



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Essais de mise au point d'une nouvelle méthode pour étudier la perméabilité de la membrane lysosomale au glucose

Spoo, Véronique

Award date:
1990

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.

750 690

Département de Chimie Physiologique
Promoteur : R. Wattiaux

Essais de mise au point d'une nouvelle
méthode pour étudier la perméabilité de la
membrane lysosomale au glucose.

Véronique SPOO

ANNEE 1989-1990

Au terme de ce mémoire, je souhaite remercier toutes les personnes qui ont su rendre cette dernière année d'étude très attrayante.

Ma reconnaissance s'adresse particulièrement au Professeur R. Wattiaux pour l'intérêt qu'il a porté à ce mémoire. Mais je tiens également à le remercier pour son aide sur la plan pratique et pour la grande patience dont il a toujours fait preuve à mon égard.

Le dynamisme du Professeur S. Wattiaux-De Coninck est sans conteste, un des attraits de ce laboratoire de Chimie Physiologique.

Il m'est difficile d'exprimer en quelques mots mes remerciements à M. Jadot. J'ai été sensible à sa rigueur et à son enthousiasme scientifique. Mais, j'ai aussi très apprécié ses encouragements et son optimisme dans les moments difficiles.

Je souhaite également remercier Isabelle pour l'amitié qu'elle m'a témoignée tout au long de mes études et pour son aide sur le plan dactylographique.

J'ai aussi beaucoup apprécié ma collaboration avec F. Dubois lors des expériences de centrifugation. De même je remercie M.T. Warnier pour sa gentillesse et sa disponibilité. Un merci tout spécial à M. Savels pour ses conseils judicieux en matière d'ordinateur.

Enfin, je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers Laurence, Patrick, Nathalie, Françoise et Didier qui n'ont pas hésité à sacrifier leur temps pour résoudre les problèmes que j'ai rencontré lors de l'impression de ce travail.

Merci à mes parents qui ont su m'encourager au bon moment et qui de cette façon m'ont permis de mener à bien ces études.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

FACULTE DES SCIENCES

Rue de Bruxelles 61 - 5000 Namur

Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam - b - Telefax 081/23.03.91

Essais de mise au point d'une nouvelle méthode pour étudier la perméabilité de la membrane lysosomale au glucose.

SPOO Véronique

Les résultats des expériences portant sur la localisation subcellulaire de la glucose oxydase injectée à un rat par voie intraveineuse, suggèrent que cette enzyme est captée par les lysosomes du foie. Les activités libre et totale suivent une cinétique de Michaelis-Menten. La phlorétine et le diéthylstilbestrol, deux inhibiteurs du transport du glucose dans les globules rouges, inhibent l'activité libre de la glucose oxydase pour des concentrations qui n'affectent pas l'activité totale de l'enzyme. L'énergie d'activation est plus élevée pour l'activité libre que pour l'activité totale. Certains monosaccharides inhibent l'activité libre pour une concentration qui est sans effet sur l'activité totale.

Ces observations tendent à montrer que l'activité libre de la glucose oxydase endocytée, mesurée sur une préparation de lysosomes, résulte principalement de l'oxydation du glucose intralysosomal. De ce fait, ce type de mesure pourrait être utilisé comme méthode pour l'étude du transport du glucose à travers la membrane lysosomale.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1990

Promoteur: R. Wattiaux

TABLE DES MATIERE.

CHAPITRE I. Introduction.....	1
1. Les lysosomes: généralités.....	1
2. Perméabilité de la membrane des lysosomes.....	3
2.1. Approches expérimentales.....	3
2.1.1. Données de la latence.....	4
2.1.2. Protection osmotique.....	4
2.1.3. Etudes morphologiques.....	5
2.1.4. Exploitation du lysosomotropisme.....	6
2.1.5. Mesure directe de la diffusion.....	6
2.2. Diffusion simple - diffusion facilitée.....	7
2.3. Perméabilité aux dérivés protéiques.....	8
2.3.1. Transporteurs d'acides aminés cationiques.....	10
2.3.2. Transporteur pour les petits acides aminés neutres.....	11
2.3.3. Transporteur pour les acides aminés neutres aromatiques.....	12
2.3.4. Transporteur pour les acides aminés dipolaires aromatiques ou ramifiés.....	12
2.3.5. Transporteur pour les acides aminés anioniques.....	13
2.4. Perméabilité aux sels.....	14
2.5. Perméabilité aux protons.....	14
2.5.1. Le pH intralysosomal.....	15
2.5.1.1. Utilisation de colorants vitaux.....	15
2.5.1.2. Détermination du pH grâce au lysosomotropisme.....	15
2.5.1.3. Utilisation de sondes fluorescentes.....	16
2.5.2. La régulation du pH intralysosomal.....	16
2.6. Perméabilité aux sucres et leurs dérivés.....	18
2.6.1. Disaccharides et polysaccharides.....	18
2.6.2. Monosaccharides.....	18
2.6.2.1. Les monosaccharides neutres.....	18
2.6.2.2. Les monosaccharides réduits ou oxydés.....	20
2.6.3. N-acétyl D-glucosamine et N-acétyl D-galactosamine.....	21
2.7. Perméabilité aux lipides et leurs dérivés.....	22
2.8. Perméabilité aux nucléotides et nucléosides.....	23
3. But du travail.....	24
CHAPITRE II. Techniques expérimentales.....	26
1. Technique de fractionnement.....	26
1.1. Préparation d'un homogénat.....	26
1.2. Centrifugation différentielle.....	27

1.3. Centrifugation isopycnique.....	28
1.4. Enzymes de référence.....	29
2. Dosages enzymatiques.....	29
2.1. Méthodes générales.....	29
2.2. Mesure de l'activité de la glucose oxydase.....	29
3. Dosage protéines	30
4. Purification des lysosomes.....	30
 CHAPITRE III. Résultats expérimentaux.....	 32
1. Mise au point du dosage de l'activité de la glucose oxydase.....	32
1.1 Introduction.....	32
1.2. Résultats.....	33
2. Endocytose de la glucose oxydase par le foie de rat.....	34
2.1.Introduction.....	34
2.2.Résultats.....	35
2.2.1.Endocytose de la glucose oxydase.....	35
2.2.2.Distribution après centrifugation différentielle.....	35
2.2.3.Distribution après centrifugation isopycnique.....	36
2.2.4.Expériences d'activation des enzymeslysosomales.....	37
2.3.Conclusions.....	38
3. Caractérisation de l'oxydation du glucose par la glucose oxydase présente dans les lysosomes.....	39
3.1.Introduction.....	39
3.2.Résultats.....	39
3.2.1. Effet du temps d'incubation et de la concentration en glucose.....	39
3.2.2. Effet du pH.....	41
3.2.3 Effet de la température.....	42
3.2.4. Effets d'inhibiteurs du transport du glucose....	43
3.2.4.1. Effet du diéthylstilbestrol.....	43
3.2.4.2. Effet de la phlorétine.....	44
3.2.4.3. Effet de la cytochalasine B.....	45
3.2.5. Mise en évidence d'une compétition possible entre le glucose et d'autres sucres pour le transporteur éventuel.....	46
3.2.5.1. Monosaccharides.....	46
3.2.5.2. Disaccharides.....	47
 CHAPITRE IV. Conclusions générales.....	 50
Bibliographie	

CHAPITRE I: INTRODUCTION.

1. LES LYSOSOMES: GÉNÉRALITÉS.

Découverts en 1949 par de Duve et ses collaborateurs, les lysosomes sont définis comme des vésicules contenant toute une variété d'hydrolases acides et entourées d'une membrane dotée de propriétés de perméabilité telles qu'elle représente également une véritable barrière vis-à-vis des substrats exogènes des diverses enzymes des granules [De Duve *et al.*, 1955]. Ces organites subcellulaires ont essentiellement un rôle hétérophagique et un rôle autophagique.

Leur fonction autophagique peut se résumer comme suit. La cellule isole des particules de son cytoplasme sous la forme d'une vacuole entourée d'une membrane, dont le contenu sera digéré après sa fusion avec des lysosomes. Des organites de la cellule, tels que du réticulum endoplasmique ou des mitochondries, peuvent se trouver isolés de cette façon.

Leur fonction hétérophagique quant à elle, s'explique par le fait qu'ils sont les sites principaux de la digestion intracellulaire de substances exogènes captées par la cellule par le processus de l'endocytose. Ils interviennent pour une grande partie dans la dégradation de composés protéiques, glucidiques et lipidiques. Le devenir des résidus de cette "digestion" intralysosomale est fortement lié à la perméabilité que la membrane des lysosomes montre vis-à-vis d'eux. Ce phénomène nous intéressant particulièrement dans le cadre de notre travail, nous y reviendrons en détails dans la suite de ce chapitre.

Comme nous l'avons dit, les lysosomes reçoivent des substances du milieu extérieur par la voie de l'endocytose. Ce processus se subdivise généralement en deux phénomènes distincts. La phagocytose consiste en la préhension de particules de taille supérieure à quelques dixièmes de microns. C'est un phénomène induit, caractéristique de certaines cellules spécialisées comme les macrophages et les polymorphonucléaires neutrophiles.

La pinocytose par contre est un processus constitutif se déroulant à la surface de la plupart des cellules, grâce auquel celles-ci isolent dans leur cytoplasme une "goutte" du milieu

extracellulaire et tout son contenu [pour une revue sur le sujet, voir Silverstein *et al.*, 1977; Steinman *et al.*, 1983; Gruenberg *et al.*, 1989]. Ce processus est encore divisé en pinocytose fluide lorsque les corps étrangers se retrouvent "passivement" capturés, du fait de leur présence aléatoire dans la vacuole de pinocytose en formation. Par contre, certaines substances sont capturées après une étape d'adsorption sur des sites de la membrane plasmique. Dans ce cas, on parle de pinocytose adsorptive. Actuellement, les termes d'endocytose fluide et endocytose adsorptive remplacent fréquemment ceux de pinocytose.

Un type particulier d'endocytose adsorptive est l'endocytose par récepteurs, très étudiée ces dix dernières années [Goldstein *et al.*, 1979; Brown *et al.*, 1983; Stahl et Scharz., 1986]. Elle se déroule dans de nombreux types de cellules différents et débute par la reconnaissance spécifique de la molécule qui sera endocytée par un récepteur présent sur la membrane plasmique. A titre d'exemple, nous citerons: l'endocytose de lipoprotéines de faible densité par des fibroblastes [Brown et Goldstein., 1979], l'endocytose d'hormones peptidiques par des hépatocytes [Carpentier *et al.*, 1979], et l'endocytose de l'albumine traitée à la formaldéhyde par les cellules non parenchymateuses du foie [Blomhoff *et al.*, 1984].

Les différents types cellulaires d'un même organe peuvent présenter des types variables de récepteurs et donc interviennent dans l'endocytose de substances différentes. C'est le cas du foie, organe sur lequel va se baser notre étude, qui est constitué d'hépatocytes et de cellules non parenchymateuses regroupant principalement les cellules endothéliales et les cellules de Kupffer. Steer et Clarenburg [1979] ont montré que les hépatocytes présentent essentiellement des récepteurs au galactose tandis qu'Achord et ses collaborateurs [1977] ont montré que les cellules non parenchymateuses sont caractérisées par la présence de récepteurs au mannose (ceux-ci seraient plus particulièrement associés aux cellules endothéliales). Ces récepteurs interviennent dans l'endocytose de glycoprotéines exposant les résidus précités.

Suite à ces observations, se pose la question de l'hétérogénéité de la population lysosomale. Chacun s'accorde à leur

prêter comme caractéristique commune la possession d'un grand nombre d'hydrolases acides. Cependant Davies [1975] expose différentes études dont les résultats tendent à montrer qu'il existe une grande hétérogénéité dans la population lysosomale d'un même organisme. Cette variabilité se situe à différents niveaux.

Tout d'abord, variabilité de la localisation. Les lysosomes ont été localisés en de nombreux endroits de l'organisme. Entre autres, au niveau des reins [Wattiaux- de Coninck *et al.*, 1965], du tissu osseux [Vaes et Jacques., 1965], des leucocytes [Cohn et Hirsch., 1960]. Ensuite, il semblerait que le contenu enzymatique des organites d'un même organe varie suivant le type cellulaire qui les renferme [Sellinger *et al.*, 1960]. Enfin, dans l'ensemble des lysosomes d'une même cellule, on peut observer des variantes de formes et de densités liées à des stades de maturation différents.

Ces constatations doivent nous faire prendre conscience de la relativité des résultats obtenus pour une population lysosomale donnée. Aussi, les résultats de notre étude faite à partir de lysosomes de foie de rat, ne concerneront pas nécessairement les granules de tous les types cellulaires hépatiques et ne pourront être transposés aux lysosomes d'un autre organe qu'après certaines vérifications.

2. PERMÉABILITÉ DE LA MEMBRANE DES LYSOSOMES.

Dans cette section, nous allons passer en revue les différentes techniques utilisées pour étudier la perméabilité de la membrane des lysosomes. Ensuite, après avoir rappelé les critères principaux d'une diffusion mettant en jeu un transporteur, nous donnerons un aperçu des résultats les plus probants obtenus jusqu'à présent, quant au passage de divers solutés à travers la membrane lysosomale.

2.1. Approches expérimentales.

Les méthodes décrites ci-dessous, présentent chacune des avantages particuliers. Cependant, toutes possèdent des

limites expérimentales que nous allons tenter de mettre en évidence.

2.1.1. Données de la latence.

Les enzymes lysosomales sont caractérisées par leur latence, c'est-à-dire qu'elles n'ont pas accès à leur substrat extralysosomal aussi longtemps que la membrane les entourant reste intacte. L'activité mesurée dans ces conditions est théoriquement nulle, pour autant que la membrane soit imperméable au substrat. Pratiquement, cette activité (activité "libre") représente quelques pour-cents de l'activité mesurée lorsque les granules sont totalement rompus

Cependant, il existe des cas où cette imperméabilité n'est pas totale [Goldman *et al.*, 1973a]. Le substrat en pénétrant, rencontre alors l'enzyme qui lui est propre. On peut dès lors mesurer une activité libre relativement importante. Les mesures de cette activité dans différentes conditions, fournissent des indications quant à l'importance de la perméabilité de la membrane vis-à-vis de ce soluté substrat.

Cette méthode permet une étude cinétique de la perméabilité de la membrane. Mais, elle est uniquement valable pour des substances qui sont les substrats potentiels d'une ou plusieurs enzymes lysosomales.

2.1.2. Protection osmotique.

Cette méthode a été établie par Berthet en 1951. Une préparation lysosomale obtenue par centrifugation différentielle est incubée dans une solution isotonique de la substance à tester. La latence d'une enzyme caractéristique des lysosomes est mesurée à différents temps. Si le soluté ne pénètre pas, sa tonicité contrebalance la tonicité du contenu lysosomal et les organites restent intacts. Aucune diminution de la latence de l'enzyme de référence choisie n'est observée.

Par contre, si le soluté peut traverser la membrane, au fur et à mesure que le temps passe, il va amener un supplément d'équivalents osmotiques à l'intérieur des lysosomes. Le

déséquilibre osmotique en résultant va entraîner un flux d'eau vers les organites. Ceux-ci vont gonfler et finalement éclater, ce qui se traduira par une perte de la latence des enzymes lysosomales. La vitesse de cette perte de latence fournit des indications quant à la vitesse de pénétration du soluté.

L'avantage principal de cette technique est qu'elle peut être utilisée sur une préparation de lysosomes non purifiés. Cependant, elle nécessite des concentrations en solutés telles (0.250 M) qu'une étude cinétique du phénomène est malaisée. De plus, les substances qui ne sont pas solubles dans l'eau à forte concentration, ne peuvent être testées.

2.1.3. Etudes morphologiques.

Les deux méthodes décrites ci-dessus permettent d'étudier *in vitro* le passage d'un soluté depuis l'extérieur vers l'intérieur des lysosomes.

In vivo, la diffusion se fait préférentiellement en sens inverse. En effet, les lysosomes doivent pouvoir se décharger des résidus résultant de la digestion. Prenant en compte cela, des expériences ont été réalisées dans lesquelles la situation *in vivo* est reproduite [Ehrenreich *et al.*, 1969].

Brièvement, des cellules sont mises en culture dans un milieu contenant le composé que l'on veut tester. Celui-ci est pris par endocytose et arrive au niveau des lysosomes. A ce moment, plusieurs situations peuvent se présenter.

Soit le composé est indigeste. Dans ce cas, deux possibilités existent: soit il s'accumule dans les lysosomes qui vont alors se présenter sous forme de grandes vacuoles luminescentes visibles au microscope à contraste de phase. Soit il est perméable et passe dans le cytosol, sans entraîner de modifications morphologiques.

Soit le composé est digeste. Dans ce cas, si les résidus de l'hydrolyse lysosomale sont perméables ils passent dans le cytosol, sinon, ils s'accumulent dans les lysosomes qui se présentent à nouveau sous forme de grandes vacuoles.

Cette méthode est peu utilisée car elle ne donne que des indications qualitatives sur la perméabilité de la membrane lysosomale vis-à-vis d'une substance donnée.

2.1.4. Exploitation du lysosomotropisme.

Certaines substances arrivent dans les lysosomes par endocytose. D'autres substances proviennent du cytosol. Leur accumulation dans les lysosomes est une conséquence de la différence de pH qui existe entre le cytosol et le milieu intralysosomal. Ces substances, souvent des bases faibles, sont appelées lysosomotropes [de Duve *et al.*, 1974]. Leur concentration dans les lysosomes est attribuée à la différence de perméabilité entre la forme non ionisée et la forme protonée. La forme neutre passe facilement du cytosol dans les lysosomes où elle se charge d'un proton et de ce fait ne peut plus sortir de l'organite.

Le lysosomotropisme peut aussi résulter de la présence d'hydrolases acides dans les lysosomes. Goldman et Kaplan [1973a] ont montré que des lysosomes mis dans un milieu isotonique, se rompent rapidement si on ajoute de faibles concentrations d'esters méthyliques d'acides aminés (L). Il semble que cette rupture est due à la pénétration rapide de l'ester dans les lysosomes où il est hydrolysé, libérant un acide aminé libre dont la vitesse de sortie est nettement inférieure à la vitesse d'entrée de l'ester. Son accumulation entraîne un déséquilibre osmotique qui conduit à la rupture de la membrane lysosomale.

Cette méthode permettant de charger les lysosomes d'une substance dont on mesure la diffusion, est très attrayante pour l'étude de la perméabilité de la bicouche phospholipidique vis-à-vis des dérivés protéiques. Elle n'a toutefois pas encore pu être transposée à d'autres substances.

2.1.5. Mesure directe de la diffusion.

Une étude directe de la perméabilité de la membrane lysosomale peut être envisagée en utilisant des substances marquées. Les lysosomes sont incubés dans un milieu contenant le soluté marqué par exemple, radioactif. Après un certain temps, les

organites sont séparés du milieu d'incubation. Il existe différentes techniques de séparation, la plus couramment utilisée étant celle où la préparation est centrifugée à travers une couche d'huile [Hales *et al.*, 1984; Docherty *et al.*, 1983].

Le rapport entre la radioactivité mesurée dans les lysosomes et la radioactivité de départ, donne de bonnes indications quantitatives quant à l'entrée de la substance.

Pour qu'une telle approche soit valable, il est malheureusement nécessaire d'avoir une préparation de lysosomes hautement purifiée. La centrifugation isopycniqne dans un gradient de Percoll [Reeves., 1979], dans un gradient de métrizamide [Wattiaux *et al.*, 1978] ou l'utilisation du triton WR 1339 [Wattiaux *et al.*, 1963], peuvent servir de méthodes de purification

2.2. Diffusion simple - diffusion facilitée.

Affirmer qu'un soluté traverse une membrane par diffusion facilitée plutôt que par diffusion simple nécessite des preuves de l'existence d'un transporteur.

Les études réalisées doivent montrer que la cinétique du transport est saturable et que ce transport présente une spécificité pour le soluté. De plus, la possibilité d'inhiber ce phénomène par différents composés et la découverte de substances compétitives sont également des arguments en faveur de l'existence d'un transporteur.

Etudier le phénomène à différentes températures peut aussi aider à trancher entre les deux hypothèses. Si la diffusion est facilitée, le Q_{10} calculé (différence de vitesse de réaction pour une différence de température de 10 °C) sera de l'ordre de 1.5 à 3 [Docherty *et al.*, 1979] tandis que le Q_{10} pour une diffusion simple est généralement nettement supérieur. La température a vraisemblablement une action plus grande sur l'état des membranes biologiques que sur le transporteur éventuel.

Un dernier critère pouvant être pris en considération est la trans-stimulation observable lors de la diffusion facilitée. Pisoni et ses collaborateurs ont montré que si des lysosomes chargés en lysine radioactive sont mis dans un milieu contenant de la lysine froide, celle-ci stimule la sortie de l'acide aminé

radioactif. Ils ont mis en évidence la spécificité de ce phénomène et sa capacité à être inhibé par différents agents [Pisoni *et al.*, 1985]. Stein [1989] reprend également cet argument dans son étude des caractéristiques d'une diffusion facilitée.

2.3. Perméabilité aux dérivés protéiques.

La latence des enzymes lysosomales est un bon argument montrant que la membrane des lysosomes est imperméable aux polypeptides [Lloyd., 1988]

Ehrenreich et Cohn [1969] ont étudié la perméabilité des dipeptides et tripeptides par la méthode de la vacuolisation. Au vu de leurs résultats, ils suggèrent que la diffusion d'un dérivé protéique à travers la membrane des lysosomes est limitée par son poids moléculaire. La valeur limite pour celui-ci étant de 230Da. Cependant, ils estiment que la charge et l'hydrophobicité de la substance sont des facteurs dont il faut également tenir compte.

La méthode de protection osmotique a été utilisée par Lloyd [1971] pour étudier la perméabilité des lysosomes aux petits peptides et acides aminés. Ses résultats sont en accord avec ceux de Cohn et Ehrenreich. Il confirme que le poids moléculaire limitant la diffusion serait de 230Da. De plus, il montre que les dipeptides présentent une moins bonne protection osmotique que les acides aminés dont ils sont formés. Il explique cela par le fait que les charges du dipeptide se "neutraliseraient", donnant un composé globalement moins chargé et donc plus apte à traverser la bicouche hydrophobe, que les acides aminés plus hydrophiles.

Goldman [Goldman *et al.*, 1974] qui utilise à la fois la protection osmotique et la vacuolisation, remarque que la variété des diastéréoisomères qui peuvent entrer dans les lysosomes, semble exclure la possibilité d'un passage par transporteur. Il suggère un mécanisme basé sur la solubilité des dérivés protéiques dans les régions non polaires de la membrane.

C'est l'étude d'une maladie de surcharge des lysosomes, la cystinose, qui a permis la découverte du premier transporteur d'acides aminés dans la membrane lysosomale. Cette pathologie est caractérisée par une quantité anormalement élevée de cystine

protéique dans les lysosomes de leucocytes et fibroblastes des malades [Schneider *et al.*, 1967].

Shulman *et al.*, [1970], se basant sur les résultats de Cohn et Ehrenreich [1969], tentent d'expliquer cette accumulation par une incapacité de la cystine à sortir des lysosomes étant donné son poids moléculaire trop élevé [240Da]. Cependant, ils se rendent compte que cette interprétation est incompatible avec l'absence d'accumulation de cystine dans les lysosomes de personnes saines. De plus, ils montrent qu'un dipeptide proche de la cystine, la cystéine-pénicillamine dont le poids moléculaire est de 269Da, n'entraîne pas la vacuolisation dans les lysosomes normaux, contrairement à ce qui se passe dans les organites cystinotiques. Cela les amène à conclure que la taille n'est pas responsable de l'accumulation de l'acide aminé. Ils émettent alors l'hypothèse d'un système de transport qui faciliterait la sortie de cystine des lysosomes normaux. Ce mécanisme serait inefficace dans les organites d'un sujet malade.

Une dizaine d'années plus tard, cette maladie est étudiée par le biais de la méthode exploitant le lysosomotropisme, c'est-à-dire qui consiste à charger les lysosomes d'ester de cystine, pour ensuite étudier l'efflux de la cystine après l'hydrolyse intralysosomale de l'ester.

Les lysosomes de leucocytes [Steinhertz *et al.*, 1982; Gahl *et al.*, 1982], de lymphoblastes transformés [Jonas *et al.*, 1982] et de fibroblastes [Jonas *et al.*, 1982] de patients cystinotiques ont ainsi été chargés avec de la cystine radioactive et la vitesse de sortie de cette substance a été comparée avec celle mesurée en utilisant des lysosomes de personnes saines. A l'exception de l'équipe de Steinhertz [Steinhertz *et al.*, 1982], toutes les autres ont observé que la sortie de cystine des lysosomes cystinotiques était plus lente. Ils ont également constaté que la vitesse pour les patients hétérozygotes était moitié moindre que celle des individus sains. De plus, cette sortie de l'acide aminé était stimulée par le MgATP alors qu'un analogue de cette substance ou un inhibiteur du transfert des protons l'inhibait.

D'autre part, Gahl *et al.*, [1982] ont démontré que ce phénomène montre une saturabilité indiquant la présence d'un système de transport de la cystine dans la membrane lysosomale.

L'existence de ce transporteur a été définitivement admise quand il a été démontré que la prise de cystine obéit au phénomène de trans-stimulation [Pisoni *et al.*, 1985].

Des expériences sur la régulation du transporteur de la cystine ont montré qu'il est vraisemblablement formé de deux constituants. Il y aurait un composant de base dont le contrôle n'a pas encore été élucidé, et un composant stimuable dont la vitesse est fonction de la combinaison de différents facteurs. Premièrement, l'amplitude du gradient de protons de part et d'autre de la membrane lysosomale [Jonas *et al.*, 1983; Smith *et al.*, 1987; Greene *et al.*, 1987]. Deuxièmement, la présence de cations monovalents qui influence l'amplitude du potentiel de la membrane lysosomale [Smith *et al.*, 1987]. Troisièmement, la présence de cations bivalents dont le mécanisme d'action n'a pas encore été établi [Jonas *et al.*, 1986]. Et enfin, la présence de polyamines dont le rôle est également inconnu [Jonas *et al.*, 1987].

Ce système de transport de la cystine dans la membrane lysosomale est différent de celui trouvé dans la membrane plasmique [Lloyd *et al.*, 1980]

Le transporteur de la cystine n'est pas le seul présent dans la membrane des lysosomes. Il en existe plusieurs autres que nous allons passer en revue. Leur classification est basée sur le type d'acides aminés qu'ils transportent.

2.3.1 Transporteurs d'acides aminés cationiques.

L'étude du transport de la lysine à travers la membrane lysosomale des fibroblastes humains [Pisoni *et al.*, 1985] a fourni la preuve de l'existence d'un autre système de transport que celui décrit pour la cystine.

Des lysosomes ont été chargés avec de l'ester de lysine. Si la concentration en lysine dans le milieu d'incubation augmente, la vitesse de sortie de l'acide aminé croît. Cette trans-stimulation

indique un processus médié par transporteur. Le Q_{10} de 2.2, de même que l'existence de compétiteurs confirment l'existence d'un transporteur.

Pisoni et ses collaborateurs ont continué leurs recherches sur le transporteur lysosomal d'acides aminés cationiques. En étudiant la prise d'arginine par les lysosomes de fibroblastes humains [Pisoni *et al.*, 1987], ils ont montré que ce processus est saturable. De plus, l'influx d'arginine est inhibé par d'autres acides aminés cationiques tels que la D-arginine et la L-lysine, mais n'est pas affecté par la présence d'acides aminés neutres ou anioniques, ni par le méthylester de la L-lysine. Ces observations indiquent que le transporteur semble être capable de se charger d'acides aminés cationiques avec un minimum de 5 atomes de carbone dans la chaîne latérale.

Les auteurs soulignent les différences qui existent entre ce transporteur lysosomal et son équivalent de la membrane plasmique. Ce dernier a une spécificité de substrat moins restrictive (il reconnaît la D-arginine) et a un K_m 8 fois plus important [Christensen *et al.*, 1984]. Dès lors, il semble que ces deux transporteurs sont les produits de gènes différents.

2.3.2 Transporteur pour les petits acides aminés neutres.

La collaboration entre Pisoni, Thoene et Christensen a donné lieu à la découverte de trois transporteurs pour les petits acides aminés neutres dans la membrane des lysosomes de fibroblastes de foetus humain [Pisoni *et al.*, 1987]. Tout d'abord, ils ont étudié la perméabilité de la membrane lysosomale vis-à-vis de la proline. Ce processus a été reconnu saturable, indépendant du sodium et du MgATP. Ils ont établi un "Eadie-Scatchard" qui s'est révélé non linéaire, suggérant deux populations de transporteurs avec des affinités différentes pour l'acide aminé. Le transporteur ayant la plus grande affinité pour la L-proline se charge également d'autres petits acides aminés avec des chaînes latérales d'au plus trois atomes de carbone. L'autre transporteur présentant moins d'affinité est spécifique de la L-proline et de la 3-4 déhydro-L-proline.

En étudiant le transport de la L-alanine, L-sérine et L-thréonine, ils ont constaté que ces trois acides aminés semblent partager un seul et même transporteur. La différence majeure entre ce système et les deux précédents est la compétition importante montrée par la leucine. Pisoni et ses collaborateurs considèrent ce dernier système comme la voie principale du transport des petits acides aminés neutres.

2.3.3. Transporteur pour les acides aminés neutres aromatiques.

Un transporteur a été décrit pour la tyrosine et autres grands acides aminés neutres dans la membrane lysosomale des cellules épithéliales de la thyroïde [Bernar *et al.*, 1986; Tietze, 1989]. Ce transporteur, comme la majorité des autres décrits jusqu'à présent, présente une cinétique saturable, un Q_{10} aux environs de 2 et est indépendant du sodium, potassium et de l'ATP. Parmi les composés utilisés pour les études de compétition, ils ont observé que la cystine, la lysine, la glycine ou encore la proline n'ont pas d'effet. Par contre, la leucine, le tryptophane ou encore la phénylalanine sont de très bons compétiteurs.

Il est à noter que ces auteurs ont été incapables de mettre en évidence un tel transporteur dans les lysosomes de leucocytes humains. Ceci montre soit une différence entre espèces, soit une variation entre types cellulaires.

2.3.4. Transporteur pour les acides aminés dipolaires aromatiques ou ramifiés.

Récemment, Stewart *et al.*, [1989] ont étudié le transport des acides aminés dipolaires ("neutres") aromatiques et ramifiés, au travers de la membrane de lysosomes obtenus à partir de fibroblastes de la peau de fœtus humain. Ils ont mis en évidence deux transporteurs appelés t et l, comparables à ceux rencontrés dans la membrane plasmique du globule rouge [Rosenberg *et al.*, 1980] ou des hépatocytes isolés de rat [Salter *et al.*, 1986].

Certaines différences existent cependant, les transporteurs de la membrane lysosomale étant indépendants du Na⁺ et de l'ATP.

2.3.5 Transporteur pour les acides aminés anioniques.

Collarini *et al.*, [1989] ont étudié le transport du L-aspartate et du L-glutamate dans les lysosomes de fibroblastes humains. Ils ont montré que ce transport suit une cinétique de saturation et qu'il est sodium-indépendant. Ayant mis en évidence les différents critères d'existence d'un transporteur (saturation, inhibition, compétition...), ils ont observé que ce transporteur ressemble à celui présent dans la membrane plasmique avec toutefois: certaines différences, le système lysosomal accepte les formes L et D (le système de la membrane plasmique uniquement la forme L), il montre une préférence pour le groupe aminé en position α (cette préférence n'existe pas au niveau de la membrane plasmique) et plus généralement, le système lysosomal est moins restrictif quant à la longueur et à la taille du substrat transporté.

Ces dernières découvertes de transporteurs sont relativement récentes et très peu ont été faites pour plus d'un type cellulaire. Le cas de la cystine a été le plus étudié car un mauvais fonctionnement de son transporteur entraîne une maladie de surcharge des lysosomes. Il est à noter que ce système est un des deux seuls à être stimulé par la présence d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane lysosomale (le deuxième étant le transporteur des acides aminés cationiques). Il est aussi le seul à être totalement différent du système trouvé dans la membrane plasmique. Pour tous les autres transporteurs des similitudes existent entre le système lysosomal et son équivalent de la membrane plasmique.

2.4. Perméabilité aux sels.

La littérature montre qu'il existe un litige quant à la capacité qu'ont les sels de petits ions tels que KCl et NaCl, d'offrir une protection osmotique aux lysosomes.

Dans les années 50, Appelmans et de Duve [1951] ont montré que les sels testés, KCl et NaCl, ne donnaient qu'une faible protection osmotique. Par contre, MgCl₂, CaCl₂ et l'acétate de sodium donnaient une protection comparable à celle présentée par le saccharose.

A l'opposé, les résultats de Lloyd [1971], de Verity et Brown [1973] et de Casey [Casey *et al.*, 1978] suggèrent que la membrane lysosomale est imperméable au KCl et NaCl. Davidson et Song [1975] donnent une explication à ce litige apparent. Ils ont montré que le changement de la température d'incubation de 37°C à 0°C modifie fortement les propriétés de perméabilité de la membrane lysosomale. Alors qu'elle est relativement imperméable aux sels à 37°C, elle devient beaucoup plus perméable à 0°C. Cela explique que Appelmans et de Duve [1951] ayant travaillé à 0°C montrent une perméabilité plus grande de la bicouche phospholipidique, que l'autre groupe de chercheurs qui tous ont travaillé à 37°C.

Il semblerait donc qu'à la température physiologique, KCl et NaCl ne passent que très lentement la membrane lysosomale. K⁺ étant cependant plus perméable que Na⁺ [Casey *et al.*, 1978]. Les anions physiologiques tels que le bicarbonate et le phosphate sont aussi peu pénétrants, tandis que les ions acétates passent beaucoup plus rapidement. Enfin, le sulfate est l'ion qui passe le moins bien la membrane lysosomale [Forster *et al.*, 1988].

2.5. Perméabilité aux protons.

Dans cette section, nous allons d'une part montrer comment le pH intralysosomal a été mesuré et, d'autre part, comment il est maintenu malgré la digestion de certaines macromolécules telles que les acides nucléiques et les protéines, qui entraîne la libération d'équivalents acides et basiques.

2.5.1. Le pH intralysosomal.

C'est Metchnikoff qui, en 1889, fut le premier à montrer que l'intérieur des vacuoles alimentaires était acide. Rous, pour sa part, a montré en 1925 que des colorants vitaux s'accumulaient en grande majorité dans des particules du système réticuloendothélial. Ces colorants rouges vifs à l'origine prenaient une couleur rouge-brun dans les vésicules (pas encore appelées lysosomes à cette époque). Il en a conclu que ce changement de couleur était une manifestation de l'acidité des granules. En 1950, de Duve et ses collaborateurs ont introduit le concept de lysosomes. Ils caractérisaient ces particules par la présence d'un grand nombre d'hydrolases dont la plupart ont un pH optimal acide.

Différentes techniques ont été développées pour mesurer ce pH intralysosomal [de Duve *et al.*, 1955]

2.5.1.1. Utilisation de colorants vitaux.

Mechnikoff, en utilisant des particules de tournesol, a été le premier à employer cette technique pour mesurer le pH interne des vacuoles alimentaires. D'autres colorants indicateurs de pH ont été utilisés par la suite: Mandell [1970] a, entre autres, utilisé le rouge phénol, le jaune brillant ou encore le bleu de bromophénol. Cela lui a permis de situer le pH de lysosomes de leucocytes entre 5,5 et 6,5 suivant le type d'indicateur choisi. Le manque de précision de cette méthode est expliqué par Reijngoud [1977] comme étant dû à des interactions entre l'indicateur et des composés de la matrice lysosomale autres que les protons.

2.5.1.2. Détermination du pH grâce au lysosomotropisme.

Des études ont montré que de nombreux acides et bases faibles peuvent diffuser à travers les membranes biologiques sous forme non ionisée alors que leur forme ionisée ne pénètre que très lentement.

Des amines ont été utilisées pour déterminer le pH des lysosomes. Une certaine quantité d'amine radioactive est mise en

présence d'une préparation de lysosomes purifiés. L'amine non chargée passe la membrane lysosomale et se charge d'un proton ce qui, comme décrit précédemment, conduit à l'accumulation progressive de la molécule chargée dans l'organite. A l'équilibre, en mesurant le rapport de concentration en amine radioactive de part et d'autre de la membrane, il est possible d'obtenir la différence de pH. Cette technique a permis de déterminer un pH interne de 6 pour un pH externe de 7.5 [Reijngoud *et al.*, 1976; Henning., 1975].

2.5.1.3. Utilisation de sondes fluorescentes.

Les récentes études portant sur les variations de pH intralysosomal sont basées sur l'utilisation de sondes fluorescentes [Harikumaret *al.*, 1983; Moriyama *et al.*, 1984], la fluorescence variant suivant le pH. Une différence de pH de presque 3 unités, entre le milieu externe et la matrice lysosomale a été trouvée par cette technique [Ohkuma *et al.* 1978].

2.5.2. La régulation du pH intralysosomal.

L'acidité du milieu intralysosomal reconnue par tous, le problème suivant est de savoir comment les lysosomes maintiennent ce faible pH.

Deux théories ont été proposées, une prônant un équilibre de type Gibbs-Donnan, l'autre mettant en jeu une pompe à protons.

Les arguments en faveur de l'équilibre de type Gibbs-Donnan sont basés sur les études de perméabilité de la membrane lysosomale aux ions, ayant démontré que cette membrane était perméable aux protons et aux cations monovalents [Goldman et Rottenberg, 1973b; Henning, 1975]. Cependant, ces expériences furent réalisées à 4°C. Or, comme nous l'avons souligné précédemment, à la température physiologique (37°C), Davidson [Davidson *et al.*, 1975] a montré que la membrane lysosomale est imperméable aux cations. Il a alors été suggéré que l'équilibre de Gibbs-Donnan impliquait un mouvement de protons accompagné d'une migration compensatoire d'anions [Reijngoud et Tager, 1975].

Les arguments en faveur d'une pompe à protons lysosomale étaient basés, au départ, sur l'observation que la protéolyse dans les lysosomes était stimulée par l'addition d'ATP [Mego *et al.*, 1972]. Depuis lors, une activité, ATPasique de la membrane lysosomale a été rapportée [Schneider *et al.*, 1981; Titani et Wells, 1974].

L'expérience la plus convainquante quant à l'existence d'une pompe à protons est celle réalisée par Ohkuma *et al.*, [1982]. Ils ont utilisé une sonde fluorescente et l'ont fait endocytée par des cellules en culture, provoquant l'accumulation du marqueur fluorescent dans les lysosomes. En plaçant ces lysosomes chargés dans un spectrofluorimètre, ils ont étudié l'effet de différentes substances sur le pH. Ils ont montré de cette façon qu'en présence de Mg^{++} , l'addition d'ATP provoque l'acidification des lysosomes. Cet effet est inhibé en présence d'un protonophore. Ces résultats suggèrent la présence d'une pompe à protons ATPasique, électrogène. Cette électrogénicité de la pompe est toutefois en désaccord avec les observations de Schneider [1981] faites à partir d'expériences utilisant de la méthylamine radioactive en présence de lysosomes de foie de rat. Cet auteur en effet a montré que l'inhibition du transport d'anions, inhibe l'acidification dépendante de l'ATP des lysosomes. Cela suggère que celle-ci se fait de façon neutre électriquement parlant.

Cependant, Reeves en 1983 [Harikumar *et al.*, 1983] utilisant des lysosomes de rein de rat chargés avec une sonde fluorescente, a montré que l'activation de la pompe à protons par le Mg-ATP provoque une augmentation rapide du potentiel de la membrane lysosomale. Ce changement est bloqué par des protonophores et voit son amplitude diminuer en présence d'anions perméables. De ces résultats, il conclut que la pompe à protons lysosomale est électrogène.

En conclusion, le transport de protons se fait sans doute grâce à une pompe fonctionnant de façon unidirectionnelle depuis le cytoplasme vers les lysosomes. Cette activité ATPasique ne serait liée à aucun autre mouvement d'ions. Une telle pompe est dite électrogène. Il est vraisemblable que le gradient électrochimique généré est dissipé par un flux, simultané mais non lié, d'ions chlorures vers les lysosomes [Forster *et al.*, 1988].

2.6. Perméabilité aux sucres et leurs dérivés.

2.6.1. Disaccharides et polysaccharides.

L'étude de la diffusion des disaccharides et polysaccharides a été réalisée par protection osmotique [Lloyd, 1969] et par vacuolisation [Ehrenreich *et al.*, 1969]. Outre le saccharose, ces auteurs ont testé entre autres, le maltose, le lactose, le tréhalose, la cellobiose et l'isomaltose. Tous les résultats concordent pour affirmer que les dissaccharides ne peuvent pas entrer dans les lysosomes.

Les études de vacuolisation et de protection osmotique avec les tri- et tétrasaccharides montrent que les oligo- et polysaccharides ne traversent pas la membrane. Le haut degré de latence de l'enzyme lysosomale α -glucosidase et l'existence d'une maladie de surcharge des lysosomes conduisant à l'accumulation du substrat de cette enzyme, confirment ces résultats.

2.6.2. Monosaccharides.

2.6.2.1. Les monosaccharides neutres.

Les polysaccharides sont dégradés dans les lysosomes en monosaccharides qui traversent la membrane des lysosomes et entrent dans le cytosol.

Cohn et Ehrenreich [1969] ont examiné une série de pentoses, hexoses et heptoses quant à leur capacité de vacuoliser les macrophages. Ils ont observé que tous étaient actifs et donc diffusibles.

La méthode par protection osmotique a été utilisée [Lloyd, 1969] pour étudier la même question. Elle a amené cet auteur à conclure en accord avec Cohn et Ehrenreich que tous ces sucres neutres peuvent passer la membrane lysosomale avec des vitesses assez similaires. Seules de petites variabilités sont visibles pour les différents isomères. Il existe toutefois une polémique à propos du mécanisme du passage de ces monosaccharides.

Lloyd [1969] explique ses observations en terme de diffusion simple. La vitesse de pénétration serait déterminée par les caractéristiques physicochimiques des composés, notamment leur poids moléculaire et le nombre de ponts hydrogènes qu'ils peuvent former avec l'eau [Stein., 1967]. Il note tout de même que dans des liposomes (vésicules phospholipidiques artificielles où aucune diffusion facilitée ne peut avoir lieu), le glucose de même que le sorbitol et le mannitol ne peuvent entrer [Bangham *et al.*, 1967].

Ce n'est que vers la fin des années 1970 que le mécanisme par diffusion facilitée a commencé à être pris sérieusement en considération. Docherty et ses collaborateurs [1979] suggèrent que les vitesses différentes pour la pénétration des sucres reflètent des différences d'affinité pour le, ou les, transporteurs de la membrane lysosomale. Bien que la stéréospécificité n'ait que peu d'influence, l'inhibition par la phlorizine et la cytochalasine B, de même que le calcul d'un Q10 de 2.8 pour la prise du glucose sont des arguments de ces auteurs en faveur d'un processus utilisant un transporteur.

Ces mêmes auteurs ont ensuite étudié l'effet du pH et des ions sur l'entrée du D-glucose dans des lysosomes de foie de rat. Ils ont observé que de faibles concentrations en cations monovalents inhibent l'accumulation de sucres par les lysosomes, et que la vitesse d'entrée du glucose augmente de façon sigmoïdale avec le pH. Utilisant des agents découplants du gradient de protons, ils ont encore observé que cela n'a pas d'effet sur l'accumulation du D-glucose à pH 7. Ils en ont alors conclu que la prise de D-glucose serait dépendante de l'ionisation d'un site actif spécifique sur un transporteur dans la membrane des lysosomes. La méthode par protection osmotique ne leur permettant pas de mesurer l'affinité du sucre pour le transporteur, ils se sont tournés vers une méthode de mesure directe de la diffusion de sucres radioactifs, en utilisant des lysosomes purifiés [Maguire *et al.*, 1983]. Ils ont ainsi calculé un Km de 48 mM pour le glucose. De plus, si la concentration en D-glucose est inférieure à ce Km, il semble entrer plus vite que le D-ribose à la même concentration. Par contre, si ces deux sucres sont en quantité nettement supérieure au Km, le ribose entre plus rapidement que le glucose. Des expériences de compétition ont

encore montré que la prise de D-glucose radioactif est réduite en présence de D-ribose.

Ces observations ajoutées à l'effet inhibiteur du diéthylstilbestrol [Jadot *et al.*, 1989] semblent indiquer la présence d'un transporteur pour le glucose dans la membrane lysosomale. En outre, il semblerait que le ribose puisse partager ce transporteur [Maguire *et al.*, 1983].

Lors de ses expériences par protection osmotique, Hales avait déjà proposé un transporteur commun pour le glucose et le ribose [Docherty *et al.*, 1979]. Il avait observé une prise plus rapide du ribose que du glucose dans les lysosomes de foie de rat. Lloyd [1969] avait fait la même observation. Mais, alors que Lloyd explique ce fait par une taille plus petite et un contenu moindre en groupements hydroxyls du ribose, Hales affirme que le glucose et le ribose partagent un même transporteur dans la membrane lysosomale. Selon lui, le glucose aurait une plus grande affinité pour le transporteur. Bird *et al.*, [1987] ont contesté ces conclusions de Hales. Selon eux, il existerait deux transporteurs différents pour l'entrée du glucose et du ribose dans les lysosomes. Plus récemment Maguire *et al.*, [1988] ont montré que les résultats de Bird pouvaient s'expliquer sur base d'un mécanisme de diffusion de ces deux sucres utilisant un seul transporteur.

Considérant tous ces résultats, Lloyd [Forster *et al.*, 1988] conclut avec Hales [1984] que l'entrée du glucose dans les lysosomes se fait vraisemblablement par diffusion simple et par diffusion facilitée.

2.6.2.2. Les monosaccharides réduits ou oxydés.

En contraste avec leurs équivalents neutres, les monosaccharides réduits ou oxydés, pénètrent très lentement ou pas du tout, dans les lysosomes: D-mannitol, D-sorbitol, D-gluconate et D-glucuronate offrent une protection osmotique quasi aussi efficace que celle apportée par les disaccharides aux lysosomes de foie de rat [Lloyd., 1969].

Le cas de l'acide sialique a été particulièrement étudié car il est associé à une maladie de surcharge des lysosomes: la

maladie de Salla. Différents groupes de chercheurs se sont penchés sur l'étude du transport de l'acide sialique à travers la membrane lysosomale.

C'est en 1983 que Renlund et ses collaborateurs proposent l'hypothèse postulant que la maladie de Salla est due à un mauvais fonctionnement d'un transporteur actif de l'acide sialique dans les lysosomes. Plus tard, Renlund *et al.*, [1986a] démontrent que l'acide sialique s'accumule plus rapidement et est retenu plus longtemps, dans les cellules malades que dans les cellules contrôles. Dans la même année, Gahl associé à Renlund [Renlund *et al.*, 1986b] donnent une preuve du dysfonctionnement du transporteur de l'acide sialique en faisant des études cinétiques utilisant des lysosomes de fibroblastes malades, chargés avec cet acide. Ils montrent entre autres que la sortie de l'acide sialique se fait plus rapidement pour les lysosomes sains que pour des lysosomes provenant de personnes atteintes.

Jonas [1986b] de même que Mancini *et al.*, [1986] confirment que la pathologie est liée au mauvais fonctionnement d'un transporteur du sucre acide. Mancini *et al.*, [1990] ont montré que la prise de l'acide sialique par des vésicules reconstituées à partir de membranes de lysosomes de rat, est fortement influencée par le gradient de pH existant entre le milieu externe et le milieu intravésiculaire. Le transport est stimulé par le MgATP mais n'est pas affecté par des protonophores. Le phénomène de trans-stimulation a pu être mis en évidence de même qu'un effet de compétition par l'acide glucuronique. Ces auteurs donnent comme conclusion d'une part que les vésicules reconstituées sont de bons systèmes pour les études cinétiques du transport de solutés à travers la membrane lysosomale et d'autre part, ils suggèrent l'existence dans cette membrane d'un transporteur spécifique pour l'acide sialique et d'autres sucres acides.

2.6.3. N-acétyl D-glucosamine et N-acétyl D-galactosamine.

La N-acétyl D-glucosamine et la N-acétyl D-galactosamine sont des produits de la dégradation lysosomale des glycoprotéines et glycosaminoglycans. La diffusion de ces sucres a

été étudiée sur des lysosomes purifiés de foie de rat par une méthode directe [Jonas *et al.*, 1989].

La prise de ces deux dérivés glucidiques est spécifique, saturable et dépendante de la température. Le Q10 calculé s'élève à 2.3. Aucun effet du NaCl, KCl ou MgATP n'a été observé. Par contre, la cytochalasine B inhibe leur entrée. La présence de D-glucose, L-fucose, D-glucosamine ou d'acides aminés cationiques ou neutres, n'affecte pas le transport de ces deux sucres. Suite à toutes ces observations, ces auteurs suggèrent que les lysosomes de foie de rat possèdent un système de transport hautement spécifique pour la N-acétyl D-glucosamine et la N-acétyl D-galactosamine.

2.7. Perméabilité aux lipides et leurs dérivés.

La maladie de Wolman est une pathologie humaine de surcharge des lysosomes en lipides due à une insuffisance de la lipase acide lysosomale. Il en résulte une accumulation de triacylglycérols et d'esters de cholestérol. De ce fait, il semblerait que la membrane lysosomale est imperméable à ces lipides neutres [Warnet *et al.*, 1981].

Les phospholipides sont dégradés dans les lysosomes, sans doute par une action séquentielle de la phospholipase C et de la lipase acide, en 2 acyl-glycérol ou inositol [Matsuzawa *et al.*, 1980]. Le glycérol et la sérine sont diffusibles [Badenoch-Jones *et al.*, 1974] de même que l'éthanolamine [Lloyd., 1988]. Par contre, la méthode par protection osmotique a montré que l'inositol ne passe pas la membrane [Lloyd., 1969].

L'existence de plusieurs maladies humaines: sphingolipidoses, résultant de l'absence ou du mauvais fonctionnement d'une ou de plusieurs enzymes lysosomales, est un bon argument montrant que ces complexes lipidiques et glycolipidiques sont incapables de traverser la membrane. Notons qu'il existe dans les lysosomes des voies métaboliques permettant de dégrader ces molécules en monosaccharides, acides gras ou sphingosine.

2.8. Perméabilité aux nucléotides et nucléosides.

La latence des activités lysosomales des ribonucléases et déoxyribonucléases est un argument en faveur de l'imperméabilité de la membrane lysosomale vis-à-vis des polynucléotides.

Les nucléosides provenant de la dégradation intralysosomale des acides nucléiques passent la membrane de ces organelles [Burton *et al.*, 1975]. Pisoni et ses collaborateurs [1989] ont montré que ce passage présente la majorité des critères caractéristiques d'un système mettant en jeu un transporteur: saturabilité, Q_{10} de 2, compétition: les bases puriques sont reconnues plus fortement que les bases pyrimidiques. Il faut cependant noter que ces résultats obtenus à partir de lysosomes purifiés de fibroblastes humains, n'ont pas permis la mise en évidence du phénomène de trans-stimulation.

3. BUT DU TRAVAIL.

De nombreux arguments tendent à montrer que le transport des monosaccharides dans les lysosomes s'effectue par diffusion facilitée [Maguire *et al.*, 1988]. Cependant, ce mécanisme ne fait pas l'unanimité [Bird *et al.*, 1987].

Nous avons choisi d'étudier la perméabilité de la membrane lysosomale vis-à-vis d'un monosaccharide particulier: le glucose. Cette question a déjà fait l'objet de nombreuses recherches. Lloyd [1969] en choisissant la méthode par protection osmotique, a montré que le glucose est pénétrant. Mais, les limites de sa technique ne lui ont par permis de fournir des renseignements sur la cinétique de diffusion de ce sucre. Avec l'utilisation de glucose radioactif, Hales et ses collaborateurs [1982] ont amélioré la technique d'étude et ont donné des arguments cinétiques en faveur d'une diffusion facilitée. Cette méthode très efficace, mais malheureusement aussi très astreignante étant donné qu'elle exige des lysosomes purifiés, n'a cependant pas permis de trancher entre les deux mécanismes envisagés ci-dessus. En effet, ces auteurs envisagent la possibilité de l'existence d'une composante de diffusion simple et d'une composante de diffusion facilitée.

Une technique originale de l'étude du transport du glucose à travers la membrane des globules rouges a été mise au point par Langdon [Langdon *et al.*, 1973]. La première étape consiste à introduire de la glucose oxydase dans des "fantômes" de globules rouges. Ensuite, ceux-ci sont mis en présence de glucose. Les mesures d'activité de la glucose oxydase sous différentes conditions permettent d'acquérir des données sur la cinétique de diffusion de ce sucre à travers la membrane des globules rouges. Ce procédé tire profit d'une part de la possibilité qu'ont les macromolécules d'entrer dans les globules rouges durant la lyse [Seeman *et al.*, 1967], et d'autre part de la capacité de cette membrane à recouvrir ses propriétés d'imperméabilité vis-à-vis des petites et grosses molécules, dès qu'elle est mise dans un tampon isotonique chaud [Sen *et al.*, 1964].

Dans ce travail nous désirons extrapoler cette méthode aux lysosomes. Pour cela, il nous faut introduire la glucose oxydase dans les lysosomes. La voie d'accès que nous avons choisie, est

celle de l'endocytose. En injectant la glucose oxydase à un rat par voie intraveineuse, nous espérons qu'elle va atteindre les lysosomes et s'y accumuler. Si tel est le cas, nous pensons que les mesures d'activité de l'enzyme endocytée sur les granules intacts d'une fraction L obtenue par centrifugation différentielle, en présence de glucose, devrait nous donner de bonnes indications quant à la cinétique de la diffusion de ce sucre à travers la membrane lysosomale.

Cette technique a le double intérêt d'allier les avantages de la protection osmotique (ne nécessite pas de lysosomes purifiés) et ceux de la méthode directe (possibilité d'étudier la cinétique du transport vu les faibles concentrations en glucose requises).

CHAPITRE II: TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES.

Ce chapitre résume les principales techniques expérimentales utilisées dans ce travail. Les conditions précises de chaque expérience sont mentionnées dans la légende des figures.

1. TECHNIQUE DE FRACTIONNEMENT.

1.1. Préparation d'un homogénat.

Toutes les expériences décrites ont été réalisées avec des rats mâles Wistar de 200 à 300 g, mis à jeun 20 heures avant le début de l'expérience.

La glucose oxydase utilisée est diluée dans du NaCl 0.9 % et injectée dans la veine fémorale de l'animal sous légère anesthésie à l'éther. La dose injectée et les temps d'injection sont notés dans la légende des figures.

Afin d'éviter la mort de l'animal par hypoglycémie, 2 ml de glucose 2 M lui sont administrés par voie intrapéritonéale directement après l'injection de glucose oxydase.

Pour des temps d'injection supérieurs à 1 h 30', une deuxième administration de glucose est pratiquée environ 1 h après la première.

Après le sacrifice de l'animal, le foie est rapidement mis sous perfusion par injection de NaCl 0.9 % glacé dans l'aorte, à un débit de 10 ml par minute. Le temps de perfusion est déterminé par une appréciation visuelle de la couleur du foie (blanchiment).

Le foie est ensuite prélevé, pesé, découpé en fines lamelles dans du saccharose 0.25 M glacé et broyé à l'aide d'un homogénéiseur coaxial (Potter- Elvehjem).

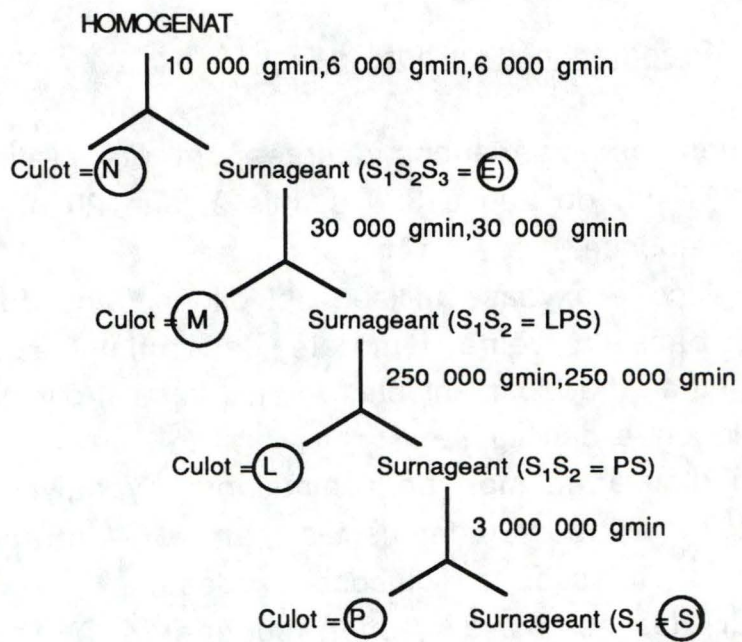


Schéma 1

1.2. Centrifugation différentielle.

L'homogénat obtenu est soumis au schéma de centrifugation différentielle décrit par de Duve *et al.*, [1955] et représenté au schéma n°1. La séparation des granules est principalement basée sur leur différence de taille.

Un volume connu de l'homogénat est centrifugé pendant un temps déterminé à une certaine vitesse, ce qui entraîne la sédimentation des granules les plus volumineux. Le surnageant est recueilli et centrifugé à une vitesse supérieure de sorte que ce sont des granules de taille inférieure qui sédimentent. Le surnageant est à nouveau recueilli et centrifugé à une vitesse encore plus élevée et ainsi de suite jusqu' à l'obtention de 5 fractions enrichies en certains organites:

a) Fraction N: contient essentiellement les noyaux et les débris cellulaires.

b) Fraction M: appelée fraction mitochondriale lourde, est enrichie en mitochondries mais contient également des lysosomes et des peroxysomes.

c) Fraction L: appelée fraction mitochondriale légère, est enrichie en lysosomes et en peroxysomes.

d) Fraction P: appelée fraction postmitochondriale ou microsomale, contient essentiellement des fragments de réticulum endoplasmique, de la membrane plasmique et de l'appareil de Golgi.

e) Fraction S: ou fraction "soluble", contient tous les éléments non sédimentables dans les conditions de centrifugation utilisées pour l'obtention de la fraction P.

Pour certaines expériences, nous avons utilisé des fractions mitochondriales totales (M+L), celles-ci sont obtenues en soumettant directement le surnageant recueilli après l'obtention de la fraction N aux conditions de centrifugation permettant l'obtention de la fraction L.

La représentation graphique des résultats expérimentaux est celle préconisée par de Duve *et al.*, [1955]. Chaque fraction est représentée par un rectangle dont la hauteur représente l'activité spécifique relative, c'est-à-dire le rapport de l'activité spécifique dans la fraction sur l'activité spécifique dans

l'homogénat. La base du rectangle correspond à la quantité de protéines trouvées dans la fraction rapportée à la somme des protéines trouvées dans chacune des 5 fractions. La surface du rectangle représente donc le pourcentage d'activité retrouvé dans la fraction.

Pour tous les dosages effectués, (protéiques et enzymatiques), un calcul de récupération sur le fractionnement est réalisé. Pour cela, nous rapportons la somme des activités mesurées dans les fractions N, M, L, P et S à l'activité mesurée dans l'homogénat (E+N).

1.3. Centrifugation isopycnique.

Ce type de centrifugation permet de séparer les granules suivant leur densité. Les organites sédimentent dans un gradient de densités croissantes jusqu'à ce qu'ils atteignent la zone correspondant à leur propre densité où ils s'équilibrent.

Les centrifugations isopycniques réalisées dans ce travail ont toutes été faites à partir de fractions mitochondriales totales déposées au sommet de gradients continus de saccharose. Les limites de densité utilisées de même que les conditions de centrifugation sont précisées dans la légende des figures. Après la centrifugation, le tube est coupé en tranches de façon à séparer des fractions de densité croissante qui seront analysées ultérieurement.

La représentation graphique des résultats est celle préconisée par Beaufay *et al.*, [1974] qui consiste à représenter chaque fraction par un rectangle dont la hauteur (la fréquence) correspond à l'activité d'une enzyme mesurée dans la fraction, exprimée en pour-cent de la somme des activités mesurées dans toutes les fractions et rapportée à l'incrément de densité caractérisant cette fraction. La base de ce rectangle représente les densités limites de cette fraction.

Ici également, un calcul de récupération est réalisé. Pour cela, nous rapportons la somme des activités mesurées dans toutes les fractions du gradient à l'activité mesurée dans la fraction M+L dont un échantillon a été déposé au sommet du gradient.

Tableau des dosages enzymatiques

<u>Enzyme</u>	<u>Substrat</u>	<u>Conc.</u>	<u>pH</u>	<u>Mesure</u>	<u>Références</u>
Arylsulfatase	p-nitrocatéchol-sulfate	20 mM	5	colorimétrique du nitrocatéchol	Bowers <i>et al.</i> [1967]
β-Galactosidase	p-nitrophényl-β D galactopyranoside	3.75 mM	3.6	colorimétrique du p-nitrophénol	Vaes [1966]
Cathepsine C	glycyl-L-arginine-β-naphtylamide	0.25 mM	6	colorimétrique de la naphtylamine	Jadot <i>et al.</i> [1984]
Cytochrome C oxydase	cytochrome C	17 μM	7.4	spectrophotométrique du cytochrome réduit	de Duve <i>et al.</i> [1955]
N-Acétyl-glucosaminidase	p-nitrophényl-N-acétyl-β D glucosaminide	4 mM	5	colorimétrique du p-nitrophénol	Vaes [1966]
Phosphodiesterase alcaline	thymidine 5' mono phosphate p-nitrophényl ester	1.5 mM	9.6	colorimétrique du p-nitrophénol	Beaufay <i>et al.</i> [1967]

1.4. Enzymes de référence.

Les mesures d'activité d'enzymes marqueurs, c'est-à-dire d'enzymes spécifiquement associées à un type de granules [de Duve et al., 1955] permettent de connaître la proportion de ce type de granule dans une fraction donnée. L'utilisation de ces enzymes marqueurs repose sur le postulat selon lequel une enzyme de référence doit présenter une localisation intracellulaire unique et une homogénéité biochimique, c'est-à-dire qu'elle doit se trouver en quantité identique dans tous les granules d'un même type.

Dans ce travail, nous avons choisi de mesurer l'activité de la phosphodiesterase alcaline pour repérer la membrane plasmique, l'activité de la cytochrome C oxydase pour repérer les mitochondries et l'activité de plusieurs hydrolases acides pour repérer les lysosomes (cathepsine C, β -galactosidase, arylsulfatase, N-acétylglucosaminidase).

2. DOSAGES ENZYMATIQUES.

2.1. Méthodes générales.

Le tableau ci-contre donne un résumé des conditions expérimentales utilisées pour le dosage de différentes enzymes marqueurs ainsi que les références bibliographiques décrivant ces méthodes plus en détail.

2.2. Mesure de l'activité de la glucose oxydase.

Les conditions expérimentales utilisées pour doser la glucose oxydase dérivent de celles proposées par Brown *et al.*, [1977]. La préparation enzymatique est ajoutée au milieu d'incubation suivant: Tris-HCl 5 mM pH 7.4, ortho-dianisidine 0.16 mM, saccharose 250 mM, peroxydase de raifort 0.1 mg et glucose 10 mM (à noter que la concentration en glucose peut varier en fonction du type d'expérience, tout changement sera indiqué dans la légende des figures). Le volume total du test est de 1 ml. Les mesures d'activités totales se font en présence d'un détergent (du triton X-100 à 0.1%) provoquant la rupture des membranes

biologiques [Wattiaux, 1966]. Les mesures d'activité libre ce font en absence de ce détergent.

Le principe du dosage de la glucose oxydase est le suivant: la glucose oxydase en présence d'oxygène oxyde le glucose en α -gluconolactone avec production de peroxyde d'hydrogène. Celle-ci, en présence de peroxydase oxyde l'ortho-dianisidine. Une mesure spectrophotométrique de l'ortho-dianisidine oxydée est faite à 450 nm.

3. Dosage des protéines.

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode décrite par Lowry [Lowry et al., 1951].

4. PURIFICATION DES LYSOSOMES.

Pour la réalisation de certaines expériences de ce travail, nous avons utilisé des lysosomes purifiés. La technique de purification choisie est celle de l'électrophorèse en flux continu décrite par ZY qui sépare les lysosomes des autres organites sur base de la différence de charge à la surface de leurs membranes.

Le principe de l'électrophorèse peut être résumé comme suit: une solution électrolytique de pH adéquat migre à travers les lignes de force d'un champ électrique. L'échantillon est injecté de façon continue au sommet de la chambre de séparation. Entraîné par le flux, les composants descendent dans la chambre et traversent le champ électrique. L'angle formé par la direction du flux et la direction prise par l'échantillon dépend de la vitesse du flux d'une part et de la mobilité électrophorétique d'autre part.

La méthode utilisée pour purifier les lysosomes est une modification de la technique décrite par Stahn *et al.*, [1970]. Brièvement, une fraction mitochondriale légère est "relavée" une fois dans du tampon triéthanolamine 10 mM/ acide acétique 10 mM/ EDTA 1 mM/ saccharose 0.25 M porté à pH 7.4 avec du NaOH. Cette fraction est ensuite centrifugée à 600 g pendant 5 min de façon à éliminer les particules susceptibles de former des agrégats.

Le surnageant est injecté en continu dans la chambre de séparation à une vitesse de 1.5 ml/h. L'appareil d'électrophorèse

(Elphor Vap 22, Bender et Hobein, Munich) est réglé de la façon suivante: intensité du champ électrique: 140 V/cm, température: 5°C, vitesse d'écoulement du tampon d'électrophorèse est de 20 ml/h/fraction. Un dosage rapide de la glucose oxydase est réalisé sur les trente fractions récoltées. Ensuite, les cinq fractions se situant de part et d'autre du pic d'activité sont rassemblées et la fraction ainsi obtenue est utilisée pour les expériences portant sur la perméabilité au glucose de la membrane lysosomale.

CHAPITRE III. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1. MISE AU POINT DU DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DE LA GLUCOSE OXYDASE.

1.1 Introduction.

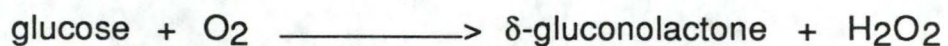
Comme nous l'avons précisé dans le paragraphe "but du travail", nous souhaitons pouvoir étudier la perméabilité au glucose de la membrane lysosomale, en dosant l'activité de la glucose oxydase endocytée. Dès lors, il est essentiel de déterminer les conditions dans lesquelles vont se faire les dosages d'activité.

Nous devons donc, d'une part, déterminer la composition du milieu d'incubation et, d'autre part, choisir une technique de mesure de l'activité de l'enzyme.

Tout d'abord, nous avons déterminé les constituants du test. A titre de référence, nous avons pris les conditions décrites par Segal *et al.* [1977] que nous avons modifiées.

Les principaux changements apportés concernent le pH, que nous avons choisi à 7.4 pour respecter les conditions physiologiques, et l'addition de saccharose à une concentration isotonique. Nous avons vérifié que les composants du test n'altèrent pas l'intégrité de la membrane lysosomale. En effet, il va de soi que les études de perméabilité membranaire nécessitent des lysosomes aussi intacts que possible.

Ensuite, nous avons choisi la technique la plus adéquate pour mesurer l'activité de l'enzyme. Sur base du principe de la réaction de la glucose oxydase:



au moins deux techniques de mesure sont possibles. Soit, un dosage colorimétrique utilisant l'oxydation de l'o-dianisidine par le peroxyde d'hydrogène en présence de peroxydase (les conditions du dosage sont celles décrites dans le chapitre "Techniques expérimentales"), soit un dosage oxypolarographique mesurant la consommation d'oxygène. Dans ce cas, le test se compose uniquement d'un tampon, du substrat, du saccharose et de l'enzyme.

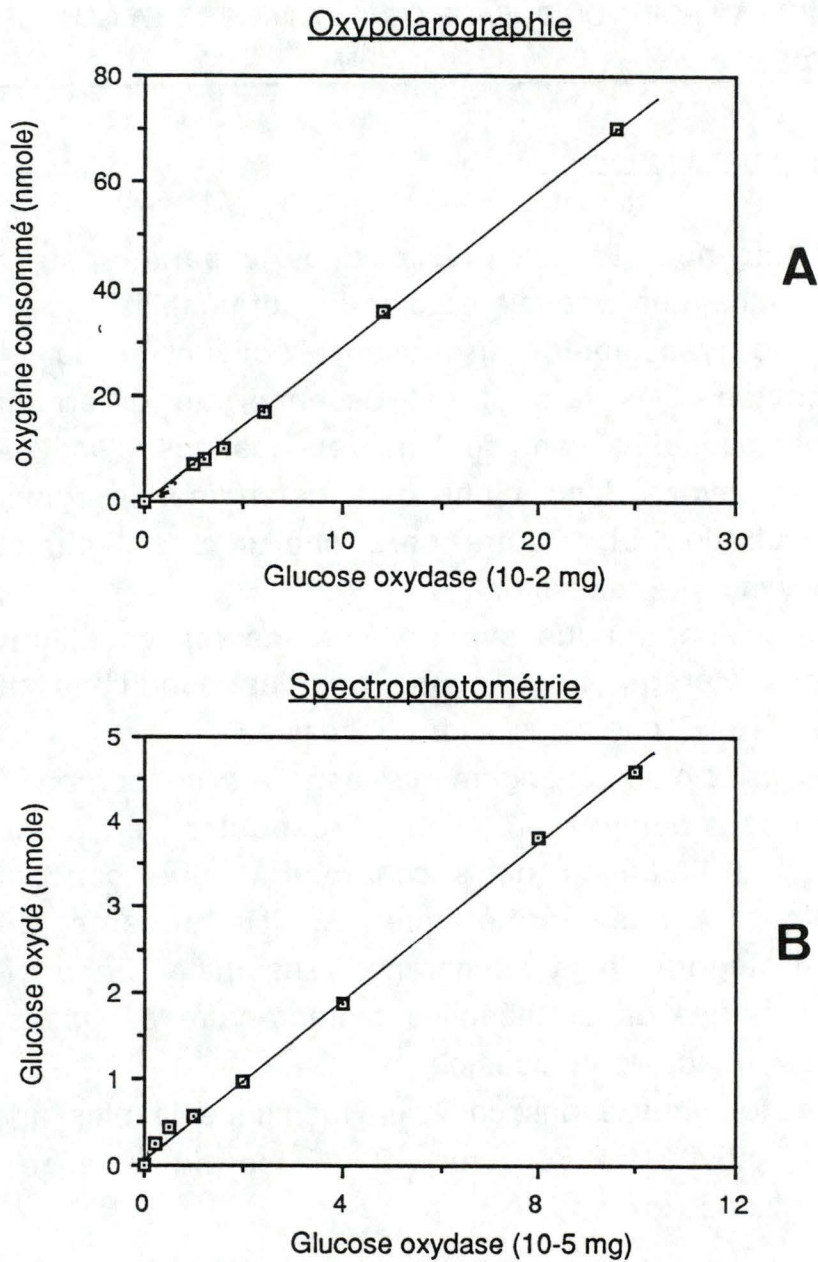


FIGURE 1. Mesure de la sensibilité de deux techniques de dosage de la glucose oxydase.

Méthode par oxypolarographie (A): évolution de la vitesse de consommation d'oxygène pour des quantités croissantes d'enzyme, en présence de glucose 10 mM, tampon Tris-HCl 5 mM pH 7.4, saccharose 0.250 M.

Méthode par spectrophotométrie (B): évolution de la vitesse d'oxydation du glucose 10 mM pour des quantités croissantes d'enzyme en présence de peroxydase 0.1 mg, Tris-HCl 5 mM pH 7.4, ortho-dianisidine 0.16 mM et saccharose 0.250 mM.

Ces deux techniques ont été comparées au point de vue de leur sensibilité.

1.2. Résultats.

Pour vérifier que la membrane lysosomale n'est pas altérée par les composants nécessaires au dosage, nous avons procédé de la façon suivante: à un milieu contenant du tampon Tris-HCl, du saccharose, de la peroxydase, de l'ortho-dianisidine et de l'eau (pour les concentrations, se référer au chapitre "Techniques expérimentales"), nous avons ajouté la préparation enzymatique à savoir: une fraction L obtenue par centrifugation différentielle.

Sur un aliquot de 100 μ l, nous avons fait des mesures d'activités libre et totale de la N-acétylglucosaminidase. Les activités libres mesurées ne dépassent jamais 7 % de l'activité totale.

De ceci, nous pouvons conclure que les conditions du test, n'altèrent pas la membrane des lysosomes. En effet, ces pourcentages d'activité libre n'excèdent pas ceux que nous obtenons généralement lors des dosages d'activité libre de la N-acétylglucosaminidase sur des granules non soumis aux constituants du test de glucose oxydase.

L'étape suivante a consisté à déterminer la différence de sensibilité entre la mesure par spectrophotométrie et la mesure par oxypolarographie. Dans ce but, nous avons mesuré les activités enzymatiques pour des quantités décroissantes d'enzyme en présence de glucose 10 mM.

Les figures 1a et 1b montrent les résultats obtenus. Nous observons que les limites de détection de l'activité de l'enzyme par oxypolarographie (fig.1a) sont de l'ordre de 0.2×10^{-2} mg de glucose oxydase par test tandis que par spectrophotométrie (fig.1b), elles sont de l'ordre de 0.2×10^{-5} mg de glucose oxydase par test. La sensibilité de la spectrophotométrie semble donc être 1000 fois supérieure à celle de l'oxypolarographie. De ce fait, nous avons adopté la mesure par spectrophotométrie.

2. Endocytose de la glucose oxydase par le foie de rat.

2.1. Introduction.

Avant de pouvoir utiliser cette enzyme dans les études intracellulaires portant sur la perméabilité de la membrane lysosomale, il nous faut vérifier qu'elle est captée par le foie, qu'elle va dans les lysosomes et qu'une fois dans ces organites, elle reste active pendant un certain temps. Aussi, dans cette seconde partie de notre travail, nous avons étudié la localisation de la glucose oxydase.

Toutes les expériences rapportées dans cette partie ont été réalisées à partir de rats ayant reçu par injection intraveineuse, une dose de 5 mg de glucose oxydase par 100 g de poids corporel. Le temps écoulé entre l'injection et le sacrifice de l'animal varie entre 1 et 180 minute(s).

Les techniques choisies pour caractériser la localisation subcellulaire de la glucose oxydase sont la centrifugation différentielle [de Duve *et al.*, 1955] et la centrifugation isopycnique en gradient de densité [Beaufay *et al.*, 1974]

Sur les préparations obtenues après l'application d'une de ces 2 techniques, nous avons dosé la glucose oxydase, des enzymes caractéristiques des lysosomes (cathepsine C et arylsulfatase) et une enzyme de la membrane plasmique (phosphodiesterase alcaline). Cette dernière a été dosée uniquement lorsque le temps d'injection était court.

Des expériences d'activation des lysosomes ont également été réalisées sur des fractions L obtenues après centrifugation différentielle. Ces expériences sont basées sur la propriété de latence des enzymes lysosomales. Lorsque des lysosomes sont mis dans un milieu isotonique et que leur membrane est bien conservée, les enzymes qu'ils renferment n'ont pas accès à leur substrat. Elles sont dites latentes. L'activité mesurée dans ces conditions est très faible ($\pm 10\%$) et est appelée activité libre. Si la membrane des lysosomes est tout-à-fait imperméable au substrat, elle indique le taux d'enzyme extérieure

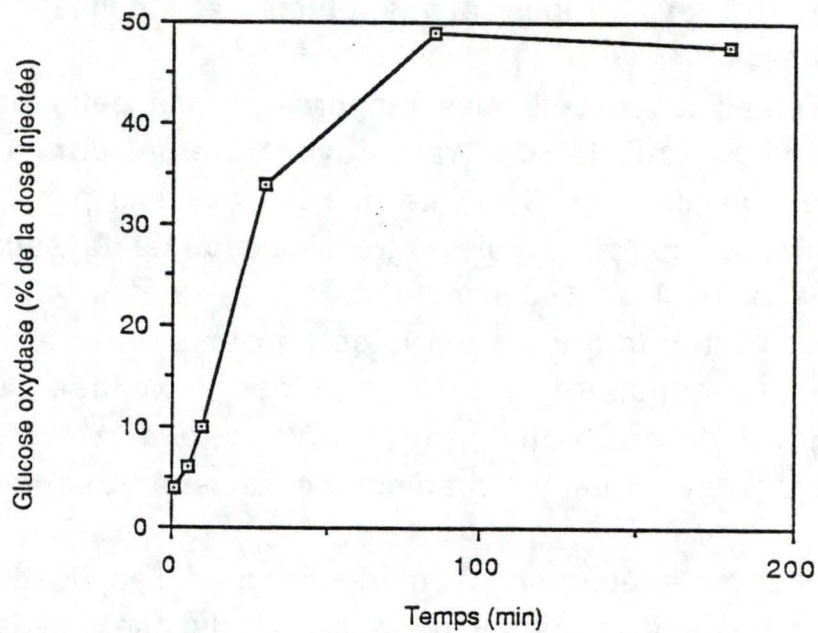


FIGURE 2. Evolution du pourcentage de glucose oxydase présente dans le foie de rat en fonction du temps séparant l'injection d'enzyme et le sacrifice de l'animal.

L'activité de la glucose oxydase est mesurée dans l'homogénat de foie de rats sacrifiés à des temps croissants après l'injection de 5 mg de glucose oxydase par 100 g de poids corporel. La quantité d'enzyme est exprimée en pour-cent de la quantité injectée.

aux granules et est donc une mesure de l'état de conservation de la membrane lysosomale. Si dans le milieu, nous ajoutons un agent capable d'altérer la membrane, tel que le triton X-100, les enzymes vont pouvoir rencontrer leur substrat. L'activité mesurée de cette façon est appelée activité totale. Il existe différents traitements qui permettent d'activer les enzymes lysosomales. Outre le triton X-100, nous avons utilisé la congélation/ décongélation, le système xanthine/ xanthine oxydase et le choc hypotonique. L'enzyme lysosomale de référence prise dans ces expériences est la N-acétylglucosaminidase.

2.2.Résultats.

2.2.1.Endocytose de la glucose oxydase.

La figure 2 montre l'évolution de la quantité de glucose oxydase dans le foie pour des temps d'injection allant de 1 à 180 minute(s).

Nous observons que le pourcentage d'enzyme dans le foie croît avec le temps d'injection jusqu'à atteindre un maximum de 48% de la dose injectée pour une durée d'injection de 90 minutes.

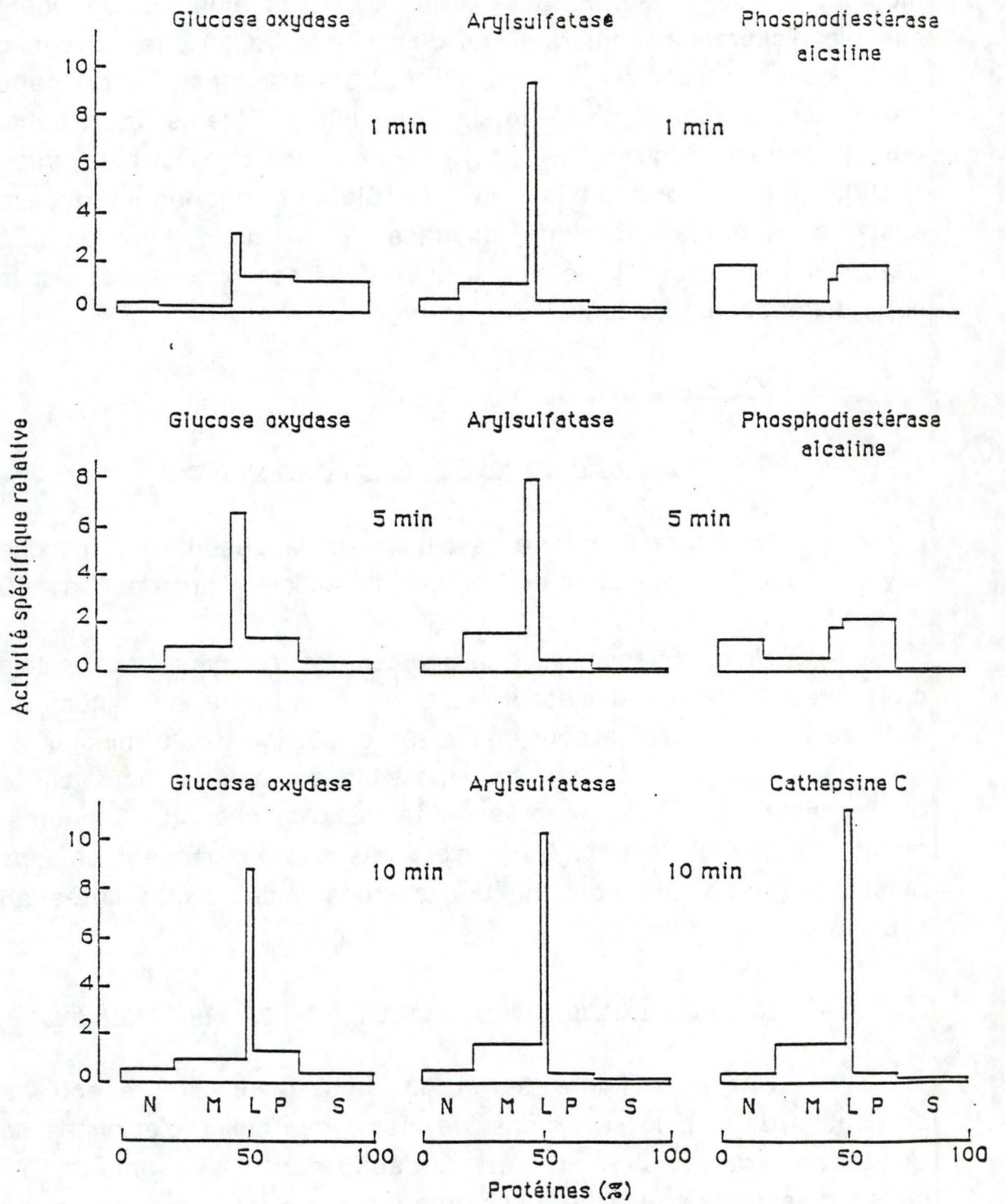
Le fait qu'il est encore possible de mesurer une activité de l'enzyme dans le foie après un temps d'injection de 3 heures, montre que la glucose oxydase n'est pas altérée pendant ce laps de temps. De ce fait, nous ne dépasserons jamais cette durée au cours de ce travail.

2.2.2.Distribution après centrifugation différentielle.

Dans les figure 3a et 3b, nous avons représenté la distribution de la glucose oxydase, de même que celles d'enzymes de référence: cathepsine C et arylsulfatase (lysosomes), et phosphodiesterase alcaline (membrane plasmique), en fonction du temps écoulé entre l'injection et le sacrifice de l'animal.

Une évolution de la distribution de la glucose oxydase est visible lorsque le temps augmente. Après 1 minute, la glucose oxydase est essentiellement associée aux fractions P et S. Plus tard, son profil de distribution rejoint progressivement celui des

A



B

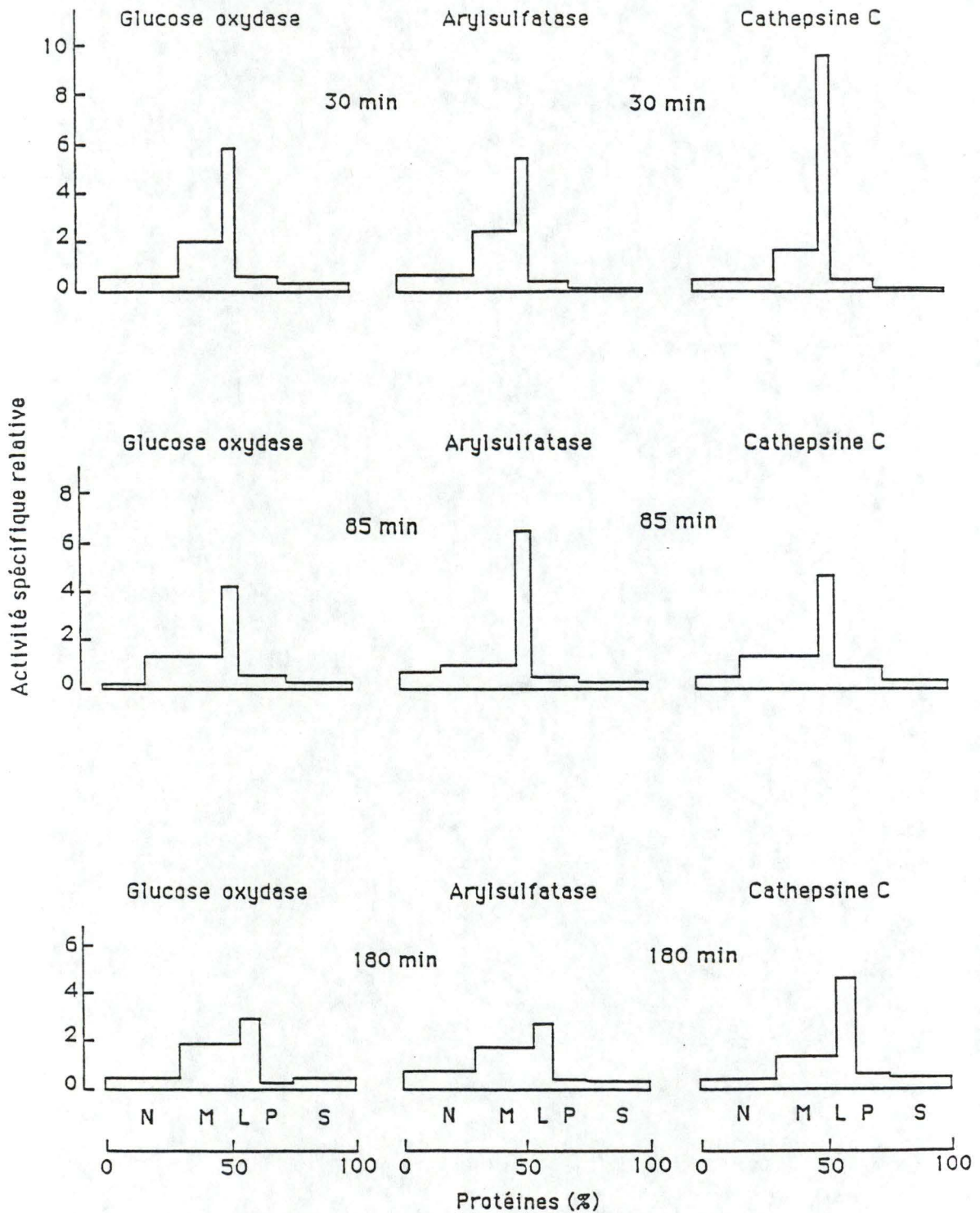


FIGURE 3AB. Profil de distribution de la glucose oxydase après centrifugation différentielle.

Le profil de distribution de la glucose oxydase (injectée à une dose de 5 mg/100 g de poids corporel) est établi à des temps croissants après l'injection, en mesurant son activité enzymatique. Les profils de distribution d'enzyme de référence sont également présentés: arylsulfatase et cathepsine C (lysosomes), phosphodiesterase alcaline (membrane plasmique).

enzymes lysosomales: arylsulfatase et cathepsine C. Nous pouvons dès à présent penser que la glucose oxydase a bien atteint les lysosomes.

2.2.3. Distribution après centrifugation isopycniq.

C'est uniquement à partir de fractions mitochondriales totales qu'ont été réalisées les centrifugations isopycniques dont les résultats sont présentés ci-dessous.

Les temps écoulés entre l'injection de glucose oxydase et le sacrifice de l'animal sont de 30 et 180 minutes. Dans les deux cas, nous avons représenté les profils de distribution de la cathepsine C et de l'arylsulfatase à côté de celui de la glucose oxydase.

La figure 4 montre les résultats obtenus pour 30 minutes d'injection. Nous observons que la distribution de la glucose oxydase est plus semblable à celle de l'arylsulfatase qu'à celle de la cathepsine C.

L'arylsulfatase est une enzyme qui se trouve à 70% dans les lysosomes des cellules parenchymateuses du foie et pour 30% dans les cellules endothéliales [Munthe-Kaas *et al.*, 1976]. Ces cellules endothéliales sont caractérisées par la présence à leur surface de récepteurs à mannose [Hubbard *et al.*, 1979]. Pazur et ses collaborateurs [1963] ont déterminé la composition en hydrates de carbone de la glucose oxydase. Ils ont montré que cette enzyme est constituée pour 16% de sucres, 14% étant du mannose. Cela explique que la glucose oxydase, captée en majorité par des cellules endothéliales, montre une distribution proche de celle de l'arylsulfatase.

Cette figure nous indique encore que la glucose oxydase s'accumule dans les fractions les plus denses du gradient. Afin de vérifier que cela correspond bien à sa zone de densité d'équilibration, nous avons choisi d'autres limites de densité pour la centrifugation isopycniq. réalisée après 180 minutes d'injection.

La figure 5 nous montre que les granules contenant la glucose oxydase s'équilibrent à des densités se situant entre 1.22

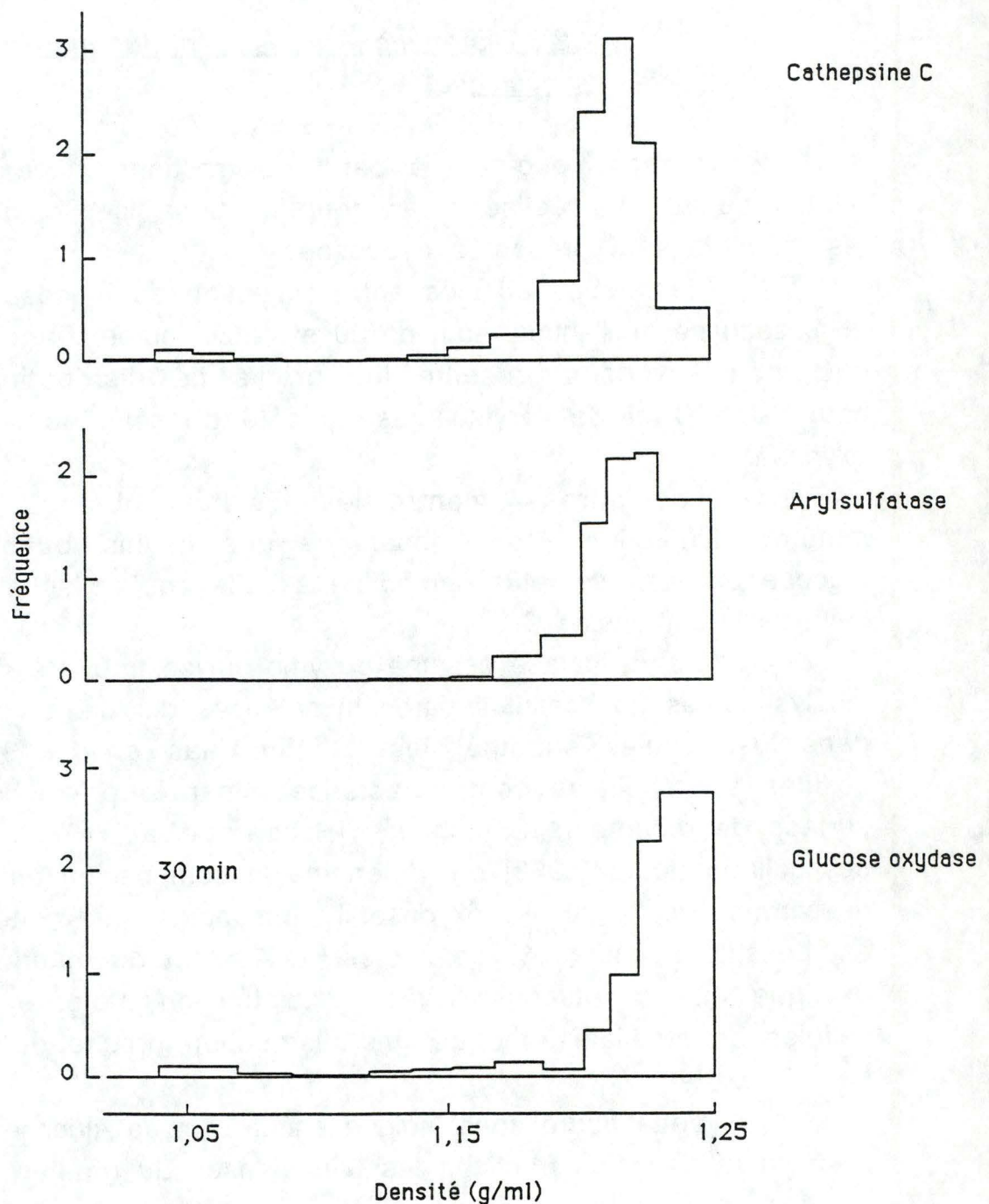


FIGURE 4. Profil de distribution de la glucose oxydase après centrifugation isopycnique d'une fraction ML dans un gradient de saccharose.

La fraction ML est préparée à partir du foie d'un rat ayant reçu une injection de 5 mg de glucose oxydase/100g de poids corporel et sacrifié 30 minutes après cette injection. Les profils de distribution d'enzyme de référence des lysosomes sont également présentés: arylsulfatase et cathepsine C. Les limites de densité choisies pour ce gradient valent 1.05 et 1.25 g/ml. La centrifugation a été réalisée à 39000 tours par minute dans un rotor spinco SV 65.

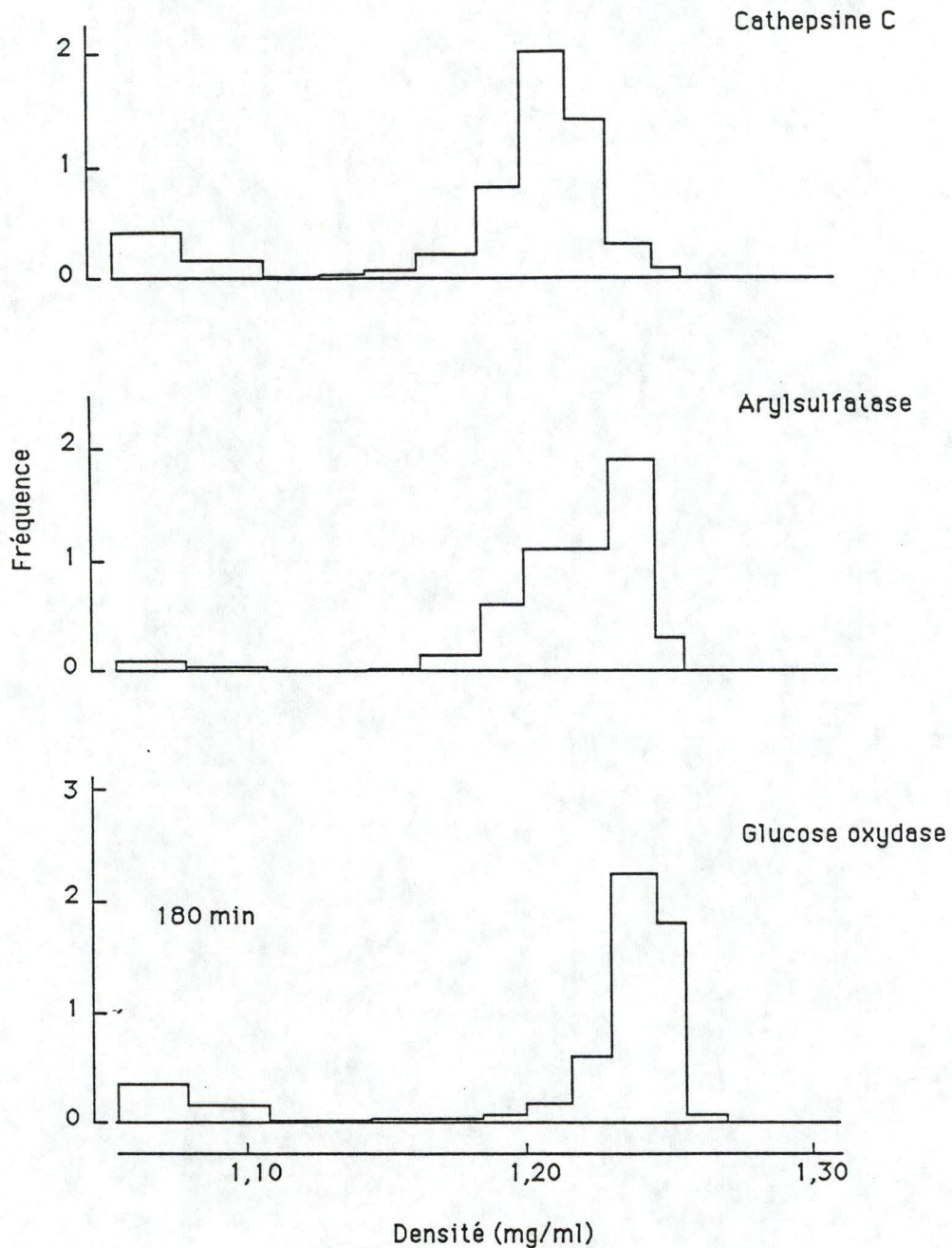


FIGURE 5. Profil de distribution de la glucose oxydase après centrifugation isopycnique d'une fraction ML dans un gradient de saccharose.

La fraction ML est préparée à partir du foie d'un rat ayant reçu une injection de 5 mg de glucose oxydase/100g de poids corporel et sacrifié 180 minutes après cette injection. Les profils de distribution d'enzyme de référence des lysosomes sont également présentés: arylsulfatase et cathepsine C. Les limites de densité choisies pour ce gradient valent 1,09 et 1,32 g/ml. La centrifugation a été réalisée à 39000 tours par minute dans un rotor spinco SV 65.

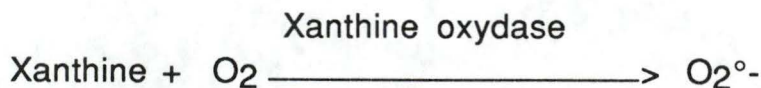
g/ml et 1.25 g/ml. Nous constatons également que les résultats illustrés par cette figure confirment ceux montrés à la figure précédente. A savoir que la glucose oxydase s'accumule sans doute dans les lysosomes des cellules endothéliales.

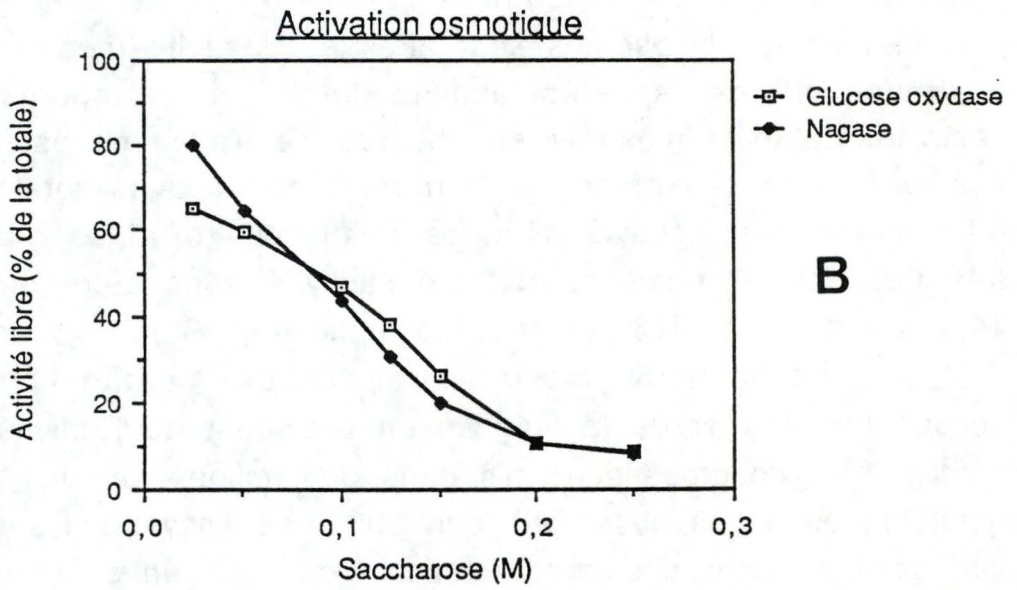
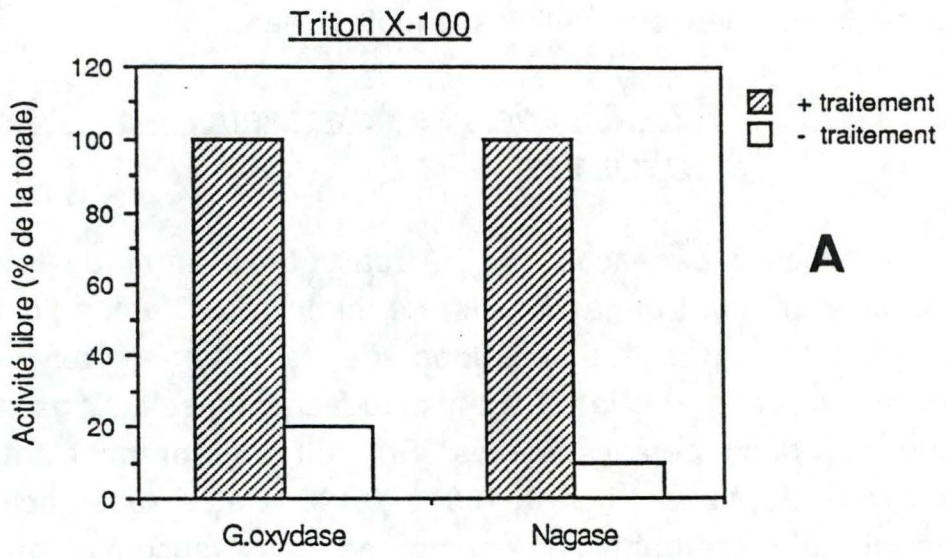
2.2.4. Expériences d'activation des enzymes lysosomales.

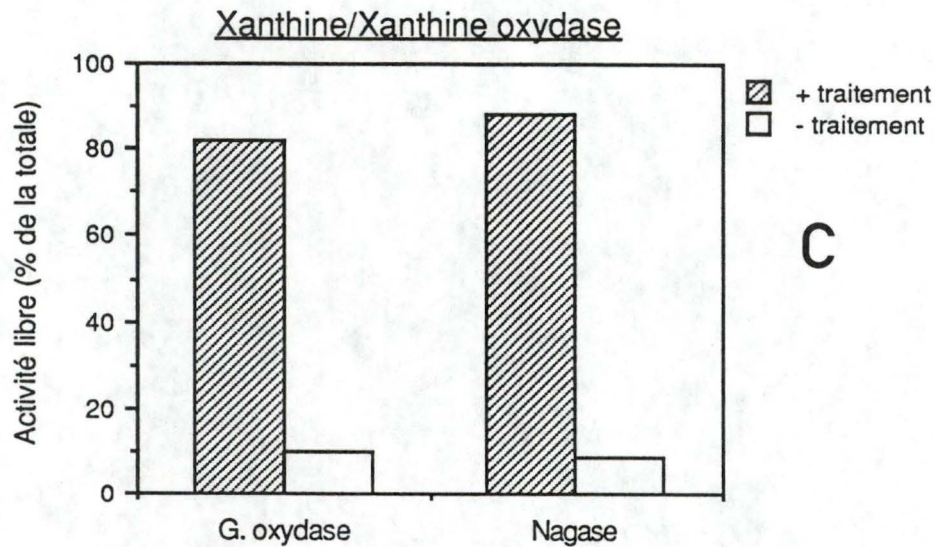
Ces expériences ont été réalisées à partir de fractions L obtenues par centrifugation différentielle. Le temps d'injection était de 30 minutes. L'activation de la glucose oxydase est comparée à celle de la N-acétylglucosaminidase (NAGase) prise comme référence des lysosomes. En tant que premier traitement, nous avons utilisé le triton X-100 à 0.1%. Cette substance est un détergent qui désorganise la membrane des lysosomes et la rend perméable [Wattiaux *et al.*, 1956]. De cette façon, enzymes et substrat peuvent se rencontrer librement. A la concentration choisie, tous les lysosomes sont atteints. L'activité mesurée après ce traitement est appelée activité totale et représente 100% d'activité. L'activité mesurée en absence de traitement est appelée activité libre et s'exprime en pour-cent de l'activité totale. Dans notre expérience, l'activité libre de la glucose oxydase représente 20% de l'activité totale tandis que l'activité sans détergent de la NAGase représente 10% de l'activité totale (Fig. 6a).

La figure 6b montre l'évolution de l'activité libre de la glucose oxydase et de la NAGase en pour-cent de l'activité totale, lorsque les lysosomes sont mis dans des milieux de plus en plus hypotoniques. Nous observons que 50% des enzymes lysosomales sont activées pour une concentration extérieure en saccharose de l'ordre de 0.1M. De plus, l'évolution de l'activité de la glucose oxydase se fait parallèlement à celle de la N-acétylglucosaminidase.

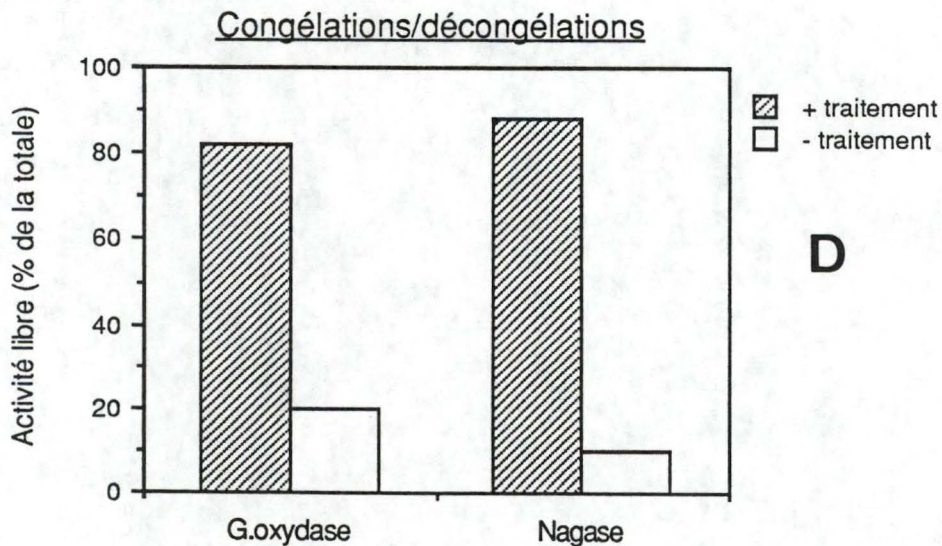
Les anions superoxydes produits par la xanthine oxydase en présence de xanthine et d'oxygène peuvent altérer la membrane lysosomale [Kalra *et al.*, 1989].







C



D

FIGURE 6. Activation des lysosomes par différents systèmes.

Nous avons utilisé des fractions L obtenues après centrifugation différentielle d'homogénats de foie de rats ayant reçu une dose de 5 mg de glucose oxydase/100 g de poids corporel et sacrifiés 30 minutes après l'injection. L'activité enzymatique de la glucose oxydase avant et après traitement est comparée à celle de la N-acétyl-glucosaminidase (Nagase). Les activités mesurées sont exprimées en pour-cent de l'activité mesurée sur une population de granules totalement rompus. Les différents traitements utilisés sont le triton X-100 (0.1%) (A), l'activation osmotique (B), le système xanthine/ xanthine oxydase [Kalra *et al.*, 1989] (C) et 3 cycles de congélation/ décongélation (D).

Nous avons mis ce système en présence d'une fraction L. La figure 6c montre, pour la glucose oxydase et pour la Nagase, l'activité libre mesurée sur une fraction L n'ayant pas été soumise aux radicaux libres et l'activité libre mesurée sur une fraction L traitée. Ces 2 activités sont exprimées en % de l'activité totale. L'activation des enzymes lysosomales par ce système est de l'ordre de 85% pour la NAgase et 80% pour la glucose oxydase.

Enfin, le dernier traitement a consisté à congeler les fractions L dans de l'azote liquide (-176°C) puis à les décongeler. Ce traitement a été appliqué 0, 1, 2 ou 3 fois. Lors de la première congélation/ décongélation, nous avons obtenu une activité représentant 80% de l'activité totale. Cela s'est avéré être le maximum que nous puissions obtenir par ce système. En effet, même en augmentant le nombre de traitements, jamais nous n'avons dépassé ces 80%. Les résultats présentés à la figure 6d, montrent l'activation de la glucose oxydase et de la NAgase après trois congélations/décongélations successives.

A la suite de ces expériences d'activation, nous constatons que pour tous les traitements utilisés, la glucose oxydase perd sa latence et se comporte exactement de la même façon que la N-acétylglucosaminidase.

2.3. Conclusions.

Cette série d'expériences nous a permis de montrer que la glucose oxydase est bien prise en charge par le foie où elle reste active pendant un minimum de 3 heures. La similarité de comportement de la glucose oxydase et des enzymes lysosomales, tant en centrifugation différentielle qu'en centrifugation isopycnique ou encore lors des expériences d'activation, nous permet de conclure qu'elle s'accumule dans les lysosomes, probablement dans les lysosomes des cellules endothéliales.

De plus, le fait que les activités libres mesurées sont faibles ($\pm 20\%$) tend à montrer que la glucose oxydase interne n'a pas librement accès au glucose externe.

3. CARACTÉRISATION DE L'OXYDATION DU GLUCOSE PAR LA GLUCOSE OXYDASE PRÉSENTE DANS LES LYSOSOMES.

3.1. Introduction.

Dans cette troisième partie de notre travail, nous avons essayé de caractériser l'activité de la glucose oxydase, mesurée d'une part avec des lysosomes intacts (activité libre) et d'autre part avec des lysosomes détruits par le triton X-100 (activité totale).

L'activité totale donne l'activité de l'enzyme qui est librement accessible au glucose.

L'activité libre quant à elle, peut s'expliquer de deux façons différentes: soit elle résulte de la pénétration du glucose dans les lysosomes (hypothèse A), soit elle provient d'une petite quantité d'enzyme libérée au cours de l'isolement de la fraction et/ou pendant le test enzymatique (hypothèse B).

Les expériences décrites ci-après auront pour but de nous aider à choisir entre l'une ou l'autre hypothèse mais aussi, de nous apporter des informations concernant le mode de transport du glucose dans les lysosomes.

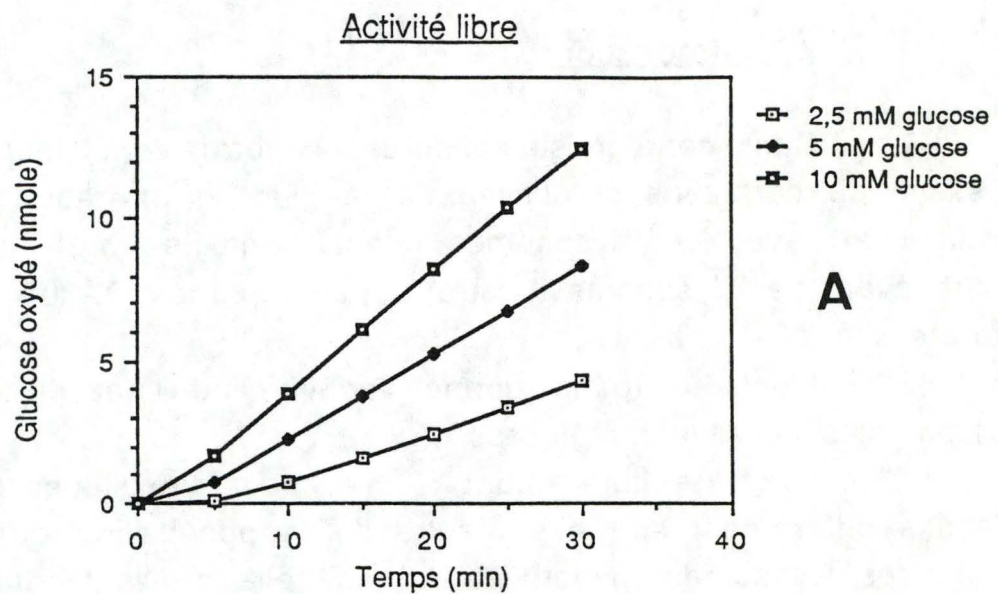
Toutes ces expériences ont été réalisées sur des fractions L obtenues par centrifugation différentielle. Le temps d'injection était invariablement de 30 minutes. La dose injectée était de 5 mg de glucose oxydase par 100 g de poids corporel.

Certaines manipulations ont été répétées à partir de lysosomes purifiés par électrophorèse en flux continu.

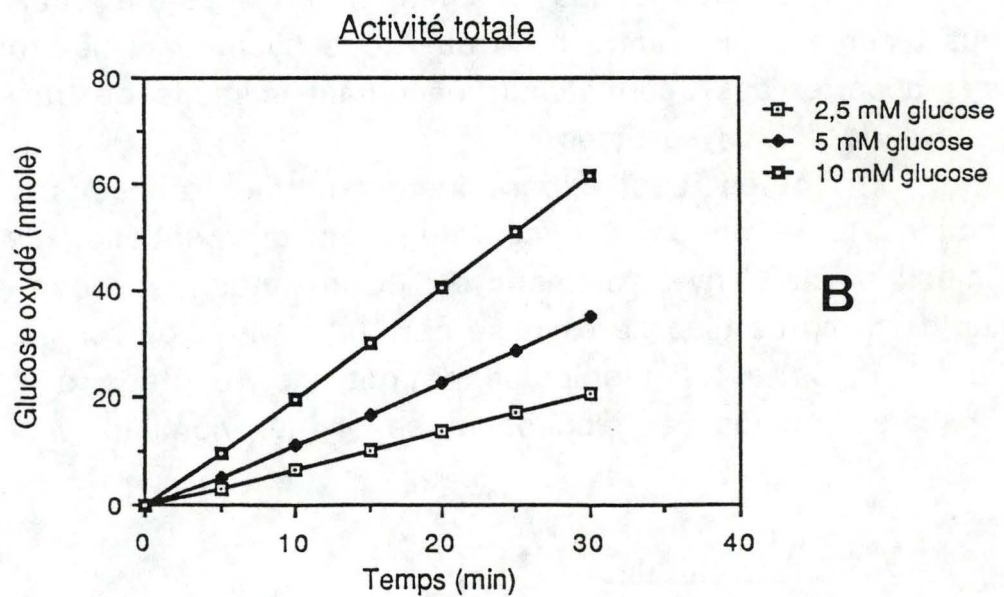
3.2. Résultats.

3.2.1. Effet du temps d'incubation et de la concentration en glucose.

Nous avons suivi l'évolution de l'activité de la glucose oxydase pendant 30 minutes pour des concentrations en glucose variant de 2.5 mM à 30 mM.



A



B

FIGURE 7. Activités libre et totale de la glucose oxydase pour différentes concentrations en glucose.

Sur la fraction L, préparée à partir du foie d'un rat injecté de glucose oxydase (5mg/100g), nous avons dosé l'activité libre (A) et totale (B) de cette enzyme au cours du temps, pour des concentrations croissantes de glucose. Les résultats sont exprimés en nanomoles de glucose oxydé.

La figure 7 montre la variation de la quantité de glucose oxydé en fonction du temps, en absence (fig. 7a) et en présence (fig. 7b) de triton X-100 à 0,1%. Afin de ne pas surcharger les graphes, seules trois concentrations en glucose ont été représentées.

Nous observons que pour l'activité totale, la vitesse de réaction est constante dès le temps zéro et le reste pendant les 30 minutes que dure la mesure. Par contre, pour l'activité libre, cette vitesse ne devient constante qu'après une certaine période de latence. Cette dernière étant d'autant plus marquée que la concentration en glucose est faible.

Deux hypothèses sont plausibles pour expliquer cette période de latence: soit elle est liée au phénomène du transport du glucose dans les lysosomes, soit elle est due au fait que la mesure de l'activité enzymatique se fait à partir de deux réactions dont les vitesses seraient différentes (schéma 2)

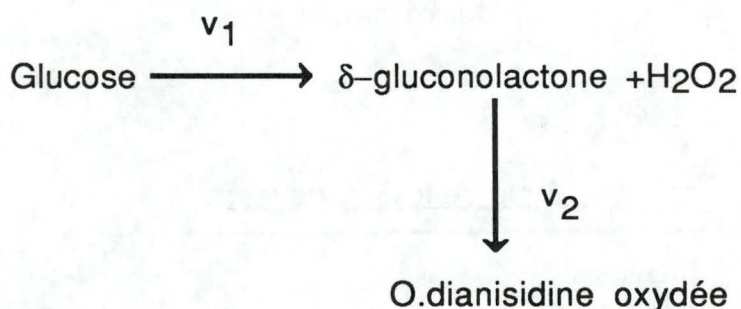
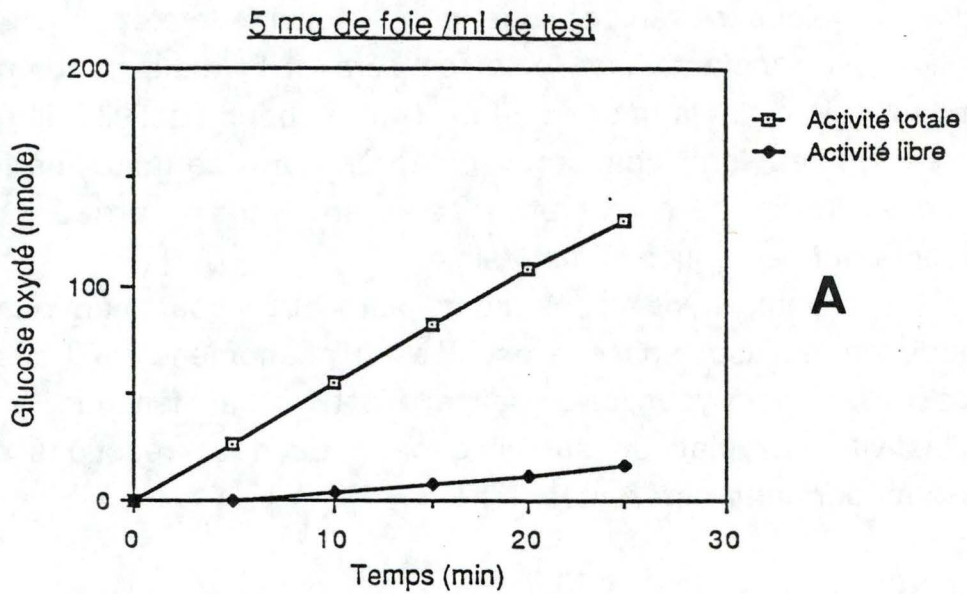


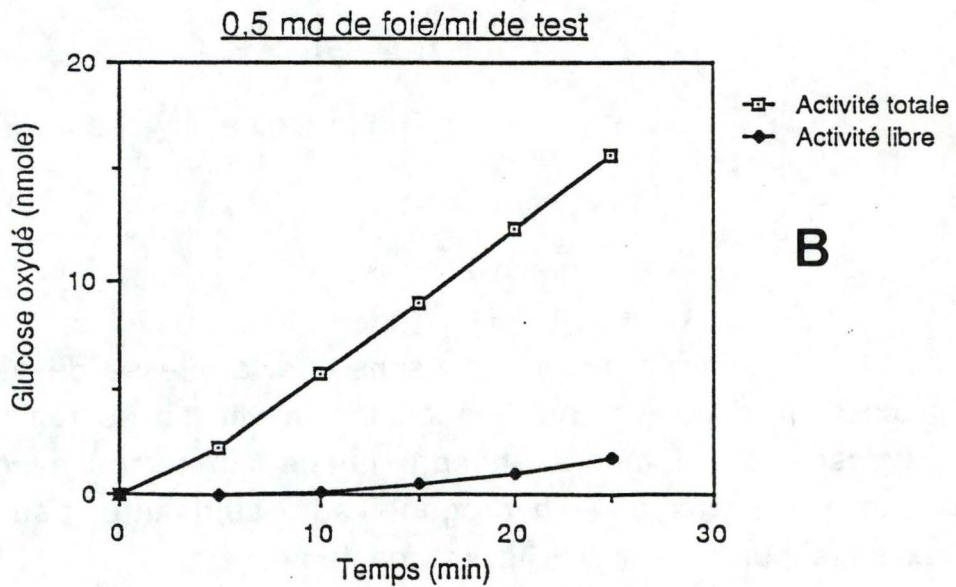
schéma 2

En clair, si nous supposons que la vitesse de réaction de la glucose oxydase (v_1) est inférieure à la vitesse de réaction de la peroxydase (v_2), il faudra attendre un certain temps avant que la quantité de peroxyde d'hydrogène soit suffisante pour que la peroxydase puisse agir à vitesse constante.

Si cette deuxième hypothèse est valable, il doit être possible de faire apparaître une période de latence similaire pour les mesures d'activité totale, en diminuant la quantité de glucose oxydase utilisée pour ces mesures. Cela a été fait pour obtenir la figure 8. Celle-ci nous montre l'évolution des activités libre et totale au cours du temps pour deux quantités de granules.



A



B

FIGURE 8. Evolution des activités libre et totale de la glucose oxydase au cours du temps pour deux quantités différentes de granules dans le test.

Les activités libre et totale de la glucose oxydase sont mesurées sur une quantité variable de fraction L d'un rat injecté. La figure 8A montre les résultats obtenus pour 5mg de foie dans le test. La figure 8B montre les résultats obtenus pour 0.5mg de foie dans le test. Les résultats sont exprimés en nanomoles de glucose oxydé.

Nous observons que lorsque la quantité de granules décroît jusqu'à correspondre une concentration de 0.5mg de foie pour 1 ml de test, une rupture de la linéarité apparaît pour l'activité totale (fig. 8b). Nous pouvons de ce fait, avancer que la période de latence existant pour les activités libres est en partie liée à une différence de vitesse de réaction entre la glucose oxydase et la peroxydase. Cette dernière étant la plus rapide. Mais, ceci ne nous impose pas le rejet de la première hypothèse car, la figure 8b nous montre encore, que le phénomène est moins marqué en présence de triton X-100 qu'en son absence.

La figure 9 nous donne la représentation graphique de la transformation de Lineweaver-Burk appliquée à l'équation de Michaelis-Mentem. Elle nous montre l'évolution de l'inverse de la vitesse en fonction de l'inverse de la concentration en substrat. Les droites tracées ont été obtenues par régression linéaire à partir des données expérimentales.

Les Km calculés pour l'activité libre, l'activité totale et l'activité de la glucose oxydase purifiée sont d'un même ordre de grandeur (respectivement: 12.20 mM, 15.50 mM, et 12.20 mM).

3.2.2. Effet du pH.

La littérature donne un pH optimal pour l'activité de la glucose oxydase de 5.6. Cependant, cette enzyme serait bien active dans un intervalle allant de 3.5 à 8.

En dosant l'activité de la glucose oxydase purifiée à différents pH compris dans cet intervalle, nous avons voulu vérifier qu'effectivement l'activité enzymatique n'était pas modifiée. Ensuite, nous avons étudié l'effet de ces différents pH sur l'activité libre et totale de l'enzyme endocytée.

La figure 10 donne les résultats obtenus. Afin de pouvoir comparer les trois courbes entre elles, nous avons choisi d'exprimer chaque valeur mesurée en pour-cent de la valeur maximale obtenue pour chaque type d'activité.

Conformément à ce que nous attendions, nous observons que, dans l'intervalle de pH choisi, l'activité de la glucose oxydase purifiée ne varie pas. L'activité totale présente elle, de légères oscillations. Par contre, en ce qui concerne l'activité libre, nous

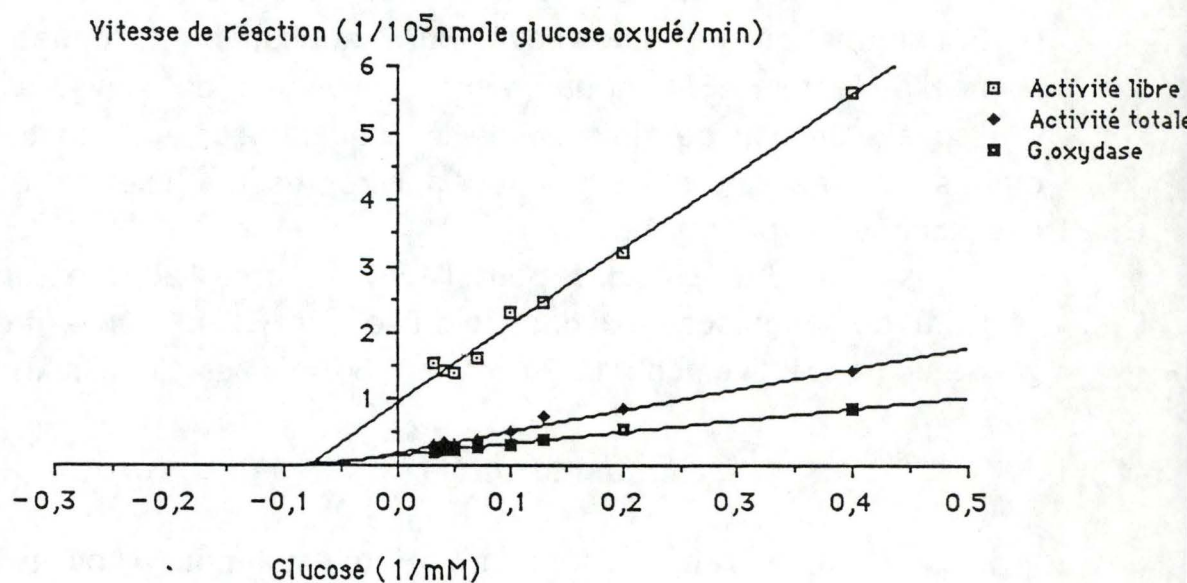


FIGURE 9. Droites de Lineweaver-Burk obtenues pour l'activité libre et totale de la glucose oxydase endocytée et pour l'activité de la glucose oxydase purifiée.

Les activités libre et totale de la glucose oxydase sont mesurées pour différentes concentrations en glucose sur la fraction L d'un rat injecté. L'activité de 2×10^{-5} mg de glucose oxydase purifiée a été mesurée pour les mêmes concentrations en glucose. Les droites présentées à cette figure ont été obtenues suite à l'application de la transformation de Lineweaver-Burk à l'équation de Michaelis-Menten.

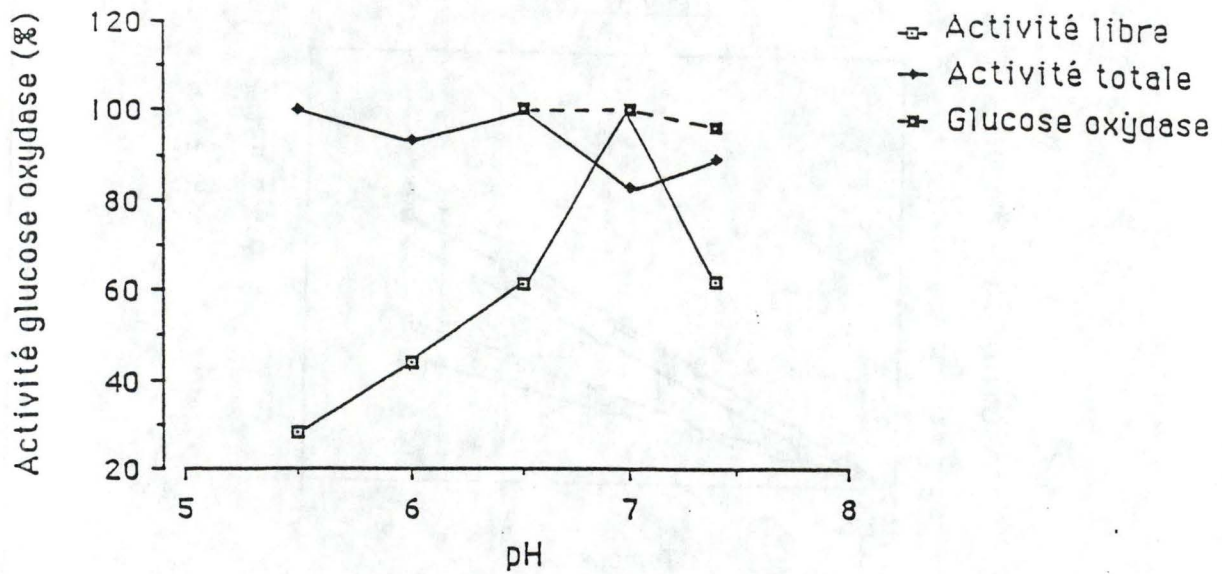


FIGURE 10. Effet du pH sur les activités libre et totale de la glucose oxydase endocytée et sur l'activité de l'enzyme purifiée.

Sur la fraction L d'un rat injecté, nous avons dosé les activités libre et totale de la glucose oxydase à différents pH. Ces dosages ont également été réalisés pour l'enzyme purifiée. Les valeurs mesurées sont exprimées en pour-cent de la valeur maximale obtenue pour chaque type d'activité.

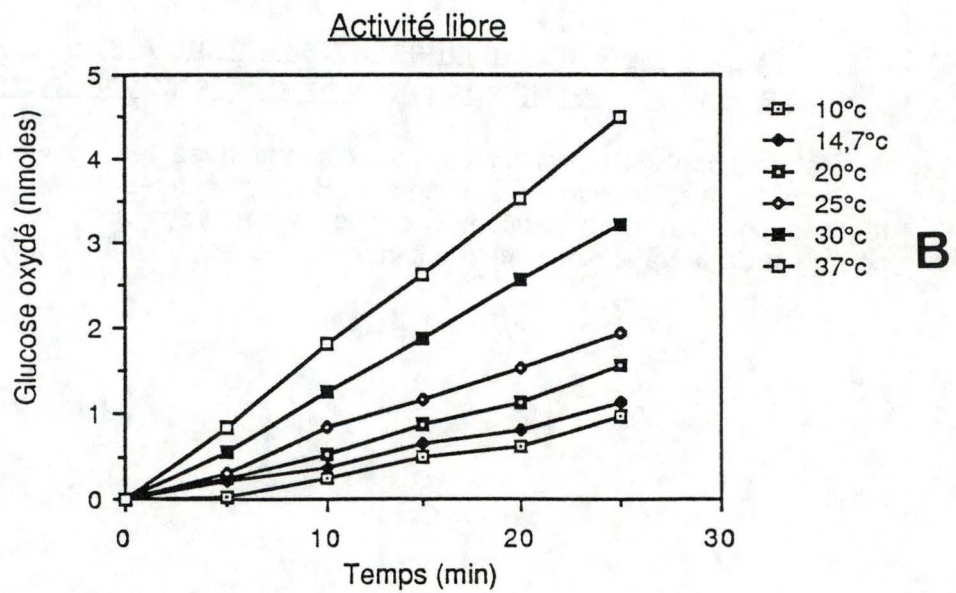
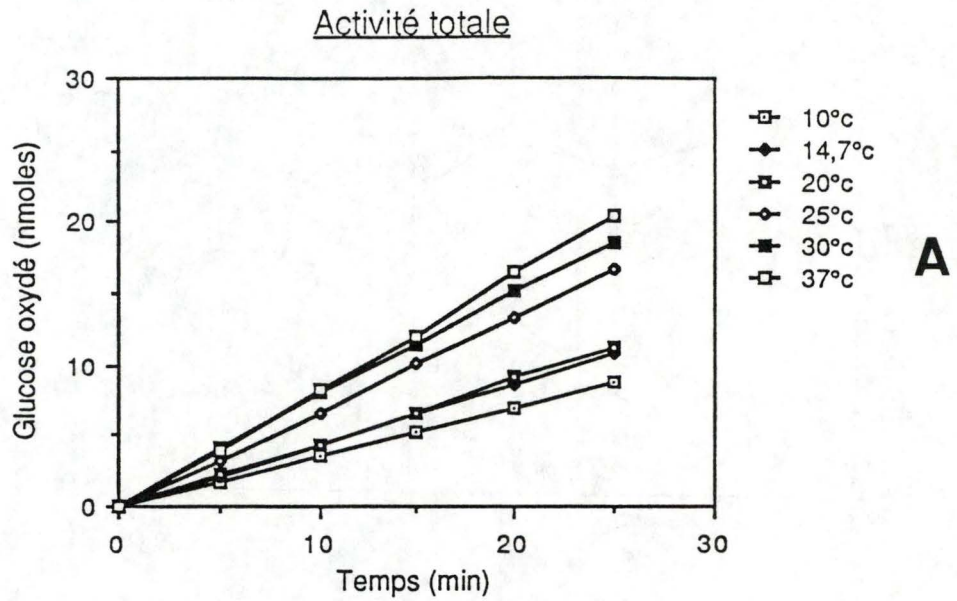


FIGURE 11. Influence de la température sur les activités libre et totale de la glucose oxydase endocytée.

Une fraction L d'un rat injecté est incubée à différentes températures en présence (activité totale: **A**) et en absence (activité libre: **B**) de triton X-100 (0.1%). Une mesure ponctuelle de l'activité de la glucose oxydase est effectuée toutes les cinq minutes.

observons qu'elle part d'un minimum à pH 5.5 pour arriver à un maximum d'activité à pH 7.

Cette expérience nous fournit un élément en faveur de l'hypothèse A posée dans l'introduction.

En effet, la différence d'action du pH suivant que nous mesurons des activités libre ou totale, montre que ce pH agit sur une structure autre que l'enzyme elle-même.

De fait, si nous supposons que l'activité libre mesurée correspond à de l'enzyme libérée, comment expliquer que le pH n'a pas le même effet ici que dans le cas de l'activité totale où l'enzyme est également extérieure aux granules?

Cet effet du pH est donc un argument en faveur de l'hypothèse A, son action pouvant s'expliquer dans le cas d'une diffusion facilitée où nous supposons que c'est le transporteur qui est sensible à la variation de pH. L'optimum mesuré correspondrait au pH optimal de ce transporteur.

3.2.3 Effet de la température.

L'équation d'Arrhénius (équation 1) indique comment se fait l'évolution de la constante de vitesse d'une réaction en fonction de la variation de température.

$$\ln K = \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)$$

Nous avons mesuré les activités libre et totale de la glucose oxydase à différentes températures. Une mesure ponctuelle a été effectuée toutes les 5 minutes.

La figure 11 illustre la variation des deux types d'activité au cours du temps pour les différentes températures choisies.

C'est à partir des données de cette figure qu'a été construit le graphe présenté à la figure 12. Nous voyons que les logarithmes des vitesses de réaction varient linéairement en fonction de l'inverse des températures absolues. Le calcul des Q10 donne 1.22 pour l'activité totale (soit une énergie d'activation de 5.6 Kcal/mole) et 1.48 pour l'activité libre (soit une énergie d'activation de 11.2 Kcal/mole).

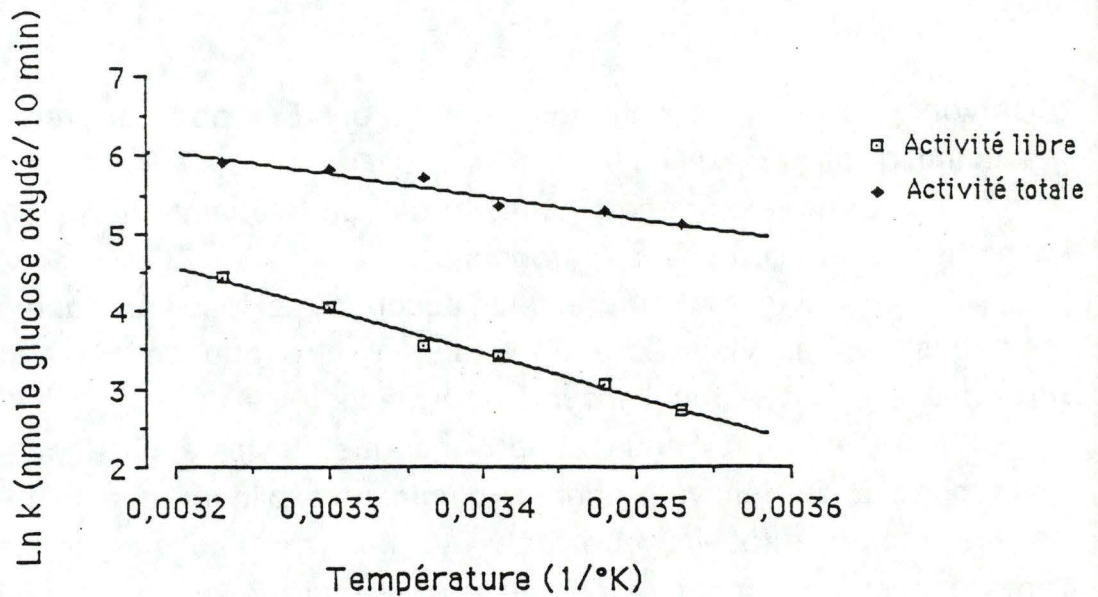


FIGURE 12. Influence de la température sur les activités libre et totale de la glucose oxydase endocytée.

Cette figure est construite à partir des résultats rapportés dans la figure 11. Le logarithme des constantes de vitesse est exprimé en fonction de l'inverse des températures absolues.

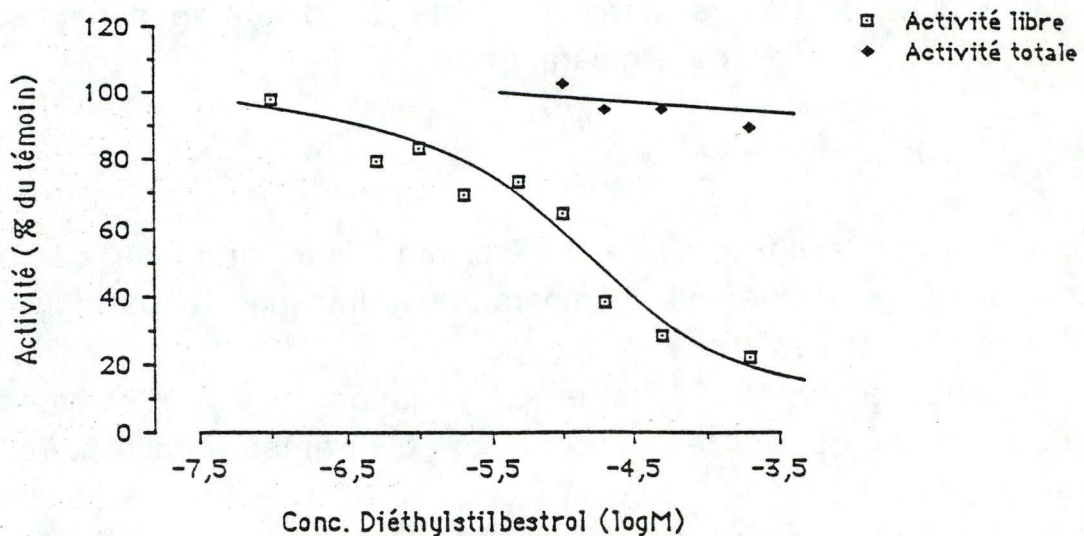


FIGURE 13. Influence du diéthylstilbestrol sur les activités libre et totale de la glucose oxydase endocytée.

Les activités libre et totale de la glucose oxydase sont dosées, sur une fraction L d'un rat injecté, en présence de différentes concentrations de diéthylstilbestrol. Les résultats sont exprimés en pour-cent des activités témoins mesurées en présence de DMSO 0.01% (solvant du diéthylstilbestrol).

Cet effet de la température différent pour les activités libre et totale, renforce encore l'hypothèse que l'activité libre résulte, au moins partiellement, d'une entrée du glucose dans les lysosomes. En effet, l'état physique des lipides constitutifs de la membrane des lysosomes, varie avec la température. Lorsque celle-ci est basse, ils prennent une structure rigide peu favorable aux phénomènes de diffusion. L'énergie d'activation supérieure pour l'activité libre s'explique si nous considérons que dans ce cas, le glucose doit traverser cette barrière physique que constitue la membrane.

3.2.4. Effets d'inhibiteurs du transport du glucose.

Le diéthylstilbestrol, la phlorétine et la cytochalasine B sont trois inhibiteurs connus du transport du glucose dans les globules rouges [Lefèvre, 1959].

Nous avons étudié leur action sur des fractions L isolées par centrifugation différentielle et sur des lysosomes purifiés par électrophorèse en flux continu.

3.2.4.1. Effet du diéthylstilbestrol.

La première expérience réalisée avec cet inhibiteur a consisté à étudier son effet en fonction de sa concentration, sur l'activité totale et sur l'activité libre.

La figure 13 illustre les résultats obtenus. Elle montre la variation des activités libre et totale (exprimées en pour-cent des activités témoins) en fonction du logarithme de la concentration en diéthylstilbestrol.

Nous observons que pour les concentrations choisies, cette substance n'a pas d'effet sur l'activité mesurée en présence de triton X-100. Par contre, son effet sur l'activité libre est d'autant plus important que sa concentration est élevée. Une inhibition de 50% est obtenue pour une concentration de 10^{-5} M.

Pour déterminer si cette inhibition est compétitive ou non, nous avons choisi une concentration en diéthylstilbestrol

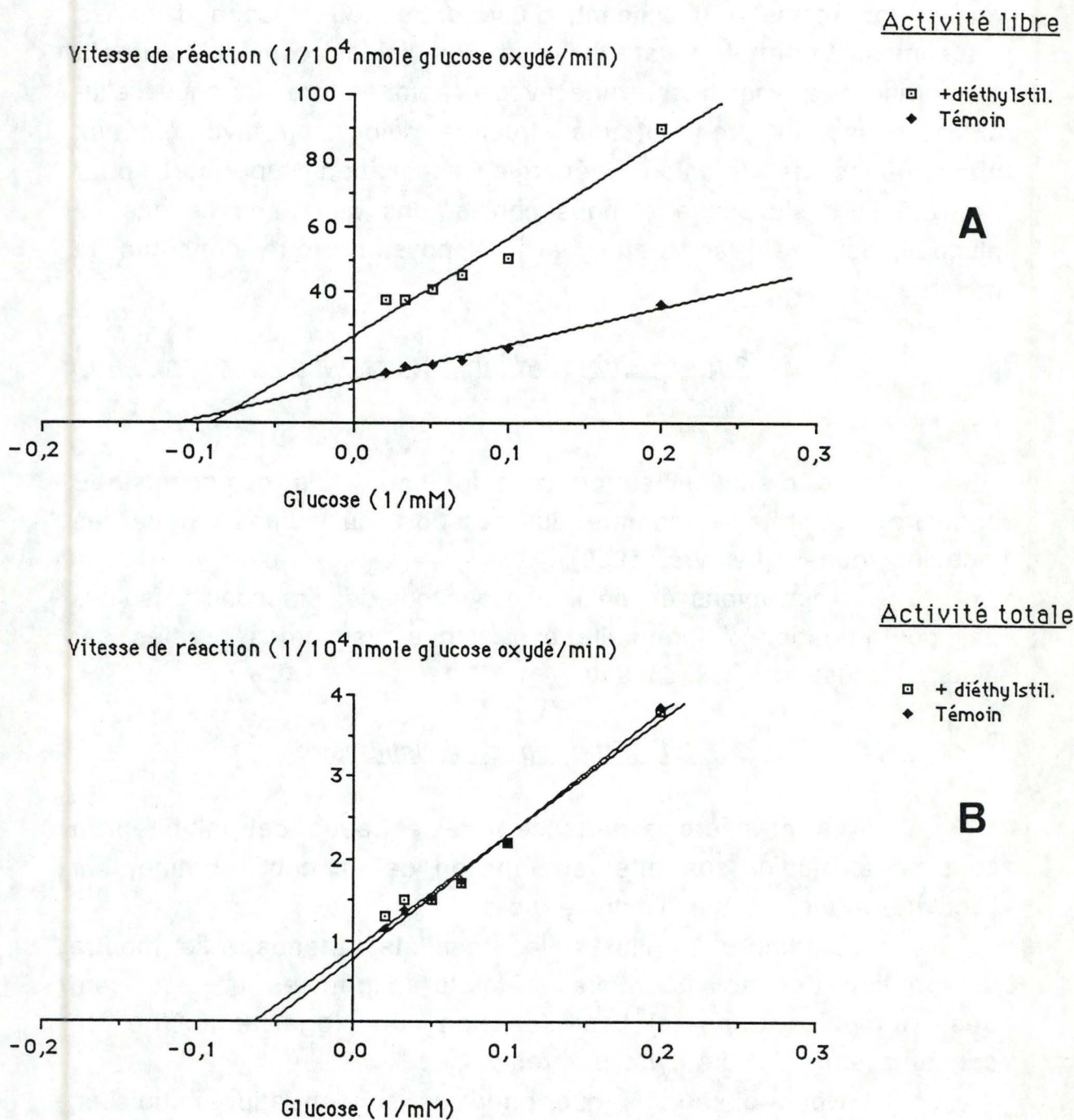


FIGURE 14. Inhibition par le diéthylstilbestrol des activités libre et totale de la glucose oxydase endocytée.

Les activités libre (A) et totale (B) de la glucose oxydase ont été mesurées, sur la fraction L d'un rat injecté, en présence et en absence de diéthylstilbestrol $10^{-5}M$, pour différentes concentrations en glucose. La transformation de Lineweaver-Burk a été appliquée à l'équation de Michaelis-Menten. Les résultats obtenus de cette façon ont été traités par régression linéaire.

(2.5×10^{-5} M), que nous avons testée en présence de différentes concentrations en glucose pour les deux types d'activité.

Les résultats illustrés aux figures 14a et 14b nous montrent la variation de l'inverse de la vitesse de réaction en fonction de l'inverse des concentrations en substrat.

Les droites tracées ont été obtenues par régression linéaire à partir des données expérimentales.

L'inhibition par le diéthylstilbestrol observée pour l'activité libre n'est pas compétitive. En effet, seul le VM est modifié, le K_m restant inchangé.

3.2.4.2. Effet de la phlorétine.

Les expériences réalisées avec cet inhibiteur sont une réplique de celles effectuées avec le diéthylstilbestrol, seules certaines concentrations sont différentes. Dans un premier temps, nous avons étudié l'action de concentrations variables en phlorétine sur les activités libre et totale de la glucose oxydase endocytée. Les résultats présentés à la figure 15 nous montrent que cet inhibiteur agit sur l'activité intralysosomale de la glucose oxydase, mais aussi sur l'enzyme libérée (cette inhibition de l'activité totale à forte concentration en phlorétine s'observe également sur l'enzyme purifiée (figure 16). Cependant, si nous considérons une concentration en phlorétine de 10^{-5} M, la réduction de l'activité totale s'élève à 10% alors que celle de l'activité libre est de 94%. Ceci tend déjà à montrer que l'inhibition en absence de triton n'est pas uniquement due à une action de la phlorétine sur l'enzyme elle-même.

Cherchant à confirmer cela, nous avons réalisé le schéma expérimental suivant à partir de lysosomes purifiés. Nous nous sommes mis dans des conditions telles que l'activité totale équivaut l'activité libre. Pour arriver à ce résultat, nous avons simplement diminué la quantité de granules ajoutée au test contenant le triton X-100. Nous avons opté pour une concentration en inhibiteur de 2×10^{-6} M pour les deux types d'activité.

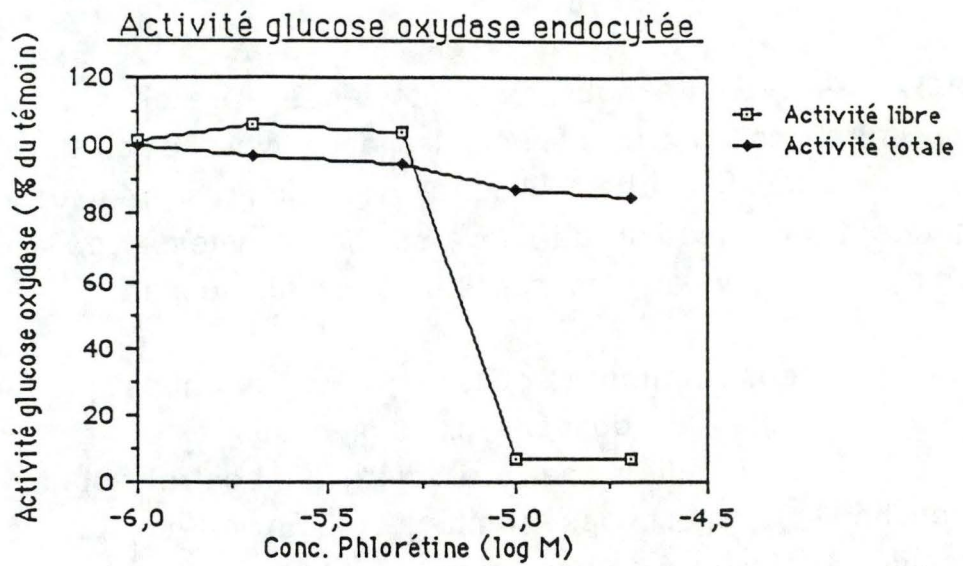


FIGURE 15. Effet de la phlorétine sur les activités libre et totale de la glucose oxydase endocytée.

Les activités libre et totale de la glucose oxydase sont mesurées, sur la fraction L d'un rat injecté, en présence de différentes concentrations de phlorétine. Chaque valeur est exprimée en pour-cent de l'activité témoin mesurée en présence de DMSO 0.01% (solvant de la phlorétine).

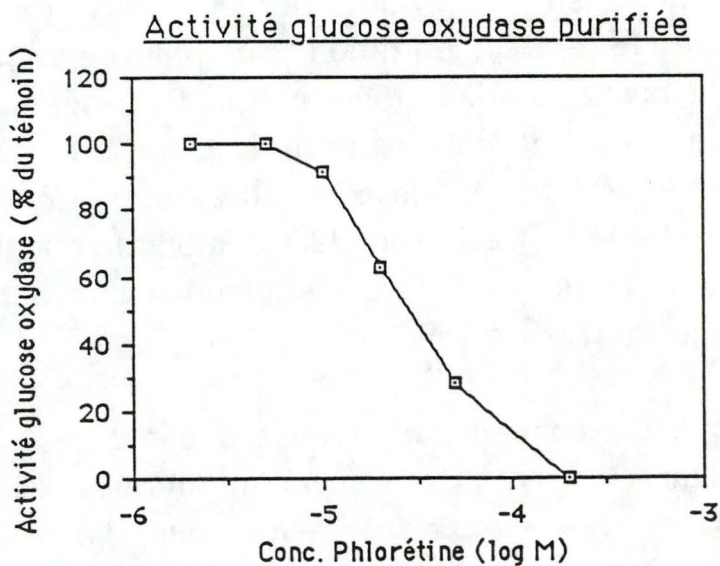


FIGURE 16. Effet de la phlorétine sur l'activité de la glucose oxydase purifiée.

L'activité de 2×10^{-5} mg de glucose oxydase purifiée est mesurée en présence de différentes concentrations de phlorétine. Chaque valeur est exprimée en pour-cent de l'activité témoin mesurée en présence de DMSO 0.01% (solvant de la phlorétine).

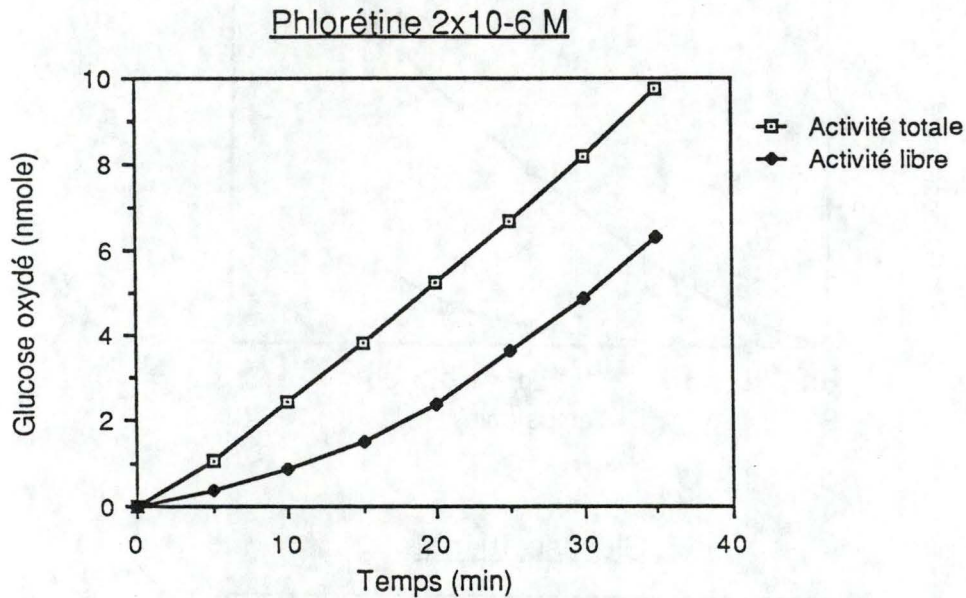


FIGURE 17. Effet de la phlorétine sur les activités libre et totale de la glucose oxydase dans une population de lysosomes purifiés.

L'activité de la glucose oxydase est mesurée en présence (activité totale) et en absence (activité libre) de triton X-100 (0.1%) pour une concentration de phlorétine de 2×10^{-6} M. Cette expérience a été réalisée avec des lysosomes purifiés, obtenus par électrophorèse en flux continu. La proportion de granules mise dans les tests est déterminée de manière à ce qu'en absence de phlorétine, l'activité totale soit équivalente à l'activité libre. Les résultats sont exprimés en nanomoles de glucose oxydé.

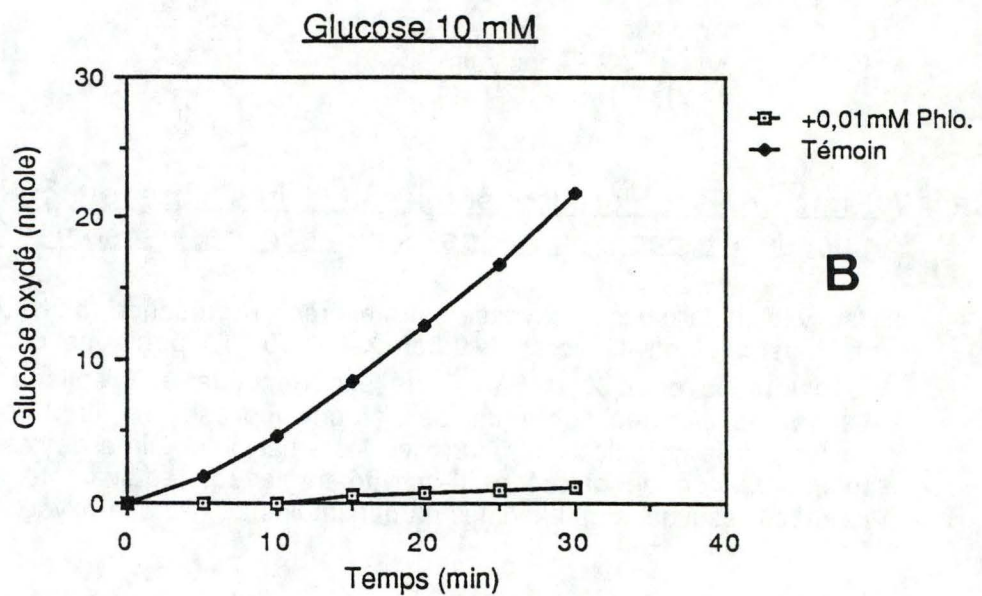
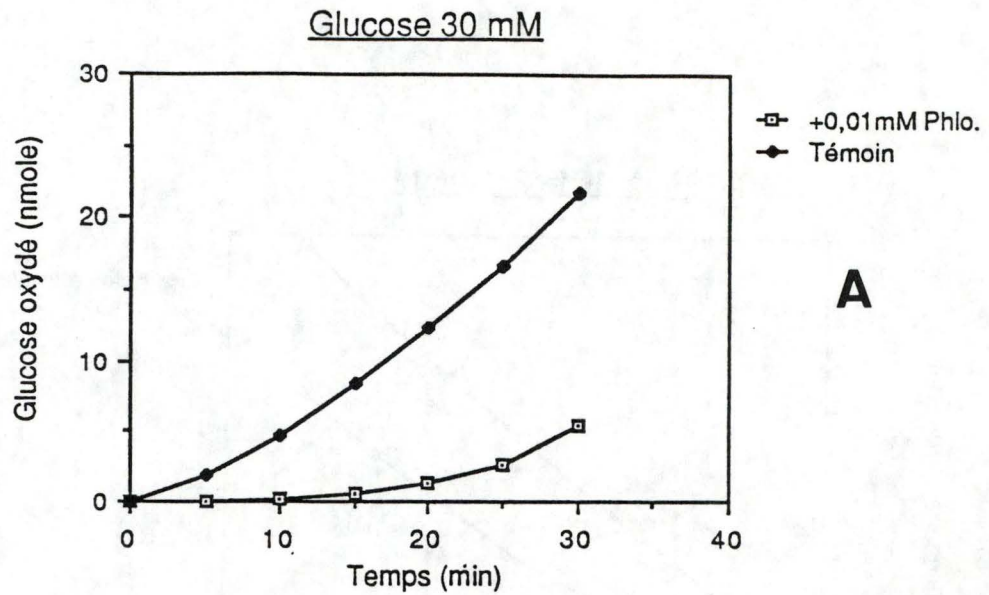


FIGURE 18. Effet de la phlorétine sur l'activité libre de la glucose oxydase endocytée pour deux concentrations en glucose.

L'activité libre de la glucose oxydase est mesurée, sur la fraction L d'un rat injecté, en absence (Témoin) ou en présence de phlorétine 0.01 mM pour deux concentrations en glucose: 30 mM (A) et 10 mM (B). Les résultats sont exprimés en nanomoles de glucose oxydé.

Les résultats obtenus sont présentés à la figure 17. Sachant qu'au départ nous avons la même activité, si l'inhibition était due à une action de la phlorétine sur l'enzyme libérée, nous devrions avoir une évolution dans le temps comparable. Ce n'est manifestement pas le cas pour un intervalle de temps compris entre 0 et 25 minutes.

Les figures 18a et 18b, montrent l'inhibition de l'activité de la glucose oxydase intralysosomale par la phlorétine 0.01 mM pour deux concentrations en glucose. Deux choses importantes sont à remarquer: tout d'abord, que l'inhibition augmente lorsque la concentration en glucose diminue, ensuite que pour une concentration de 30 mM en sucre, l'inhibition est levée avec le temps. Après 25 minutes, les vitesses de réaction avec et sans phlorétine deviennent pratiquement égales.

3.2.4.3. Effet de la cytochalasine B.

Cet inhibiteur a été essayé à des concentrations allant de 10^{-7} M à 10^{-4} M sur les activités libre et totale pour deux concentrations en glucose (10 et 1 mM). Aucun effet significatif n'a pu être mis en évidence, ni sur fraction L obtenue par centrifugation différentielle, ni sur lysosomes purifiés.

A titre indicatif, un exemple des résultats obtenus est présenté aux figures 19a et 19b. Il montre l'évolution des activités libres et totales au cours du temps, pour deux concentrations en cytochalasine B. La concentration en glucose est de 10 mM. Les activités témoins présentées ont été mesurées en présence de DMSO (solvant de la cytochalasine B). La cytochalasine B étant un bon inhibiteur du transporteur du glucose dans les globules rouges [Lefèvre, 1959], nous pouvons nous demander si les résultats obtenus ne sont pas en contradiction avec un mécanisme de transport du glucose par diffusion facilitée. En fait, cette absence d'effet est compatible avec l'existence d'un transporteur, si nous supposons que l'inhibiteur agit à la face interne de la membrane. De ce fait, dans les conditions de notre test d'activité libre, cet inhibiteur externe n'aurait pas accès au transporteur interne d'où son inefficacité.

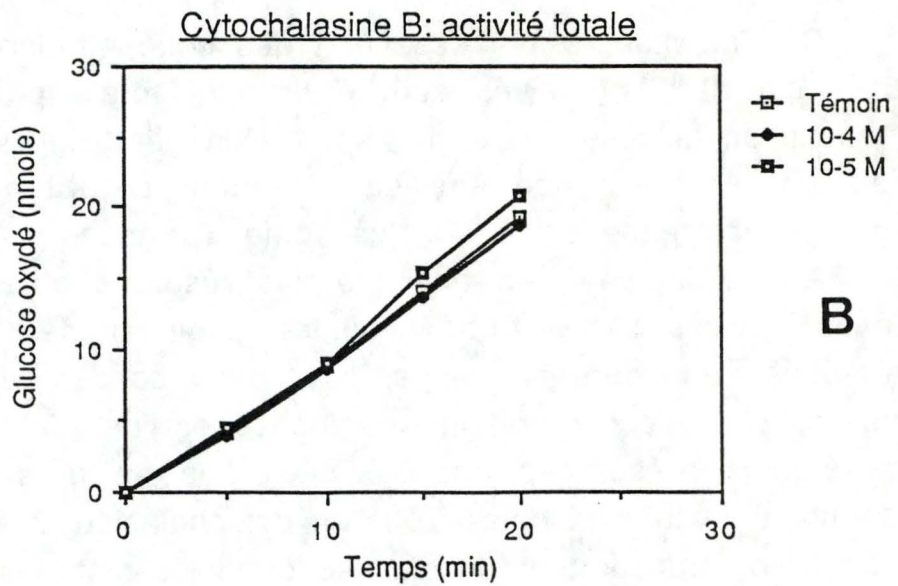
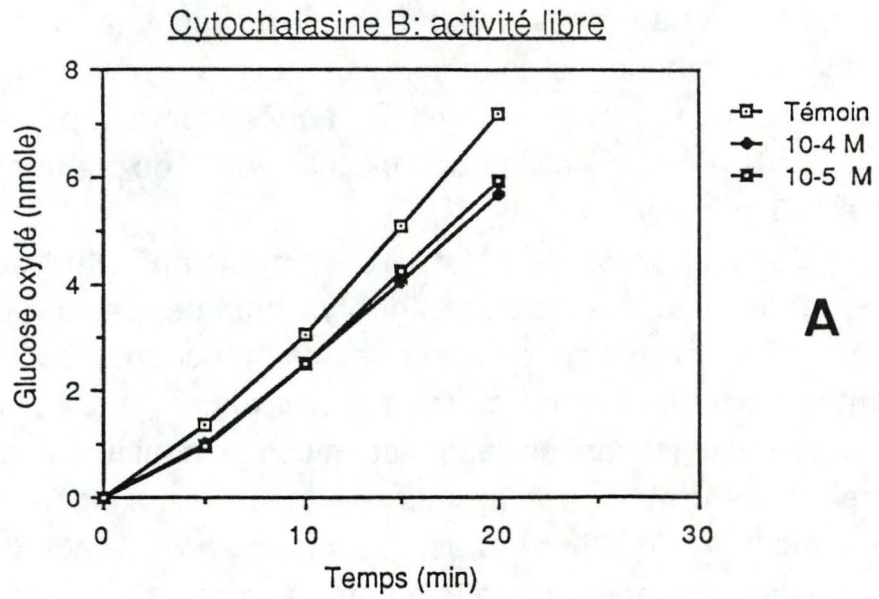


FIGURE 19. Effet de la cytochalasine B sur les activités libre et totale de la glucose oxydase endocytée.

Les activités libre (A) et totale(B) de la glucose oxydase sont mesurées sur la fraction L d'un rat injecté mise en présence de cytochalasine B ($10^{-4}M$ et $10^{-5}M$) ou en absence d'inhibiteur (Témoin). Les résultats sont exprimés en nanomoles de glucose oxydé.

A la suite de ces expériences, se pose la question de savoir, comment le diéthylstilbestrol et la phlorétine peuvent empêcher le glucose de traverser la membrane lysosomale.

Melchior et Czech [1979] ont montré que dans des vésicules reconstituées, le transport du glucose médié par transporteur dépend de la fluidité de la bicouche phospholipidique. D'autre part, nous savons que les stéroïdes (ou des composés proches) peuvent changer l'état physique de la bicouche et ainsi affecter sa perméabilité.

Jadot *et al.*, [1989] ont montré que le diéthylstilbestrol pouvait se lier à la membrane lysosomale et notamment modifier la perméabilité au glucose de cette membrane.

Comme le discutent ces auteurs, l'explication la plus plausible est que le diéthylstilbestrol (et probablement la phlorétine) se fixe sur des sites spécifiques jouant un rôle dans le transport du glucose.

3.2.5. Mise en évidence d'une compétition possible entre le glucose et d'autres sucres pour le transporteur éventuel.

Si un transporteur pour le glucose existe au niveau de la membrane lysosomale, il est logique de supposer qu'une compétition va avoir lieu entre le glucose et d'autres saccharides.

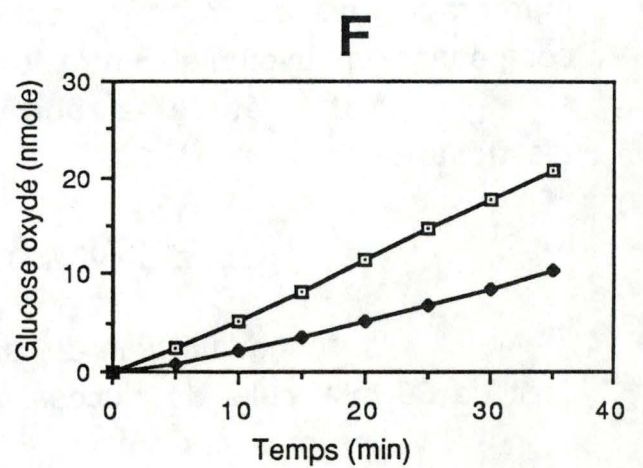
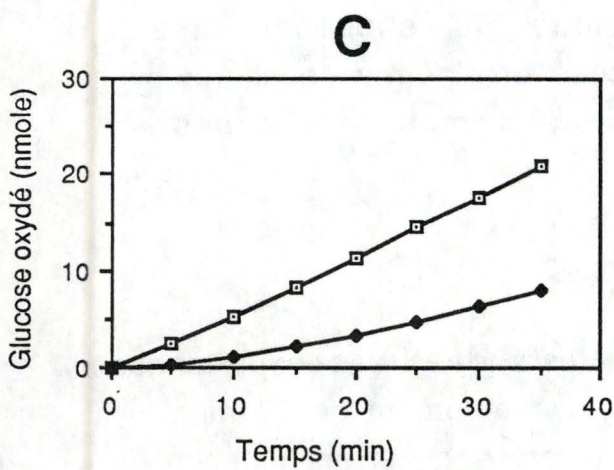
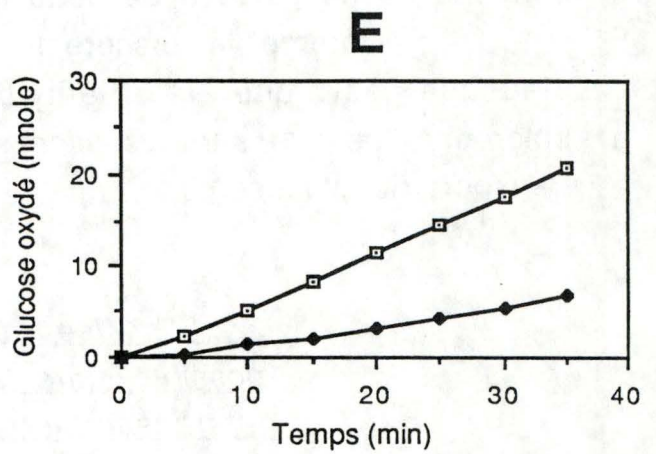
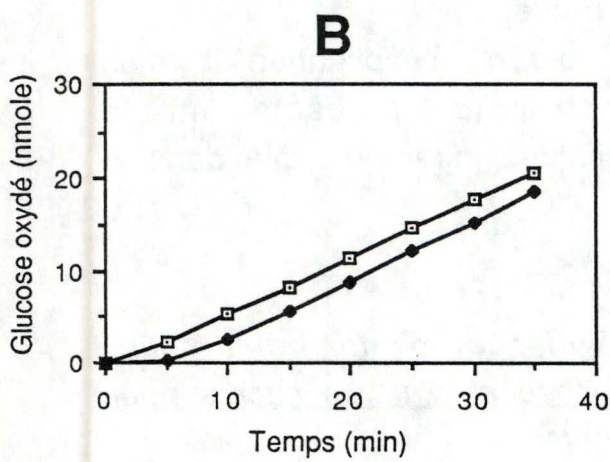
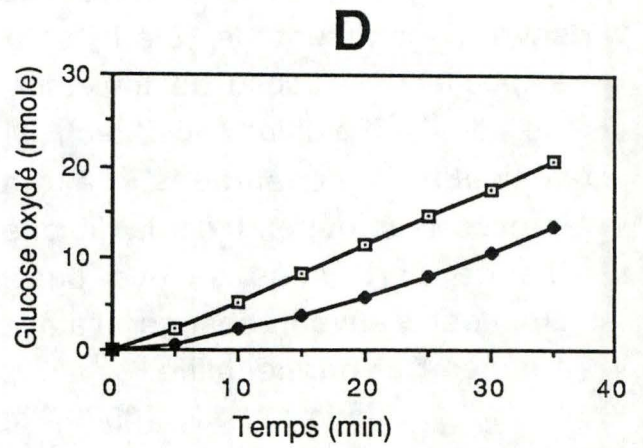
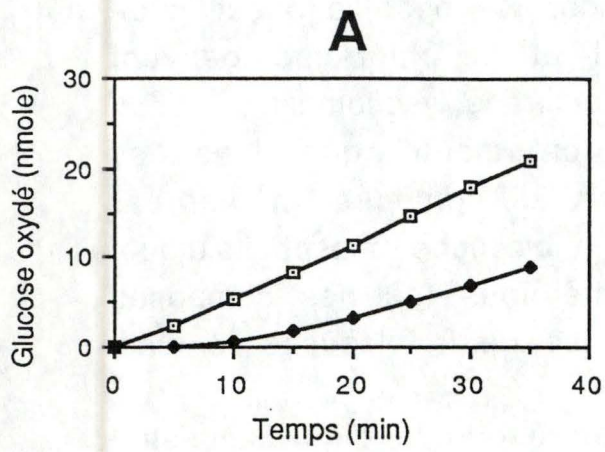
Notre étude a porté sur des monosaccharides et dissaccharides.

3.2.5.1. Monosaccharides.

La concentration du sucre testé dans ces expériences était de 50 mM, celle du glucose étant invariablement de 10 mM.

Les mesures ont été faites en présence et en absence de triton X-100. Dans les conditions choisies, aucun des sucres utilisés n'avait d'action sur l'enzyme libérée (ces résultats ne sont pas montrés).

L'action de ces sucres sur l'activité libre de l'enzyme est illustrée à la figure 20 où pour chaque graphe nous avons



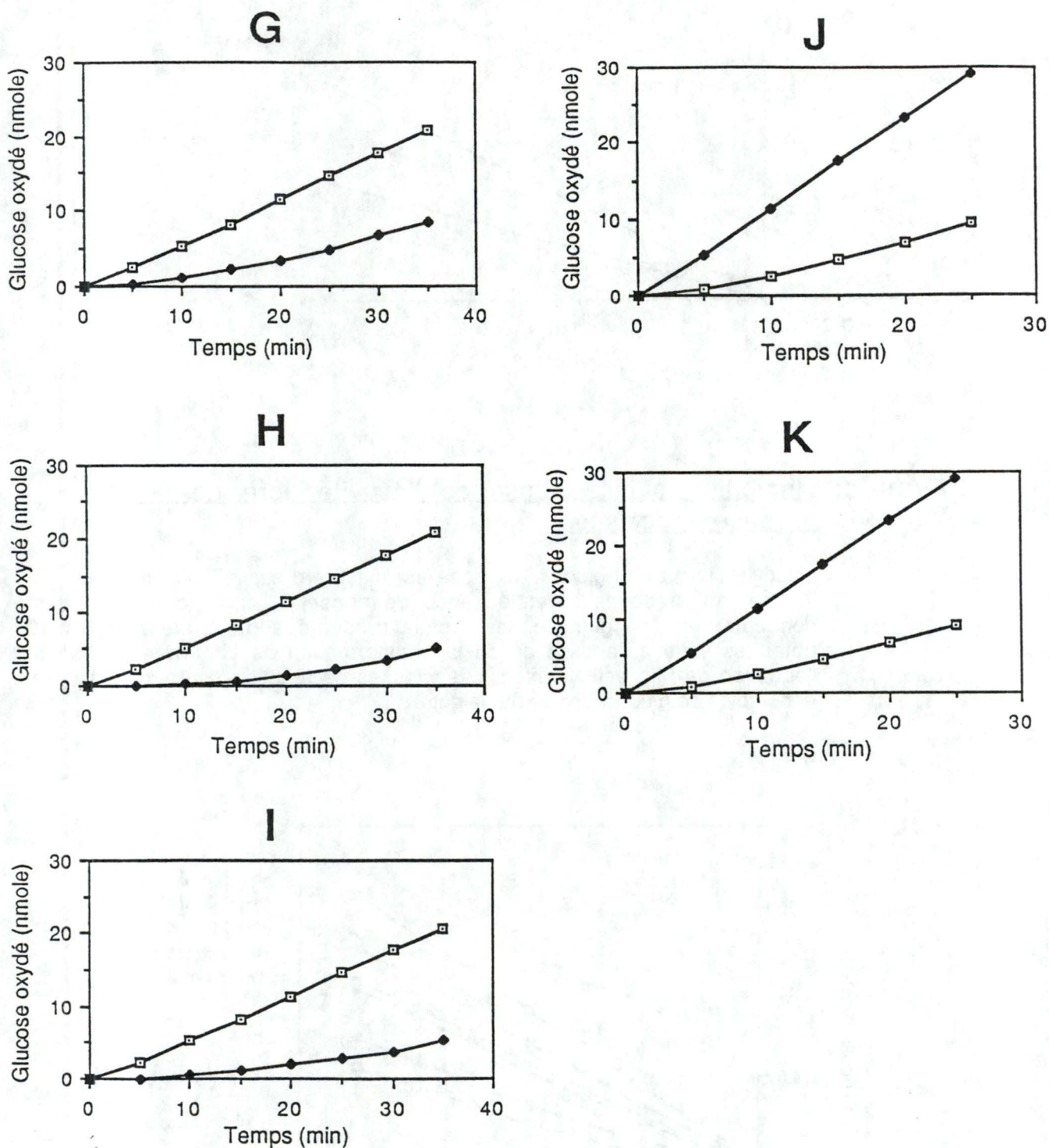


FIGURE 20. Effet de différents monosaccharides sur l'activité libre de la glucose oxydase endocytée.

L'activité libre de la glucose oxydase est mesurée sur la fraction L d'un rat injecté, mise en présence de glucose 10 mM et d'un autre monosaccharide à une concentration de 50 (●) mM. Les activités libres témoins sont mesurées en présence de glucose 10 mM uniquement (◻). Les différents monosaccharides testés sont: A= deoxyglucose, B= deoxyribose, C= β-d glucopyranoside, D= galactose, E= α-d glucopyranoside, F= fructose, G= mannose, H= ribose, I=L-glucose, J= mannitol, K= sorbitol. Les résultats sont exprimés en nanomoles de glucose oxydé.

Vitesse de réaction ($1/10^5$ nmole glucose oxydé/min)

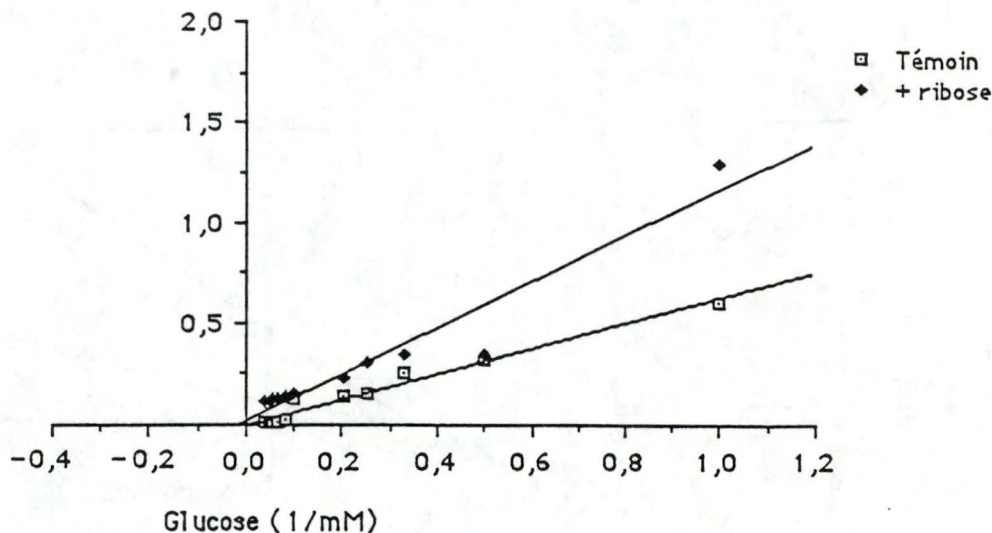


FIGURE 21. Inhibition par le ribose de l'activité libre de la glucose oxydase endocytée.

L'activité libre de la glucose oxydase est mesurée, sur la fraction L d'un rat injecté, en présence et en absence de ribose 20 mM pour différentes concentrations en glucose. les droites présentées par cette figure sont obtenues suite à l'application de la transformation de Lineweaver-Burk à l'équation de Michaelis-Menten. Les vitesses de réaction sont exprimées en nanomoles de glucose oxydé par minute.

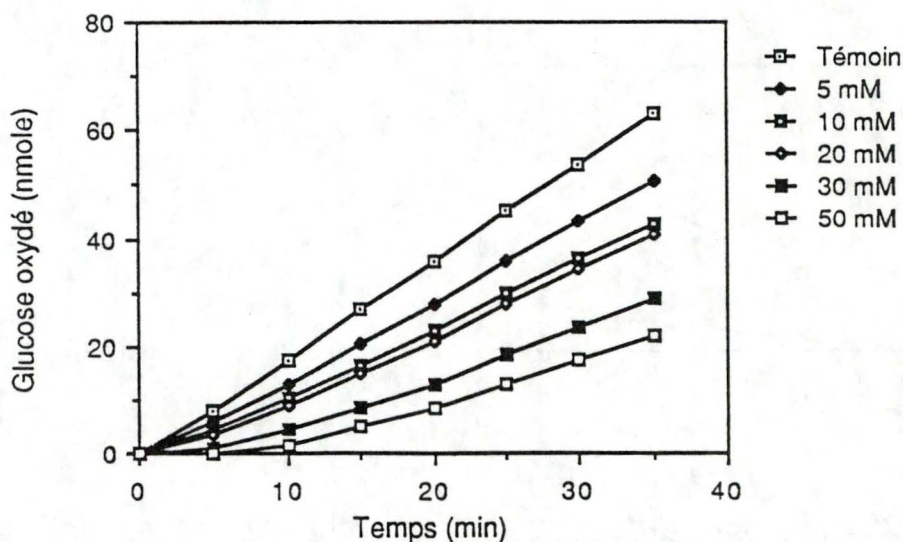


FIGURE 22. Effet de la concentration de ribose sur l'activité de la glucose oxydase endocytée.

L'activité libre de la glucose oxydase est mesurée sur la fraction L d'un rat injecté mise en présence de concentrations de ribose allant de 0 mM à 50 mM. Les résultats sont exprimés en nanomoles de glucose oxydé.

représenté l'évolution de l'activité libre au cours du temps, en présence et en absence du monosaccharide testé.

Nous observons que l'effet est variable suivant le sucre, l'effet étant maximal pour le L-glucose et minimal pour le déoxy-ribose.

Un cas particulier est celui du galactose que voit son effet supprimé après un certain temps (fig.20).

Cherchant à savoir si cette inhibition est de type compétitif, nous avons étudié l'action du ribose pour différentes concentrations en glucose. La gamme de concentrations choisie pour ce dernier, variait de 1 à 25 mM. La concentration en ribose quant à elle était de 20 mM.

Cette fois encore, nous avons appliqué la transformation de Lineweaver-Burk à l'équation de Michaelis-Menten.

La figure 21 présente les droites de régression obtenues à partir des résultats des mesures faites en présence et en absence de ribose. L'enzyme libérée n'a pas été testée ici, l'expérience précédente ayant montré qu'une concentration en ribose de 50 mM ne l'affectait pas.

Les Km calculés sont de l'ordre de 7 mM sans ribose et de 27.5 mM avec ce sucre. Ceci nous permet de conclure que l'inhibition par le ribose est compétitive. Toutefois, la vitesse maximale est également diminuée, indiquant que l'inhibition n'est pas uniquement du type compétitif. Remarquons que l'inhibition est d'autant plus importante que la concentration en ribose est élevée (fig. 22).

3.2.5.2. Disaccharides.

Les dissacharides étudiés sont: le maltose, la cellobiose et le saccharose.

Tout comme pour les monosaccharides, nous avons étudié leur action sur les activités libre et totale de la glucose oxydase. Leur concentration étant de 50 mM, celle du glucose étant de 10 mM.

Sur base des résultats obtenus, l'action du saccharose a été étudiée plus en détails.

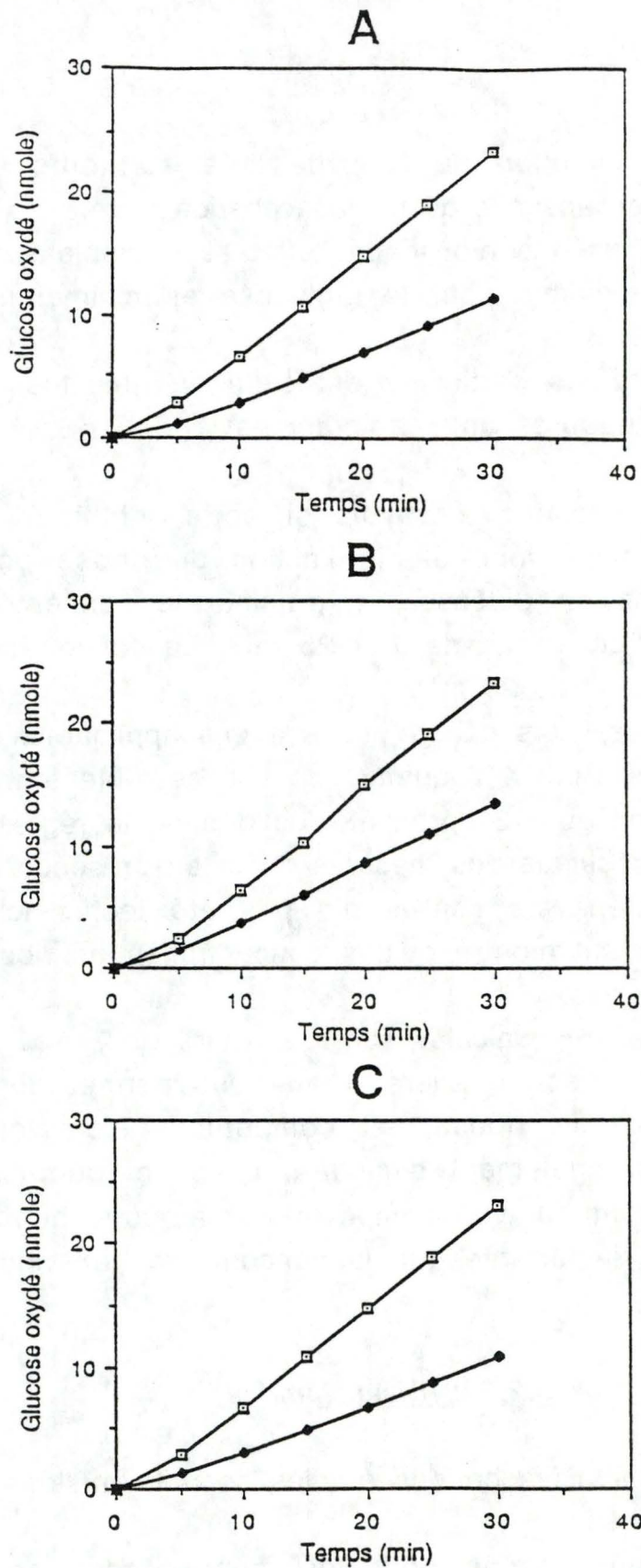


FIGURE 23. Effet de différents disaccharides sur l'activité libre de la glucose oxydase endocytée.

L'activité libre de la glucose oxydase est mesurée sur la fraction L d'un rat injecté mise en présence de glucose 10 mM et d'un autre disaccharide à une concentration de 50 mM (—●—). Les activités libres témoins sont mesurées en présence de glucose 10 mM uniquement (—◻—). Les différents disaccharides testés sont: A=Saccharose, B=Cellobiose, C=Maltose. Les résultats sont exprimés en nanomoles de glucose oxydé.

Tout d'abord, nous avons observé que dans les conditions choisies, aucun des disaccharides utilisés n'a d'effet sur l'activité de l'enzyme libérée (ces résultats ne sont pas représentés).

La figure 23 présente les résultats obtenus suite aux mesures d'activité libre en présence et en absence du sucre étudié. Nous constatons que pour tous les disaccharides, l'inhibition semble être du même ordre de grandeur. Le minimum étant de 43% (cellobiose) et le maximum de 54% (maltose).

Un fait marquant observé est l'inhibition de 50% par le saccharose, ce disaccharide étant connu pour son incapacité à traverser la membrane lysosomale [Lloyd *et al.*, 1969].

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène.

Suivant une première hypothèse, la glucose oxydase serait endocytée dans une population particulière de lysosomes, ceux-ci étant caractérisés par le fait qu'ils nécessiteraient une tonicité du milieu plus élevée pour être stables. Si cette supposition est exacte, toutes les activités libres mesurées jusqu'à présent pourraient s'expliquer en partie par une libération en petites quantités de l'enzyme dans le milieu extérieur (hypothèse 1).

La deuxième hypothèse quant à elle, présuppose l'existence d'un transporteur du glucose. L'hypertonie du milieu agirait sur ce transporteur en diminuant son efficacité (hypothèse 2).

Pour choisir entre ces deux hypothèses, nous avons à nouveau utilisé la phlorétine et le diéthylstilbestrol. Si l'hypothèse 1 est exacte, nous devons nous attendre à ce que pour une concentration en saccharose donnée, l'activité libre avec inhibiteur soit équivalente à l'activité libre sans inhibiteur.

Dans un premier temps, nous avons choisi deux concentrations en saccharose (0.22 M et 0.36 M) que nous avons testées en présence de phlorétine 10^{-5} M, pour l'activité libre et pour la totale.

Comme nous l'avons déjà constaté, cet inhibiteur diminue l'action de l'enzyme libérée. L'activité avec inhibiteur représentant 72% de l'activité témoin, pour les deux concentrations

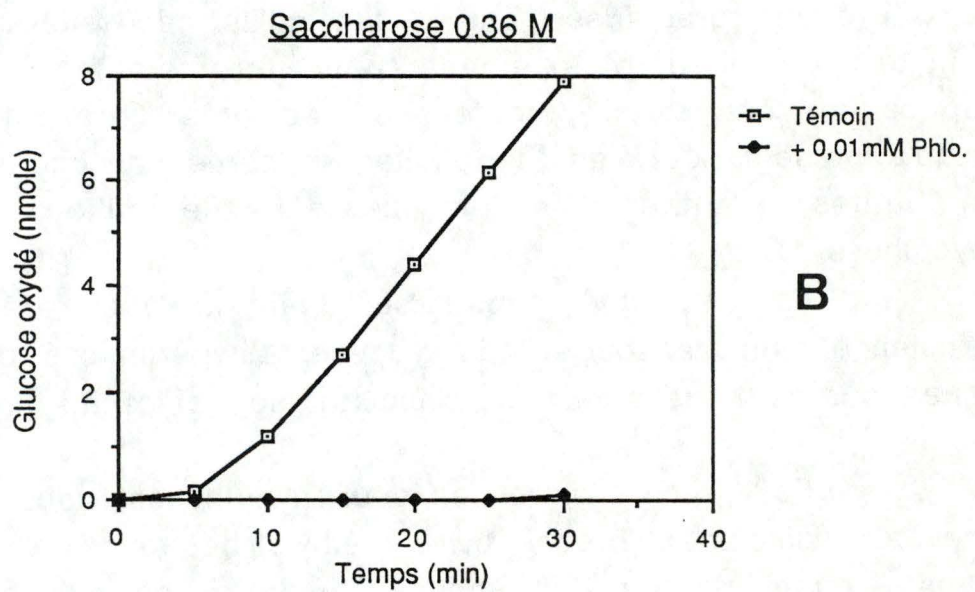
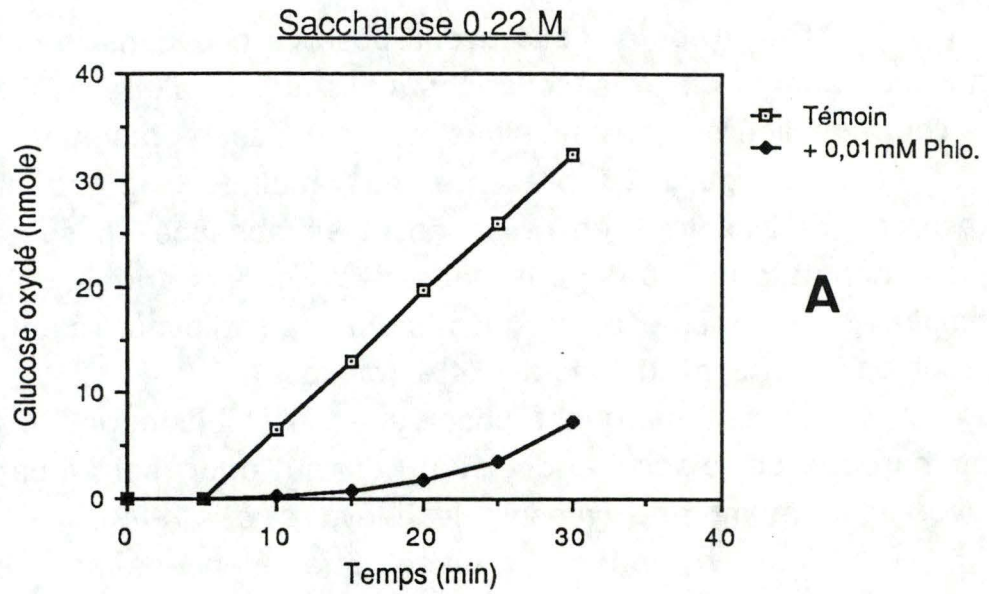


FIGURE 24. Effet de la phlorétine sur l'activité libre de la glucose oxydase endocytée, pour deux concentrations de saccharose.

L'activité libre de la glucose oxydase est mesurée en absence (Témoin) et en présence de phlorétine 0.01 mM sur la fraction L d'un rat injecté, incubée dans un milieu contenant du saccharose 0.22 M (A) ou du saccharose 0.36 M (B).

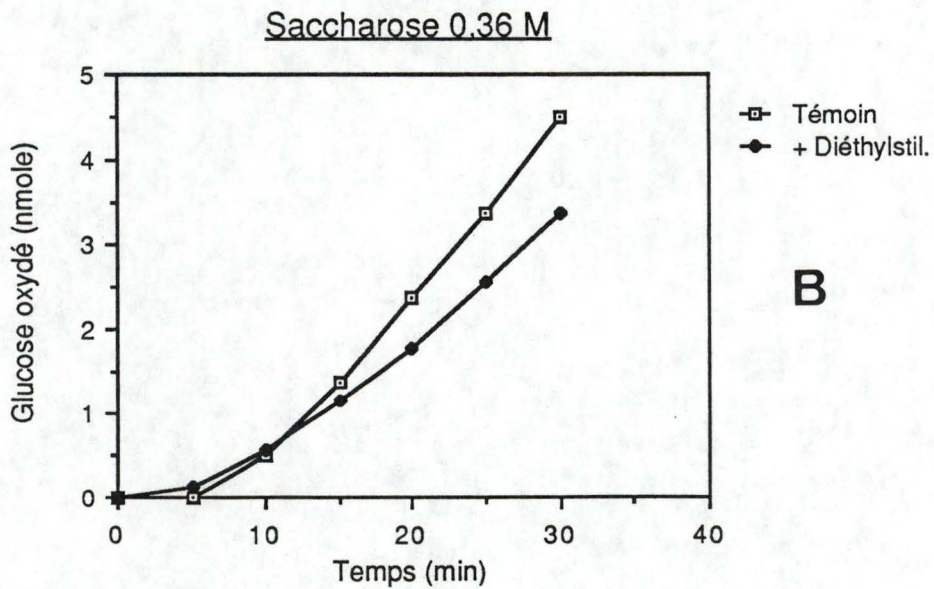
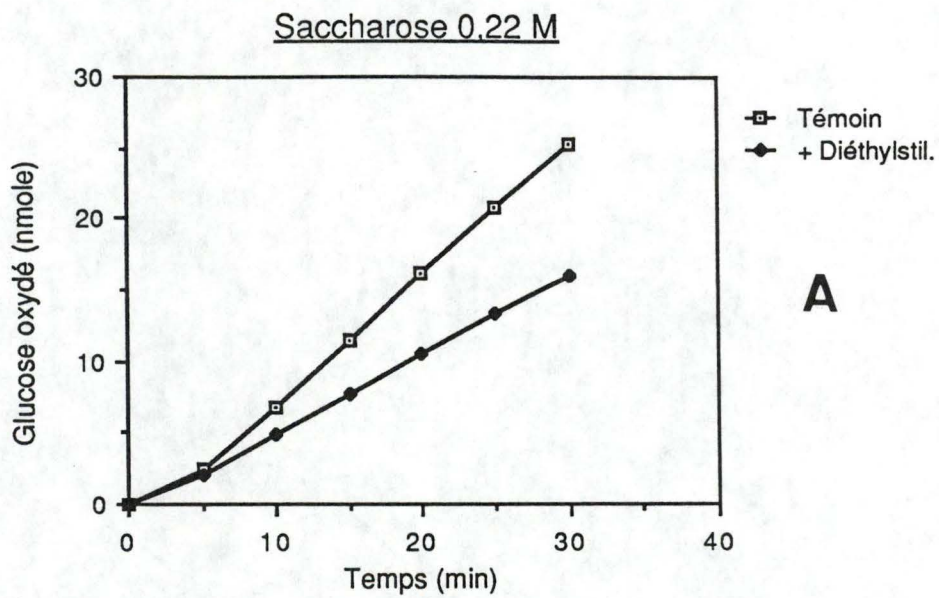


FIGURE 25. Effet du diéthylstilbestrol sur l'activité libre de la glucose oxydase endocytée, pour deux concentrations de saccharose.

L'activité libre de la glucose oxydase est mesurée en absence (Témoin) et en présence de diéthylstilbestrol 2×10^{-5} M, sur la fraction L d'un rat injecté, incubée dans un milieu contenant du saccharose 0.22 M (A) ou du saccharose 0.36 M (B).

en saccharose. L'inhibition de l'activité libre est présentée aux figures 24a et 24b. Nous constatons que l'inhibition est pratiquement totale à 0.36 M, alors qu'elle est de 43% à 0.22 M. Remarquons que ces valeurs sont nettement supérieures aux 28% observés pour l'activité totale.

Nous avons répété cette expérience en remplaçant la phlorétine par le diéthylstilbestrol pris à une concentration de 2×10^{-5} M. Les résultats obtenus sont illustrés à la figure 25. Pour les deux concentrations en saccharose choisies, nous avons représenté l'évolution de l'activité libre au cours du temps, avec et sans inhibiteur.

Aucune action du diéthylstilbestrol n'a été observée sur l'enzyme libérée. Par contre, l'activité de la glucose oxydase mesurée sans triton X-100 est réduite par cet inhibiteur. Contrairement à ce que nous avons observé pour la phlorétine, nous constatons une réduction plus grande de l'activité à 0.22 M (40%) que pour 0.36 M en saccharose (25%).

Les résultats de ces deux expériences nous permettent de penser que l'activité libre de la glucose oxydase que nous mesurons n'est pas due, au moins en partie, à de l'enzyme libérée à partir de lysosomes particulièrement sensibles à la tonicité.

CHAPITRE IV: CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Les expériences de centrifugation différentielle et isopycnique, de même que les expériences d'activation des enzymes lysosomales, nous ont permis de postuler que la glucose oxydase injectée à un rat par voie intraveineuse, est captée par le foie et atteint les lysosomes (vraisemblablement ceux des cellules endothéliales) où elle reste active pendant un minimum de 180 minutes.

De ce fait, nous avons effectué des mesures d'activité libre et totale de cette enzyme endocytée, pour étudier la perméabilité de la membrane des lysosomes vis-à-vis du glucose.

Les activités libres de la glucose oxydase mesurées sur une préparation de lysosomes peuvent résulter soit de la libération de petites quantités d'enzyme dans le milieu d'incubation (hypothèse A), soit de l'oxydation intralysosomale du glucose (hypothèse B), ce processus étant limité par la diffusion du sucre à travers la membrane lysosomale.

Le fait que les activités libre et totale ont un K_m similaire, est en faveur de l'hypothèse A. Cependant, l'hypothèse B n'est pas non plus invraisemblable. En effet, si le glucose entre dans les lysosomes par diffusion facilitée, la vitesse de son oxydation intralysosomale par la glucose oxydase (V) en fonction de la concentration externe en glucose (C_e) sera un hyperbole [Taverna et Langdon., 1972],

$$v = \frac{V_a \cdot C_e}{K_a + C_e}$$

où V_a est le flux unidirectionnel maximal et K_a la concentration en glucose donnant un flux équivalent à la moitié du flux maximal, si nous supposons que la concentration interne en glucose est beaucoup plus faible que la concentration externe. On ne peut exclure que K_a soit d'un même ordre de grandeur que K_m .

L'énergie d'activation plus élevée pour l'activité libre que pour l'activité totale de la glucose oxydase est en faveur de l'hypothèse B. En effet, si dans les conditions de mesure de l'activité libre, le glucose doit traverser la membrane des lysosomes, une énergie supplémentaire sera nécessaire.

L'inhibition de l'activité libre de la glucose oxydase par le diéthylstilbestrol et la phlorétine, à des concentrations pour lesquelles ces substances n'ont pas d'effet sur l'activité totale renforce encore l'hypothèse B.

L'effet inhibiteur d'autres monosaccharides sur l'activité libre alors qu'ils sont sans effet sur l'activité totale, est aussi en faveur de l'hypothèse B. Cependant, cette inhibition semble être due en partie, a un effet osmotique comme tendent à le montrer les expériences réalisées avec des disaccharides.

En résumé, à la suite de toutes ces observations, nous pensons que l'activité libre de la glucose oxydase mesurée sur des lysosomes chargés avec cette enzyme, résulte principalement d'une oxydation intralysosomale du glucose et peut de ce fait être utilisée pour mesurer la diffusion du glucose à travers la membrane lysosomale.

Bibliographie

- Achord, D.T., Brot, F.E. & Shy, W.S. (1977)
Biophys. Res. Commun. **77**, 409-415
- Appelmans, F. & de Duve, C. (1955)
Biochem. J. **59**, 426-433
- Badenoch-Jones, P. & Baum, H. (1974)
Biochem. J. **142**, 1-6
- Bangham, A.D., de Gier, J. & Greville, G.D. (1967)
Chem. Phys. Lipids **1**, 225
- Beaufay, H., Amar-Costesec, A., Feytmans, E., Thines-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M. & Berthet, J. (1974)
J. Cell Biol. **61**, 188-200
- Bernar, J., Tietze, F., Kohn, L.D., Bernardini, L., Harper, G.S., Grollman, E.F. & Gahl, W.A. (1986)
J. Biol. Chem. **261**, 17107-17112
- Berthet, J., Berthet, L., Appelmans, F. & de Duve, C. (1951)
Biochem. J. **50**, 182-189
- Bird, S.J., Forster, S. & Lloyd, J.B. (1987)
Biochem. J. **245**, 929-931
- Blomhoff, R., Eskild, W. & Berg, T. (1984)
Biochem. J. **218**, 81-86
- Brown, J.A. & Segal, H.L. (1977)
J. Biol. Chem. **252**, 7151-7155
- Brown, M.S., Anderson, R.G.W. & Goldstein, J.L. (1983)
Cell **32**, 663-667
- Brown, M.S. & Goldstein, J.L. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 3330-3337
- Burton, R., Eck., C.D. & Lloyd, J.B. (1975)
Biochem. Soc. Trans. **3**, 1251-1253

Carpentier, J.L., Gordon, P., Barazzone, P., Freychet, P., Le Cam, A. & Orci, L. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 2803-2807

Casey, R.P., Hollemans, M. & Tayer, J.M. (1978)
Biochem. Biophys. Acta **508**, 15-26

Christensen, H.N. (1984)
Biochem. Biophys. Acta **779**, 255-269

Cohn, Z.A. & Ehrenreich, B.A. (1969)
J. Exp. Med. **129**, 201-225

Cohn, Z.A. & Hirsch, J.G. (1960)
J. Exp. Med. **112**, 983

Collarini, E.J., Pisoni, R.L. & Christensen, H.N. (1989)
Biochim. Biophys. Acta **987**, 139-144

Davidson, S.J. (1975)
Biochim. Biophys. Acta **411**, 282-290

Davidson, S.J. & Song, S.W. (1975)
Biochim. Biophys. Acta **375**, 274-285

Davies, M. (1975)
in : *Lysosomes in Biology and Pathology* (Bingle, J.T. and Bean, R.T., eds.), Vol IV, pp.305-348, North-Holland Publ. co., Amsterdam

de Duve, C., de Barse, T., Poole, B., Trouet, A., Tulkens, P. & Vanhoof, F. (1974)
Biochem. Pharmacology **23**, 2495-2531

de Duve, C., Pressman, B.C. Gianetto, R. Wattiaux, R. & Appelmans, F. (1955)
Biochem. J. **60**, 604-617

Docherty, K., Brenchley, G.V. & Hales, C.N. (1979)
Biochem. J. **178**, 361-366

Docherty, K., Maguire, G.A. & Hales, N. (1983)
Bioscience Reports **3**, 207-216

Ehrenreich, B.A. & Cohn, Z.A. (1969)
J. Exp. Med. **129**, 227-243

- Forster, S; & Lloyd, J.B. (1988)
Biochim. Biophys. Acta **947**, 465-491
- Gahl, W.A., Tietze, F. Bashan, N., Steinherz, R. & Schulman, J.D.
(1982)
J. Biol. Chem. **257**, 9570-9575
- Goldman, R. & Kaplan, A. (1973)
Biochim. Biophys. Acta **318**, 205-216
- Goldman, R. & Naider, F. (1974)
Biochim. Biophys. acta **338**, 224-233
- Goldman, R. & Rottenberg H. (1973)
FEBS Lett. **33**, 233- 238
- Goldstein, J.L., Anderson, R.G.W. & Brown, M.S. (1979a)
Nature **279**, 679-685
- Goldstein, J.L., Ho, Y.K. Basu, S.K. & Brown, M.S. (1979b)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 333-337
- Greene, A.A., Clark, K.F. Smith, M.L. & Schneider, J.A. (1987)
Biochem. J. **246**, 547-549
- Gruenberg, J. & Kathryn, E. H. (1989)
Ann. Rev. Cell. Biol. **5**, 453-481
- Hales, C.N., Docherty, K. & Maguire, G.A. (1984)
in : *Lysosomes in Biology and Pathology* 'Bingle, J.T. Bean, R.T. and Sly, W., eds.), Vol 7, pp. 165-174, Elsevier, Amsterdam
- Hales, C.N. Docherty, K. & Maguire, G.A. (1982)
Biochem. Soc. Trans. **10**, 14-15
- Harikumar, P. & Reeves, J.P. (1983)
J. Biol. Chem. **258**, 10403-10410
- Henning, R. (1975)
Biochem. Biophys. Acta **401**, 307-316
- Hubbard, A.N., Wilson, G. Ashwell, G. & Stukenbrok, H. (1979)
J. Cell Biol. **83**, 47-64
- Jadot, M., Wattiaux-de Coninck, S. & Wattiaux, R. (1989)
Biochem. J. **262**, 981-984

- Jonas, A.J., Greene, A.A., Smith, M.L. & Schneider, J.A. (1982)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 4442-4445
- Jonas, A.J. Smith, M.L. & Schneider, J.A. (1982)
J. Biol. Chem. **257**, 13185-13188
- Jonas, A.J., Smith, M.L., Allison, W.S., LAikind, P.K., Greene, A.A. & Schneider, J.A. (1983)
J. Biol. Chem. **258**, 11727-11730
- Jonas, A.J. (1986a)
Biochem. J. **236**, 671-677
- Jonas, A.J. (1986b)
Biochem. Biophys. Res. Commun. **137**, 175-181
- Jonas, A.J., Symons, L.J. & Speller, R.J. (1987)
J. Biol. Chem. **262**, 16391-16393
- Jonas, A.J., Dubinsky, W.P. (1989)
J. Biol. Chem. **264**, 4993
- Kalra, J., Chaudhary, A.K. & Prasad, K. (1989)
J. Mol. Cell. Cardiol. **21**, 1125-1136
- Lefèvre, P.G. (1959)
Science **130**, 104-105
- Lloyd, J.B. (1969)
Biochem. J. **115**, 703-707
- Lloyd, J.B. (1971)
Biochem. J. **121**, 245-248
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951)
J. Biol. Chem. **193**: 265-275
- Maguire, G.A., Docherty, K. & Hales, C.N. (1983)
Biochem. J. **212**, 211-218
- Maguire, G.A., Kay, J.D.S. & Hales, C.N. (1988)
Biochem. J. **252**, 621-623
- Mancini, G.M.S., Verhejin, F.W. & Galjaard, H. (1986)
Hum. Genet. **73**, 214-217

- Mandell, G.L. (1970)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **134**, 447-449
- Matsuzawa, Y. & Hostetler, K.Y. (1980)
J. Biol. Chem. **255**, 646-652
- Mego, J.L., Farb, R.M. & Baines, J. (1972)
Biochem. J. **128**, 763-769
- Melchior, D.L. & Czech, M.P. (1979)
J. Biol. Chem. **254**, 8744-8747
- Moriyama, Y., Takano, T. & Ohkuma, S. (1984)
Biochem. J. **95**, 995-1007
- Munthe-Kaas, A.C., Berg, T. & Seljelid, R. (1976)
Exptl. Cell Res. **99**, 146-154
- Ohkuma, S. & Poole, B. (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 3327-3333
- Ohkuma, S., Moriyama, Y. & Takano, T. (1982)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 2758-2762
- Pazur, J.H., Kleppe, K. & Ball, E.M. (1963)
Arch. Biochem. Biophys. **103**, 515-518
- Pisoni, R.L., Flickinger, K.S., Thoene, J.G. & Christensen, H.N. (1986)
Fed. Proc. **45**, 1759
- Pisoni, R.L., Thone, J.G. & Christensen, H.N. (1985)
J. Biol. Chem. **260**, 4791-4798
- Pisoni, R.L., Thoene, J.G., Lemans, R.M. & Christensen, H.N. (1987)
J. Biol. Chem. **262**, 15011-15018
- Pisoni, R.L. & Thoene, J.G. (1989)
J. Biol. Chem. **264**, 4850
- Reeves, J.P. (1979)
J. Biol. Chem. **254**, 8914-8921
- Reijngoud, D.J. & Tayer, J.M. (1975)
FEBS Lett. **54**, 76-79

- Reijngoud, D.J., Oud, P.S., Kas, J. & Tayer, J.M. (1976)
Biochem. Biophys. Acta **448**, 290-302
- Reijngoud, D.J. & Tayer, S.M. (1977)
Biochem. Biophys. acta **472**, 419-449
- Renlund, M., Chester, M.A., Lundblad, A., Parkkinen, J. & Krusius, T.
(1983)
Eur. J. Biochem. **130** 39-45
- Renlund, M., Tietze, F. & Gahl, W.A. (1986a)
Science **232**, 759-762
- Renlund, M., Kovanen, P.T., Raivio, K.O. Aula, P., Gahmberg, C.G. &
Ehnholm, C. (1986b)
J. Clin. Invest. **77**, 568-574
- Rosenberg, R., Young, J.D. & Ellory, J.C. (1980)
Biochim. Biophys. Acta **598**, 375-384
- Salter, M., Knowles, R.G. & Pogson, C.I. (1986)
Biochem. J. **233** 499-506
- Schneider, J.A., Bradley, K.H. & Seegmiller, J.D. (1967)
Science **157**, 1321-1322
- Schneider, D.L. (1981)
J. Biol. Chem. **256**, 3858-3864
- Schulman, J.D. & Bradley, K.H. (1970)
J. Exp. Med. **132**, 1090-1105
- Seeman, P. (1967)
J. Cell. Biol. **32**: 55-70
- Sellinger, O.Z., Beaufay, H., Jacques, P., Doyen, A. & de Duve, C.
(1960)
Biochem. J. **74**: 450-456
- Sen, A.K. & Post, R.L. (1964)
J. Biol. Chem. **239**: 345-352
- Silverstein, S.C., Steimman, R.M. & Cohn, Z.A. (1977)
Ann. Rev. Biochem. **46**, 669-722

- Smith, M.L., Greene, A.A., Potashnik, R., Mendoza, S.A. & Schneider, J.A. (1987)
J. Biol. Chem. **262**, 2144-1253
- Stahl, P. & Schwantz, A.L. (1986)
J. Clin. Invest. **77**, 657-662
- Steer, C.J. & Clarenburg, R. (1979)
J. Biol. Chem. **254**, 4457-4461
- Stein, W.D. (1967)
in : "The movement of molecules across cell membranes", New York & London Academic Press, INC
- Stein, D.W. & Lieb, D.W. (1989)
in: "Transport and Diffusion across cell membranes", New York & London Academic Press, INC
- Steinherz, R., Tietze, F., Gahl, W.A., Triche, T.J., Chiang, H., Modesti, A. & Schulman, J.D. (1982)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 4446-4450
- Steinman, R.M., Mellman, I.S., Muller, W.A. & Cohn, Z.A. (1983)
J. Cell Biol. **96**, 1-27
- Stewart, B.A., Collarini, E.J., Pisoni, R.L. & Christensen, H.N. (1989)
Biochim. Biophys. Acta **987**, 145-153
- Taverna, R.D. & Langdon, R.G. (1973)
Biochim. Biophys. Acta **298**, 412-421
- Tietze (1989)
J. Biol. Chem. **264**, 4762
- Titani, N. & Wells, W.W. (1974)
Arch. Biochem. Biophys. **164**, 357-366
- Vaes, G & Jacques (1965)
Biochem. J. **97**, 393-402
- Verity, M.A. & Brown, W.J. (1973)
Exp. Mol. Pathol. **19**, 1-14
- Ward, W.F. & Mortimore, G.E. (1978)
J. Biol. Chem. **253**: 3581-3587

Warner, T.G. Dambach, L.M., Shir, J.H. & O'Brien, J.S. (1981)
J. Biol. Chem. **256**, 2592-2597

Wattiaux, R. (1966)
dans : "Etude expérimentale de la surcharge des lysosomes". Thèse
d'Agrégation de l'Enseignement Supérieur- Université Catholique de
Louvain, Belgique (Imprimerie.Duculot, Gembloux, Belgique) 149pp.

Wattiaux, R. & de Duve, C. (1956)
Biochem. J. **63**, 606-608

Wattiaux, R. Wibo, M & Baudhuin, P. (1963)
in : Ciba foundation symposium on lysosomes, pp. 176-200, de
Reuck, A.V.S. & Cameron, M.P. eds., J. & A. Churchill Ltd. London

Wattiaux-de Coninck, S., Rugeerts M.J. & Wattiaux R. (1965)
Biochim. Biophys. Acta **105**, 446

Wattiaux, R., Wattiaux-de Coninck, S., Ronveaux-Dupal, M-F. &
Dubois, F. (1978)
J. Cell. Biol. **78**, 349-368