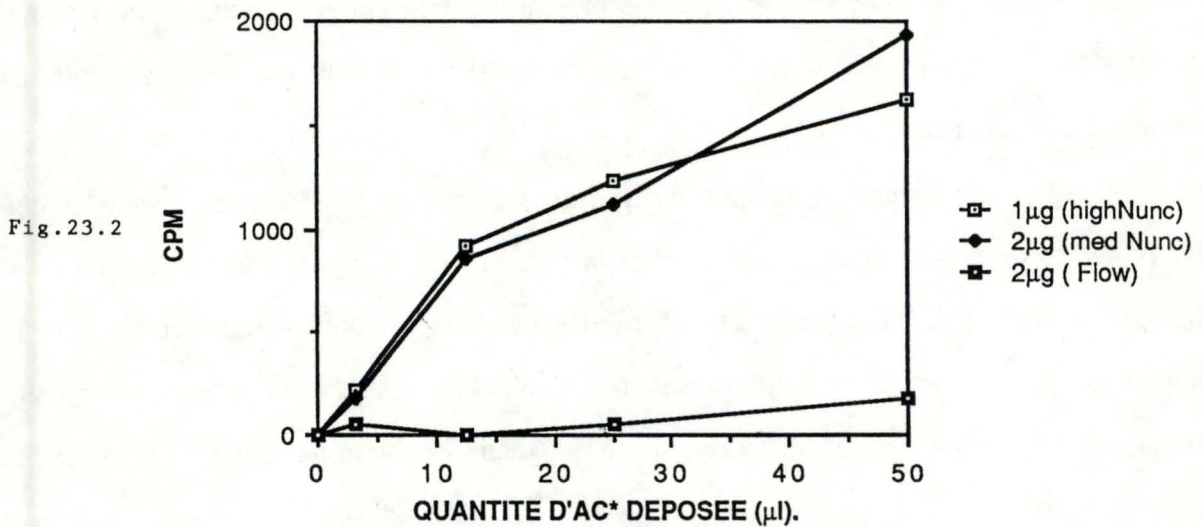
Après extraction aux détergents, la reconnaissance antigène-anticorps ne se produit pas; on peut avancer les hypothèses suivantes pour expliquer les résultats :

- 1- l'antigène extrait ne s'absorbe pas sur les puits; le détergent ou l'acétone en sont peut être la cause.
- 2- l'antigène extrait a subi un changement dans sa structure; il n'est dès lors pas reconnu par l'anticorps lors des tests. Cette hypothèse serait plausible si l'épitope reconnu était conformationnel; or, l'anticorps 10D10 reconnaît un épitope séquentiel, puisqu'il a pu être utilisé en Western Blot sur des membranes de lysosomes de foie de rat (communication personnelle de M.M. Gonze).
- 3- la technique demande une mise au point plus élaborée.

Comparaison des boîtes Titertek, High et Medium Binding.



Comparaison des boîtes Titertek, High et Medium Binding.



Comparaison des boîtes Titertek, High et Medium binding: blancs.

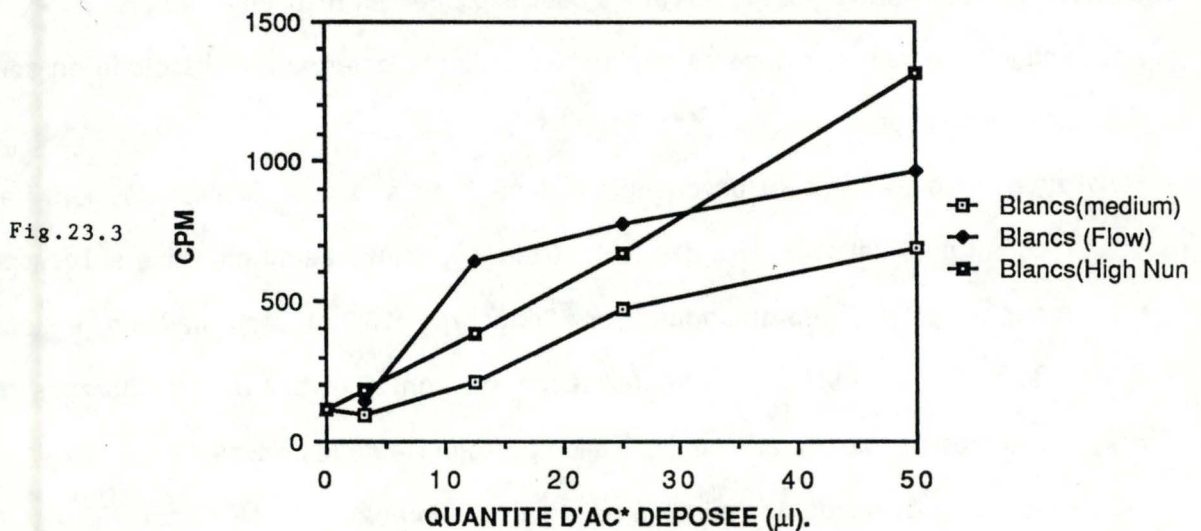


Fig. 23 : Titration de l'anticorps radioactif en SPRIA, réalisée sur 3 types de boîtes de titration (Titertek (Flow), High et Medium Binding (Nunc)), où 2 μg de protéines de la membrane lysosomale (Lys II) sont adsorbées. Le PBS remplace les protéines lysosomales dans les blancs.
 Fig. 23.1 et 23.2 : différence test-blanc.
 Fig. 23.3 : les blancs correspondant aux figures 23.1 & 23.2 sont repris .

2.1.3. Comparaison de 3 types de boîtes : Titertek (Flow), Medium et High Binding (Nunc).

Dans toutes les mises au point précédentes, nous avons utilisé des boîtes Flow en PVC. Nous avons ensuite comparé la capacité d'adsorption vis-à-vis des membranes lysosomales de 3 types de boîtes multipuits : Titertek (Flow), Medium et High Binding (Nunc) en polystyrène .

Dans un premier temps, nous avons titré l'anticorps radioactif sur les différents types de boîtes dans les conditions standards; une même quantité de membranes lysosomales est adsorbée (2 µg); les courbes obtenues peuvent ainsi être comparées (fig. 23.1); dans une deuxième expérience de confirmation, nous avons diminué cette quantité de protéines pour la boîte multipuits qui nous semblait la plus intéressante (figure 23.2 et 23.3).

Ensuite, nous avons testé simultanément sur ces boîtes l'effet de la poly-L-lysine seule ou associée à la glutaraldéhyde ainsi que l'effet de la température lors de la réaction de liaison entre l'anticorps radioactif et de l'antigène adsorbé (fig. 24).

2.1.3.1. Comparaison des boîtes (fig. 23).

On observe à la figure 23.1 que l'adsorption se produit de manière beaucoup plus efficace sur les boîtes High Binding (Nunc), que sur les boîtes Titertek (Flow) ou Medium Binding (Nunc). La courbe de titration obtenue pour les High Binding (Nunc) évolue beaucoup plus rapidement et atteint le plateau pour de faibles quantités de l'anticorps radioactif. La courbe de titration de l'anticorps obtenue pour les boîtes Medium Binding se situe de manière intermédiaire entre celles obtenues pour les boîtes Titertek (Flow) et High Binding (Nunc).

Cette courbe évolue beaucoup plus lentement et atteint le même plateau que la courbe obtenue par High Binding (Nunc) mais pour de plus grandes quantités de l'anticorps radioactif.

La figure 23.2 nous montre que l'adsorption de l'antigène est tellement importante sur les boîtes High Binding (Nunc) que la courbe de titration du 10D10 S³⁵, obtenue lorsque

Effet de la P-L-L et de la Glut. sur High Binding: incubation à 4°C.

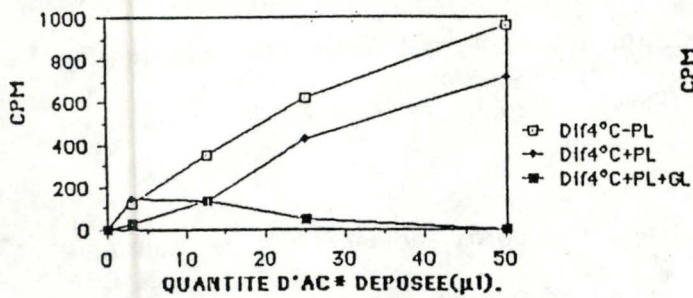


Fig. 24.1

Effet de la P-L-L et de la Glut. sur High Binding: incubation à 37°C.

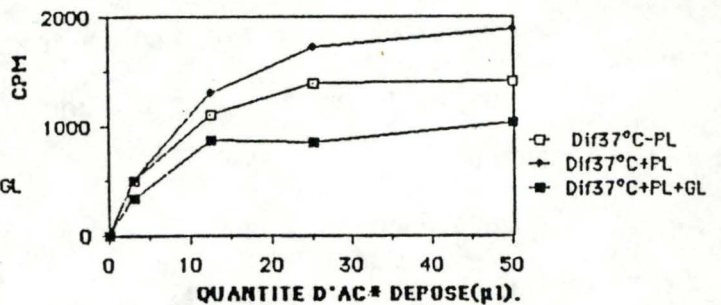


Fig. 24.3

Effet de la P-L-L et de la Glut. sur Medium Binding: incubation à 4°C.

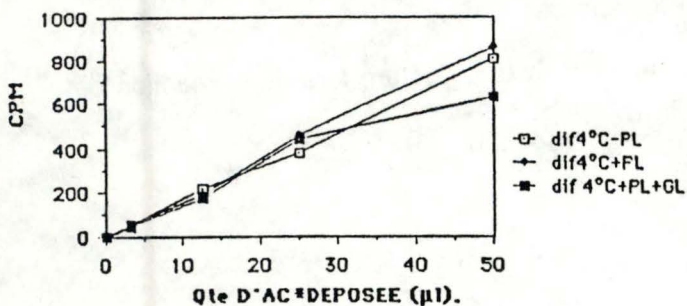


Fig. 24.2

Effet de la P-L-L et de la Glut. sur High Binding: incubation à 37°C : blanc

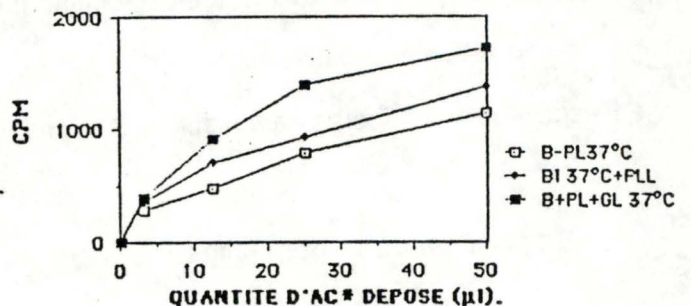


Fig. 24.4

Effet de la P-L-L et de la Glut. sur High Binding: incubation à 4°C : blancs.

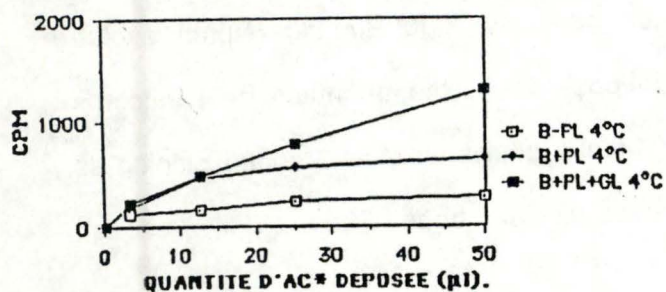


Fig. 24.5

Effet de la température sur High Binding.

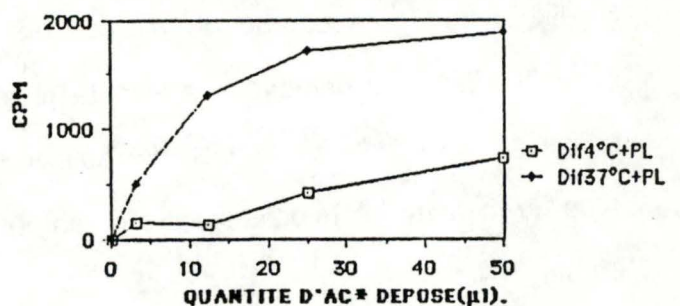


Fig. 24.6

Fig. 24 : Effet de la poly-L-lysine associée, ou non, à la glutaraldéhyde sur les boîtes Medium et High Binding (Nunc).

Effet de la température d'incubation de l'antigène-anticorps, sur High Binding(Nunc).

Fig. 24.1, 24.2 & 24.3 : différence tests - blancs.

Fig. 24.4 & 24.5 : valeurs des blancs.

Fig. 24.6 : comparaison des valeurs corrigées (test-blancs) sur les boîtes High Binding (Nunc) en présence de poly-L-Lysine.

Titration de l'anticorps radioactif en SPRIA où 2 µg de protéines de la membrane lysosomale (Lys II) ont été préadsorbées en présence ou non de poly-L-lysine, sur Medium et High Binding (Nunc). Le PBS remplace les protéines lysosomales pour les blancs.

L'incubation antigène-anticorps sur les boîtes High Binding (Nunc) s'est réalisée à 37°C et à 4°C.

l'on adsorbe 1 μg de protéines de la membrane, est identique à celle obtenue sur les boîtes Medium Binding (Nunc) où l'on adsorbe deux fois plus d'antigène.

Les blancs (fig. 23.3) sont légèrement plus élevés pour les High Binding (Nunc).

Nous avons examiné ensuite plusieurs facteurs dans cette expérience : l'effet de la poly-L-lysine seule ou associée à la glutaraldéhyde, l'importance de la température (4°C et 37°C) lors de la réaction entre l'antigène fixé et l'anticorps radioactif.

2.1.3.2. Effet de la poly-L-lysine associée ou non à la glutaraldéhyde (figure 24).

Nous avons déjà montré à la figure 20 que l'effet de la poly-L-lysine et de la glutaraldéhyde sur les boîtes Titertek (Flow) est faible. Nous voulions cependant étudier l'effet de ces molécules sur les boîtes Medium et High Binding (Nunc), d'autant plus que ces boîtes adsorbent beaucoup plus l'antigène (fig. 23). Nous avons d'abord effectué des essais dans lesquels la poly-L-lysine ($100 \mu\text{l}$ à $10 \mu\text{g/ml}$) était préadsorbée durant 1 heure; ensuite nous avons ajouté $50 \mu\text{l}$ de préparation de membranes lysosomales pendant une nuit à 4°C . Sans rincer, on plonge la plaque de titration dans un bain de glutaraldéhyde (1% dans le PBS) et on rince au PBS après 30 min. Les puits sont ensuite saturés à la BSA et on réalise un test SPRIA. Parallèlement, nous avons réalisé un test similaire en absence de glutaraldéhyde et un autre, sans poly-L-lysine ni glutaraldéhyde; ceci afin de comparer l'effet de la poly-L-lysine seule ou associée à la glutaraldéhyde. Les graphes 24.1 et 24.2 nous montrent les courbes de titration du 10D10 S^{35} obtenues lors de l'incubation de l'anticorps radioactif durant une heure à 4°C , sur les deux types de boîtes, Medium et High Binding (Nunc); la réaction antigène-anticorps se produit dans les mêmes conditions, ce qui rend la comparaison possible.

2.1.3.3. Discussion.

La réaction antigène-anticorps a été réalisée dans un premier temps à 4°C .

La poly-L-lysine associée à la glutaraldéhyde n'assure pas une bonne adsorption des

membranes sur les boîtes High Binding (Nunc); c'est ce qui apparaît au graphe 24.1. On peut noter également que la titration dans ces conditions (incubation antigène-anticorps à 4°C) est maximale lorsqu' on n'utilise pas de poly-L-lysine lors de la titration de l'anticorps radioactif sur ces boîtes.

La figure 24.2 nous montre que la poly-L-lysine, utilisée seule ou avec la glutaraldéhyde, n'augmente pas l'adsorption des membranes lysosomales sur les boîtes Medium Binding (Nunc); en effet, les 3 courbes de titration sont groupées.

Dans ces conditions (4°C), on obtient un signal optimum lorsque la titration a lieu sur les boîtes High Binding (Nunc) et sans poly-L-lysine ni glutaraldéhyde.

2.1.3.4. Effet de la température (figures 24.1 et 24.3).

Si nous comparons le graphe 24.1 et 24.3, qui nous montre l'effet de la poly-L-lysine et de la glutaraldéhyde lorsque la réaction d'incubation de l'anticorps radioactif se déroulée à 37°C, nous pouvons constater que l'effet de la poly-L-lysine est modulé par la température d'incubation de l'anticorps radioactif. Alors que pour une température d'incubation de 4°C, le signal maximal est obtenu lors de la titration sans poly-L-lysine, à 37°C, il est obtenu en présence de poly-L-lysine.

L'association poly-L-lysine et glutaraldéhyde ne permet pas d'obtenir une bonne adsorption des membranes ou une bonne présentation de l'antigène, que ce soit pour une température de réaction antigène-anticorps de 37°C ou de 4°C.

La figure 24.6 nous montre de manière plus nette l'importance du facteur température d'incubation lors de la réaction antigène - anticorps. On observe en effet que si la titration s'effectue à 37°C, en présence de poly-L-lysine sur les boîtes High Binding, le signal obtenu est au moins deux fois plus intense que le signal obtenu sur ces mêmes boîtes, sans poly-L-lysine et pour une incubation de l'anticorps s'effectuant à 4°C.

Effet de la quantité de protéines adsorbées sur High Binding(Nunc).

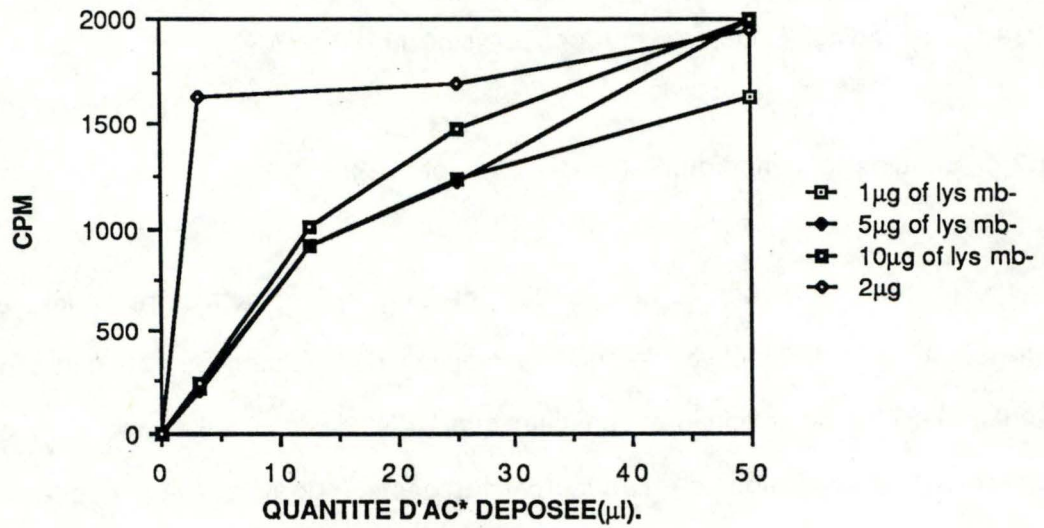


Fig. 25 : Titration en SPRIA de l'anticorps radioactif sur boîte High Binding (Nunc) où se trouvent adsorbées de 1 à 10 μg de protéines de membranes de lysosomes (Lys II), en présence de poly-L-lysine.

Le PBS remplace les protéines lysosomales dans les blancs.

2.1.3.5. Discussion.

Il est assez net que les boîtes High Binding (Nunc) sont plus efficaces pour fixer les membranes lysosomales que les autres types de boîtes (fig. 23).

L'utilisation de la poly-L-lysine seule, sans glutaraldéhyde, sur High Binding (Nunc) ainsi que la température d'incubation antigène-anticorps de 37°C permet d'obtenir un signal fortement amplifié comparé à ceux obtenus dans les autres conditions.

Ce sont ces conditions que nous utiliserons ultérieurement.

On peut supposer cependant que la quantité d'antigène exposé (2 µg) soit trop faible; il serait peut être possible d'augmenter encore le signal en augmentant la quantité d'antigène déposée; c'est ce que nous avons testé dans l'expérience suivante.

2.1.3.6. Effet de la quantité d'antigène adsorbée au fond des puits High Binding (Nunc) (figure 25).

Nous avons déposé des quantités croissantes de protéines de membranes lysosomales, de 1 µg à 10 µg, en présence de poly-L-lysine, et nous avons réalisé une titration de l'anticorps (fig. 25).

Nous observons que les courbes de titration obtenues en adsorbant respectivement 1, 5 et 10 µg de protéines de membranes lysosomales sont relativement groupées. La courbe obtenue en adsorbant 2 µg de membranes au fond des puits donne un signal nettement supérieur aux autres. Cette courbe atteint son plateau relativement tôt; la quantité d'anticorps radioactif nécessaire pour obtenir un signal suffisant est donc faible, ce qui est un avantage important.

L'utilisation de la poly-L-lysine permet une bonne adsorption des membranes lysosomales; il est possible pourtant que, dans ces conditions, il se forme un réseau poly-L-lysine-membranes lysosomales, qui masque une partie plus ou moins importante des épitopes; ce qui provoquerait une atténuation du signal.

Nous avons tenté d'augmenter encore ce signal en éliminant le surplus de poly-L-

SPRIA : pré-poly-lysine vidée ou non avant l'ajout des membranes de lysosomes.

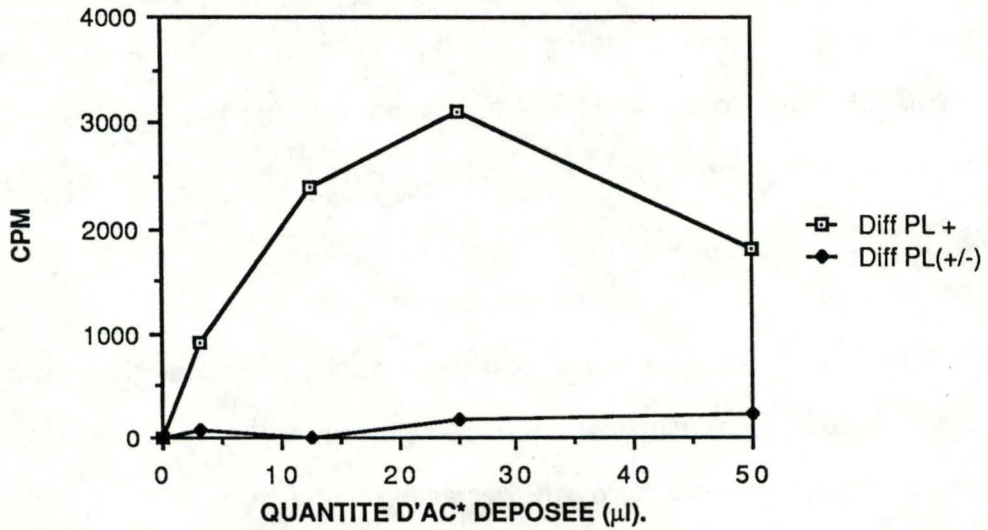


Fig. 26 : Effet de la vidange de la Poly-L-lysine avant l'adsorption des membranes.
 Titration du 10D10 radioactif en SPRIA sur Titertek (Flow) où 2 µg de protéines de la membrane lysosomale (Lys II) ont été adsorbées en présence de la totalité de la Poly-L-lysine (PL+) ou après vidange du surplus de celle-ci (PL±).
 Le PBS remplace les protéines lysosomales dans les blancs; les valeurs présentées (Diff) sont corrigées (Test - blanc).

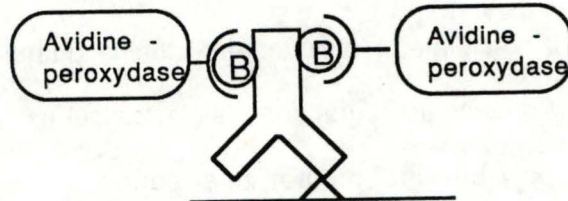


Fig. 27 : Méthode Avidine-Biotine complexe (ABC) (86).

lysine non adsorbée dans le fond des puits. Nous avons donc procédé à la vidange des puits avant le dépôt des membranes lysosomales (fig. 26).

2.1.3.7. Effet de la vidange de la poly-L-lysine (figure 26).

La figure 26 nous montre les résultats d'une titration réalisée en présence de la totalité de la poly-L-lysine (PL+) et après vidange de l'excès de poly-L-lysine (PL±). On observe très nettement que la poly-L-lysine est un facteur important, sinon essentiel, à l'adsorption des membranes. Le surplus de poly-L-lysine, non adsorbée dans le fond des puits, ne doit en aucun cas être éliminée avant le dépôt des membranes, sous peine de voir le signal fortement diminué.

2.1.3.8. Conclusion.

La comparaison des boîtes lors d'une titration dans les conditions standards (fig. 23) montre que les boîtes **High Binding (Nunc)** adsorbent plus l'antigène que les autres types de boîtes (Titertek (Flow) et Medium Binding (Nunc)).

Le signal obtenu est encore amplifié lorsque l'on combine **l'adsorption de poly-L-lysine que l'on ne vide pas** (fig. 26) avant le dépôt des membranes, et une **incubation à 37°C de l'anticorps avec l'antigène fixé** (fig. 24). Ces expériences ont été réalisées en adsorbant **2 µg de protéines de membranes lysosomales**; cette quantité semble être la quantité optimale, car adsorber plus d'antigène membranaire n'aboutit pas à une augmentation du signal mesuré (fig. 25).

La titration de l'anticorps radioactif sera donc réalisé dans les conditions suivantes, de façon à obtenir le signal le plus élevé possible :

- 1) Dépôt de 100 µl de poly-L-lysine (100 µg/ml).
- 2) Dépôt des 2 µg de membranes sur la poly-L-lysine (50 µl), une nuit à 4°C.
- 3) Rinçage et lavage des puits au PBS.
- 4) Saturation au PBS/BSA, 2 heures à 37°C.

Tableau 8 : Dosage du 10D10 par ELISA, aux différentes étapes (1, 2, 3, 4 et 5) du marquage à la biotine.

Les valeurs présentées sont les valeurs d'absorbance à 405 nm, elles sont corrigées (blanc soustrait). L'ascite n'a pas été dosé lors de cette expérience.

dilution de la fraction.	1. 10D10 purifié.	2. 1 ^{er} pic.	3. 10D10 après dialyse.
1/10	177	92	125
1/20	136	80	124
1/50	111	37	92
1/100	151	18	104
1/200	101	0	96
1/300	83	0	86
1/400	115	0	85
1/500	9	0	78
<u>concentration en protéines</u>	1.43 mg/ml	-	-
<u>nombre de ml</u>	16,5	13,5	20,29

dilution de la fraction	4. 10D10 concentré	dilution de la fraction	5. 10D10 biotiné
1/20	149	1/50	1076
1/50	149	1/100	959
1/100	126	1/200	927
1/200	128	1/400	875
1/400	122	1/1600	826
1/800	120	1/3200	818
1/1600	105	1/6400	757
<u>concentration en protéine</u>	6.49 mg/ml		2.3 mg/ml
<u>nombre de ml</u>	2,22		0,97

Protocole : Dosage ELISA standard réalisé sur 2 µg de membranes lysosomales adsorbées sur boîte Titertek (Flow) 1 nuit à 4°C. 50 µl de la fraction diluée ont été déposés une heure à 37°C. Le second anticorps utilisé est de la Fab peroxydase diluée 1/100 pour 1, 2, 3, 4; et pour 5, l'avidine peroxydase diluée 1/400 à été utilisée pour révéler le test.

Comparaison des absorbances obtenues ramenées au volume total de la fraction.

Absorbance au plateau * ad 1 ml * dilution au plateau * volume total * facteur correctif

1.	136	*	20	*	20	*	16.5	=	897.600
(2.	80	*	20	*	20	*	13.5	=	132.000)
3.	124	*	20	*	20	*	20.29	=	1.006.384
4.	128	*	20	*	200	*	2.22	* 100/94.1	= 1.209.000
5.	927	*	20	*	200	*	0.97	* 100/22.5	= 15.985.600

Le signal mesuré pour le 10D10-B est fortement amplifié.

On peut remarquer qu'il n'y a pas eu de pertes de protéines au cours du marquage.

- 5) Dépôt de l'anticorps radioactif. Incubation 1 heure à 37°C.
- 6) Rinçage et lavage des puits.
- 7) Comptage de la radioactivité

2.2. MISE AU POINT DE LA TITRATION DE L'ANTICORPS 10D10 BIOTINYLE.

Notre but étant d'amplifier le signal mesuré lors d'une titration du 10D10 sur des membranes lysosomales et, d'autre part, le marquage du 10D10 à la methionine S³⁵ étant un procédé long et coûteux, nous avons marqué l'anticorps à la biotine.

Les tests basés sur la méthode Avidine-Biotine Complexe (ABC méthode) (86) (fig. 27) demandent une mise au point plus élaborée, puisqu'il faudra déterminer, d'une part, la quantité optimale d'avidine-peroxydase et, d'autre part, la dilution optimale de l'anticorps biotinylé 10D10-B à utiliser.

Pour déterminer cette dilution, nous devons mettre au point le dosage du 10D10-B.

Cette partie se résume en 3 points :

- 2.2.1. Marquage à la biotine de l'anticorps monoclonal 10D10.
- 2.2.2. Détermination de la concentration optimale de l'avidine-peroxydase.
- 2.2.3. Détermination des conditions optimales de titration.

2.2.1. Marquage à la biotine de l'anticorps monoclonal 10D10.

Pour le marquage à la biotine, il faut une solution d'anticorps fortement concentrée; c'est pour cette raison que l'on utilise de l'ascite comme source de 10D10 (73). On purifie l'anticorps sur une colonne de protéine A couplée au sépharose et, après concentration, on procède au marquage.

Toutes les étapes de ce processus sont contrôlées par un test ELISA réalisé sur chaque fraction; ceci afin de vérifier qu'aucune perte de l'anticorps ne s'est produite. On mesure aussi la concentration protéique à chaque étape; cette mesure est importante, notamment pour contrôler la concentration en monoclonal de la solution à marquer.

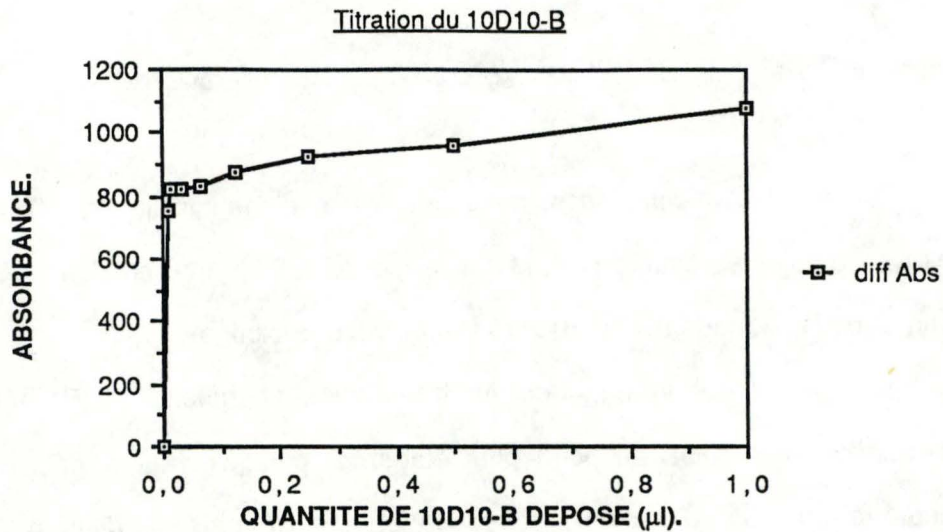


Fig. 28 : Titration du 10D10-B sur Titertek (Flow) où 2 µg de protéines de la membrane lysosomale (Lys III) ont été adsorbées en absence de poly-L-lysine. Le PBS remplace les protéines lysosomales dans les blancs. La dilution de l'avidine-peroxydase est de 1/400, elle a été déterminée d'après la figure 29.

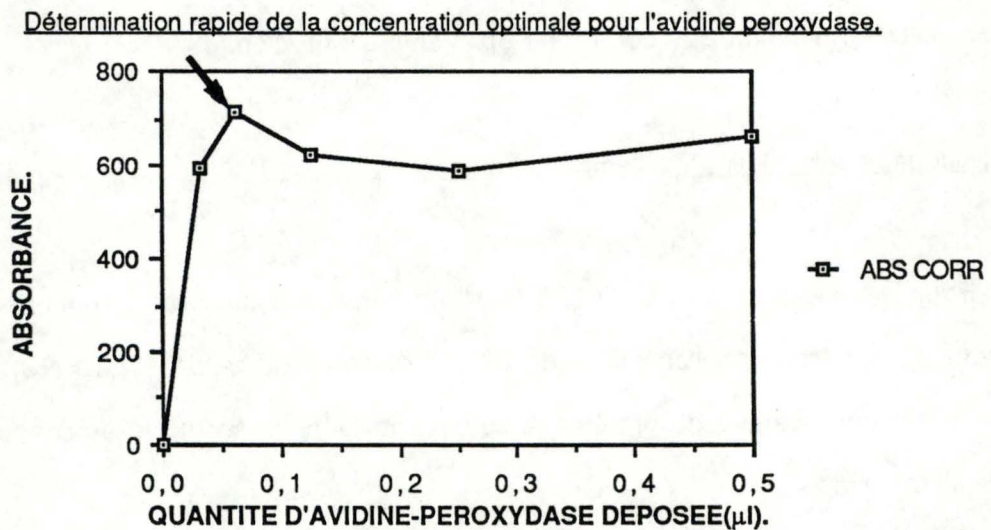


Fig. 29 : Détermination rapide de la dilution d'avidine-peroxydase à utiliser. Le 10D10-B 1/100 a été déposé sur Titertek (Flow) où 2 µg de protéines de la membrane lysosomale (Lys III) ont été adsorbées en absence de poly-L-Lysine. Le PBS remplace les protéines lysosomales dans les blancs. Différentes quantités d'avidine peroxydase ont ensuite été déposées pour déterminer la dilution à utiliser.

Les solutions à doser sont :

1. le 10D10 purifié (plus 1^{er} pic, protéines non retenues par la colonne après dépôt de l'ascite).
2. le 10D10 après dialyse.
3. le 10D10 concentré.

Ces mesures se trouvent rassemblées dans le tableau 8. La comparaison des valeurs obtenues par dosage ELISA de l'anticorps nous permet de constater que le 10D10 a été concentré de manière correcte au cours des étapes préparatoires au marquage. Sa concentration finale avant le marquage est de 6,49 mg/ml; cette concentration assez faible s'est avérée suffisante pour le marquage.

Le 10D10 biotinylé donne en effet une courbe de titration provisoire (fig. 28), pour une solution d'avidine-peroxydase diluée 400 fois, dilution que nous avons déterminée de manière rapide à la figure 29.

Cette courbe évolue régulièrement; on assiste à une légère chute de l'absorbance pour les fortes dilutions mais celle-ci n'est pas vraiment nette.

On peut donc conclure que le marquage à la biotine s'est produit de manière adéquate.

2.2.2. Détermination de la concentration optimale de l'Avidine-peroxydase.

La quantité d'avidine-peroxydase déposée sur les puits lors de la révélation d'un test ELISA utilisant l'anticorps biotinylé doit être suffisante pour mettre en évidence tout l'anticorps adsorbé sur l'antigène. Nous devons donc déterminer la dilution à laquelle l'avidine-peroxydase donne un signal optimal.

2.2.2.1. Résultats.

Nous avons réalisé une détermination de la dilution à utiliser de manière rapide (fig. 29) lors du dosage du 10D10 marqué à la biotine (fig.28); la dilution choisie alors est de 400. Nous avons étendu ensuite les quantités d'avidine-peroxydase testées afin de

Détermination de la concentration optimale pour l'avidine peroxydase.

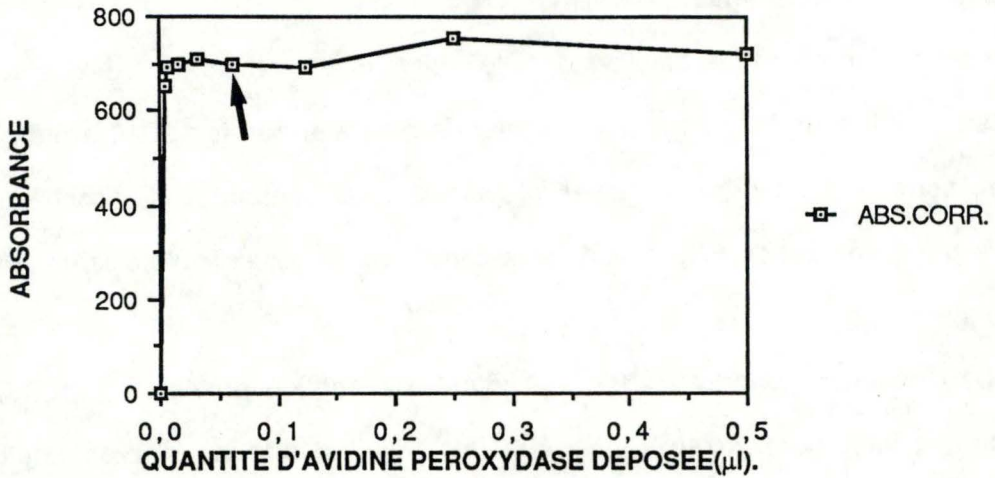


Fig. 30 : Détermination de la dilution d'avidine-peroxydase à utiliser.

Le 10D10-B 1/100 a été déposé sur Titertek (Flow) où 2 µg de protéines de la membrane lysosomale (Lys III) ont été adsorbées en absence de poly-L-Lysine. Le PBS remplace les protéines lysosomales dans les blancs. Différentes quantités d'avidine peroxydase ont ensuite été déposées pour déterminer la dilution à utiliser.

Titration du 10D10-B sur High Binding.

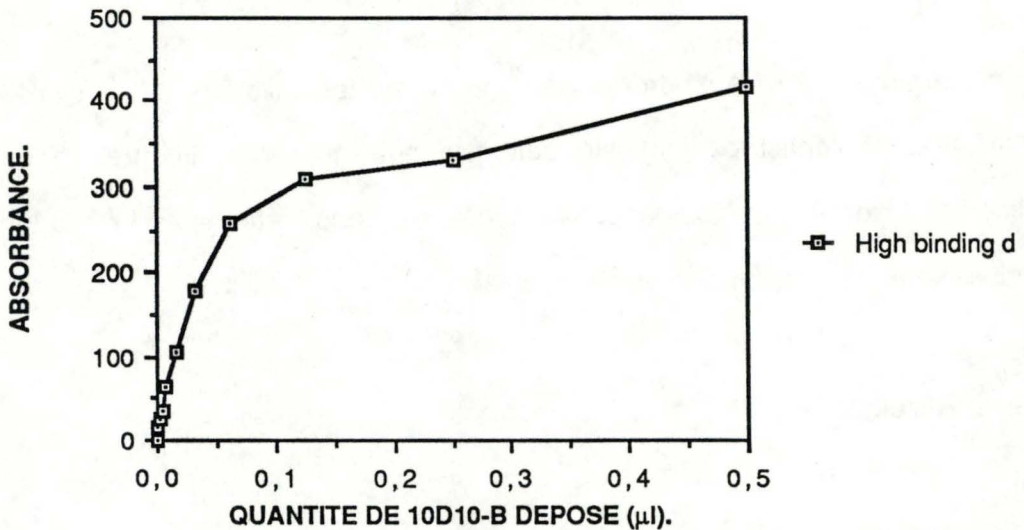


Fig. 31 : Titration du 10D10-B par ELISA modifié, sur High Binding (Nunc) où 2 µg de protéines de la membrane lysosomale (Lys III) ont été adsorbées en absence de poly-L-lysine. Le PBS remplace les protéines lysosomales dans les blancs. La révélation du test a été réalisée avec une solution d'avidine-peroxydase diluée 6400 fois.

préciser la dilution à utiliser (fig. 30).

Les deux courbes de dosage de l'avidine-peroxydase se ressemblent fortement; toutes deux montrent que les valeurs obtenues pour les différentes dilutions de l'avidine-peroxydase restent assez constantes. Même pour des dilutions importantes, on n'observe pas de chute brutale de l'activité; c'est pour cette raison que nous avons décidé d'utiliser l'avidine-peroxydase diluée 6.400 fois.

Cependant, lorsque nous réalisons un dosage avec cette dilution d'avidine-peroxydase (fig. 31), nous n'obtenons pas les valeurs attendues; la courbe de titration est régulière et évolue vers une valeur de plateau, mais cette valeur maximale est nettement inférieure à celle obtenue à la figure 28 où la dilution d'avidine-peroxydase était de 400.

Après avoir suspecté les facteurs tels que la température, l'attente entre la révélation et la mesure au lecteur de plaques MR 600, nous avons retesté l'effet de la dilution de l'avidine-peroxydase sur la courbe obtenue lors de la titration du 10D10-B. Pour cette expérience, nous avons testé le 10D10-B sur des boîtes Titertek (Flow) et High Binding (Nunc), dans des conditions identiques, en utilisant deux dilutions de l'avidine-peroxydase (800 et 6.400).

Les résultats obtenus sont repris à la figure 32.

La figure 32 nous montre que dans tous les cas, nous obtenons une courbe de titration qui évolue de manière régulière vers un plateau.

Pour une dilution donnée, on n'observe pas de différence nette entre les courbes obtenues, sur les boîtes Titertek (Flow) et High Binding (Nunc), que ce soit pour une dilution de 1/6.400 ou 1/800.

Par contre, on remarque une très grosse différence entre les courbes obtenues pour une dilution d'avidine-peroxydase 1/800 ou 1/6.400. A la dilution 1/800, les courbes obtenues pour les 2 types de boîtes donnent des valeurs d'adsorbance nettement supérieures (± 1.380); le plateau n'étant pas atteint pour la dilution 1/100 de 10D10-Biotinylé, alors que si l'avidine-peroxydase est diluée 6400 fois, il est atteint pour une dilution de 1/500 de 10D10-biotinylé.

Effet de la dilution de l'avidine-peroxydase.

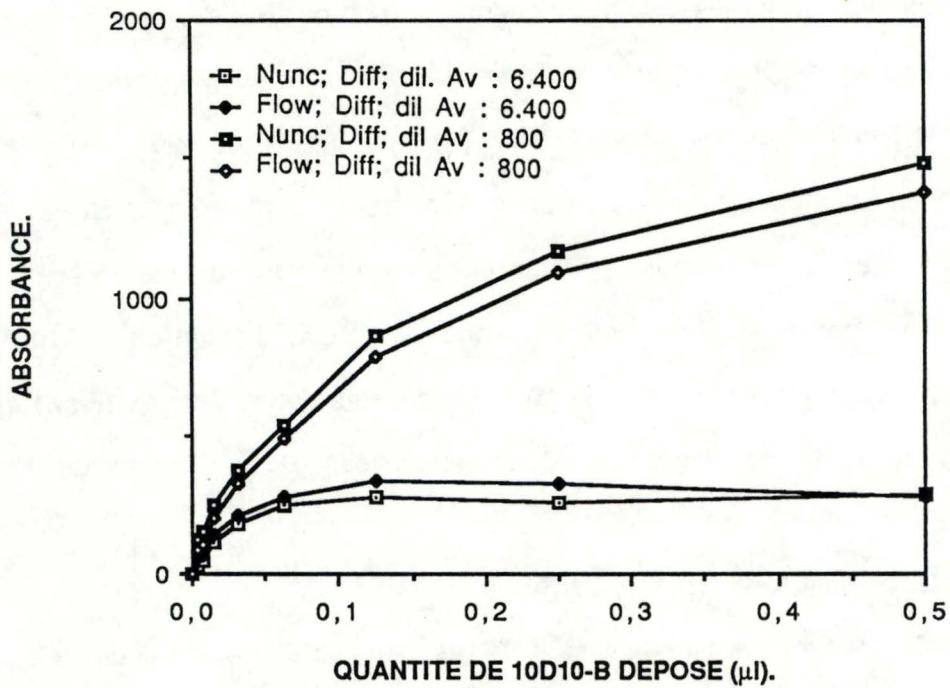


Fig. 32 : Influence de la dilution de l'avidine-peroxydase sur la sensibilité du test ELISA modifié pour le 10D10-B.

Titration du 10D10-B sur High Binding (Nunc) et Titertek (Flow) où 2 μg de protéines de membrane lysosomale (Lys III) ont été adsorbées. Le PBS remplace les protéines lysosomales dans les blancs.

Le 10D10-B a été déposé une nuit et la révélation du test a été réalisée en diluant l'avidine-peroxydase 800 fois et 6400 fois respectivement.

2.2.2.2. Discussion.

De ces expériences, on peut tirer deux conclusions importantes.

Premièrement, la dilution de l'avidine-peroxydase que l'on doit utiliser est très importante pour la sensibilité du dosage ELISA adapté à l'anticorps biotinylé. La quantité d'avidine-peroxydase déposée sur les puits doit être suffisante pour mettre en évidence tout l'anticorps biotinylé fixé; le fait que le plateau soit plus rapidement atteint, dans le cas où la dilution utilisée est de 1/6.400, n'est pas un hasard : il se trouve en fait que toute l'avidine-peroxydase déposée se fixe à l'anticorps biotinylé fixé au fond des puits; la sensibilité du dosage est donc ici relativement faible. Lorsque la concentration en avidine-peroxydase augmente, on observe alors une augmentation de la sensibilité du dosage.

Dans les expériences que nous avons réalisées et présentées dans ce travail, nous avons utilisé pour certaines la dilution 1/6.400 ou 1/800.

La seconde conclusion que l'on peut tirer de ces expériences est le peu d'importance du type de boîte utilisé. En effet, que le dosage se réalise sur les boîtes High Binding (Nunc) ou Titertek (Flow), les courbes obtenues sont semblables. La sensibilité du dosage ne se trouve pas modifiée par ce paramètre.

2.2.3. Détermination des conditions optimales de titration.

Pour le dosage du 10D10 S³⁵, nous avons montré l'importance de la poly-L-lysine ainsi que du type de boîte utilisé pour la titration. Nous avons tenté de mettre en évidence l'effet de ces paramètres sur le dosage du 10D10-B, afin de mettre éventuellement en évidence une augmentation significative du signal mesuré.

La figure 33 reprend les résultats d'une expérience où nous avons titré le 10D10-B sur les boîtes High Binding (Nunc) (33.1) et Titertek (Flow) (33.2), en présence ou en absence de poly-L-lysine. Les figures 33.3 et 33.4 reprennent les valeurs des blancs obtenus lors de ces titrations.

Cette expérience nous permet d'une part de comparer les 2 boîtes de titration et, d'autre

Titration du 10D10-B sur High Binding en présence ou non de Poly-L-Lysine.

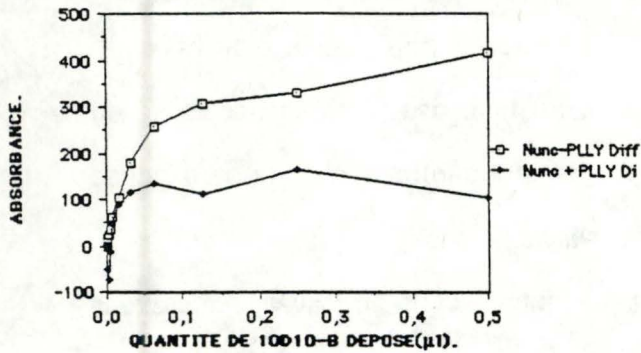


Fig. 33.1

Titration du 10D10-B sur High Binding en présence ou non de poly-L-lysine, blancs.

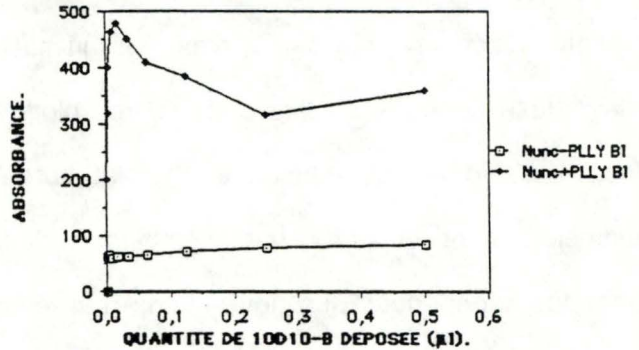


Fig. 33.3

Titration du 10D10-B sur Titertek (Flow) en présence ou non de poly-L-lysine.

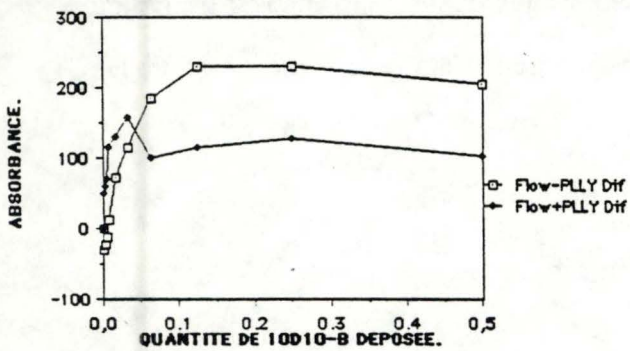


Fig. 33.2

Titration du 10D10-B SUR Titertek en présence de poly-L-lysine ou non, blancs.

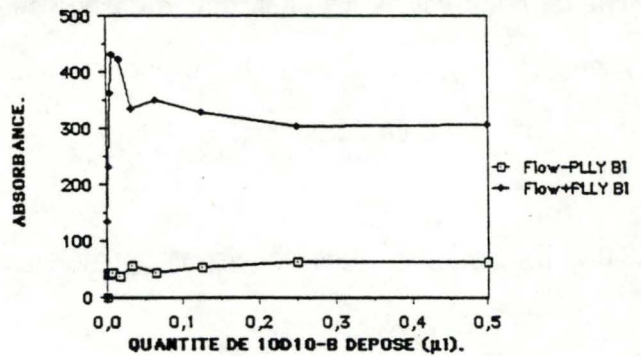


Fig. 33.4

Fig. 33 : Effet de la poly-L-lysine sur les 3 types de boîtes.

Titration du 10D10-B sur les boîtes : Titertek (Flow), Medium et High Binding (Nunc) où sont adsorbées 2 μg de protéines de membrane lysosomale (Lys III) en présence de poly-L-lysine. Le PBS remplace les protéines lysosomales dans les blancs.

La solution d'avidine-peroxydase est diluée 6400 fois.

part, de mettre en évidence l'effet de la poly-L-lysine.

2.2.3.1. Effet de la poly-L-lysine.

En observant les figures 33.1 et 33.2, il est assez frappant de constater que, dans les 2 graphes, la courbe de titration du 10D10 biotinylé en présence de poly-L-lysine évolue de manière irrégulière, et se trouve constamment plus bas que la courbe de titration du 10D10-Biotinylé, en absence de poly-L-lysine.

En observant les graphes 33.3 et 33.4, nous pouvons remarquer l'évolution irrégulière des blancs sur les 2 types de boîtes lors d'une titration en présence de poly-L-lysine. Si on compare valeurs corrigées (tests-blancs) et blancs, on constate que les valeurs des blancs sont nettement supérieures; ceci est le signe d'une adsorption non spécifique qui se produit en présence de poly-L-lysine, et ce, sur les 2 types de boîtes testées.

2.2.3.2. Comparaison des boîtes.

La comparaison des graphes 33.1 et 33.2 en absence de poly-L-lysine nous permet de remarquer que les courbes sont assez semblables; on observe dans les deux cas une courbe évoluant vers un plateau. Rappelons que la dilution d'avidine-peroxydase utilisée pour cette expérience est de 1/6.400, ce qui explique les valeurs peu élevées.

2.2.3.3. Discussion.

On n'observe pas de différence significative entre les courbes de dosage obtenues en absence de poly-L-lysine, sur les deux types de boîtes. Ces observations sont en accord avec les observations réalisées au point 2.2.1.

D'autre part, nous observons que la poly-L-lysine n'a pas le même effet sur le dosage du 10D10-Biotinylé que sur le dosage du 10D10 S³⁵. On observe une adsorption non spécifique importante qui empêche le dosage du 10D10 biotinylé en présence de

Tableau 9 : Origine de l'adsorption non spécifique dans un test ABC.

A. membrane + PLL sans 10D10-B	A'. membrane -PLL + 10D10-B
50.6	374
B. membrane + PLL sans 10D10-B	B'. membrane + PLL + 10D10-B
50.6	535
C. pas de membrane - PLL sans 10D10-B	C'. pas de membrane - PLL + 10D10-B
47.6	50.3
D. pas de membrane + PLL sans 10D10-B	D'. pas de membrane + PLL +10D10-B
47	844

Les valeurs proposées dans ce tableau sont le moyennes des absorbances mesurées lors des tests. Les conditions de préparation des boîtes sont indiquées. Dans tous les cas, on dépose l'avidine-peroxydase et on procède à la révélation par réaction à la peroxydase.

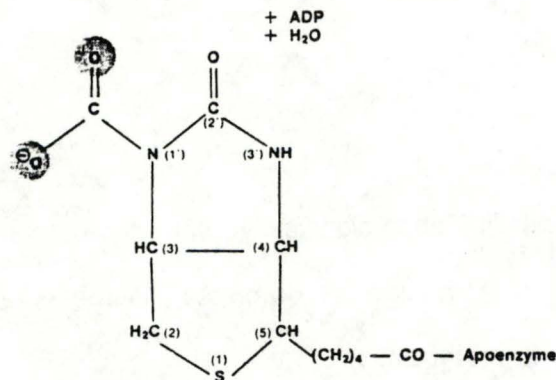


Fig. 34 : Structure de la N-Carboxy biotine (90).

poly-L-lysine.

Nous avons tenté de découvrir l'origine de cette adsorption non spécifique; elle peut provenir de la fixation du 10D10 biotinylé ou encore de l'avidine-peroxydase sur la poly-L-lysine (tableau 9).

L'expérience suivante a été réalisée : pour les test A, B, A' et B', nous avons adsorbé des membranes de lysosomes purifiés en présence et en absence de poly-L-lysine. Nous n'avons déposé que sur certains puits le 10D10-Biotinylé, alors que l'avidine-peroxydase est ajoutée partout. Nous avons réalisé des blancs (C, D, C' et D'), c'ad que les membranes ne sont pas adsorbées mais les autres conditions du test ne sont pas modifiées. Cette expérience nous permet de tester rapidement si l'avidine-peroxydase s'adsorbe sur la poly-L-lysine ou si c'est le 10D10-B qui s'y adsorbe de manière non spécifique.

Un examen rapide de ce tableau nous permet de remarquer que lorsque le 10D10 est absent (ABCD) ou lorsqu'il est présent mais en absence de membranes (C'), on ne constate pas d'adsorption non spécifique; par contre, si le 10D10-B est présent en absence de membranes et en présence de poly-L-lysine (D'), l'adsorption non spécifique est énorme; l'avidine-peroxydase seule ne s'adsorbe pas dans en présence de poly-L-lysine (D).

La comparaison D-D' nous permet de dire que l'adsorption non spécifique est due à l'anticorps biotinylé sur la poly-L-lysine. On pourrait expliquer cette adsorption de l'anticorps biotinylé sur la poly-L-lysine par la présence d'un groupement carboxylique dans la structure de la biotine. Lorsqu'elle se trouve en milieu alcalin, conditions de marquage de l'anticorps, le groupement carboxylique porte une charge négative : c'est la N-Carboxy-biotine(fig.34) (90). A pH 7.4, pH du dosage immuno-enzymatique, la poly-L-lysine est chargée positivement; l'adsorption non spécifique proviendrait d'une interaction électrostatique entre ces deux molécules.

2.2.4. Sensibilisation des puits avec du 10D10 non marqué.

Augmenter la quantité de membrane adsorbée sur le fond des puits devrait permettre d'augmenter la sensibilité du test en exposant une quantité plus importante d'antigène. Pour

Tableau 10 : Sensibilisation des plaques de titration.

	<u>Etapas</u>							<u>Absorbance</u>	<u>Blanc</u>	<u>Absorbance corrigée</u>
	1	1'	2	2'	3	3'	4			
A	+	-	+	-	+	-	+	1134	323	811
	-	-	+	-	+	-	+	174	125	49
B	-	+	+	-	+	-	+	745	217	528
	-	-	+	-	+	-	+	165	128	37
C	-	+	-	+	+	-	+	579	268	310
	-	-	-	+	+	-	+	286	295	-
D	-	+	-	+	-	+	+	843	656	187
	-	-	-	+	-	+	+	410	134	275

Protocole : Test ELISA modifié pour le 10D10-B.

La plaque de titration a été sensibilisée par le dépôt de 2 µg de 10D10 non marqué. Cette sensibilisation a été réalisée 2 heures à 37°C (étape 1) ou 1 nuit à 4°C (étape 1').

Les plaques ont été saturées à 37°C pendant 2 heures avec du PBS/BSA 1%.

2 µg de membranes lysosomales purifiées sont ensuite adsorbées; soit 1 heure à 37°C (étape 2), soit 1 nuit à 4°C (étape 2').

Le 10D10-B dilué 100 fois est alors déposé, 1 heure à 37°C (étape 3) ou 1 nuit à 4°C (étape 3').

L'étape 4 est identique à tous les tests; elle consiste à déposer l'avidine-peroxydase diluée 6 400 fois, puis à révéler la réaction avec de l'ABTS/H₂O₂ dans les conditions standards du test ELISA.

Les 4 tests A, B, C et D ont été réalisés en combinant les conditions d'incubations pour les différentes étapes.

Parallèlement, un test semblable a été réalisé dans les mêmes conditions mais où la sensibilisation n'a pas été réalisée; ce test correspond à la seconde ligne où 1 et 1' sont omis.

Pour chacun des tests, un blanc a été réalisé en remplaçant les membranes par du PBS.

Les valeurs obtenues pour les tests sont corrigés en soustrayant les valeurs de blancs.

cette raison nous avons essayé de sensibiliser les puits (76) par adsorption de 10D10, avant d'y déposer les membranes lysosomales purifiées (la poly-L-lysine n'est pas utilisée).

L'antigène est dans un premier temps capté par l'anticorps spécifique immobilisé; il réagit ensuite avec l'anticorps biotinylé. Pour ce dosage, il faut donc que l'antigène possède plusieurs épitopes de façon que, après sa réaction avec l'anticorps immobilisé, il puisse encore réagir avec le 10D10-B (76).

Nous réalisons ce dosage en plusieurs étapes et pour chacune d'elles nous avons testé différentes conditions. Celles-ci sont reprises dans le tableau 10, ainsi que les résultats obtenus.

Nous avons rencontré, avec cette technique, des problèmes d'adsorption non spécifique, comme l'indiquent les valeurs fortement élevées des blancs.

Il est certain que la sensibilisation est d'autant meilleure que toutes les étapes se réalisent à 37°C; on remarque d'ailleurs qu'elle diminue au fur et à mesure qu'une étape réalisée à 37°C est remplacée et se déroule à 4°C.

2.2.5. Conclusion.

D'une manière générale, on peut dire que la biotinylation de l'anticorps permet une amplification importante du signal obtenu lors du dosage de l'antigène.

La titration du 10D10 se réalise de manière optimale en utilisant une dilution d'avidine-peroxydase de 800. Il apparaît que les boîtes Titertek du type Flow et High Binding de type Nunc sont efficaces, les Nunc donnant un résultat très légèrement supérieur.

Nous réalisons cette titration sans employer de poly-L-lysine puisque la biotine (10D10-B) chargée négativement interagit avec les charges positives de la poly-L-lysine, ce qui conduit à une adsorption non spécifique importante.

Remarquons qu'il peut être intéressant de sensibiliser les plaques à condition d'effectuer toutes les étapes à 37°C; mais le signal obtenu est plus faible que celui mesuré lorsque la sensibilisation n'a pas lieu, en utilisant une solution d'avidine-peroxydase diluée 800 fois.

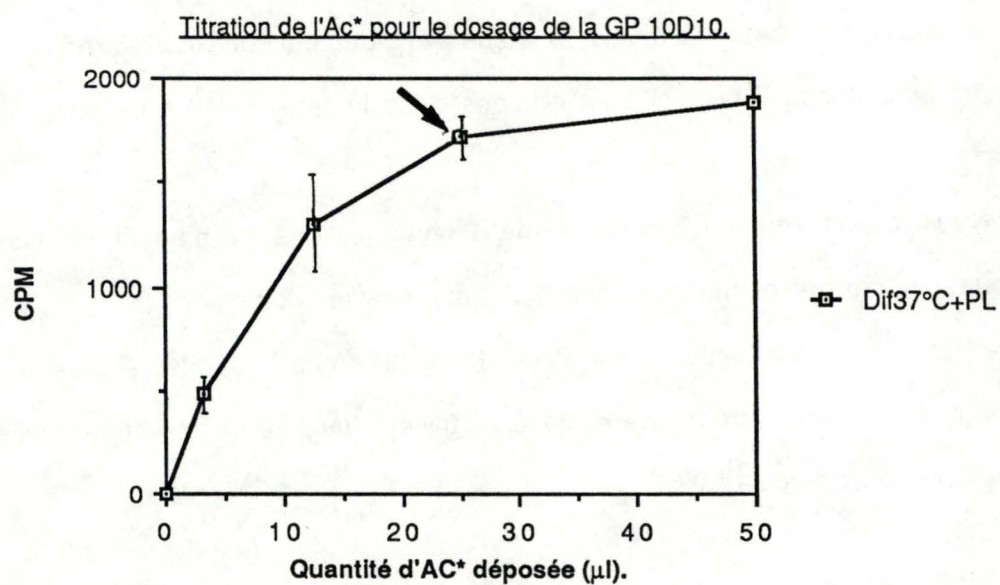


Fig. 35 : Titration de l'anticorps radioactif en SPRIA sur High Binding (Nunc) où 2 μg de protéines de membrane lysosomale (Lys II) ont été adsorbées en présence de poly-L-lysine. Le PBS remplace les protéines lysosomales dans les blancs.

Partie 3. Mise au point du dosage de l'antigène GP10D10.

3.1. INTRODUCTION.

Le dosage de la GP10D10 contenue dans une préparation, telle qu'une fraction de gradient, s'effectue selon le test de compétition décrit au point 8.2 de la partie Matériel et Méthodes (fig. 14).

Ce test se compose de deux incubations successives. On incube d'abord la préparation avec le 10D10 radioactif ou biotinylé; la dilution de celui-ci est choisie selon la courbe de titration, en se plaçant au début de la décroissance du plateau. Nous appellerons cette première incubation la **préincubation**. On dépose alors ce mélange sur des puits où sont préadsorbées des membranes de lysosomes purifiés. Au cours de l'**incubation**, l'anticorps 10D10 S³⁵ non lié pendant la préincubation, se fixera à l'antigène immobilisé. Un lavage élimine les complexes antigènes-anticorps formés au cours de la préincubation; restent sur le fond des puits les complexes antigènes-anticorps formés au cours de l'incubation; ils seront soumis au comptage de la radioactivité.

Pour ces deux étapes, nous avons déterminé les conditions dans lesquelles elles doivent être réalisées.

Nous avons mis au point le dosage de la GP10D10 en utilisant des membranes de lysosomes (Lys II) purifiés comme source d'antigène, une fraction ML et une fraction de gradient. Plusieurs dilutions de membranes lysosomales purifiées dans du PBS/PMSF ont été testées, de sorte qu'une courbe d'inhibition peut être tracée pour chaque expérience. Nous avons mis au point le dosage avec le 10D10 S³⁵, ensuite nous avons réalisé l'expérience à l'aide du 10D10 biotinylé.

Titration GP10D10 de Mb(LYSII):Préincubation 4°C,incubation 4°C.

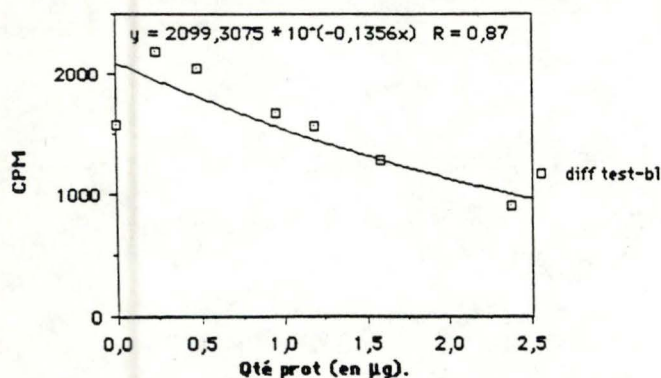


Fig. 36

Titration GP10D10 de Mb (LYSII):Préincubation 4°C,incubation 37°C.

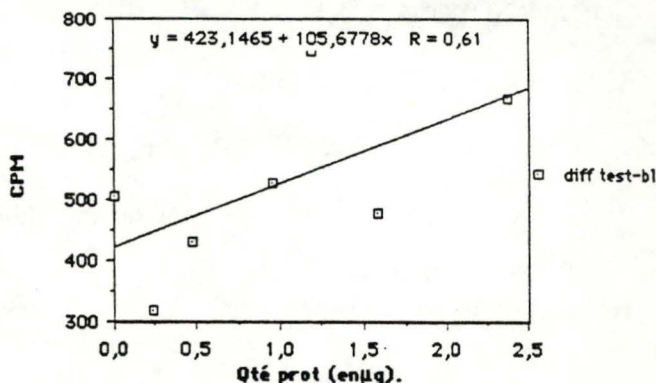


Fig. 37

Titration GP10D10 de Mb(lysII) :préincubation 37°C,incubation 37°C.

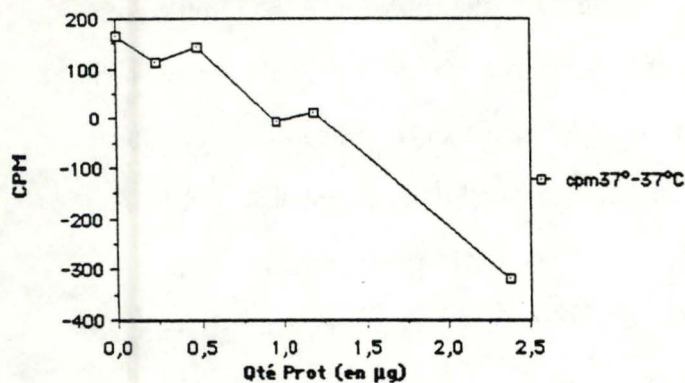


Fig. 38

Titration GP10D10 de Mb(LYSII):Préincubation 37°C,incubation 4°C.

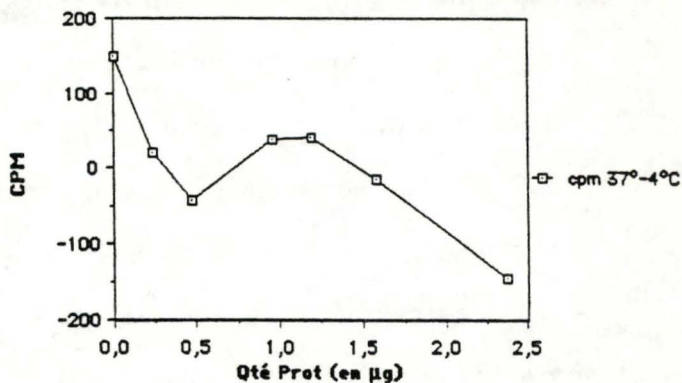


Fig. 39

Mise au point du dosage de la GP10D10 sur des membranes de lysosomes purifiées. Quatre expériences ont été réalisées dans différentes conditions :

	<u>Préincubation.</u>	<u>Incubation.</u>
fig. 36	4°C; 4 heures	4°C; 1 nuit
fig. 37	4°C; 4 heures	37°C; 1h30
fig. 38	37°C; 1h30	4°C; 1 nuit
fig. 39	37°C; 1h30	37°C; 1h30

Les quantités de membranes lysosomales (μg de protéine), préincubées dans le PBS/PMSF 0,2 mM en présence de l'anticorps radioactif dilué deux fois (Fig. 35), sont indiquées en abscisse. La quantité de GP10D10 à mettre en évidence est donc directement proportionnel à la quantité de protéines lysosomales (0 à 2,4 μg /puits).

Après l'incubation, le mélange est déposé sur des plaques High Binding (Nunc) où sont préadsorbées 2 μg de protéines de membrane lysosomale (Lys II) en présence de poly-L-lysine (le PBS remplace les protéines lysosomales adsorbées dans les blancs). L'excédent d'anticorps radioactif, non lié au cours de la préincubation, se lie sur les membranes fixées au fond des puits, pendant l'incubation (CPM en ordonnée).

Quand les résultats le permettent, la droite où la courbe la plus probable est calculée avec le coefficient de corrélation.

3.2. MISE AU POINT DU DOSAGE AVEC LE 10D10 S³⁵ RADIOACTIF.

3.2.1. Résultats.

L'anticorps que nous avons utilisé pour ces expériences est le 10D10 radioactif dont la courbe de titration se trouve à la figure 35; nous avons décidé d'après cette courbe d'utiliser une dilution de 1/2, soit 25 µl d'anticorps radioactif.

Quatre expériences ont été réalisées dans différentes conditions :

	<u>Préincubation.</u>	<u>Incubation.</u>
fig. 36	4°C; 4 heures	4°C; 1 nuit
fig. 37	4°C; 4 heures	37°C; 1h30
fig. 38	37°C; 1h30	4°C; 1 nuit
fig. 39	37°C; 1h30	37°C; 1h30

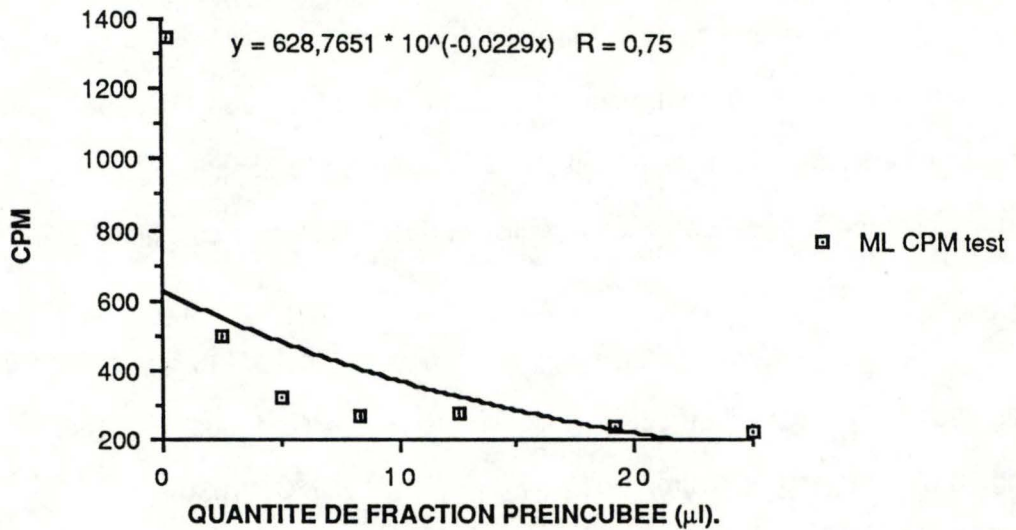
La figure 37 nous montre les résultats obtenus lorsque la préincubation s'est produite à 4 °C et l'incubation à 37°C. On observe que les valeurs enregistrées pour les différentes concentrations sont relativement faibles et n'évoluent pas de manière régulière. On peut remarquer également que l'on obtient une valeur plus élevée lorsque la quantité d'antigène est importante, ce qui est anormal.

Les figures 38 et 39 nous montrent les résultats obtenus lorsque la préincubation a eu lieu à 37°C, et que l'incubation s'est déroulée, d'une part à 4°C (fig. 38) et d'autre part à 37°C (fig. 39). Pour ces 2 graphes, nous obtenons des valeurs peu élevées, même négatives, et qui évoluent de manière irrégulière.

Notons cependant que l'on observe les valeurs les plus faibles lorsque la quantité de membrane utilisée lors de la préincubation est maximale, ce qui va dans le sens escompté.

On observe enfin à la figure 36 les résultats obtenus lorsque la préincubation et l'incubation se sont réalisées à 4°C. Les points obtenus dans ces conditions évoluent de manière régulière et peuvent être estimés par une exponentielle décroissante, avec un

Dosage de la GP10D10 sur la fraction ML d'un fractionnement de foie de rat normal.



Dosage de la GP10D10 sur la fraction 7 d'un gradient ML de foie de rat normal.

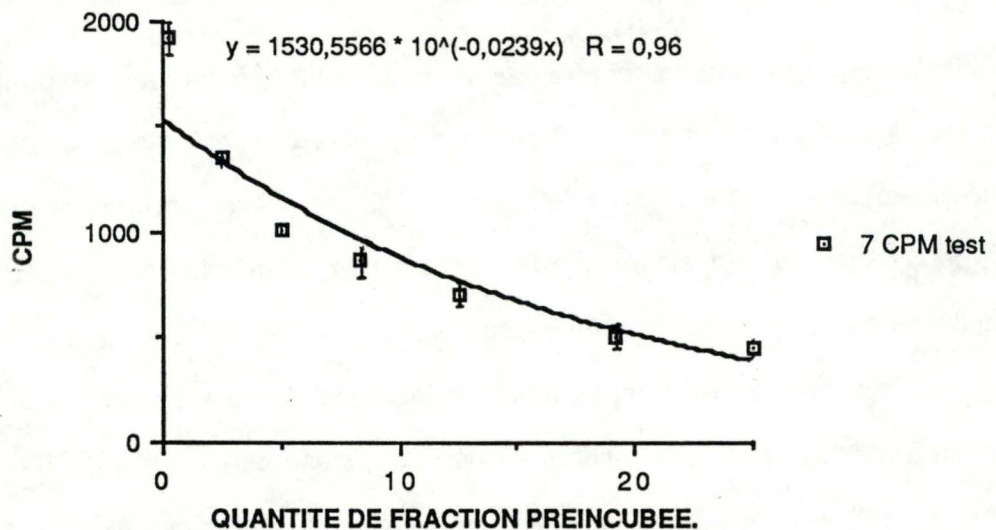


Fig. 40 et 41 : Dosage de la GP10D10 sur des fractions riches en lysosomes.

Différentes quantités de la fraction ML et de la fraction 7 d'un gradient de foie de rat normal sont préincubées, en présence de l'anticorps radioactif dilué 2 fois d'après la courbe de titration (Fig. 35), durant 4 H à 4°C. Le mélange est ensuite déposé sur une boîte High Binding (Nunc) où sont préadsorbées en présence de poly-L-lysine 2 µg de protéines de la membrane lysosomale (Lys III). Le PBS remplace les protéines lysosomales adsorbées dans les blancs. Au cours de cette incubation qui dure une nuit à 4°C, l'anticorps radioactif libre se fixe sur les membranes immobilisées (CPM en ordonnée).

coefficient de corrélation de 0,87. Les valeurs les plus élevées sont obtenues lorsque la préincubation s'est faite en présence de peu d'antigène. On peut remarquer que les valeurs absolues enregistrées dans ces conditions sont largement supérieures à celles obtenues dans les autres tests.

3.2.2. Discussion.

Nous pouvons remarquer, en comparant les figures 37, 38 et 39, que les valeurs sont relativement faibles alors qu'on enregistre des mesures très élevées à la figure 36. Ces 4 tests ayant été réalisés en même temps, avec la même préparation d'anticorps et la même préparation de membranes lysosomales (Lys II), il apparaît donc que **la sensibilité du dosage est maximale lorsque les 2 étapes se déroulent à 4°C**. On observe, lorsque la préincubation a lieu à 4°C et l'incubation à 37°C (fig. 37), que la valeur la plus élevée est obtenue pour la plus faible dilution des membranes (1/25); ceci est contraire au principe de compétition selon lequel le signal mesuré est inversement proportionnel à la quantité de GP10D10 dans la préparation à doser. Le profil obtenu lorsque les 2 étapes se déroulent à 4°C (fig. 36) est plus régulier que les autres puisque qu'une exponentielle décroissante peut exprimer la relation avec un coefficient de corrélation relativement élevé (0,87).

Il nous reste à vérifier la sensibilité de ce dosage dans ces conditions, sur d'autres fractions riches en lysosomes. Dans l'expérience suivante, le test de compétition a été réalisé sur une fraction ML (fig. 40) et sur la fraction 7 d'un gradient ML obtenu à partir d'un foie normal, fraction la plus riche en lysosomes (fig. 41). Les conditions de ce test sont celles déterminées lors de la mise au point; nous pouvons ainsi juger de leur efficacité.

Les courbes obtenues (fig. 40 et 41) évoluent de manière régulière; les valeurs enregistrées sont comparables à celles obtenues lors de la mise au point sur des membranes lysosomales purifiées.

L'exponentielle décroissante calculée est d'autant mieux ajustée que la fraction est purifiée. Il faut également tenir compte de la quantité de lysosomes présents dans la fraction. Il apparaît donc que ces conditions de dosage sont adéquates et permettent de doser avec une

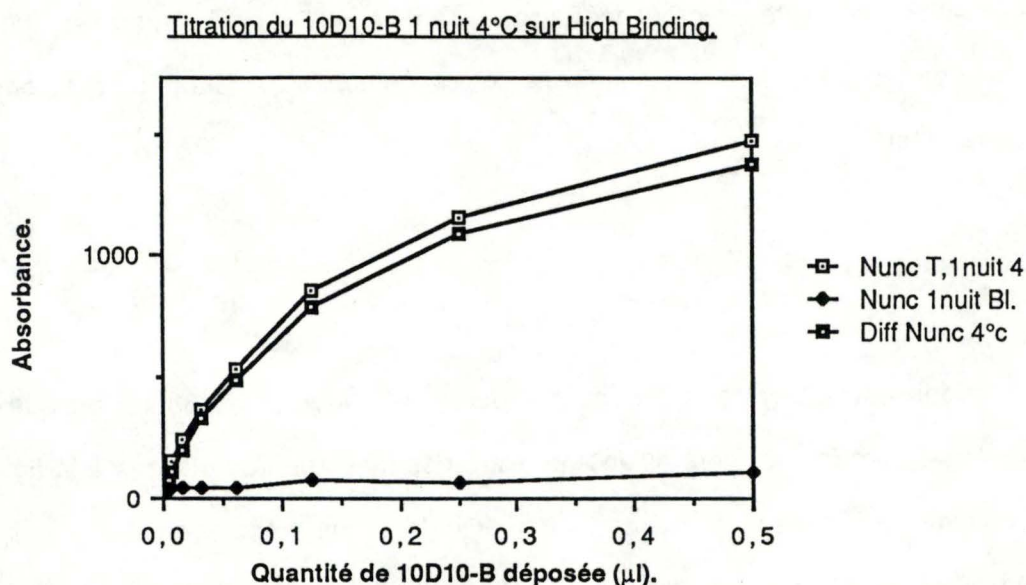


Fig. 42 : Titration du 10D10-B sur High Binding (Nunc) où sont préadsorbées 2 µg de protéines de membrane lysosomale (Lys III), en absence de poly-L-lysine. Le PBS remplace les protéines lysosomales dans les blancs. Différentes quantités (de 0,5 à 0 µl) de 10D10 sont ensuite déposées à 4°C durant une nuit. La révélation s'est réalisée, après rinçage des plaques au PBS, avec de l'avidine-peroxydase diluée 800 fois.

Dosage de la GP 10D10 de membranes lysosomales purifiées avec le 10D10-B.

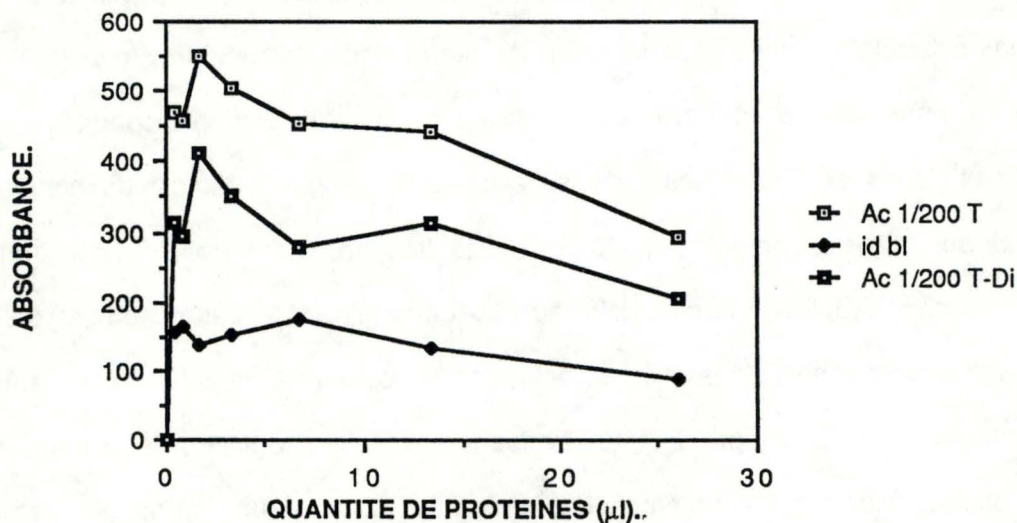


Fig. 43 : Courbe de titration de la GP10D10 de membranes lysosomales. La préincubation s'est déroulée 4 H à 4°C et l'incubation à 4°C pendant une nuit. Le mélange est déposé sur une plaque High Binding (Nunc) où sont préadsorbées 2 µg de protéines de membrane lysosomale (Lys III). Le PBS remplace les protéines lysosomales adsorbées dans les blancs. La révélation de la réaction a été réalisée après rinçage des plaques au PBS, avec de l'avidine-peroxydase diluée 800 fois.

bonne sensibilité la GP10D10 contenue dans des fractions riches en lysosomes (fraction 7). Par contre, pour la fraction ML, le coefficient de corrélation est nettement moins bon. Il semble que les quantités de fraction préincubées étaient trop faibles; en effet, les premiers et seconds points sont très éloignés; il eût fallu un certain nombre de points intermédiaires.

3.3. DOSAGE DE LA GP10D10 A L'AIDE DU 10D10 BIOTINYLE.

Nous avons tenté de doser la GP10D10 contenue dans différentes dilutions de préparations de membranes purifiées (Lys III), à l'aide du 10D10 biotinylé dont la courbe de titration se trouve à la figure 42; la quantité de 10D10 biotinylé utilisée pour doser la GP10D10 est de 50 μ l dilué 200 fois, soit 0,25 μ l; en effet, rappelons que, pour ce test de compétition, il faut se placer au début de la décroissance de la courbe de titration de l'anticorps.

La préincubation et l'incubation se sont déroulées à 4°C.

3.3.1. Résultats.

La figure 43 nous montre la courbe d'inhibition obtenue, ainsi que les valeurs des blancs.

Cette courbe évolue de manière assez régulière. Les valeurs corrigées sont très faibles; cela est dû aux blancs très élevés dont l'évolution suit celle des tests.

3.3.2. Discussion.

La courbe obtenue pour le dosage de la GP10D10, à l'aide du 10D10 biotinylé est loin de ressembler à la courbe d'inhibition idéale. On mesure en effet des valeurs relativement faibles et l'évolution observée à la figure 43 montre une décroissance pour des volumes supérieurs à 3,15 μ l que nous ne pouvons expliquer.

Le 10D10 biotinylé ne nous permet pas de doser avec une bonne sensibilité la

GP10D10.

Nous avons décidé à ce stade de ne pas nous attarder à cette mise au point qui risquait d'être plus compliquée que celle utilisant le 10D10 S³⁵.

3.4. CONCLUSION.

Les conditions de dosage de la GP10D10 d'une préparation subcellulaire ont été déterminées.

Par la suite, nous procéderons au dosage par compétition de la GP10D10 à l'aide de l'anticorps radioactif, de la manière suivante :

1. Titration du 10D10 S³⁵ utilisé pour déterminer la quantité adéquate d'anticorps à utiliser.
2. Dilution des préparations à doser dans du PBS/PMSF 0,2 mM.
Préincubation de ces dilutions avec l'anticorps pendant 4 heures à 4°C.
3. Dépôt des mélanges sur des plaques multipuits High Binding (Nunc) où sont préadsorbées 2µg de protéines de membranes lysosomales selon les conditions décrites dans la Partie 2 (en présence de poly-L-lysine).
Cette incubation se poursuit la nuit à 4°C.
4. Rinçage des puits au PBS.
5. Les puits sont ensuite découpés et la radioactivité est comptée. Les résultats sont calculés (calcul du probit) et le profil de distribution de la glycoprotéine est déterminé.

Partie 4. Distribution de la GP10D10 dans un gradient de densité provenant d'une fraction ML de foie de rat (foies : témoin et après endocytose de l'invertase et/ou du Triton WR-1339).

4.1. INTRODUCTION.

Le but de ce travail est de localiser les lysosomes dans un gradient isopycnique à l'aide de l'anticorps monoclonal 10D10 dirigé contre une protéine de la membrane lysosomale, et de suivre les déplacements de celle-ci lors de l'endocytose de Triton WR-1339 et d'invertase. Le Triton WR-1339 est un détergent non ionique et non dégradable (63); l'invertase est une glycoprotéine de levure caractérisée par une haute teneur en mannose, dégradée lentement après sa capture par les cellules du foie (3).

La comparaison du profil de distribution des deux enzymes marqueurs de lysosomes, l'arylsulfatase et la cathepsine C, avec celui de la GP10D10, permettra de vérifier la corrélation existant entre la distribution d'une protéine de la **membrane** des lysosomes et des 2 enzymes de la **matrice** lysosomale dans un **foie contrôle**.

Nous savons que l'injection de **Triton WR-1339** à un rat conduit à l'allègement de tous les lysosomes hépatiques en centrifugation isopycnique. En gradient de saccharose, les lysosomes de foie de rat sont localisés à une densité médiane de 1,12 g/ml au lieu de 1,21 g/ml, 4 jours après l'injection du Triton WR-1339 (64).

L'injection d'**invertase** permet également de modifier la densité des lysosomes en centrifugation isopycnique (3). Cependant, contrairement au Triton WR-1339, l'invertase s'accumule dans les lysosomes des cellules non parenchymateuses, riches en arylsulfatase, qu'elle alourdit jusqu'à une densité de 1,30 g/ml (15). Madnick *et al.* (57) localisent l'invertase dans les cellules non parenchymateuses, Tolleshaug *et al.* (56) et Thirion *et al.* (55) la localisent également dans les hépatocytes, mais par cellule il y a 4 fois plus d'invertase dans les cellules endothéliales, ce qui en concentration équivaut à un rapport important.

Tableau 11.1 : Dosage de la GP10D10 sur les différents types de gradients.

	Témoin	Invertase (3 H)	Triton (4 jours)	WR-1339 Invertase (15 H)
E	565	1468	473	503
N	427	237	90	63
ML	183	2298	601	222
PS	1875	1508	432	620
Rec:	250%	237%	199.50%	159.82%
1	2	42	16	7
2	1	11	37	46
3	2	4	20	23
4	1	14	28	10
5	4	21	46	9
6	5	31	37	46
7	20	69	19	31
8	34	79	5	20
9	28	48	7	16
10	21	46	19	12
11	8	58	24	137
12		27		106
13		899		0
Rec:	68.54%	58.8%	42.86%	208%

Les valeurs présentées sont les activités obtenues pour le dosage de la GP10D10 sur les 4 types de gradients étudiés. Par activité de la GP10D10, nous entendons l'unité d'inhibition calculée par l'ordinateur (probit), multipliée par la dilution de la fraction considérée. Les récupérations sont calculées, pour le fractionnement, par rapport à l'homogénat (E+N) et pour le gradient, par rapport à ML.

Tableau 11.2 : Dosage enzymatique sur les différents types de gradients.

	Témoin	Invertase (3 H)	Triton WR-1339 (4 jours)	Triton WR-1339 et Invertase (15 H)
<u>Cathepsine C.</u>				
E	95 731	102 069	86 537	147 747
N	16 896	4 475	5 800	8 800
ML	102 144	78 800	56 560	97 600
PS	16 204	13 083	19 772	39 806
Rec. Fract.	120%	90%	89%	93%
Rec. Grad.	123%	96%	64%	82,5%
<u>Arylsulfatase.</u>				
E	12 631	23 661	10 100	13 186
N	1 024	2 075	750	1 730
ML	15 148	22 600	7 514	10 200
PS	1 629	2 959	1 452	3 439
Rec. Fract.	130%	107%	90%	104%
Rec. Grad.	65%	94%	108%	91%
<u>Phosphodiesterase alcaline.</u>				
E	48 804	23 106	21 200	24 145
N	25 903	9 600	7 000	9 400
ML	9 299	5 060	1 979	2 882
PS	24 511	22 468	20 291	17 476
Rec. Fract.	80%	113%	104%	59%
Rec. Grad.	72%	92%	114%	91%
<u>Invertase.</u>				
E	-	229 680	-	524 472
N	-	1 600	-	28 400
ML	-	161 200	-	393 600
PS	-	54 800	-	76 285
Rec. Fract.	-	94%	-	90%
Rec. Grad.	-	90%	-	94,5%

Les valeurs présentées sont les valeurs d'activité enzymatiques corrigées (test - blanc) obtenues lors des dosages des différentes enzymes sur les fractionnements des 4 types de gradients étudiés. Les récupérations pour le fractionnement sont indiquées (Rec. Fract.) ainsi que les récupérations pour le gradient (Rec. Grad.). Les activités enzymatiques obtenues lors des dosages sur les fractions de gradient ne sont pas indiquées; elles sont reprises dans les profils de distribution établis pour chaque gradient.

Tableau 12 : Densités médianes - Densités moyennes.

Type de gradient	GP10D10	Arylsulfatase	Cathepsine C	Invertase	Phosphodiesterase <u>alcaline</u>
Témoin	1,209	1,209	1,204	-	1,192
Invertase 3 H	(1,245)	(1,220)	1,203	(1,25)	1,17
Triton 4 j.	(1,157)	1,130	1,132	-	1,178
Invertase (15 H) et Triton (4 j.)	(1,233)	(1,199)	1,126	1,198	1,178

Les densités médianes des différents gradients sont reportées; elles sont exprimées en g/ml.

Les valeurs entre parenthèses correspondent aux densités moyennes des distributions multimodales.

Enfin, l'utilisation simultanée du Triton WR-1339 et de l'invertase permet une séparation plus nette des lysosomes d'origines différentes. Etant tous allégés par le Triton WR-1339, ce sont essentiellement les lysosomes des cellules non parenchymateuses qui sont alourdis par l'invertase (59). Les lysosomes des cellules parenchymateuses et non parenchymateuses devraient donc se trouver dans des régions de densité plus éloignées en centrifugation isopycnique, que si seuls l'invertase ou le Triton WR-1339 avaient été endocytés. La distinction des 2 types de lysosomes en serait facilitée.

Le dosage de la GP10D10 sur ce type de gradient pourrait nous permettre de localiser l'antigène sur les lysosomes d'un type particulier de cellules hépatiques.

Remarques : 1. Comme nous l'avons signalé dans Matériel et Méthodes, les déterminations ont été faites en triple dans tous les cas. A titre d'exemple, les déviations standards sont représentées dans le cas de la figure 35, ainsi qu'aux figures 40 et 41, lors du dosage de la GP10D10 sur une fraction ML et une fraction 7 d'un gradient témoin.

2. Pour chaque expérience, deux gradients ont été réalisés; l'un à servi aux dosages des enzymes marqueurs et l'autre au dosage de la GP10D10.

Les activités et récupérations sont données dans le tableau 11. La discussion des résultats sous-entend, sans l'explicitier à chaque fois, que les récupérations sont plus ou moins déficitaires et qu'il est évident que les résultats que nous avons obtenus sont donc préliminaires.

3. Le tableau 12 donne les densités médianes calculées à partir des distributions unimodales des activités enzymatiques et de la GP10D10 dosée; de même, la moyenne des distributions bi- ou plurimodale est reprise.

4. Notons que la localisation en gradient de densité de l'invertase, 3 H ou 15 H après l'injection, est pratiquement semblable (15).

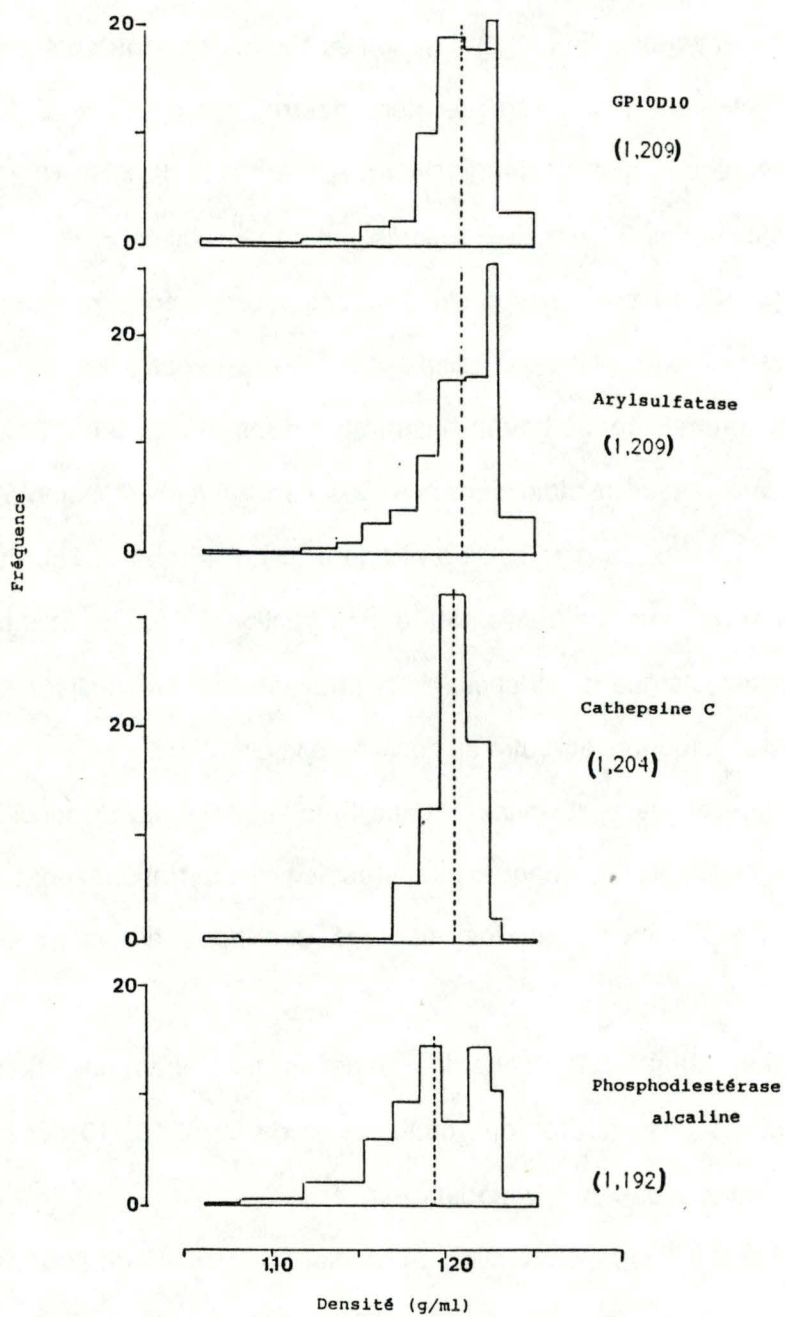


Fig. 44 : Profil de distribution de la GP10D10 et de quelques enzymes marqueurs, sur un gradient de saccharose réalisé à partir d'une fraction ML de foie de rat. (témoin). Les densités médianes ou les densités moyennes des distributions plurimodales sont indiquées entre parenthèses et reportées sur le graphe en pointillé.

4.2. DISTRIBUTION DE LA GP10D10 DANS LES FRACTIONS D'UN GRADIENT PROVENANT D'UN FOIE DE RAT TEMOIN (fig. 44 et Tableau 12).

4.2.1. Détermination de la dilution du 10D10 S³⁵ à utiliser dans le test de compétition.

La courbe de titration de l'anticorps se trouve à la figure 35, il s'agit du même anticorps que celui utilisé pour la mise au point du dosage de la GP10D10; nous l'avons dilué deux fois (on utilise donc 25 μ l).

4.2.2. Les résultats.

On observe une fréquence maximale des enzymes lysosomaux, arylsulfatase et cathepsine C, dans la région du gradient de densité comprise entre 1,20 - 1,21 g/ml.

Les densités médianes (1,204 g/ml pour la cathepsine C, 1,209 g/ml pour l'arylsulfatase et la GP10D10) obtenues pour ces 3 histogrammes coïncident.

Les profils de distribution des deux enzymes marqueurs des lysosomes, arylsulfatase et cathepsine C, paraissent à première vue semblables, et ressemblent à celui obtenu pour le dosage de la GP10D10.

Cependant, si on examine les profils de distribution de façon plus attentive, on constate que GP10D10, arylsulfatase et cathepsine C ne sont pas strictement superposables; notons de plus qu'une petite quantité de GP10D10 se retrouve dans les régions légères du gradient. On peut donc suspecter que ces 3 composants se retrouvent dans des structures lysosomales différentes d'un type cellulaire donné ou dans des lysosomes appartenant à des types cellulaires différents.

Le profil obtenu pour la phosphodiesterase alcaline ne ressemble pas à celui obtenu pour le dosage de l'antigène; le maximum de fréquence s'étend sur une plus large région du gradient, de 1,15 à 1,21 g/ml. *La densité médiane* (1,192 g/ml) ne correspond pas à celle obtenue pour le dosage de l'antigène GP10D10 (1,209 g/ml). Il est à noter que la densité médiane de la phosphodiesterase alcaline présente dans une fraction ML est plus élevée (1,192 g/ml)

que celle de la phosphodiesterase alcaline contenue dans une fraction P (en moyenne 1,15 - 1,16 g/ml).

4.2.3. Discussion.

Le rat n'étant pas traité, ni au Triton WR-1339, ni à l'invertase, la population lysosomale peut être considérée comme normale. C'est ce qui ressort des graphes, puisque les distributions des deux enzymes marqueurs des lysosomes sont semblables dans une certaine mesure, ainsi que leurs densités médianes; celles-ci correspondent à la densité des lysosomes normaux (1,21 g/ml) dans un gradient de saccharose.

L'arylsulfatase et la cathepsine C, bien qu'étant des enzymes marqueurs de lysosomes, ne présentent pas une localisation identique dans les cellules de foie (58). La cathepsine C est retrouvée surtout dans les cellules parenchymateuses alors que l'arylsulfatase est rencontrée surtout dans les cellules non-parenchymateuses (58,59,67). On remarque une différence de distribution entre l'arylsulfatase et la cathepsine C; l'arylsulfatase présente un maximum vers 1,23 g/ml, la cathepsine C vers 1,20 g/ml.

La GP10D10 présente la même densité médiane que les 2 enzymes lysosomaux; elle est donc associée aux lysosomes. Cependant, la glycoprotéine n'a pas exactement le même profil que l'un ou l'autre de ces enzymes lysosomaux. Ceci laisse suspecter une localisation cellulaire mixte dans les cellules non parenchymateuses et parenchymateuses.

Une partie minime de GP10D10 se retrouve dans la première fraction du gradient. Il n'est pas possible d'identifier les structures correspondantes; notons cependant qu'un faible pourcentage de cathepsine C se retrouve dans cette même fraction.

Il eût été intéressant de doser également la galactosyl transférase, marqueur de l'appareil de Golgi qui s'équilibre dans un gradient de saccharose à de faibles densités.

Viennent également s'équilibrer à ces faibles densités, les endosomes, organites qui pourraient être mis en évidence 10 à 15 min après l'internalisation de l'invertase par les cellules non parenchymateuses, ou de l'asialofétuine par les hépatocytes par exemple (92).

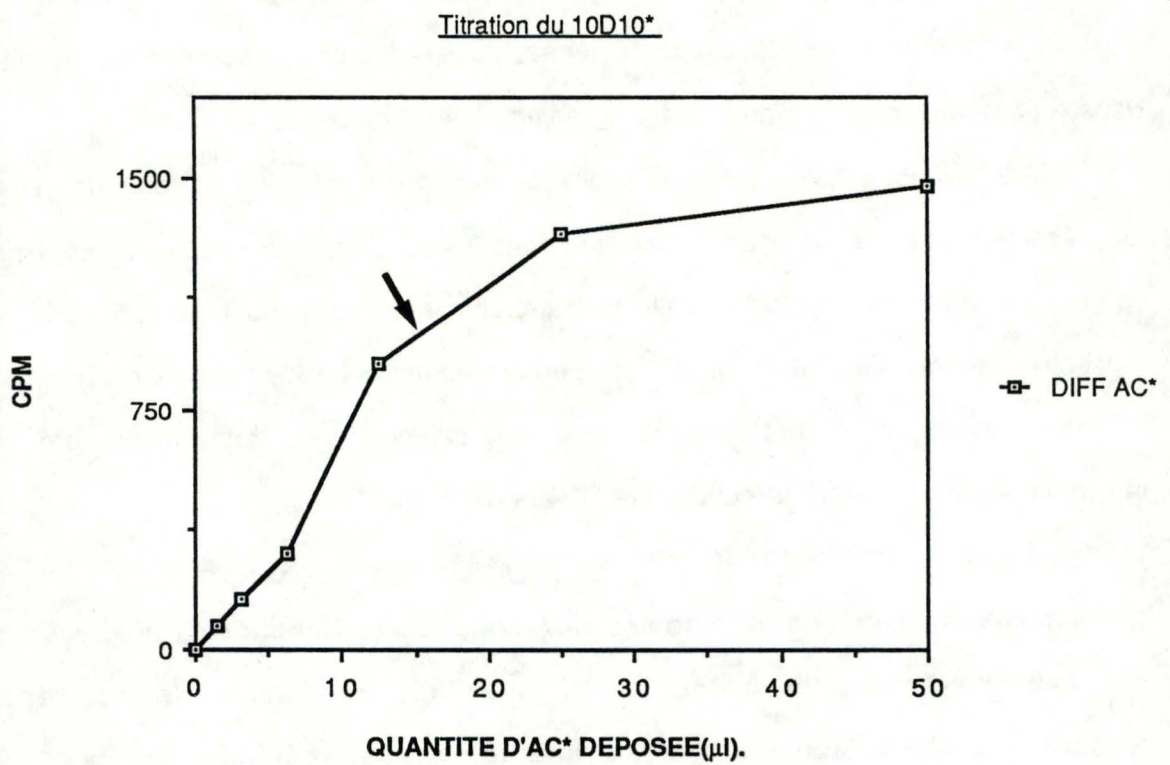


Fig. 45 : Titration du 10D10 radioactif en SPRIA sur High Binding (Nunc) où sont préadsorbées 2 μg de protéines de la membrane lysosomale (Lys IV), en présence de poly-L-lysine. Le PBS remplace les protéines lysosomales dans les blancs.

Le fait que la distribution de la GP10D10, protéine de la membrane lysosomale, corresponde à celle des enzymes lysosomaux signifie que le dosage de l'antigène nous permet de localiser les membranes des lysosomes et donc les lysosomes dans un gradient, de la même manière qu'un dosage enzymatique. C'est à notre connaissance la première fois qu'un tel résultat a pu être obtenu.

La distribution correspondant au dosage de la phosphodiesterase alcaline, enzyme marqueur de la membrane plasmique, ne ressemble pas à celui obtenu pour la GP10D10. Ceci signifie que la GP10D10, dosée sur le gradient à l'aide de l'anticorps 10D10 dirigé contre les membranes lysosomales purifiées, est localisée sur les lysosomes, et ne se situe vraisemblablement pas sur la membrane plasmique.

4.3. DISTRIBUTION DE LA GP10D10 DANS LES FRACTIONS D'UN GRADIENT PROVENANT D'UN FOIE DE RAT AYANT RECU 3 HEURES AUPARAVANT UNE INJECTION D'INVERTASE (fig. 46 et tableau 12).

4.3.1. Détermination de la dilution du 10D10 radioactif à utiliser.

La courbe de titration de l'anticorps S³⁵ correspondant se trouve à la figure 45; nous avons choisi de le diluer 3 fois.

Cet anticorps radioactif est celui utilisé pour le dosage de la GP10D10 lors des expériences suivantes.

4.3.2. Les résultats.

On observe à la figure 46 que les profils de distribution de l'arylsulfatase et de la cathepsine C diffèrent.

La cathepsine C montre une distribution unimodale centrée sur les densités 1,20 - 1,21 g/ml du gradient; celle-ci n'est pas du tout affectée par le traitement (cfr tableau 12).

L'arylsulfatase, l'invertase et la GP10D10 présentent une distribution bimodale.

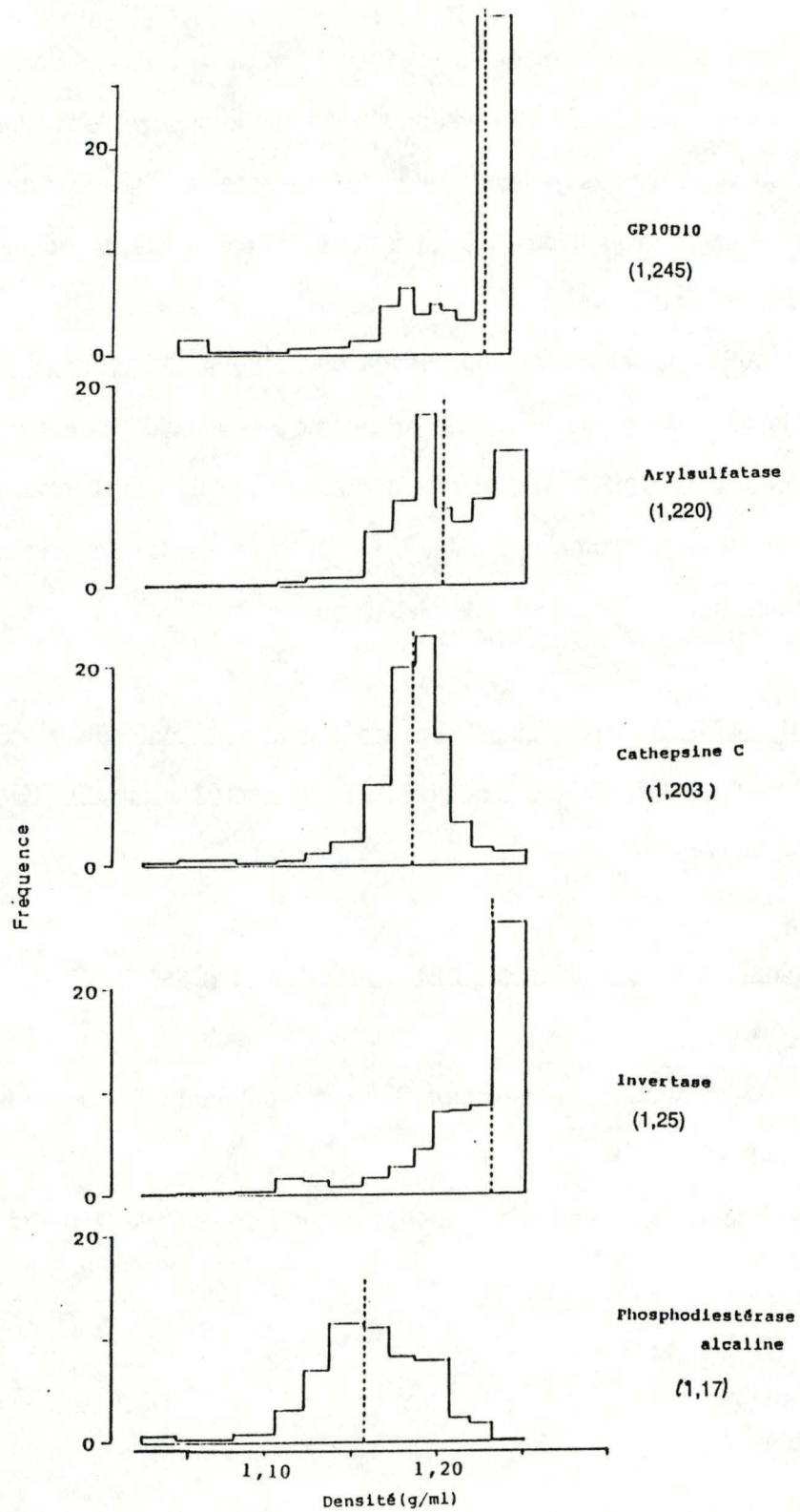


Fig. 46: Profil de distribution de la GP10D10 et de quelques enzymes marqueurs sur un gradient de saccharose réalisé à partir d'une fraction ML de foie de rat ayant reçu 3 H auparavant une injection d'invertase (0,9 mg / 100 g de poids corporel). Les densités médianes ou les densités moyennes des distributions plurimodales sont indiquées entre parenthèses et reportées sur le graphe en pointillé.

L'arylsulfatase est retrouvée dans les régions correspondant aux densités 1,21 g/ml et dans les zones de forte densité du gradient. L'invertase s'accumule surtout dans les zones de fortes densités du gradient; on en retrouve de plus une certaine proportion centrée autour d'une densité de 1,21 g/ml. La GP10D10 a un profil de distribution qui ressemble à celui de l'invertase, aux alentours de 1,21 g/ml et dans le fond du gradient. En d'autres termes, cela suggère que la GP10D10 se trouve essentiellement dans les lysosomes porteurs d'invertase; 60 à 65 % est présente dans la dernière fraction du gradient, une quantité d'environ 30% se retrouve dans les régions plus légères du gradient (1,21 g/ml) et 3% est plus léger que 1,09 g/ml, la densité limite du gradient de saccharose utilisé.

4.3.3. Discussion.

L'invertase injectée se retrouve principalement dans les lysosomes des cellules non parenchymateuses qu'elle alourdit (15). L'arylsulfatase, enzyme plus abondant dans les cellules non parenchymateuses (58,67), voit son profil de distribution partiellement déplacé vers les plus fortes densités.

Les lysosomes des cellules non parenchymateuses sont alourdis, mais non les lysosomes des cellules parenchymateuses; ce qui est mis en évidence par la distribution de la cathepsine C qui n'est pas modifiée par l'injection d'invertase; en effet la cathepsine C se trouve essentiellement dans les cellules parenchymateuses (15).

Nous pouvons dire, en examinant la distribution de la GP10D10, que **l'injection de l'invertase met en évidence deux catégories de structures contenant la GP10D10; on pourrait estimer très approximativement que 60 à 65% de la GP10D10 est associée aux cellules non parenchymateuses et 30% aux cellules parenchymateuses. Il est à noter que 3% environ sont retrouvés dans la fraction légère; fraction légère où s'équilibrent normalement les endosomes et une fraction du Golgi.** Les résultats obtenus après endocytose de l'invertase pendant 3 heures, suggèrent donc fortement une association préférentielle de la GP10D10 avec les membranes lysosomales des cellules non parenchymateuses. Une quantité moindre serait associée aux

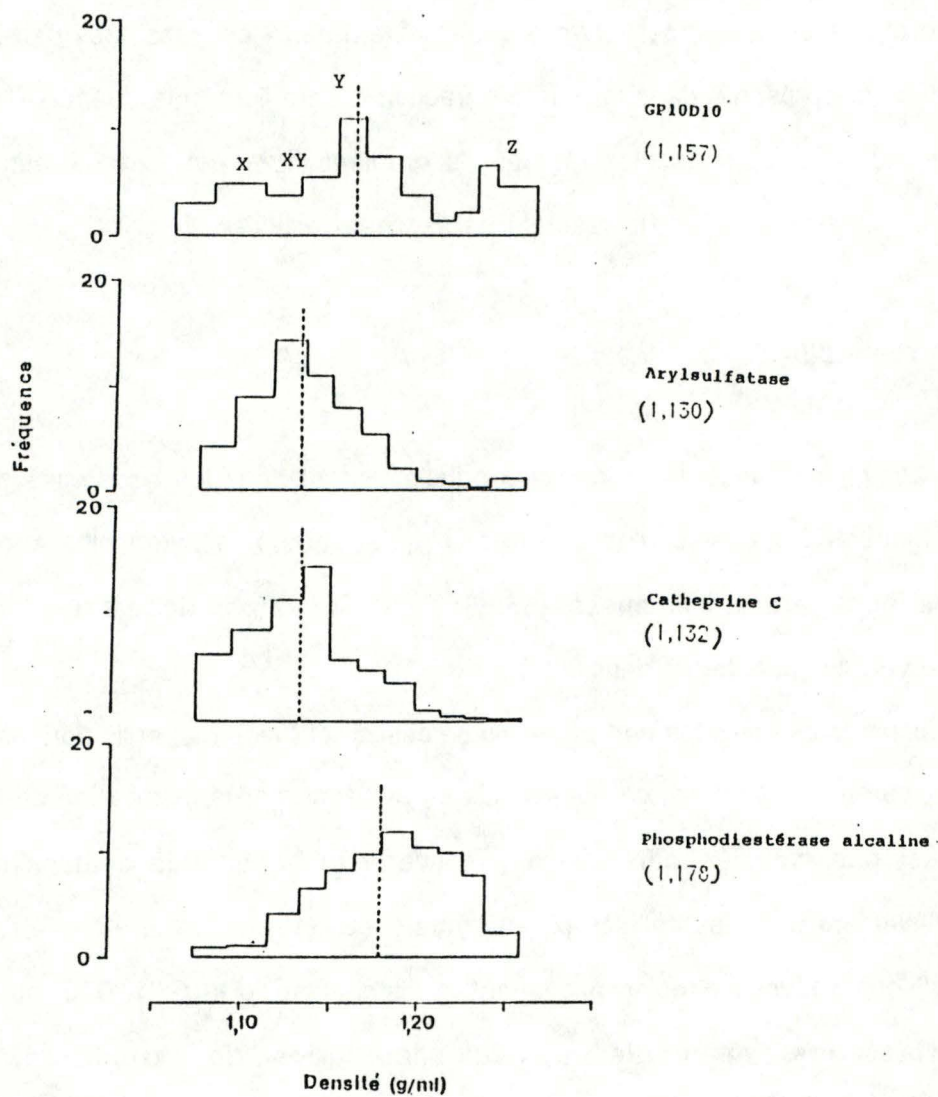


Fig. 47 : Profil de distribution de la GP10D10 et de quelques enzymes marqueurs sur un gradient de saccharose réalisé à partir d'une fraction ML de foie de rat ayant reçu 4 jours auparavant une injection de Triton WR-1339 (0,5 ml d'une solution à 17% / 100 g de poids corporel).

Les densités médianes ou les densités moyennes des distributions plurimodales sont indiquées entre parenthèses et reportées sur le graphe en pointillé.

X, XY, Y et Z représentent les populations de structures portant de la GP10D10 qui sont mises en évidence par l'injection du Triton WR-1339.

membranes des lysosomes hépatocytaires. Enfin, une quantité minime mais réelle (voir gradient témoin), pourrait être associée à des structures apparentées soit aux endosomes soit au Golgi.

4.4. DISTRIBUTION DE LA GP10D10 DANS LES FRACTIONS D'UN GRADIENT PROVENANT D'UN FOIE DE RAT AYANT RECU 4 JOURS AUPARAVANT UNE INJECTION DE TRITON WR-1339
(fig.47 et tableau 12).

4.4.1. Résultats.

On sait que le Triton WR-1339 affecte les lysosomes des cellules parenchymateuses et non parenchymateuses (endothéliales et de Kupffer) (93); ceux-ci étant incapables d'éliminer cette substance, ils l'accumulent et sont fortement dilatés 4 jours après l'injection (65); ils s'équilibrent alors à des densités faibles dans un gradient de saccharose (64).

On observe à la figure 47 que les deux *distributions* des enzymes lysosomales, cathepsine C et arylsulfatase, sont unimodales et correspondent, ainsi que les densités médianes qui se situent aux alentours de 1,13 g/ml. Le graphe obtenu pour la GP10D10 montre que la distribution de la glycoprotéine GP10D10 est, par contre trimodale (les 3 populations seront appelées X, Y et Z) et ne correspond pas à la distribution des enzymes marqueurs.

Z n'est pas modifiée par le traitement au Triton WR-1339 alors que X et Y sont allégées; X est fortement allégée avec un petit pic aux environs d'une densité de 1,11 g/ml; Y, plus abondant que X, est centrée autour d'une densité de 1,155 - 1,160 g/ml.

La phosphodiesterase alcaline présente une distribution unimodale centrée sur la région de densités comprises entre 1,17 à 1,18 g/ml (cfr tableau 12), ce qui est plus faible que pour un rat normal; sa distribution n'est pas modifiée par le traitement.

4.4.2. Discussion.

Le Triton WR-1339 s'accumulant dans les lysosomes des cellules non parenchymateuses et parenchymateuses provoque un allègement de ceux-ci, c'est ce qui est mis en évidence par le déplacement vers les plus faibles densités du gradient des deux enzymes marqueurs des lysosomes.

On peut également observer ce glissement pour la densité moyenne du profil de distribution de la GP10D10; d'une densité médiane de 1,209 g/ml pour un gradient témoin, on mesure une moyenne de densité de 1,157 g/ml en présence de Triton WR-1339 (dans ce cas, on ne peut évidemment pas parler de densité médiane).

La distribution trimodale de la GP10D10 montre que :

- 1- la majeure partie des membranes portant la GP10D10 est allégée et se retrouve à des densités de 1,11 et 1,15 g/ml (X+Y).
- 2- une partie n'est absolument pas touchée par le Triton WR-1339 (Z).
- 3- la partie allégée (X+Y) n'est pas superposable à celle des enzymes lysosomaux (arylsulfatase et cathepsine C).
- 4- à une densité de 1,12 g/ml, on trouve une proportion importante d'arylsulfatase et de cathepsine C, mais non de GP10D10. Nous appellerons cette population XY.
- 5- si on attribue des scores (0, +, ++, +++) à l'abondance relative en GP10D10, arylsulfatase et cathepsine C, on arrive à établir le tableau suivant :

	X	XY	Y	Z
GP10D10	+	+	+++	++
Arylsulfatase	++	+++	+	0
Cathepsine C	++	+++	+	0

Il faut donc en conclure :

- qu'il y a des structures membranaires (Z) assez bien pourvues en GP10D10 mais

dépourvues des 2 enzymes que nous avons dosés; il faudrait donc en doser d'autres pour examiner leur contenu éventuel en enzymes lysosomaux.

- que Y est riche en GP10D10 et relativement pauvre en arylsulfatase et cathepsine C.
- que X est pauvre en GP10D10 mais riche en cathepsine C et arylsulfatase.
- qu'il existe des lysosomes XY riches en arylsulfatase et cathepsine C mais pauvres en GP10D10.

Il n'est pas possible à ce stade d'attribuer X Y Z et XY à un type lysosomal ou cellulaire déterminé. Donc l'injection de Triton WR-1339 permet de mettre en évidence 3 structures membranaires portant la GP10D10, que l'on ne peut détecter dans un gradient ML de foie de rat normal.

L'injection de Triton WR-1339 influence sans aucun doute, la distribution des membranes lysosomales; cependant il n'est pas possible de superposer dans ce cas, enzymes lysosomaux et protéine de la membrane des lysosomes. Il semble que la majeure partie des structures portant la GP10D10 s'est allégée, une partie mineure n'a pas été touchée par le traitement.

Les lysosomes ou structures à GP10D10 sont plus hétérogènes que ce que la distribution des enzymes lysosomaux permet de mettre en évidence.

4.5. DISTRIBUTION DE LA GP10D10 DANS LES FRACTIONS D'UN GRADIENT ML PROVENANT D'UN FOIE DE RAT AYANT RECU UNE INJECTION 4 JOURS AUPARAVANT DE TRITON WR-1339 ET D'INVERTASE 15 HEURES AUPARAVANT (fig. 48 et tableau 12).

4.5.1. Résultats.

On observe à la figure 48, que la cathepsine C, contenue principalement dans les cellules parenchymateuses, présente une distribution monomodale centrée sur une région du gradient où les densités sont faibles; en effet, la cathepsine C présente une densité médiane de 1.124 g/ml alors que la densité médiane est de 1.132 g/ml lorsque seul le Triton WR-1339 est injecté; Cela signifie que la distribution de la cathepsine C, allégée par le Triton

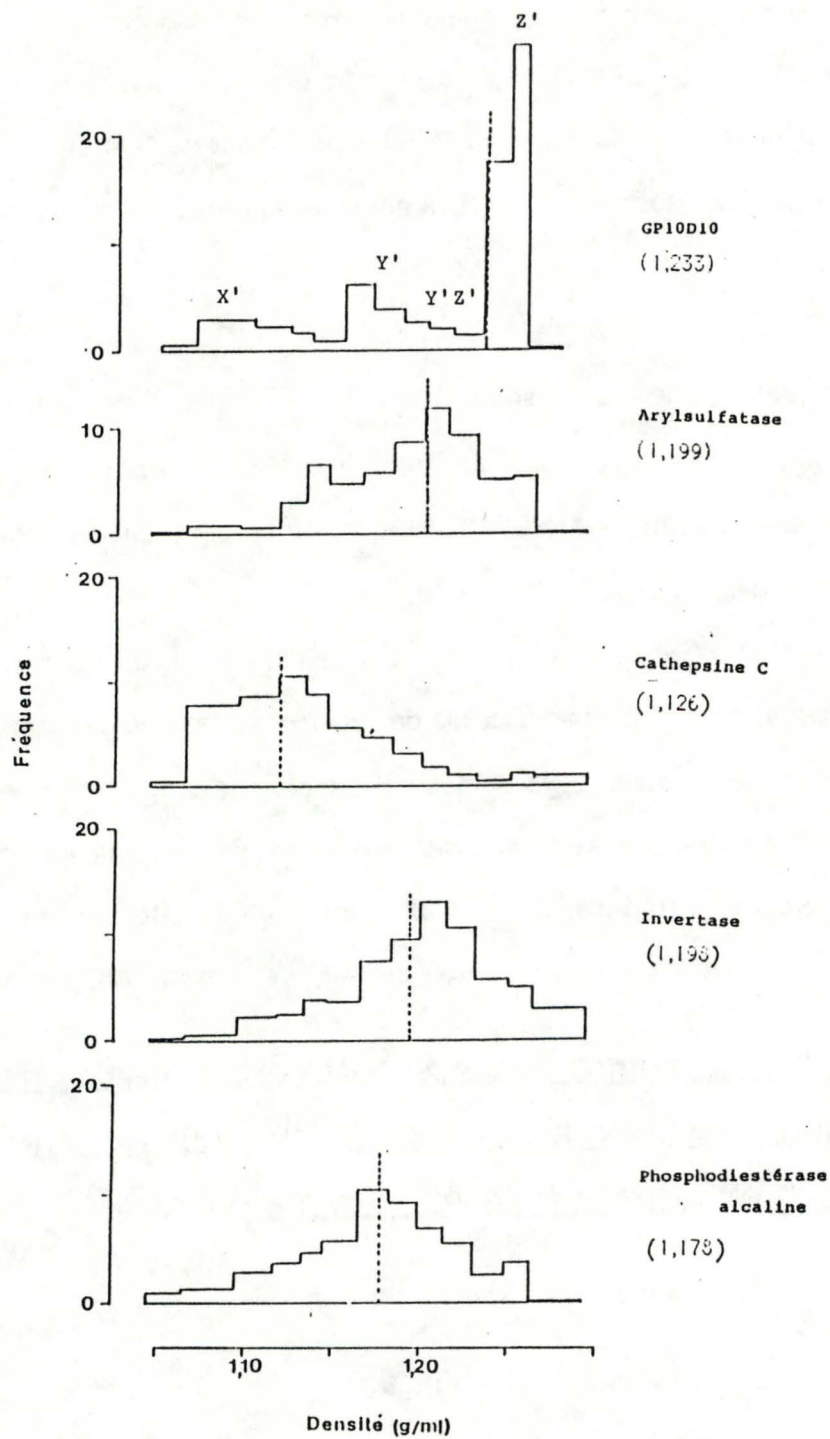


Fig. 48 : Profil de distribution de la GP10D10 et de quelques enzymes marqueurs sur un gradient de saccharose réalisé à partir d'une fraction ML de foie de rat ayant reçu 4 jours auparavant une injection de Triton WR-1339 (0,5 ml d'une solution à 17% / 100 g de poids corporel) et 3 H auparavant une injection d'invertase (0,9 mg / 100 g de poids corporel).

Les densités médianes ou les densités moyennes des distributions plurimodales sont indiquées entre parenthèses et reportées sur le graphe en pointillé.

X', Y', Y'Z' et Z' représentent les populations de structures portant de la GP10D10 qui sont mises en évidence par l'injection du Triton WR-1339.

WR-1339 (par rapport au témoin), n'est pas modifiée par l'injection supplémentaire d'invertase 15 heures auparavant (par rapport au Triton WR-1339 seul).

On remarque également une similitude entre les profils de distribution de l'arylsulfatase et de l'invertase. Ces deux enzymes présentent dans leur profil de distribution un pic de fréquence pour la région de densité comprise entre 1,20 et 1,215 g/ml, et un épaulement vers 1,15 g/ml.

Le profil de distribution de la GP10D10 est hétérogène. On observe trois pics : le premier (X'), centré sur les faibles densités (environ 1,10 g/ml), pourrait correspondre au pic de la cathepsine C; le second (Y') est centré sur les densités moyennes (environ 1,16 - 1,17 g/ml), et le troisième (Z'), plus important est présent dans la région de plus fortes densités, de plus de 1,24 g/ml.

4.5.2. Discussion.

Le Triton WR-1339, injecté à un rat, est retrouvé dans les lysosomes des cellules parenchymateuses et non parenchymateuses du foie, qu'il allège (64). L'invertase injectée contrecarre l'effet du Triton WR-1339 en alourdissant les lysosomes des cellules non parenchymateuses dans lesquels elle s'accumule.

L'invertase est reprise principalement par les cellules endothéliales (59). En présence de Triton WR-1339, on retrouve l'enzyme injectée dans des structures de densité proche de 1.198 g/ml au lieu de 1.25 g/ml ou plus, si elle est injectée seule. On peut remarquer que les cellules endothéliales ingèrent le Triton WR-1339 et l'invertase, et donc, les lysosomes de ce type cellulaire sont affectés, et par le Triton WR-1339 et par l'invertase.

La cathepsine C localisée dans les cellules parenchymateuses, se trouve centrée sur des densités plus légères (1,12 g/ml) que pour le gradient témoin (1,20 g/ml) mais identiques au gradient Triton WR-1339 seul (Tableau 12); alors que l'arylsulfatase et l'invertase présentent, toutes deux une distribution identique, dans une région du gradient où la densité est de l'ordre de 1,19 g/ml. Cette valeur est plus faible que si seule l'invertase est injectée

(1,25 g/ml). Ce type de gradient permet donc une séparation plus nette des deux types de lysosomes des cellules parenchymateuses et non parenchymateuses, sur base des enzymes marqueurs. La GP10D10 se trouve toujours répartie en trois populations, X' Y' et Z', mais l'importance relative de ces 3 fractions est modifiée par rapport au gradient Triton WR-1339 seul; la majeure partie de la GP10D10 se retrouve maintenant dans le fond du gradient à une densité d'environ 1,25 g/ml.

Nous avons établi un tableau qui reprend les scores approximatifs des enzymes de la matrice lysosomale, de la GP10D10, protéine de la membrane des lysosomes, et de l'invertase.

	X'	Y'	Y'Z'	Z'
GP10D10	+	+	+	++++
Arylsulfatase	±0	+	+++	+
Cathepsine C	+++	+	0	±0
Invertase	±0	+	+++	+

On pourrait donc supposer que X' appartient aux lysosomes des cellules parenchymateuses (le marqueur étant la cathepsine C), que Z' par exclusion, doit appartenir à des lysosomes de cellules non parenchymateuses ne contenant pas de cathepsine C. Ces derniers accumulent peu d'invertase et peu ou pas de Triton WR-1339 mais contiennent par contre beaucoup de GP10D10 et peu d'arylsulfatase. Y'Z' appartient aux cellules non parenchymateuses; il contient peu de GP10D10, très peu ou pas de cathepsine C mais beaucoup d'invertase et d'arylsulfatase. D'après les données de la littérature et les résultats immunocytochimiques que nous avons obtenus (voir plus loin), nous proposons que Y'Z' soit une population représentant les lysosomes des cellules endothéliales où l'invertase s'accumule surtout et que Z', représenterait peut-être les lysosomes des cellules de Kupffer où on retrouve une faible proportion d'arylsulfatase et d'invertase, mais où on retrouve très peu de cathepsine C. Quant à Y', comme aucune localisation préférentielle ne peut être mise en évidence, il est impossible de se prononcer sur l'origine de ces structures, au moins à ce niveau.

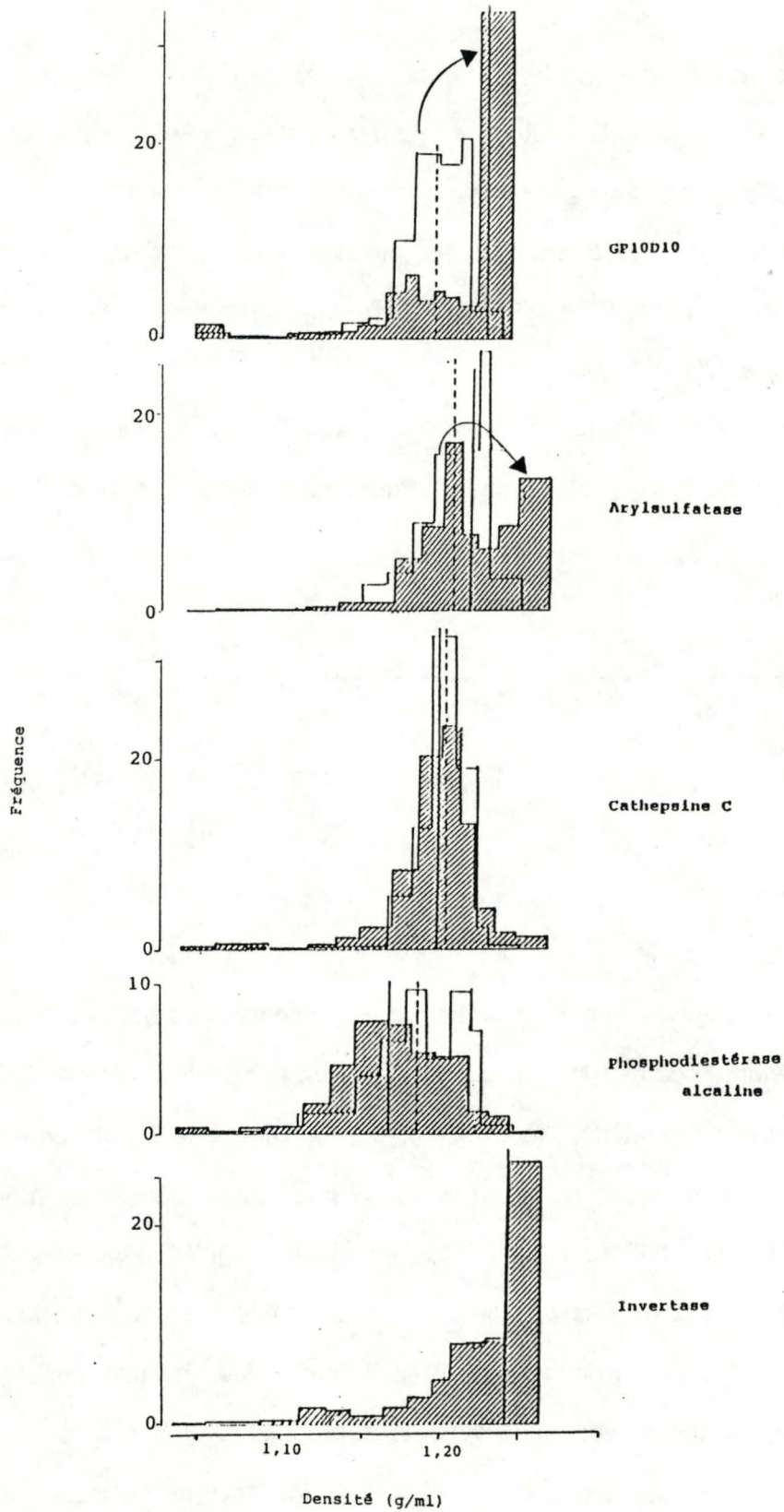


Fig. 49 : Comparaison des figures 44 et 46.

Gradient témoin et invertase (3 H).

Le profil obtenu pour le gradient témoin est représenté en clair et le trait pointillé correspond aux densités médianes et aux densités moyennes des distributions plurimodales.

Le profil obtenu pour le gradient invertase (3 H) est représenté en ombré (//) et le trait plein correspond aux densités médianes et aux densités moyennes des distributions plurimodales.

Les flèches indiquent l'effet de l'invertase.

4.6. COMPARAISON DES DISTRIBUTIONS OBTENUES SUR LES DIFFERENTS GRADIENTS.

Nous avons voulu faciliter la perception des résultats par la comparaison des différents gradients entre eux. Les comparaisons suivantes devraient nous permettre de mettre en évidence les déplacements de la GP10D10 sous l'effet du Triton WR-1339 ou de l'invertase. Nous tenterons ainsi tirer des conclusions plus précises quant à la localisation de cette glycoprotéine et déterminer à quel type cellulaire appartiennent les 3 populations de structures qui contiennent la GP10D10 dans leur membrane.

Nous comparerons les gradients suivants :

- 1) témoin / invertase (3 H) (fig. 49)
- 2) témoin / Triton WR-1339 (fig. 50)
- 3) invertase (3 H) / Triton WR-1339 et invertase (15 H) (fig. 51)
- 4) Triton WR-1339 / Triton WR-1339 et invertase (15 H) (fig. 52)

4.6.1. Témoin / invertase (3 H) (fig. 49).

La distribution de la cathepsine C ne montre aucune modification en présence d'invertase; Cette observation est en accord avec le fait que l'invertase ne s'accumule pas ou peu dans les lysosomes des cellules parenchymateuses (15).

Le profil de distribution de l'arylsulfatase montre une distribution monomodale en absence d'invertase, qui devient bimodale après 3 H d'injection. Les deux pics correspondent à deux types de lysosomes. Une fraction s'est alourdie suite à l'accumulation d'invertase et l'autre fraction est composée de lysosomes qui n'ont pas encore été touchés par la présence d'invertase et/ou de lysosomes de cellules parenchymateuses qui ne sont pas modifiés par la présence de l'invertase.

La phosphodiesterase alcaline ne présente aucun changement suite à la présence de l'invertase.

La distribution de la GP10D10 montre un glissement très net vers les plus fortes densités du gradient; ceci laisse supposer que la GP10D10 présente une localisation essentiellement non parenchymateuse.

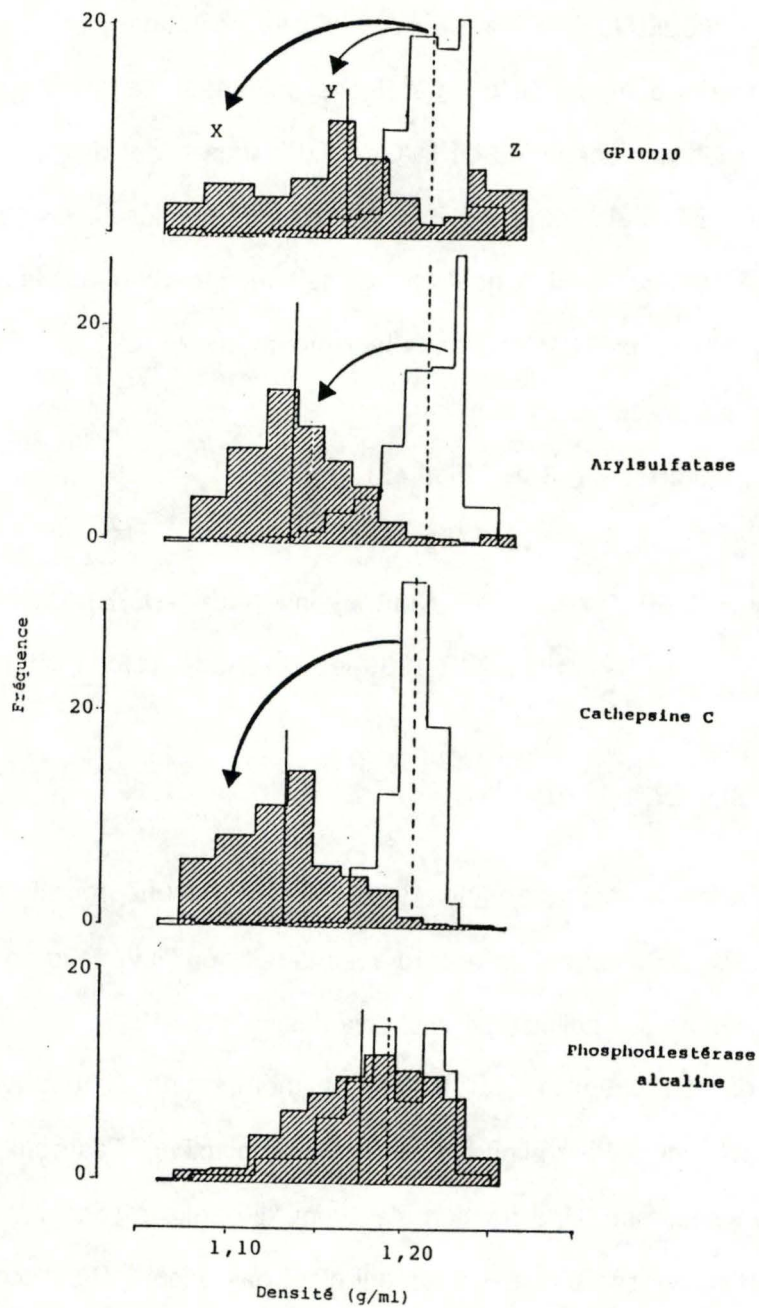


Fig. 50 : Comparaison des figures 44 et 47.

Gradient témoin et Triton WR-1339 (4 jours).

Le profil obtenu pour le gradient témoin est représenté en clair et le trait pointillé correspond aux densités médianes et aux densités moyennes des distributions plurimodales.

Le profil obtenu pour le gradient Triton WR-1339 (4 jours) est représenté en ombré (//////) et le trait plein correspond aux densités médianes et aux densités moyennes des distributions plurimodales. X, Y et Z correspondent aux densités moyennes des distributions plurimodales. X, Y et Z correspondent aux trois populations mises en évidence dans le profil de distribution de la GP10D10 par l'injection du Triton WR-1339.

Les flèches indiquent l'effet du Triton.

4.6.2. Témoin / Triton WR-1339 (fig. 50).

Sous l'effet du Triton WR-1339, on observe un allègement des lysosomes des cellules non parenchymateuses et parenchymateuses; en effet les distributions de l'arylsulfatase et de la cathepsine C montrent un glissement vers les plus faibles densités du gradient.

La GP10D10, qui présente une distribution monomodale en l'absence du Triton WR-1339, se répartit en présence de celui-ci en 3 populations qui contiennent la glycoprotéine en proportion variable. Une partie des lysosomes centrés sur les densités de 1,20 - 1,21 g/ml du gradient témoin se déplace, en présence du Triton WR-1339, vers les densités légères du gradient (X). On retrouve une deuxième population de lysosomes dans les densités intermédiaires (Y) et enfin, une troisième qui reste sur place (Z). Il est assez difficile d'attribuer ces structures à l'un ou l'autre type cellulaire. La comparaison du profil obtenu en présence de Triton WR-1339 ne nous éclaire pas plus sur l'origine de ces structures mais bien sur leur diversité.

Le Triton WR-1339 n'a aucune influence sur la phosphodiesterase alcaline car les profils de distribution obtenus en présence ou en absence de détergent se superposent.

4.6.3. Invertase (3 H) / Triton WR-1339 / invertase (15 H) (fig. 51).

Sous l'effet du Triton WR-1339, la cathepsine C migre d'une densité de 1,21 à 1,10 g/ml; ceci signifie que les cellules parenchymateuses sont allégées par le Triton WR-1339 qu'elles accumulent.

L'arylsulfatase présente aussi un déplacement sous l'effet du Triton WR-1339.; les plus fortes densités (1,25 g/ml) migrent vers une densité de 1,20 g/ml et correspondent aux cellules non parenchymateuses. On peut également observer qu'une partie des lysosomes présents aux alentours de 1,20 g/ml en présence d'invertase, migre sous l'effet conjoint du Triton WR-1339 et de l'invertase vers les régions de 1,14 g/ml, densité qui correspond à un pic de la cathepsine C; cette population lysosomale pourrait donc être associée à des cellules parenchymateuses.

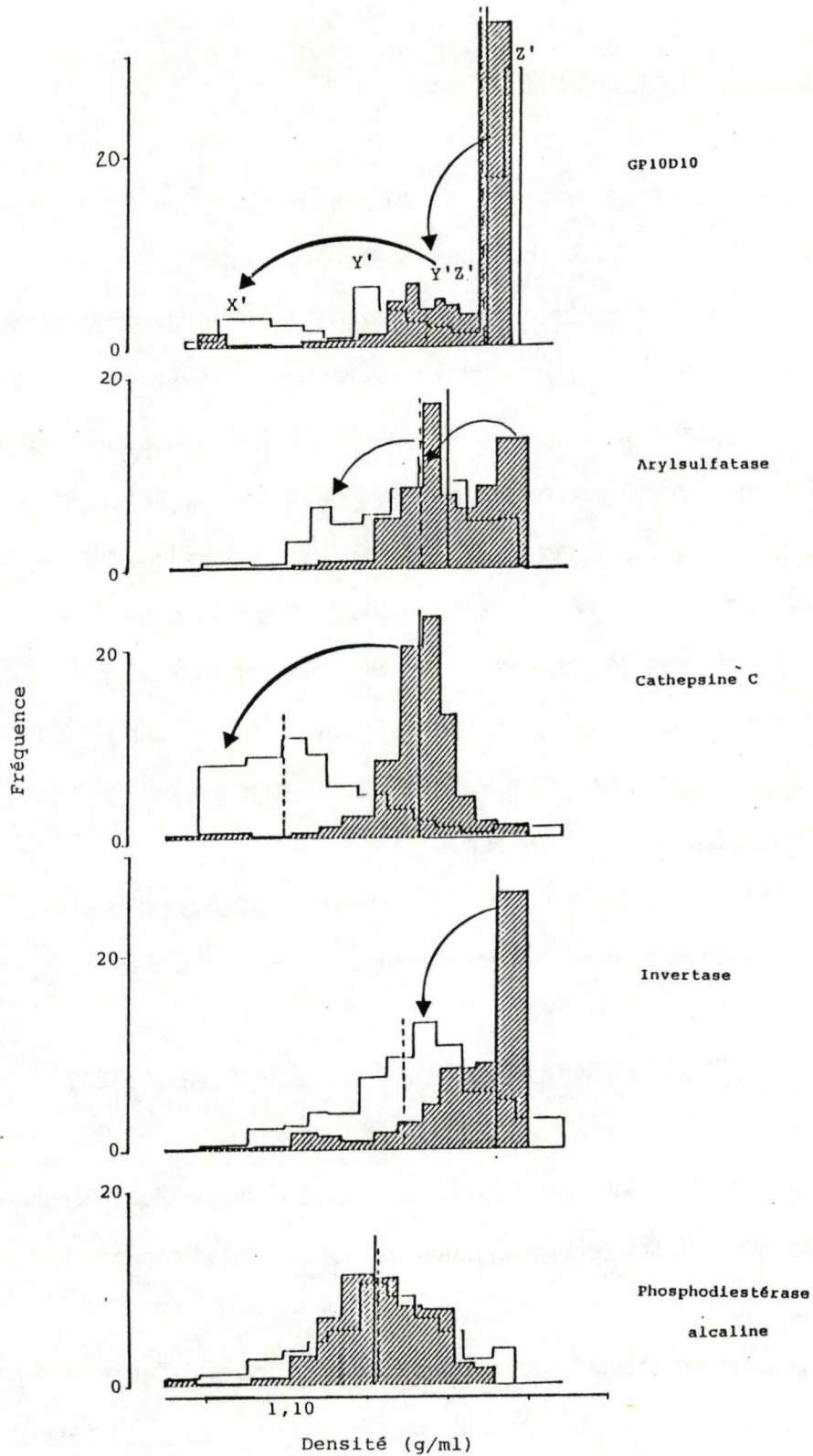


Fig. 51 : Comparaison des figures 46 et 48.

Gradient invertase (3 H) et Triton WR-1339 / Invertase

Le profil obtenu pour le gradient Triton WR-1339 / Invertase est représenté en clair et le trait pointillé correspond aux densités médianes et aux densités moyennes des distributions plurimodales. X', Y', Y'Z' et Z' correspondent aux populations mises en évidence dans le profil de la distribution de la GP10D10 par l'injection de Triton WR-1339 et d'invertase.

Le profil obtenu pour le gradient invertase (3 H) est représenté en ombré (//) et le trait plein correspond aux densités médianes et aux densités moyennes des distributions plurimodales.

Les flèches représentent l'effet du Triton WR-1339.

La GP10D10 qui s'accumule dans les régions de forte densité du gradient en présence d'invertase, voit sa distribution éclater en 3 pics lorsque le Triton WR-1339 est présent; ces 3 pics correspondant à 3 populations de structures membranaires contenant la glycoprotéine.

Une partie des structures reste dans le fond du gradient et n'est pas touchée par le Triton WR-1339 (Z'); on les attribue à des cellules non parenchymateuses. Une autre partie est fortement allégée et se situe dans les régions de faible densité où on retrouve également la cathepsine C; il s'agit sans aucun doute de structures présentes dans des cellules parenchymateuses (X').

Un pic intermédiaire est aussi présent (Y'), ces structures sont moins influencées par le Triton WR-1339 et se retrouvent aux densités 1,15 - 1,16 g/ml du gradient. Il est difficile de déterminer de manière précise l'origine de ces structures intermédiaires.

Enfin, (X'Y') apparaît sous l'effet combiné du Triton WR-1339 et de l'invertase et provient des cellules endothéliales qui accumulent préférentiellement l'invertase.

La distribution de la phosphodiesterase alcaline ne présente pas de changement significatif si le Triton WR-1339 est présent.

4.6.4. Triton WR-1339 / Triton WR-1339 et invertase (15 H) (figure 52).

La comparaison des gradients Triton WR-1339 / Triton WR-1339 et invertase, nous permet de visualiser l'effet de l'invertase indiqué par les flèches.

La distribution de la cathepsine C ne présente aucune modification en présence de l'invertase; ceci signifie que les lysosomes des cellules parenchymateuses ne sont pas influencés par l'injection d'invertase.

Une partie de l'arylsulfatase subit par contre, un déplacement important vers les fortes densités du gradient lorsque l'invertase est présente. Une partie de l'arylsulfatase reste sur place dans ces conditions et appartient aux cellules parenchymateuses. Ceci nous permet de supposer que le pic unique observé pour l'arylsulfatase en présence du Triton WR-1339 seul correspond à deux populations de lysosomes. Une population peut être

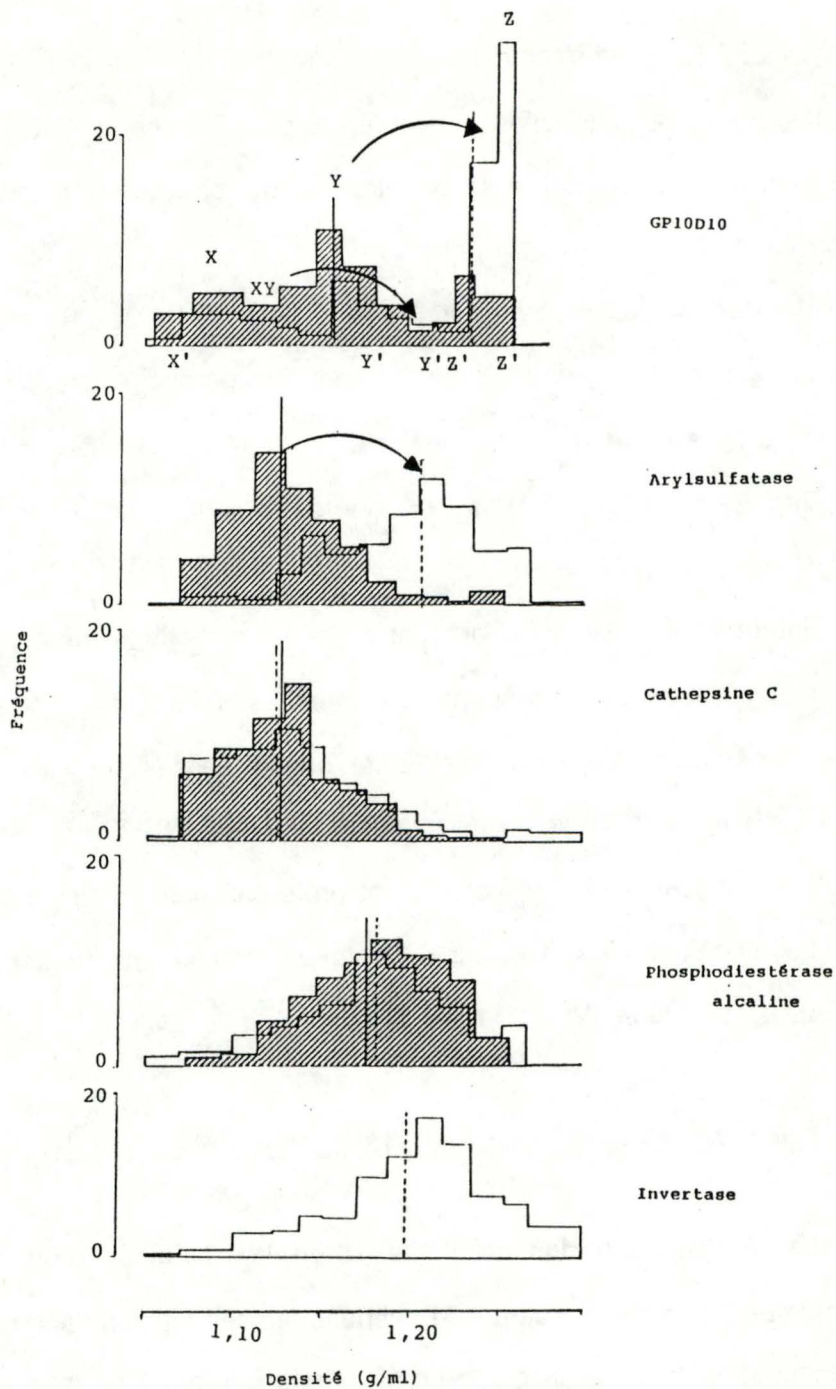


Fig. 52 : Comparaison des figures 47 et 48.

Gradient Triton WR-1339 et Triton WR-1339 / invertase.

Le profil obtenu pour le gradient Triton WR-1339 / Invertase est représenté en clair et le trait pointillé correspond aux densités médianes et aux densités moyennes des distributions plurimodales. X', Y', Y'Z' et Z' correspondent aux populations mises en évidence dans le profil de la distribution de la GP10D10 par l'injection de Triton WR-1339 et d'invertase.

Le profil obtenu pour le gradient Triton WR-1339 (4 jours) est représenté en ombré (//) et le trait plein correspond aux densités médianes et aux densités moyennes des distributions plurimodales.

X, Y et Z correspondent aux trois populations mises en évidence dans le profil de distribution de la GP10D10 par l'injection du Triton WR-1339.

Les flèches représentent l'effet de l'invertase.

associée aux cellules parenchymateuses; ces lysosomes ne sont pas déplacés en présence d'invertase.

La seconde population de lysosomes serait associée aux cellules non parenchymateuses; ces lysosomes seraient déplacés en présence de l'invertase et on les retrouve aux plus fortes densités du gradient. L'invertase qui, en présence de Triton WR-1339, se situe aux environs de 1,21 g/ml.

La distribution de la phosphodiesterase alcaline, marqueur des membranes plasmiques, ne montre aucun changement. L'invertase injectée ne modifie donc pas la densité de la membrane plasmique en gradient de saccharose.

Les modifications subies par la GP10D10 sous l'effet de l'invertase se résument plus aisément dans le tableau suivant :

Triton WR-1339	Triton WR-1339/ invertase	Effet de l'invertase sur			contenu en Inv.	Teneur en GP10D10	Type de cellule
		les structures contenant :					
		GP10D10	Cath. C	Aryls.			
X	= X'	0	0		±0	+	Parenchymateuse
Y	= Y'	0	0		0	+	Parenchymateuse
Y	→ Z'	+		+	+	++++	Non Parenchymat
XY	→ Y'Z'			+	++++	+	Endothéliale
Z	= Z'	0	0	+	+	++++	Non Parenchymat

Dans ce tableau, nous avons utilisé les abréviations suivantes pour représenter les différentes enzymes : Cath. C pour la cathepsine C, Aryls. pour l'arylsulfatase et Inv. pour l'invertase.

Les flèches indiquent les déplacements des populations contenant la GP10D10 sur un gradient, déplacements dûs à l'injection d'invertase; nous utilisons le signe '=' lorsqu'aucun déplacement n'a lieu en présence d'invertase.

L'étude de l'effet de l'invertase sur le déplacement des structures permet de localiser celle-ci dans un type cellulaire déterminé. Les arguments utilisés pour déterminer cette

localisation sont les suivants : - lorsque l'invertase provoque un déplacement, les structures appartiennent aux cellules non parenchymateuses; si le contenu en invertase est fort important, il s'agit de cellules endothéliales (voir microscopie).

- lorsque l'invertase ne provoque aucun changement de la distribution des structures, celles-ci sont contenues dans les cellules parenchymateuses.

4.7. CONCLUSIONS GENERALES DES RESULTATS BIOCHIMIQUES.

1. La GP10D10 est associée aux lysosomes du foie de rat mais non à la membrane plasmique. Une faible proportion pourrait correspondre soit à des éléments du Golgi, soit aux endosomes (gradient contrôle).
2. La GP10D10 est en majeure partie associée aux cellules non parenchymateuses et secondairement aux cellules parenchymateuses. Une faible proportion serait associée soit au Golgi soit aux endosomes (gradient invertase).
3. La GP10D10 est présente dans au moins 4 types de structures membranaires différentes (gradient Triton WR-1339).
4. La GP10D10 est présente sur les lysosomes des cellules parenchymateuses (X' et Y' partiellement) et non parenchymateuses (Y' partiellement et Z'); sur les lysosomes des cellules endothéliales (Y'Z'), pauvres en GP10D10 (gradient Triton WR-1339 et Invertase).

Le dosage de la GP10D10 est donc à même de révéler une hétérogénéité des lysosomes du foie de rat que les activités de l'arylsulfatase et de la cathepsine C ne soit pas à même de révéler.

Titration de poly-sérum de lapin anti-invertase.

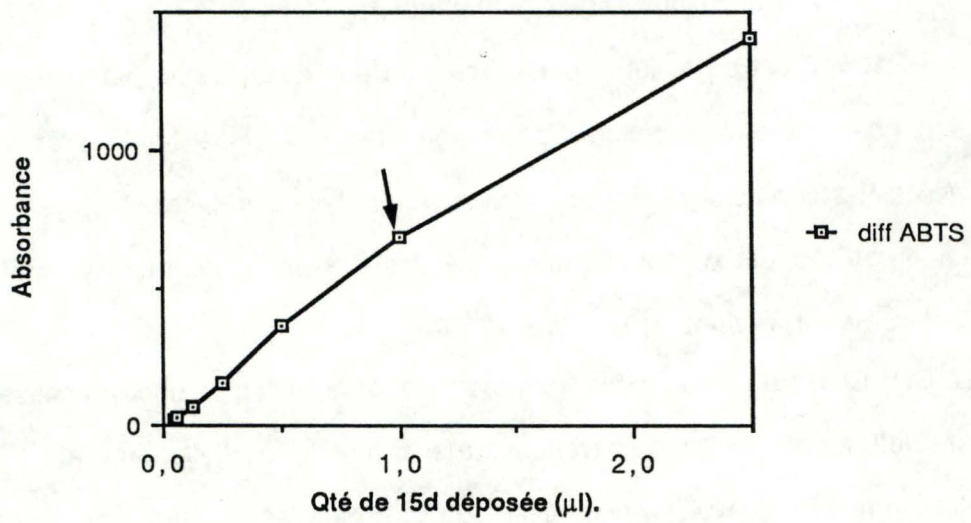


Fig. 53 : Titration du 15d, anticorps anti-invertase par ELISA , sur Titertek(Flow), où sont préadsorbés 5µg d'invertase par puit.

PARTIE 5. LOCALISATION IMMUNOCYTOCHIMIQUE DE LA GP10D10.

5.1. INTRODUCTION.

Nous avons tenté de localiser la GP10D10 par immunocytochimie; cette approche morphologique est complémentaire à l'approche biochimique réalisée dans les premières parties du travail.

En comparant les observations obtenues, nous pouvons vérifier si ces deux approches donnent une localisation similaire pour la glycoprotéine.

Une expérience de double marquage a été réalisée sur des coupes à congélation de foie de rat ayant reçu une injection d'invertase, par le docteur P.J. Courtoy et C. Slomianny, qui ont localisé en même temps l'invertase injectée et la GP10D10. Les anticorps utilisés sont le 15 d, anticorps anti-invertase purifiée et le 10D10-B, anticorps dirigé contre les membranes lysosomales purifiées.

Les expériences en immunoperoxydase ont été entreprises par S. Wattiaux-De Coninck, M.J. Dehassé et M.F. Six, afin de localiser d'une part la GP10D10 avec de l'anticorps 10D10 purifié et de l'anticorps 10D10-B, et d'autre part, l'invertase injectée avec du 15 d, anticorps anti-invertase purifiée.

5.2. LES ANTICORPS UTILISES.

5.2.1. Caractéristiques de ces anticorps.

Le 15 d, anticorps anti-invertase purifiée sur colonne d'affinité par William Duque Castrillon de Jesus, a été utilisé afin de localiser l'invertase. Cet anticorps a été titré par ELISA sur de l'invertase adsorbée sur fond des puits de boîtes Titertek (Flow), à raison de 5 µg d'invertase par puit, ceci afin de déterminer la dilution à employer. La courbe obtenue se trouve à la figure 53 et la dilution choisie est de 1/50.

Tableau 13 : Epuisement de l'anticorps.

15d. anticorps anti-invertase (dil 1/20).

non traité.

épuisé par adsorption
sur de l'invertase.

1824-72 = 1751

68-81 = 13

10D10-B. anticorps anti-membranes de lysosomes purifiés (dil 1/50).

non traité.

épuisé par adsorption
sur des membranes de
lysosomes.

1845-175 = 1669

267-89 = 178

Protocole : Test Elisa et Elisa modifié pour le 10D10-B réalisé en vue de vérifier si l'épuisement des solutions contenant le 15d et le 10D10-B s'est réalisé de manière adéquate. Le test Elisa pour le 15d s'est réalisé en déposant 50 µl de la solution contenant l'anticorps épuisé ou non, sur le fond de puits Titertek (Flow) où sont préadsorbés en absence de poly-L-lysine, 50 µl d'invertase (1 mg/ml).

Le test Elisa pour le 10D10-B s'est réalisé en déposant 50 µl de la solution contenant l'anticorps épuisé ou non sur le fond de puits Titertek (Flow) où sont préadsorbées en absence de poly-L-lysine 2 µg de protéines de membranes lysosomales, 1 nuit à 4°C.

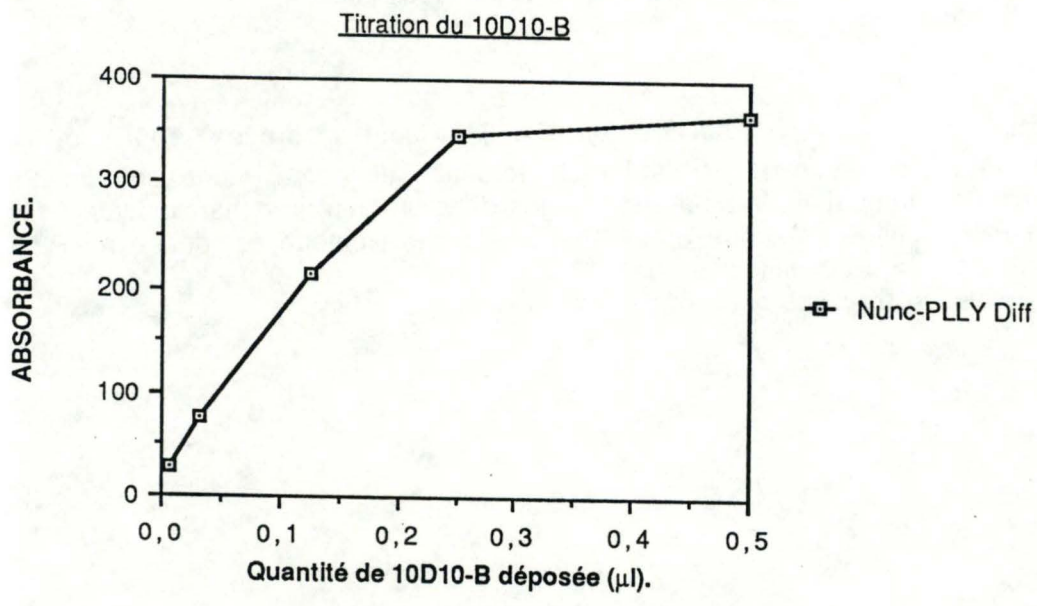


Fig. 54 : Titration du 10D10-B utilisé pour les travaux en immunofluorescence. Cette titration est réalisée sur High Binding (Nunc) où sont adsorbées 2µg de protéines de la membrane lysosomale en absence de poly-L-lysine. La dilution de l'avidine peroxydase utilisée pour révéler ce test est de 1/6400.

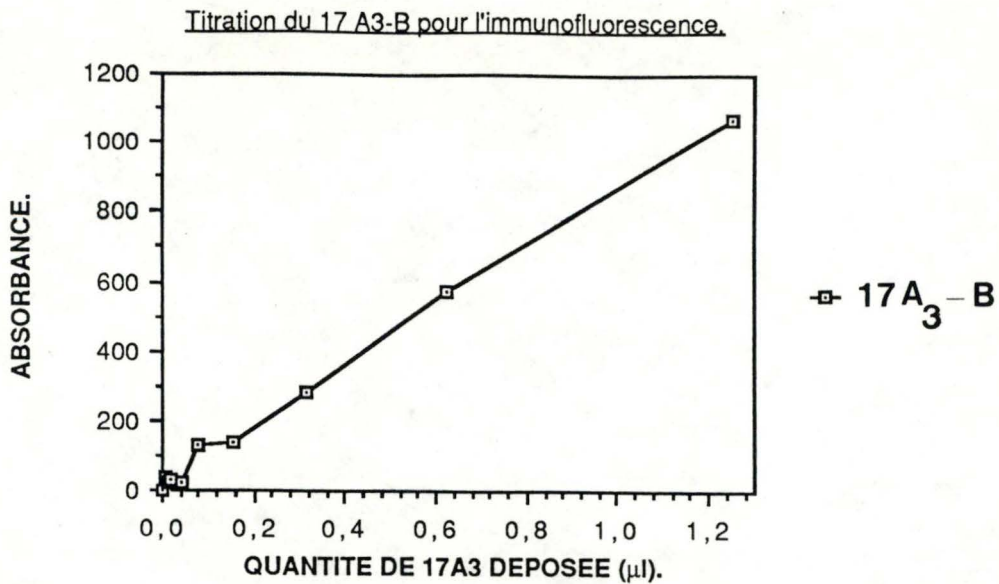


Fig.55 : Titration du 17 A₃ -B sur Titertek (Flow) où sont adsorbées 100 µl de cellules bovines (à raison de 510⁶/ml) en présence de poly-L-lysine pendant 30 min. Après centrifugation, la boîte est plongée dans un bain de glutaraldéhyde (1% dans le PBS) ; elle est vidée après 10 minutes et la plaque est rincée au PBS, puis saturée au PBS ovalbumine. La solution d'avidine peroxydase a été diluée 1/800 fois.

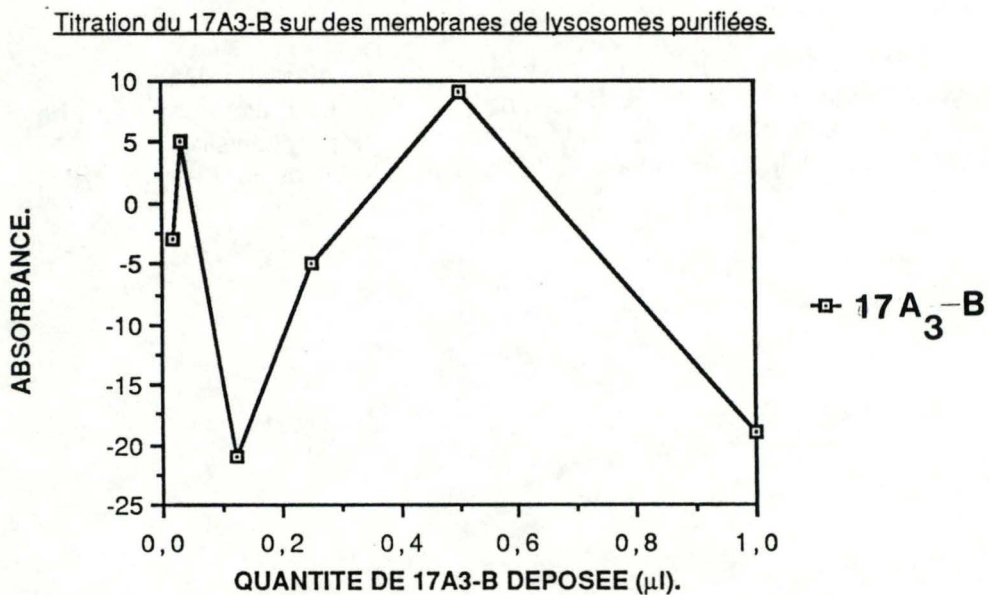


Fig. 56 : Titration du 17 A₃ -B sur Titertek (Flow) où sont adsorbées 2µg de protéines de membranes lysosomales (Lys III) en absence de poly-L-lysine. La solution d'avidine peroxydase a été diluée 1/800 fois.

Différents contrôles ont été réalisés, notamment un contrôle où le 15 d utilisé a été auparavant adsorbé 1 heure avec de l'invertase purifiée de sorte que l'anticorps soit épuisé. Cet anticorps épuisé est alors testé par ELISA en même temps que le 15 d, dans les mêmes conditions. La comparaison des valeurs obtenues pour une même dilution (1/20) nous permet d'affirmer que la préparation est bien épuisée (cfr. tableau 13).

Le 10D10-B a été utilisé pour localiser la GP10D10 et sa courbe de titration a été réalisée afin de déterminer la dilution à utiliser (figure 54).

Différents contrôles ont également été préparés : un anticorps non spécifique, le 17 A₃, dirigé contre la membrane plasmique de cellules de boeuf lymphocytes et plasmocytes, a été biotinylé. La courbe de titration du 17 A₃-B sur des cellules bovines fixées en présence de poly-L-lysine sur une boîte Titertek (Flow) se trouve à la figure 55; son caractère non spécifique par rapport aux membranes lysosomales est montré à la figure 56 par la titration du 17 A₃-B sur des membranes de lysosomes purifiées.

Le 10D10-B a été épuisé contre des membranes de lysosomes purifiées (détails expérimentaux dans l'appendice technique). La comparaison des valeurs obtenues, pour une même dilution (1/50) et dans des conditions identiques lors du test ELISA réalisé avec du 10D10-B épuisé et non épuisé (tableau 13), nous permet d'affirmer que le 10D10-B est bien épuisé dans la préparation.

5.2.2. En immunofluorescence sur coupes à congélation.

Le 15 d purifié sur colonne d'affinité a été utilisé à la dilution 1/50.

Le 15 d épuisé par adsorption sur de l'invertase a servi de contrôle.

Le 10D10-B a été utilisé à la dilution 1/100.

5.2.3. En immunoperoxydase sur coupes Smith et Farquahr.

Le 15 d purifié sur colonnes d'affinité a été utilisé à la dilution de 1/20.

Le 15 d épuisé par adsorption sur de l'invertase a été préparé pour servir de contrôle.

Le 10D10 purifié a été utilisé à la dilution de 1/10 et le 8 C11, un autre anticorps non spécifique, dirigé contre la membrane plasmique de cellules bovines, a été utilisé comme contrôle.

Le 10D10-B a été utilisé à la dilution 1/50; sa courbe de titration se trouve à la figure 54.

Le 17 A3 biotinylé a servi de contrôle.

5.3. LES RESULTATS.

5.3.1. Immunofluorescence sur coupes à congélation.

Planche 1 : Coupe à congélation de foie de rat, de 0,5 μm d'épaisseur, pour l'immunofluorescence.

Le 15 d, anticorps anti-invertase, est utilisé; il est reconnu par un anticorps de porc anti-lapin couplé à la rhodamine.

Agrandissement final : 1228 fois.

Le rat a reçu une injection d'invertase (0,9 mg/100 g de poids corporel) pendant 3 heures.

Le 15 d présente une localisation essentiellement endothéliale. La flèche 1 met en évidence le marquage très net qui s'effectue par endroit, de manière ponctuée.

La présence d'invertase est aussi à remarquer dans les cellules de Kupffer; c'est ce qu'indique la flèche 2. Cependant, le signal lumineux y est plus diffus; cela témoigne d'une moins grande concentration en invertase dans ces cellules.

On ne peut ignorer le signal lumineux présent dans les hépatocytes, bien que celui-ci soit beaucoup moins important que dans les autres types cellulaires.

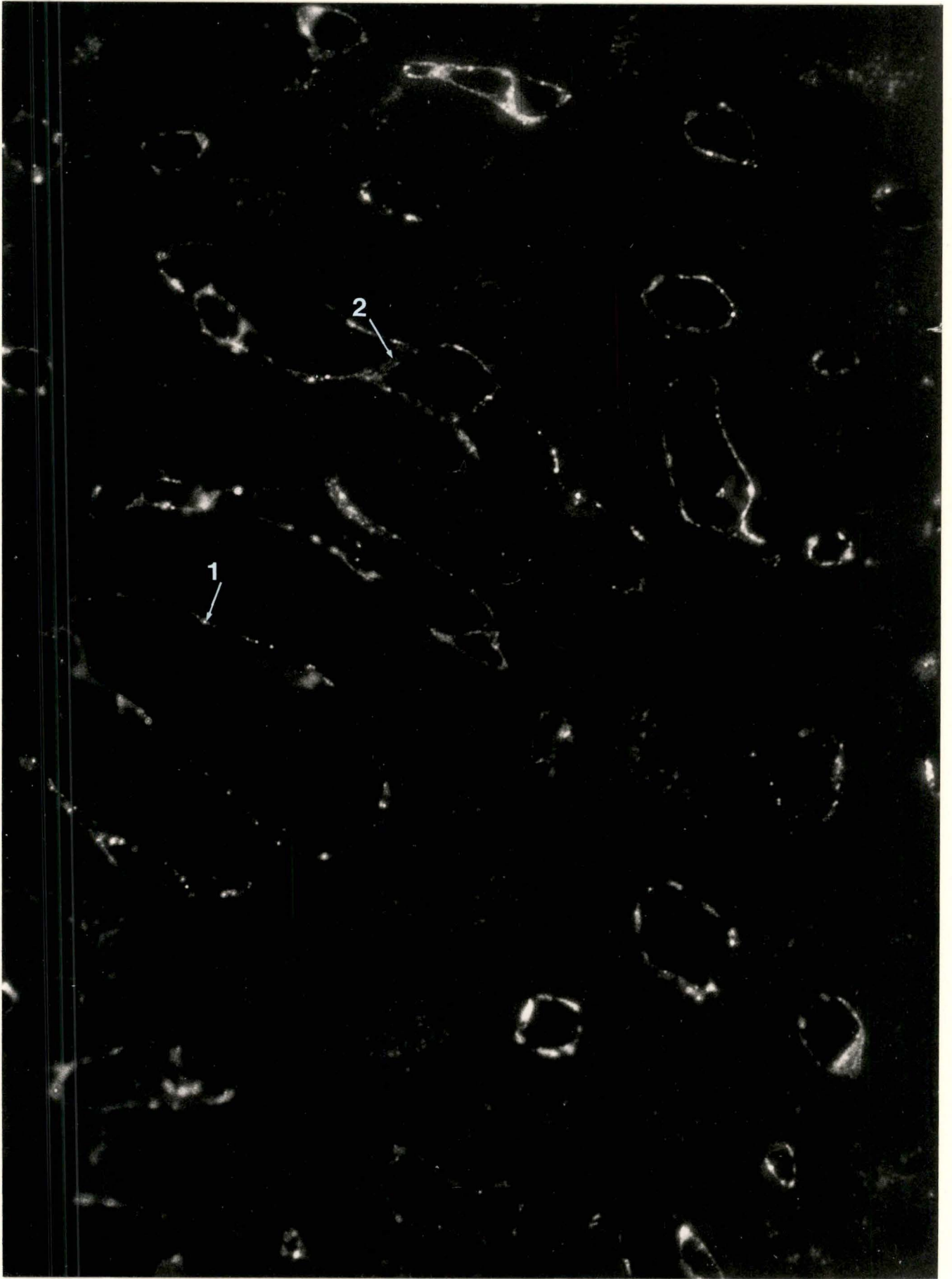


Planche 2 : Coupe à congélation de foie de rat de 0,5 μm d'épaisseur utilisée pour le double marquage en immunofluorescence : anticorps anti-membranes de lysosomes purifiés, 10D10-B, reconnu par la streptavidine couplée à la fluorescéine et anticorps anti-invertase, 15 d, reconnu par un anticorps de porc anti-lapin couplé à la rhodamine.

Photo 1 : fluorescéine (10D10-B).

Photo 2 : rhodamine (15 d).

Sur la même coupe on a localisé l'invertase et la GP10D10.

Le rat a reçu une injection d'invertase de 0,9 mg/ 100 g de poids corporel.

Agrandissement final : 866 fois.

La photo 1 nous permet de localiser la GP10D10 dans les cellules endothéliales (flèche E), dans les cellules de Kupffer (flèche K) et dans les hépatocytes (flèche H).

Il est possible que la lipofuschine dans les hépatocytes interfèrent avec la lecture de la fluorescéine.

Les contrôles suivants ont été effectués : sérum non immun pour le 15 d; 10D10-B préincubé en présence de membranes lysosomales, monoclonal non apparenté (17 A₃-B) ou streptavidine couplée à la fluorescéine seule.

Dans le cas du contrôle invertase (15 d épuisé), aucun marquage en immunofluorescence n'est visible (second marquage à la rhodamine). Au contraire, lorsque on utilise la streptavidine couplée à la fluorescéine (contrôle 10D10-B), on constate nettement un marquage dans les hépatocytes; ce qui laisse suspecter une fluorescence endogène à attribuer probablement à la lipofuschine présente dans les lysosomes secondaires.

Il eut été intéressant d'inverser les seconds fluorophores pour vérifier ceci.

La photo 2 nous permet de confirmer les observations de la planche 1; on note la présence d'invertase dans les cellules endothéliales et de Kupffer essentiellement, ainsi que dans les hépatocytes mais en quantité moindre.

La comparaison de ces photos nous permet de constater que la GP10D10 et l'invertase ne sont pas localisées de manière identique. On peut très nettement repérer 3 types de structures qui contiennent les 2 antigènes en proportion différente.

Dans les cellules non parenchymateuses :

La flèche 1 pointe des structures riches et en GP10D10 et en invertase.

La flèche 2 indique des structures pauvres en invertase mais riches en GP10D10.

La flèche 3 montre des structures riches en invertase mais pauvres en GP10D10.

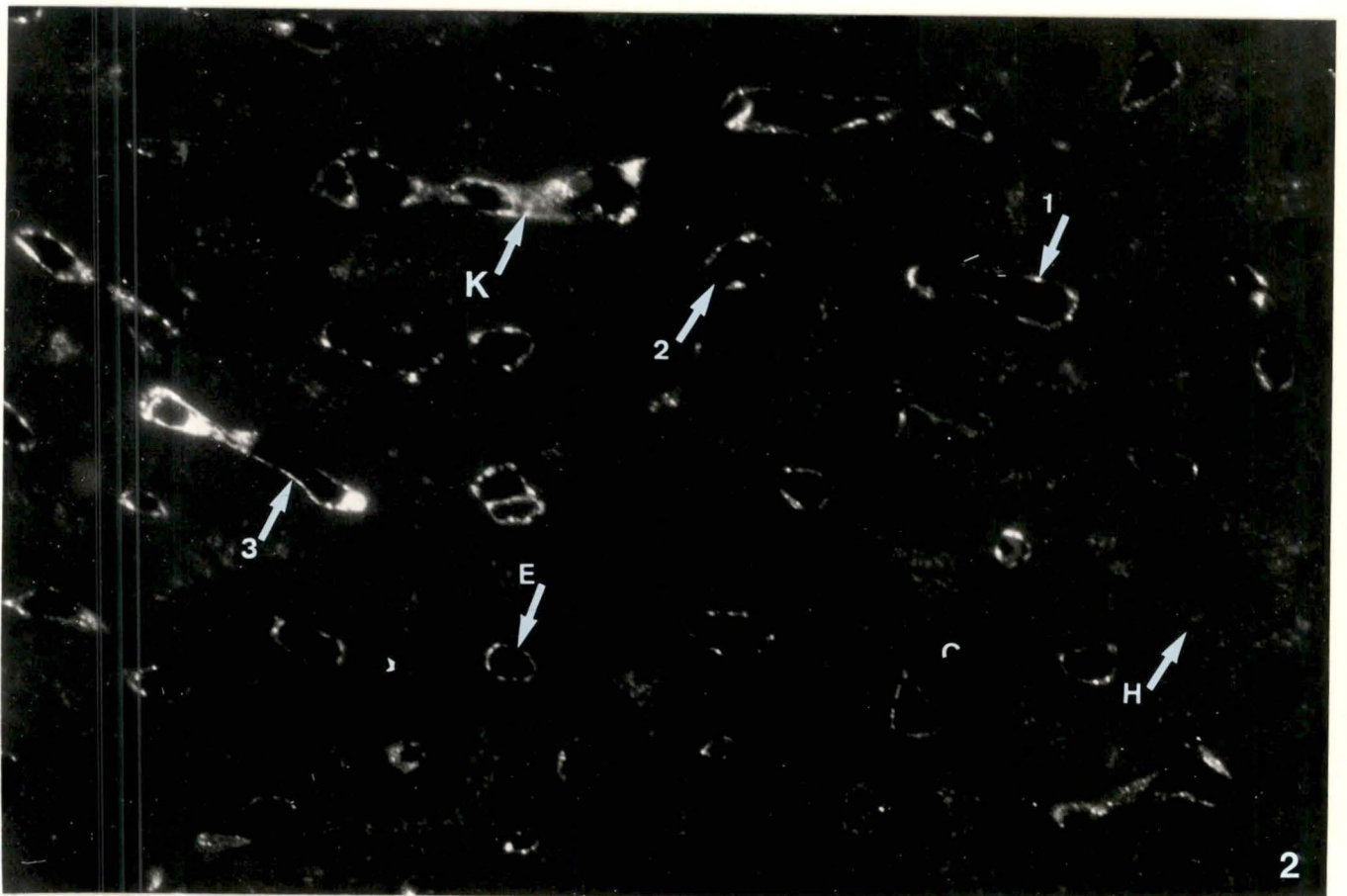
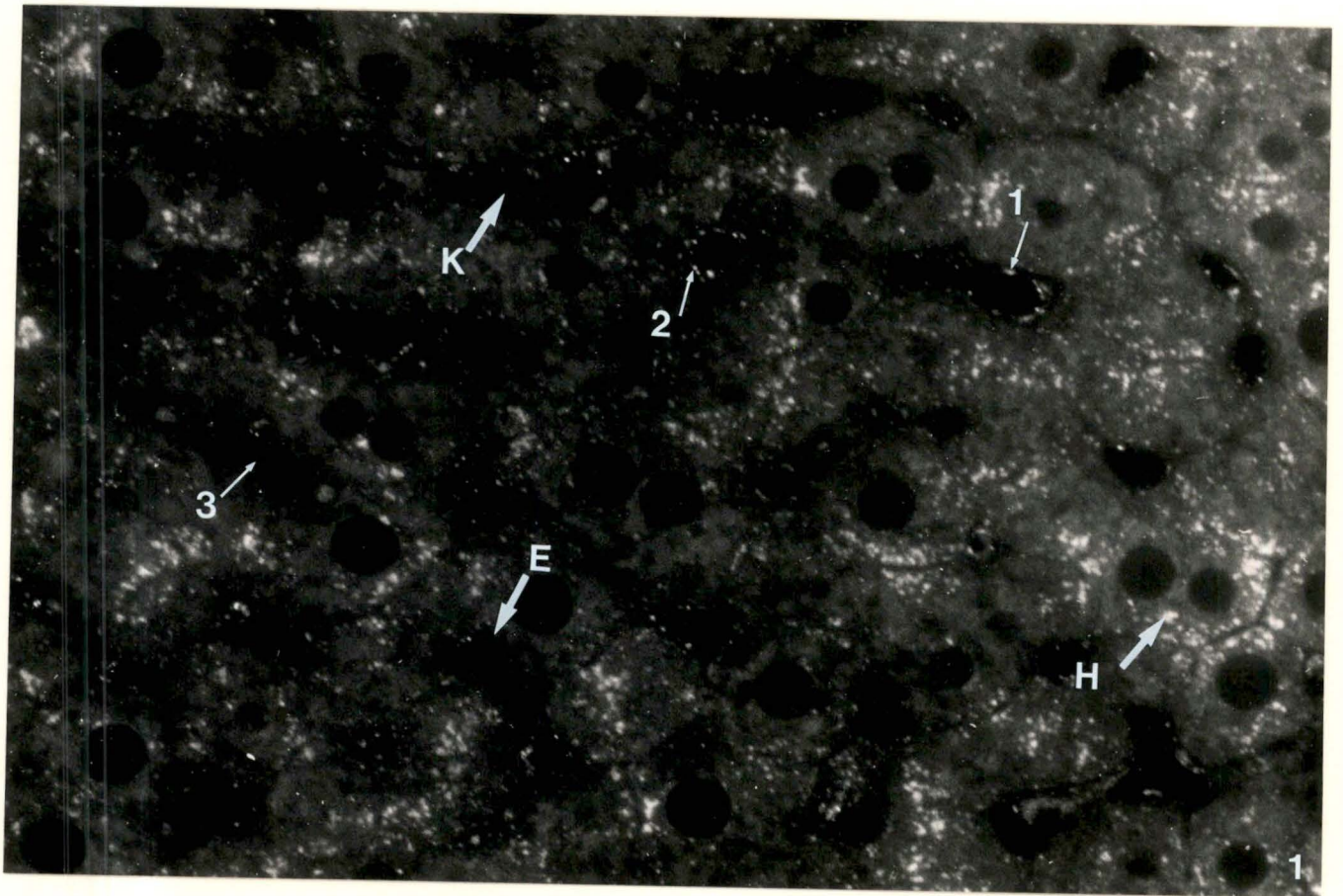


Planche 3 : Marquage de l'invertase et de la GP10D10 en immunoperoxydase, coupe de foie de rat au Smith & Farquahr (25 μ m d'épaisseur).

Le rat a reçu une injection d'invertase de 0.9 mg/100 g de poids corporel, durant 3 heures.

Photo 1 : le 15 d, anticorps anti-invertase, est utilisé; il est reconnu par des fragments Fab d'immunoglobuline anti-lapin, couplés à la peroxydase (Agrandissement : 1 444 fois).

Photos 2 & 3 : le 10D10, anticorps anti-membranes lysosomales purifiées est utilisé; il est ensuite reconnu par des fragments Fab d'immunoglobuline de lapin anti-souris couplés à la peroxydase. (Photo 2 : agrandissement 1 444 fois; photo 3 : agrandissement 3 611 fois).

Photo 4 : le 8C11, un anticorps anti-membrane plasmique de lymphocytes et de plasmocytes de boeuf, est utilisé comme anticorps non spécifique pour le contrôle (agrandissement 1 444 fois).

La photo 1 nous montre que le 15 d est localisé dans les cellules sinusoidales essentiellement; on ne note pas d'invertase dans les hépatocytes.

La photo 2 nous permet de constater la présence de 10D10 dans les cellules sinusoidales. On peut également retrouver le 10D10 dans les hépatocytes mais en concentration moindre.

La photo 3 montre en effet que le 10D10 est présent dans les hépatocytes sous forme de granulations très nettes; c'est ce que pointe la flèche.

La photo 4 est une photo contrôle qui nous permet de constater qu'il n'y a pas d'interférence lors de l'expérience.

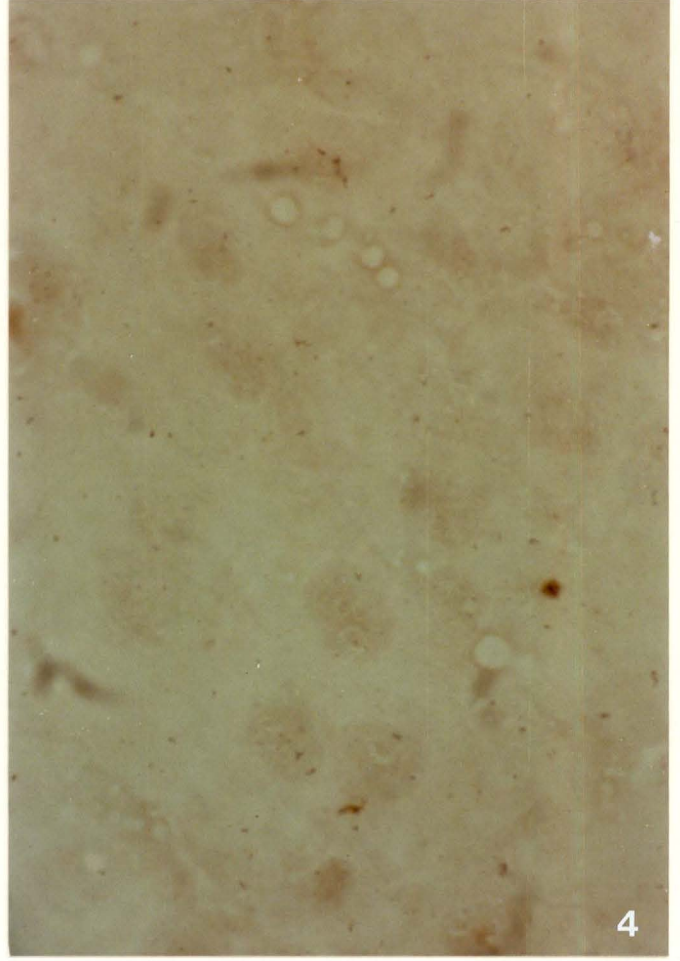
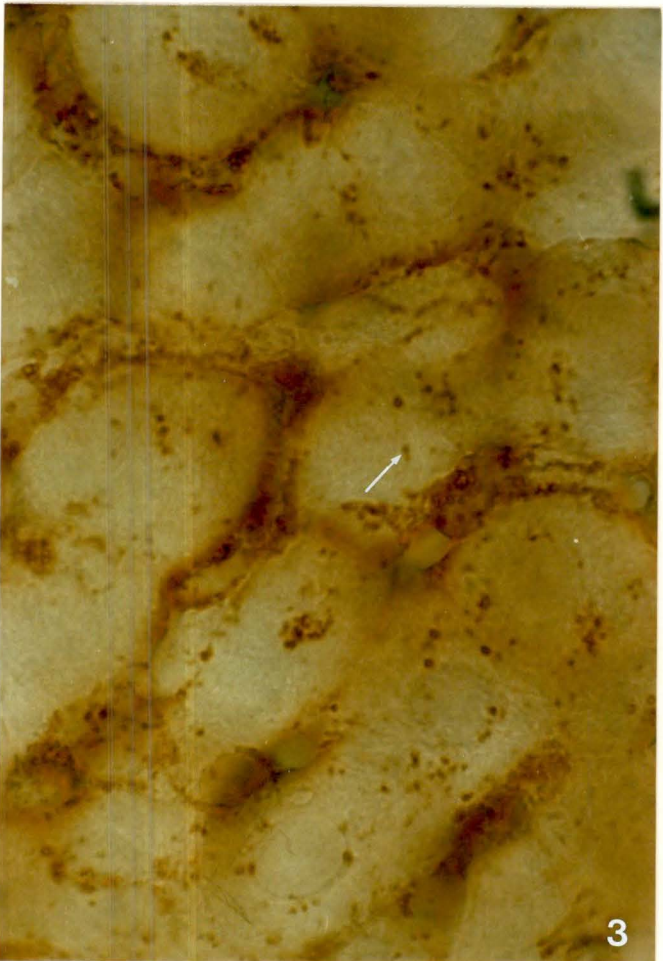
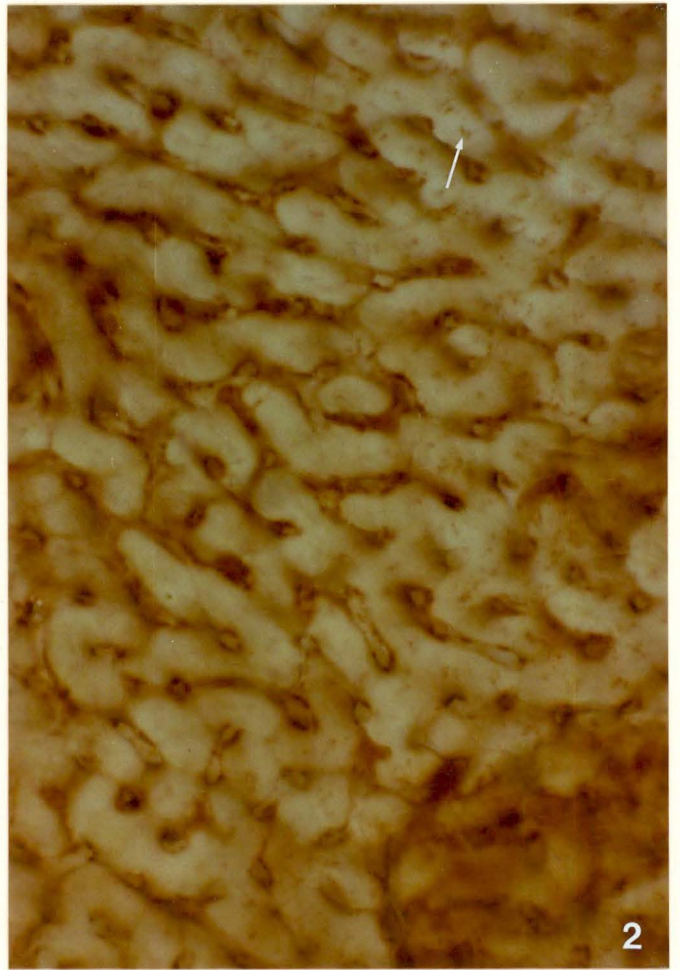
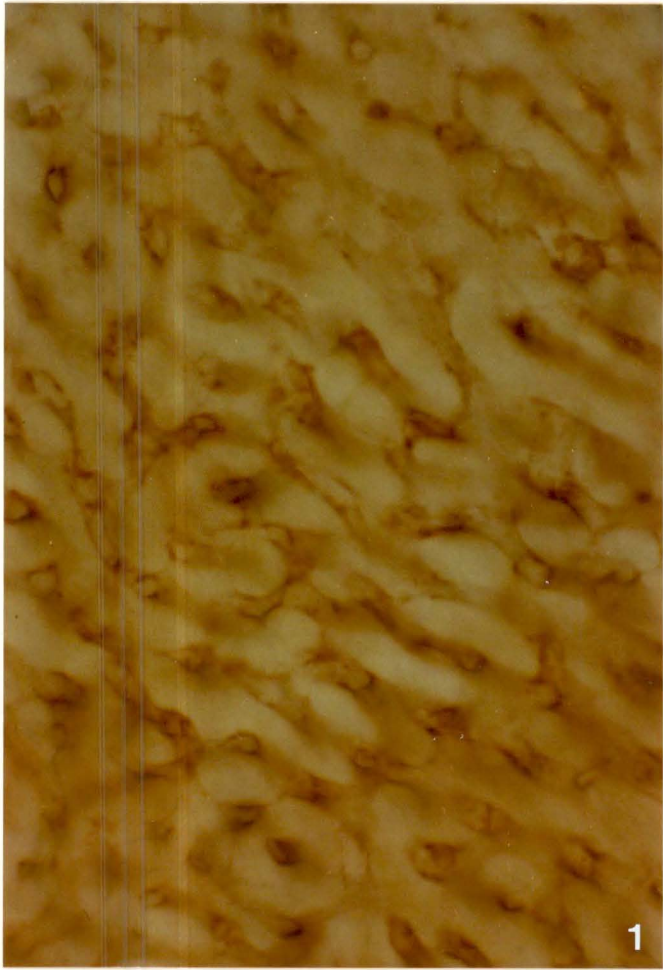


Planche 4 : Marquage de la GP10D10 en immunoperoxydase, coupe de foie de rat au Smith & Farquahr (25 μ m d'épaisseur).

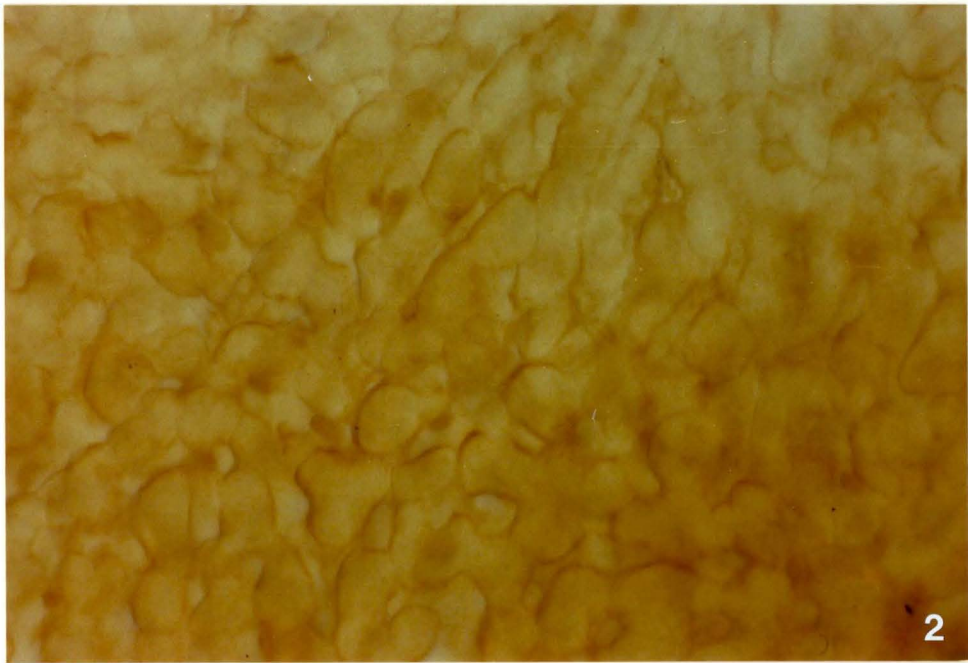
Photos 1 : l'anticorps 10D10-B, anticorps anti-membrane de lysosomes purifiés est déposé; il est ensuite reconnu par de l'avidine couplée à la peroxydase (agrandissement : 3 611 fois).

Photo 2 : Le 17 A₃-B, anticorps anti-membranes plasmiques de cellules boeuf, lymphocytes et plasmocytes, est utilisé comme contrôle (agrandissement : 1 444 fois).

On note une amplification du signal suite à l'utilisation des anticorps biotinylés.

Ces photos montrent une localisation pour la GP10D10 identique à celle déjà observée à la planche 4. Les granulations intrahépatocytaires sont également présentes.

La GP10D10 a également été localisées dans les hépatocytes en immunofluorescence (planche 2); le signal mesuré alors était très important par rapport à celui obtenu lors d'un marquage simple en immunoperoxydase. Bien que la précision de la technique soit plus grande qu'en immunoperoxydase, il est à remarquer que le signal enregistré à la planche 2 peut provenir d'une interférence lors de la mesure; interférence due à la lipofuschine présente dans les hépatocytes.



5.4. CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET CONFRONTATION DES RÉSULTATS BIOCHIMIQUES ET MORPHOLOGIQUES.

Au cours de la première partie de ce travail, nous avons mis au point le dosage quantitatif de la GP10D10, glycoprotéine de la membrane lysosomale, utilisant à cet effet l'anticorps monoclonal 10D10 (51). C'est à notre connaissance la première fois que ce type de résultat a été obtenu.

Les distributions en gradient de densité de la GP10D10 et des enzymes marqueurs, obtenues dans différentes conditions d'endocytose de l'invertase et du Triton WR-1339, nous ont permis de définir 5 populations de lysosomes porteurs de cette glycoprotéine : les hépatocytes, ainsi que les cellules non parenchymateuses, en présentent 2 et on attribue une 5^{ième} population aux cellules endothéliales.

L'immunoperoxydase (3 H d'invertase) en simple marquage localise la GP10D10 sur les cellules non parenchymateuses essentiellement, et sur les hépatocytes, en quantité moindre. Cette localisation coïncide avec celle de la biochimie (gradient 3 H invertase), qui attribue 60% de la GP10D10 aux lysosomes des cellules non parenchymateuses et 35% aux lysosomes des cellules parenchymateuses.

L'invertase a été localisée par la biochimie et l'immunoperoxydase en marquage simple dans les lysosomes des cellules non parenchymateuses uniquement; l'immunofluorescence la localise également dans les hépatocytes, ce qui n'est pas impossible car J. Thirion *et al.* (55) et Madnick *et al.* (57) ont montré que les hépatocytes pouvaient endocyter l'invertase.

Un double marquage en immunofluorescence, dont la précision est supérieure aux marquages simples, montre dans les cellules non parenchymateuses la présence de 4 structures qui contiennent la GP10D10 et l'invertase dans des proportions variables.

Dans les cellules endothéliales, un type de structure présente de la GP10D10 et de l'invertase; le second ne contient que de la GP10D10 et le troisième ne contient que de l'invertase.

La GP10D10 est aussi retrouvée dans les hépatocytes.

Les techniques biochimiques, lorsque le rat a reçu une injection d'invertase (3 H.), ne détectent la GP10D10 que dans deux types de structures.

Cependant, on observe 5 populations de structures contenant la GP10D10 lorsque le dosage a été réalisé sur des gradients de foie de rat ayant reçu une injection de Triton WR-1339 (4 jours) et d'invertase (15 H), en présence d'invertase, qui correspondent aux données morphologiques; on pourrait en effet associer X' aux hépatocytes, Y'Z' aux cellules endothéliales. Dans les cellules non parenchymateuses, on trouve Y' qui contient de l'invertase et de la GP10D10 alors que Z' contient beaucoup de GP10D10 et peu d'invertase. La GP10D10, protéine de la membrane lysosomale est donc, tous résultats confondus, associés surtout aux lysosomes des cellules non parenchymateuses, cellules de Kupffer et cellules endothéliales dans lesquelles plusieurs populations sont à remarquer. La GP10D10 de la membrane lysosomale de foie de rat est donc un outil plus fin que les localisations enzymatiques de l'arylsulfatase et de la cathepsine C pour mettre en évidence les différents types de lysosomes du foie de rat.

Il serait intéressant de compléter les résultats biochimiques dans les conditions d'endocytose (engorgement des lysosomes par des substances pas ou peu digestes), par la mesure d'autres enzymes des lysosomes, notamment les RNase et DNase afin d'affiner les distinctions entre les différentes populations lysosomales. Enfin, cette méthode de mesure nous permettrait de suivre l'évolution de la GP10D10 d'une façon chronologique cette fois, au cours du transit de l'invertase par les différents compartiments d'endocytose, les endosomes, les MVB, les lysosomes; et cela nous permettrait de voir si il y a une fusion entre les membranes des endosomes et des lysosomes au cours du processus d'endocytose et où cette fusion a lieu.

Dans ce cas, il serait plus aisé de travailler sur des cellules isolées.

BIBLIOGRAPHIE.

B I B L I O G R A P H I E.

1. ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., AND WATSON, J.D. (1983).
Ch. 6 : La membrane plasmique.
Dans *Biologie moléculaire de la cellule*.
Ed. Flammarion médecine sciences
2. STEINMAN, R.M., MELLMAN, I.S., MULLER, W.A., AND COHN, Z.A. (1983).
Endocytosis and the recycling of plasma membrane .
J. Cell Biol. 96, 1-27.
3. PARKS, A.C. (1980).
Intermediates in the degradation of yeast invertase (Thesis)
University Microfilms International .
4. PASTAN, I. AND WILLINGHAM, M.C. (1985).
Ch 1. The pathway of endocytosis.
In *Endocytosis review*.
Willingham and Pastan.
Ed. Plenum.
5. PASTAN, I. AND WILLINGHAM, M.C. (1983).
Receptor-mediated endocytosis : coated pits, receptosomes and the Golgi.
Tibs 26, 250-260.
6. WILEMAN, T., HARDING, C., AND STAHL, P. (1985).
Receptor-mediated endocytosis.
Biochem. J. 232, 1-14.
7. DIMENT, S., AND STAHL, P. (1985)
Macrophage endosomes contains proteases wich de grade endocytosed protein ligands.
J. Biol. Chem. 260, 15311-15317.
8. WILLINGHAM, M.C., AND PASTAN, I. (1984).
Endocytosis and membrane traffic in cultured cells.
Recent Prog. Horm. Res., 40, 569-587.
9. FARQUHAR, M.G. (1983).
Intracellular membrane traffic : pathways, carriers and sorting devices.
Methods Enzymol. 98, 1-13.
10. DAUTRY-VARSAT, A., AND LODISH, H.(1984).
Les récepteurs cellulaires.
Pour la science, 79-85.
11. GEUZE, H.J., SLOT, J.W., STROUS, G.J.A.M., PEPPARD, J., VON FIGURA, K., HASILIK, A.,
AND SCHWARTZ, A.L. (1984).
Intracellular receptor sorting during endocytosis : comparative immunoelectron
microscopy of multiple receptors in rat liver.
Cell 37, 195-205.
12. MORRE, D.J. , WIDNELL, C.J. , AND THILO, L. (1984).
Membrane dynamics : flow routes and quantitation of membrane transport and recycling.
Fed. Proc. 43, 1 2884-2887.

13. FARQUHAR, M.G. (1983).
Multiple pathways of exocytosis, endocytosis, and membrane recycling : validation of a Golgi route.
Fed. Proc. 42, 2407-2413.
14. DE BRUYN, P.P.H., MICHELSON, S., AND BANKSTON, P.W. (1985).
In-vivo endocytosis by bristle-coated pits and intracellular transport of endogenous albumin in the endothelium of the sinuses of liver and bone marrow.
Cell Tissue Res. 240, 1-7.
15. JADOT, M., MISQUITH, S., DUBOIS, F., WATTIAUX-DE CONINCK, S., AND WATTIAUX, R. (1986).
Intracellular pathway followed by invertase endocytosed by rat liver.
Eur. J. Biochem. 161, 695-700.
16. NICHOLS, B.A. (1982).
Uptake and digestion of Horseradish peroxidase in rabbit alveolar macrophages.
Lab. Invest. 47, 235-246.
17. KOLB-BACHOFEN, V., SCHELPPER-SCHAFFER, J., AND VOGELL, W. (1982).
Electron microscopic evidence for an asialoglycoprotein receptor on Kupffer cells : localization of lectin-mediated endocytosis.
Cell. 29, 859-866.
18. ASHWELL, G., AND HARFORD, J. (1982).
Carbohydrate-Specific receptors of the liver.
Annu. Rev. Biochem. 51, 531-543.
19. STEER, C.J., AND CLARENBURG, R. (1979).
Unique distribution of glycoprotein receptors on parenchymal and sinusoidal cells of rat liver.
J. Biol. Chem. 254, 457-4461.
20. TAVASSOLI, M., KISHIMOTO, T., AND KATAOKA, M. (1986).
Liver endothelium mediates the hepatocyte's uptake of ceruloplasmin.
J. Cell Biol. 102, 1298-1303.
21. PRAANING-VAN DALEN, D.P., BROUWER, A., AND KNOOK, D.L. (1981).
Clearance capacity of rat liver Kupffer, endothelial, and parenchymal cells.
Gastroenterology 81, 1036-1044 .
22. PRIEELS, J-P., PIZZO, S.V., GLASGOW, L.R., PAULSON, J.C., AND HILL, R.L. (1978).
Hepatic receptor that specifically binds oligosaccharides containing fucosyl α 1- \rightarrow 3 N-acetylglucosamine linkages.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2215-2219.
23. SMEDSRØD, B., HAKAN PERTOFT, SIGBRITT ERIKSSON, J. ROBERT, E FRASER, AND TOVARD C. L. (1984).
Studies in vitro on the uptake and degradation of sodium hyaluronate in rat liver endothelial cells.
Biochem. J. 223, 617-626.
24. SMEDSRØD, B., KJELLEN, L., AND PERTOFT, H. (1985).
Endocytosis and degradation of chondroitin sulphate by liver endothelial cells.
Biochem. J. 229, 63-71.

25. VAN RENSWOUDE, J., BRIDGES, K.R., HARFORD, J.B., AND KLAUSNER, R.D. (1982).
Receptor-mediated endocytosis of transferrin and the uptake of Fe in K562 cells :
identification of a nonlysosomal acidic compartment.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6186-6190.
26. COURTOY, P.J., MOGUILEVSKY, N., RETEGUI, L.A., CASTROCANE, C.E., AND MASSON, P.L.
(1984).
Uptake of lactoferrin by the liver.
II. Endocytosis by sinusoidal cells.
Lab. Invest 50, 329-334.
27. BERGERON, J.J.M., CRUZ, J., KHAN, M.N., AND POSNER, B.I. (1985).
Uptake of insulin and other ligands into receptor-rich endocytic components of target
cells : the endosomal apparatus.
Annu. Rev. Physiol. 47 , 383-403.
28. MARSH, M., BOLZAN, E., AND HELENIUS, A. (1983).
Penetration of semliki forest virus from acidic prelysosomal vacuoles.
Cell 32, 931-940.
29. FELDMAN, S.R., ROSENBERG, M.R., NEY, K.A., MICHALOPOULOS, G., AND PIZZO, S.V.
(1985).
Binding of α_2 -macroglobulin to hepatocytes : mechanism of in vivo clearance.
Biochem Biophys. Res. Commun. 128, 795-802.
30. de DUVE, C., AND WATTIAUX, R. (1966).
Function of lysosomes.
Annu. Rev. Physiol. 28, 435.
31. LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., AND FAMBROUGH, D.M. (1986).
Lysosomal membrane Dynamics : Structure and interorganellar movement of a major
lysosomal membrane glycoprotein.
J. Cell. Biol. 102, 1593-1605.
32. LLOYD, J.B. & FOSTER, S. (1986).
The lysosome membrane.
Tibs 11, 365-368.
33. WATTIAUX, R., WATTIAUX-DE CONINCK, S. (1983).
Chap. 6 : Separation of cell organelles.
In Iodinated Density Gradient Media.
a practical approach
Ed. RICKWOOD, D., IRL PRESS (Oxford, Washington DC).
34. BURNSIDE, J., AND SCHNEIDER, D. (1975).
Characterization of the membrane proteins of rat liver lysosomes.
Biochem. J. 204, 525-534.
35. HENNING, R. (1974).
Ch. 20 : The lysosomal membrane characteristic features of composition and function.
In Methodological development in Biochemistry.
Ed. Reid E.
36. SCHNEIDER, D.L., BURNSIDE, J., GORGA, F.R., AND NETTLETON, C.J. (1975).
Properties of the membrane protein of rat liver lysosomes. The majority of lysosomal
membrane protein are exposed to the cytoplasm.
Biochem. J. 176, 75-82.

37. NEISS, W.F. (1984).
A coat of glycoconjugates on the inner surface of the lysosomal membrane in the rat kidney.
Histochemistry 80, 603-608.
38. GREEN, S.A., LIMMER, K.-P., GRIFFITHS, G., AND MELLMAN, I. (1987).
Kinetics of intracellular transport and sorting of lysosomal membrane and plasma membrane protein.
J. Cell Biol. 105, 1227-1240.
39. LEWIS, V., GRUN, S.A., MARSH, M., VIHKO, P., HELENIUS, A., AND MELLMAN, I. (1985).
Glycoproteins of the lysosomal membrane.
J. Cell Biol. 100, 1839-1847.
40. REGGIO, H., BANTON, D., HARMS, E., COUDRIER, E., AND LOUVARD, D. (1984).
Antibodies against lysosomal membranes reveal a 100,000-Md, W+ protein that cross-reacts with purified H⁺, K⁺ ATPase from gastric mucosa.
J. Cell Biol. 99, 1511-1526.
41. CHEN, J.W., PAN, W., D'SOUZA, M.P., AND AUGUST, J.T. (1985).
Lysosome-Associated membrane proteins : characterization of lamp-1 of macrophage p388 and mouse embryo 3T3 cultured cells.
Arch. Biochem. Biophys. 239, 574-586.
42. CHEN, J.W., MURPHY, T.L., WILLINGHAM, M.C. , PASTAN, I., AND AUGUST, J.I. (1985).
Identification of two lysosomal membrane glycoproteins.
J. Cell Biol. 101, 85-95.
43. BARRIOCANAL, J.G., BONIFACINO, J.S., YUAN, L., AND SANDOVAL, I.V. (1986).
Biosynthesis, glycosylation, movement through the Golgi system, and transport to lysosome by an N-linked carbohydrate-independent mechanism of three lysosomal integral membrane proteins.
J. Biol. Chem. 261, 16755-16763.
44. CROZE, E., IVANOV, I., SNITKIN, H., KREIBICH, G., SABATINI, D., AND ROSENFELD, M.G. (1986).
Biosynthesis of a cysteine-rich, highly glycosylated protein present in lysosomal endosomal membranes.
J. Cell Biol. 103, 355 a, abstract n° 1320.
45. GEUZE, H.J., SLOT, J.W., STROUS, G.A.M., HASILIK, A., AND VON FIGURA, K. (1984).
Ultrastructural localisation of the mannose 6-phosphate receptor in rat liver.
J. Cell Biol. 98, 2047-2054.
46. D'SOUZA, M.P., AND AUGUST, M.T. (1986).
A kinetic analysis of biosynthesis and localization of a lysosome-associated membrane glycoprotein.
Arch. Biochem. Biophys. 249, 522-532.
47. MULLER, W.A., STEINMAN, R.M., AND COHN, Z.A. (1980).
The membrane proteins of the vacuolar system.
II Bidirectional flow between secondary lysosomes and plasma membrane.
J. Cell Biol. 86, 304-314.

48. HAYLETT, T., AND THILO, L. (1986).
Limited and selective transfer of plasma membrane glycoproteins to membrane of secondary lysosomes.
J. Cell Biol. 103, 1249-1256.
49. DRAYE, J-P., QUINTART, J., COURTOY, P.J., AND BAUDHUIN, P. (1987).
Relations between plasma membrane and lysosomal membrane.
1. Fate of covalently labelled plasma membrane protein.
Eur. J. Biochem. 170, 395-403.
50. DRAYE, J-P., QUINTART, J., COURTOY, P.J., AND BAUDHUIN, P. (1987).
Relations between plasma membrane and lysosomal membrane.
2. Quantitative evaluation of plasma membrane marker enzymes in the lysosomes.
Eur. J. Biochem. 170, 404-411.
51. GONZE, M.M., WATTIAUX-DE CONINCK, S., MAINFERME, F., THIRION, J., AND WATTIAUX R. (1988).
Characterization of lysosomal membrane protein reacting with 10D10 monoclonal antibody.
138^{ème} réunion de la société belge de biochimie. (Anvers).
52. MORENO, F., OCHOA, A.G., GASCON, S., AND VILLANUEVA, J.R. (1975).
Molecular forms of yeast invertase.
Eur. J. Biochem. 50, 571-579.
53. COLONNA, W. J., CANO, F.R., AND LAMPEN, J.O. (1974).
Microheterogeneity in yeast invertase.
Biochim. Biophys. Acta. 16, 36994-37001.
54. TRIMBLE, R.B., AND MALEY, F. (1977).
Subunit structure of external invertase from *saccharomyces cerevisiae*.
J. Biol. Chem. 252, 350-356.
55. THIRION, J., THIBAUT-VERCRUYSSSEN, R., RONVEAUX-DUPAL, M.F., AND WATTIAUX, R. (1983).
Experimental sucrose overloading of rat liver lysosomes. Effect of pre-treatment with invertase.
Eur. J. Cell. Biol. 31, 107-113.
56. TOLLESHAUG, H., BERG, T., AND BLOMHOFF, R. (1984).
Uptake of mannose-terminated glycoproteins in isolated rat liver cells.
Evidence for receptor-mediated endocytosis in hepatocytes.
Biochem. J. 223, 151-160.
57. MADNICK, H.M., WINKLER, J.R., AND SEGAL, H.L. (1978).
Uptake of yeast invertase by rat liver cells *in vivo* and *in vitro*.
Arch. Biochem. Biophys. 191, 385-392.
58. ARBORGH, B., BERG, T., AND ERICSSON, J.L.E. (1973).
Quantitation of acid phosphatase and arylsulfatase in rat hepatic parenchymal and Kupffer cells.
Febs Lett. 35, 51-53.
59. JADOT, M., WATTIAUX-DE CONINCK, S., AND WATTIAUX, R. (1985).
Effect on lysosomes of invertases endocytosed by rat liver.
Eur. J. Biochem. 151, 485-488.

60. JADOT, M., COLMANT, C., WATTIAUX-DE CONINCK, S., AND WATTIAUX, R. (1984).
Intralysosomal hydrolysis of glycy-L-phenylalanine 2-naphtylamide.
Biochem. J. 219, 965-970.
61. HAYASHI, H., STTITARA, M., AND YAMASAKI, F. (1982).
The origin of lipid accumulated in liver lysosomes after administration of Triton WR-1339 .
J. Biochem. 92, 1585-1590.
62. ORBAN, E., MADERSPACH, A., AND TOMORI, E. (1980).
Triton WR-1339 induced changes in the fatty acid composition of serum lipids in rat.
Biochem. Pharmacol. 29, 2879-2882.
63. WATTIAUX, R., WIBO, M., AND BAUDHUIN, P..
Influence of the injection of Triton WR-1339 on the properties of rat liver lysosomes.
Ciba foundation symposium on lysosomes, 176-200.
Eds. de Reuck, Av. and Cameron M.P.
J & A Churchill LTD London.
64. WATTIAUX, R. (1966).
Etude expérimentale de la surcharge des lysosomes (Thesis).
J. Duculot, Gembloux, Belgium.
65. TROUT, J.J., AND VILES, J.M. (1979).
Cellular changes associated with Triton WR-1339 accumulation in rat hepatocytes.
I. Autophagy.
Exp. Mol. Pathol. 30, 230-241.
66. BLOUIN, A., BOLENDER, R.P., AND WEIBEL, E.R. (1977).
Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and non hepatocytes in the rat liver parenchyma.
A stereological study.
J. Cell Biol. 72, 441-455.
67. MUNTKE-KAAS, A.C., BERG, T., AND SELJELID, R. (1976).
Distribution of lysosomal enzymes in different types of rat liver cells.
Exp. Cell Res. 99, 146-154.
68. BERG, T. AND BOMAN, D. (1973).
Distribution of lysosomal enzymes between parenchymal and Kupffer cells of rat liver.
Biochimica et Biophysica acta, 321, 585-596.
69. BEAUFAY, H., JACQUES, P., BAUDHUIN, P., SELLINGER, O.Z. , BERTHET, J., AND de DUVE, C. (1964).
Tissue fractionation studies.
Biochem. J. 92, 184-205.
70. de DUVE, C., PRESSMAN, B.C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R., AND APPELMANS, F. (1985).
Tissue fractionation patterns of enzymes in rat liver tissue.
Biochem. J. 60, 604-617.
71. WATTIAUX, R., WATTIAUX-DE CONINCK, S., ROUVEAUX-DUPAL, M.F., DUBOIS, F. (1978).
Isolation of rat liver lysosomes by isopycnic centrifugation in a metrizamide gradient.
J. Cell Biol. 78, 349-368.

72. ALDRICH CHEMIE (1987-1988).
Catalog handbook of fine chemie
73. AVRAMEAS, S., ET TERNYNCK, T.H. (1987).
Chap 1 : Purification des anticorps.
Dans Techniques immunoenzymatiques.
Ed. INSERM (Société Française d'immunologie).
74. TIJSEN, P. (1985).
Chap. 3 : Non-immunologic molecular recognition systems used in immunoassays.
In Laboratory techniques in Biochemistry and molecular biology 15.
Ed. Elsevier.
75. GUESDON, J-L., TERNYNCK, T., AND AVRAMEAS, S. (1979).
The use of Avidin-Biotin interaction in immunoenzymatic techniques.
J. Histochem. Cytochem. 27, 1131-1139.
76. AVRAMEAS, S., ET TERNYNCK, T.H. (1987).
Chap 3 : Dosages immunoenzymatiques quantitatifs.
Dans Techniques immunoenzymatiques.
Ed. INSERM (Société Française d'immunologie).
77. AVRAMEAS, S., ET TERNYNCK, T.H. (1987).
Chap 7 : Systèmes d'amplification des méthodes immunoenzymatiques.
Dans Techniques immunoenzymatiques.
Ed. INSERM (Société Française d'immunologie).
78. WILCHEK, M., AND BAYER, E.A. (1984).
The avidin-biotin complex in immunology.
Immunol. Today 5, 39-43.
79. WARNKE, R., AND LEVY, R. (1980).
Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies : a biotin-avidin horseradish peroxydase method.
J. Histochem. Cytochem. 28.
80. BOWERS, W.E., FINKENSTAEDT, J.T., AND de DUVE, C. (1967).
Lysosomes in lymphoïd tissue.
1. the measurement of hydrolytic activities in whole homogenates.
J. Cell Biol. 32, 325-337.
81. ROY (1953).
Biochem. J., 12.
82. STAHN (1970).
J. Cell Biol. 46, 576.
83. BROWN, J.A., AND SEGAL, H.L. (1977).
Effect of glucagon on pinocytosis by the yolk sac of the rat.
J. Biol. Chem. 252, 7151-7155.
84. KLEIN J. (1975).
Biochemistry of h-2 antigens.
In Biology of the Mouse Histocompatibility-2 complex. Principles of immunogenetics applied to a single system 353-360.
Springer-Verlag, Berlin, Heidenberg, New-York.

85. BORDIER, C. (1981).
Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution.
J. Biol. Chem. 256, 1604-1607.
86. POLAK, J.M., AND VAN NOORDEN, S. (1984).
chap.6 Modification of the basic methods.
In *An introduction to immunochemistry : current techniques and problems.*
Ed Christopher Hammond
Oxford University Press.
87. GRAHAM, R.C., AND KARNOVSKY, M.J. (1966).
The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney : ultrastructural cytochemistry by a new technique.
J. Histochem. Cytochem. 14, 291-302.
88. COPPE, P., LETESSON, J.-J., SAINT GUILLAIN, M., AND LELOUP, R. (1985).
The use of colloidal gold for screening monoclonal antibodies to cell surface antigens.
J. Immunol. Methods. 76, 211-222.
89. LANSDORP, P.M., ASTALDI, G.C.B., OOSTERHOF, F., AND JANSSEN, M.C. (1980).
J. Immunol. Methods. 39, 393.
90. ALBERTS, A.W., AND VAGELOS, P.R. (1972).
Acyl CoA. carboxylase
In *The enzymes* (P.D. BOYER), Vol. VI, Acad. press edit., N.-Y., 37-82.
91. TOLLESHAUG, H., BERG, T., NILSSON, M., AND NORUM, K.R. (1977).
Uptake and degradation of ¹²⁵I-labelled asialo-fetuin by isolated rat hepatocytes.
Biochim. Biophys. Acta, 499, 73-84.
92. HENNING, R. AND PLATTNER, H. (1975).
Formation of Triton WR-1339 -filled rat liver lysosomes.
I. Properties and intracellular distribution of [³H] Triton WR-1339 .
Exp. Cell Res. 94, 363-376.

APPENDICE TECHNIQUE.

A P P E N D I C E T E C H N I Q U E.

1. PURIFICATION DE LYSOSOMES ET DE MEMBRANES LYSOSOMALES DE FOIE DE RAT.

1.1. PREPARATION DE LA FRACTION "L" (FRACTION MITOCHONDRIALE LEGERE) PAR CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE.

1.1.1. Matériel.

4 rats wistar mâles à jeun.

Centrifugeuses (Beckman Instruments, Inc, Spinco, Div. PALO, Alto, Calif.)

L₂ 65 B; L₂ 75 B; L₅ 50; L₅ 65 ou LHV 50 à 2°C.

Rotor 30.

Tubes et bouchons pour le rotor 30.

Saccharose 0,25 M glacé.

Gaze, ciseaux, berlins, pieds gradués, tige en verre, glace pilée, petits tubes à congeler, pipette à décanter.

Homogénéiseur de Potter A et C avec piston en téflon monté sur moteur rotatif.

Balance, pipettes.

1.1.2. Protocole.

Toutes les manipulations doivent se dérouler le plus rapidement possible, à 0°C et dans du Saccharose 0,25 M.

a) Homogénéisation: préparation de la fraction H.

1. Peser les foies dans un berlin taré contenant du saccharose 0,25 M glacé.
2. Homogénéiser par un seul passage au Potter (2 500 RPM).
3. Filtrer l'homogénat (H) sur 2 épaisseurs de gaze, rincer le Potter au saccharose 0,25 M et diluer la fraction H ($\pm 1/5$).
4. Prélever un volume déterminé de la fraction H et la placer dans des tubes à congeler pour les dosages enzymatiques.

b) Préparation de la fraction NM.

1. Prélever un volume déterminé de la fraction H et le placer dans des tubes à

centrifuger (± 30 ml par tube). Répartir de manière équitable, au besoin peser les tubes pour équilibrer le rotor 30.

Centrifuger au rotor 30 à 12 500 RPM accélération maximale ($\int \omega^2 t = 16 \text{ rad}^2/10^7$ seconde).

2. Décantier en continu jusqu'au niveau supérieur du culot.

Recueillir le surnageant dans un pied gradué; et remettre les culots en suspension à la tigette en verre avec du saccharose 0,25 M.

Pooler les culots 2 par 2; bien rincer les tubes à centrifuger; puis boucher les tubes remplis et mélanger leur contenu.

3. Faire deux lavages à 12 500 RPM ($\int \omega^2 t = 16 \text{ rad}^2/10^7$ seconde) au rotor 30 et répéter les opérations de 2 à 3.

4. Resuspendre les culots (NM) avec du saccharose 0,25 M glacé pour obtenir une dilution 1/5.

5. Noter le volume du surnageant (LPS) et en prélever une partie dans des tubes à congeler.

c) Préparation de la fraction "L".

1. Prélever une partie du surnageant (LPS) dans des tubes pour le rotor 30; bien les boucher et mélanger leur contenu.

Centrifuger ensuite à 20 000 RPM ($\int \omega^2 t = 217 \text{ rad}^2/10^7$ seconde).

2. Décantier en suçant (càd en recueillant le maximum de volume). Recueillir le surnageant (PS) dans un pied gradué.

3. Laver les culots deux fois : pooler les culots 3 par 3, en les resuspendant à la tigette de verre dans du saccharose 0,25 M.

4. Resuspendre "L" dans le saccharose glacé, pour avoir une dilution de 1/0,33.

5. Noter le volume de PS et déterminer sa dilution . Prélever des échantillons de L et de PS.

1.2. PURIFICATION DES LYSOSOMES.

1.2.1. Matériel.

Métrizamide (analytical grade) Nyegaard and Co (Oslo - Norway).

Fraction "L" mitochondriale légère.

Centrifugeuses L2 75 B; L5 65 ou L5 50 et rotor SW 28.

Tubes et bouchons pour le rotor SW 28.

Pipettes de 10 ml et tube slicer.

1.2.2. Protocoles.

a. Préparer les solutions de métrizamide : solution de densité déterminée, mettre à pH 7,4 à l'aide de NaOH 1/100 N, si nécessaire.

Les densités (en g/ml) sont $\rho_1 = 1,253$

$$\rho_2 = 1,16$$

$$\rho_3 = 1,145$$

$$\rho_4 = 1,135$$

$$\rho_5 = 1,105$$

Vérifier au réfractomètre, les différentes densités des solutions de métrizamide sur base de la formule : $\rho = 3,35 n - 3,462$ où n = indice de réfraction.

Au besoin ajuster la densité avec de l'eau pour diluer, ou avec une solution de densité plus élevée pour concentrer.

b. Diluer la fraction "L" 1/0,33 avec la solution de métrizamide de densité 1,253, à raison de 1 volume de L pour 2 volumes de solution de métrizamide.

La solution ainsi obtenue (L_M) possède une densité de 1,18 g/ml.

c. Réaliser un gradient discontinu de métrizamide en déposant 13 ml de "L" préparée dans la métrizamide (L_M) au fond du tube à gradient.

Déposer ensuite délicatement 6 ml des 4 autres solutions de métrizamide dans un ordre décroissant (cfr fig 11).

Les bandes de densité différente doivent apparaître nettement.

d. Centrifuger les gradients 2 heures à 27 000 RPM dans le rotor SW 28.

Découper les tubes à gradient avec le tube slicer.

Récupérer la fraction 1,2 et 3; mesurer leur volume.

Prélever des échantillons dans des petits tubes à congeler.

1.3. PREPARATION DES MEMBRANES.

1.3.1. Matériel.

Fraction 2 du gradient de métrizamide.

H₂O ; PBS.

Centrifugeuse Beckman L5 65 B.

Rotor 60 Ti, tubes et bouchons adéquats.

Pipettes et tubes gradués.

1.3.2. Protocole.

Diluer environ 6 fois dans H₂O la fraction 2 contenant les membranes.
Mélanger puis centrifuger dans le rotor 60 Ti à 40 000 rpm pendant 40 min.
Resuspendre les culots dans du PBS jusqu'à une dilution de 0,2.

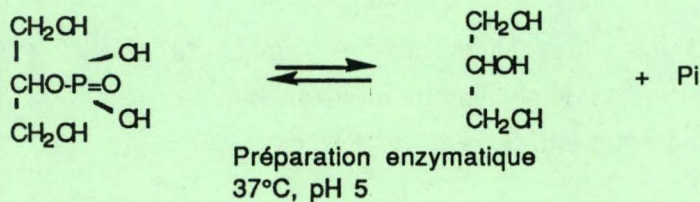
1.4. DOSAGE DE LA PHOSPHATASE ACIDE ET DES PROTEINES EN MILIEU DE METRIZAMIDE.

PHOSPHATASE ACIDE (58).

Principe :

Enzyme de référence des lysosomes

Réaction catalysée par la phosphatase acide:



(β-glycérophosphate -----> glycérol + phosphate inorganique.)

L'activité libre se détermine en milieu isotonique, l'activité totale en milieu iso- ou hypotonique et en présence d'un détergent : le Triton X-100. La réaction est arrêtée par dénaturation de l'enzyme au moyen d'acide trichloracétique (TCA)

Solutions stock :

- β-glycérophosphate pH 5; 0,5M
- Tampon acétate pH 5; 1 M
- Saccharose M (*facultatif*)
- Triton 2% (en poids/vol)
- Acide trichloracétique à 15,5% (en poids/vol)(TCA)

Mixtures d'incubation

- (Activité totale) (*à préparer dans un petit erlenmeyer*)
- 40 X 0,2 ml de β-glycérophosphate pH 5, 0,5M
- 40 X 0,1 ml de Tampon acétate pH 5, 1 M
- 40 X 0,1 ml de Triton 2%
- 40 X 1,1 ml d'eau

-pipeter 1,5 ml de la mixture test dans de petits tubes à centrifuger en plastique et les marquer.

-Les tubes non soulignés sont les tests.

Les blancs seront incubés à 37°C sans addition de la préparation enzymatique, fixés au TCA; après quoi on y ajoutera les quantités adéquates de la fraction. L'enzyme qui y est présent sera d'office dénaturé et ne pourra pas agir sur le substrat; il s'agit donc d'un blanc destiné à mesurer la quantité de phosphate inorganique présent dans les fractions et les réactifs.

-suivant la quantité de préparation enzymatique à incuber, compléter chaque tube avec de l'eau distillée de façon à ce que le volume final soit de 2 ml.

-plonger ces tubes dans un bain-marie à 37°C et démarrer la réaction enzymatique en ajoutant de minute en minute la préparation enzymatique. Mélanger convenablement et déclencher le chronomètre à ce moment; effectuer cette opération pour tous les tests en suivant le plan d'incubation. mais non pour les blancs.

-arrêter la réaction en ajoutant 1,5 ml d'acide trichloracétique à 15,5 % (TCA) dans les tests et les blancs.

-ajouter les fractions dans les tubes blancs

-mélanger

-centrifuger à la centrifugeuse Janetzki durant 5 minutes

-prélever 1 ml de surnageant de chacun des petits tubes en plastique et les placer dans de grands tubes de pyrex, 1 ml d'eau (blanc) et 1 ml de la solution étalon de phosphate inorganique à 0,5 μ mole /ml (étalon) et effectuer le dosage de phosphate inorganique

Calcul des résultats

L'unité de phosphatase acide est la quantité d'enzyme qui hydrolyse 1 μ mole de B-glycérophosphate par minute à 37°C

$$\text{Unité/gr de tissu} = \frac{(\text{Lecture-Blanc}) \times 3.5 \times \text{dilution} \times 0.5}{\text{Etalon} \times \text{volume d'enzyme} \times \text{temps}}$$

DOSAGE DES PROTEINES EN PRESENCE DE METRIZAMIDE (33).

But: précipiter les protéines et garder la métrizamide en solution qui sera éliminée.

1. 100 μ L de protéines diluées adéquatement dans de nouveaux tubes Janetzki - y ajouter 1 ml de TCA à 10%

Faire 2 blancs et un étalon (100 μ L à 400 μ g/ ml ou 100 μ l d'eau)

2. Centrifuger pendant 10 minutes à la Janetzki.

Eliminer le surnageant en versant (attention au culot et secouant)

3. Ajouter 0.5 ml de NaOH 0.5 N - Vortexer (il faut dissoudre le culot) Attendre 30 minutes

4. Ajouter 2.5 ml de la mixture alcaline

Na₂CO₃ 1% 100 ml

Tartrate sodico-potassique 2% 1 ml

CuSO₄ 1% 1 ml

Mélanger-Attendre 15 minutes

5. Ajouter en chronométrant 0.25 ml de FOLIN dilué 2 fois- Lire à 540 nm

2. MARQUAGE DE L'ANTICORPS A LA BIOTINE (74).

2.1. PURIFICATION DU 10D10 A PARTIR D'ASCITE SUR COLONNE PROTEINE-A SEPHAROSE (73).

1. Préparer une plaque de titration la veille.
2. **Equilibration de la colonne** avec le tampon de liaison : 1.5M glycine et 3M NaCl à ajuster à pH 8.9 avec du NaOH 5 M.
3. **Préparation de l'ascite** : centrifuger l'ascite (4 ml) à 5500 RPM 30 min et diluer le surnageant 2 fois dans le Binding buffer.
Laisser s'écouler le tampon jusqu'au niveau supérieur de la colonne, puis déposer l'ascite.
NE PAS OUBLIER D'EN GARDER UN PEU POUR LE DOSAGE. Récupérer le premier pic qui peut être rechargé.
Laver avec le tampon jusqu'au moment où l'absorbance à 280 nm retourne au niveau de base.
4. **Elution** : on élue le 10D10 avec le tampon d'élution : acide citrique 100 mM pH 6 (le 10D10 est une Ig1) , recueillir le 10D10.
5. **Régénération de la colonne** : elle s'effectue à l'aide du tampon de régénération : acide citrique 100mM pH3.

2.2 BIOTINYLATION PROPREMENT DITE DE L'ANTICORPS MONOCLONAL

6. L'échantillon est ensuite porté à pH 7.4 avec du TRIS solide.
Il est ensuite désalé sur un colonne PD 10.
7. Le 10D10 est ensuite concentré.
8. **Préparation du BNHS** (biotinyl -N- hydroxy - succinimide ester) : le BNHS (5mg) est dissous immédiatement avant usage dans 50 µl de diméthylformamide (Jansen 99,5%).
9. 0,5 ml de 10D10 (= 3,24 mg de protéines) sont mélangés à 150 µl de tampon bicarbonate 1M, pH 8,5; on ajoute ensuite 50 µl de BNHS en solution dans le diméthylformamide.
10. La réaction se poursuit 4 heures à température normale.
11. La solution est ensuite dialysée la nuit à 4°C contre du PBS.
12. l'anticorps biotinylisé est alors aliquoté et congelé.
13. On réalise un **test ELISA** et un **dosage des protéines**, sur l'ascite, le premier pic (molécules non retenues), le 10D10 purifié, le 10D10 après dialyse, le 10D10 concentré et le 10D10 biotinylé; pour suivre les étapes de la purification et du marquage de l'anticorps.

3. TESTS IMMUNOENZYMATIQUES QUANTITATIFS (76).

3.1. ADSORPTION DES MEMBRANES DE LYSOSOMES EN PHASE SOLIDE.

3.1.1. Matériel.

Boîtes multipuits Titertek (Flow) ou High et Medium Binding (Nunc).

Membranes de lysosomes Lys I, II, III, IV, V.

Tampon PBS	NaCl	8 g/L
	KCl	0,2 g/L
	Na ₂ HPO ₄	1,15 g/L
	KH ₂ PO ₄	0,2 g/L

porter à pH 7,4

BSA 0,1% dans le PBS.

poly-L-lysine 10 µg/ml dans H₂O

glutaraldéhyde 1% dans le PBS.

parafilm.

3.1.2. Protocole.

Utiliser des boîtes de 96 micropuits à fond plat.

1. Adsorber la poly-L-lysine durant 1 heure à température ambiante (100 µl à 10 µg/ml)
2. Enlever la polylysine ou non en secouant énergiquement- ne pas laver!
3. Déposer les membranes de lysosomes 50 µl par puits (1 à 10 µg de protéine).
Déposer 50 µg de PBS (blancs), couvrir de parafilm.
4. Laisser adsorber la nuit à 4°C ou 5 heures à 37°C.
5. On immerge ou non les plaques dans un bain de glutaraldéhyde (1% dans le PBS)
On attend 30 minutes à température ambiante.
6. On vide et on lave 3 fois au PBS.
7. Ajouter dans chaque puits 100µl de PBS/BSA 1% 2 H à 37° C ou la nuit à 4° C pour la saturation (NaN₃ 0,1% pour le stockage).

Les conditions expérimentales sont variables d'une expérience à l'autre; la poly-L-lysine peut être utilisée seule ou, ni la poly-L-lysine, ni la glutaraldéhyde n'interviennent dans l'adsorption des membranes. Dans ce cas, les étapes 5 ou 1 et 5 ne sont pas réalisées. Les conditions expérimentales exactes sont mentionnées dans les légendes des figures.

3.2. TITRATION DU 10D10. TEST EN PHASE SOLIDE ELISA (76).

3.2.1. Matériel.

Membranes de lysosomes insolubilisées sur boîte de titration.
anticorps à doser.

PBS.

Fab peroxydase (Biosys).

ABTS chromogène 2-2' azino di-(3-éthyl benzthiazoline sulfonate) $C_8H_{16}N_4O_6S_4$ -
(NH_4)₂ Boehringer PM = 548,7.

H₂O₂ à 30%

Tampon citrate 20,5 g Na₂HPO₄·2H₂O

8,9 g acide citrique pH = 5,6

1 L H₂O

3.2.2. Protocole.

1. 50 µl de polysérum -ou anticorps monoclonal dilué dans le PBS/BSA 1% par puit
pendant 1 H à 37° C.

Rincer 5 fois au PBS.

2. 50 µl de FAB PEROXYDASE (Biosys) antisouris dilué (dans le PBS/BSA ou
PBS/OVALB) 500 fois

Incuber à 37° C pendant 1 H. Rincer 5 fois au PBS.

3. 100 µl de ABTS/H₂O₂ soit 4 µg de ABTS par 6ml de tampon citrate 0.046 M pH 5,6 +
5µl de H₂O₂.

20.5 g de Na₂HPO₄· 2 H₂O (PM 178)

8.9 g d'acide citrique (PM 192) ad 1 litre

Incuber à 37° C pendant 15 min ou 1 H.

Lire à 405 nm.

3.3. TITRATION DU 10D10S³⁵ TEST EN PHASE SOLIDE SPRIA.

3.3.1. Matériel.

Membranes de lysosomes insolubilisées sur boîtes de titration. Les boîtes que nous avons
utilisées sont: Titertek (Flow) dont le n° de lot est 77-173-05; Medium Binding
(Nunc)(n° de lot: 433717) et High Binding (Nunc) (n° de lot :468667).

Anticorps S³⁵ à doser.

PBS

Fil chauffé à blanc

compteur à scintillation; aqualuma (Lumac, n° de lot : 12.056).

3.3.2. Protocole.

1. 50 µl d'anticorps monoclonal dilué dans PBS/BSA 1% par puit **pendant 1H à 37 °C.**
2. Découper les puits avec le fil chauffé à blanc.
3. Mettre chaque puit dans une fiole pour le compteur à scintillation (programme 3).

3.4. TITRATION DU10D10-B- TEST SUR PHASE SOLIDE ELISA MODIFIE.

3.4.1. Matériel.

Membranes de lysosomes insolubilisées sur boîte de titration.

anticorps à doser.

PBS.

Avidine peroxydase .

ABTS chromogène (2-2' azino di-3-éthyl benzthiazoline sulfonate)

Boehringer PM = 548,7.

H₂O₂ à 30%

Tampon citrate 20,5 g Na₂HPO₄·2H₂O

8,9 g acide citrique pH = 5,6

1 L H₂O

3.4.2. Protocole.

1. 50 µl de polysérum -ou anticorps monoclonal dilué dans le PBS/BSA 1% par puit **pendant 1 H à 37° C.**
Rincer 5 fois au PBS.
2. 50 µl d'AVIDINE PEROXYDASE diluée dans le PBS/BSA (400 ou 800 ou 6 400 fois) selon l'expérience. (La dilution utilisée est mentionnée dans la légende de la figure.)
Incuber à 37° C pendant 1 H.
Rincer 5 fois au PBS.
3. 100 µl de ABTS/H₂O₂ soit 4 µg de ABTS par 6ml de tampon citrate 0.046 M pH 5,6 + 5 µl de H₂O₂.
20.5 g de Na₂HPO₄· 2 H₂O (PM 178)
8.9 g d'acide citrique (PM 192) ad 1 litre
Incuber à 37° C pendant 15 min ou 1 H.
Lire à 405 nm.

3.5. DOSAGE DE LA GP10D10 CONTENUE DANS UNE FRACTION.

3.5.1. Matériel.

Fraction contenant de la GP10D10 (membranes purifiées, Lys ou fractions d'un gradient ML.)

PBS

PBS/PMSF 0,2 mM (20 mM PMSF dans PMSO = 0,035 gr dans 4 ml DMSO + H₂O).

Membranes insolubilisées sur plaque multipuits; anticorps (radioactif ou biotinylé).

3.5.2. Protocole.

Préincubation.

1. Diluer les fractions dans le PBS/PMSF 0,2 mM.

Les membranes purifiées sont diluées 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/100 et 1/200.

Chaque fraction de gradient et ML est diluée 1; 1,3; 2; 3; 5; 10 et 100 fois.

2. Prélever 75 µl de chaque dilution et mélanger avec 75 µl d'anticorps dilué adéquatement.

Pour le dosage sur fraction de gradient, la préincubation se déroule à 4°C pendant 4 heures.

Pour le dosage sur membranes purifiées, les conditions d'incubation sont mentionnées dans la légende des figures 36 à 39.

Incubation.

1. Déposer 45 µl du mélange sur les puits (triples).

Incuber une nuit à 4°C pour les fractions de gradient et ML.

2. Rincer au PBS 5 fois.

3. Poursuivre le protocole SPRIA au point 2, si l'anticorps est radioactif (S³⁵).

Poursuivre le protocole ELISA modifié au point 2 si l'anticorps est biotinylé.

4. MESURES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES.

4.1 CATHEPSINE C (15).

Enzyme marqueur des lysosomes

Solutions stock.

- 1.- Substrat: glycyl-arginyl-naphtylamide GAN : 0,5mM
porter à pH 5
- 2.- Tampon acétate 0,2M pH 5
- 3.- Activateur: 5 ml de tampon acétate + 56,8mg de mercaptoéthylamine
2,5 ml d'eau
2,5 ml de Triton X-100 à 2%
- 4.- Etalon naphtylamine 0,025 mM
- 5.- TCA à 10 % et à 3,3 %

Composition des tests.

Gradient: 25 tests/Blancs

25 ml	substrat GAN
8 ml	activateur
30 ml	eau

Pipeter 1,95 ml par tube compatible avec la centrifugeuse Janetzki

Incubations : à 37°C durant 10 min.

Gradient normal

de 1 à 6 : 50 µl

7 à 9: 50 µl 1/4

Gradient Triton

de 1 à 3 : 50 µl 1/4

4 à 10: 50 µl

ML : 50 µl 1/2 x 50

Fixation: 1 ml de TCA à 10%. Centrifuger 5 minutes à la Janetzki.

Dosage de la naphtylamine libérée.

- Principe :
- (A) le nitrite en milieu acide transforme le groupement aminé en sel de diazonium.
 - (B) le sulfamate d'ammonium élimine l'excès de nitrite.
 - (C) réaction de copulation avec Naphtyléthylène dialmine et formation

d'un colorant azoïque.

Révélation : sur 1 ml de surnageant (après centrifugation à la Janetzki 5 min).

A. 1ml de NaNO_2 à 0,1% dans H_2O . Mélanger au **Vortex** pendant 20 sec.

B. 1 ml de sulfamate d'ammonium à 0,5% dans H_2O . Mélanger au **Vortex** pendant 20 sec.

C. 2ml de Naphtyléthylène diamine à 0,5% dans éthanol 95%. Mélanger au **Vortex** pendant 20 sec.

Lire à 580 m μ après 30 min (lecture stable)

Faire 1 Blanc et 1 Etalon (1ml = 0,025 μ mole de naphtylamine).

Blanc et étalon doivent contenir 1 ml de TCA 3,3% (soit 2 ml H_2O + 1 ml TCA 10%)

(le pH est important lors de la révélation).

4.2. ARYLSULFATASE (80, 81, 82).

Substrat : para-nitrocatecholsulfate dipotassium salt Σ PM 329,4-Boîte 521

<u>Mixture pour 24 tests (20μl d'enzyme)</u>	<u>Concentration finale</u>
14,94 mg de para-nitrocatecholsulfate dipotassium salt	20 mM
120 μ l de triton 2%	
600 μ l de tampon Acétate 0,2 M; pH 5	50 mM
1280 μ l d'eau	
Dont 80 μ l par test et 20 μ l d'enzyme	

Incubation dans des tubes coniques à 37°C

Les blancs contiennent la même mixture, sont plongés dans le bain durant le même temps que les tests, lorsque le temps d'incubation est écoulé on sort les blancs du bain à 37°C, on les fixe au moyen du TCA glacé, on rajoute l'enzyme.

Lire rapidement: le para-nitrocatecholsulfate dipotassium s'hydrolyse rapidement en milieu acide

Fixation: + 300 μ l de TCA à 2,2 %. Centrifuger à la Janetzki 5 minutes.

Révélation: 0,2 ml de surnageant + 1,8 ml de révélateur, NaOH 1,1 N (Par exemple: 2ml de NaOH N et 16 ml de NaOH N)

Lire à 510 nm

4.3 LA PHOSPHODIESTERASE ALCALINE.

La phosphodiesterase alcaline clive à 25°C, la thymidine 5' monophosphateparanitro-phényl diester en thymidine 5' monophosphate et paranitrophénol qui se colore en jaune en milieu alcalin.

Solution stock :

tampon glycine 0,5 M pH 9,6.

Zn (OAc)₂ 0,01 M.

NaOH 1 N.

NaOH 0,1 N.

Mixture d'incubation :

pour 20 tests : 3,45 mg de thymidine 5' monophosphateparanitro-phényl diester.

1 ml de tampon glycine 0,5 M pH 9,6.

1 ml de Zn (OAc)₂ 0,01 M.

2 ml d'eau distillée.

60 µl de NaOH 1 N.

Incubation :

-Pipeter 200 µl de mixture dans des tubes cristals; on prévoit également 3 ou 4 blancs.

-Incuber les tubes dans un bain marie à 25 °C.

-Ajouter au test 50 µl de la fraction diluée; on peut incuber un volume de fraction moins important mais il faut alors compléter chaque tube avec de l'eau distillée de façon à obtenir un volume final de 250 µl.

-Ajouter 50 µl de la fraction diluée au blanc après les avoir fixés au NaOH.

Fixation et révélation :

-Dès que la couleur jaune apparait, fixer le test avec 1 ml de NaOH 0,1 N (± 10 min pour le fractionnement, et 8 min pour le gradient).

-Lire à 400 nm dans une cuvette réduite.

4.4 INVERTASE (59 et 83).

L'invertase injectée à des rats, clive le Saccharose en fructose et glucose à 37°C et à pH 5, le glucose libéré est alors dosé en présence d'O-dianisidine, par réaction avec la glucose oxydase et la peroxydase.

Solution stock :

Triton X-100 2%.

Tampons acétate 0,2 M, pH5.

BaOH 0,14 M (bouillir et filtrer).

Zn SO₄ 0,14 M

Diluer l'une ou l'autre des solutions de manière à ce qu'un mélange à volume identique de Ba(OH)₂ et Zn SO₄ donne une solution de pH 7.

Mixture d'incubation :

Pour 100 ml : 8,55 g saccharose

10 ml Triton 2%

50 ml acétate 0,2 M pH 5

ad. 100 ml avec de l'eau

Incubation :

- Pipeter 100 µl de mixture dans des petits tubes à centrifuger en plastique.
- ***Prévoir un blanc pour chaque test car le Saccharose contenu dans les fractions du gradient est également consommé par l'invertase. Les blancs sont soustraits des tests afin d'éliminer cette interférence.***
- Ajouter un étalon, glucose 1 mM qui suit la filière des tests.
- Les blancs sont incubés à 37°C sans addition de la préparation enzymatique, ils sont fixés ensuite au Ba(OH)₂ et Zn SO₄.
- Les test sont incubés à 37°C et on y ajoute de min en min 100 µl de la fraction adéquatement diluée.

Fixation :

- La réaction est arrêtée en ajoutant 100 µl de BaOH et 100 µl de Zn SO₄.
- Mélanger.
- Ajouter 100 µl de la fraction diluée au blanc.
- Centrifuger 5 min à la centrifugeuse Janetzki.

Révélation : dosage du glucose libéré.

- Prélever 200 µl de surnageant.

Solution stock :

O-dianisidine.

Glucose oxydase.

Peroxydase.

Tris - HCL 0,25 M.

Mixture d'incubation :

- Préparer la mixture glucose oxydase - peroxydase : 60 mg de glucose oxydase.
5 mg de peroxydase.
100 ml de tris-HCL 0,25 M pH8.

Incubation et révélation :

- Aux 200 μ l de surnageant, on ajoute 4 ml de O-dianisidine et 2 ml de mixture glucose oxydase - peroxydase.
- On incube dans des tubes en pyrex, à 37°C pendant 30 min.
- Lecture à 450 nm.

5. SOLUBILISATION DES CONSTITUANTS MEMBRANAIRES.

5.1. EXTRACTION DE PROTEINES MEMBRANAIRES AU TRITON X-114 (85).

5.1.1. Protocole.

-L'échantillon à extraire (0,2 à 1 mg de protéines par ml) est contenu dans un tampon
10 mM Tris-HCl pH 7,4
150 mM NaCl
0,5 à 1 % Triton X-114 à 0°C.

-Pour séparer les protéines, on dépose dans le fond de tube conique Eppendorf microfuge de 1,5 ml, un coussin de 300 µl contenant : 10 mM Tris-HCl pH 7,4
150 mM NaCl
0,06 % Triton X-114

-L'échantillon (clair) de 200 µl est déposé au-dessus de ce coussin et le tube est incubé durant 3 minutes à 30°C exactement. On constate une opalescence et coagulation.

- Le tube est ensuite centrifugé durant 3 min à 300 g à température de chambre ou à 30°C dans une centrifugeuse équipée d'un rotor à godet oscillant (Janetzki, rotor Eppendorf).

- Après centrifugation, la phase détergente se retrouve dans le fond du tube sous forme d'une gouttelette huileuse.

La séparation est répétée une deuxième fois.

- On récupère la phase aqueuse et on lui rajoute de nouveau du Triton X-114 à 0,5 %. Après dissolution du surfactant à 0°C, la mixture est redéposée au-dessus du coussin huileux, le tout est incubé 3 min à 30°C, pour initier la condensation, et centrifugé comme précédemment. On obtient la **couche détergente dans le fond.**

- Enfin la couche aqueuse est lavée au moyen de Triton X-114 à 2% dans un autre tube (sans coussin de Saccharose cette fois). La phase détergente de cette dernière séparation est éliminée. On obtient la **couche aqueuse**. Finalement on ajoute à la **couche détergente et à la couche aqueuse** du Triton X-114 et du tampon de façon à obtenir les mêmes concentrations de tampons et de détergent pour les deux phases.

5.1.2. Test ELISA sur les protéines extraites.

1. Diluer les protéines des phases aqueuse et détergente dans le PBS (1/5, 2/5, 3/5, 4/5 et 5/5).
2. Les déposer sur une plaque Flow, une nuit à 4°C.
3. Poursuivre le test ELISA (point 3.2).

5.2. EXTRACTION AVEC DU TAMPON DE LYSE CONTENANT DU NP-40 (PRECIPITATION A L'ACETONE).

5.2.1. Solution stock d'extraction.

250 ml	de tampon phosphate 200 mM; pH 7,4	
2,5 ml	d'iodoacétate 200 mM	(conc finale 1 mM)
0,659 ml	Aprotinine 77 mM	(conc finale 1 μ M ou 5 μ g/ml)
12,5 ml	EDTA 200 mM	(conc finale 5 mM)
10 ml	de NP40	(conc finale 2%)
0,1 gr	d'azide de Sodium	(conc finale 0,02%)
2,5 ml	de PMSF 200 mM	(conc finale 1 mM)
	de leupeptine	(conc finale 5 μ M)
	de pepstatine	(conc finale 5 μ M)
	de chymostatine	(conc finale 5 μ g/ml)

à porter à 500 ml

5.2.2. Protocole.

à 1 volume de suspension de membranes de lysosomes purifiés à 120 μ g /ml **minimum**, on ajoute 3 volumes de tampon de Lyse et 5 volumes d'acétone

Overnight à 0°C

Centrifuger durant 10 minutes à la Janetzki (5000 RPM 10 à 15 min)

Décantier et resuspendre au PBS à une concentration de 10 à 20 μ g /ml

5.2.3. Test SPRIA.

1. Adsorber 9 μ g par puit de protéines extraites, une nuit à 4°C (PBS pour les blancs).
2. Rincer au PBS 5 fois.
3. Saturer au PBS/BSA.
4. Réaliser un test SPRIA (point 3.3.).

5.3 EXTRACTION DES PROTEINES DE LA MEMBRANE LYSOSOMALE AVEC DU TAMPON DE LYSE CONTENANT DU NP-40 ET DU DOC : PAS DE PRECIPITATION A L'ACETONE.

5.3.1. Solutions stock d'extraction.

250 ml de tampon phosphate 200 mM; pH 7,4

2,5 ml	d'iodoacétate 200 mM	(conc finale 1 mM)
0,659 ml	Aprotinine 77 mM	(conc finale 1 μ M ou 5 μ g/ml)
12,5 ml	EDTA 200 mM	(conc finale 5 mM)
10 ml	de NP40	(conc finale 2%)
0,1 gr	d'azide de Sodium	(conc finale 0,02%)
2,5 ml	de PMSF 200 mM	(conc finale 1 mM)
	de leupeptine	(conc finale 5 μ M)
	de pepstatine	(conc finale 5 μ M)
	de chymostatine	(conc finale 5 μ g/ml)
	du désoxycholate	(concentration finale: 0.5%)

à porter à 500 ml

5.3.2. Protocole.

1. Un volume de membranes à 948 μ g/ml sont mélangées à 3 volumes de tampon de Lyse.Vortex
2. Overnight (rotamix) à 4°C.
3. Centrifuger et resuspendre le culot dans du tampon de Lyse pour avoir la concentration de 10 μ g dans 45 μ l.

5.3.3. Test SPRIA.

1. Adsorber une nuit à 4°C : 10; 5,5; 2,2 et 1,1 μ g de protéines extraites.
2. Rincer 5 fois au PBS et saturer avec 100 μ l de PBS/BSA 1%.
3. Poursuivre le test SPRIA (point 3.3).

6. IMMUNOPEROXYDASE SUR COUPES SMITH ET FARQUAHR.

premier anticorps : 10D10-B

second anticorps : avidine peroxydase.

- Fixation par perfusion , NaCl 9 ‰ 30 sec, préfixation 3 min (glut 0,1% - formol 4% - tampon phosphate 0,1 M); fixation 9 min (formol 4% - tampon bicarbonate 0,1 M).

TOUTES LES SOLUTIONS SONT A TEMPERATURE NORMALE.

- couper l'échantillon au Smith et Farquhar, fixer ensuite 4 heures dans le milieu de fixation, rincer la nuit dans le tampon de rinçage (phosphate 0,1 M - sucrose 4% - CaCl₂ 0,15 mM).
- Le lendemain, rincer 3 fois au PBS, le dernier rinçage durera au moins 15 min.
- Incuber durant 30 min dans du méthanol H₂O₂ 0,3% (1 ml/100 ml).
- incuber durant 30 min dans phénylhydrazine 0,1 %, H₂O₂ 1µl / 100 ml de PBS, fraîchement préparé.
- rincer 3 fois au PBS.
- préincuber dans PBS/BSA 1% durant 30 min à température normale. Ne pas rincer - éliminer le bloquant avec un kleenex ou une pipette.
- appliquer une goutte du premier anticorps dilué dans PBS/BSA 1% (1/50 et 1/100 de 10D10-B ou 1/70 et 1/40 de 17 A3-B). ECHANTILLONS D'ANTICOPRS QUI N'ONT JAMAIS ETE DEGELES.

Indiquer les anticorps utilisés : nom, date et dilution.

Incuber de préférence deux heures à température de labo + une nuit à 4°C; sinon une heure ou 2 heures à température du labo.

- rincer 3 fois au PBS ou PBS/BSA 1% chaque fois durant 5 min.
NE JAMAIS LES LAISSER SECHER.
- Appliquer le deuxième anticorps conjugué à la peroxydase (avidine peroxydase 1/800 et 1/400) dilué dans PBS seul, 60 min à température de labo et à l'obscurité.
- Rincer 3 fois au PBS ou PBS/BSA 1% chaque fois durant 5 min.
NE JAMAIS LES LAISSER SECHER.
- Incuber durant 5 min au DAB (100 mg de DAB dans 40 ml d'eau; à congeler dans de grands tubes en plastique à raison de 1 ml / tube. Au moment de l'emploi, ajouter 9 ml de tampon Tris 0,05 M - imidazol 0,01 M pH 7,4 - la fraîcheur du tampon est capitale, ne pas stocker le mélange des 2 tampons).
- Incuber au DAB - H₂O₂ pendant le temps requis (1 ml de DAB congelé + 100 µl de H₂O₂ 1/30).
- Laver abondamment au PBS et monter une coupe.

