



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution à l'étude de l'adressage de la cathepsine C de rat exprimée dans des oocytes de *Xenopus Laevis*

Santilman, Virginie

Award date:
1998

[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.

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

SECRETARIAT BIOLOGIE
F. U. N. D. P.
Rue de Bruxelles 61
S.C. - 5000 NAMUR

JUN 1998

Faculté des Sciences

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ADRESSAGE DE LA CATHEPSINE C DE RAT
EXPRIMEE DANS DES OOCYTES DE XENOPUS LAEVIS**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licenciée en Sciences
biologiques**

Virginie SANTILMAN

Juin 1998

Au terme de ce mémoire, je tiens à exprimer ma reconnaissance envers toutes les personnes qui ont contribué à sa réalisation.

Merci au Professeur P. Devos, promoteur de ce mémoire pour ses utiles suggestions.

Je remercie le Professeur S. Wattiaux-De Conninck qui m'a accueillie dans son laboratoire de Chimie Physiologique.

J'adresse toute ma gratitude au Professeur M. Jadot qui m'a guidée tout au long de ce mémoire et m'a permis de bénéficier de son expérience scientifique qu'il communique avec enthousiasme.

Je tiens à remercier le Docteur F. Mainferme ainsi que le Professeur R. Wattiaux pour leurs conseils judicieux plus particulièrement lors de la rédaction.

Un grand merci à D. Detaille du laboratoire de Biochimie et Physiologie Comparées pour son attention et sa patience au cours des microinjections.

C'est également envers toutes les personnes du laboratoire de Chimie Physiologique que je n'ai pas encore citées que j'exprime ma reconnaissance. Je pense plus particulièrement à Monsieur F. Dubois dont le sourire éclaire toujours le laboratoire ainsi qu'à D. Demirov, L. Le, N. Laurent et M. Savels pour leur collaboration précieuse.

Je remercie de tout cœur mes parents qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de mes études ainsi que mes amis sans qui beaucoup de montagnes n'auraient pu être franchies.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Contribution à l'étude de l'adressage de la cathepsine C de rat exprimée dans
des oocytes de Xenopus Laevis**

SANTILMAN Virginie

Résumé

Les microinjections d'ARN messenger coiffé dans des oocytes de *Xenopus Laevis* sont capables de forcer l'expression par ceux-ci d'une exopeptidase lysosomale soluble, la cathepsine C (dipeptidylaminopeptidase I) sauvage de rat. La protéine produite, mise en évidence par immunoprécipitation, correspond au précurseur glycosylé de cette enzyme. L'étude de l'adressage de la cathepsine C par microinjection d'ARN réalisés à partir des différents mutants de la cathepsine C disponibles pourrait dès lors être envisagée en utilisant les conditions d'expérimentation que nous avons définies.

Par ailleurs, nous avons montré au cours de ce travail, qu'un lysat d'oocytes de *Xenopus Laevis* semble pouvoir être utilisé pour une partie des études biosynthétiques que nous comptons réaliser sur la cathepsine C.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1998

Promoteur: P. Devos

Co-promoteur : M. Jadot

Table des matières :

Introduction	1
I. Cathepsine c :	1
I.1. Lysosomes en général :	1
I.2. Protéases lysosomales :	1
I.3. Cathepsine C :	2
II. Biosynthèse et adressage des hydrolases lysosomales :	4
II.1. Voie dépendante du mannose-6-phosphate :	4
Phosphotransférase :	6
II.2. Adressage indépendant du mannose-6-phosphate :	7
III. Etude de la biosynthèse et de l'adressage de la cathepsine C :	9
III.1. Biosynthèse :	9
Cathepsine C et voie indépendante du mannose-6-phosphate :	10
But du travail	11
Matériel et méthodes :	13
I. Préparation et contrôle de l'ARN messager :	13
I.1. Préparation du plasmide :	13
I.2. Linéarisation du plasmide :	13
I.3. Transcription in vitro :	14
A. Production d'ARN messager non coiffé :	14
B. Production d'ARN messager coiffé :	14
I.4. Traduction in vitro :	15
A. Traduction dans du lysat de réticulocytes de lapin :	15
B. Traduction dans de l'extrait de germe de blé :	16
C. Traduction dans du lysat d'oocytes :	17
Obtention des oeufs :	17
Réalisation du lysat :	17
Traitement à la ribonucléase :	18
Traduction :	18
II. Expression oocytaire :	19
II.1. Microinjections :	19
A. Description du matériel utilisé :	19
Oocytes de <i>Xenopus Laevis</i> :	19
Appareil de microinjection :	19

Milieu de Barth modifié :	20
B. Microinjections :	20
C. Marquage métabolique :	20
II.2 Immunoprécipitations :	21
III. Chromatographie d'affinité sur une colonne porteuse du récepteur de Man-6-P :	22
IV. Gels électrophorétiques :	23
IV.1 Gel d'agarose :	23
IV.2 Gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) :	23
V. Centrifugations et dosages enzymatiques :	24
V.1 Centrifugation différentielle :	24
V.2 Centrifugation isopycniqne :	25
V.3 Dosages enzymatiques :	26
Résultats et discussion :	27
I. Mesure de l'activité endogène de la cathepsine C dans l'oocyte :	27
I.1 Activité dans l'homogénat :	27
I.2 Centrifugation différentielle :	28
I.2. Centrifugation isopycniqne :	29
II. Préparation du plasmide et restriction :	31
III. Production d'ARN messager non coiffé :	33
IV. Traduction in vitro dans du lysat de réticulocytes de lapin:	34
V. Microinjection d'ARN non coiffé :	36
VI. Production d'ARN messager coiffé :	37
VII. Traductions in vitro :	39
VII.1 Lysat de réticulocytes de lapin :	39
VII.2 Extrait de germe de blé :	40
Traduction in vitro :	41
Immunoprécipitation :	42
VIII. Microinjections de l'ARN coiffé :	43
VIII.1 Dosage de l'activité :	43
VIII.2 Immunoprécipitations :	45
Injection d'ARN uniquement précipité à l'éthanol :	45
Immunoprécipitation de l'activité :	47
Injection de deux préparations d'ARN différentes :	48
Mise au point de l'injection : quantité d'ARN et temps de marquage métabolique :	49
Utilisation de L-méthionine [³⁵ S] pour le marquage métabolique :	50
IX. Traduction dans du lysat d'oocytes :	52

Traduction.....	52
Chromatographie d'affinité sur une colonne porteuse du récepteur de Man-6-P	53

Conclusion et perspectives :	56
---	----

Bibliographie :	60
------------------------------	----

Introduction

I. Cathepsine c :

I.1. Lysosomes en général :

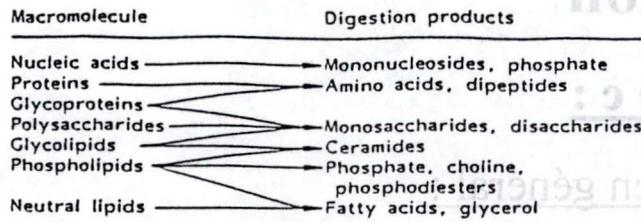
Les lysosomes sont, par définition, des vacuoles denses aux électrons limitées par une membrane et riches en hydrolases acide-dépendantes. Celles-ci sont capables de dégrader la plupart des macromolécules qu'elles soient endogènes (fonction autophagique) ou endocytées (fonction hétérophagique). On distingue les lysosomes primaires qui viennent d'être formés, des lysosomes secondaires résultant de la fusion d'un lysosome primaire avec un endosome. Cependant, cette définition est assez limitée pour décrire et comprendre leur biogenèse. En effet, les lysosomes reçoivent du matériel des voies d'endocytose et de biosynthèse et partagent de nombreuses caractéristiques avec les vésicules impliquées dans leur formation. De plus, pour les distinguer, une caractérisation morphologique s'avère assez difficile, car ils sont, de ce point de vue, très hétérogènes.

de Duve lui-même, reconnaissant la difficulté de les définir proposa que les lysosomes aient plus qu'une fonction de digestion acide et soient en fait le compartiment de dégradation terminal. Cette définition fonctionnelle est confirmée par le fait que les marqueurs d'endocytose ne ressortent pas des lysosomes : ils sont dégradés ou y résident indéfiniment. Ils sont également le compartiment terminal pour les enzymes lysosomales, celles-ci suivant, à partir de l'appareil de Golgi, un transport unidirectionnel.

I.2. Protéases lysosomales :

Les lysosomes contiennent une cinquantaine d'enzymes regroupées sous le terme d'hydrolases acides car elles catalysent des réactions de type : $A-B + H_2O \rightarrow A-H + B-OH$ et ne fonctionnent qu'à un pH acide maintenu par une pompe à

Digestive activity of lysosomes



Proteolytic pathway	Glycanolytic pathway	Nuclease pathway	Lipolytic pathway
Cathepsin D	Hyaluronidase	Ribonuclease II	Triacylglycerol lipase
Cathepsin B	Heparin endoglucuronidase	Deoxyribonuclease II	Phospholipase A ₁
Cathepsin H	Heparan sulfate endoglycosidase		Phospholipase A ₂
Cathepsin L	Lysozyme ^b	Exonuclease (5'-terminal)	Phosphatidate phosphatase
(Glycosidases and phospho-protein phosphatase also act on intact proteins)	α-L-Fucosidase	Acid phosphatase	Acylsphingosine deacylase
	α-Galactosidase	(There are additional enzymes with phosphodiesterase, pyrophosphatase, nucleoside triphosphatase, and phosphoamidase activities in lysosomes)	Sphingomyelin phosphodiesterase
	β-Galactosidase		(Other enzymes including glycosidases and sulphatases also make important contributions to the lipolytic pathway. Moreover, there are necessary 'activator' proteins)
Tripeptidyl peptidase	α-Glucosidase		
Dipeptidyl peptidase I	β-Glucosidase		
Dipeptidyl peptidase II	α-N-Acetylgalactosaminidase		
Arginyl aminopeptidase (cathepsin H)	α-N-Acetylglucosaminidase		
Peptidyl dipeptidase C (cathepsin B)	β-N-Acetylglucosaminidase		
Carboxypeptidase A	β-Glucuronidase		
Carboxypeptidase B	α-L-Iduronidase		
Prolyl carboxypeptidase	α-Mannosidase		
Tyrosine carboxypeptidase	β-Mannosidase		
Dipeptidase I	Neuraminidase		
Dipeptidase II	β-Aspartylglucosylaminase		
	Chondroitin 6-sulfatase		
	Heparin sulfatase		
	Iduronosulfatase		
	Sulfatases A and B		

Figure 1. Enzymes lysosomales et leurs fonctions digestives.

Les principales enzymes lysosomales sont classées selon leur voie métabolique. Elles sont capables de dégrader la plupart des macromolécules biologiques. (Holtzman ; Lysosomes ; p2-3)

protons de la membrane lysosomale. Ces hydrolases sont capables de dégrader la plupart des macromolécules biologiques : acides nucléiques, lipides, polysaccharides, ou protéines (voir figure 1).

Ces enzymes, pour la plupart des glycoprotéines, partagent un même mode de synthèse dont il sera question plus loin. Leur adressage s'effectue selon deux voies majeures : dépendante et indépendante des récepteurs de mannose-6-phosphate. Elles ont également en commun une durée de vie assez longue ($\frac{1}{2}$ vie d'un jour à plusieurs semaines) et ce malgré leur environnement contenant de nombreuses enzymes capables de les dégrader.

Les protéases sont des hydrolases capables de dégrader des chaînes polypeptidiques ou de petits polypeptides. On distingue les exopeptidases qui n'agissent qu'aux extrémités des peptides, des endopeptidases qui sont capables de les cliver en leur sein. Les cathepsines, généralement des endopeptidases, constituent la plus grande partie des protéases lysosomales.

I.3. Cathepsine C :

La cathepsine C ou dipeptidylaminopeptidase I (DPP-I ; EC 3.4.14.1) est une glycoprotéine lysosomale soluble qui appartient au groupe des protéases à cystéine et plus spécialement à la famille de la papaïne. Les membres de celle-ci (papaïne et d'autres protéases des plantes ainsi que les cathepsines B, H, L, S, C et K) ont en commun une grande homologie de séquence en acides aminés dans la région mature de la protéine avec une conservation de 3 acides aminés au sein du site actif ainsi qu'une activité optimale à pH acide (Turk *et al.*, 1997).

La cathepsine C de rat est composée d'un peptide signal de 28 résidus amino-terminaux, d'un propeptide de 201 acides aminés et d'une région mature de 233 résidus carboxy-terminaux. Le propeptide est inhabituellement long et ne montre pas de similarité de séquence avec celui des autres protéases à cystéine ; il pourrait

posséder une fonction particulière. Par contre, la région mature de l'enzyme possède entre 39.5 et 30.5 % d'identité avec les autres membres de la famille de la papaïne (Kominami *et al.*, 1992)

Au contraire des autres enzymes de sa famille qui sont petites et monomériques (20-35 kDa), la cathepsine C possède une structure oligomérique de 200 kDa. La cathepsine C du rat serait composée de 8 sous-unités assemblées en deux tétramères par des liaisons covalentes (Muno *et al.*, 1993). La cathepsine C humaine est composée de 4 sous-unités identiques comprenant chacune 3 chaînes polypeptidiques dont deux liées par des ponts disulfures. Cette structure permet d'expliquer par un effet de coopération entre sous-unités une cinétique d'hydrolyse du substrat différente de la cathepsine C du rat, déviant de la courbe de Michaelis-Menten (Dolenc *et al.*, 1995).

La cathepsine C n'est pas, comme les autres cathepsines, une endopeptidase mais bien une exopeptidase capable d'enlever séquentiellement des dipeptides de la région amino-terminale de différents peptides. Son activité enzymatique est maximale à pH 5-6 et requiert la présence d'agents réducteurs des groupes thiols, tels que la mercaptoéthylamine, ainsi que des ions Cl⁻. Elle présente une certaine spécificité : lorsque l'acide aminé situé du côté carboxy-terminal de la liaison clivée est une arginine, son activité est maximale ; par contre, elle est nulle lorsque cet acide aminé est une proline.

Outre sa fonction de dégradation du matériel extracellulaire intégré par endocytose ou du matériel intracellulaire dans le cadre de l'autophagie, en tant qu'enzyme lysosomale, la cathepsine C est également impliquée dans la croissance cellulaire (Doughty *et al.*, 1987), l'activation du facteur plaquettaire XIII (Lynch *et al.*, 1988) et l'activation d'une autre enzyme lysosomale, la neuraminidase (D'Agarosa *et al.*, 1988). L'IGF II (insulin-like growth factor II) est aussi un de ses substrats (Kiess *et al.*, 1994). La cathepsine C est présente dans une large variété de

Biosynthetic Pathway Endocytic Pathway

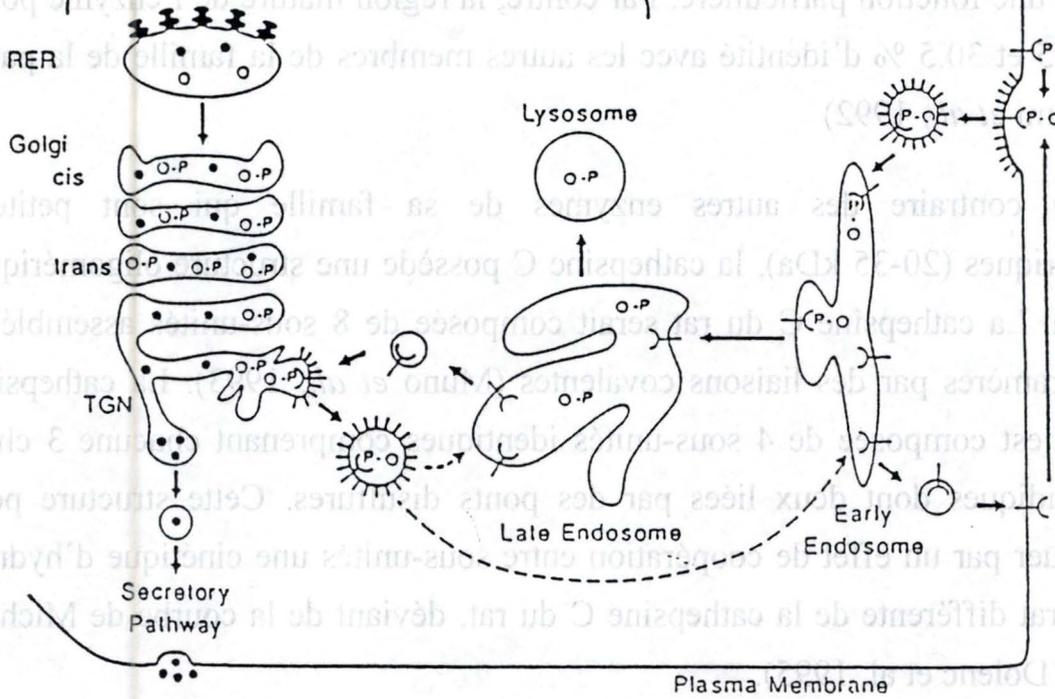


Figure 2. Voie dépendante du mannose-6-phosphate. Les enzymes lysosomales (o) et les protéines sécrétées (●) sont synthétisées dans le RER et transportées dans l'appareil de Golgi où les enzymes acquièrent des résidus Man-6-P (o-P). Les enzymes lysosomales se lient au récepteur Man-6-P (Y) dans le trans Golgi network (TGN) et sont dirigées vers les endosomes précoces et/ou tardifs où elles s'en détachent à cause de l'acidification de ces organites. Les endosomes tardifs fusionnent alors avec les lysosomes pendant que les récepteurs retournent vers l'appareil de Golgi ou la membrane plasmique. (Dahms et al., 1989, p 12116).

tissus mais son taux d'expression est plus élevé dans les lymphocytes cytotoxiques et les cellules myéloïdes (MacGuire *et al.*, 1993). Dans ces cellules, elle est localisée dans les granules de sécrétion et semble être la principale enzyme responsable de l'activation des protéases à sérine, son inhibition empêchant leur activation. Ceci a été confirmé pour différentes enzymes des granules de sécrétion : la cathepsine C active de manière spécifique la prochymase grâce à l'association de celle-ci avec l'héparine (Murakami *et al.*, 1995) ; le propeptide des granzymes A et B dans les lymphocytes cytotoxiques et les cellules "natural killer" est directement clivé par la cathepsine C (Kummer *et al.*, 1996).

II. Biosynthèse et adressage des hydrolases lysosomales :

II.1. Voie dépendante du mannose-6-phosphate :

Les protéines lysosomales, les protéines sécrétées et les protéines de la membrane plasmique partagent la même voie de synthèse jusqu'au dernier compartiment de l'appareil de Golgi où s'effectue leur tri vers les différents organites. Le pilotage spécifique des enzymes lysosomales comporte trois parties essentielles dont nous allons discuter plus en détail : d'abord des modifications sélectives (phosphomannosylation) par des enzymes, ensuite la reconnaissance de ces modifications par des récepteurs de mannose-6-phosphate et enfin la reconnaissance des récepteurs de mannose-6-phosphate par les composants cellulaires qui permettent le transport vers les lysosomes. (Voir figure 2).

La synthèse des enzymes lysosomales, des protéines sécrétées et de celles de la membrane plasmique s'effectue sur des polysomes associés au réticulum endoplasmique rugueux et débute par la formation du peptide signal composé de 15 à 20 acides aminés hydrophobes. Dès l'émergence de celui-ci du ribosome, il est

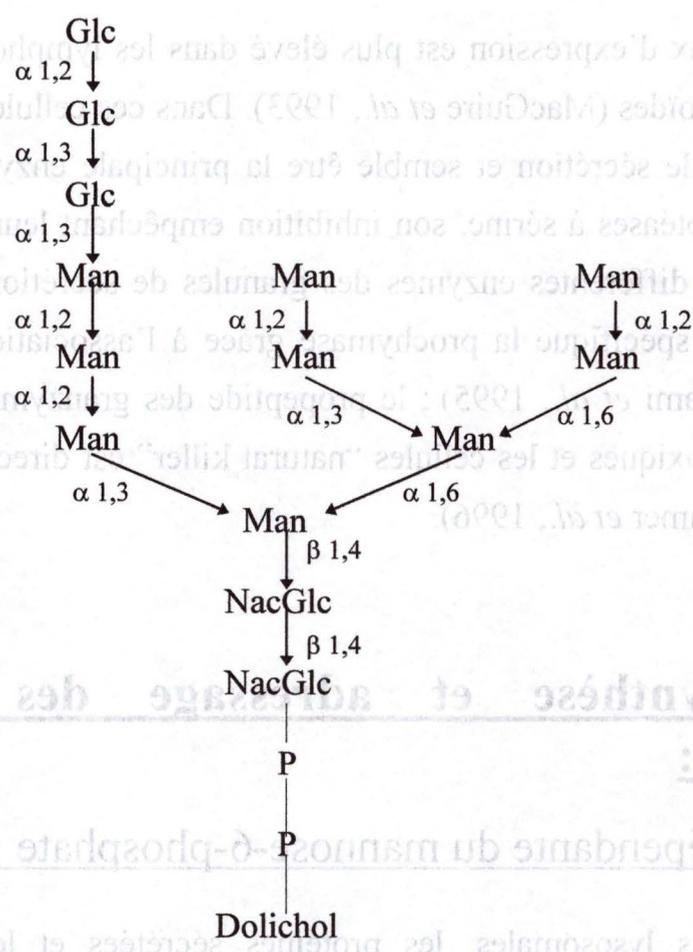


Figure 3. Oligosaccharide N-lié.
 Structure du précurseur lié à un lipide (Glc : glucose ; Man : mannose ; NAcGlc : N-acétylglucosamine ; P : phosphate). (D'après Kornfeld, 1989)

Les protéines lysosomiales, les protéines sécrétées et les protéines de la membrane plasmique partagent la même voie de synthèse jusqu'au dernier compartiment de l'appareil de Golgi où s'effectue leur tri vers les différents organites.

La synthèse des enzymes lysosomiales, des protéines sécrétées et de celles de la membrane plasmique s'effectue sur des polysomes associés au réticulum endoplasmique rugueux et débute par la formation du peptide signal composé de 15 à 20 acides aminés hydrophobes. Dès l'émergence de celui-ci du ribosome, il est reconnu par des enzymes sécrétées (phosphotransférase) qui permettent le transport vers les lysosomes. (Voir figure 2.)

La reconnaissance des récepteurs de mannose-6-phosphate par les composants des membranes plasmiques et des lysosomes est effectuée par des enzymes sécrétées (phosphatidylmannosylase) par des enzymes, ensuite la reconnaissance de ces molécules par des récepteurs de mannose-6-phosphate et enfin la reconnaissance des récepteurs de mannose-6-phosphate par les composants des membranes plasmiques et des lysosomes.

reconnu par une ribonucléoprotéine cytoplasmique, la SRP ("signal recognition particle"). Ce complexe interagit avec un récepteur situé sur la membrane du réticulum endoplasmique, la "protéine d'arrimage", ce qui permet la translocation du polypeptide dans la lumière du réticulum endoplasmique. Après le clivage de la séquence signal, les enzymes lysosomales subissent une glycosylation cotraductionnelle via l'ajout d'un oligosaccharide préformé à mannose prédominant (2 résidus N-acétylglucosamine, 9 résidus mannose et 3 résidus glucose portés par le dolichol phosphate, intermédiaire lipidique inséré dans la membrane du RER, voir figure 3) sur des résidus asparagines (oligosaccharide N-lié). Cette étape est la dernière qui soit commune avec les enzymes sécrétées et celle de la membrane plasmique.

Peu après leur exportation du réticulum endoplasmique rugueux, les enzymes lysosomales acquièrent leur marqueur de reconnaissance mannose-6-phosphate (Man-6-P). La phosphorylation de leurs chaînes oligosaccharidiques haut-mannose se déroule en 2 étapes dans un site pré-Golgi. Tout d'abord, un N-acétylglucosamine-1-phosphate est transféré sur des résidus mannoses grâce à l'UDP-GlcNAc (enzyme lysosomale N-acétylglucosaminylphosphotransférase ou phosphotransférase). Ensuite, l'enzyme de démasquage, la N-acétylglucosamine-1-phosphodiester-N-acétylglucosaminidase, élague le N-acétylglucosamine, dévoilant ainsi les résidus Man-6-P (pour un article de revue, voir Kornfeld et Mellman, 1989).

Dans l'appareil de Golgi, deux types de récepteurs vont reconnaître spécifiquement les résidus Man-6-P (Dahms *et al.*, 1989). Le premier, de 46 kDa possède une affinité de liaison plus élevée en présence de cations bivalents. Le second, de 215 kDa est indépendant des cations et correspond en fait au récepteur à l'IGF-II (insulin-like growth factor II). Les deux récepteurs sont des glycoprotéines intégrales qui possèdent deux sites de liaison avec deux résidus phosphomannoses.

A partir de l'appareil de Golgi "trans" (trans Golgi network), les enzymes lysosomales liées aux récepteurs de Man-6-P sont ségréguées dans des vésicules recouvertes de clathrine. Celles-ci fusionnent avec un compartiment de dissociation du ligand (CURL) dont le pH acide est favorable à la dissociation des hydrolases et des récepteurs. Ceux-ci sont alors recyclés et retournent soit vers l'appareil de Golgi soit vers la membrane plasmique où ils peuvent aussi intervenir dans l'adressage des enzymes endocytées. L'étude de la localisation des récepteurs de Man-6-P a permis de déterminer que leur taux le plus élevé se situe dans une structure prélysosomale correspondant aux endosomes tardifs (Griffiths *et al.*, 1988). Après la fusion des endosomes tardifs avec les lysosomes, les hydrolases y sont libérées. Elles subissent alors les clivages protéolytiques qui mènent à leur activation.

Phosphotransférase :

La reconnaissance de la protéine lysosomale par la phosphotransférase est l'étape fondamentale du processus d'adressage spécifique vers les lysosomes. Cette enzyme est capable de phosphoryler sélectivement les oligosaccharides haut-mannose des protéines lysosomales plutôt que ceux des autres protéines même s'ils sont similaires. La phosphotransférase effectue des interactions de type protéine-protéine plutôt que carbohydrates-protéine. En vue de déterminer le site de reconnaissance protéique pour la phosphotransférase, une chimère entre deux protéines de séquences similaires mais de localisations différentes : la cathepsine D lysosomale et le pepsinogène sécrété, a été réalisée et exprimée dans les oocytes de *Xenopus Laevis* où elle est efficacement phosphorylée (Baranski *et al.*, 1990). Cette étude a abouti à la détermination d'un site de reconnaissance protéique tridimensionnel par la phosphotransférase qui pourrait être commun à toutes les enzymes lysosomales (Baranski *et al.*, 1991).

La phosphotransférase possède un site catalytique et un site de reconnaissance. La forme bovine est un complexe de 540 kDa composé d'homodimères liés par des

ponts disulfures de 166 et 51 kDa et de deux sous-unités identiques associées de manière non-covalente de 56 kDa (Bao *et al.*, 1996).

II.2. Adressage indépendant du mannose-6-phosphate :

La voie d'adressage dépendante du signal mannose-6-phosphate est la voie majeure que suivent les enzymes lysosomales : les enzymes qui ne possèdent pas ce signal sont le plus souvent sécrétées. Cependant, depuis une quinzaine d'années, il a été démontré qu'au moins certaines enzymes dans certaines cellules, pouvaient suivre une voie alternative .

Dans le cas de la mucopolysaccharidose de type II, l'absence de phosphotransférase et donc de marqueur de reconnaissance Man-6-P provoque la sécrétion des enzymes lysosomales en particulier par les fibroblastes. Par contre, certaines cellules comme les lymphocytes B, les hépatocytes et les cellules de Kupffer maintiennent un taux normal d'enzymes lysosomales. Ces observations ont permis de suggérer l'existence de mécanismes alternatifs à la voie dépendante du Man-6-P (Kornfeld, 1986 ; Glickmann *et al.*, 1993).

Dans le cas des enzymes lysosomales solubles, une association membranaire via un récepteur dans l'appareil de Golgi pourrait être un mécanisme possible pour la voie indépendante du Man-6-P. Dans les macrophages alvéolaires de lapin, le précurseur inactif de la cathepsine D est associé à la membrane des endosomes indépendamment des résidus Man-6P (Diment *et al.*, 1988). Cette association disparaît avec le clivage protéolytique qui mène à l'activation de l'enzyme. Rijnboutt *et al.* (1991) ont réalisé des observations similaires sur la même enzyme dans les cellules Hep G2. Ils ont constaté que les enzymes ne possédant pas le signal Man-6-P (mais envoyées correctement vers les lysosomes) ainsi que celles endocytées par les récepteurs de Man-6-P sont associées aux membranes. Cette association s'effectue probablement dans le même compartiment et pourrait être un

événement commun aux voies indépendante du mannose-6-phosphate et d'endocytose.

La liaison membranaire pourrait se faire via un récepteur qui reconnaîtrait un signal particulier. Dans les cellules mammaires cancéreuses, il a été démontré que la procathepsine D se lie aux membranes microsomales mais pas sa forme mature (Capony *et al.*, 1994) ce qui suggère que le signal de liaison est présent dans le propeptide. Dans le cas de la cathepsine L, MacIntyre *et al.* (1993) ont démontré que l'association aux membranes microsomales à pH 5 est réalisée via une séquence de 9 résidus dans le propeptide qui se lierait à un récepteur spécifique, une glycoprotéine intégrale de 43 kDa (LPR, lysosomal proenzyme receptor).

Outre ce signal de liaison, des déterminants protéiques requis pour le ciblage indépendant du mannose-6-phosphate ont pu être déterminés à nouveau grâce à des protéines chimériques cathepsine D/pepsinogène exprimées dans des cellules incapables d'utiliser le voie dépendante du mannose-6-phosphate. Leur séquence, située du côté carboxy-terminal, est en partie commune avec le motif de reconnaissance par la phosphotransférase (Glickmann et Kornfeld, 1993).

La liaison aux membranes pourrait également se faire de manière indirecte via l'agrégation de plusieurs protéines lysosomales entre elles. Cette agrégation a déjà été prouvée pour la cathepsine D au cours de son ciblage vers les lysosomes (Zhu *et al.*, 1993). De plus des assemblages supramoléculaires de protéines lysosomales et de lipides existent à pH 5 (Jadot *et al.*, 1997).

D'autre part, le transport des glycoprotéines lysosomales membranaires semble pouvoir s'effectuer également suivant une voie indépendante du Man-6-P. Leur queue cytoplasmique contient un signal conservé glycine-tyrosine qui est également présent chez des enzymes lysosomales dont le précurseur se trouve inséré dans la membrane comme la phosphatase acide. Ce signal est reconnu par l'adaptateur HA2 lié à la clathrine dans les puits recouverts (Kornfeld & Mellman, 1989) ce qui

permet à ces protéines d'être efficacement envoyées vers les lysosomes bien qu'elles ne possèdent pas de signal Man-6-P.

III. Etude de la biosynthèse et de l'adressage de la cathepsine C :

III.1. Biosynthèse :

La cathepsine C possède une voie de biosynthèse similaire à celle des autres enzymes lysosomales. Elle est produite dans le réticulum endoplasmique sous forme de procathepsine C. Dans les macrophages de rat (Muno *et al.*, 1993) celle-ci a un poids moléculaire de 55 kDa. et est ensuite clivée en une forme mature composée de deux chaînes de 18 et 7.8 kDa.. Dans les cellules de l'Hépatome 7777 de Morris (Mainferme *et al.*, 1985) elle est d'abord synthétisée comme un précurseur formant des bandes multiples entre 92.5 et 57 kDa ou 72 et 67 kDa. Celui-ci est ensuite clivé en une forme intermédiaire de 50 kDa puis en une forme mature de 18+6 kDa. Il existe 4 sites potentiels de N-glycosylation : 3 dans le propeptide et 1 dans la partie mature (voir figure 9a).

La cathepsine C se distingue des autres cathepsines par le fait qu'elle est oligomérique. Il a été démontré (Muno *et al.*, 1993) que cette oligomérisation se passe avant son entrée dans les lysosomes. Le précurseur dans le réticulum endoplasmique et la forme mature dans les lysosomes existent tous deux sous une forme oligomérique. Il a été prouvé (Muno *et al.*, 1993) que la cathepsine C est capable de suivre la voie dépendante du Man-6-P décrite plus haut pour son adressage vers les lysosomes.

Cathepsine C et voie indépendante du mannose-6-phosphate:

Dans certains types cellulaires, la cathepsine C serait capable de suivre une voie indépendante du signal mannose-6-phosphate. Ceci a été démontré dans les cellules de l'Hépatome 7777 de Morris (Mainferme *et al.*, 1985) où la cathepsine C possède bien le signal Man-6-P mais où le nombre de récepteurs au Man-6-P est fortement réduit (absence du récepteur de 215 kDa). Malgré cela, un ciblage correct, quoique moins efficace, de la cathepsine C vers les lysosomes est réalisé.

Un mécanisme possible pour cette voie de synthèse serait, comme pour la cathepsine D (Capony *et al.*, 1994) ou la cathepsine L (MacIntyre *et al.*, 1993), l'association transitoire du précurseur de l'enzyme avec des endomembranes (Burge *et al.*, 1991). Cette association a lieu dès la fin de la synthèse dans le réticulum endoplasmique. La procathepsine C voyage ensuite ainsi à travers le complexe de Golgi et les compartiments prélysosomiaux. A son arrivée dans les lysosomes, elle est libérée sous une forme soluble et mature, ce qui pourrait s'effectuer via un processus protéolytique.

But du travail

L'objectif de ce mémoire est de contribuer à l'étude de la maturation et du ciblage de la cathepsine C. Cette enzyme a été choisie pour différentes raisons. Il s'agit d'une enzyme lysosomale qui est capable d'utiliser la "voie du Man-6-P" pour son ciblage intracellulaire (Muno *et al.*, 1993). Cependant, celui-ci peut, au moins dans certaines cellules, se faire d'une façon indépendante du récepteur de Man-6-P (Mainferme *et al.*, 1985). Enfin, la cathepsine C est une des rares enzymes lysosomales existant sous une forme oligomérique. Cette oligomérisation semble se produire avant l'arrivée du précurseur dans le compartiment lysosomal (Muno *et al.*, 1993), mais son interférence éventuelle avec l'élaboration du signal Man-6-P n'a jamais été étudiée.

Dans le cadre de l'étude du ciblage et de la maturation de la cathepsine C, un des buts serait d'identifier le ou les site(s) utilisé(s) comme substrat par la phosphotransférase dans la cathepsine C sauvage de rat. Celle-ci possède quatre sites potentiels de glycosylation (3 dans le propeptide et 1 dans la partie mature). Les 4 résidus asparagine représentant ces sites ont été mutés au laboratoire en différentes combinaisons en résidus glutamine. En testant un à un les 16 mutants dans un système d'expression particulier, il doit être possible de déterminer le ou les site(s) effectivement glycosylé(s) ainsi que la ou les chaîne(s) saccharidique(s) que la phosphotransférase phosphoryle pour construire le signal Man-6-P. Des mutants par délétion ont également été produits. Leur expression pourrait permettre entre autres, d'étudier le rôle du propeptide de la cathepsine C. Par ailleurs, la relation éventuelle entre l'oligomérisation du précurseur et la construction du signal mannose-6-phosphate pourrait être étudiée.

Ce mémoire a d'abord pour objectif d'étudier l'expression de la cathepsine C sauvage de rat dans les oocytes de *Xenopus Laevis*. Ceux-ci peuvent permettre en effet, via l'injection d'ARN messenger eukaryotique, de traduire de nombreuses protéines exogènes de manière très efficace. Au contraire des systèmes in vitro, ils sont capables de mener à bien un certain nombre de modifications post-traductionnelles et de diriger les protéines produites vers leur lieu de résidence intracellulaire correct (Colman, 1984). Ils ont été utilisés par Faust *et al.* (1987) dans une étude similaire sur une autre enzyme lysosomale, la cathepsine D humaine. Ces auteurs ont démontré que les oocytes de Xénope possédaient l'entièreté de la voie dépendante du mannose-6-phosphate. Si la cathepsine C sauvage de rat peut être exprimée dans les oocytes de Xénope, nous tenterons de déterminer si cette enzyme peut servir de substrat à la phosphotransférase et suit la voie du Man-6-P pour aboutir dans les lysosomes ou leur équivalent oocytaire. Une fois terminée la mise au point du système pour la cathepsine C sauvage, la microinjection des différents mutants pourra être envisagée afin de mener à bien les études dont il a été question plus haut.

Matériel et méthodes :

I. Préparation et contrôle de l'ARN messenger :

I.1. Préparation du plasmide :

Le plasmide est extrait d'une culture bactérienne (X11-blue) transformée par électroporation en présence du pGEM-DAP I contenant le gène de la cathepsine C (voir figure 9a). Les bactéries transformées sont mises en culture dans du milieu 2x YT (Bactotryptone 16g/l ; Yeast Extract 10g/l ; NaCL 5g/l) auquel on a ajouté de l'ampicilline (50 µg/ml). Après avoir passé une nuit à 37°C dans un incubateur à agitation, les milieux de culture sont centrifugés à 4°C pendant 10 minutes à 4000 rpm. Le plasmide est ensuite extrait en utilisant le protocole d'extraction/purification de plasmides décrit par Maniatis *et al.* (Molecular cloning, second edition, 1989) auquel 2 modifications sont apportées. Premièrement, on resuspend les culots obtenus après traitement à l'isopropanol dans une solution de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM; pH 7,4), mais sans les sécher auparavant. Deuxièmement, la ribonucléase est ajoutée après et non avant l'étape de précipitation. Une lecture au spectrophotomètre à 260 nm permet de connaître la concentration du plasmide extrait (lecture sur 5 µl dilué 200 fois).

I.2. Linéarisation du plasmide :

25 µg d'ADN obtenu au point I.1. sont digérés avec 80 unités d'une enzyme de restriction (soit Xba I soit Pst 1) en présence d'un tampon approprié et dans un volume total de 100 µl. La réaction est incubée 2 heures à 37 °C.

L'ADN linéarisé est extrait au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol.

Le culot est resuspendu dans 30 µl d'eau bidistillée et autoclavée puis stocké à -20°C.

I.3. Transcription in vitro :

A. PRODUCTION D'ARN MESSAGER NON COIFFE :

La réaction de transcription in vitro d'ARN messenger est réalisée suivant les indications prescrites dans le kit P2075 de la firme Promega excepté quelques modifications (en gras).

- ingrédients :
- 10 µl du tampon de transcription, 5 X concentré
 - 5 µl de DTT 100 mM
 - 1 µl RNasin® inhibiteur de ribonucléase (**40 u/µl**)
 - 5 µl ATP 10 mM
 - 5 µl GTP 10 mM
 - 5 µl UTP 10 mM
 - 5 µl CTP 10 mM
 - 5 µl d'ADN linéarisé (voir point I.2.)
 - 1 µl T7 ARN polymérase (20u/µl)
 - 9 µl H₂O sans Ribonucléase

La T7 ARN polymérase utilise les ribonucléotides triphosphates pour transcrire l'ADN linéarisé cloné derrière un promoteur du phage T7 en ARN messenger. La réaction est incubée à 39 °C pendant 2 heures.

L'ARN produit est extrait au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol. Le culot est resuspendu dans 25 µl d'eau bidistillée et autoclavée puis stocké à -70°C.

B. PRODUCTION D'ARN MESSAGER COIFFE :

La réaction de transcription in vitro d'ARN messenger coiffé est réalisée suivant les indications prescrites dans le kit T7 Cap Scribe de la firme Boehringer

Mannheim excepté que l'eau n'est pas traitée au DEPC, mais seulement autoclavée.

ingrédients: - 4 µl de tampon "Cap Scribe"

- 0,5 µg d'ADN linéarisé

- 13 µl d'H₂O

- 3 µl de T7 ARN polymérase (20 unités/µl)

Le tampon "Cap Scribe" contient les ribonucléotides triphosphates et les précurseurs nécessaires à la fixation de la coiffe (m⁷G(5')ppp(5')G et P¹-5'-(7méthyl)-guanosine-P³-5'-guanosine triphosphate). La T7 ARN polymérase utilise ceux-ci pour transcrire l'ADN linéarisé cloné derrière un promoteur du phage T7 en ARN messenger portant une coiffe à son extrémité 5'.

La réaction est incubée à 37 °C pendant 2 heures, 1 µl supplémentaire de T7 polymérase est alors ajouté avant une nouvelle incubation de 2 heures destinée à augmenter la production d'ARN. La réaction est alors arrêtée en ajoutant 2 µl d'EDTA 0,2 M pH 8,0 glacé.

L'ARN est ensuite, soit simplement précipité à l'éthanol comme décrit dans le kit T7 Cap Scribe, soit extrait au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol. Le culot est resuspendu dans 25 µl d'eau autoclavée puis stocké à -70°C.

I.4. Traduction in vitro :

A. TRADUCTION DANS DU LYSAT DE RETICULOCYTES DE LAPIN :

La réaction de traduction in vitro est réalisée suivant les indications prescrites dans le kit L4960 de la firme Promega excepté quelques modifications (en gras).

ingrédients : - 35 µl de lysat de réticulocytes

- 9 **ou 10,5** µl H₂O

- 1 µl RNasin® (inhibiteur de ribonucléase (40u/µl))

- 1 µl 1mM mixture d'acides aminés sans méthionine

- 2 μ l méthionine **tran³⁵S-label (70% de L-méthionine [³⁵S] et 15 % de L-cystéine [³⁵S])**.(1180 Ci/mmol)
à 10 mCi/ml
- 2 **ou 0,5** μ l d'ARN obtenu en I.3. ou 2 μ l d'ARN
contrôle (luciférase)

Le lysat de réticulocytes contient les composants nécessaires pour la synthèse des protéines (ARNt, ribosomes, acides aminés, facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison). Les ARNm endogènes sont détruits par un traitement à la nucléase.

Pour détruire les régions de structure secondaire locales, l'ARN messenger est d'abord chauffé 10 minutes à 67 °C puis immédiatement placé sur glace.

La réaction est incubée 1 heure à 30 °C.

5 μ l de la réaction est analysée par électrophorèse sur gel de SDS-PAGE (Voir IV.2.).

B. TRADUCTION DANS DE L'EXTRAIT DE GERME DE BLE:

La réaction de traduction in vitro est réalisée suivant les indications prescrites dans le kit L 4380 de la firme Promega excepté quelques modifications (en gras).

- ingrédients :
- 12,5 μ l d'extrait de germe de blé
 - 0,5 μ l RNasin® (inhibiteur de nucléase (40u/ μ l))
 - 2 μ l 1mM mixture d'acides aminés sans méthionine
 - 1 **ou 0,5** μ l d'ARNm (obtenu au point I.3.) ou 1 μ l
d'ARN contrôle (BMV)
 - 1 μ l de méthionine **tran³⁵S-label** (1180 mCi/mmol)
à 10mCi/ml
 - 7 **ou 7,5** μ l H₂O

La synthèse des protéines s'effectue grâce aux composants présents dans l'extrait de germe de blé (ARNt, ribosomes, acides aminés, facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison). Les ARNm endogènes sont détruits par un traitement préalable à la ribonucléase.

Avant de démarrer la réaction de traduction, l'ARN messenger est d'abord chauffé 10 minutes à 67 °C puis immédiatement placé sur glace ce qui permet de détruire les structures secondaires locales. La réaction est incubée à 25 °C pendant 1 heure.

5 µl de la réaction est analysée par électrophorèse sur gel de SDS-PAGE (Voir IV.2.).

C. TRADUCTION DANS DU LYSAT D'OOCYTES :

Obtention des oeufs :

Le lysat est réalisé à partir d'oocytes matures (pondus). Une femelle adulte de Xénope reçoit dans son sac lymphatique dorsal, deux injections de hCG (human chorionic gonadotropin) qui induisent la ponte : la première de 500 UI 24 heures avant la ponte, la seconde de 250 UI 16 heures avant la ponte. L'animal est placé dans un aquarium individuel muni d'une grille de fond jusqu'à la récolte des œufs.

Réalisation du lysat :

Immédiatement après la récolte, les œufs sont placés dans une solution de cystéine 2% et NaCl 110 mM pH 7.7 qui permet d'enlever l'enveloppe gélatineuse. Ils sont ensuite lavés quatre fois avec le tampon d'extraction glacé (KCl 100 mM, CaCl₂ 0.1 mM, MgCl₂ 1 mM, saccharose 50 mM et HEPES 10 mM, pH 7.7).

Les œufs sont ensuite transférés dans un tube Beckman de type "polyallomer" (13x51 mm) et centrifugés à 1700 tours par minute pendant 1 minute à 4°C dans une centrifugeuse de type "International".

Après l'enlèvement d'un maximum de tampon, les œufs sont centrifugés dans un rotor SW65 à 14000 tours par minute pendant 15 minutes à 4°C ce qui

provoque leur lyse. Le "cytoplasme" est alors retiré et placé dans un tube en polycarbonate. 5 µl/ml de cytochalasine B à 10 mg/ml lui est ajoutée puis celui-ci est à nouveau centrifugé dans les mêmes conditions. Le culot est éliminé et 1 µl d'aprotinine à 10 mg/ml est ajoutée par millilitre de "cytoplasme".

Traitement à la ribonucléase :

Pour détruire les ARNs messagers endogènes, l'extrait est divisé en 5 portions traitées chacune avec différentes concentrations de ribonucléase : 0, 0.12, 0.25, 0.5 et 2 µg/ml.

Sur glace, 1 µl de ribonucléase est ajoutée à 200 µl d'extrait. Le mélange est ensuite incubé 15 minutes à 10°C. 2 µl de DTT 100 mM puis 100 unités de RNasin® inhibiteur de nucléase sont ajoutés avant une nouvelle incubation de 10 minutes à 10 °C. Chaque extrait reçoit alors 2 µl d'ARNt de foie de veau à 10 mg/ml puis est utilisé directement ou congelé à -70 °C en lui ajoutant 0.15 volume de saccharose 1.5 M.

Traduction :

Au moment de la traduction, différents éléments sont encore ajoutés à l'extrait : du lysat de réticulocytes, de la créatine phosphate comme source d'énergie et de la spermidine pour augmenter l'efficacité de l'élongation.

- ingrédients :
- 1 µl de lysat de réticulocytes de lapin
 - 0.2 µl de créatine phosphate 500 mM
 - 0.6 µl de spermidine 33 mM
 - 1 µl de méthionine **trans**³⁵**S-label** (1180 mCi/mmol)
 - 10 µl d'extrait d'oocytes
 - 1 µl d'ARN (0.5µg/µl)

Le mélange réactionnel est ensuite incubé 1 heure à 21 °C. Pour l'analyse du produit de la traduction sur un gel SDS-PAGE (voir IV.2), 40 µl de triton X-100 1 % et PMSF 1 mM lui sont ajoutés ainsi que 50 µl de solubilisateur (voir IV.2).

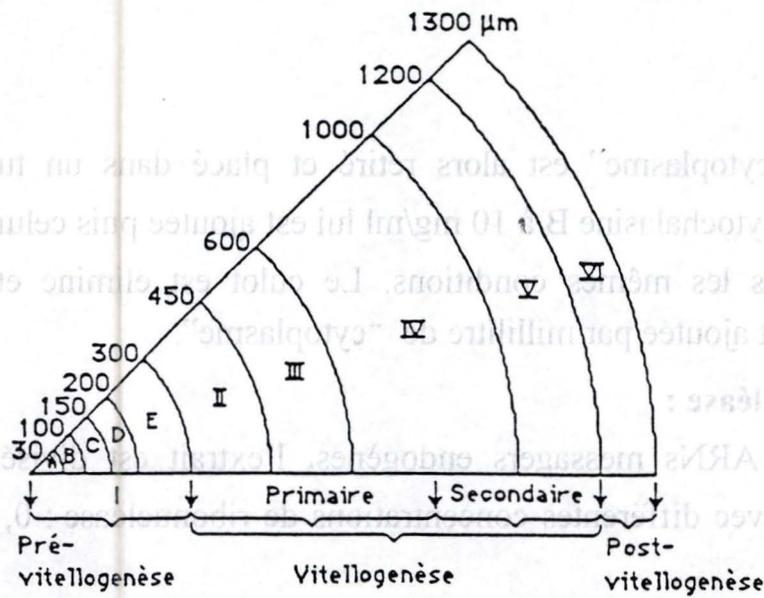


Figure 4. Croissance d'un oocyte de *Xenopus Laevis* en fonction de la vitellogenèse. Stades I à VI définis selon J. Dumont (1972).

II. Expression oocytaire :

L'ARN messager produit est microinjecté dans des oocytes de *Xenopus Laevis*. Ceux-ci sont capables d'exprimer des protéines exogènes et dans certains cas, d'effectuer leur maturation. Les microinjections pourraient permettre l'expression de la cathepsine C de rat.

II.1 Microinjections :

A. DESCRIPTION DU MATERIEL UTILISE :

Oocytes de *Xenopus Laevis* :

Le Xénope est un amphibien anoure aglosse originaire d'Afrique du sud. Son oogenèse est divisée en six étapes basées sur l'anatomie du développement des oocytes. (voir figure 4). Pour les microinjections, on utilise les stades V-VI. Ils ont un diamètre compris entre 1000 et 1300 μm et on distingue clairement le pôle animal (foncé) du pôle végétal (clair). Ils sont en fin de vitellogenèse. Ces stades sont caractérisés par une grande activité de synthèse protéique liée à l'importance de la machinerie ribosomique.

Appareil de microinjection :

Celui-ci se compose de 4 éléments:

- Un microscope (Zeiss)
- Un micromanipulateur (Leitz Germany cat.n° 520137) dans lequel sont introduites les micropipettes. Celles-ci sont confectionnées à partir de capillaires de verre étirés à chaud.
- Une bouteille d'azote fournissant les différentes pressions.
- Un dispositif permettant de sélectionner à l'aide d'interrupteurs deux pressions différentes:
 - la pression de maintien qui empêche un reflux du milieu dans la micropipette
 - la pression d'injection, réglée directement au

niveau du détendeur. Elle équivaut environ à 1/40 atm mais doit être réglée pour chaque micropipette.

Milieu de Barth modifié :

Tampon Hepes 15 mM pH 7,6; NaCl 88 mM; KCl 1 mM; NaHCO₃ 2,4 mM; CaNO₃ 0,3 mM; MgSO₄ 0,41 mM.

B. MICROINJECTIONS :

Une femelle adulte de Xénope est anesthésiée par immersion dans de la glace durant 1/2 heure. Après avoir été décapitée, ses ovaires sont prélevés et immédiatement plongés dans du milieu de Barth modifié glacé.

Les oocytes sont libérés des lobes ovariens par dissection manuelle. Les stades V-VI sont isolés sur un verre de montre et stockés dans le milieu de Barth modifié glacé.

Les oocytes sont placés par groupes de 5-10 sur une lame porte-objet dans une goutte de milieu et injectés avec 20-50 nl d'ARNm (la quantité d'ARNm injecté est précisée pour chaque type d'expérience).

Dès qu'ils ont été injectés, les oocytes sont placés dans une boîte de pétri contenant du milieu de Barth modifié additionné de sulfate de gentamycine (0,05mg/ml). Cette boîte est placée une nuit dans un incubateur à 19°C pour permettre d'éliminer les oocytes endommagés avant l'analyse de l'expression éventuelle du transcrit injecté.

C. MARQUAGE METABOLIQUE :

Les oocytes sont ensuite incubés à 19 °C par groupes de 5-10 dans 200 µl du milieu de Barth modifié additionné de sulfate de gentamycine contenant 5 % de sérum bovin foetal et 1 mCi/ml de L-méthionine[³⁵S] ou de tran³⁵S-label. Les

oocytes et les milieux sont collectés séparément et congelés à -70°C .

II.2 Immunoprécipitations :

Cette technique a pour but, en utilisant un anticorps spécifique de détecter la présence de la cathepsine C de rat éventuellement exprimée par les oocytes de Xénope.

Les oocytes congelés et radiomarqués sont homogénéisés dans 400 μl de tampon d'homogénéisation (Tris-HCl 0.1 M pH 8, 1 % Triton X-100 et 1% d'une mixture d'antiprotéases (chymostatine, antipaïne, leupeptine, pepstatine (chacune à 2 mg/ml) et aprotinine (10 TIU/ml) dans le DMSO 50%)) par 10 passages du piston d'un petit potter (1ml). Les homogénats sont ensuite centrifugés 5 minutes à 4°C dans une microfuge pour enlever les agrégats. Les milieux sont portés à 400 μl à l'aide du même tampon d'homogénéisation.

Après cette étape, 40 μl de chaque échantillon sont prélevés et stockés à 4°C additionnés de 5 μl de solubilisateur 5 X concentré (voir IV.2). Ils seront chargés sur un gel SDS polyacrylamide avec les échantillons immunoprécipités pour servir de témoins.

Les surnageants des homogénats et les milieux sont additionnés de 400 μl de tampon d'immunoprécipitation (KCl 0.1 M, MgCl_2 5 mM, Triton X-100 1 %, SDS 0.5 %, déoxycholate de sodium 1%, PMSF 1 mM, Tris-HCl 0.1 M, pH 8) et agités une nuit à 4°C avec 2 μl d'anticorps anti-cathepsine C.

50 μl de suspension de protéine A-Sépharose sont ajoutés à chaque échantillon et ceux-ci sont agités 2 heures à 4°C , pour permettre de récupérer les complexes immuns par centrifugation.

On procède alors à 4 lavages avec 1 ml de Triton X-100 1%, Tris-HCl 0.1 M, pH 8, NaCl 100 mM, aprotinine 0.2 TIU/ml, PMSF 1 mM suivis par deux lavages supplémentaires (Tris HCl 0.1 M pH 8).

Après l'ajout de solubilisateur (voir IV.2), les protéines immunoprécipitées

sont dissociées de la résine par chauffage 5 minutes à 100°C puis 5 minutes de centrifugation dans une microfuge à 4°C. Le surnageant est immédiatement analysé par électrophorèse sur gel de SDS-PAGE (Voir IV.2.).

III. Chromatographie d'affinité sur une colonne porteuse du récepteur de Man-6-P :

Cette technique permet d'isoler parmi d'autres protéines celles qui possèdent le signal mannose-6-phosphate. Une colonne contenant 1 cm³ d'Affigel-10 couplé à la partie luminale (soluble) du récepteur au Man-6-P bovin de 215 kDa (CI-MPR) est d'abord équilibrée avec du PBS (Phosphate-Buffered Saline (NaCl 8g/l ; NaH₂PO₄ 1,044 g/l ; K₂HPO₄ 0,2 g/l ; KCl 0,2 g/l) et du Triton X-100 0,1 %. Le produit de la traduction dans le lysat d'oocytes (40 µl) est chargé sur la colonne. Celle-ci est d'abord lavée avec 6 ml de PBS, Triton X-100 0,1 % pour permettre l'élution du matériel non fixé. Lorsqu'on ne détecte plus de radioactivité, la colonne est lavée avec 3 ml de PBS, Triton X-100 0,1 %, glucose-6-phosphate 10 mM ce qui permet d'éluer ce qui serait fixé de manière non-spécifique par le phosphate. Un dernier lavage est ensuite effectué avec 3 ml de PBS, Triton X-100 0,1 %, mannose-6-Phosphate 10 mM. Ce dernier entre en compétition avec le matériel qui possède le signal Man-6-P fixé de manière spécifique et permet de le détacher de la colonne.

La radioactivité est mesurée sur 10 µl de chaque fraction recueillie, dans un compteur Beckman LS.6500.

IV. Gels électrophorétiques :

IV.1 Gel d'agarose :

Ce type d'électrophorèse est utilisé au cours de ce travail pour la vérification de certaines manipulations, la détermination de la quantité ou de la taille de l'ADN ou de l'ARN.

On utilise des gels à une concentration de 1 % en agarose dans du tampon TAE (TAE 50 X : Tris base 242 mg/l ; acide acétique glacial 57,1 ml/l ; EDTA 0.5 M pH 8 100ml/l). Du bromure d'éthidium à 0,2 mg/ml est ajouté. Celui-ci s'insère entre les bases d'ADN ou d'ARN et émet sous UV une lumière fluorescente orange.

Les échantillons d'ADN sont additionnés de solution tampon pour gel (bleu de bromophénol 0.025%, cyanol de xylène 0.025%, glycérol 30 % et EDTA 50mM), ceux d'ARN d'une solution de même composition contenant en plus de la formamide.

Dans le cas d'un gel pour l'ARN, l'appareil destiné à mouler le gel ainsi que la cuve de migration sont plongés 1/2 heure dans H₂O₂ 10 % ce qui permet d'éviter les risques liés à la présence éventuelle d'activité ribonucléase.

La taille et la concentration sont estimées par comparaison avec un étalon. Pour l'ADN, il s'agit du génome du phage lambda digéré par Hind III et Eco R I. Pour l'ARN, il s'agit d'une mixture de 6 ARNs synthétiques portant une queue de poly-A de la firme GibcoBRL.

IV.2 Gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) :

Ce type d'électrophorèse est utilisé au cours de ce travail pour l'analyse des produits des traductions in vitro et des immunoprécipitations. Il permet la séparation des polypeptides présents dans chaque échantillon en fonction de leur poids

moléculaire. L'estimation de ce poids moléculaire se fait par comparaison avec un étalon composé de différentes protéines marquées au carbone 14 (lysozyme 14,3 kDa, anhydrase carbonique 30 kDa, ovalbumine 46 kDa, BSA 66 kDa, phosphorylase b 97,4 kDa, myosine 220 kDa). L'étalon et les échantillons à analyser sont additionnés de solubilisateur (SDS 10%, bleu de bromophénol 0,03% ; glycérol 10%; Tris-HCl 125 mM pH 6,8; DTT 10 mM) le DTT qu'elle contient dissocie les ponts disulfures.

Les gels sont composés de deux solutions polymérisées : le gel d'empilement (acrylamide-bisacrylamide 25 ml ; Tris-HCl 2 M pH 8,8 10ml ; Temed 50 µl ; SDS 20% 250 µl ; H₂O 14,5 ml ; APS 10% 300 µl) et le gel de séparation (acrylamide-bisacrylamide 4 ml ; Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 3,5 ml ; Temed 25 µl ; SDS 20% 125 µl ; saccharose 60% 3,1 ml ; H₂O 13,9 ml ; APS 10% 150 µl).

Après la migration, le gel est fixé 1/2 heure dans un bain (acide acétique 45%, méthanol 10 %) puis traité pour permettre une analyse par fluorographie. Le gel est incubé 1/2 heure en présence d' "Entensify A" (Dupont de Nemours) + 20 % méthanol et ensuite 1/2 heure d' "Entensify B" + 20 % méthanol qui précipite dans le gel le réactif de scintillation. Le gel est finalement séché puis placé dans une cassette à l'abri de la lumière sous un film photo. Cette cassette est placée à -70°C durant un temps suffisant pour impressionner le film.

V. Centrifugations et dosages enzymatiques :

V.1 Centrifugation différentielle :

Cette technique permet de séparer les différents types d'organites subcellulaires selon leur coefficient de sédimentation qui dépend principalement de leur taille. Les fractionnements sont réalisés selon une méthode inspirée de celle décrite pour le foie de rat décrite par de Duve et al. (1955).

Les oocytes sont d'abord homogénéisés dans une solution de saccharose

0,25 M par 10 passages du piston serrant d'un homogénéiseur Dounce (petit modèle). L'homogénat est centrifugé 10 minutes à 1500 tours par minute à 4°C. On obtient un surnageant appelé **E1** et un culot qui est à nouveau homogénéisé par 5 passages du piston serrant du même Dounce. Ce culot est centrifugé 10 minutes à 1500 tours par minute à 4 °C. Un surnageant **E2** et un culot appelé fraction **N** (contenant essentiellement les noyaux) sont obtenus. Les fractions E1 et E2 sont réunies en une fraction E. Une partie de celle-ci est centrifugée pendant 10 minutes à 55000 tours par minute à 4°C. On obtient un culot appelé fraction **MLP** et un surnageant dénommé fraction **S**.

V.2 Centrifugation isopycnique :

Cette technique permet de séparer les différents types d'organites subcellulaires selon leur densité. Les particules migrent dans un champ centrifuge où elles traversent des zones de densité croissante. Elles s'arrêtent lorsqu'elles atteignent la zone correspondant à leur propre densité.

Une partie de la fraction MLP d'oocytes obtenue par centrifugation différentielle est placée au sommet d'un gradient de densité de saccharose s'étendant depuis 1,05 g/ml jusqu'à 1,30 g/ml. A sa sortie du mélangeur, le gradient de saccharose est recueilli dans des tubes Beckman de type "Polyallomer" dans lesquels on a préalablement déposé 0,5 ml de "Maxidens". Après avoir déposé 0,6 ml de la fraction MLP au sommet du gradient, celui-ci est scellé et centrifugé dans un rotor Beckman SW65 à 39000 rpm durant 2 heures 30 min. à 4°C. Les fractions sont obtenues en sectionnant le tube contenant le gradient environ tous les 3 mm au moyen d'une lame horizontale. La densité de chaque fraction est estimée en mesurant leur indice de réfraction. La concentration de saccharose est fournie par conversion de cette mesure en g/ml.

V.3 Dosages enzymatiques :

Les activités de la cathepsine C et de quelques autres enzymes de référence ont été mesurées dans les homogénats de foie et d'oocytes, dans les fractions obtenues en centrifugations différentielle et isopycniqne et dans les milieux d'incubation des oocytes.

Le tableau présenté ci-dessous résume les conditions expérimentales employées pour doser les enzymes ainsi que les références qui y sont associées.

Enzyme	Substrat	Méthode de mesure	pH	Référence
Cathepsine C	Glycyl-L-arginine- β -naphtylamide	Fluorimétrie (β -naphtylamine)	5	Jadot <i>et al.</i> (1984)
β -Galactosidase	4-méthylumbelliferyl β -D-galactopyranoside	Fluorimétrie (4-méthylumbelliférone)	4	Peters <i>et al.</i> (1972)
Phosphatase acide	4-méthylumbelliféryl-phosphate	Fluorimétrie (4-méthylumbelliférone)	5	Peters <i>et al.</i> (1972)

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Lowry *et al.* (1951)

	Activité cathepsine C (UAF)	mg de protéines	Activité spécifique
Oocytes	2050	221	9,3
Foie	586300	290	2021,7

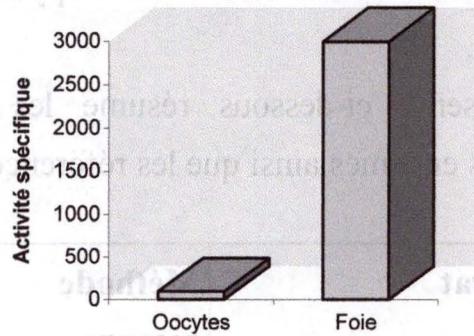


Figure 5. *Activité cathepsine C dans des homogénats de foie et d'oocytes.* L'activité de la cathepsine C est exprimée en unités arbitraires de fluorescence (UAF). L'activité spécifique est l'activité ramenée aux mg de protéines.

Résultats et discussion :

I. Mesure de l'activité endogène de la cathepsine C dans l'oocyte :

Différentes mesures de l'activité de la cathepsine C ont été réalisées sur l'oocyte et comparées avec le foie. Le but de ces mesures, aucune information n'étant fournie par la littérature, est de déterminer s'il existe une activité endogène de la cathepsine C. Il est possible que la méthode de dosage utilisée ne puisse pas mettre en évidence l'activité de la cathepsine C d'oocytes. Il se peut également que l'activité détectée soit celle d'une autre enzyme capable d'hydrolyser le substrat employé (glycyl-L-arginine- β -naphtylamide). Quoiqu'il en soit, la mesure d'une activité cathepsine C devrait permettre par la suite, dans l'hypothèse où les oocytes seraient capables de produire la cathepsine C de rat enzymatiquement active, de distinguer une éventuelle activité exogène résultant des microinjections qui se manifesterait par une augmentation de l'activité cathepsine C dans l'oocyte.

I.1 Activité dans l'homogénat :

La figure 5 montre les résultats des dosages de la cathepsine C et des protéines qui ont été effectués sur des homogénats de foie de rat et d'oocytes de Xénope. L'activité spécifique représente l'activité ramenée aux mg de protéines. Nous constatons qu'il existe bien une activité semblable à celle de la cathepsine C dans les oocytes de Xénope. L'activité spécifique de la cathepsine C dans les oocytes est faible comparée à celle présente dans le foie (218 fois moindre). Des études précédentes avaient mis en évidence, pour les protéases, une activité spécifique relativement faible (cathepsine D : Decroly *et al.*, 1979) et même non détectable (cathepsine B : Wall *et al.*, 1985). Notre observation nous permet d'espérer détecter

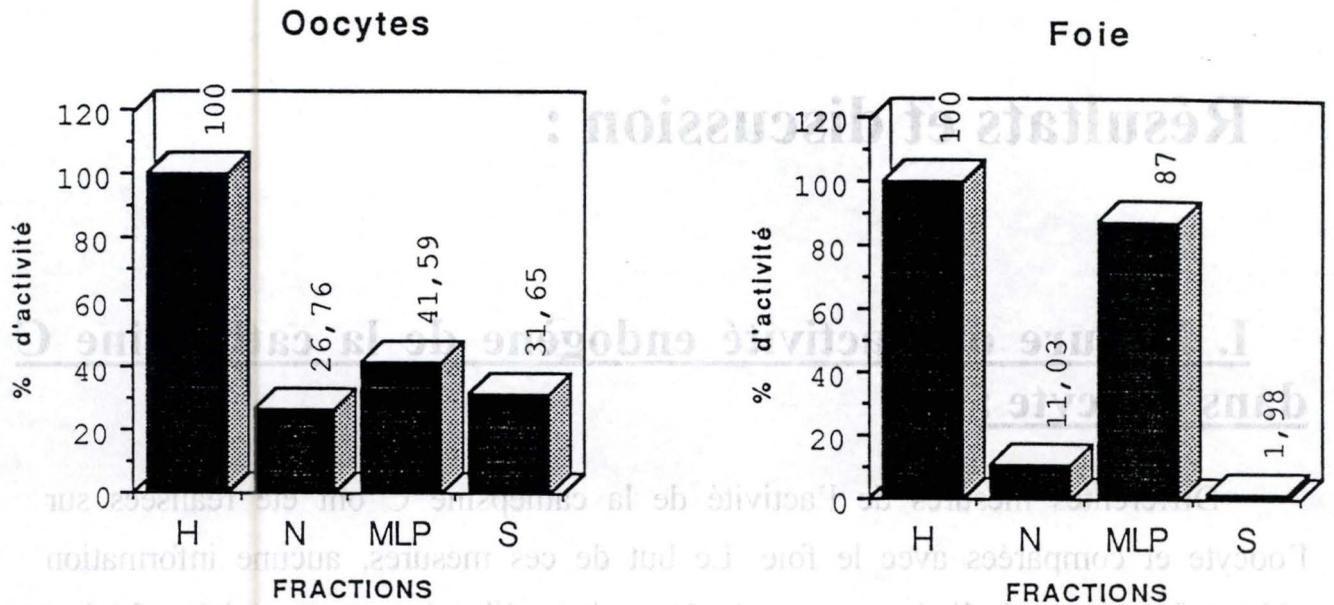


Figure 6. Répartition de l'activité de la cathepsine C dans les oocytes de Xénope et dans le foie de rat.

Un homogénat cellulaire (H) est fractionné par centrifugation différentielle en différentes fractions (N, MLP, S) sur lesquelles est effectué le dosage de l'activité de la cathepsine C. Le pourcentage d'activité de la cathepsine C de chaque fraction est donné par rapport à l'homogénat.

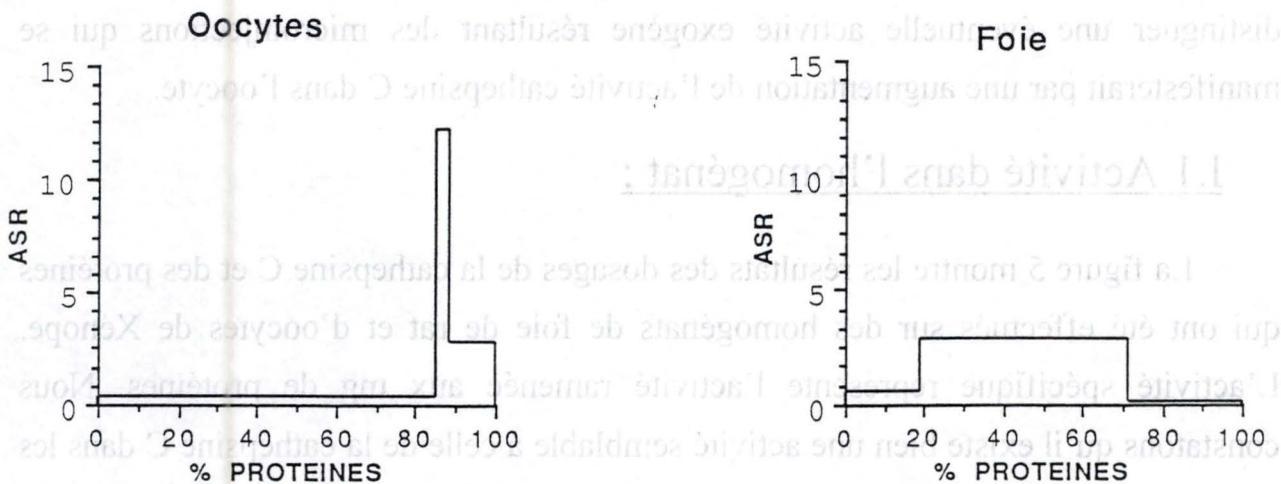


Figure 7. Distribution de la cathepsine C dans les oocytes de Xénope et dans le foie de rat.

Un homogénat cellulaire (H) est fractionné par centrifugation différentielle en différentes fractions (N, MLP, S) sur lesquelles est effectué le dosage de l'activité de la cathepsine C et celui des protéines. L'activité spécifique relative (ASR) représente le pourcentage d'activité par rapport aux pourcentage de protéines d'une fraction déterminée.

une augmentation significative de l'activité spécifique reliée à la cathepsine C après les microinjections.

I.2 Centrifugation différentielle :

Le but général de ce travail étant de contribuer à l'étude de l'adressage de la cathepsine C, il était nécessaire de pouvoir déterminer où se retrouve la majeure partie de celle-ci chez l'oocyte. Nous avons tout d'abord choisi d'utiliser une approche par centrifugation différentielle. Celle-ci nous a permis en suivant un schéma de centrifugation se référant à celui utilisé pour le foie d'obtenir 3 fractions. Pour le foie, le contenu de ces fractions a été déterminé comme étant : pour la fraction **N**, les noyaux, les débris cellulaires et quelques cellules intactes ; pour la fraction **MLP** des mitochondries, des lysosomes, des peroxysomes, des éléments du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi ; pour la fraction **S** ou fraction soluble, les éléments non sédimentables (dans les conditions utilisées pour la centrifugation de la fraction).

Les dosages effectués (voir figures 6 et 7) montrent que la fraction MLP contient le plus d'activité cathepsine C. Bien qu'étant des cellules tout à fait différentes d'un point de vue fonctionnel et morphologique, cette observation est valable tant pour le foie (87%) que pour les oocytes (41%). L'activité spécifique relative représente le pourcentage d'activité par rapport au pourcentage de protéines dans une fraction déterminée. Elle est de 0.31, 12.17 et 2.79 dans les fractions N, MLP et S dans l'oocyte. Elle est de 0.58, 2.83 et 0.07 dans les mêmes fractions dans le foie de rat. La comparaison des histogrammes obtenus en représentant l'activité spécifique relative en fonction du pourcentage de protéines montre que l'activité spécifique relative est beaucoup plus importante dans la fraction MLP de l'oocyte. Ceci s'explique par le fait que cette fraction contient une très faible proportion des protéines cellulaires par rapport à la même fraction dans le foie. L'oocyte est une cellule contenant une quantité importante de protéines de réserves destinées au

développement futur de l'embryon. La majorité des protéines (85%) se retrouve dans la fraction N. Il est logique de constater que l'activité spécifique relative de cette fraction est assez faible.

Les résultats de centrifugation différentielle montrent qu'il est possible pour l'oocyte d'obtenir une fraction MLP enrichie en lysosomes. Celle-ci peut nous fournir un matériel intéressant pour une séparation des lysosomes par un gradient de densité.

I.2. Centrifugation isopycnique :

Si nous parvenons à exprimer une cathepsine C exogène dans l'oocyte, quelle que soit sa forme moléculaire, un critère essentiel à analyser est l'aboutissement de la protéine dans ce qui devrait être son site de résidence intracellulaire, c'est à dire le lysosome. Il est donc nécessaire de "visualiser" le compartiment lysosomal des oocytes, ce que nous avons tenté de faire par centrifugation en gradient de densité de saccharose.

Comme la majeure partie de l'activité de la cathepsine C de l'oocyte, se retrouve dans la fraction MLP obtenue en centrifugation différentielle, nous avons décidé de l'utiliser pour effectuer un gradient de densité de saccharose.

La figure 8 montre la distribution de la cathepsine C, objet de cette étude, et de deux autres enzymes propres aux lysosomes : la phosphatase acide et la β -galactosidase. Sur les histogrammes, la densité en g/ml est indiquée en abscisse. En ordonnée, se trouve la fréquence qui est calculée par la formule $Q/\sum Q\Delta\rho$ où Q représente l'activité mesurée dans la fraction, $\sum Q$ l'activité totale associée à l'ensemble des fractions et $\Delta\rho$ la différence de densité entre le sommet et le bas de la fraction.

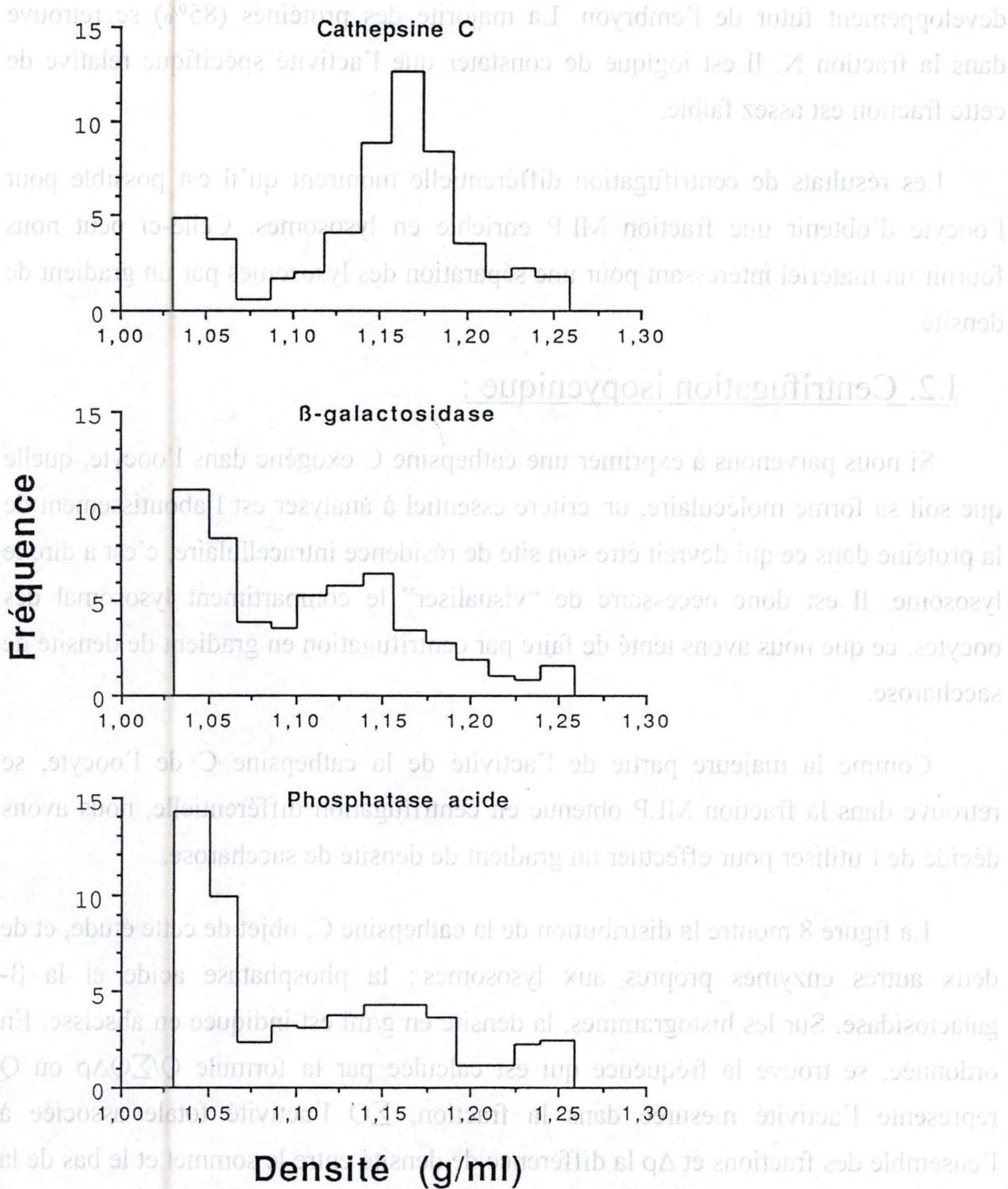


Figure 8. Profils de distribution de trois enzymes lysosomales en centrifugation isopycnique d'une fraction MLP d'oocytes dans un gradient de saccharose.

Une fraction MLP d'oocytes obtenue en centrifugation différentielle est déposée au sommet d'un gradient de densité de saccharose. Celui-ci est découpé en 13 fractions sur lesquelles sont mesurées les activités de la cathepsine C, de la β-galactosidase, de la phosphatase acide et des protéines. En abscisse, la densité de saccharose exprimée en g/ml. En ordonnée, la fréquence calculée par la formule $Q/\Sigma Q\Delta\rho$ où Q représente l'activité mesurée dans la fraction, ΣQ l'activité totale associée à l'ensemble des fractions et $\Delta\rho$ la différence de densité entre le sommet et le bas de la fraction.

Dans les trois distributions, on constate la présence de deux pics d'“équilibre” : le premier aux alentours de 1.05 g/ml, le second plus large centré sur 1.15/1.17 g/ml.

Les travaux de Wall *et al.* (1985) ont démontré la présence dans l'oocyte de Xénope de stade V-VI d'au moins deux populations de lysosomes : les lysosomes légers et les plaquettes vitellines légères. Dans leur étude comme dans celle de Faust *et al.* (1987) sur la cathepsine D, les lysosomes légers s'équilibrent comme une large bande s'étendant de 1.12 à 1.18 g/ml. Nous pouvons également constater ici la présence de cette population qui contient la majeure partie de la cathepsine C. Par contre, les plaquettes vitellines légères sont signalées comme s'équilibrant à 1.21 g/ml. Dans notre gradient, une faible activité est présente à cette densité. Wall *et al.*, 1985 ont également démontré que cette population est très fragile : suivant les conditions d'homogénéisation et de centrifugation, son activité peut se retrouver au sommet du gradient. Decroly *et al.* (1979) obtenaient pour la phosphatase acide un pic semblable au notre aux alentours de 1.05 g/ml. Celui-ci pourrait correspondre à la population des plaquettes vitellines légères endommagée mais on ne peut également exclure qu'il s'agisse d'une activité soluble qui ne migre pas au cours de la centrifugation.

Par ailleurs, on constate que le pourcentage relatif d'activité retrouvée dans les deux pics varie en fonction de l'enzyme mesurée. Une distribution hétérogène des enzymes lysosomales pourrait exister entre les deux populations de lysosomes des oocytes. Les plaquettes vitellines légères où se retrouve peu de l'activité de la cathepsine C contiennent la majorité des protéines vitellines qui s'y accumulent par endocytose afin d'assurer le développement futur de l'embryon (Wall *et al.*, 1985). La vitellogénine est une glycoprotéine qui constitue la majeure partie de ces réserves. Jusqu'à ce que l'oocyte soit fécondé, celle-ci ne subit que peu de dégradations : déphosphorylation et clivage de ses chaînes oligosaccharidiques ainsi que production de petits peptides. Elle est stockée sous forme de lipoprotéine

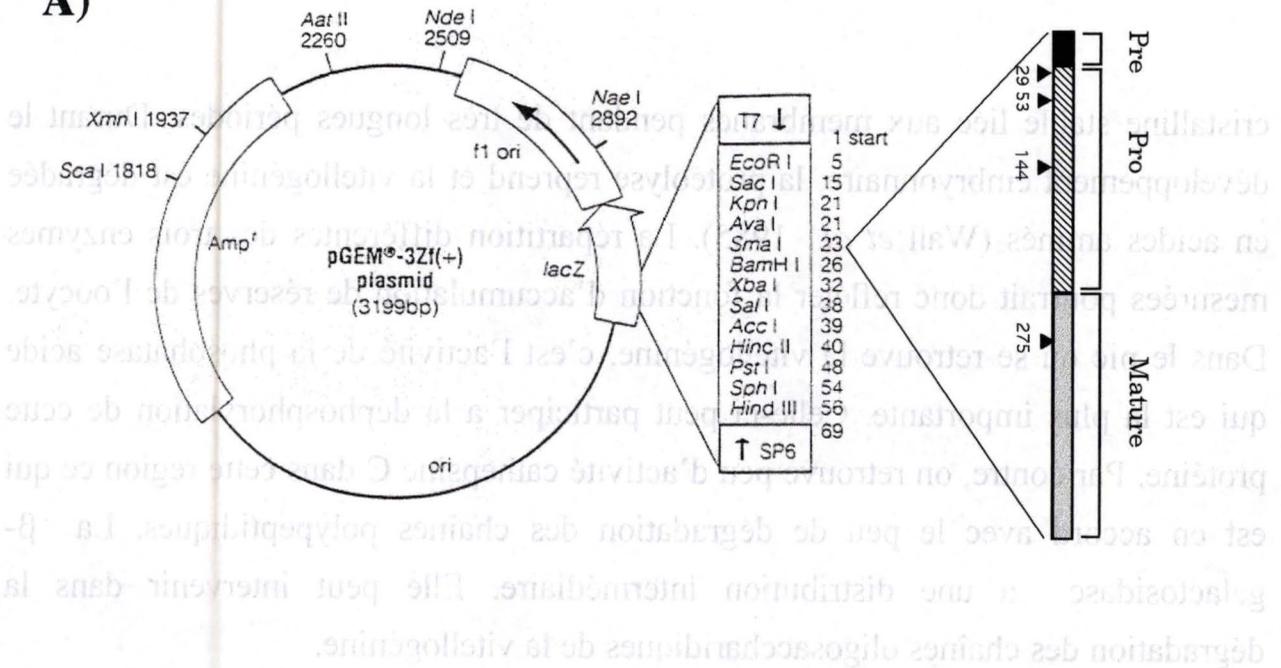
crystalline stable liée aux membranes pendant de très longues périodes. Durant le développement embryonnaire, la protéolyse reprend et la vitellogénine est dégradée en acides aminés (Wall *et al.*, 1985). La répartition différentes des trois enzymes mesurées pourrait donc refléter la fonction d'accumulation de réserves de l'oocyte. Dans le pic où se retrouve la vitellogénine, c'est l'activité de la phosphatase acide qui est la plus importante. Celle-ci peut participer à la déphosphorylation de cette protéine. Par contre, on retrouve peu d'activité cathepsine C dans cette région ce qui est en accord avec le peu de dégradation des chaînes polypeptidiques. La β -galactosidase a une distribution intermédiaire. Elle peut intervenir dans la dégradation des chaînes oligosaccharidiques de la vitellogénine.

Le fractionnement en gradient de saccharose met bien en évidence les deux populations lysosomales des oocytes que rejoint la cathepsine D après son expression dans l'oocyte (Faust *et al.*, 1987): Dans l'éventualité d'une expression de la cathepsine C de rat au sein de l'oocyte suite aux microinjections, la réalisation d'un tel gradient devrait permettre de vérifier aisément si celle-ci est également ciblée vers les lysosomes.

II. Préparation du plasmide et restriction :

Pour produire l'ARNm destiné aux microinjections, il est nécessaire de disposer d'un ADN linéarisé contenant le gène de la cathepsine C de rat. Nous disposons pour entamer ce travail, du plasmide pGEM-DAP I (figure 9a) produit au laboratoire. Celui-ci est un vecteur double brin de 4813 paires de bases possédant le gène de résistance à l'ampicilline. Il dérive du pGEM-3Zf(+) dans lequel on a inséré au site Sma I, l'ADNc de la cathepsine C (Dipeptidyl Amino Peptidase I). L'ADNc de la cathepsine C a été obtenu à partir de l'ARN total de foie de rat soumis à l'action de la transcriptase inverse. L'ADNc de la cathepsine C a été ensuite amplifié par PCR.

A)



B)

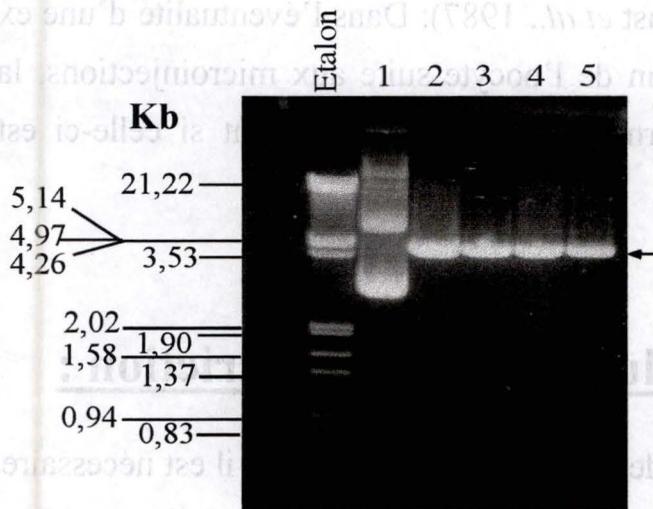


Figure 9. Restriction du plasmide isolé.

A) Représentation schématique du plasmide pGEM-DAPI: le gène de la cathepsine C (1614 bp) a été inséré au site Sma I du pGEM 3 Zf+. Les 4 sites potentiels de glycosylation sont indiqués par des ►

B) Photographie d'un gel d'agarose sur lequel ont migré : le plasmide extrait non restreint (piste 1) et restreint par Pst 1 (piste 2 (avant l'extraction) et piste 4 (après l'extraction)) ou par Xba I (piste 3 (avant l'extraction) et piste 5 (après l'extraction)).

Le plasmide a d'abord été extrait d'une culture bactérienne puis linéarisé par une enzyme de restriction, soit Xba I soit Pst1. Cette linéarisation de l'ADN est nécessaire pour permettre sa transcription par l'ARN polymérase ("Run-off transcription"). Les sites de restriction de ces enzymes se situent en aval du promoteur du phage T7 et du gène de la cathepsine C inséré en Sma I. Ils ne sont en outre pas contenus dans le gène de la cathepsine C. Ce sont donc deux enzymes adaptées à la "linéarisation" du plasmide. Cependant, Pst 1 se distingue de Xba I par le fait qu'elle produit des extrémités 3' saillantes. Il sera dès lors intéressant de comparer les résultats donnés par les ADN résultant de l'action de ces deux enzymes.

Une mesure au spectrophotomètre à 260 nm sur 5 µl dilué 200 fois a permis de déterminer pour l'ADN plasmidique une concentration d'environ 10 µg/µl.

La figure 9b représente un gel d'agarose 1% sur lequel on a fait migrer côte à côte 1µg d'étalon, 200 ng d'ADN plasmidique non restreint, 1,25 µg d'ADN plasmidique restreint par Xba I avant l'extraction, 1,25 µg d'ADN plasmidique restreint par Pst1 avant l'extraction, l'ADN plasmidique restreint par Xba I après l'extraction et l'ADN plasmidique restreint par Pst1 après l'extraction. Lors de l'extraction au phénol-chloroforme qui suit la réaction de restriction, nous estimons avoir perdu environ 25 % de l'ADN.

La taille attendue du plasmide est de 4.8 Kb. L'ADN plasmidique non restreint présente deux bandes de migration principales, la première aux environs de 6 Kb, la seconde vers 2.5 Kb. Les différentes conformations que peut prendre l'ADN expliquent des vitesses de migration différentes pour des tailles identiques. La bande migrant vers 6 Kb est en fait de l'ADN plasmidique circulaire qui migre plus lentement. La bande retrouvée vers 2.5 Kb est l'ADN plasmidique superenroulé qui migre plus vite qu'un ADN linéaire. Ces affirmations sont confirmées par la restriction : l'ADN restreint migre bien à la taille attendue de 4.8 Kb. Comme

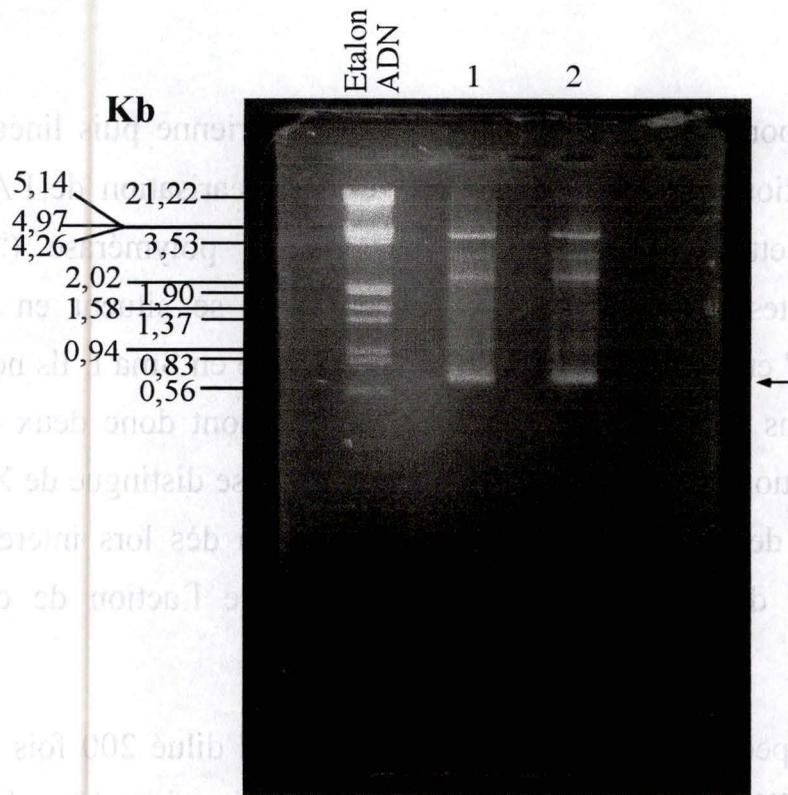


Figure 10. ARN messager non coiffé.

Photographie d'un gel d'agarose sur lequel a migré le produit de la transcription *in vitro* réalisée à partir de l'ADN linéarisé par Pst 1, avant (piste 1) et après son extraction (piste 2).

attendu, on ne constate pas, sur le gel, de différence entre les bandes d'ADN restreint par Xba I et PstI.

La présence d'une seule bande pour l'ADN restreint confirme l'existence d'un site unique de restriction pour chacune des enzymes ainsi que la possibilité en les utilisant d'obtenir un plasmide linéarisé.

Nous disposons donc à présent d'un ADN linéarisé de bonne qualité et d'une concentration que nous estimons de 0.5 µg/µl ce qui est suffisant pour permettre sa transcription.

III. Production d'ARN messenger non coiffé :

Disposant d'un kit de la firme Promega, nous avons d'abord réalisé une transcription in vitro d'ARN messenger non coiffé à partir de l'ADN linéarisé par PstI, un tel ARN donnant par ailleurs de bons résultats lors de traductions in vitro réalisées précédemment au laboratoire.

La figure 10 représente un gel d'agarose sur lequel on a fait migrer un étalon ADN ainsi que le produit de la transcription in vitro avant et après son extraction au phénol-chloroforme. L'étalon ADN ne permet pas de déterminer la taille de l'ARN messenger produit.

L'ARN messenger produit par transcription in vitro en utilisant la T7 polymérase a une taille attendue de 1600 paires de bases. On peut raisonnablement estimer que la bande de plus faible poids moléculaire observée sur le gel lui correspond. Celle-ci n'est pas diffuse et ne présente pas de signes de dégradation, évidents lors d'une contamination par la ribonucléase. On peut donc considérer que l'ARN est de qualité adéquate pour les expériences ultérieures.

La bande de poids moléculaire le plus élevé correspond à des résidus d'ADN linéarisé de 5 Kb. La réaction de transcription ne contient en effet pas de désoxyribonucléase. Les bandes intermédiaires présentes sur le gel pourraient correspondre à des ARN supplémentaires dont l'apparition est caractéristique de l'utilisation d'ADN linéarisé par Pst 1. Cette enzyme de restriction produit des extrémités 3' saillantes que l'ARN polymérase peut utiliser pour produire des ARN plus longs 'en tournant sur elle-même' (Schenborn *et al.*, 1985).

La transcription *in vitro* a donc permis de produire un ARN messager dont la concentration que nous estimons de 100 ng/ μ l et la qualité semblent suffisantes pour tenter son expression.

IV. Traduction *in vitro* dans du lysat de réticulocytes de lapin:

Avant de tenter une première série d'injections, il nous a paru utile de tester au préalable l'ARN messager produit dans un système de traduction *in vitro*. Le système choisi est le lysat de réticulocytes. Celui-ci contient tous les composants nécessaires pour une traduction et est efficace avec la plupart des ARN messagers.

10% de la réaction de traduction sont chargés sur un gel SDS-PAGE 10 %. Après la migration, celui-ci est fixé, traité pour la fluorographie et placé sous un film photographique. La figure 11 montre ce film révélé après une exposition de 4 semaines. On peut y voir côte à côte un étalon de protéines marquées au carbone 14, un contrôle positif (une réaction de traduction où l'ARN est celui de la luciférase), un contrôle négatif (une réaction de traduction où l'ARN est remplacé par de l'eau) et deux réactions de traduction réalisées avec l'ARN messager non coiffé de la cathepsine C (la première avec 50 ng et la seconde avec 200 ng d'ARN messager produit à partir d'ADN linéarisé par Pst 1).

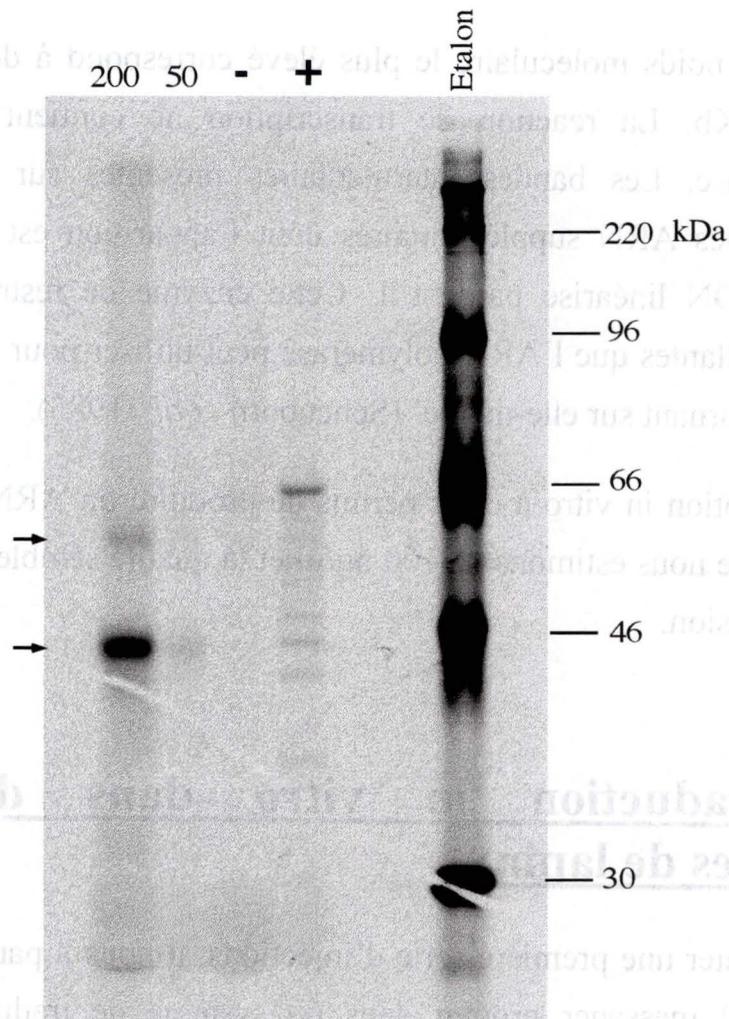


Figure 11. Traduction *in vitro* dans du lysat de réticulocytes de lapin.

Film placé sur un gel SDS-PAGE 10 % révélé après 4 semaines d'exposition. Sur le gel ont migré 4 réactions de traduction : un contrôle positif (+), un contrôle négatif (-), une réaction utilisant 50 ng d'ARN messager non coiffé produit à partir d'ADN restreint par Pst 1 (50) et une réaction utilisant 200 ng du même ARN (200).

Deux bandes apparaissent (peu visibles après scanning) dans la réaction employant 50 ng d'ARN et sont visibles plus nettement encore dans la réaction employant 200 ng. La bande la plus intense semble correspondre à la forme précurseur de la cathepsine C de rat non glycosylée qui possède un poids moléculaire de 45 kDa. La bande moins intense de 55 kDa pourrait correspondre à la procathepsine C glycosylée. La glycosylation des protéines s'effectue normalement dans le réticulum endoplasmique. In vitro, la présence de membranes microsomales est nécessaire. Dans le lysat de réticulocytes, il est nécessaire d'en rajouter pour bien visualiser les modifications post-traductionnelles. On ne peut cependant pas exclure qu'il existe bien des membranes microsomales en faible quantité dans le lysat de réticulocytes permettant d'obtenir une petite quantité de précurseur de cathepsine C glycosylée.

Notons, le rendement très faible (4 semaines d'exposition furent nécessaires) de la traduction dans le lysat de réticulocytes. Une explication pourrait être la présence de particules SRP (signal recognition particle). Celles-ci se fixent de manière cotraductionnelle sur le peptide signal des protéines sécrétées pour permettre leur translocation dans la lumière du réticulum endoplasmique. Cependant, dans les systèmes in vitro ne possédant pas ou peu de membranes microsomales la particule SRP reste fixée à la protéine freinant fortement sa traduction qui s'arrête après 70-100 acides aminés.

Quoiqu'il en soit, la traduction in vitro de l'ARN messenger produit in vitro permet d'obtenir une protéine que l'on identifie comme étant la procathepsine C. L'ARN messenger que nous produisons est donc d'une part, assez stable pour permettre sa traduction in vitro et d'autre part, ne contient pas de séquences stop prématurées qui pourraient résulter de mutations et produire des protéines tronquées.

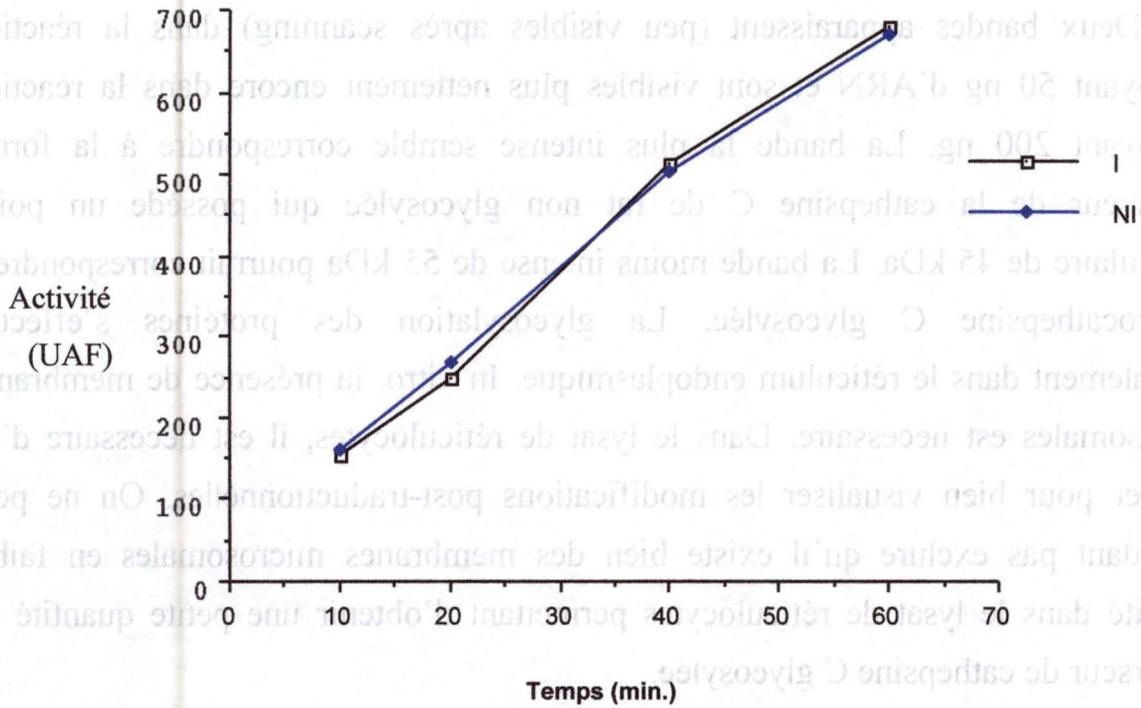


Figure 12. Cinétique de l'activité de la cathepsine C.

Des dosages de la cathepsine C ont été effectués sur des homogénats d'oocytes (contenant le même nombre de cellules) injectés avec de l'ARN messager non coiffé (I) et non injectés (NI). L'activité de la cathepsine C est exprimée en unités arbitraires de fluorescence (UAF). En abscisse, se trouve le temps d'incubation en présence du substrat. Le temps d'incubation des oocytes dans leur milieu avant leur homogénéisation est de 24 heures.

V. Microinjection d'ARN non coiffé :

Ayant obtenu un résultat lors de la traduction *in vitro* de l'ARN messenger, nous avons dès lors tenté d'obtenir un résultat *ex vivo*. L'approche la plus simple à mettre en œuvre était une mesure de l'activité de la cathepsine C sur un homogénat d'oocyte après microinjection de l'ARN messenger.

Les oocytes ont été injectés avec 50 nl d'ARN concentré à 0,1 ng/nl. Après une nuit d'incubation dans une solution de Barth modifiée pour éliminer les cellules endommagées, les oocytes injectés et non injectés ont été incubés 24 heures à 19°C dans 10 µl par oocyte de Solution de Barth modifiée additionnée de 5 % de sérum bovin foetal. Le dosage de la cathepsine C a ensuite été réalisé sur des homogénats contenant le même nombre de cellules en effectuant des temps d'incubation croissants en présence de son substrat.

La figure 12 montre la cinétique de l'activité en fonction du temps d'incubation en présence du substrat. On ne constate pas de différence significative entre les activités mesurées dans les oocytes injectés et non injectés.

Les résultats obtenus précédemment ayant mis en évidence une faible activité de la cathepsine C dans l'homogénat d'oocyte, nous pouvions espérer constater une augmentation de celle-ci, ce qui aurait constitué un moyen très simple d'analyse. Cependant, le résultat négatif obtenu ici n'est peut-être pas surprenant. En effet, de nombreuses étapes mènent à l'expression d'une protéine enzymatiquement active. D'après Soreq *et al.* (1985), les oocytes de Xénope sont capables d'en produire mais la réussite de chacune des étapes qui y mènent varie considérablement d'un ARN messenger à l'autre.

L'échec de cette expression peut provenir de l'ARN lui-même. Tout d'abord, l'ARN peut être dégradé dans l'oocyte avant sa traduction. L'ARN utilisé n'est pas coiffé. La présence d'une coiffe à l'extrémité 5' augmente la stabilité des ARN

messagers. Dans la plupart des systèmes *in vitro* la présence de celle-ci n'est pas nécessaire pour permettre la traduction. Par contre, plusieurs auteurs soulignent l'importance de la coiffe pour les microinjections d'ARN messenger dans les oocytes de Xénope (Colman, 1984 ; Matten *et al.*, 1995). Dans notre cas, l'absence d'une telle coiffe peut mener à la dégradation prématurée de l'ARN. Une deuxième hypothèse pourrait être que l'ARN produit n'est pas d'une concentration ou d'une qualité suffisante pour forcer une expression de la cathepsine C de rat. Nous avons déjà signalé que la transcription à partir d'ADN linéarisé par Pst 1 peut générer des ARN supplémentaires de plus grande taille. Ceux-ci peuvent contenir des séquences complémentaires de l'ARN messenger 'utile' et empêcher sa traduction.

Dans le cas où l'ARN est bien utilisé par l'oocyte, différentes raisons peuvent expliquer le fait que celui-ci n'exprime pas la protéine enzymatiquement active. Tout d'abord, la protéine précurseur peut ne pas être envoyée vers des organites intracellulaires mais être sécrétée. Ensuite, l'oocyte peut ne pas être capable de réaliser la maturation de la protéine nécessaire à son activité. Pour des raisons que nous ignorons, il se peut également que l'enzyme bien que présente sous sa forme mature soit dégradée dans l'oocyte peu après son expression. Enfin, la cathepsine C de rat pour être enzymatiquement active doit se trouver sous sa forme oligomérique. L'oocyte n'est peut-être pas capable de réaliser cette étape.

VI. Production d'ARN messenger coiffé :

Suite aux problèmes évoqués plus haut qui peuvent résulter de l'absence d'une coiffe à l'extrémité 5' de l'ARN produit *in vitro*, nous avons tenté d'augmenter l'efficacité de la traduction par l'oocyte.

La réaction de transcription d'ARN messenger coiffé a été réalisée à l'aide du kit T7 Cap Scribe de la firme Boehringer Mannheim. Ce kit contient une ARN

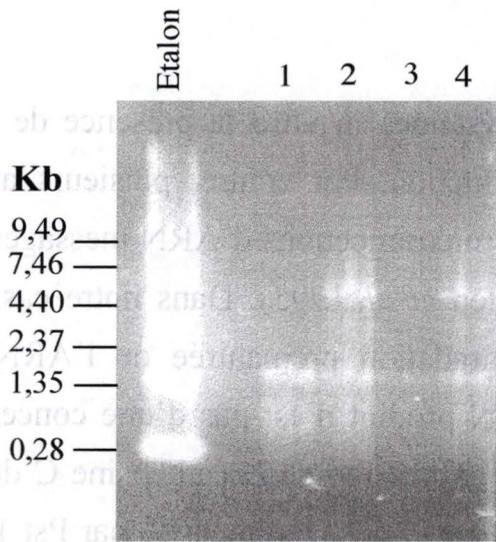


Figure 13. ARN messenger coiffé : utilisation d'ADN linéarisé par *Xba I* ou *Pst I*.
 Photographie d'un gel d'agarose sur lequel a migré le produit de la transcription in vitro réalisée à partir de l'ADN linéarisé : - par *Xba I*, avant (piste 1) et après son extraction (piste 3)
 - par *Pst I*, avant (piste 2) et après son extraction (piste 4)

VI. Production d'ARN messenger coiffé :

Une fois aux problèmes évolutifs plus haut qui peut être le résultat de l'absence d'une coiffe à l'extrémité 5' de l'ARN produit in vitro, nous avons tenté d'augmenter l'efficacité de la traduction par l'ovocyte.

La réaction de transcription d'ARN messenger coiffé a été réalisée à l'aide du kit

IV. Ce kit est de la firme Boehringer Mannheim. Ce kit contient une ARN

polymérase qui utilise le promoteur du phage T7 présent en amont du gène de la cathepsine C. La polymérase incorpore à l'extrémité 5' les précurseurs de coiffe qui lui sont fournis. La firme Boehringer Mannheim préconise après la réaction de transcription une simple précipitation à l'éthanol. L'ARN transcrit étant habituellement préalablement extrait au phénol-chloroforme, nous avons réalisé les deux sortes de préparations en vue d'une comparaison de l'efficacité de la traduction des transcrits préparés par ces méthodes.

La figure 13 montre un gel d'agarose 1 %. Sur celui-ci se trouvent côte à côte, un étalon de poids moléculaire "ARN" permettant d'estimer la concentration du transcrit et sa taille ainsi que les ARN messagers produits à partir d'ADN linéarisé par Xba I et Pst I avant et après leur précipitation à l'éthanol. Nous estimons au cours de celle-ci, avoir perdu 50% du produit de transcription. On constate la présence dans les 4 pistes, d'une bande aux environs de 1600 paires de base qui est la taille attendue du transcrit. Dans le cas de l'ARN produit à partir d'ADN linéarisé par PstI on constate la présence d'une bande supplémentaire. La transcription réalisée à partir d'ADN linéarisé par PstI produit en plus de l'ARN attendu, un ARN supplémentaire dont il a déjà été question plus haut. Celui-ci pouvant inhiber en partie la traduction, nous avons décidé de ne plus utiliser pour la suite de nos expériences que de l'ARN produit à partir d'ADN linéarisé par Xba I qui ne présente pas cet inconvénient. La concentration de l'ARN produit est estimée à 0,2µg/µl.

La figure 14 représente un gel d'agarose 1 % où ont migré 3 µg d'un étalon de poids moléculaire "ARN" et les ARN messagers produits à partir d'ADN linéarisé par Xba I. Ceux-ci ont été soit uniquement précipités à l'éthanol, soit extraits au phénol-chloroforme et précipités à l'éthanol. L'ARN produit migre dans tous les cas en une bande de 1.6 Kb qui est la taille attendue. L'ARN obtenu ici est représenté par une bande unique qui n'est pas diffuse et ne présente pas de signes évidents de dégradation. La concentration obtenue après précipitation à l'éthanol ou extraction

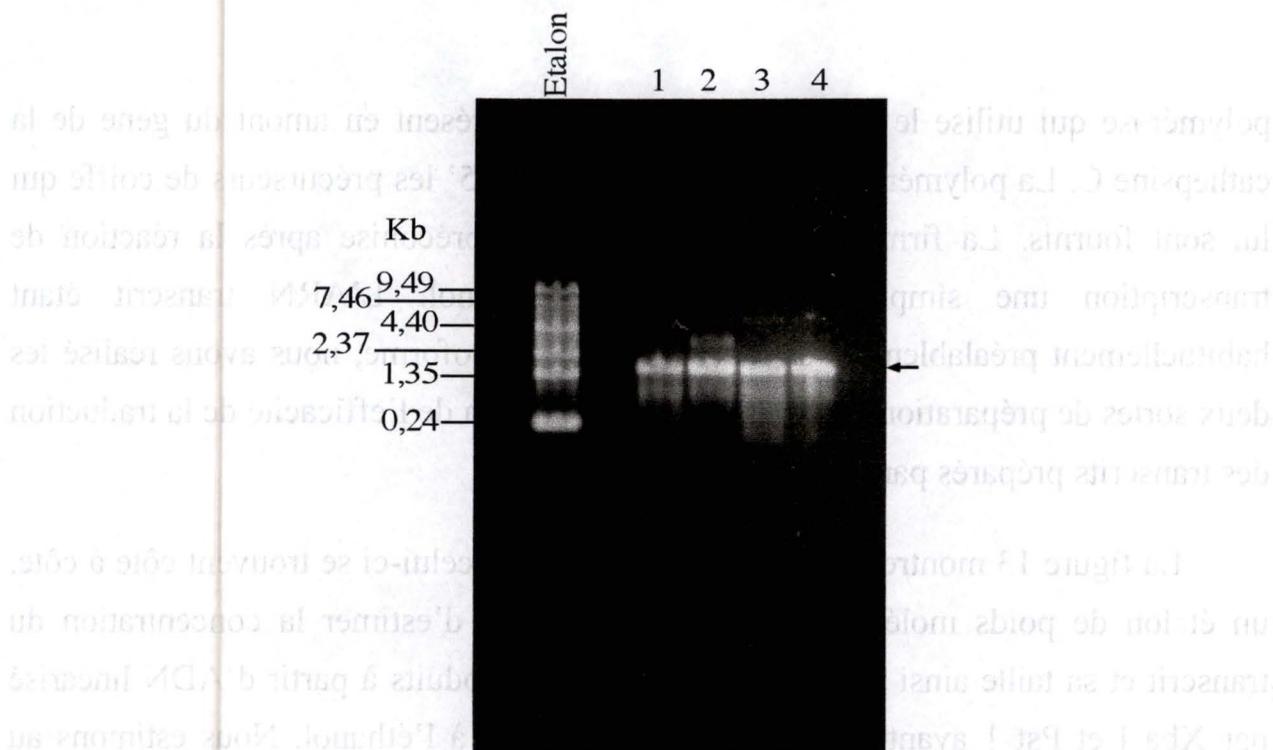


Figure 14. ARN messenger coiffé.

Photographie d'un gel d'agarose sur lequel a migré le produit de la transcription in vitro réalisée à partir de l'ADN linéarisé par Xba I : - avant (piste 1) et après simple précipitation à l'éthanol (piste 2)
 - avant (piste 3) et après extraction au phénol-chloroforme et précipitation à l'éthanol (piste 4)

au phénol-chloroforme (rendement évalué à plus de 80% dans les deux cas) estimée à 1 µg/µl est importante. Cependant, pour obtenir un tel ARN, une série de mises au point techniques telles que l'augmentation de la quantité de polymérase et du temps d'incubation ainsi qu'un meilleur contrôle de l'extraction ont été nécessaires. Pendant ces mises au point, de l'ARN de moins bonne qualité et de plus faible concentration a été utilisé pour réaliser les premières expériences d'expression présentées ci-dessous.

VII. Traductions in vitro :

Avant de microinjecter l'ARN messenger coiffé, nous avons d'abord testé celui-ci dans différents systèmes de traduction in vitro.

VII.1 Lysat de réticulocytes de lapin :

Le premier système utilisé est le lysat de réticulocytes de lapin déjà employé pour l'ARN messenger non coiffé.

5 µl de la réaction de traduction (50 µl au total) ont été chargés sur un gel SDS-PAGE qui après la migration, est traité pour la scintillation et placé sous un film photographique. La figure 15 montre ce film révélé après une exposition de 4 semaines. On peut y voir côte à côte un étalon composé de protéines marquées au carbone 14, un contrôle négatif (une réaction où l'ARN est remplacé par de l'eau), un contrôle positif (une réaction où l'ARN est celui de la luciférase) et quatre réactions de traduction réalisées avec 2 ou 0.5 µg d'ARN messenger coiffé, soit uniquement précipité à l'éthanol (E), soit extrait au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol (P).

On constate pour les réactions de traduction réalisées à partir de l'ARN messenger coiffé la présence de deux bandes. La protéine produite en plus grande

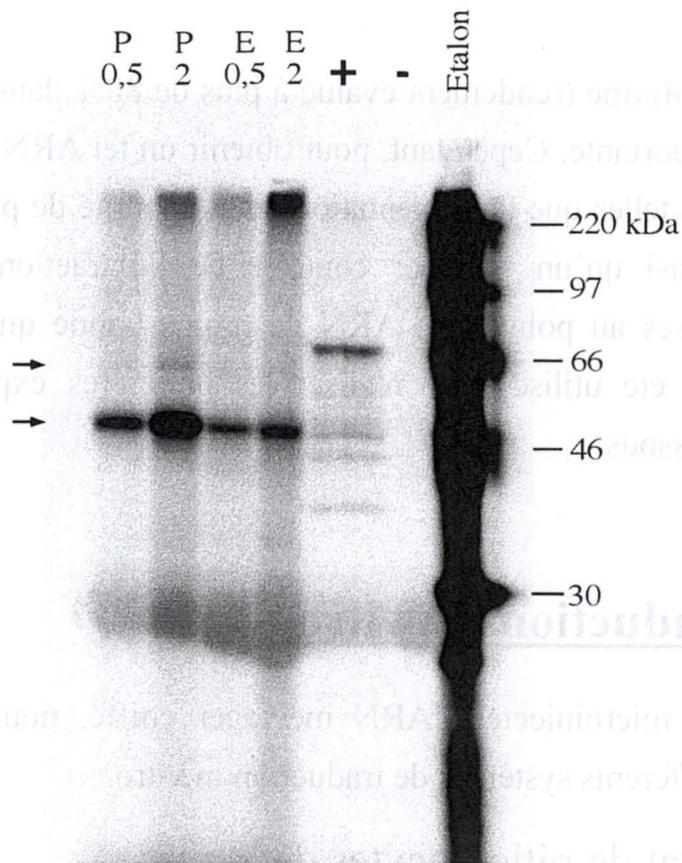


Figure 15. Traduction *in vitro* dans du lysat de réticulocytes de lapin.

Film placé sur un gel SDS-PAGE 15% révélé après 4 semaines d'exposition. Sur le gel ont migré 6 réactions de traduction : un contrôle négatif (-), un contrôle positif (+), deux réactions utilisant soit 2 μ g (E 2) soit 0,5 μ g (E 0,5) d'ARN messager coiffé uniquement précipité à l'éthanol produit à partir d'ADN restreint par Xba I et deux réactions utilisant soit 2 μ g (P 2) soit 0,5 μ g (P 0,5) d'ARN messager coiffé extrait au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol produit à partir d'ADN linéarisé par Xba I.

quantité a un poids moléculaire de 45 kDa ce qui correspond bien à la procathepsine C de rat non glycosylée. L'autre bande de 55 kDa pourrait correspondre à la procathepsine C de rat glycosylée pour autant qu'on admette la présence dans le lysat de membranes microsomales comme il en a déjà été fait mention auparavant.

Il existe une différence d'intensité entre les bandes des réactions employant 0.5 μg (moins intenses) et 2 μg . On constate également que la quantité de protéines produite à partir de l'ARN messenger extrait au phénol-chloroforme puis précipité à l'éthanol semble plus importante que celle produite à partir d'ARN messenger uniquement précipité à l'éthanol. Celui-ci contient de nombreuses protéines qui peuvent inhiber la traduction. Par contre, l'extraction au phénol-chloroforme permet la purification de l'ARN par la disparition d'une grande partie de ces protéines. Ceci explique peut-être, la plus grande efficacité de traduction observée avec ce type d'ARN.

Notons que l'efficacité générale de la traduction est assez faible : un temps d'exposition du film très long est nécessaire pour voir apparaître les bandes correspondant aux protéines produites. Ce manque d'efficacité peut provenir, soit de l'ARN messenger utilisé, soit du lysat. L'ARN semblant être de la bonne taille et en concentration suffisante, le problème viendrait plutôt du lysat lui-même. Comme il en a déjà été question plus haut, une possibilité serait que le lysat de réticulocytes de lapin contienne, même en faible quantité, des particules SRP (signal recognition particle) qui peuvent ralentir considérablement la traduction de protéines destinées à suivre la voie de la sécrétion, ce qui est le cas de la cathepsine C.

VII.2 Extrait de germe de blé :

L'obtention rapide d'un signal important par traduction *in vitro* présenterait un intérêt technique évident puisqu'elle nous permettrait de tester rapidement la qualité

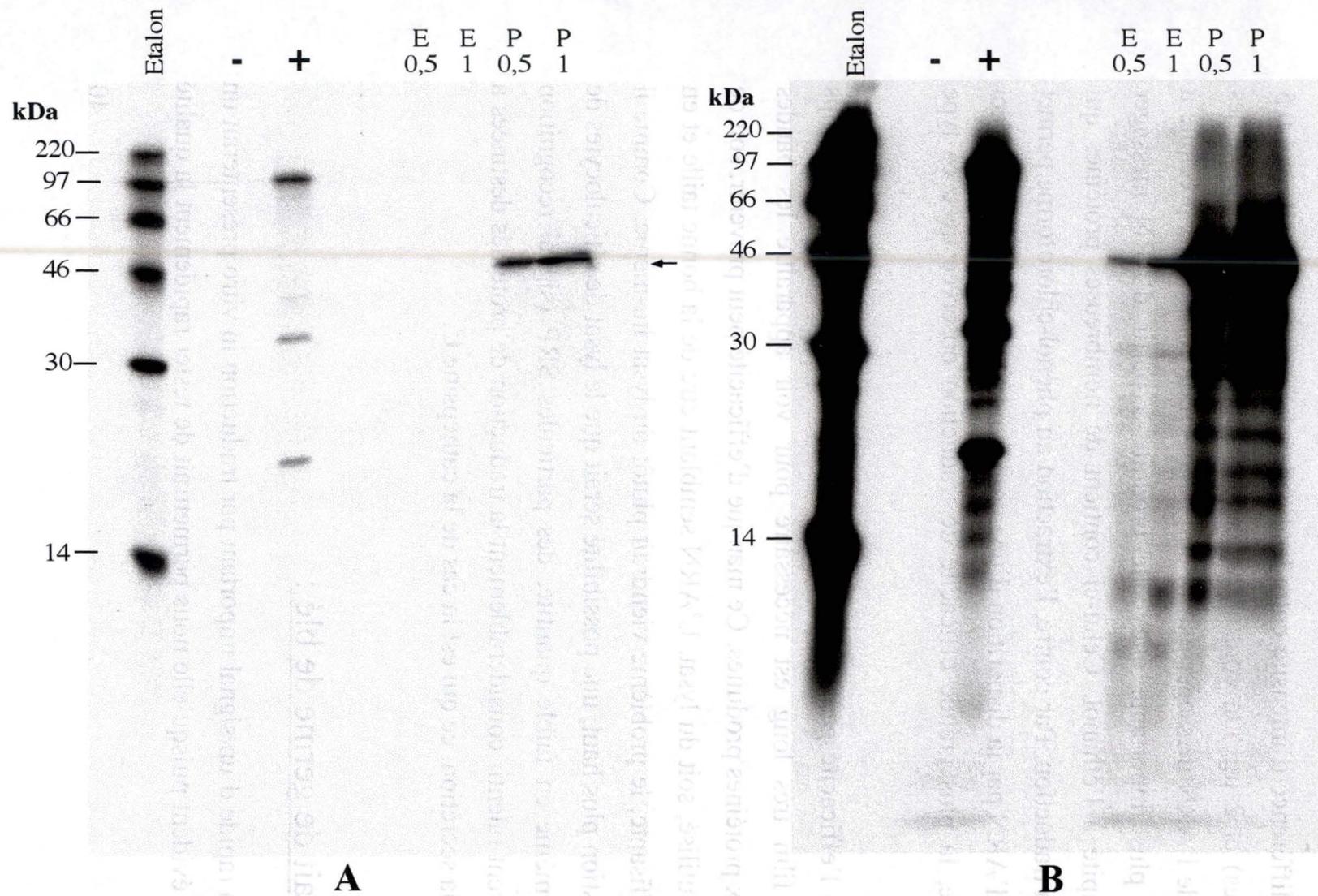


Figure 16. Traduction *in vitro* dans de l'extrait de germe de blé.

Film placé sur un gel SDS-PAGE 15% révélé après A) 48 heures ou B) 4 semaines d'exposition. Sur le gel ont migré 6 réactions de traduction: un contrôle négatif (-), un contrôle positif (+), deux réactions utilisant soit 0,5 μ g (E 0,5) soit 1 μ g (E 1) d'ARN messager coiffé uniquement précipité à l'éthanol produit à partir d'ADN restreint par Xba I et deux réactions utilisant soit 0,5 μ g (P 0,5) soit 1 μ g (P 1) d'ARN messager coiffé extrait au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol produit à partir d'ADN linéarisé par Xba I.

des préparations d'ARN que nous réaliserons. Nous disposerions ainsi d'un contrôle nous assurant de la qualité de notre ARN avant de tenter son expression plus fastidieuse dans l'oocyte. C'est pourquoi, n'ayant pas atteint ce but en utilisant du lysat de réticulocytes de lapin, nous avons décidé d'utiliser de l'extrait de germe de blé.

TRADUCTION IN VITRO :

Sur un gel SDS-PAGE de 15 % ont été chargés 5 µl d'une réaction dont le volume total est de 25µl. Le gel est ensuite traité comme décrit auparavant. La figure 16 montre le film placé sur le gel révélé soit après une exposition de 48 heures (16a) soit après une exposition de quatre semaines (16b). On peut voir côte à côte un étalon de protéines marquées au carbone 14, un contrôle négatif (une réaction de traduction où l'ARN est remplacé par de l'eau), un contrôle positif (une réaction de traduction où l'ARN est celui du BMV) et quatre réactions de traduction réalisées avec 1 ou 0.5 µg d'ARN messenger coiffé soit uniquement précipité à l'éthanol, soit extrait au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol.

Après seulement 48 heures d'exposition, une bande de 45 kDa apparaît clairement dans les réactions utilisant de l'ARN extrait au phénol-chloroforme ce qui n'était pas le cas dans le lysat de réticulocytes. Après 4 semaines d'exposition, la même bande est également présente dans les réactions utilisant de l'ARN uniquement précipité à l'éthanol. L'extrait de germe de blé produit d'une manière beaucoup plus efficace que le lysat de réticulocytes une protéine dont le poids moléculaire est celui de la procathepsine C de rat non glycosylée. La bande de 55 kDa qui apparaissait dans le lysat de réticulocytes et que nous supposons être la procathepsine C glycosylée n'apparaît plus dans ce système qui ne possède ni membranes microsomales ni particules SRP nécessaires à la glycosylation. La tendance à une plus grande efficacité de l'ARN extrait au phénol-chloroforme dont il a déjà été question plus haut est ici plus nette encore. Il n'est pas exclu que

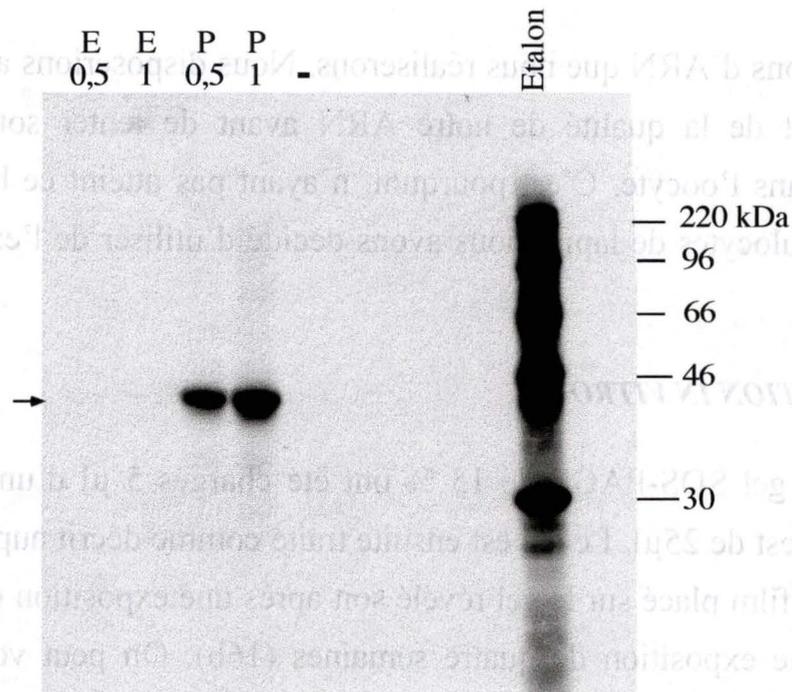


Figure 17. Immunoprécipitation de la traduction *in vitro* dans de l'extrait de germe de blé. Film placé sur un gel SDS-PAGE 15 % révélé après 4 semaines d'exposition. Sur le gel ont migré 5 immunoprécipités de réactions de traduction : un contrôle négatif (-), les immunoprécipités des réactions utilisant soit 1 (P 1) soit 0.5 (P 0.5) μg d'ARN extrait au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol ainsi que les immunoprécipités des réactions utilisant soit 1 (E 1) soit 0.5 (E 0.5) μg d'ARN uniquement précipité à l'éthanol.

l'extrait de germe de blé puisse être plus sensible que le lysat de réticulocytes aux "impuretés" présentes dans la préparation d'ARN.

Nous disposons à présent, d'un système et de conditions expérimentales permettant un rendement important de la traduction de notre ARN.

IMMUNOPRECIPITATION :

A ce stade de notre travail, il nous a semblé essentiel de confirmer que le produit de la traduction *in vitro* correspondait bien à la cathepsine C de rat. Pour cela, nous avons réalisé l'immunoprécipitation du produit de la traduction au moyen d'un anticorps spécifique anti-cathepsine C de rat produit au laboratoire : un lapin a reçu plusieurs injections de cathepsine C de foie de rat purifiée ; les IgG sanguines ont été ensuite partiellement purifiées sur une colonne DEAE-cellulose. L'anticorps a été entre autres, utilisé par Mainferme et al. (1985) dans une étude sur le transport et la synthèse de la cathepsine C dans les cellules de l'Hépatome 7777 de Morris. Il reconnaît les formes précurseur et mature de la cathepsine C de rat.

20 μ l d'une réaction de traduction *in vitro* réalisée dans un extrait de germe de blé, comme décrit dans la figure 16, sont dilués dans 400 μ l de Tris-HCl et Triton X-100 plus un mélange d'antiprotéases et 400 μ l de tampon d'immunoprécipitation puis immunoprécipités au moyen de l'anticorps anti-cathepsine C de rat. Après précipitation des complexes immuns à l'aide de protéine A-sépharose, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS a été effectuée. La figure 17 représente un film révélé après quatre semaines.

La réaction de contrôle positif de la traduction a également été immunoprécipitée à l'aide du même anticorps et est utilisée ici comme contrôle négatif. Dans la piste qui lui correspond, aucune bande n'apparaît. Les protéines produites lors de la traduction *in vitro* dans l'extrait de germe de blé sont bien immunoprécipitées par l'anticorps spécifique de la cathepsine C de rat. En effet,

dans les pistes correspondant aux réactions de traduction réalisées à partir d'ARN coiffé extrait au phénol-chloroforme on retrouve clairement la bande de 45 kDa. Comme prévu, dans celles correspondant aux réactions de traduction réalisées à partir d'ARN coiffé uniquement précipité à l'éthanol la même bande apparaît mais de manière beaucoup moins intense.

Nous pouvons donc à présent affirmer que le signal obtenu par traduction en extrait de germe de blé de notre produit de transcription in vitro correspond bien au précurseur non glycosylé de la cathepsine C de rat.

VIII. Microinjections de l'ARN coiffé :

VIII.1 Dosage de l'activité :

Les résultats de traduction in vitro confirmant la qualité de notre ARN messager coiffé, nous avons tenté d'obtenir des résultats ex vivo. Des dosages enzymatiques étant moins fastidieux que des immunoprécipitations, nous avons d'abord tenté de les utiliser pour voir si l'injection de notre ARN messager forçait l'expression de la cathepsine C de rat enzymatiquement active dans les oocytes de Xénope.

Les oocytes sont injectés avec 20 nl par oocyte d'ARNm coiffé d'une concentration de 1 µg/µl. Des oocytes ont également été injectés avec 20 nl d'eau. Après une incubation d'une nuit dans du milieu de Barth modifié additionné de sulfate de gentamycine, les oocytes endommagés sont retirés et des groupes de 5 oocytes sont formés. Ceux-ci sont à nouveau incubés à 19°C dans le même milieu durant des temps croissants au terme desquels ils sont, ainsi que leurs milieux respectifs, congelés et stockés à - 70°C. Le dosage de la cathepsine C est ensuite effectué sur les oocytes homogénéisés à l'aide d'un petit "Potter" dans du

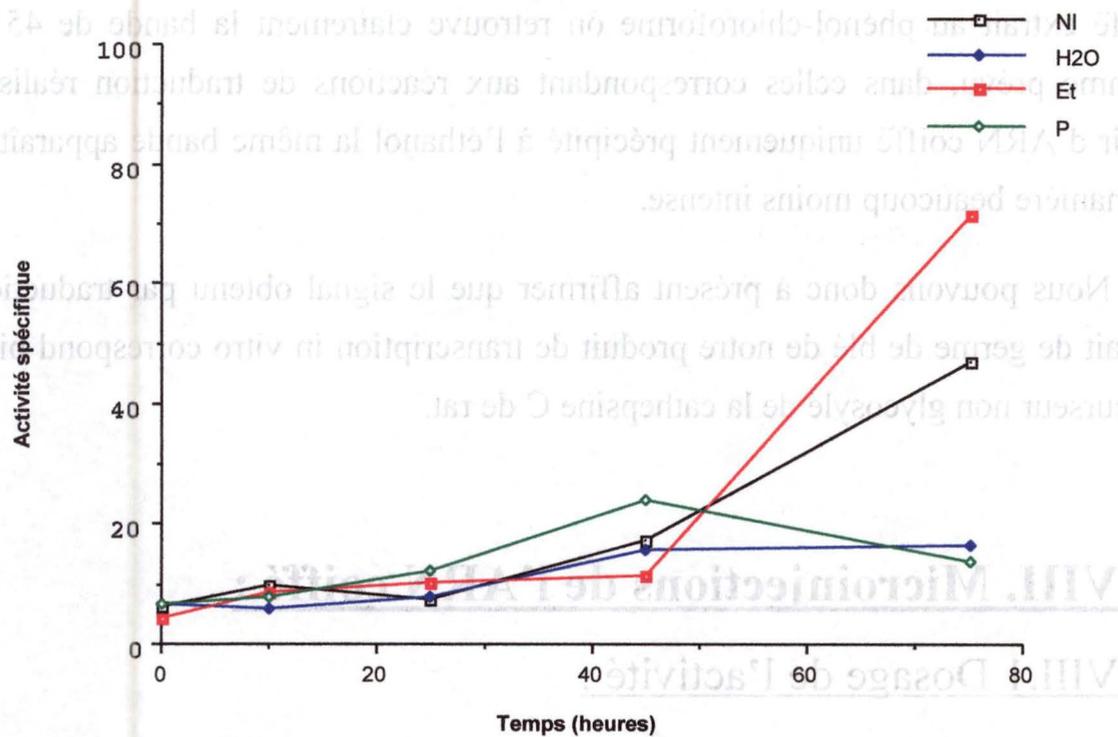


Figure 18: *Activité spécifique de la cathepsine C en fonction du temps d'incubation des oocytes.*

Dosages réalisés sur des homogénats d'oocytes non injectés (NI), injectés avec de l'eau (H2O), injectés avec de l'ARN coiffé uniquement précipité à l'éthanol (Et), injectés avec de l'ARN coiffé extrait au phénol-chloroforme (P). L'activité spécifique est l'activité (exprimée en unités arbitraires de fluorescence) rapportée aux mg de protéines. En abscisse, se trouve le temps d'incubation des oocytes dans leur milieu avant leur homogénéisation. Pour les dosages, le temps d'incubation en présence du substrat est de 20 minutes.

saccharose isotonique de même que sur les milieux. Le dosage des protéines a été effectué sur les homogénats d'oocytes.

Le graphique de la figure 18 montre l'évolution de l'activité spécifique (activité rapportée aux mg de protéines) en fonction des temps d'incubation des oocytes dans leurs milieux.

Sur ces mêmes homogénats, a également été effectué un dosage de la phosphatase acide, autre enzyme lysosomale. Celle-ci présente pratiquement la même évolution d'activité spécifique. La légère augmentation constatée à partir de 45 heures ne résulte donc pas de la microinjection. Elle est peut-être à attribuer à la maturation des oocytes. On peut supposer que les oocytes évoluent vers le stade mature dans lequel l'activité des hydrolases est beaucoup plus importante (Wall et al., 1985). Les différences observées entre les différents groupes peuvent résulter d'une différence d'évolution entre les oocytes. On peut par exemple, supposer qu'à 75 heures d'incubation, les oocytes injectés avec de l'eau et ceux injectés avec de l'ARN extrait au phénol-chloroforme sont en train de mourir.

Les dosages de l'activité ne permettent donc pas de détecter une éventuelle expression de la cathepsine C de rat par l'oocyte de Xénope. S'il existe une protéine produite par l'oocyte suite aux microinjections, elle n'est pas enzymatiquement active. Par ailleurs, voulant nous assurer que la cathepsine synthétisée n'était pas sécrétée, nous avons également réalisé des dosages dans les milieux. Ceux-ci ne mettent pas en évidence une activité significative. Il semble donc improbable que la cathepsine C active soit sécrétée. Toutefois, il convient d'observer ici une certaine prudence quant à ces affirmations. Nous ne connaissons en effet pas la quantité d'enzyme nécessaire pour détecter une éventuelle différence significative d'activité. La cathepsine C de rat pourrait être produite en quantité trop faible pour être enzymatiquement détectable. Rappelons d'autre part, que l'obtention d'un résultat négatif d'une mesure d'activité n'est pas réellement étonnant vu le nombre d'étapes

de maturation post-traductionnelles qui devraient se dérouler correctement pour l'obtention d'une enzyme fonctionnelle.

Cette expérience nous a permis de constater que les méthodes de dosages enzymatiques ne constituent pas un moyen efficace pour vérifier l'efficacité de la traduction résultant de la microinjection. D'autres méthodes telle que l'immunoprécipitation doivent dès lors être envisagées.

VIII.2 Immunoprécipitations :

L'immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps spécifique permet d'aller "rechercher" une protéine particulière parmi d'autres dans un homogénat cellulaire. Rappelons, que nous disposons d'un anticorps anti-cathepsine C de rat qui reconnaît les formes précurseur et mature de cette protéine. Nous l'avons déjà utilisé avec succès pour réaliser l'immunoprécipitation du produit de la traduction en extrait de germe de blé. Il nous a semblé intéressant d'utiliser cette approche pour suivre l'expression éventuelle de la cathepsine C après microinjection de l'ARNm. Une électrophorèse de l'immunoprécipité nous permettra en outre, de déterminer le poids moléculaire de la protéine éventuellement exprimée par les oocytes, nous renseignant ainsi sur la capacité de l'oocyte à effectuer certaines étapes de maturation.

INJECTION D'ARN UNIQUEMENT PRECIPITE A L'ETHANOL :

Des oocytes ont été injectés avec 20 nl d'ARN messenger coiffé uniquement précipité à l'éthanol et d'une concentration de 1 µg/µl. Des marquages métaboliques de 10 et 30 heures ont ensuite été réalisés sur les oocytes avec du tran³⁵S-label. Les milieux d'incubation et les oocytes homogénéisés sont utilisés pour l'immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps anti-cathepsine C de rat.

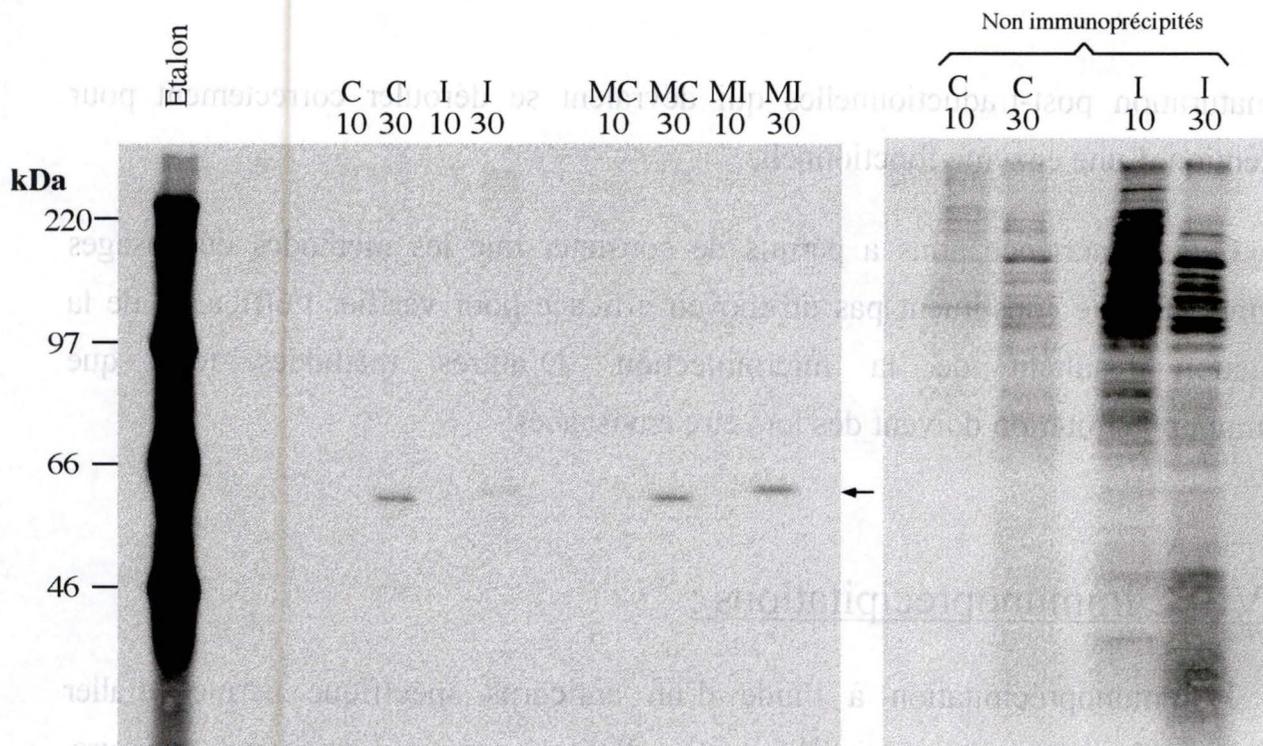


Figure 19. Immunoprécipitation d'oocytes injectés avec de l'ARN uniquement précipité à l'éthanol.

Films placés sur des gels SDS-PAGE révélés après 6 semaines d'exposition. Sur un gel 10% ont migré les immunoprécipités d'oocytes non injectés (C), d'oocytes injectés avec de l'ARN uniquement précipité à l'éthanol (I), ayant subi dix (10) ou trente heures (30) de marquage métabolique ainsi que des milieux correspondants. Sur un gel 15% ont migré les homogénats d'oocytes non immunoprécipités.

La figure 19 montre les immunoprécipités des oocytes et des milieux ainsi que les homogénats non immunoprécipités des oocytes. Les deux films placés sur les gels SDS-PAGE ont été révélés après 6 semaines.

Les oocytes non immunoprécipités permettent d'apprécier l'intensité du marquage métabolique. Celui-ci est apparemment assez faible mais montre comme attendu, une large variété de protéines marquées. A noter, la grande variation observée entre les différents échantillons en ce qui concerne l'efficacité du marquage métabolique.

On constate l'apparition dans les échantillons immunoprécipités ayant subi trente heures de marquage métabolique, d'une bande de 55 kDa. Celle-ci correspond à la procathepsine C glycosylée. L'anticorps semble reconnaître la cathepsine C de l'oocyte (protéine endogène) puisqu'une bande semblable se retrouve dans les oocytes non injectés. Une variation du rendement de l'immunoprécipitation peut expliquer que cette bande soit plus intense dans les oocytes non injectés. Quoiqu'il en soit, il ne semble pas y avoir de différence de quantité significative résultant des microinjections.

Les bandes présentes dans les milieux font penser à une sécrétion de la protéine. Cependant, des difficultés rencontrées pour récolter séparément les oocytes et les milieux peuvent avoir eu comme conséquence un relargage du contenu de certaines cellules lysées dans les milieux.

L'immunoprécipitation à l'aide de notre anticorps permet donc de détecter dans l'oocyte, une protéine qui pourrait correspondre à la procathepsine C glycosylée de Xénope.

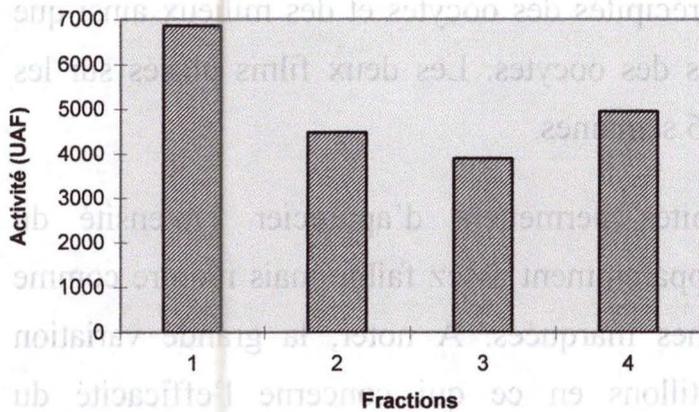


Figure 20. Immunoprécipitation de l'activité.

Des dosages de l'activité (exprimée en unités arbitraires de fluorescence) de la cathepsine C ont été effectués :

- 1 sur une fraction MLP d'oocytes non immunoprécipitée
- sur le surnageant d'une fraction MLP d'oocytes : 2 immunoprécipitée (+ Ac α cathepsine C + protéine A sépharose + Triton X-100 + Tris HCl)
- 3 non immunoprécipitée (+ protéine A sépharose + Triton X-100 + Tris HCl)
- 4 non immunoprécipitée (+ Triton X-100 + Tris HCl)

IMMUNOPRECIPITATION DE L'ACTIVITE :

Les immunoprécipitations précédentes semblaient indiquer une possible reconnaissance par l'anticorps de la cathepsine C de Xénope. Pour vérifier si l'anticorps anti-cathepsine C de rat reconnaît la forme enzymatiquement active de la cathepsine C de Xénope, nous avons testé la capacité de l'anticorps anti cathepsine C de rat à immunoprécipiter l'activité cathepsine C de Xénope. Cette expérience a été réalisée sur une fraction MLP (celle-ci contenant la plus grande partie de l'activité).

La figure 20 montre les résultats des dosages sur une fraction MLP non immunoprécipitée ; sur le surnageant d'une fraction MLP immunoprécipitée ; sur le surnageant d'une fraction MLP non immunoprécipitée mais additionnée de Tris 1M, de Triton X-100 10 % et de protéine A sépharose ; sur le surnageant d'une fraction MLP non immunoprécipitée mais additionnée de Tris 1 M et de Triton X-100 10 %. La fraction MLP seule a une activité un peu plus élevée que les autres fractions. Au sein de celles-ci, on ne constate pas de différence nette.

On s'attendrait, si l'anticorps reconnaissait la forme enzymatiquement active de la cathepsine C de rat à une diminution plus marquée de l'activité dans le surnageant de la fraction immunoprécipitée. Nous pouvons envisager différentes hypothèses pour expliquer ce résultat. Tout d'abord, nous ne pouvons exclure que la bande détectée dans la figure 19 ne corresponde en fait pas à la cathepsine C de Xénope mais à une protéine autre de taille semblable reconnue par l'anticorps. Par contre, si la protéine détectée correspond bien à la cathepsine C de Xénope, notons qu'elle ne correspond pas, de par son poids moléculaire, à la forme mature détectée chez le rat, la seule qui soit active. Dans l'hypothèse où la forme mature serait bien produite par l'oocyte, l'anticorps anti-cathepsine C de rat pourrait ne pas être capable de la reconnaître. Une similarité de séquence entre le propeptide de la cathepsine C de rat et de la cathepsine C de Xénope serait suffisante pour permettre la reconnaissance

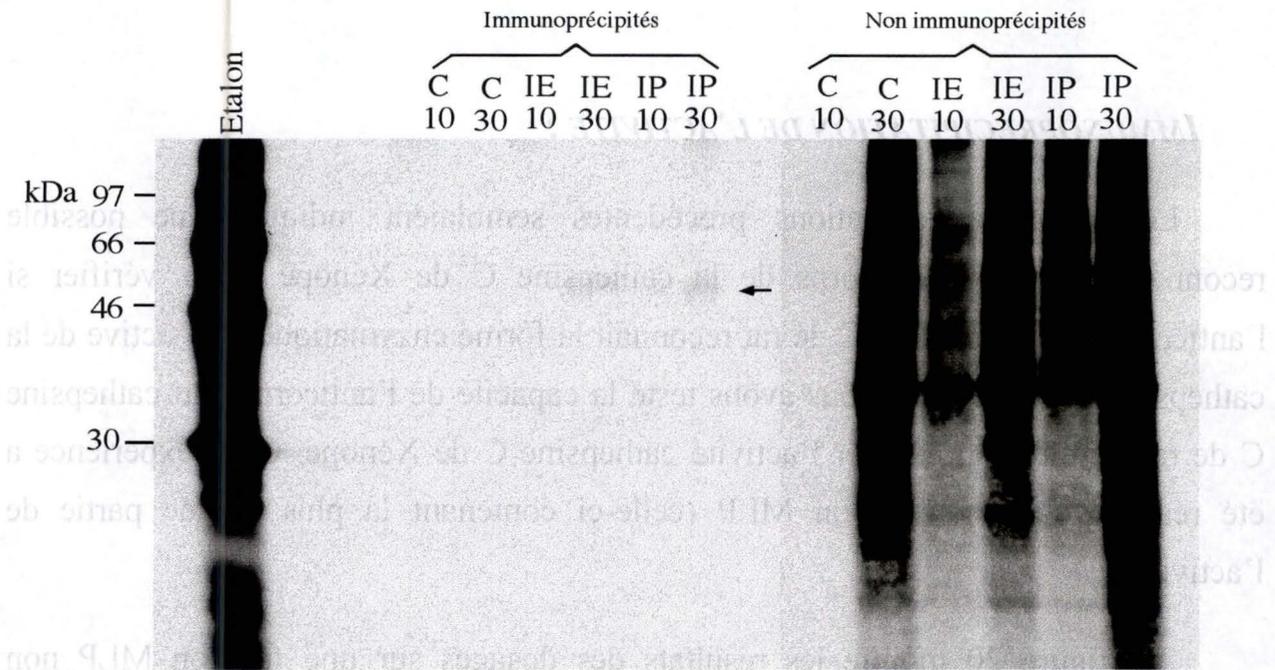


Figure 21. Immunoprécipitation d'oocytes injectés avec deux préparations d'ARN différentes.

Film placé sur un gel SDS-PAGE 15 % révélé après 6 semaines d'exposition. Sur le gel ont migré les immunoprécipités d'oocytes non injectés (C), d'oocytes injectés soit avec de l'ARN uniquement précipité à l'éthanol (IE) soit avec de l'ARN extrait au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol (IP), ayant subi dix (10) ou trente heures (30) de marquage métabolique ainsi que les échantillons non immunoprécipités leur correspondant.

des deux proenzymes par notre anticorps. Tandis que la forme mature serait trop dissemblable pour pouvoir être reconnue.

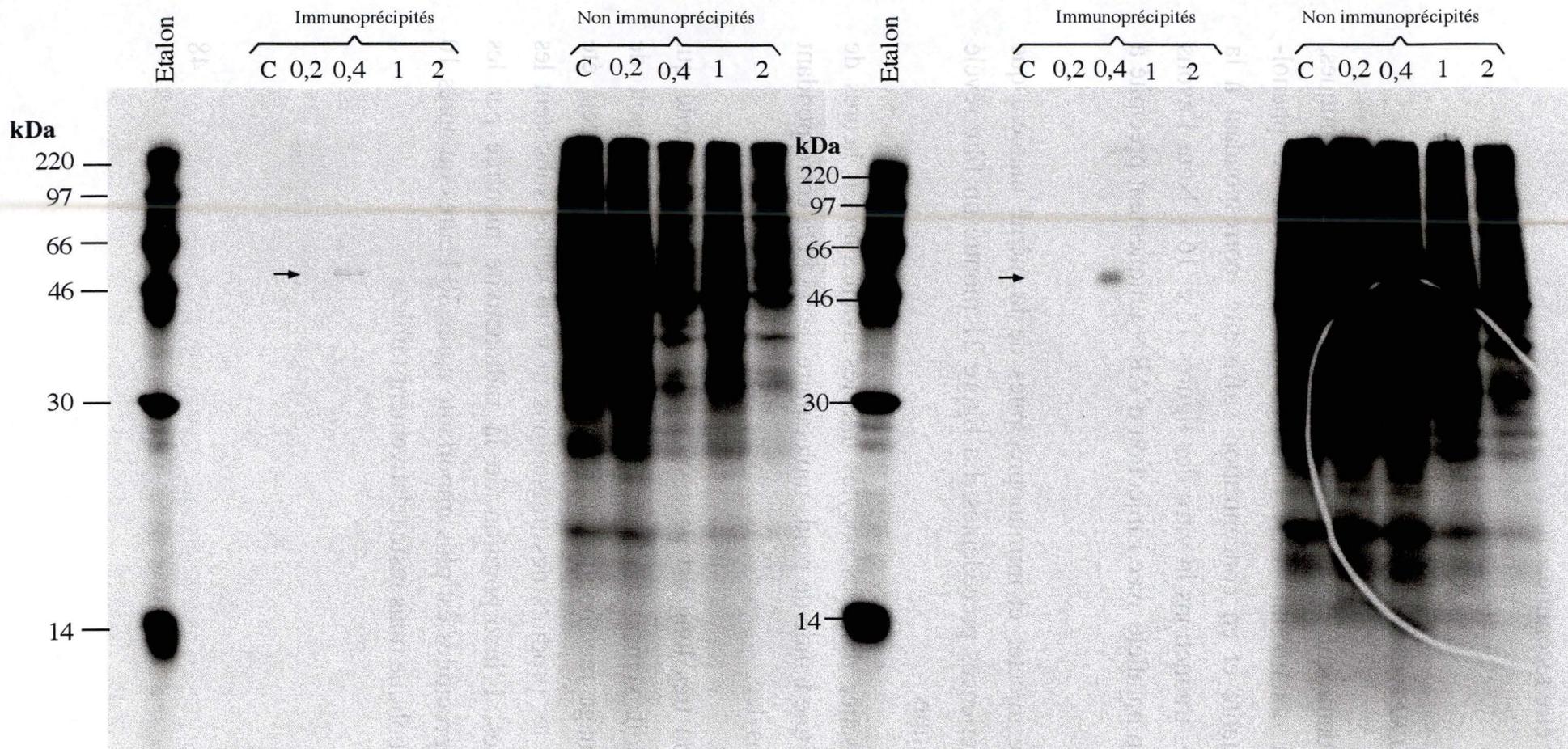
INJECTION DE DEUX PREPARATIONS D'ARN DIFFERENTES :

Comme décrit précédemment, après une série de mises au point techniques, nous sommes parvenu à obtenir un ARN messager coiffé extrait au phénol-chloroforme de bonne qualité et en concentration suffisante (correspondant à la figure 14 et utilisé pour les traductions in vitro des figures 15 et 16). Nous l'avons injecté dans des oocytes en parallèle avec l'injection d'ARN uniquement précipité à l'éthanol

Les oocytes ont été injectés et immunoprécipités de la même manière que celle décrite dans les expériences précédentes. La figure 21 montre un film révélé après 6 semaines d'exposition.

On constate la présence dans les oocytes injectés ayant subi 30 heures de marquage métabolique, d'une bande de poids moléculaire de 55 kDa correspondant à la procathepsine C glycosylée.

Un temps d'exposition très long est nécessaire. Le problème d'efficacité qui semble se poser peut soit venir de l'immunoprécipitation elle-même, soit de l'injection, soit du marquage métabolique. L'immunoprécipitation ayant déjà été utilisée avec succès pour les produits des traductions in vitro seules subsistent les deux dernières hypothèses. L'incorporation de la radioactivité montrée par les échantillons non immunoprécipités est plus importante après 30 heures qu'après 10 heures de marquage métabolique mais reste relativement faible.



A

B

Figure 22. Immunoprécipitation d'oocytes injectés avec différentes concentrations d'ARN.

Film placé sur un gel SDS-PAGE 15% révélé après 6 semaines d'exposition. Sur le gel ont migré les immunoprécipités d'oocytes non injectés (C), d'oocytes injectés avec de l'ARN extrait au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol d'une concentration estimée à 0,2 ; 0,4 ; 1 ou 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ainsi que les échantillons non immunoprécipités leur correspondant. Les oocytes injectés et non injectés ont subi A) 45 heures B) 75 heures de marquage métabolique.

On n'a pas mis ici en évidence une différence nette entre les injections réalisées à partir d'ARN précipité à l'éthanol ou extrait au phénol-chloroforme. Le problème d'efficacité évoqué ne permet cependant pas de tirer de conclusions à ce sujet.

MISE AU POINT DE L'INJECTION : QUANTITE D'ARN ET TEMPS DE MARQUAGE METABOLIQUE :

Jusqu'ici, nous nous étions basés sur les conditions expérimentales utilisées par Faust *et al.*(1987). Nous avons voulu voir de façon systématique si nous pouvions trouver des conditions permettant d'obtenir une synthèse plus efficace de la cathepsine C de rat après l'injection du transcrite dans l'oocyte. Nous avons modifié la quantité d'ARN injectée ainsi que le temps de marquage métabolique.

Des oocytes ont été microinjectés avec 20 nl d'ARN coiffé extrait au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol. Les différentes concentrations choisies sont de 0.2, 0.4, 1 et 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, les temps de marquage métabolique sont de 45 et 75 heures. Les immunoprécipitations sont réalisées de la même manière que précédemment et les échantillons sont chargés sur un gel SDS-PAGE 15%. Le film placé sur ce gel est révélé après 10 jours. La figure 22a montre les échantillons ayant subi un marquage métabolique de 45 heures, la figure 22b de 75 heures.

On constate la présence dans les oocytes injectés avec de l'ARN d'une concentration de 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, d'une bande de 55 kDa. Elle est déjà présente après 45 heures de marquage métabolique et se retrouve de manière beaucoup plus intense après 75 heures de marquage métabolique. Comme précédemment, la protéine mise en évidence correspond à la procathepsine C glycosylée. Les autres concentrations en ARN et les oocytes non injectés ne donnent pas lieu à des bandes visibles.

La concentration donnant un résultat positif est celle employée par Faust *et al.* (1987) dans une étude similaire sur la cathepsine D. Jusqu'à présent nous avons

utilisé une concentration double de celle-ci. Il est possible que l'injection d'une trop grande quantité d'acides nucléiques soit toxique pour l'oocyte (Colman, 1984).

Quoiqu'il en soit, on peut ici, pour la première fois, mettre en évidence une différence entre les oocytes injectés et les oocytes non injectés. L'oocyte semble donc capable de produire la cathepsine C de rat du moins sous sa forme précurseur glycosylée. L'emploi d'une concentration en ARN inadaptée peut expliquer en partie les faibles résultats des expériences précédentes. Il faut noter qu'il existe une certaine difficulté à estimer correctement la quantité d'ARN injecté, deux paramètres étant d'une précision relative : la concentration de l'ARN estimée par comparaison avec la fluorescence de l'étalon et le volume d'injection sujet à de petites variations dues à l'appareil de microinjection lui-même. Pour déterminer précisément la quantité d'ARN injectée, nous devrions envisager d'effectuer un marquage radioactif du transcrit en incorporant dans celui-ci un ribonucléotide tritié lors de la transcription in vitro.

UTILISATION DE L-METHIONINE [³⁵S] POUR LE MARQUAGE METABOLIQUE :

Jusqu'à présent, nous avons utilisé pour les marquages métaboliques du tran³⁵S-label (contenant 70 % de L-méthionine [³⁵S] et 15 % de L-cystéine [³⁵S]). Plusieurs auteurs évoquent une possible inhibition de la traduction que peut entraîner son emploi, tant chez l'oocyte que dans le lysat de réticulocytes ou l'extrait de germe de blé. Cependant nous l'avons utilisé avec succès pour marquer le produit de la traduction de notre transcrit dans l'extrait de germe de blé. Pour vérifier son influence sur le marquage métabolique des protéines oocytaires, nous avons réalisé de nouvelles microinjections en utilisant de la L-méthionine [³⁵S].

Des oocytes sont injectés avec 20 nl d'ARN coiffé extrait au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol d'une concentration de 0.4 µg/µl (concentration optimale définie dans l'expérience précédente). Des marquages métaboliques de 10 heures et 25 heures sont ensuite réalisés sur des oocytes injectés et non injectés. Des

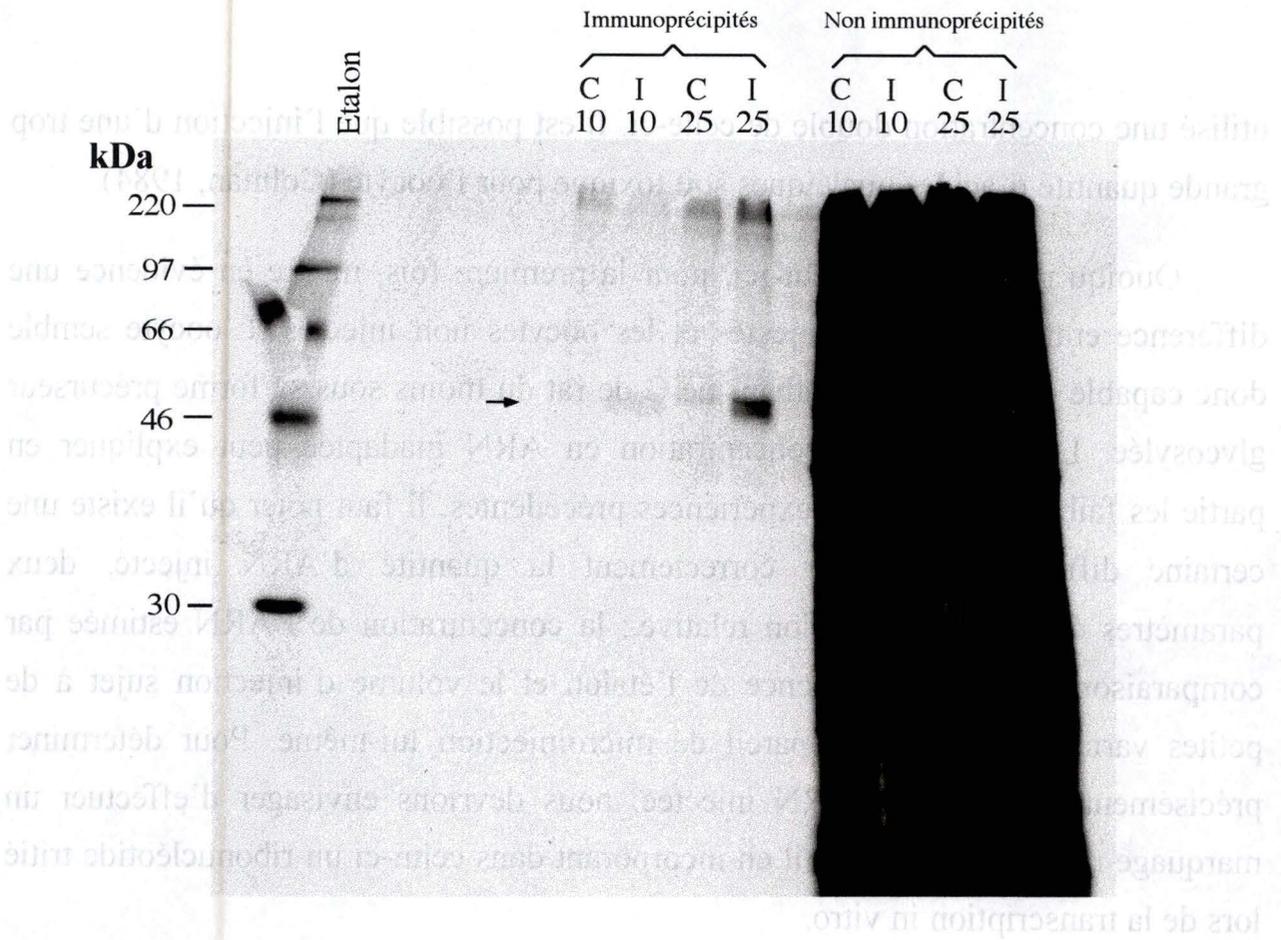


Figure 23. Immunoprécipitation d'oocytes après marquage métabolique à la *L*-méthionine [^{35}S].

Film placé sur un gel SDS-PAGE 15% révélé après 6 jours d'exposition. Sur le gel ont migré les immunoprécipités d'oocytes non injectés (C), d'oocytes injectés avec de l'ARN extrait au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol (I), ayant subi dix (10) ou 25 heures (25) de marquage métabolique avec de la *L*-méthionine [^{35}S], ainsi que les échantillons non immunoprécipités leur correspondant.

échantillons prélevés avant les immunoprécipitations et des échantillons résultant de l'immunoprécipitation sont chargés sur un gel SDS-PAGE 15 %.

Le film de la figure 23 a été révélé après seulement 6 jours d'exposition. Dans les 4 échantillons immunoprécipités, une bande de 55 kDa correspondant à la forme précurseur glycosylée de la cathepsine C de rat apparaît après 10 heures et plus nettement encore après 25 heures de marquage métabolique. L'utilisation de L-méthionine [³⁵S] permet d'augmenter considérablement l'efficacité globale du marquage métabolique. Les échantillons non immunoprécipités montrent que l'incorporation de la radioactivité semble bien meilleure que précédemment et le temps d'exposition du film nécessaire pour l'apparition de bandes dans les échantillons immunoprécipités est beaucoup plus court qu'auparavant. L'efficacité du marquage métabolique est telle qu'elle permet de visualiser ce qui pourrait être la cathepsine C endogène. Cependant, les immunoprécipitations des oocytes injectés mettent en évidence une quantité nettement plus importante de cathepsine C que dans les oocytes non injectés.

Les conditions optimales pour une détection de l'expression de la cathepsine C de rat semblent à présent réunies : concentration en ARN appropriée et marquage radioactif plus efficace. Les microinjections sont capables de provoquer l'expression de la cathepsine C de rat dans les oocytes de Xénope.

Notons toutefois, que malgré l'importance du signal correspondant au précurseur glycosylé, nous ne détectons pas la forme mature de la cathepsine C de rat. L'anticorps utilisé reconnaît pourtant les formes précurseur et mature de celle-ci. Dans les cellules de l'Hépatome 7777 de Morris (Mainferme *et al.*, 1985) ainsi que lors de transfection de cellules Cos-7 à l'aide de l'ADNc codant pour la cathepsine C, la forme mature est bien mise en évidence. Nous ne pouvons exclure que contrairement à ces cellules, l'oocyte ne soit pas capable d'effectuer les différentes étapes conduisant à la maturation de cette protéine. Il est également possible que la

maturation s'effectue avec un rendement trop faible pour permettre une détection par immunoprécipitation de la forme mature. Il est possible que le temps nécessaire pour la maturation soit plus long que ceux utilisés pour nos marquages métaboliques (10 et 25 heures). Notons à titre de comparaison que Faust *et al.* (1987) détectaient la forme mature de la cathepsine D après 20 heures de marquage métabolique mais celle-ci n'était clairement visible qu'après 75 heures.

IX. Traduction dans du lysat d'oocytes :

Le but ultime étant la mise au point d'un système permettant l'étude de la maturation et du ciblage de la cathepsine C, nous avons, en parallèle avec la mise au point des conditions optimales pour l'injection, testé l'utilisation d'un lysat d'oocytes de Xénope pour traduire la cathepsine C transcrite *in vitro*. D'après Matthews (1991), un tel lysat pourrait permettre, en plus de la traduction d'obtenir des modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation et même l'ajout du signal Man-6-P. Nous pourrions, dans le meilleur des cas, imaginer son utilisation pour les expériences futures que nous voulons mener (étude de l'utilisation des sites potentiels de glycosylation dans la cathepsine C de rat et de l'ajout du signal Man-6-P ainsi que du rôle du propeptide dans le ciblage de l'enzyme), bien que d'après la littérature, l'efficacité de l'ajout du signal Man-6-P soit assez faible.

TRADUCTION

Nous avons préparé un lysat à partir d'oocytes de Xénope matures (pondus après injection de hCG). Après son obtention, celui-ci est traité avec différentes concentrations de ribonucléase (0, 0.12, 0.25, 0.5 et 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) afin de détruire les ARN messagers endogènes. Des réactions de traduction *in vitro* de 10 μl sont alors réalisées pour chaque taux de ribonucléase avec 1 μl d'ARN coiffé extrait au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol (ARN identique à celui obtenu dans la

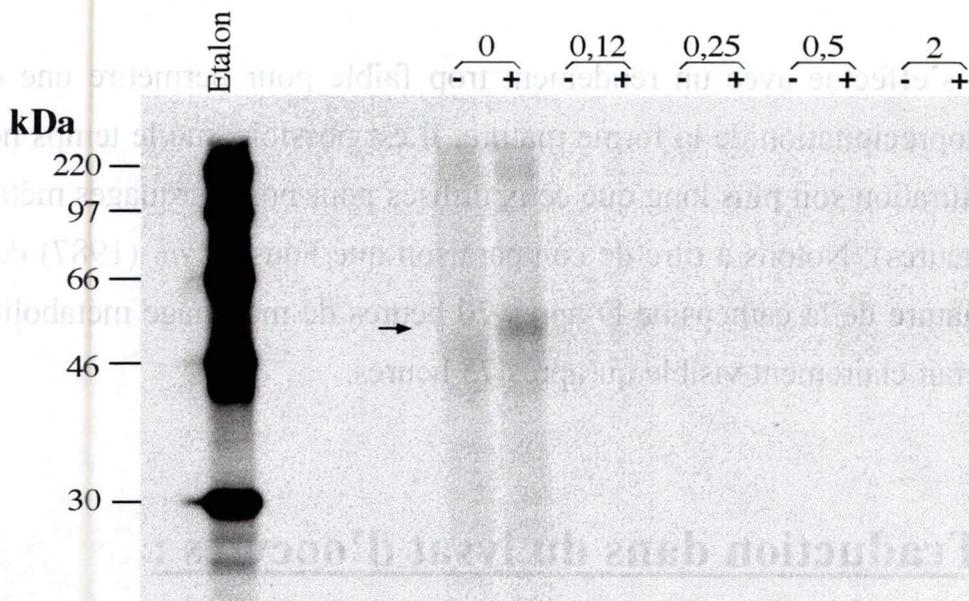


Figure 24. Traduction *in vitro* dans du lysat d'oocytes de *Xénope*.

Film placé sur un gel SDS-PAGE 15% révélé après 48 heures d'exposition. Pour les réactions de traduction qui ont migré sur le gel, 5 lysats traités avec différentes concentrations de ribonucléase (0; 0,12; 0,25 et 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ont été utilisés. Pour chaque lysat, deux réactions de traduction ont été réalisées : l'une en utilisant 0,5 μg d'ARNm coiffé extrait au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol (+), l'autre en utilisant de l'eau à la place de l'ARN(-).

figure 14 et utilisé pour les traductions des figures 15, 16 et les microinjections des figures 21, 22, 23) d'une concentration de 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (concentration optimale pour les microinjections dans les oocytes) ou avec 1 μl d'eau. Les échantillons sont additionnés de Triton X-100 et de PMSF avant d'être chargés sur un gel SDS-PAGE de 15 %.

La figure 24 est un film photographique révélé après 48 heures d'exposition. Une bande de 55 kDa qui pourrait correspondre à la procathepsine C de rat glycosylée est présente dans les échantillons non traités à la ribonucléase. Cette glycosylation serait éventuellement due à la présence (normale dans les conditions de préparation du lysat d'oocytes) de membranes microsomales. Dans les échantillons traités à la ribonucléase, la même bande est faiblement visible. Sa netteté diminue avec le taux de ribonucléase employé. L'efficacité plus faible de ces lysats peut provenir d'un fonctionnement partiel de l'inhibiteur de ribonucléase ajouté après le traitement à l'aide de cette enzyme.

Quoiqu'il en soit, le lysat d'oocytes semble donc capable de traduire de manière efficace notre ARN messenger in vitro. Nous pourrions donc envisager d'utiliser cette approche pour étudier la fixation éventuelle du signal Man-6-P sur la cathepsine C produite de cette façon.

CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR UNE COLONNE PORTEUSE DU RECEPTEUR DE MAN-6-P

Si le lysat d'oocytes est capable d'ajouter sur la protéine produite le signal Man-6-P assez efficacement pour permettre sa détection, nous pourrions utiliser par la suite ce système de traduction pour étudier la phosphorylation des chaînes oligosaccharidiques haut-mannose des différents mutants de la cathepsine C à notre disposition.

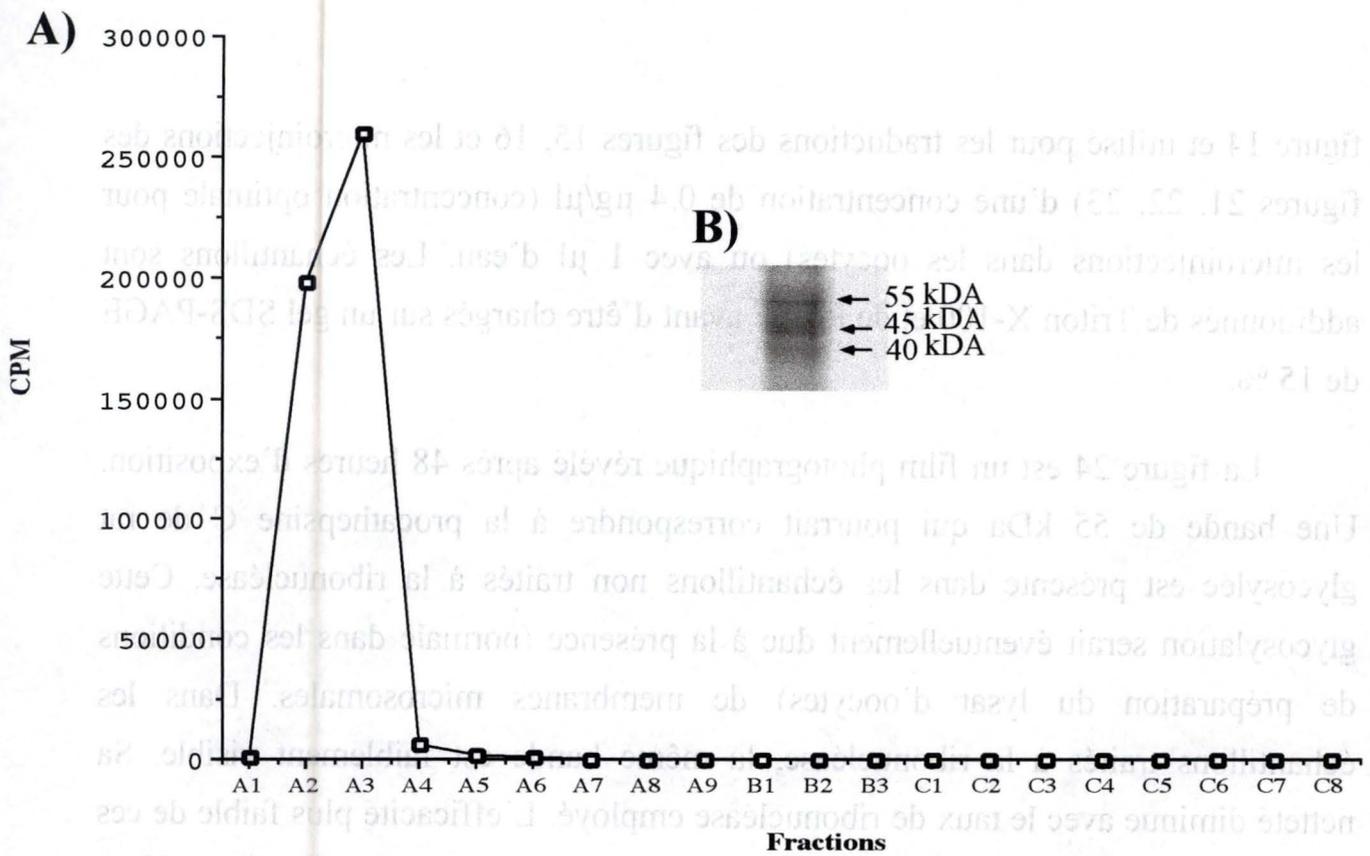


Figure 25. Chromatographie d'affinité (récepteur de Man-6-P).

A) Protéines produites par traduction in vitro dans le lysat d'oocytes.

B) Un comptage de la radioactivité en coups par minute (CPM) est réalisé sur les différentes fractions éluées : A matériel non retenu (élué par le tampon)

B matériel retenu de manière non-spécifique (élué par Glc-6-P)

C matériel retenu de manière spécifique (élué par Man-6-P)

Pour déterminer la possibilité d'une telle utilisation, nous avons voulu tester la présence éventuelle du signal Man-6-P. Une façon de réaliser un tel test consiste à utiliser la chromatographie d'affinité qui permet de retenir sur une colonne couplée à un récepteur de Man-6-P les protéines qui s'y lient. On recueille par élution différentes fractions radioactives : les protéines ne possédant pas le signal Man-6-P ne sont pas retenues sur la colonne et sortent de celle-ci en premier lieu ; on élue ensuite à l'aide de glucose-6-phosphate les protéines qui sont phosphorylées ailleurs que sur le mannose en position 6' ; enfin, les dernières fractions sont recueillies en ajoutant sur la colonne du tampon contenant du mannose-6-phosphate qui entre en compétition avec les protéines possédant ce signal et permet de les détacher. Si le comptage de la radioactivité sur les différents éluats met en évidence une augmentation de celle-ci dans les fractions correspondant aux protéines phosphomannosylées, nous pourrions envisager de réaliser une immunoprécipitation visant à mettre en évidence la cathepsine C.

Une traduction est d'abord réalisée en utilisant le lysat d'oocytes non traité à la ribonucléase. Nous avons ensuite procédé au passage de son produit sur la colonne d'affinité. La figure 25a montre les résultats du comptage de la radioactivité sur les différents éluats. Dans les fractions correspondant au matériel retenu sur la colonne (après élution en présence de mannose-6-phosphate), nous ne constatons pas la présence du pic de radioactivité attendu. Il ne semble pas qu'il y ait de protéines phosphomannosylées dans le produit de la traduction.

Pour vérifier si cette absence de détection du signal Man-6-P ne provenait pas simplement d'une absence de protéines, nous avons effectué un gel SDS-PAGE d'une partie du produit de la traduction. La figure 25b montre qu'on obtient un nombre plus important de bandes que dans la figure 24 du peut-être à une variation de l'efficacité du marquage radioactif des protéines. Quoiqu'il en soit, nous retrouvons la bande de 55 kDa correspondant à la procathépsine C glycosylée. Deux autres bandes sont également visibles : celle de 45 kDa pourrait correspondre à la

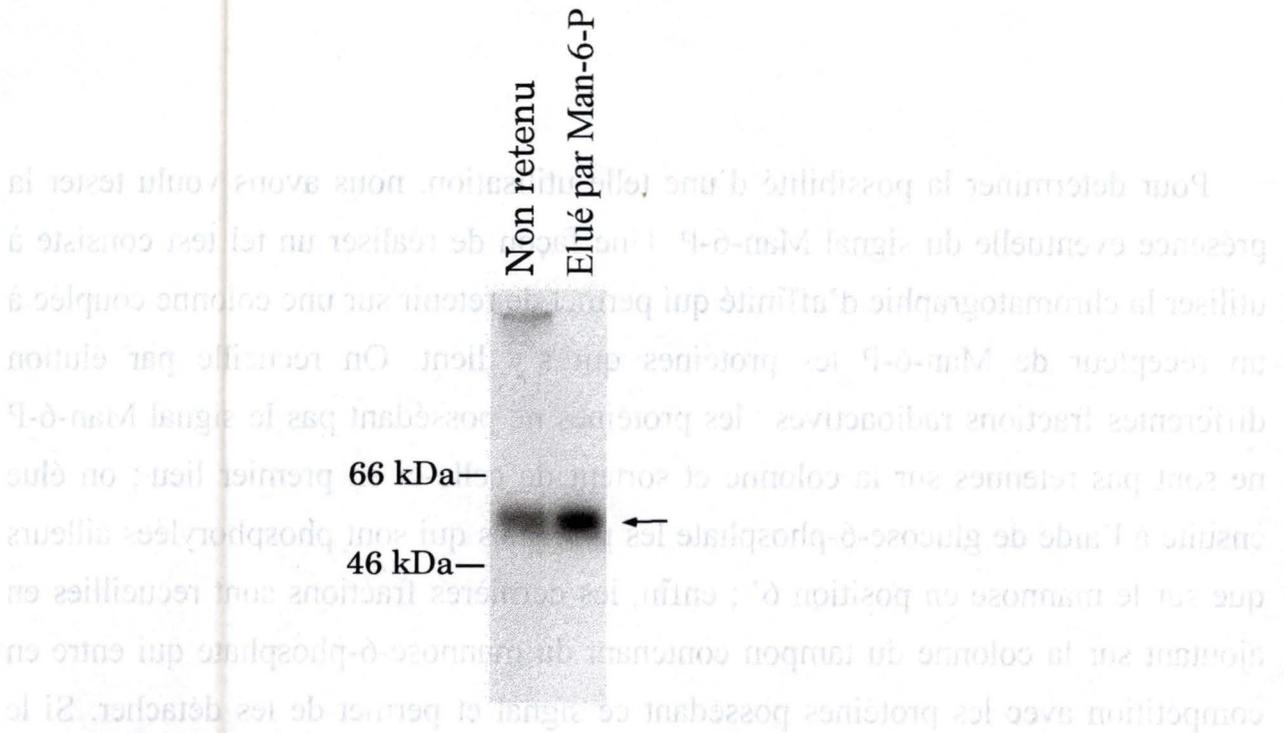


Figure 26. Chromatographie d'affinité (récepteur de Man-6-P) de cellules Cos-7 transfectées par l'ADNc de la cathepsine C.

Immunoprécipitation du matériel retenu et non retenu sur une colonne d'affinité porteuse du récepteur de Man-6-P.

La traduction est d'abord réalisée en utilisant le lysat d'ovocytes non traité à la ribonuclease. Nous avons ensuite procédé au passage de son produit sur la colonne d'affinité. La figure 26a montre les résultats du couplage de la radioactivité sur les différents échant. Dans les fractions correspondant au matériel retenu sur la colonne (après élimination en présence de mannose-6-phosphate) nous ne constatons pas la présence du pic de radioactivité attendu. Il ne semble pas qu'il y ait de protéines phosphomannosylées dans le produit de la traduction.

Pour vérifier si cette absence de détection du signal Man-6-P ne provenait pas simplement d'une absence de protéines, nous avons effectué un gel SDS-PAGE d'une partie du produit de la traduction. La figure 26b montre qu'on obtient un nombre plus important de bandes que dans la figure 24 du fait d'une variation de l'efficacité du marquage radioactif des protéines. Quoiqu'il en soit, nous retrouvons la bande de 55 kDa correspondant à la procathepsine C glycosylée. Deux autres bandes sont également visibles : celle de 45 kDa pourrait correspondre à la

procathepsine C non glycosylée, celle de 40 kDa pourrait indiquer un début de clivage du précurseur de la cathepsine C.

D'autre part, l'efficacité de la colonne d'affinité ne semble pas devoir être mise en cause. En effet, nous avons utilisé celle-ci avec succès pour détecter la phosphorylation de la cathepsine C exprimée par transfection dans les cellules Cos 7 qui ne possèdent pas de cathepsine C endogène. La figure 26 montre le résultat de l'immunoprécipitation du matériel retenu et non retenu sur la colonne. On constate dans la piste représentant les protéines possédant le mannose-6-phosphate et dans celle ne le possédant pas, la présence d'une bande de 55 kDa représentant la procathepsine C de rat glycosylée.

Ces expériences préliminaires nous laissent penser que le lysat d'oocytes ne produit pas de protéines phosphomannosylées en quantité significative.

Le lysat d'oocytes ne peut donc permettre d'étudier la phosphomannosylation de la cathepsine C. Cependant contrairement aux autres systèmes de traduction *in vitro* testés, le lysat d'oocytes est un outil intéressant puisqu'il semble capable d'effectuer efficacement la glycosylation de la cathepsine C. Nous avons donc à notre disposition un système permettant de mener à bien une partie de l'étude de la maturation et du ciblage de la cathepsine C, de manière moins fastidieuse que les microinjections.

Conclusion et perspectives :

La cathepsine C ou dipeptidylaminopeptidase I est une exopeptidase lysosomale soluble et oligomérique dont l'adressage intracellulaire peut s'effectuer de manière dépendante ou indépendante (du moins dans les cellules de l'Hépatome 7777 de Morris) du récepteur de mannose-6-phosphate. Nous avons tenté de mettre au point un nouveau système (alternatif notamment à la transfection de cellules Cos-7) permettant l'étude de son adressage et de sa maturation. Il s'agit d'oocytes de *Xenopus Laevis* qui peuvent permettre la traduction, la maturation et l'adressage de protéines exogènes après microinjection de l'ARN messenger correspondant.

Par immunoprécipitation des protéines présentes dans des homogénats d'oocytes injectés et non injectés, nous avons mis en évidence que les microinjections sont capables de forcer l'expression de la cathepsine C sauvage de rat dans les oocytes de Xénope. La détection de cette expression est maximale lorsque de l'ARN messenger coiffé extrait au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol d'une concentration estimée à 0,4 µg/µl est utilisé ainsi que lorsque le marquage métabolique est effectué à l'aide de L-méthionine [³⁵S]. Dans ces conditions, un film placé sur un gel SDS-PAGE et révélé après 6 jours, sur lequel ont été chargés les immunoprécipités d'oocytes injectés et non injectés ayant subi un marquage métabolique de 25 heures montre clairement une néosynthèse importante de la cathepsine C de rat. La forme moléculaire de la cathepsine C synthétisée par l'oocyte en réponse à la microinjection de l'ARN messenger et détectée par immunoprécipitation correspond à la molécule précurseur (procathepsine C) dans sa forme glycosylée. La procathepsine C présente quatre sites potentiels de glycosylation. La comparaison des formes non glycosylée et glycosylée indique que dans l'oocyte, comme dans des cellules Cos-7 transfectées par l'ADNc codant pour la cathepsine C (Demirov D, Mainferme F., Wattiaux- De

Conninck S., Wattiaux R. and Jadot M., manuscrit en préparation) et dans des cellules de rat exprimant naturellement l'enzyme (Mainferme et al., 1985 ; Burge et al., 1991) les quatre sites potentiels de glycosylation semblent utilisés simultanément. Un article paru pendant la préparation de notre travail indique que dans la cathepsine C humaine, les quatre sites de glycosylation sont également utilisés (Cigic *et al.*, 1998). Si dans les conditions optimales de synthèse de la cathepsine C de rat par l'oocyte, nous pouvons donc observer une première étape de maturation de la protéine, que représente la glycosylation, nous n'avons par contre, pas pu détecter l'apparition de la forme mature de l'enzyme normalement produite par le clivage protéolytique du précurseur. La littérature indique pourtant que l'oocyte est capable de mettre en place un système de transport intracellulaire dépendant du Man-6-P et de conduire de cette façon un précurseur de protéine lysosomale vers les lysosomes (Faust *et al.*, 1987).

Nous n'avons pas pu, par manque de temps, étudier la raison pour laquelle la maturation de la cathepsine C ne se produit pas. La poursuite de ce travail nécessitera certainement de se pencher sur ce problème qui peut avoir plusieurs causes. Citons par exemple, la possibilité que la procathepsine C de rat ne soit pas reconnue par la phosphotransférase de l'oocyte, que l'adoption par la cathepsine C néosynthétisée d'une structure compatible avec son transport hors du réticulum endoplasmique ne se fasse pas ou peu efficacement dans l'oocyte. D'autre part, rappelons que l'oligomérisation de la cathepsine C a lieu d'après la littérature (Muno *et al.*, 1993) avant l'arrivée de l'enzyme dans les lysosomes. Il est donc également possible que l'oocyte ne soit pas capable de mener à bien l'oligomérisation de la protéine du rat avec pour conséquence une dégradation du précurseur avant son arrivée dans le compartiment où devrait avoir lieu les diverses étapes de sa maturation. Il n'est pas exclu non plus, que la stabilité dans les lysosomes d'oocyte de la forme mature de la cathepsine C de rat ne soit pas suffisante pour permettre sa détection.

La prochaine étape à réaliser sera une analyse de la présence éventuelle d'un signal Man-6-P sur le précurseur glycosylé de la cathepsine C de rat produit par

l'oocyte. Cette analyse devra être faite en utilisant un homogénat d'oocytes microinjectés et marqués et en y mesurant la proportion de précurseurs glycosylés retenus spécifiquement par une colonne de chromatographie d'affinité constituée de récepteurs de Man-6-P immobilisés. Les expériences préliminaires que nous avons réalisées devraient nous permettre de mener à bien rapidement ce type d'analyse. Notons enfin, qu'avant de conclure à une absence de maturation de la cathepsine C dans l'oocyte, il sera nécessaire d'approfondir l'étude de sa biosynthèse en réalisant notamment des marquages métaboliques plus longs. Nous pourrions alors envisager une étude semblable de la biosynthèse des différents mutants (de délétion et de glycosylation) de la cathepsine C disponibles au laboratoire.

Dans le cadre de ce travail, nous avons également défini des conditions d'expérimentation optimales pour certaines manipulations qui devront être effectuées en aval ou en amont des microinjections. L'extrait de germe de blé constitue pour l'ARN messager coiffé codant pour la cathepsine C sauvage de rat que nous avons produit, un système de traduction efficace. Celui-ci pourra nous permettre de tester la qualité des ARN messagers que nous produirons à partir des différents mutants de la cathepsine C, avant leur microinjection dans les oocytes de Xénope.

Nous sommes parvenus après l'obtention d'une fraction MLP d'oocytes enrichie en lysosomes, à mettre en évidence par un gradient de densité de saccharose les populations lysosomales des oocytes. Lors des expériences futures d'expression de la cathepsine C tant sauvage que mutée, la réalisation d'un tel gradient devrait permettre de vérifier si la cathepsine C de rat est bien adressée vers les lysosomes.

Par ailleurs, le lysat d'oocytes que nous avons testé est capable de traduire efficacement *in vitro* notre ARN messager. Il semble produire en quantité importante la procathepsine C de rat glycosylée. La chromatographie d'affinité porteuse du récepteur de Man-6-P ne nous a pas permis de détecter sur les protéines produites le signal Man-6-P. Cependant, le lysat d'oocytes de Xénope pourrait constituer un outil

intéressant et moins fastidieux que les microinjections pour une partie de l'étude de la maturation et de l'adressage de la cathepsine C, en particulier en ce qui concerne sa glycosylation.

Bibliographie :

- Bao, M., Booth, J.L., Elmendorf, J. B., and Canfield W.M. (1996). Bovine UDP-N-acetylglucosamine : lysosomale-enzyme-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. *J. Biol.Chem.***271**, 31437-31445.
- Baranski, T.J., Faust, P.L., and Kornfeld, S. (1990). Generation of a lysosomal enzyme targeting signal in the secretory protein pepsinogen. *Cell* **63**, 281-291.
- Baranski, T.J., Koelsch, G., Hartsuck, J.A., and Kornfeld, S. (1991). Mapping and molecular modeling of a recognition domain for lysosomal enzyme targeting. *J. Biol. Chem.* **266**, 23365- 23372.
- Burge, V., Mainferme, F., and Wattiaux, R. (1991). Transient membrane association of the precursors of cathepsin C during their transfer into lysosomes. *Biochem. J.* **275**, 797-800.
- Capony, F., Braulke, T., Rougeot, C., Roux, S., Montcourrier, P., and Rochefort, H. (1994). Specific mannose-6-phosphate receptor-independent sorting of pro-cathepsin D in breast cancer cells. *Experimental Cell Research* **215**, 154-163.
- Cigic, B., Krizal, I., Kralj, B., Turk, V., Pain, R.H. (1998). Stoichiometry and heterogeneity of the pro-region chain in tetrameric human cathepsin C. *Biochim. Biophys. Acta* **1382**, 143-150.
- Colman, A. (1984). Translation of eukaryotic messenger RNA in xenopus oocytes. *Transcription and traduction : a practical approach. IRL Press ; Oxford* 271-302.
- D'Agarosa, R.M., and Callahan, J.W. (1988). In vitro activation of neuraminidase in the β -galactosidase-neuraminidase-protective protein complex by cathepsin C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 770-775.
- Decroly, M., Goldfinger, L., and Six-Tondeur, N. (1979). Biochemical characterization of lysosomes in unfertilized eggs of *Xenopus Laevis*. *Biochem. Biophys. Acta* **587**, 567-578.
- Demirov, D., Mainferme, F., Wattiaux-De Conninck, S., Wattiaux, R., and Jadot, M. In vitro mutagenesis of potential glycosylation sites of Dipeptidyl Aminopeptidase I. *Manuscrit en préparation.*

- Dahms, N.M., Lobel, P., and Kornfeld, S. (1989) Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting. *J. Biol. Chem.* **264**, 12115-12118.
- Diment, S., Leech, M.S., and Stahl, P.D. (1988). Cathepsin D is membrane associated in macrophages endosomes. *J. Biol. Chem.* **263**, 6901-6907.
- Dolenc, I., Turk, B., Pungercic, G., Ritonja, A., and Turk, V. (1995). Oligomeric structure and substrate induced inhibition of human cathepsin C. *J. Biol. Chem.* **270**, 21626-21631.
- Doughty, M.J., and Gruenstein, E.I. (1986). Cell growth and substrate effects on characteristics of a lysosomal enzyme (cathepsin C) in Duchenne muscular dystrophy fibroblasts. *Biochem. Cell Biol.* **65**, 617-625.
- Dumont, J.N. (1972). Oogenesis in *Xenopus Laevis*. *J. Morph.* **136**, 153-180.
- Faust, P.L., Wall, D.A., Perara E., Lingappa, V.R., and Kornfeld, S. (1987). Expression of human cathepsin D in *Xenopus* oocytes : phosphorylation and intracellular targeting. *J. Cell Biol.* **105**, 1937-1945.
- Glickmann, J.N., and Kornfeld, S. (1993). Mannose-6-phosphate-independant targeting of lysosomal enzymes in I-cell disease B lymphoblasts. *J. Cell Biol.* **123**, 99-108.
- Griffiths, G., Hoflack, B., Simons, K., Mellman, I., and Kornfeld, S. (1988). The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* **52**, 329-341.
- Holtzman, E. (1989). Lysosomes. *Cellular organelles- Plenum Press*.
- Jadot, M., Dubois, F., Wattiaux-De Conninck, S., and Wattiaux, R. (1997). Supramolecular assemblies from lysosomal matrix proteins and complex lipids. *Eur. J. Biochem.* **249**, 862-869.
- Kiess, W., Terry, C., Burgess, W.H., Linder, B., Lopaczynski, W., and Nissley, P. (1994). Insulin-like growth factor-II is a substrate for dipeptidylpeptidase I (cathepsin C). *Eur. J. Bioch.* **226**, 179-184.
- Kominami, E., Ishido, K., Muno, D., and Sato, N. (1992). The primary structure and tissue distribution of cathepsin C. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* **373**, 367-373.
- Kornfeld, S., and Mellman, I. (1989). The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **5**, 483-525.
- Kornfeld, S. (1986). Trafficking of lysosomales enzymes in normal and disease states. *J. Clin. Invest.* **77**, 1-6.

- Kummer, J.A., Kamp, A.M., Citarella, F., Horrevoets, A.J.G., and Hack, C.E. (1996). Expression of human recombinant granzyme A zymogen and its activation by the cysteine proteinase cathepsin C. *J. Biol. Chem.* **271**, 9281-9286.
- Lynch, G.W., and Pfueller, S.L. (1988). Thrombin-Independent Activation of platelet factor XIII by endogeneous platelet acid protease. *Thrombosis and Haemostasis* **59**, 372-377.
- McGuire, M.J., Lipsky, P.E., and Thiele, D.L. (1993). Generation of active myeloid and lymphoid granule serine proteases requires processing by the granule thiol protease dipeptidyl peptidase I. *J. Biol. Chem.* **268**, 2458-2467.
- McIntyre, G.F., Godbold, G.D., and Erickson, A. H. (1994). The pH-dependent membrane association of procathepsin L is mediated by a 9-residue sequence within the propeptide. *J. Biol. Chem.* **269**, 567-572.
- Mainferme, F., Wattiaux, R. and von Figura, K. (1985). Synthesis, processing and transport of cathepsin C in Morris hepatoma 7777 cells and rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **153**, 211-216.
- Matten, W.T., and Vande Woude G.F. (1995). Microinjection into *Xenopus* Oocytes. *Methods in enzymology.* **254**, 458-465.
- Muno, D., Ishidoh, K., Ueno, T., and Kominami, E. (1993). Processing and transport of the precursors of cathepsin C during its transfer into lysosomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **306**, 103-110.
- Murakami, M., Karnik, S.S., and Husain A. (1995). Human prochymase activation. *J. biol. Chem.* **270**, 2218-2223.
- Pham, C.T.N., Armstrong, R.J., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Payan, D.G., and Ley, T.J. (1997). Molecular cloning, chromosomal localization, and expression of murine dipeptidyl peptidase I. *J. Biol. Chem.* **272**, 10695-10703.
- Rijnbouts, S., Kal, A.J., Gueuze, H.J., Aerts, H., and Strous, G.J. (1991). Mannose-6-phosphate-independent targeting of cathepsin D to lysosomes in hepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 23586-23592.
- Schenborn, E.T., and Mierendorf, R.C. Jr. (1985). A novel transcription property of SP6 and T7 polymerases : dependence on template structure. *Nucleic Acids Res.* **13**, 6223-6236.
- Soreq, H., and Huez, G. (1985). The synthesis of biologically active proteins in mRNA-microinjected *Xenopus* Oocytes. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **18**, 199-238.
- Turk, B., Turk, V., and Turk., D. (1997). Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol. Chem.* **378**, 141-150.

Wall, D. A., and Meleka, I. (1985). An unusual compartment involved in vitellogenin endocytosis by *Xenopus* oocytes. *J. Cell Biol.* **101**, 1651-1664.

Zhu, Y., and Conner, G.E. (1994). Intermolecular association of lysosomal protein precursors during biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **269**, 3846-3851.