



HAL
open science

Dynamique de l'Onzin au sein de la voie endocytaire : une étude biochimique et morphologique.

Magali Chemali

► **To cite this version:**

Magali Chemali. Dynamique de l'Onzin au sein de la voie endocytaire : une étude biochimique et morphologique.. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT : . tel-00134847

HAL Id: tel-00134847

<https://theses.hal.science/tel-00134847>

Submitted on 5 Mar 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1

U.F.R. de BIOLOGIE

Dissertation présentée en vue de l'obtention du titre de Docteur en Sciences

Spécialité :

Biologie cellulaire et biochimie

Soutenue publiquement

le 19 décembre 2006

**DYNAMIQUE DE L'ONZIN AU SEIN DE
LA VOIE ENDOCYTAIRE :**
une étude biochimique et morphologique

Magali CHEMALI

Directeur de thèse : Jérôme GARIN

Composition du Jury :

M. Rémy SADOUL	Président
Mme Graça RAPOSO M. François LETOURNEUR	Rapporteurs
M. Michel JADOT M. Michel DESJARDINS M. Jérôme GARIN	Examineurs

Thèse préparée au Laboratoire de Chimie des Protéines

Département de Réponse et Dynamique Cellulaires

Commissariat à l'Energie Atomique – Grenoble – France

A ma mère, à mon père,

أحبكما من أعماق قلبي

« Je sais pourquoi tant de gens aiment couper du bois. C'est une activité où l'on voit tout de suite le résultat. »

- Albert Einstein -

Ce travail de doctorat a été principalement réalisé au Département de Réponse et Dynamique Cellulaires du CEA de Grenoble, mais également à l'Université Notre Dame de la paix à Namur. Je remercie donc ces deux établissements pour m'avoir accueillie et ainsi permis de réaliser mon doctorat. Ce travail a été financé par une bourse de l'association « Vaincre les Maladies Lysosomales » (deux années) et par le CEA sur budget d'unité (deux années). Une bourse du ministère des affaires étrangères français, la bourse Lavoisier, a permis de financer mes séjours en Belgique représentant dix-huit mois répartis sur ces quatre années de thèse.

Merci Jérôme (Garin), pour avoir dirigé mon doctorat et m'avoir fait confiance tout au long de ce travail. Outre ton soutien scientifique, ton humanité, ta gentillesse et ton éternel optimisme m'ont bien souvent permis de relever la tête et de recharger mes batteries de motivation.

Merci Michel (Jadot), pour m'avoir accueillie dans ton laboratoire et m'avoir consacré une grande attention durant chacun de mes séjours à Namur. Ton support scientifique a été indispensable à la réalisation de ce travail, mais également à ma construction en tant que scientifique.

Merci également à Graça Raposo, François Letourneur, Rémy Sadoul et Michel Desjardins pour avoir accepté de se pencher aussi sérieusement sur mon travail et de faire partie du jury en charge de mon évaluation ce 19 décembre 2006.

Il me serait trop long de citer toutes les personnes du laboratoire de Chimie des Protéines avec lesquelles j'ai interagi et travaillé pendant ma thèse, alors je remercie simplement l'ensemble des membres du laboratoire pour ce qu'ils m'ont apporté pendant ces quatre années de doctorat et ce qu'ils apportent à cette unité pour en faire un lieu où l'on travaille avec autant de sérieux que de bonne humeur.

En particulier, merci Agnès (Chapel) pour ton soutien, tes manips, toutes les fois où tu as accepté de venir tôt et de partir tard pour m'aider, toutes les choses que j'ai pu te confier les yeux fermés en sachant d'avance qu'elle seraient mieux faites que si je les faisais moi-même, tous tes rires, toutes tes attentions... Ton aide fut pour moi d'un précieux secours.

Merci également au Laboratoire de Chimie Physiologique. J'y ai été merveilleusement bien accueillie et aidée de tous, ce qui m'a permis d'avancer le plus efficacement et le plus agréablement possible dans mon travail. En particulier, merci Isabelle (Hamer), pour tous tes efforts pour mettre à ma disposition les outils et le savoir faire du laboratoire. Nos nombreuses discussions m'ont été d'un grand soutien durant ces nombreux séjours à Namur, soutien scientifique, certes, mais également moral. Merci également Jacqueline (Thirion) pour m'avoir initiée aux joies de la centrifugation ! Merci enfin Mme Wattiaux pour m'avoir si souvent soutenue et efficacement aidée sur la fin de mon travail.

Il me faudrait certainement bien plus que ces quelques lignes pour vous remercier comme je le souhaiterais, M. Wattiaux, pour tout ce que vous m'avez apporté au cours de mon doctorat. Ce fut une grande chance pour moi de croiser votre chemin, de pouvoir bénéficier

de vos si nombreux conseils, votre expérience, votre savoir faire et votre capacité à faire avancer les choses même quand on croit qu'elles ne peuvent plus bouger.

Anne-Emilie (Declèves) ! Un grand merci à toi pour le temps et la patience que tu as consacrés à ce projet en prenant sur le temps que tu devais aussi consacrer au tien. Ton travail de qualité, ta disponibilité et tes compétences en ce domaine qu'est l'immunohistologie ont permis de faire considérablement avancer ce projet.

Cher Jean-Marc (Moulis), je te remercie pour bien des choses... Tu m'as toujours accueillie avec beaucoup de gentillesse dans ton laboratoire, me proposant tout ce dont tu disposais comme savoir faire, outils et contacts pour venir à bout de chacune de mes interrogations. Certes, je n'ai toujours pas compris, à la fin de mon doctorat, le rôle de ces cystéines qui font la « richesse » de l'Onzin, mais je sais qu'elles m'ont permis de travailler bien souvent à tes côtés, ce qui fut pour moi une chance et un grand plaisir.

Je remercie aussi l'Atelier de Transgenèse du DRDC pour la construction de la souris transgénique. Merci également à Isa (Bama) et Irène (Maréchal) pour s'être occupées de mes souris à Grenoble et pour avoir accepté de gérer leur élevage « à distance », lors de mes différents séjours en Belgique. Merci enfin à Coraline (Leirens) pour son aide concernant la gestion de mes souris à Namur.

Merci au Laboratoire Cellules et Tissus pour m'avoir si gentiment accueillie et aidée dans mon travail. En particulier, merci Raphaël (Déom) et Daniel (Van Vlaender) pour le temps que vous m'avez consacré, pour votre bonne humeur perpétuelle et votre précieux savoir faire.

Merci bien sûr à mes parents, mes frères et mes sœurs pour leur soutien pendant les années d'étude qui furent nécessaires à la réalisation de ce doctorat. Votre soutien a toujours été et sera toujours mes principales force et motivation. Et merci mama pour la relecture de ce manuscrit !

Pour terminer, merci « Applied Biosystems »... pour m'avoir permis de rencontrer celui qui m'a soutenue, aidée et accompagnée tout au long de ce doctorat. Car c'est à l'occasion d'une présentation de l'un de vos appareils que ma route a croisé la sienne, pour m'amener, quatre ans plus tard, à réaliser ma plus grande et, « inshaallah », plus belle expérience : celle consistant à mélanger, amplifier, organiser de l'ADN humain pour aboutir, après neuf mois d'incubation, à la formation d'un petit être qui sera à la fois lui, et moi...

Table des matières

CHAPITRE I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
A. ORGANISATION ET TRAFIC DES MEMBRANES DE LA VOIE ENDOCYTAIRE.....	15
1/ L'endocytose : généralités	15
2/ Transport de matériel au sein des endosomes	16
a) Endosome précoce	17
b) Endosome de recyclage	19
c) Corps multivésiculaires – endosomes tardifs.....	21
3/ Transport de matériel des endosomes vers le lysosome	26
B. PROTEOMIQUE ET LYSOSOME.....	31
1/ Introduction	31
2/ Protéomique du lysosome.....	34
a) Protéines solubles de lysosomes tissulaires	36
b) Protéines solubles de lysosomes de lignées cellulaires	38
c) Protéines de la membrane du lysosome	39
C. ANATOMIE DU FOIE	43
1/ Introduction	43
2/ Les différentes cellules du foie	43
a) Les hépatocytes	44
b) Les cellules endothéliales	45
c) Les cellules de Kupffer.....	46
d) Les cellules biliaires	47
e) Les cellules de Ito	47
f) Les « Pit Cells »	47
<i>But du travail</i>	49
CHAPITRE II. TECHNIQUES EXPERIMENTALES.....	55
A. TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT	57
1/ Matériel de départ.....	57
a) Foie de souris	57
b) Cellules péritonéales de souris	57
2/ Fractionnement par centrifugation différentielle.....	58
a) Foie de souris	58
b) Cellules péritonéales	58
c) Présentation des résultats	59
3/ Fractionnement par centrifugation isopycniq... ..	59
a. Conditions de centrifugation	59
b. Présentation des résultats	60
B. MARQUEURS DES COMPARTIMENTS SUBCELLULAIRES.....	60
1/ Dosages enzymatiques	61
2/ Westerns blots	61
C. PREPARATION DE PHAGOSOMES-LATEX.....	63
1/ Administration des billes de Latex	63
a) Souris	63

b) Cellules péritonéales de souris	64
2/ Gradients discontinus de saccharose	64
3/ Analyse par spectrométrie de masse	65
D. ISOLEMENT DES CELLULES DU FOIE	65
1/ Perfusion du foie de souris	65
2/ Séparation des cellules hépatiques par centrifugation différentielle	67
E. PREPARATION D'EXOSOMES DE CELLULES DENDRITIQUES DE SOURIS	67
1/ Culture des DC	67
2/ Purification des exosomes par ultra-centrifugation	67
3/ Analyse protéomique	68
F. TECHNIQUES MORPHOLOGIQUES	68
1/ Immunofluorescence	68
a) Cellules péritonéales	68
b) Phagosomes-Latex	69
c) Fixation et marquage	69
d) Observation	70
2/ Immunohistochimie	70
a) Enrobage en paraffine	70
b) Congélation	70
c) Marquage immunologique	71
G. NORTHERN BLOTS	71
H. MARQUAGE METABOLIQUE DE CELLULES 32D AU PALMITATE TRITIE	72
1/ Marquage métabolique	72
2/ Immunoprécipitation	73
3/ Séparation sur gel et exposition	73
I. CONSTRUCTION DE LA SOURIS TRANSGENIQUE TG-ONZIN.....	74
1/ Construction génétique	74
2/ Construction de la souris TG-Onzin par transgénèse additionnelle	74
3/ Criblage des descendancees	75
 CHAPITRE III. RESULTATS	 77
A. EXPRESSION ET LOCALISATION DE L'ONZIN DANS DIFFERENTS ORGANES MURINS ET HUMAINS	79
1/ Introduction	79
2/ Expression de l'Onzin dans différentes lignées cellulaires et différents tissus humains	80
3/ Distribution de l'Onzin dans différents organes et tissus de souris	83
4/ Distribution de l'Onzin dans différentes cellules de rate de souris	84
5/ Localisation cellulaire de l'Onzin déterminée par des approches morphologiques	84
a) L'intestin grêle	84
b) Le rein	86
c) La rate	86
d) Le thymus	87
e) Le foie	87
6/ Séparation des cellules du foie par perfusion de collagénase	88
7/ Discussion	90
B. DISTRIBUTION DE L'ONZIN APRES FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE DE FOIE DE SOURIS PAR CENTRIFUGATION.....	95
1/ Introduction	95
2/ Distribution de l'Onzin dans les différentes fractions isolées par centrifugation différentielle	96

3/ Distribution de l'Onzin de la fraction mitochondriale totale après centrifugation isopycnique	97
a) <i>Gradients de Percoll</i>	97
b) <i>Gradients de saccharose et de Nycodenz</i>	98
4/ Effet de la digitonine sur l'Onzin des fractions L et P	99
5/ Distribution de l'Onzin des fractions N et P après centrifugation isopycnique	100
6/ Discussion	101
C. EFFET D'UNE INJECTION D'INVERTASE SUR LA VITESSE DE SEDIMENTATION ET LA DENSITE DU COMPARTIMENT AUQUEL L'ONZIN EST ASSOCIEE	107
1/ Introduction	107
2/ Distribution cellulaire de l'invertase capturée par le foie de souris	109
3/ Distribution de l'invertase après centrifugation différentielle	110
a) <i>Injection d'une dose « légère »</i>	110
b) <i>Injection d'une dose « lourde »</i>	111
4/ Distribution de l'invertase après centrifugation isopycnique	112
a) <i>Injection d'une dose « légère »</i>	112
b) <i>Injection d'une dose « lourde »</i>	112
5/ Discussion	113
D. EFFET D'UNE INJECTION DE TRITON WR-1339 SUR L'ONZIN	119
1/ Introduction	119
2/ Effet de l'injection de Triton WR-1339 sur la vitesse de sédimentation de l'Onzin	120
3/ Cinétique de l'effet de l'injection de Triton WR-1339 sur la densité de l'Onzin	121
4/ Effet du Triton WR-1339 sur la liaison de l'Onzin à la membrane	122
a) <i>Nature de la liaison de l'Onzin à la membrane</i>	122
b) <i>Solubilisation de l'Onzin par choc osmotique</i>	123
c) <i>Cinétique de solubilisation de l'Onzin de la fraction tritosomale</i>	124
d) <i>Association physique de l'Onzin à une molécule de faible densité</i>	124
e) <i>Effet in vitro du Triton WR-1339 sur la liaison de l'Onzin à la membrane</i>	126
5/ Discussion	126
E. LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE L'ONZIN DANS LES MACROPHAGES PERITONEAUX DE SOURIS	133
1/ Introduction	133
2/ Distribution de l'Onzin après centrifugation isopycnique	134
3/ Distribution intracellulaire de l'Onzin étudiée par immunofluorescence	135
4/ Discussion	136
F. EFFET DE LA PHAGOCYTOSE DE BILLES DE LATEX SUR DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DE L'ONZIN	141
1/ Introduction	141
2/ Effet de l'injection de billes de latex sur la densité de l'Onzin du foie de souris	142
3/ Effet de la phagocytose de billes de latex sur l'Onzin des macrophages péritonéaux de souris	143
a) <i>Isolement des phagosomes par centrifugation dans un gradient discontinu</i>	143
b) <i>Etude par immunofluorescence</i>	144
4/ Discussion	145
<i>Conclusions générales et perspectives</i>	149
<i>Annexes</i>	159
<i>Références bibliographiques</i>	214

CHAPITRE I. *Introduction*
bibliographique

A. ORGANISATION ET TRAFIC DES MEMBRANES DE LA VOIE ENDOCYTAIRE.

1/ L'endocytose : généralités

Une cellule est une entité biologique séparée du milieu extracellulaire par une barrière dynamique, la membrane plasmique, qui coordonne l'entrée et la sortie des molécules permettant la « communication » entre la cellule et son environnement.

Les molécules empruntent, pour pénétrer dans l'espace intracellulaire, des voies différentes en fonction de leur nature physicochimique. Si les molécules lipophiles sont capables de franchir la membrane plasmique par simple diffusion passive, la situation est plus complexe pour les ions, les molécules polaires, les macromolécules, ou les particules, pour lesquelles la bicouche lipidique dont est formée la membrane plasmique constitue un obstacle infranchissable. Ces molécules vont parvenir à pénétrer dans l'espace intracellulaire, aidées par des protéines insérées dans la membrane plasmique : les canaux ou les transporteurs.

Les macromolécules, quant à elles, peuvent pénétrer à l'intérieur de la cellule dans des vésicules dérivées de la membrane plasmique, résultant de la projection ou de l'invagination d'une partie de cette membrane par un processus appelé « endocytose » (de Duve et al. 1963). L'endocytose se produit par différents mécanismes répartis en deux catégories distinctes : la phagocytose, ou « cell eating » et la pinocytose, ou « cell drinking » (figure 1).

La phagocytose est un phénomène hautement régulé, restreint à des cellules spécialisées, comme les macrophages, les cellules dendritiques ou les neutrophiles. Elle concerne l'endocytose de molécules de grande taille, incluant les pathogènes (bactéries ou levures), les cellules mortes ou les globules rouges en fin de vie. La phagocytose fait intervenir des récepteurs spécifiques situés à la surface des phagocytes, qui reconnaissent des molécules localisées sur les particules à ingérer, comme certains sucres de la paroi bactérienne, ou des phospholipides présents

spécifiquement sur le feuillet externe de la membrane plasmique des cellules apoptotiques. La liaison du récepteur phagocytaire à son ligand déclenche la polymérisation de l'actine au niveau de la membrane en contact avec le pathogène, aboutissant à la projection de pseudopodes autour de la particule à ingérer et son internalisation dans le phagosome ainsi formé (Greenberg et al. 1990).

La pinocytose, ou capture par phase fluide, est un processus constitutif se déroulant à la surface de la plupart des cellules, grâce auquel celles-ci capturent un petit volume du milieu extracellulaire et son contenu (Conner and Schmid 2003). Le taux d'internalisation de solutés présents dans le milieu extracellulaire est directement proportionnel à leur concentration et au volume capturé par la cellule. L'efficacité de l'endocytose de molécules est augmentée par l'adsorption préalable de la molécule à la surface cellulaire. On parlera alors de « pinocytose adsorptive », optimale lorsqu'elle se produit *via* des récepteurs spécifiques.

La nature de la molécule cargo et de son récepteur déterminera la voie pinocytaire que va emprunter la molécule internalisée : macropinocytose, endocytose par formation d'un puits de clathrine ou de cavéoline, ou enfin endocytose indépendante de ces deux molécules (figure 1).

2/ Transport de matériel au sein des endosomes

De nombreux travaux ont été consacrés ces trente dernières années à l'étude du chemin intracellulaire suivi par des molécules endocytées. Ces travaux ont permis d'identifier, sur des critères morphologiques et fonctionnels, quatre entités différentes au sein de la voie endocytaire : les endosomes précoces, les vésicules de recyclage, les corps multivésiculaires/endosomes tardifs et les lysosomes (figure 2). Ces compartiments ne peuvent plus être considérés aujourd'hui comme des réservoirs passifs par lesquels transitent les molécules endocytées, mais plutôt comme des plateformes capables de se remodeler activement afin de remplir leurs fonctions dans le processus endocytaire. Cette partie sera consacrée à la description de ces remodelages au sein des endosomes.

a) Endosome précoce

Les endosomes précoces sont définis comme les premières structures intracellulaires atteintes par un marqueur endocyté (Helenius et al. 1983). L'étude du cas particulier de l'endocytose de certains récepteurs de la membrane plasmique, souvent après liaison à leur ligand, a notamment permis de mettre en évidence le tri qui s'opère au sein de l'endosome précoce. En effet, des molécules internalisées dans un même endosome peuvent avoir des destins totalement différents, les unes étant recyclées vers la membrane plasmique, alors que d'autres sont acheminées vers le lysosome pour y être dégradées (Maxfield et al. 1978 ; Pastan and Willingham 1983).

Le recyclage d'un récepteur de la membrane plasmique permet à une même protéine de capturer, de manière itérative, plusieurs molécules de ligand. L'existence de ce mécanisme a été suspectée suite à l'observation que l'endocytose de LDL peut se poursuivre pendant une longue période en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique, sans que les récepteurs ne disparaissent de la membrane cellulaire (Brown et al. 1983). Le recyclage d'un récepteur suppose l'existence d'un compartiment au sein duquel le récepteur a pu se séparer physiquement de son ligand. Cette séparation se produit sous l'effet d'un pH légèrement acide (6-6,2), comme le montrent différents travaux (Tycko and Maxfield 1982, van Renswoude et al. 1982). Elle est donc possible au sein de l'endosome précoce. En effet, Schmid et collaborateurs (Schmid et al. 1989) ont montré que le pH régnant au sein de l'endosome précoce des fibroblastes de Hamster (CHO) était proche de 6 – 6,2. Pour démontrer cela, ils ont utilisé comme sonde interne de pH des virus enveloppés dont les glycoprotéines de surface subissent des changements irréversibles à des pH définis, les rendant résistants à la trypsine. Ils ont montré que les virus sensibles à pH inférieur ou égal à 6,2 résistent à la trypsine cinq minutes après leur internalisation, ce temps correspondant à leur acheminement dans l'endosome précoce (Schmid et al. 1988). Les travaux de Gagescu et collaborateurs (Gagescu et al. 2000) ont abouti à des valeurs de pH légèrement inférieures à celles proposées par leurs prédécesseurs (pH 5,6 – 6). Pour cela, ils ont suivi, dans les cellules épithéliales de rein de chien (MDCK), la cinétique d'internalisation de la transferrine couplée à une sonde fluorescente sensible au pH (le

FITC). Ils ont montré que cette protéine transite par un compartiment à pH 5,6 – 6 immédiatement après son internalisation.

Il semblerait que la morphologie des endosomes précoces soit favorable à la ségrégation de molécules dans différentes régions. Comme le montrent les travaux de Geuze et collaborateurs (Geuze et al. 1983), on observe très vite après la séparation du récepteur et de son ligand la ségrégation de ces deux molécules dans des régions morphologiquement différentes de l'endosome précoce. Ces auteurs montrent, par microscopie électronique, que le récepteur destiné à être recyclé est localisé dans les extensions tubulaires de l'endosome, alors que le ligand, qui doit être acheminé plus loin dans la voie endocytaire, est ségrégué dans la lumière de ce compartiment (appelé CURL : compartiment de découplage du complexe récepteur / ligand).

Tous les récepteurs endocytés ne suivent pas le même devenir que le récepteur au LDL que nous avons cité. Certains récepteurs sont adressés à la voie de dégradation lysosomale, avec leur ligand. C'est notamment le cas du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGF), qui ne réapparaît pas à la membrane plasmique après son internalisation (Beguinot et al. 1984, Dunn et al. 1986). Il serait tentant de penser que des signaux d'adressage à la voie de dégradation, ou à la voie de recyclage, sont présents dans une partie de la séquence protéique des récepteurs. Ces signaux pourraient être « lus » par l'endosome précoce ou par des protéines cytoplasmiques qui se concentreraient à sa membrane, ce qui permettrait de décider du destin des récepteurs endocytés. En accord avec ce modèle, des motifs d'adressage à la voie de dégradation ont été mis en évidence par différents groupes sur plusieurs récepteurs. Dans le cas que nous avons évoqué précédemment, ce sont les résidus Leu⁶⁷⁹ et Leu⁶⁸⁰ qui sont responsables de l'acheminement du récepteur à l'EGF vers le lysosome (Kil and Carlin 2000). Par ailleurs, l'étude de la régulation négative du récepteur CD4 par la protéine Nef des lentivirus de primates a permis de mieux comprendre comment la cellule peut moduler l'endocytose, puis la dégradation d'une molécule de surface. En effet, la protéine Nef se lie à la queue cytosolique du récepteur CD4 et provoque son internalisation grâce à un motif di-leucine reconnu par la protéine adaptatrice AP-2 (Foti et al. 1997). Enfin, un motif di-acide également

contenu dans la séquence de Nef entraîne sa liaison à la β -COP, puis son adressage au lysosome où la protéine sera dégradée, de même que le récepteur auquel elle s'est liée (Piguet et al. 1999). Aussi, l'adressage des récepteurs membranaires à la voie de dégradation est un processus régulé, dépendant de motifs spécifiques présents dans la séquence protéique de ces récepteurs.

Cependant, ces motifs d'adressage à la voie lysosomale ne se ressemblent guère, ce qui est à l'encontre de l'hypothèse de l'existence d'une séquence consensus commune à l'ensemble des récepteurs destinés à être dégradés après internalisation. Par ailleurs, l'acheminement vers la voie de dégradation peut être déterminé par une modification post-traductionnelle du récepteur concerné : la fixation d'une molécule d'ubiquitine (mono-ubiquitination) sur sa queue cytoplasmique (pour revue, voir (Hicke and Dunn 2003)).

Quel est alors l'élément qui permet de décider du destin des récepteurs internalisés, après leur passage dans l'endosome précoce ? Il a été proposé par Gruenberg (Gruenberg 2001) que les radeaux lipidiques (rafts) puissent participer activement au tri des molécules au sein de l'endosome précoce. En effet, ces régions riches en cholestérol et en sphingomyeline, jouent le rôle de « plateformes d'internalisation » au niveau de la membrane plasmique et du réseau *trans*-golgien (Ikonen 2001). Même si les liens entre les rafts et l'endocytose ne sont pas encore clairement établis, il semblerait que les tris des protéines et des lipides soient intimement liés au niveau des membranes endosomales précoces (Gruenberg 2001). Ceci est conforté par la mise en évidence de rafts dans la membrane des endosomes de recyclage de fibroblastes de Hamster (Chinese Hamster-Ovary, CHO) et de cellules épithéliales de rein de chien (Madin-Darby canine kidney, MDCK) (Mayor et al. 1998, Gagescu et al. 2000).

b) Endosome de recyclage

La ségrégation des récepteurs dans les tubules émanant de l'endosome précoce laisse à penser que les endosomes de recyclage, qui permettent notamment l'acheminement des récepteurs recyclés vers la membrane plasmique, proviennent de

ces tubules. Yamashiro et collaborateurs (1984) ont étudié, morphologiquement et biochimiquement, le devenir intracellulaire du récepteur à la transferrine après son internalisation. La transferrine est la protéine principale du transport de fer dans l'organisme des mammifères. Après son endocytose, elle réapparaît intacte à la surface cellulaire, fixée à son récepteur, après avoir déversé le fer qu'elle contenait à l'intérieur de la cellule. La liaison du fer à la transferrine est très sensible au pH, contrairement à la fixation de la transferrine à son récepteur (Dautry-Varsat et al. 1983). Le groupe de Maxfield (Yamashiro et al. 1984) a montré que la transferrin, qui échappe à la voie de dégradation après son internalisation, est présente dans des structures tubulaires morphologiquement proches des saccules de Golgi. Cependant, les travaux de microscopie électronique montrent que ces tubules contenant les récepteurs recyclés et les saccules de Golgi sont physiquement séparés (Griffiths et al. 1988).

Bien que les endosomes de recyclage puissent fusionner directement avec la membrane plasmique, certains d'entre eux s'accumulent dans une région périnucléaire proche du centre organisateur des microtubules (MTOC) (Hopkins 1983). Ces vésicules périnucléaires représentent un stock intracellulaire de récepteurs recyclés, comme le montrent les travaux de Van der Sluijs et collaborateurs (van der Sluijs et al. 1992). Ces auteurs ont montré que jusqu'à 75 % des récepteurs à transferrine se trouvent à l'intérieur de la cellule, dans des vésicules proches du MTOC. On peut se demander quel est l'intérêt pour la cellule de faire transiter les récepteurs en cours de recyclage vers le MTOC avant de les acheminer à la membrane plasmique. Il semblerait que ce transit soit utile à certains types cellulaires, comme les cellules polarisées. En effet, l'accumulation d'endosomes de recyclage dans les environs du MTOC pourrait permettre à la cellule d'envoyer plus efficacement le matériel recyclé vers différentes régions de la membrane plasmique (Hughson and Hopkins 1990, Knight et al. 1995).

Parallèlement à ces études montrant que les endosomes de recyclage sont intimement liés aux microtubules, différents travaux montrent que le recyclage de certains récepteurs reste effectif en présence d'agents perturbateurs des microtubules

(Gruenberg et al. 1989, Jin and Snider 1993). Pour concilier ces résultats, il serait tentant de penser que le recyclage des récepteurs se produit *via* deux chemins intracellulaires différents, par exemple directement à partir des endosomes précoces, ou en passant d'abord par les endosomes de recyclage (Gruenberg 2001). Cette hypothèse est appuyée par le fait que certains récepteurs réapparaissent rapidement à la membrane plasmique après leur internalisation alors que d'autres restent dans des compartiments internes de la cellule pour des périodes bien plus longues (Sheff et al. 1999).

c) Corps multivésiculaires – endosomes tardifs

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'endosome précoce est un centre de tri où les récepteurs endocytés destinés à être recyclés vers la membrane plasmique sont séparés des protéines devant cheminer plus profondément dans la voie endocytaire pour être dégradées dans le lysosome. Les protéines membranaires destinées à la dégradation sont incorporées dans des vésicules internes au sein de cet endosome précoce (Gruenberg and Maxfield 1995) par invagination d'une partie de la membrane de cet organite. La région membranaire où se produisent ces invaginations forme alors, par bourgeonnement, une vésicule qui va progressivement se détacher de l'endosome précoce pour devenir un corps multivésiculaire physiquement indépendant.

Les travaux de Mayran et collaborateurs (Mayran et al. 2003) montrent le rôle fondamental de l'annexin II dans la formation du corps multivésiculaire. En effet, lorsque l'expression de cette protéine est réprimée par des ARN interférentiels, le corps multivésiculaire se forme au niveau de l'endosome précoce mais ne peut s'en détacher pour devenir physiquement autonome. Cependant, la répression de l'annexin II n'a pas d'effet sur la formation des vésicules internes du corps multivésiculaire, ce qui suggère l'intervention d'autres molécules dans ce mécanisme.

Pour former une vésicule interne, la membrane de l'endosome se déforme localement, s'invagine et se referme au niveau des deux coudes formés par

l'invagination, libérant ainsi la vésicule dans la lumière de l'endosome (van Deurs et al. 1993). Les déformations nécessaires à cette invagination sont favorisées par la présence d'un lipide particulier, en forme de cône inversé, au sein de la membrane du corps multivésiculaire, le phospholipide lysobisphosphatidique acide (LBPA). Kobayashi et collaborateurs montrent, en utilisant un anticorps monoclonal produit contre les membranes d'endosomes de cellules de Hamster (Baby Hamster Kidney), que ce lipide est fortement enrichi au niveau des vésicules internes du corps multivésiculaire (Kobayashi et al. 1998). Les travaux *in vitro* de Matsuo et collaborateurs ont permis de confirmer l'importance du rôle joué par le LBPA dans la formation des vésicules internes (Matsuo et al. 2004). Ces auteurs ont préparé des liposomes de composition en phospholipide proche de celle des endosomes tardifs, en incluant ou pas le LBPA. Ils ont montré que seuls les liposomes contenant ce phospholipide particulier étaient capables de former spontanément des vésicules internes.

De nombreux travaux soulignent le rôle important du phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns(3)P), un dérivé phosphorylé d'un phospholipide membranaire, dans la formation des vésicules internes du corps multivésiculaire (Gillooly et al. 2000). Le rôle du PtdIns(3)P est notamment démontré par l'inhibition de la PtdIns(3)P kinase qui empêche, dans les cellules de mammifères, la formation des vésicules internes (Fernandez-Borja et al. 1999, Futter et al. 2001). Ce phosphatidylinositol, enrichi dans les membranes endosomales, recrute des protéines cytoplasmiques qui présentent des domaines FYVE (Fab1, YOtB, Vac1, EEA1 ; pour revue voir Odorizzi et al. 2000) ou PX (homologues à la protéine Phox ; pour revue voir Sato et al. 2001). Dans leur travaux, Petiot et collaborateurs (Petiot et al. 2003) étudient le rôle du PtdIns(3)P sur le transport du récepteur à hormone de croissance le long de la voie endocytaire, suite à son internalisation. Ils montrent que le peptide constitué d'un tandem de séquences FYVE, qui se lie très spécifiquement au PtdIns(3)P, inhibe le tri du récepteur dans le corps multivésiculaire, mais non son transport des endosomes précoces vers les endosomes tardifs.

Or, comme nous le disions précédemment, de nombreux travaux ont montré que le récepteur à l'EGF était dégradé après son internalisation. Ceci suggère que les vésicules internes formées par intervention du PtdIns(3)P puissent être destinées à la voie de dégradation lysosomale. Le LBPA, quant à lui, est résistant à la dégradation (Brotherus et al. 1974). Par conséquent, il a été suggéré que la population de vésicules internes des corps multivésiculaires soit subdivisée en deux groupes distincts : les vésicules contenant le PtdIns(3)P, destinées à être dégradées et celles contenant le LBPA, qui pourraient être retenues comme réservoir de cholestérol et, probablement, d'autres composés membranaires (Katzmann et al. 2002).

L'internalisation de protéines dans les vésicules lumineales du corps multivésiculaire est un mécanisme finement régulé. En effet, toutes les protéines de la membrane de l'endosome ne sont pas destinées à être dégradées. Ceci implique l'existence de signaux permettant au corps multivésiculaire de repérer les protéines devant être internalisées en vue de les acheminer vers le lysosome et celles à exclure de ce processus d'internalisation, qui pourront par exemple être délivrées à la membrane limitante du lysosome (Roberts et al. 1989). Ceci peut être illustré par l'exemple de la régulation du récepteur à l'EGF, endocyté après liaison à son ligand. Ce récepteur est alors normalement internalisé dans les vésicules internes du corps multivésiculaire et envoyé vers la voie de dégradation lysosomale. Cependant, les travaux de Felder et collaborateurs (Felder et al. 1990) montrent qu'une mutation ponctuelle dans le domaine de phosphorylation de ce récepteur empêche son adressage aux vésicules internes du corps multivésiculaire : la totalité du récepteur endocyté est associé à la membrane périphérique de l'endosome. Ces travaux montrent ainsi que les protéines parvenant aux corps multivésiculaires peuvent renfermer des « informations » décodées par cet organite ou par des protéines cytosoliques concentrées au niveau de sa membrane périphérique, informations qui sont nécessaires à l'adressage vers les compartiments de destination.

La vacuole de levure est l'équivalent des endosomes/lysosomes des cellules de mammifères. L'invagination de la membrane externe de la vacuole aboutit à la formation de vésicules internes dans la lumière vacuolaire. Ces vésicules sont

dégradées par les enzymes luminales, qui sont activées par le produit du gène *pep4* (Davis et al. 1993). Les vacuoles des mutants du gène *pep4* accumulent dans des vésicules internes les protéines membranaires normalement destinées à être dégradées, acquérant ainsi les caractéristiques morphologiques du corps multivésiculaire des cellules de mammifères (Odorizzi et al. 1998). De nombreux travaux portant sur la régulation négative des protéines membranaires de levures et de mammifères ont permis de proposer l'implication des mécanismes d'ubiquitination dans l'adressage des protéines vers la voie de dégradation (Bonifacino and Weissman 1998). Cependant, le concept d'utilisation par la cellule de l'ubiquitine comme signal d'endocytose à la membrane plasmique a longtemps dominé sur l'idée de l'intervention de ce mécanisme dans le tri au niveau de l'endosome (Strous and Govers 1999). Ce n'est que récemment que le rôle de l'ubiquitination dans l'association de certaines protéines membranaires aux vésicules internes de la vacuole a pu être démontré expérimentalement (Katzmann et al. 2001, Urbanowski and Piper 2001).

Comme la plupart des motifs d'adressage des protéines vers un compartiment intracellulaire, l'ubiquitine est reconnue par des composants de la machinerie de transport. La machinerie qui permet, par reconnaissance de l'ubiquitine, l'association des protéines de la membrane du corps multivésiculaire aux vésicules internes est appelée « ESCRT-I, II et III » (Endosomal Sorting Complex Required for Transport I, II and III) (pour revue, voir Katzmann et al. 2002). Les études génétiques et biochimiques de la levure ont permis de démontrer que les complexes protéiques ESCRTs sont recrutés de façon séquentielle à la membrane de la vacuole. En effet, ESCRT-II agit en aval d'ESCRT-I, puisque la surexpression d'ESCRT-II peut partiellement compenser la perte de fonction d'ESCRT-I et non l'inverse (Babst et al. 2002). Le complexe ESCRT-III est recruté à la membrane après le complexe ESCRT-II, puisque son assemblage à la membrane de la vacuole est dépendant d'ESCRT-II (Babst et al. 2002). Bien que les modes d'action des protéines ESCRTs ne sont pas encore totalement élucidés, la mise en évidence d'interactions directes entre ESCRT-I, ESCRT-II et l'ubiquitine suggère que ces deux complexes sont impliqués dans la reconnaissance et la concentration des protéines ubiquitinées au niveau des

invaginations de la membrane du corps multivésiculaire (Katzmann et al. 2001, Katzmann et al. 2002). Le complexe ESCRT-III, qui est constitué de petites protéines « coiled-coil » fortement chargées, pourrait être plus directement impliqué dans l'invagination de la membrane endosomale où sont concentrées les protéines ubiquitinées (Gruenberg and Stenmark 2004).

Quel est le devenir des vésicules internes du corps multivésiculaire ? Nous avons insisté sur le rôle de ces vésicules dans l'adressage des protéines endocytées vers le lysosome, c'est-à-dire dans le compartiment terminal de la voie de dégradation. Cependant, dans certains types de cellules, ces vésicules peuvent être déversées dans le milieu extracellulaire par fusion du corps multivésiculaire avec la membrane plasmique (figure 3). Ce mécanisme a été mis en évidence au début des années 80, par des travaux de microscopie électronique sur des réticulocytes en culture (Harding et al. 1983, Pan et al. 1985). Ces petites vésicules (50 nm de diamètre) ont ensuite été purifiées par centrifugation et appelées « exosomes » (Johnstone et al. 1987). Les exosomes sont généralement produits par les cellules d'origine hématopoïétique comme les lymphocytes T et B, les mastocytes et les cellules dendritiques (Raposo et al. 1996, Thery et al. 2002), mais également par les cellules épithéliales intestinales. Ils renferment de nombreuses protéines provenant de la membrane plasmique, du cytoplasme et de membranes de la voie endocytaire. 80% de ces protéines sont communes à l'Homme et à la souris. La fonction physiologique de ces vésicules exocytées n'a pas encore été élucidée, bien que de nombreux travaux aient montré leur rôle dans la stimulation de la réponse immune, *in vitro* (Hsu et al. 2003) et *in vivo* (Thery et al. 2002). Thery et collaborateurs ont proposé que les cellules puissent utiliser les exosomes pour « communiquer ». En effet, le rapprochement physique de différentes protéines membranaires au sein d'une même vésicule pourrait permettre de stimuler simultanément plusieurs récepteurs localisés sur la membrane plasmique des cellules rencontrées par l'exosome au cours de sa circulation (Thery et al. 2002). Par ailleurs, la capture des exosomes, par fusion avec la membrane plasmique de la cellule cible ou par endocytose, pourrait permettre des échanges de membranes entre différentes cellules de l'organisme. Cependant, le mécanisme exact d'interaction entre

les exosomes et leurs éventuelles cellules cibles n'a pas encore été élucidé (pour revue voir Fevrier and Raposo 2004).

3/ Transport de matériel des endosomes vers le lysosome

Les lysosomes sont généralement définis comme des vésicules d'environ 0,5 µm de diamètre, denses aux électrons, représentant le compartiment terminal de la voie endocytaire et contenant de nombreuses enzymes hydrolytiques fonctionnant de manière optimale à pH acide (Holtzmann 1989 ; Helienus et al. 1983). Ils se distinguent biochimiquement des endosomes par leur densité élevée (Storrie 1988) et l'absence de récepteurs au mannose-6-phosphate (Griffiths et al. 1988) et de récepteurs en cours de recyclage.

Dans les cellules de mammifères, les organites interagissent à différents niveaux de la voie endocytaire. Ces interactions aboutissent notamment à des échanges de matériel entre les endosomes précoces (Gruenberg et al. 1989), entre les endosomes tardifs (Aniento et al. 1993), entre les lysosomes (Storrie and Desjardins 1996, Bakker et al. 1997) et entre les endosomes tardifs et les lysosomes (Mullock et al. 1998).

Le transfert de matériel entre l'endosome tardif et le lysosome est une étape essentielle à la dégradation, par les hydrolases acides, du matériel endocyté. Quatre hypothèses ont été proposées pour expliquer ce transfert de matériel (figure 4).

La première hypothèse propose que l'endosome tardif devienne un lysosome par un phénomène de maturation, c'est-à-dire par dégradation d'une partie de sa membrane périphérique, condensation de son matériel luminal et exclusion du récepteur au mannose-6-phosphate (Roederer et al. 1990, Murphy 1991). Les tenants de cette hypothèse s'appuient notamment sur des expériences montrant que la densité des endosomes peut, dans certaines conditions, augmenter considérablement, s'approchant ainsi de celle des lysosomes. Cependant, les travaux de Mullock et collaborateurs (Mullock et al. 1994) montrent que si la densité des endosomes

augmente lorsqu'ils sont incubés en présence de cytosol et d'ATP, elle n'augmente pas suffisamment pour pouvoir assimiler ces endosomes « modifiés » à des lysosomes.

La deuxième hypothèse est basée sur l'existence de vésicules de transfert faisant la navette entre l'endosome tardif et le lysosome. Cette hypothèse est notamment soutenue par les travaux de Vida et Gerhardt montrant que l'incubation de la pré-vacuole de levures ayant endocyté la carboxypeptidase Y radiomarquée, en présence de cytosol et d'ATP, aboutit à la formation de vésicules contenant la protéine endocytée (Vida and Gerhardt 1999). Ces vésicules, capables de fusionner avec des membranes « réceptrices », sont assimilées par ces auteurs à des intermédiaires fonctionnels entre la pré-vacuole, correspondant à l'endosome des mammifères et la vacuole, c'est-à-dire les lysosomes. Cependant, ces auteurs n'ont pas cherché à connaître la nature exacte des vésicules émanant de la pré-vacuole, qui peuvent également être considérées comme les équivalents des endosomes mûres et non comme des vésicules de transfert.

Par des essais *in vitro* de fusion entre différentes vésicules de la voie endocytaire et par une étude morphologique, Gruenberg et collaborateurs (Gruenberg et al. 1989) ont identifié des vésicules transportant le matériel endocyté entre les endosomes précoces et les lysosomes. Ces vésicules sont capables de fusionner entre elles, avec le lysosome, mais pas avec l'endosome précoce duquel elles se sont détachées. Cependant, ces auteurs n'ont pas déterminé la nature des vésicules qu'ils décrivent dans ce travail. Les travaux que l'un d'entre eux publiera quelques années plus tard permettront d'assimiler ces vésicules à des corps multivésiculaires, situés en position intermédiaire entre les endosomes précoces et les lysosomes (pour revue, voir Gruenberg 2001).

La troisième hypothèse propose que les transferts de matériel entre les endosomes tardifs et les lysosomes se produisent par des phénomènes transitoires répétés de fusion-fission, le « kiss and run ». Storrie et Desjardins ont proposé cette hypothèse pour expliquer leurs expériences montrant que les marqueurs

endosomaux/phagosomaux de petite taille étaient transférés plus rapidement que les marqueurs de grande taille, dans les lysosomes (Storrie and Desjardins 1996).

La quatrième hypothèse implique la fusion complète de l'endosome tardif et du lysosome, formant transitoirement un « organite hybride », suivi de la reformation d'un nouveau lysosome par fission. Cette hypothèse, qui peut être considérée comme une extension de l'hypothèse du « kiss and run » (certains « kisses » pouvant aboutir à une fusion totale), a été proposée par Griffiths (1996). Il a construit sa théorie autour de l'observation morphologique du lysosome qui apparaît comme une petite structure dense aux électrons en microscopie électronique. Griffiths a proposé que le lysosome, jouant le rôle de compartiment de stockage des enzymes hydrolytiques, puisse fusionner de façon répétitive et régulée avec l'endosome tardif pour former « l'estomac de la cellule », où la dégradation du matériel se produit.

Cette hypothèse de l'organite hybride a été appuyée par de nombreuses expériences réalisées par le groupe de Luzio (pour revue, voir Luzio et al. 2005). Mullock et collaborateurs montrent notamment, dans un système *in vitro* basé sur l'utilisation de composés issus de foie de rat, l'apparition d'un organite de densité intermédiaire entre l'endosome et le lysosome (Mullock et al. 1998). Cet organite contient les marqueurs des endosomes tardifs (l'asialofetucine endocytée et le récepteur au mannose-6-phosphate) et des lysosomes (cathepsine L) ; il est moins dense aux électrons que le lysosome classique et a un diamètre supérieur à celui des endosomes tardifs et des lysosomes. Il a été appelé « organite hybride » par ces auteurs et assimilé à « l'estomac de la cellule » décrit par Griffiths.

Ce modèle est également celui que soutiennent Helenius et Mellman. Cependant, ceux-ci ne distinguent pas l'endosome tardif de l'organite hybride. En effet, ils considèrent l'endosome tardif comme la « phase active » de la vie du lysosome, c'est-à-dire le compartiment riche en hydrolases acides dans lequel parviennent les molécules endocytées. Au fur et à mesure de la dégradation et de la condensation du matériel, l'endosome tardif devient un lysosome. Le lysosome est donc défini, comme dans le modèle de Luzio, comme l'organite d'accumulation du matériel non digéré, inactif d'un point de vue hydrolytique du fait de l'absence de substrat (Mellman 1996). Le cycle dynamique entre l'endosome tardif et le lysosome

est bouclé lorsque le lysosome fusionne avec l'endosome tardif, lui apportant les enzymes nécessaires à la dégradation du matériel qui lui est parvenu.

Dans de récents travaux, Bright et collaborateurs (Bright et al. 2005) montrent, en suivant en cellules vivantes le devenir de molécules fluorescentes endocytées, que la réalité biologique peut être un mélange de certaines hypothèses proposées à partir de modèles statiques (cellules fixées). En effet, ces auteurs aboutissent à la conclusion que 32% des échanges de matériel entre les endosomes tardifs et les lysosomes se produisent par des phénomènes de fusion-fission (hypothèse de l'organite hybride), alors que le reste des transferts se produit par des phénomènes de « kiss and run ». Selon leur étude, seuls les organites en contact physique sont capables d'échanger du matériel, ce qui invalide l'hypothèse de l'existence de vésicules de transfert entre les endosomes et les lysosomes. Par ailleurs, la technique utilisée permet de visualiser le passage de fluorochromes de l'endosome au lysosome, à travers un tubule émanant du lysosome, avant que ces deux compartiments ne fusionnent complètement.

B. PROTEOMIQUE ET LYSOSOME

1/ Introduction

Une cellule eucaryote est constituée d'une mosaïque d'unités fonctionnelles physiquement isolées par des membranes biologiques, les organites intracellulaires. Ces organites renferment de nombreuses molécules « résidentes », mais aussi un certain nombre de molécules qui interagissent de façon transitoire avec les différents compartiments intracellulaires. La compréhension du fonctionnement de chacun de ces organites, donc de la physiologie globale de la cellule, passe par l'identification et la caractérisation de ces molécules ségréguées au sein des compartiments. Le développement des technologies de protéomique à haut débit a abouti à la multiplication des analyses systématiques des protéomes des différents organites intracellulaires. Ces travaux ont grandement participé à l'augmentation des connaissances de la fonction et de la dynamique de ces compartiments (Brunet et al. 2003, Yates et al. 2005).

Le développement de ces technologies de pointe a été rendu possible grâce aux progrès spectaculaires réalisés dans le domaine de l'instrumentation et au séquençage du génome de différentes espèces, comme l'Homme (Venter et al. 2001), la souris (Waterston et al. 2002) et le rat (Gibbs et al. 2004). Les protéines sont désormais identifiées beaucoup plus rapidement, sans passer par leur séquençage systématique, par établissement d'une corrélation entre les mesures spectrométriques des peptides générés par digestion des protéines et les informations de séquence contenues dans les banques de données (pour revue, voir Aebersold and Mann 2003, Tyers and Mann 2003).

L'analyse par spectrométrie de masse du protéome d'un organite intracellulaire est réalisée en trois étapes principales (pour revue, voir Andersen and Mann 2006).

a. Isolement des organites à partir d'un homogénat d'organe ou de cellules isolées (figure 5).

La stratégie la plus couramment utilisée consiste à séparer les organites présents dans l'homogénat par des méthodes de centrifugation. Cette stratégie présente notamment l'avantage de permettre l'isolement de grandes quantités de matériel, parfois indispensables à certaines analyses par spectrométrie de masse. Les étapes de centrifugation, permettant la séparation des compartiments en fonction de leur taille et de leur densité, peuvent être remplacées ou suivies d'une étape d'immunopurification. Pour ce faire, la fraction contenant les organites à purifier est mise en contact avec des anticorps dirigés contre des protéines spécifiques de l'organite, les anticorps étant généralement fixés sur des billes ou sur une matrice de colonne de chromatographie.

Les compartiments de la voie endocyttaire peuvent également être isolés grâce à des molécules ou des particules internalisées par la cellule. Par exemple, si la molécule endocytée est fluorescente, l'organite dans lequel elle aboutit (endosome ou lysosome en fonction du temps d'internalisation) pourra être isolé par cytométrie en flux (Bananis et al. 2004). Si la particule endocytée est de nature métallique, les compartiments de la voie endocyttaire pourront être isolés par tri magnétique. Enfin, si la densité de la particule internalisée est très différente de celle de l'ensemble des organites intracellulaires, le compartiment dans lequel elle aboutit peut être isolé par gradient de densité. C'est en particulier cette dernière approche qu'a utilisée le groupe de Desjardins pour isoler des quantités importantes de phagosomes de cellules J774, après phagocytose de billes de latex (Garin et al. 2001).

b. Séparation des protéines de l'organite.

Avant l'analyse par spectrométrie de masse, les protéines contenues dans l'échantillon isolé peuvent être séparées par électrophorèse mono ou bi-dimensionnelle. Lors de l'électrophorèse mono-dimensionnelle, les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire, après avoir été solubilisées par le détergent ionique SDS (Sodium DodécylSulfate). Après migration, le gel est découpé

en plusieurs bandes et les protéines qu'elles contiennent sont extraites et analysées séparément par spectrométrie de masse.

Lors d'une analyse bi-dimensionnelle, les protéines sont séparées, en première dimension, en fonction de leur point isoélectrique et, en deuxième dimension, en fonction de leur masse moléculaire (Klose and Kobalz 1995). Les protéines sont ensuite isolées sous forme de « spots », puis identifiées par séquençage d'Edman ou par spectrométrie de masse. L'inconvénient majeur de la séparation bi-dimensionnelle vient du fait que cette technique est peu compatible avec l'analyse des protéines membranaires (Luche et al. 2003).

Il est également possible de réaliser une analyse protéomique en faisant abstraction de toute étape de séparation des protéines par électrophorèse. L'ensemble des protéines d'un échantillon est alors digéré par la trypsine. Le mélange complexe de peptides ainsi obtenus est séparé par chromatographie liquide avant d'être analysé par spectrométrie de masse (McCormack et al. 1997, Aebersold and Mann 2003).

c. Identification des protéines.

Dans les années 1960, Edman met au point le premier procédé d'identification d'une protéine sur la base de sa séquence en acides aminés (Edman and Begg 1967). Il faut attendre la fin des années 90 et le développement d'outils de spectrométrie de masse adaptés à l'analyse des peptides pour pouvoir identifier de façon fiable les protéines présentes en faibles quantités (quelques femtomoles) dans des échantillons biologiques plus ou moins complexes.

La méthode analytique de choix (figure 6) consiste à coupler chromatographie liquide à faible débit (nanoLC) et spectrométrie de masse en mode tandem (MS/MS) (pour revue détaillée et comparaison des différentes analyses possibles par spectrométrie de masse, voir Domon and Aebersold 2006). Cette étape chromatographique permet à la fois de concentrer les peptides présents dans l'échantillon et de répartir dans le temps leur passage dans le spectromètre de masse. L'analyse des peptides est réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse de type Quadrupole-ToF utilisé en mode tandem (MS/MS). Concrètement, le rapport masse

sur charge de chaque peptide élué de la colonne de chromatographie est déterminé au niveau d'un premier analyseur ; le peptide est ensuite sélectionné afin d'être fragmenté par collision avant une seconde analyse MS. Les fragmentations étant générées au niveau des liaisons peptidiques, elles permettent la détermination complète ou partielle de la séquence en acides aminés du peptide par mesure d'écart de masse entre les pics. Plus récemment, des logiciels ont été développés afin d'identifier les protéines présentes dans l'échantillon biologique de départ en comparant les spectres MS/MS expérimentaux produits par le spectromètre de masse avec les spectres MS/MS théoriques qui peuvent être déduits des séquences des peptides tryptiques présents dans les banques de données protéiques.

Comme nous le disions précédemment, l'identification, par spectrométrie de masse, des protéines contenues dans les différents compartiments intracellulaires, a permis de comprendre la dynamique et la fonction de ces compartiments. Par exemple, l'étude menée sur le phagosome par Garin et collaborateurs a permis d'identifier 140 protéines de ce compartiment des cellules J774, dont plusieurs étaient classiquement associées au réticulum endoplasmique (Garin et al. 2001). La découverte surprenante d'une telle concentration en protéines de ce compartiment a permis à l'équipe de Desjardins de proposer, un an plus tard, un modèle expliquant la formation de la membrane du phagosome *via* le recrutement du réticulum endoplasmique à la surface cellulaire, où il fusionne directement avec la membrane plasmique au niveau du bol phagocytaire (Gagnon et al. 2002). Par ailleurs, la découverte, dans la membrane du phagosome, de protéines du réticulum endoplasmique participant à la présentation antigénique sur les molécules CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I, a permis d'expliquer les mécanismes de présentation croisée des peptides antigéniques (Houde et al. 2003, Jutras and Desjardins 2005).

2/ Protéomique du lysosome

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le lysosome est un organe intracellulaire représentant le compartiment terminal de la voie endocytaire, où se

produit la dégradation de différentes macromolécules. Ces processus dégradatifs sont assurés par une cinquantaine d'enzymes hydrolytiques solubles localisées en grande majorité dans le lumen de l'organite. Les substrats de ces enzymes leur parviennent par endocytose, phagocytose, ou autophagie. Le rôle clé des lysosomes dans le métabolisme cellulaire est notamment souligné par l'existence d'une quarantaine de maladies héréditaires, dites « lysosomales », affectant le catabolisme de lipides neutres, de phospholipides ou de glycolipides. Ces maladies, dont les origines moléculaires ne sont pas toujours parfaitement connues, se traduisent généralement par une accumulation de matériel non dégradé dans le lysosome (pour revue, voir Meikle et al. 1999).

La majeure partie des maladies lysosomales est attribuable à un défaut affectant les enzymes solubles. Ces protéines sont adressées au lysosome grâce à l'acquisition d'un sucre mannose-6-phosphate dans le réseau trans-Golgien (von Figura and Hasilik 1986). La fixation de ce sucre permet en effet la reconnaissance des enzymes lysosomales nouvellement synthétisées par deux types de récepteurs membranaires au mannose-6-phosphate (MPR), l'un étant dépendant, l'autre indépendant, de cations. Ces récepteurs lient les enzymes phosphorylées dans l'environnement neutre du réseau trans-Golgien, puis se déplacent vers un compartiment prélysosomal acide où la dissociation des récepteurs et de leurs ligands a lieu.

Une quantité non négligeable de maladies impliquant le lysosome sont dues à un défaut associé aux protéines présentes dans la membrane de l'organite, protéines pour lesquelles nous ne disposons que de maigres informations en comparaison aux données relatives aux protéines solubles du même compartiment. En effet, seules quelques pathologies comme la maladie de Danon affectant la protéine LAMP2 (Nishino et al. 2000), la maladie de Neimann-Pick C affectant NPC1 (Carstea et al. 1997), la cystinose pour laquelle la protéine cystinosin est défectueuse (Town et al. 1998) et la maladie de Salla affectant la sialin (Verheijen et al. 1999), ont à ce jour été attribuées à un défaut dans une protéine membranaire du lysosome.

Par ailleurs, il est classiquement admis aujourd'hui que le lysosome est impliqué dans un certain nombre de maladies ne se caractérisant pas par une accumulation de matériel non dégradé, comme la maladie d'Alzheimer (Pasternak et al. 2003), des maladies autoimmunes et la résistance à diverses maladies infectieuses. Le rôle joué par le lysosome dans ces pathologies est mal défini du fait de la méconnaissance des protéines de la membrane de cet organite, ou des protéines cytosoliques qui lui sont associées.

De nombreux travaux visant à mieux connaître le répertoire des protéines solubles et membranaires du lysosome se sont multipliés dans la littérature ces dernières années. Nous décrirons certains de ces travaux dans la partie qui suit.

a) Protéines solubles de lysosomes tissulaires

La purification des protéines solubles lysosomales est grandement facilitée par la présence du résidu mannose-6-phosphate. En effet, il est possible d'utiliser une forme soluble du récepteur spécifique de ce sucre (récepteur de boeuf au mannose-6-phosphate, indépendant des cations, CI-MPR) pour capturer les protéines mannose-6-phosphate présentes dans un échantillon (Hoflack et al. 1987). Cependant, dans la plupart des tissus, ce sucre est rapidement enlevé, par un mécanisme encore non élucidé, une fois que l'enzyme a atteint le compartiment lysosomal (Einstein and Gabel 1991, Steinberg et al. 1994). L'application d'une telle méthode de purification par affinité n'est donc applicable que dans certains cas particuliers, pour lesquels le mannose-6-phosphate est encore fixé aux enzymes lysosomales. C'est notamment le cas des hydrolases acides du cerveau, qui conservent leur « étiquette » mannose-6-phosphate jusque dans le lysosome (Jadot et al. 1999). Aussi, le groupe de Peter Lobel a appliqué au cerveau de rat et au cerveau humain (Sleat et al. 1996, Sleat et al. 1997b) la méthode mise au point quelques années auparavant par Hoflack et collaborateurs (Hoflack et al. 1987). En piégeant les protéines mannose-6-phosphate contenues dans le cerveau de rat, puis en les analysant par séquençage N-terminal, leurs travaux ont permis de confirmer l'abondance des protéines mannose-6-phosphate dans ce tissu et d'identifier la Palmitoyl-Protein-Thioesterase (PPT),

impliquée dans la maladie lysosomale « céroïde-lipofuscinose neuronale infantile », comme protéine potentiellement lysosomale (Sleat et al. 1996). Dans leurs travaux sur le cerveau humain, ce même groupe a comparé en gel bi-dimensionnel le protéome mannose-6-phosphate du cerveau d'un patient atteint de la maladie « céroïde-lipofuscinose neuronale infantile » à celui d'un individu sain (Sleat et al. 1997b). Cette maladie se caractérise par l'accumulation de matériel autofluorescent au niveau de corps intra-cytoplasmiques dans différentes cellules de l'organisme, en particulier dans les neurones. En montrant que la protéine encodée par le gène CLN2 est absente de l'échantillon de protéines mannose-6-phosphate issues du cerveau du malade et en complétant ce travail par une analyse du gène codant pour cette protéine chez le patient et chez l'individu sain, Sleat et collaborateurs proposent que cette protéine soit à l'origine de la céroïde-lipofuscinose neuronale tardive. Cette hypothèse a par la suite été confirmée par d'autres groupes de recherche (Rawlings and Barrett 1999, Vines and Warburton 1999).

Plus récemment, l'équipe de Lobel a procédé à la complétion du protéome mannose-6-phosphate de cerveau humain grâce à l'utilisation de technologies de type « haut débit » (Sleat et al. 2005). Cette étude a permis l'identification de 54 protéines potentiellement associées au lysosome, dont neuf n'avaient jamais été identifiées auparavant.

Les travaux que nous venons de détailler ont donc représenté les premières grandes analyses du protéome soluble du lysosome de cerveau. Nous avons vu comment ces analyses, menant à la découverte de nouvelles protéines, ont pu participer à l'augmentation des connaissances du lysosome et des maladies qui l'affectent. Par ailleurs, l'étude du protéome lysosomal soluble du cerveau est d'autant plus justifié que cet organe est généralement le plus affecté par les différentes maladies lysosomales. Cependant, la connaissance de ce compartiment, d'un point de vue fondamental, doit également passer par l'étude de son protéome soluble dans des organes autres que le cerveau. En effet, comme le soulignent Sleat et collaborateurs dans leur dernier article publié sur le protéome lysosomal soluble du cerveau (Sleat et al. 2005), « l'analyse complète du glycoprotéome issu de différentes sources

(tissulaires ou cellulaires) est nécessaire à la constitution d'un catalogue des protéines lysosomales (solubles) ». Nous avons vu que la purification des protéines solubles des lysosomes du cerveau est grandement facilitée du fait de la conservation de l'étiquette mannose-6-phosphate sur les protéines issues de cette organe, même dans le lysosome (Jadot et al. 1999). Cependant, le cerveau n'est pas l'unique source potentielle d'hydrolases lysosomales phosphorylées. En effet, ces protéines sont également présentes dans l'urine et le plasma sanguin. Comme le proposent Sleat et collaborateurs (Sleat et al. 1997a), les hydrolases lysosomales mannose-6-phosphate de l'urine proviennent probablement de l'épithélium longeant certains tubules rénaux. Ce groupe a purifié ces protéines à partir d'urine humaine, par chromatographie d'affinité, comme ils l'avaient précédemment fait à partir de cerveau. Le séquençage N-terminal de ces protéines a permis de montrer l'abondance, jusque là insoupçonnée, de l'alpha-glucosidase et la N-acétylglucosamine-6-sulfatase dans cet échantillon.

Différents travaux ont montré qu'une partie des protéines lysosomales nouvellement synthétisées par des lignées cellulaires, bien que possédant un sucre mannose-6-phosphate, échappent à l'adressage au lysosome et sont sécrétées dans le milieu (Ludwig et al. 1994, Kasper et al. 1996). Un mécanisme similaire pourrait être à l'origine de la présence de protéines mannose-6-phosphate dans le plasma sanguin, comme le proposent Sleat et collaborateurs (Sleat et al. 2006). Ce groupe a isolé les protéines mannosylées du sérum humain par chromatographie d'affinité sur MPR immobilisé, puis a identifié ces protéines par LC-MS/MS. Leurs travaux ont notamment permis la découverte de neuf nouvelles protéines potentiellement lysosomales. Par ailleurs, cette étude constitue une première tentative d'utilisation des outils protéomiques pour le diagnostic de maladies lysosomales à partir de sérum.

b) Protéines solubles de lysosomes de lignées cellulaires

Dans l'ensemble des cellules de l'organisme, les protéines lysosomales solubles nouvellement synthétisées conservent leur étiquette mannose-6-phosphate dans les compartiments pré-lysosomaux. Un des moyens d'obtention d'une quantité suffisante de protéines phosphorylées consiste à provoquer l'accumulation de ces

protéines mannose-6-phosphate en les empêchant d'atteindre le lysosome, où elles seraient immédiatement dé-phosphorylées. C'est ce qu'ont réalisé Journet et collaborateurs à partir de lignées cellulaires monocytaires ou de cancer du sein (Journet et al. 2000, Journet et al. 2002). Pour cela, ce groupe a provoqué la sécrétion, dans le milieu de culture, des protéines lysosomales nouvellement synthétisées, par incubation pendant 24 h dans un milieu contenant du NH_4Cl . Cette substance est dite, comme la chloroquine, lysomotropique (base faible). Elle traverse, sous sa forme non chargée, les membranes biologiques et s'accumule dans les endosomes, perturbant leur acidification. Les protéines mannose-6-phosphate nouvellement synthétisées sont alors détournées de leur adressage au lysosome et sont sécrétées. Elles sont alors purifiées par chromatographie d'affinité et séparées par gel bi-dimensionnel. L'analyse par spectrométrie de masse des différents spots a mené à l'identification de 22 protéines, dont six de localisation inconnue.

c) Protéines de la membrane du lysosome

Contrairement aux protéines solubles, les protéines de la membrane du lysosome ne possèdent pas d'étiquettes particulières qui auraient pu permettre de les isoler à partir d'un homogénat cellulaire, par chromatographie d'affinité. Elles sont adressées au lysosome grâce à des motifs spécifiques inclus dans la séquence de leur queue cytoplasmique (pour revue, voir Bonifacino and Traub 2003). Aussi, la purification des protéines membranaires du lysosome passe nécessairement par l'isolement du granule dans sa totalité, dans des conditions qui permettent de conserver son intégrité. En effet, les lysosomes intacts peuvent être isolés des autres compartiments intracellulaires sur la base de leurs propriétés physiques ou biochimiques.

Les organites intracellulaires sont chargés négativement à pH physiologique, leur charge globale dépendant notamment de la composition de leur membrane. Cette propriété physique a permis d'envisager la séparation des différents compartiments intracellulaires d'une fraction complexe, par électrophorèse (Davenport 1964). Les travaux de Hannig, dans lesquels il décrit le premier appareil d'électrophorèse en

phase fluide, ont permis d'adapter cette technique à la préparation d'une quantité importante d'organites intracellulaires (Hannig 1964). Les travaux de Stahn et collaborateurs montrent qu'il est ainsi possible d'obtenir une fraction enrichie en lysosomes d'un facteur 40 à 240 fois (selon l'enzyme lysosomale mesurée), à partir d'un homogénat de foie de rat, en combinant des techniques de centrifugation et d'électrophorèse en phase fluide (Stahn et al. 1970). Cependant, ce taux élevé d'enrichissement est atteint au détriment du rendement qui, lui, est relativement faible (4 %). Par ailleurs, le coût élevé et la complexité de l'équipement d'électrophorèse en phase fluide limitent son utilisation dans les laboratoires et incitent les chercheurs à avoir plutôt recours à des techniques de centrifugation, moins coûteuses et plus aisées, pour isoler les compartiments intracellulaires.

Les techniques de centrifugation permettent de séparer les organites, à partir d'un homogénat cellulaire, sur la base de leur taille et de leur densité. Les travaux du groupe de Christian de Duve ont notamment porté sur l'utilisation de ces techniques pour étudier les lysosomes de foie de rat (De Duve et al. 1955, Beaufay et al. 1959, Baudhuin et al. 1965). Pour obtenir un taux de purification satisfaisant des lysosomes par le biais de la centrifugation, il est indispensable d'exploiter l'ensemble des propriétés biochimiques qui permettent de distinguer ces organites des autres compartiments intracellulaires. En effet, la séparation des différents organites d'une fraction complexe dépend grandement du milieu et des conditions de centrifugation utilisées. Par exemple, comme le montrent les travaux de Wattiaux et collaborateurs (1978), si les lysosomes et les peroxysomes d'une fraction « mitochondriale totale » se superposent après centrifugation isopycnique dans un gradient continu de saccharose, ces organites sont mieux séparés dans un gradient continu de metrizamide ou de Nycodenz. Cependant, cette séparation n'est pas suffisante pour obtenir une préparation de lysosomes avec un taux d'enrichissement satisfaisant. Ces auteurs ont montré qu'en utilisant un gradient discontinu de metrizamide et en chargeant la fraction mitochondriale légère au fond du gradient, il était possible de séparer les lysosomes des mitochondries et d'obtenir des lysosomes avec un taux de purification très élevé (66 à 80 fois) et un rendement satisfaisant (10 à 12 %). Cette méthode a été utilisée par les groupes de Michel Jadot (FUNDP, Namur, Belgique) et Jérôme Garin

(CEA, Grenoble, France) pour purifier des lysosomes de foie de rat, avant de procéder à l'identification, par spectrométrie de masse, des protéines membranaires de ce compartiment (Boonen et al. 2006 ; Boussac 2001).

Une autre méthode pour purifier les lysosomes consiste à modifier spécifiquement la densité de ces organites par injection de Triton WR-1339, *in vivo*, à l'animal. Comme le décrivent les travaux de Wattiaux et collaborateurs (Wattiaux et al. 1963), ce détergent non-ionique est endocyté par les cellules du foie, s'accumule dans le lysosome, en même temps qu'une quantité considérable de différents lipides. L'accumulation de ces molécules non dégradées dans le lysosome provoque une augmentation de la taille de cet organite, ainsi que la diminution drastique de sa densité. En gradient de saccharose, cela se traduit par le déplacement des lysosomes devenus des « tritosomes » vers le sommet du gradient, loin des mitochondries, peroxyosomes et membranes plasmiques. Cette méthode a été appliquée par Trouet et collaborateurs afin d'obtenir une fraction de tritosomes enrichis 30 fois par rapport à l'homogénat, avec un rendement de l'ordre de 20 % (Trouet 1964). Cette technique présente l'avantage de provoquer la modification de la densité de l'ensemble des lysosomes du foie et ainsi d'éviter de ne sélectionner, au cours des étapes de purification, qu'une sous population de lysosomes. C'est aussi la technique qu'ont choisie Bagshaw et collaborateurs pour purifier des lysosomes de foie de rat dans le but d'étudier, par spectrométrie de masse, la composition protéique de leur membrane (Bagshaw et al. 2005). Leurs travaux ont permis d'identifier 215 protéines, dont seule une partie avait déjà été décrite comme associée au lysosome. Les autres protéines identifiées au cours de cette étude sont originaires du réticulum endoplasmique, du Golgi et de la membrane plasmique ou sont de nouvelles protéines dont la localisation subcellulaire demeure à ce jour inconnue. L'inconvénient majeur de la méthode de purification des lysosomes de foie par injection de Triton WR-1339 est qu'il mène à l'obtention d'organites « anormaux », car modifiés par le détergent. En effet, même si de nombreux travaux ont montré que ces organites conservent leur activité enzymatique (Leighton et al. 1968, Burnside and Schneider 1982, Pasternak et al. 2003) ainsi que leurs propriétés de fusion avec le phagosome (Wattiaux et al. 1996),

nous ne pouvons totalement exclure que la composition de la membrane du lysosome puisse être affectée par le traitement au Triton WR-1339.

C. ANATOMIE DU FOIE

1/ Introduction

Le foie est un organe plein situé dans la cavité abdominale. C'est le plus gros des organes chez de nombreux mammifères, comme l'Homme, la souris et le rat. Il est entouré d'une capsule conjonctive (capsule de Glisson) qui s'invagine dans le parenchyme hépatique permettant la formation de plusieurs lobes.

C'est la vascularisation du foie qui détermine l'organisation générale de l'organe. Le foie reçoit deux systèmes vasculaires afférents :

- **La veine porte** qui draine le sang veineux riche en nutriments, provenant de la cavité abdominale. Cette veine pénètre dans le foie par le hile et se ramifie pour former les branches de la veine porte qui sont situées dans les espaces portes.
- **L'artère hépatique**, branche du tronc coeliaque, pénètre par le hile hépatique et se ramifie pour donner naissance aux branches de l'artère hépatique situées elles aussi dans les espaces portes. Elle apporte le sang riche en oxygène nécessaire au fonctionnement de l'organe.

Aussi, les espaces portes sont constitués de l'ensemble des vaisseaux afférents du foie. Le sang provenant de ces systèmes circule ensuite dans les capillaires sinusoides, limités par les travées d'hépatocytes qui ont une disposition radiaire et convergent vers la veine centrolobulaire. Cette veine conduit aux veines sus-hépatiques, voies efférentes du foie. Cette vascularisation très organisée définit le lobule hépatique, unité fonctionnelle du foie, tel qu'il est représenté sur la figure 7.

2/ Les différentes cellules du foie

Le foie est composé de deux types de cellules : les cellules parenchymateuses et les cellules non-parenchymateuses. Les cellules parenchymateuses, ou hépatocytes,

sont les cellules les plus importantes en nombre et en volume, puisqu'elles représentent 60 à 70 % des cellules et 70 à 80 % du volume du foie (Widmann et al. 1972, Blouin et al. 1977). Les cellules non parenchymateuses peuvent être classées en deux groupes : les cellules sinusoidales et les cellules biliaires. Ces dernières, représentant moins de 1 % des cellules hépatiques, entourent le canal biliaire à sa sortie du lobule. Elles jouent un rôle capital dans la transformation de la bile (Arias et al. 1982). Les cellules sinusoidales représentent 30 à 40 % des cellules hépatiques mais, en raison de leur petite taille, seulement 6 % du volume total du foie. Sous ce nom générique sont réunies les cellules endothéliales (48 % des cellules sinusoidales), les cellules de Kupffer (39 %), les cellules de Ito (Fat-storing cells, 13 % des cellules sinusoidales) et les « Pit cells » (moins de 1 % des cellules hépatiques) (Widmann et al. 1972, Blouin et al. 1977).

Aussi, même si le foie est globalement l'organe le plus « homogène » en terme de composition cellulaire, il est constitué d'une quantité non négligeable de cellules minoritaires. Si ce nombre de cellules n'influence que très peu l'interprétation des études biochimiques sur des compartiments présents en quantités égales dans l'ensemble des types cellulaires, il peut en revanche avoir une influence importante sur les études des compartiments très abondants dans ces cellules minoritaires. Ceci est appuyé par les travaux morphométriques de Blouin et collaborateurs (Blouin et al. 1977), qui montrent qu'une quantité significative de lysosomes, de membranes plasmiques et d'éléments du Golgi, dans un homogénat de foie, provient des cellules non parenchymateuses.

a) Les hépatocytes

Ces cellules forment la majeure partie du parenchyme hépatique. Elles possèdent trois voies métaboliques spécifiques : le cycle de l'urée, le métabolisme des lipides et lipoprotéines et enfin la conjugaison de la bilirubine (composé provenant essentiellement de la dégradation de l'hémoglobine) à l'acide glycuronique visant à faciliter son excrétion. Les hépatocytes participent activement à la biotransformation

de différentes substances xénobiotiques (comme les médicaments, l'alcool, les hormones) et sont la principale source de protéines plasmatiques (Arias et al. 1982).

Les hépatocytes sont des cellules polyédriques d'environ 25 μm de diamètre, légèrement aplaties et disposées en travées (travées de Remak) séparées par les capillaires sinusoides. Ainsi, chaque cellule est baignée par du sang sur deux de ses faces (figure 8). Les hépatocytes sont des cellules épithéliales dont la polarité apicale – basolatérale est tout à fait particulière. En effet, le pôle apical de l'hépatocyte est représenté par la portion de membrane constituant les parois du canalicule biliaire (figures 8 et 9). Le reste de la membrane plasmique forme le pôle basolatéral.

La membrane apicale ou canaliculaire de l'hépatocyte représente 15 % du volume total de membrane plasmique hépatocytaire (Evans 1980). Elle est organisée en microvillosités (figure 10) qui remplissent une partie de la lumière canaliculaire et dont la structure est maintenue par des bâtonnets d'actine. Le canalicule biliaire, d'un diamètre d'environ 1 μm , est séparé des espaces péricellulaires et de l'espace de Disse par des jonctions serrées, pratiquement imperméables, puisque seules les micromolécules peuvent les franchir (Arias et al. 1982). C'est dans le canalicule biliaire que l'hépatocyte libère la bilirubine et les acides biliaires. Ceux-ci sont soit synthétisés par l'hépatocyte, soit repris dans le sang par sa membrane sinusoidale.

Le pôle basolatéral de l'hépatocyte est composé de la membrane sinusoidale, bordant l'espace de Disse et de la membrane contiguë, située entre deux cellules adjacentes. Comme le montre la figure 10, la membrane sinusoidale de l'hépatocyte forme de nombreuses digitations dans l'espace de Disse.

b) Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales, très plates et allongées, forment une barrière entre l'espace sinusoidal et l'espace de Disse (figure 10). Aussi, bien qu'elles ne représentent que 2,5 % du volume total du foie, leurs membranes constituent cependant 15 % du volume total des membranes plasmiques (Blouin et al. 1977). Les

cellules endothéliales sont localement perforées (pores de diamètres d'environ 40 nm), permettant, au niveau des perforations, le passage de molécules entre l'espace de Disse et la lumière du sinusoiide, donc les échanges entre l'hépatocyte et le sang.

c) Les cellules de Kupffer

Les cellules de Kupffer représentent 80 à 90 % des macrophages résidents de l'organisme et 33 % des cellules sinusoiidales du foie. Elles sont soit accrochées à la paroi du sinusoiide, soit flottantes dans la lumière du vaisseau sanguin. Ces cellules, de 10 µm de diamètre, possèdent les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des macrophages. Elles sont en relation avec l'espace de Disse grâce à des prolongements cytoplasmiques qui traversent les fenestrations des cellules endothéliales. Elles sont plus abondantes autour des espaces portes.

La principale fonction des cellules de Kupffer est la capture, par phagocytose, des matériaux particuliers tels que les globules rouges sénescents et les microorganismes. Par ailleurs, ces cellules sont les plus actifs défenseurs du tissu hépatique, notamment par leur fonction immunologique (Arii and Imamura 2000).

Les cellules de Kupffer jouent également un rôle important dans les lésions hépatiques dues à la consommation excessive d'alcool. En effet, Adachi et collaborateurs (Adachi et al. 1994) montrent que l'inactivation, *in vivo*, des cellules de Kupffer par injection de chlorure de gadolinium, diminue la nécrose hépatique observée chez des rats traités à l'éthanol. L'alcool augmente la perméabilité de la paroi intestinale à l'endotoxine et au lipopolysaccharide (LPS), des constituants majeurs de la membrane externe des bactéries Gram négatives. Ces substances activent les cellules de Kupffer, qui produisent alors des médiateurs toxiques comme les cytokines pro-inflammatoires (IL1 TNF- α), les radicaux oxygénés et des protéases (Martinez et al. 1992) susceptibles de léser le tissu hépatique.

d) Les cellules biliaires

Les canalicules biliaires, que nous avons décrits précédemment, débouchent par le canal de Herring dans le canal biliaire, bordé par des cellules spécifiques : les cellules biliaires. Ce sont des cellules épithéliales d'environ 10 µm de diamètre, dont le noyau et les mitochondries sont relativement petits par rapport aux hépatocytes. Ces cellules restent très méconnues, probablement du fait de leur faible représentativité dans le foie (1 % des cellules hépatiques). On sait néanmoins qu'elles participent à la transformation de la bile sécrétée par les hépatocytes.

e) Les cellules de Ito

Les cellules de Ito (13 % des cellules sinusoidales) sont généralement localisées sous les cellules endothéliales, dans l'espace de Disse. Leurs prolongements forment localement un double revêtement sinusoidal, renforçant ainsi la paroi du capillaire. Le réticulum endoplasmique rugueux de ces cellules est très développé. On observe également de nombreuses gouttelettes graisseuses composées essentiellement de vitamine A (ou acide rétinoïque) dans leur cytoplasme, ce qui leur a valu le nom de « fat storing cells ». Ces cellules participent également à la régénérescence du tissu hépatique (Friedman 1993).

f) Les « Pit Cells »

Ces petites cellules de 7 µm de diamètre, également appelées les « natural killers » du foie, sont localisées dans la lumière des sinusoides. Elles sont caractérisées par leur forme étoilée et la présence, dans leur cytoplasme, de nombreux granules denses aux électrons. On estime que le foie compte une « Pit cell » pour dix cellules de Kupffer (Bouwens and Wisse 1987, Luo et al. 2000).

But du travail

But du travail

Depuis sa découverte dans les années 1950 par Christian De Duve, le lysosome a été l'objet de nombreuses études qui ont notamment permis de caractériser cet organite d'un point de vue biochimique, morphologique et, en partie, fonctionnel. Longtemps réduit à la seule fonction « d'estomac » de la cellule, le lysosome est désormais considéré comme un organite dynamique interagissant avec différents compartiments intracellulaires.

La compréhension de la fonction des protéines lysosomales a été, pendant des années, grandement facilitée par l'étude des maladies affectant le lysosome. Pour illustrer ceci, citons l'exemple de la première mise en évidence d'une maladie lysosomale. Il s'agit d'une glycogénose, la maladie de Pompe, caractérisée comme toute glycogénose par une accumulation de glycogène dans différents tissus. En 1961, Gery Hers, attaché au laboratoire de Christian de Duve, a montré que la maladie de Pompe résultait de l'absence d'une glycosidase acide lysosomale et non d'une des enzymes classiques du catabolisme du glycogène : la phosphorylase, amylo 1-6 glucosidase (Hers 1963, De Duve and Wattiaux 1966). Il a ainsi pu établir pour la première fois un lien entre une pathologie humaine et un dysfonctionnement des lysosomes.

La stratégie d'étude des protéines a été profondément modifiée ces dernières années par le développement de la génomique et de la protéomique. En effet, de façon générale, la recherche de la fonction des protéines ne passe plus désormais obligatoirement par l'étude de la pathologie, puis la remontée progressive à l'acteur moléculaire susceptible d'être responsable de cette pathologie. Le point de départ de l'étude de la fonction d'une protéine peut être la protéine elle-même, son identification, sa localisation dans un tissu, une cellule, un compartiment intracellulaire. Diverses stratégies sont alors mises en place pour déterminer sa fonction, comme par exemple la recherche d'un partenaire, la surexpression ou la déplétion en lignées cellulaires puis en modèle animal, la sensibilité à diverses

drogues. L'implication potentielle de la protéine étudiée dans une ou plusieurs pathologies peut être déduite des éléments d'information apportés par ces différentes approches.

Ce changement de stratégie s'est opéré parallèlement aux avancées technologiques considérables survenues au cours de ces dernières années et, en particulier, au développement des outils protéomiques de type « haut débit ». En effet, ces outils ont permis l'établissement progressif de répertoires de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de protéines de chaque compartiment intracellulaire (voir introduction), permettant non seulement aux biologistes d'accéder rapidement à l'identité des acteurs moléculaires du compartiment étudié, mais aussi de considérer l'ensemble de ces compartiments d'un point de vue dynamique. Cependant, la spectrométrie de masse ne peut permettre au biologiste de faire l'économie de techniques relevant de la biologie cellulaire, moléculaire ou de la biochimie, afin notamment de vérifier de façon rigoureuse la localisation subcellulaire supposée des protéines identifiées dans un échantillon donné. En effet, les fractions qui sont préparées en amont de l'analyse protéomique représentent des fractions enrichies (par rapport à l'homogénat initial) en un compartiment donné et non le compartiment purifié. Il est donc indispensable d'envisager la possibilité de la présence de protéines contaminantes au sein de l'échantillon qui est analysé en spectrométrie de masse.

Depuis plusieurs années, notre laboratoire s'intéresse au protéome de la membrane du lysosome (Boussac 2001). Cette analyse a été menée dans la logique que nous venons d'expliquer, à savoir que l'augmentation des connaissances de la physiologie d'un compartiment passe par l'identification des acteurs moléculaires qu'il renferme. Or, comme nous avons pu le voir dans l'introduction générale de ce travail, le protéome lysosomal membranaire est très peu caractérisé, comparativement au protéome lysosomal soluble. Une fraction enrichie en lysosomes de foie de rat a donc été préparée par centrifugation, dans un gradient préparatif de Nycodenz (Wattiaux et al. 1978), en collaboration avec l'équipe dirigée par Michel Jadot (FUNDP, Namur, Belgique). Les protéines membranaires contenues dans cet échantillon ont été extraites dans un mélange de chloroforme / méthanol contenant 1

% de Triton-X100, puis séparées par SDS-PAGE et analysées en spectrométrie de masse (Boonen et al. 2006 ; Boussac 2001). Cette analyse a mené à la découverte d'un peptide de 15 acides aminés [(CH3COO)-AQAATVIVTQPGFVR], parmi les peptides les plus abondants de l'échantillon, que les bases de données reliaient à une petite protéine riche en cystéines, nommée Onzin chez la souris. La séquence de cette protéine est identique entre le rat et la souris à 97 % et à 82 % entre la souris et l'Homme.

Souris	M.AQAPTVIVTQPGFVR..APQNSNWQTSLCDCFSDCGVCLCGTFCFTCLGCQVAADM
Rat	M.AQAATVIVTQPGFVR..APQNSNWQTSLCDCFSDCGVCLCGTFCFTCLGCQVAADM
Homme	MQAQAFVIVTQPGVGPAPQNSNWQTMCDCFSDCGVCLCGTFCFTCLGCQVAADM
Souris	NECCLCGTTVAMRTLYRTRYGIPGSICDDYMTLFCPVCSVCQLKRDINRRRAMNAF
Rat	NECCLCGTTVAMRTLYRTRYGIPGSICDDYMTLFCPVCSVCQIKRDINRRRAMNAF
Homme	NECCLCGTISVAMRTLYRTRYGIPGSICDDYMATLCCPHCTLQIKRDINRRRAMRTF

Figure 11 : *Alignement des séquences d'Onzin de souris, de rat et d'Homme.*

Les acides aminés grisés diffèrent des acides aminés des séquences des deux autres espèces.

Au moment de la découverte de l'Onzin, la littérature n'apportait aucune donnée précise sur la localisation ou le rôle joué par cette protéine dans l'organisme. Nous avons donc décidé d'étudier cette protéine, en commençant par sa localisation tissulaire et intracellulaire.

Etant donné que l'Onzin est absente de l'ensemble des lignées cellulaires testées, nous avons été contrainte d'étudier l'Onzin, dès le commencement de ce travail, à partir de tissus provenant directement de l'animal, même si cette stratégie rajoute un certain niveau de complexité dans l'interprétation des résultats. Nous avons étudié la localisation intracellulaire de cette protéine dans le foie de souris, en utilisant des techniques de centrifugation analytique. Par le passé, cette technique, basée sur l'isolement des compartiments intracellulaires en fonction de critères biochimiques comme la taille et la densité, a été très utilisée pour étudier les protéines du foie. Ceci nous permet donc d'avoir un support de connaissance favorable à la mise en place de

But du travail

la stratégie, aussi bien qu'à l'interprétation de nos résultats. Par ce travail, nous avons montré que l'Onzin est une protéine de la voie endocytaire, présente dans un compartiment en relation dynamique avec le lysosome.

CHAPITRE II. Techniques expérimentales

A. TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT

1/ Matériel de départ

a) Foie de souris

Lorsque cela est précisé, la souris aura reçu au préalable une injection intraveineuse (veine de la queue) de Triton WR-1339 (Tyloxapol, Sigma, T0307) ou d'invertase de *Candida* (Sigma, I4753).

Les souris utilisées dans les différentes expériences sont des femelles pesant 20-25 g, de fond génétique C57Bl/6J ou NMRI. Elles sont sacrifiées par dislocation cérébrale, les foies sont rapidement prélevés, pesés et coupés en petits morceaux dans une solution isotonique de saccharose (0,25 M) glacé. Ils sont ensuite homogénéisés dans un Potter en verre dont le piston en téflon est actionné par un appareil électrique (un passage, rotation 2500 rpm).

b) Cellules péritonéales de souris

Les cellules péritonéales sont récoltées par lavage du péritoine de souris C57Bl/6J avec 10 ml de PBS-SVF 3%. Les cellules sont ensuite mises en culture pendant 72 h dans du milieu DMEM, SVF 15%, Antibiotique/Antimycotique (Gibco, 15240 : pénicilline, streptomycine, amphotéricine) en boîte de pétri (environ 10^7 cellules par boîte de 10 cm de diamètre). Le fractionnement est réalisé à partir des cellules adhérentes (macrophages, en grande partie), comme décrit par Darte et Beaufay (Darte and Beaufay 1983). Brièvement, le surnageant de culture contenant les cellules non-adhérentes est jeté, le tapis cellulaire est lavé trois fois vigoureusement au PBS et les cellules sont décrochées de la boîte au « cell-scraper » dans 1 ml de « tampon d'homogénéisation » (saccharose 0,25 M, 3 mM Immidazole pH 7.4, 1 mM EGTA). Elles sont alors centrifugées à 2000 RPM pendant 11 minutes (rotor SX-4250) et cassées par 5 passages dans une seringue (aiguille 16 x 0,45 mm).

2/ Fractionnement par centrifugation différentielle

a) Foie de souris

L'homogénat est fractionné par centrifugation différentielle selon le schéma de de Duve et collaborateurs (De Duve et al. 1955). Cinq fractions sont successivement isolées :

- la fraction nucléaire **N**, constituée essentiellement de noyaux et de débris cellulaires,
- la fraction **M**, mitochondriale lourde, contenant la majeure partie des mitochondries, mais également des lysosomes et des peroxysomes,
- la fraction mitochondriale légère **L**, enrichie en lysosomes et peroxysomes,
- la fraction microsomale **P**, contenant la plus grande partie des éléments du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, ainsi qu'une partie de la membrane plasmique,
- la fraction **S** constituée des éléments non sédimentables de l'homogénat.

La fraction mitochondrial totale « M+L », contenant la plus grande partie des mitochondries, lysosomes et peroxysomes du foie, est obtenue par centrifugation de l'homogénat, après élimination de la fraction N, dans les conditions d'obtention de la fraction L.

b) Cellules péritonéales

L'homogénat est centrifugé à 1400 RPM (Beckman, Rotor SX-4250) pendant 3 minutes. Le surnageant (extrait E1) est récupéré, le culot est repris dans 1 ml de « tampon d'homogénéisation », puis est à nouveau soumis à 5 passages à la seringue. Le lysat obtenu est centrifugé dans les mêmes conditions que précédemment. Ces étapes sont répétées 3 fois, en regroupant les surnageants isolés après chaque centrifugation. Une fraction MLP est préparée à partir de l'extrait total (E1+E2+E3+E4) par centrifugation à haute vitesse (100000 g) pendant 35 minutes dans un rotor 50Ti (Beckman).

c) Présentation des résultats

La répartition des différents marqueurs dans les fractions isolées par centrifugation différentielle est représentée sous forme d'une suite de 5 histogrammes correspondant aux fractions N, M, L, P, S isolées successivement (De Duve et al. 1955). La largeur d'un histogramme correspond à la quantité de protéines (P) contenues dans la fraction considérée rapportée à la quantité totale de protéines (ΣP) contenues dans le foie (exprimée en pourcentage). La hauteur d'un histogramme correspond au degré de purification de la protéine d'intérêt. Lorsque celle-ci est une enzyme dont l'activité (Q) est mesurée par dosage spécifique (voir plus loin), la hauteur de l'histogramme correspond à l'activité spécifique relative (ASR) de l'enzyme contenue dans la fraction (Q/P) par rapport à celle de l'homogénat ($\Sigma Q/\Sigma P$). Cette valeur est obtenue en calculant, pour chaque fraction, le rapport du pourcentage d'activité sur le pourcentage de protéines :

$$ASR = \frac{Q/P}{\Sigma Q/\Sigma P} = \frac{Q/\Sigma Q}{P/\Sigma P}$$

Lorsque la protéine d'intérêt (protéine « X ») est détectée par Western blot, la hauteur de l'histogramme correspond à la quantité de protéine « X » détectée dans la fraction considérée pour un dépôt d'une quantité égale de protéines totales de chaque fraction.

3/ Fractionnement par centrifugation isopycniq

a. Conditions de centrifugation

Les fractions N, ML, LP, P, ou MLP sont déposées au sommet des différents types de gradients de densité préformés (saccharose, Nycodenz, Percoll). Les limites de densités utilisées, ainsi que les conditions de centrifugations (rotors, temps, vitesses) sont notées dans la légende des figures. Après centrifugation, les tubes de

gradients sont découpés en 13 tranches dans un appareil décrit par Beaufay et collaborateurs (Beaufay et al. 1959, Beaufay et al. 1964). Les densités des 13 fractions récoltées sont mesurées par réfractométrie optique.

b. Présentation des résultats

Dans le graphique représentant la distribution d'une protéine d'intérêt dans un gradient après centrifugation isopycnique, chaque fraction est schématisée par un rectangle centré sur sa densité moyenne et dont la largeur est limitée par les densités des fractions inférieure et supérieure. La hauteur de l'histogramme indique la « fréquence » de la protéine d'intérêt, c'est-à-dire le pourcentage (1) d'activité enzymatique de l'enzyme mesurée par dosage spécifique ou (2) de protéine X détectée par Western blot, contenue dans la fraction considérée par rapport à la variation de densité existant entre les extrémités de cette fraction. Lorsque la distribution est unimodale, une courbe de fréquence (dont la médiane correspond à la densité médiane d'équilibration de la protéine) peut être dérivée de cet histogramme.

B. MARQUEURS DES COMPARTIMENTS SUBCELLULAIRES

La distribution des compartiments subcellulaires isolés dans les différentes fractions obtenues par centrifugation différentielle ou isopycnique est déterminée (1) en mesurant l'activité d'enzymes de référence ou (2) en détectant la protéine par Western blot. La distribution de l'Onzin (détectée par Western blot) est ensuite comparée à ces marqueurs de référence dans les mêmes échantillons.

Les protéines ont été mesurées dans tous les échantillons par la méthode de Lowry et collaborateurs (Lowry et al. 1951).

1/ Dosages enzymatiques

β -galactosidase, β -hexosaminidase, β -glucuronidase, β -mannosidase. Pour mesurer l'activité enzymatique de ces enzymes, 3 à 5 μ l d'échantillon sont incubés pendant 10 à 20 minutes à 37°C, dans un volume de 0,2 ml contenant 50 mM acétate pH 5.5, 0.05% TritonX100 en présence des substrats spécifiques de ces enzymes (1 mM, Sigma). Ces substrats methylumbellyferyl (MU) sont :

- le MU- β -D-galactopyranoside, pour la mesure de la β -galactosidase,
- le MU-N-acétyl- β -glucosaminide, spécifique de la β -hexosaminidase,
- le MU- β -glucuronide, spécifique de la β -glucuronidase,
- le MU- β -mannopyranoside, pour mesurer la β -mannosidase.

Le produit résultant de l'action de l'enzyme sur son substrat est mesuré par fluorimétrie (excitation 365nm, émission 450nm) après arrêt de la réaction par ajout de 1 ml de 50 mM Glycine pH 10.5, 5 mM EDTA, 0.5 % TritonX100.

Phosphodiesterase Alcaline. L'activité de la PDase alcaline est mesurée par colorimétrie. Pour cela, 5 μ l de chaque fraction sont incubés à 25°C pendant 30 minutes dans 250 μ l de tampon 0.1 M glycine pH 9.6, 2 mM acétate de zinc contenant 1,5 mM *p*-nitrophenylthymidine-5'-phosphate. La réaction est arrêtée par ajout de 1 ml de NaOH 0.1 M et la libération de *p*-nitrophenol est mesurée par absorbance à 400 nm.

2/ Westerns blots

Pour la détection des protéines par Western blot, une quantité égale de protéines (25 à 50 μ g) de chaque fraction E, N, M, L, P, S, ou un volume égal (2 à 12 μ l) de chacune des 13 fractions des gradients de densité, sont déposés sur gel SDS-PAGE (10, ou 12 % acrylamide) après solubilisation dans un tampon Laemmli dénaturant. Ce tampon de solubilisation est à pH 6,8 pour la détection de l'ensemble des marqueurs de référence et de l'invertase et à pH 11 pour la détection de l'Onzin. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane PVDF (Millipore), qui est alors incubée avec des anticorps spécifiques dont la liste est présentée dans le tableau 1. Les

anticorps sont visualisés par chémioluminescence amplifiée par le kit Supersignal West pico, Pierce, après exposition de 30 secondes à 5 minutes à un film autoradiographique (Kodak, BioMax XAR film, 853-2665).

Antigène	Origine de l'anticorps	Fournisseur	Concentration utilisée	Utilisation
LAMP1 de souris	Monoclonal de Rat, clone 1D4B	Université de Iowa, USA	2µg/ml	IF
EEA1 humain	Monoclonal de souris, clone 14	BD Pharmingen	10µg/ml	IF
Rab7 de souris	Polyclonal de chèvre, C-19	Santa Cruz	1µg/ml	WB
CD98 de souris	Polyclonal de chèvre, M-20	Santa Cruz	1µg/ml	WB
Invertase de Candida	Ployclonal de chèvre	USBiological	5µg/ml	WB, IH
LBPA	Monoclonal de souris	Dr Gruenberg, Université de Genève, Suisse	Non Déterminé	IF
OSCP de rat	Polyclonal de lapin	Dr Alain Dupuis, CEA	Non Déterminé	WB
Rab5 humain	Monoclonal de souris, clone 15	Transduction Laboratories	1µg/ml	WB
TSG101	Monoclonal de souris, clone 4A10	GenTex	5µg/ml	WB
β-actine	Monoclonal de souris, clone AC-74	Sigma	0,2µg/ml (WB) ou 20µg/ml (IP)	WB, IP
TGN38 de rat	Monoclonal de souris, clone 2	BD Pharmingen	2µg/ml	IF
CD19 de souris	Monoclonal de rat, clone 1D3	BD Pharmingen	1µg/10 ⁶ cellules	FACS
CD3 de souris	Monoclonal de rat, clone 17A2	BD Pharmingen	1µg/10 ⁶ cellules	FACS

Tableau 1 : *Liste des anticorps utilisés.*

IF : Immunofluorescence ; **IH**: Immunohistologie; **WB** : Western blot ; **IP**: Immunoprécipitation; **FACS**: Cytométrie en flux.

3/ Anticorps anti-Onzin

Les anticorps polyclonaux de lapin reconnaissant la séquence de l'Onzin de souris et de rat ont été obtenus par injection de peptides C-terminaux de souris (CQLKRDINRRRAMNAF) ou N-terminaux de rat (MAQAATVIVTQPGFVRAPQNSN), synthétisés au laboratoire par Agnès Chapel, à quatre lapins différents (Charles River Laboratory, Elevage des Dombes, Lyon). Ces anticorps sont nommés N-ter1, N-ter2, C-ter1 et C-ter2. Utilisés en Western blot à la dilution 1/3000, ces quatre anticorps mettent en évidence une bande au même poids moléculaire (environ 13 kDa). Les anticorps N-ter1, N-ter2 et C-ter1 donnent le même signal de type vésiculaire en immunofluorescence (dilution 1/100) dans des macrophages péritonéaux, avec très peu de bruit de fond.

C. PREPARATION DE PHAGOSOMES-LATEX

1/ Administration des billes de Latex

a) Souris

Afin d'éviter l'agrégation hydrophobe potentielle des billes de latex une fois dans la circulation sanguine, celles-ci sont saturées par l'albumine bovine (BSA, voir Desjardins and Scianimanico 1998) avant injection intraveineuse dans la veine de la queue de la souris (NMRI, 25 g). 200 µl d'une solution de PBS contenant 0,5 % de billes de latex carboxylées (2×10^9 particules) de diamètre 0,9 µm (Sigma, CLB-9), saturées à la BSA, sont injectés à la souris « latex » 1 h 30 avant son sacrifice et le prélèvement de son foie. La souris « contrôle » reçoit une injection de 200 µl de PBS. Les foies sont découpés en petits morceaux dans du saccharose 0,25 M, 3 mM imidazole pH 7,4 et sont homogénéisés par 5 passages au Dounce « loose » suivis de 5 passages au Dounce « tight ». Après cela, 2×10^9 particules de latex sont incubées dans l'homogénat du foie de la souris « contrôle » pendant 30 minutes, à 4°C.

b) Cellules péritonéales de souris

Après lavage péritonéal de 40 souris femelles C57Bl/6, les cellules prélevées (environ $120 \cdot 10^6$) sont mises en culture dans 8 boîtes de pétri (10 cm de diamètre) en milieu DMEM, SVF 15%, Antibiotique/Antimycotique (Gibco, 15240 : pénicilline, streptomycine, amphotéricine) pendant 24 h. Les cellules adhérentes sont alors lavées au PBS, puis quatre des boîtes sont incubées en milieu de culture contenant 0,05 % de billes de latex de diamètre 0,8 μm (Sigma, blue dyed L-1398) pendant 1 h 30 à 37°C. Les milieux sont ensuite retirés, les cellules sont lavées au PBS et récoltées au « cell scraper » dans du saccharose 0,25 M contenant 3 mM d'imidazole pH 7.4, avant d'être cassées au Dounce « tight ». Le taux de lyse cellulaire est contrôlé tous les 10 passages au microscope, par comptage des cellules ; l'homogénéisation est arrêtée lorsque 85% des cellules sont cassées (50 passages). Après cela, 2×10^9 particules de latex sont incubées dans l'homogénat des macrophages n'ayant pas internalisé de billes (4 boîtes de pétri).

2/ Gradients discontinus de saccharose

Les gradients discontinus sont préparés selon le protocole de Desjardins et Scianimanico (1998). L'homogénat (3 ml) est centrifugé à 1000 g pendant 7 minutes ; le surnageant post-nucléaire (« extrait phagosomal », 1.2 ml) est porté à 42 % saccharose par ajout progressif de saccharose 62 %. Un gradient discontinu est préparé de la manière suivante, dans un tube Beckman SW41 (toutes les solutions de saccharose contiennent 3 mM imidazole, pH 7.4) : un coussin de 1 ml de saccharose 62 %, 2 ml d'extrait phagosomal porté à 42 % de saccharose, 2 ml de saccharose à 35 %, 2 ml de saccharose à 25 % et enfin 2 ml de saccharose à 10 %. Le gradient est centrifugé pendant 60 min à 24000 RPM dans un rotor Beckman SW41. Une fine couche blanchâtre ou bleue - retrouvée dans les gradients réalisés, respectivement, à partir de foie ou de cellules péritonéales- correspondant aux billes de latex (contenues ou pas dans les phagosomes) s'équilibre à l'interface des couches 25 et 10% saccharose. Le tube est découpé en 6 ou 9 fractions, selon les gradients.

3/ Analyse par spectrométrie de masse

Avant congélation, la fraction qui contient les phagosomes (fraction n°2) est complétée à 10 ml avec du saccharose 0,25 M. Cette fraction est alors centrifugée à 15000 RPM dans le rotor SW41 pendant 15 minutes. Le culot (phagosomes latex) est resuspendu dans 500 µl de PBS contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete, Roche, 11-873-580-001). Les protéines présentes dans la préparation de phagosomes sont identifiées par spectrométrie de masse.

Pour cela, 5 µl de bleu de Laemmli concentré sont rajoutés à 20 µl de chaque échantillon (contrôle et latex), chauffés à 95°C pendant 5 minutes et déposés sur gel SDS-PAGE. La migration est arrêtée lorsque les protéines sont entrées de quelques millimètres dans la partie « separating » du gel. La bande de gel contenant la totalité des protéines est alors découpée et les protéines qu'elle contient sont digérées par la trypsine (Ferro et al. 2002). La séparation chromatographique des peptides (colonne de phase inverse 15 cm x 7,5 µm) est directement couplée à un spectromètre de masse de type QTOF Ultima (Waters). Les données de MS et MS/MS sont acquises et analysées automatiquement par le logiciel MassLynx 4.0. Les recherches dans les bases de données (compilation des bases de données de SwissProt et Trembl) sont réalisées en utilisant le programme MASCOT 2.0. Les protéines identifiées par deux peptides ou plus et présentant un score supérieur à 40, sont directement validées. Pour les protéines identifiées par seulement un peptide, la séquence peptidique est vérifiée manuellement.

D. ISOLEMENT DES CELLULES DU FOIE

1/ Perfusion du foie de souris

Des souris C57Bl/6 pesant 20 à 25 g sont anesthésiées par une injection sous cutanée de 7 µg de Domitor (Pfizer Animal Health, USA), suivie d'une injection intra-

péritonéale, 10 minutes après, de 200 µl de Ketamine 10 mg/ml (Rhône Merieux, Bruxelles, Belgique).

Le cathéter (20 G, Angiocath Becton Dickinson, Utah) est inséré dans la veine cave et la veine porte est sectionnée pour permettre l'évacuation du tampon de perfusion. La suite des étapes aboutissant à la séparation des cellules du foie a été décrite par Seglen (1976), sur le foie de rat.

La perfusion est réalisée à 37°C à un débit de 8 ml/min, contrôlé par une pompe péristaltique. Le foie est d'abord perfusé pendant 5 minutes avec un « tampon de perfusion » (voir composition ci-dessous) dépourvu de calcium dans le but de déstabiliser les contacts intercellulaires. Les matrices extracellulaires sont ensuite digérées par l'action de la Collagénase (Worthington, Lakewood, USA) préparée dans un tampon salin (voir composition ci-dessous) dont la perfusion (8 minutes) suit sans discontinuité celle du « tampon de perfusion ». Une fois la perfusion arrêtée, le foie est prélevé et les cellules sont séparées délicatement à l'aide d'un peigne à chien métallique dans le « tampon de suspension » (voir composition ci-dessous). La suspension ainsi obtenue est ensuite filtrée sur une gaze en nylon de 250 µm. Le taux de mort cellulaire à cette étape, évalué par comptage au bleu Trypan, est de l'ordre de 15 %.

Tampon de perfusion : (pour 1 l). pH 7,4.	Tampon de collagénase : (pour 0,5 l). pH 7,4.	Tampon de suspension : (pour 0,5 l)
8,3 g NaCl	0,25 g Collagénase	2 g NaCl
0,5 g KCl	0,35 g CaCl ₂ .2H ₂ O	0,2 g KCl
2,4 g Hepes	12 g Hepes	75 mg KH ₂ PO ₄
0,24 g NaOH	2 g NaCl	50 mg Na ₂ SO ₄
	0,25 g KCl	3,6 g Hepes
	1,32 g NaOH	3,5 g TES
		3,25 g Tricine
		1 g NaOH

2/ Séparation des cellules hépatiques par centrifugation différentielle

Les hépatocytes et les cellules sinusoidales sont séparées par centrifugation différentielle du fait de leur différence de taille importante (facteur 10). La suspension cellulaire est centrifugée à 400 RPM pendant 2,5 minutes (Rotor SX-4250, Beckman). Le culot contenant principalement les hépatocytes, encore contaminés par quelques cellules sinusoidales, est lavé deux fois au PBS. Le premier surnageant, contenant les cellules sinusoidales, est centrifugé à 1800 RPM, pendant 6 minutes. Le culot est repris dans du PBS ; les hépatocytes contaminants sont éliminés par centrifugation à basse vitesse (400 RPM, 2,5 minutes). Le surnageant est centrifugé à 1800 RPM pendant 6 minutes. L'observation au microscope des culots « hépatocytes » et « cellules sinusoidales » révèle (1) l'absence de cellules sinusoidales (petites cellules rondes) parmi les hépatocytes (grosses cellules) du premier culot, (2) la présence d'une quantité importante d'hépatocytes contaminants dans le culot « cellules sinusoidales ».

E. PREPARATION D'EXOSOMES DE CELLULES DENDRITIQUES DE SOURIS

1/ Culture des DC

La moelle osseuse est prélevée chez des souris BALB/c âgées de 4 à 12 semaines. Les progéniteurs de cellules dendritiques présents dans la moelle osseuse sont amplifiés et différenciés par une culture en deux étapes, en présence de différentes cytokines (Berthier et al. 2000).

2/ Purification des exosomes par ultra-centrifugation

Les exosomes sont purifiés par centrifugations successives à vitesse croissante. Brièvement, 50 ml de surnageant de culture sont centrifugés deux fois pendant 10 minutes à 500 g, puis 15 minutes à 2000 g et enfin 30 minutes à 10000 g, afin

d'éliminer les cellules mortes et les débris cellulaires éventuellement en suspension. Le surnageant est alors centrifugé à 100000 g pendant 1 h. Le culot, contenant les exosomes, est repris dans une solution de PBS, 1 % Triton X100 et soumis à un dosage protéique selon la méthode BCA (acide bicinchoninique).

3/ Analyse protéomique

Les protéines présentes dans les exosomes de cellules dendritiques ainsi isolés, sont identifiées par spectrométrie de masse. Pour cela, 55 µg d'exosomes sont dissous dans du bleu de Laemmli à pH 6.8, chauffés pendant 5 minutes à 95°C avant d'être déposés sur un gel SDS-PAGE. Après migration sur 2 cm de gel « separating », les protéines sont visualisées par coloration du gel au bleu de Coomassie (Biorad, G-250). Le gel est alors découpé en fines bandes de 1,5 mm de largeur, qui sont ensuite digérées par la trypsine (Ferro et al. 2002). L'analyse protéomique est alors réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (voir « Analyse par spectrométrie de masse des phagosomes-latex »), à l'exception de la base de données utilisée, qui est, dans le cas présent, NCBIInr et non SwissProt/Trembl.

F. TECHNIQUES MORPHOLOGIQUES

1/ Immunofluorescence

a) Cellules péritonéales

Les cellules péritonéales de souris C57Bl/6 et de souris transgéniques « TG-Onzin » sont prélevées par lavage péritonéal. Elles sont comptées et déposées sur lames à huit chambres de culture (Falcon, 354108) dans du milieu DMEM, 15 % SVF, Antibiotique/Antimycotique (Gibco, 15240 : pénicilline, streptomycine, amphotéricine) pendant 24 h (200 000 cellules par chambre). Après cette période, les

cellules non-adhérentes sont éliminées et les cellules adhérentes sont lavées vigoureusement au PBS.

b) Phagosomes-Latex

Les cellules péritonéales lavées au PBS sont incubées pendant 10 minutes à 37°C dans du milieu DMEM, SVF 15 % contenant 0.05% de billes de latex fluorescentes (Polysciences, Inc, USA, Ref 17154, Ex. 441 nm, Em. 486 nm) de 1 µm de diamètre. Cette étape d'internalisation est suivie d'une chasse de 10 minutes à 6 heures (voir légende des figures) à 37°C dans du milieu DMEM, 15 % SVF, Antibiotique/Antimycotique, ne contenant pas de billes. Les cellules sont alors lavées vigoureusement au PBS avant fixation.

c) Fixation et marquage

Fixation. Les cellules sont fixées à température ambiante pendant 30 minutes dans du PBS contenant 4 % de paraformaldéhyde.

Démasquage Citrate. Les lames sont immergées dans un récipient contenant 500 ml de tampon 10 mM citrate, pH 6.2, chauffées au micro-onde pendant 3 minutes à puissance 800 W, puis 10 minutes sur fonction « décongélation » afin de maintenir la température proche de 100°C tout en évitant l'ébullition. Le récipient contenant le tampon bouillant est ensuite laissé à température ambiante pendant 20 minutes, au cours desquelles la température diminue d'environ 40°C.

Saturation. Les sites potentiels de fixation non spécifique de l'anticorps sont saturés par incubation des lames pendant 15 minutes à température ambiante dans une solution de PBS contenant 0,05 % de caséine bovine (Sigma, C6905).

Marquage immunocytochimique. Les anticorps primaires sont incubés à température ambiante, pendant 45 minutes, dans du PBS. Les anticorps secondaires dirigés contre le rat, la souris ou le lapin (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc,

USA et Molecular Probe, USA), couplés à différents fluorochromes (Alexa 488, FITC, Cyanine-3, Cyanine-5) sont incubés dans du PBS pendant 25 minutes à température ambiante.

Les noyaux sont marqués par incubation pendant 1 minute dans une solution de PBS contenant du Hoechst 33342 (500 ng/ml, Molecular Probe, H-3570, Ex. 350nm, Em. 461nm).

d) Observation

La fluorescence est détectée par un microscope confocal à balayage laser de type TSC-SP2 (Leica).

2/ Immunohistochimie

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Anne-Emilie Declèves, « Service de physiologie et pharmacologie », Université de Mons-hainaut, Mons, Belgique et avec Raphaël Déom, « Laboratoire cellules et tissus », FUNDP, Namur, Belgique.

a) Enrobage en paraffine

Les organes de souris C57Bl/6 et TG-Onzin pesant 20 à 25 g sont rapidement prélevés et fixés pendant 48 h dans un grand volume de bouin alcoolique (10 % Formol, 43 % éthanol, 7 % acide acétique, acide picrique 6.75 mg/ml). Ils sont ensuite déshydratés par bains d'éthanol et de butanol et enfin enrobés en paraffine. Des coupes de 5 µm d'épaisseur sont déposées sur lames traitées à la polylysine et déparaffinées par bains successifs de toluène et d'éthanol, avant de subir un démasquage citrate similaire à celui détaillé ci-dessus.

b) Congélation

Pour l'étude de la distribution cellulaire de l'invertase, un bout de foie d'une souris ayant reçu une injection intraveineuse de 25 µg ou 2 mg d'invertase est déposé

dans un petit volume de Tissue-Tek (Sakura, Tokyo, Japon) et immédiatement congelé à -80°C . Des coupes de $3\ \mu\text{m}$ d'épaisseur sont réalisées au cryostat (Leica) et déposées sur lames « superfrost ». Ces coupes sont ensuite fixées et perméabilisées par incubation dans une solution glacée de méthanol/acétone (volume à volume) pendant 5 minutes, avant d'être lavées au PBS.

c) Marquage immunologique

Les peroxydases endogènes particulièrement abondantes dans certains types de cellules (macrophages, globules rouges) sont inhibées par traitement à l' H_2O_2 0.5%. Un prétraitement avidine/biotine est réalisé afin de bloquer les biotines endogènes, les récepteurs à la biotine, ainsi que les sites de liaison à l'avidine présents en quantités importantes dans certains tissus comme le foie. Les sites de fixation non-spécifique de l'anticorps sont saturés par incubation des coupes dans une solution de 0.05 % de caséine de bœuf. Les anticorps primaires (anti-Onzin N-ter1 et anti-invertase) sont incubés dans du PBS pendant 1 h à température ambiante. Les anticorps secondaires utilisés (dirigés contre le lapin ou la chèvre pour la mise en évidence de l'Onzin et de l'invertase, respectivement) sont biotinylés. Le complexe Avidine-Biotine-Peroxydase (ABC, Dako Cytomation) utilisé pour amplifier le signal se fixe sur la biotine de ces anticorps secondaires et sera révélé par l'ajout d'un substrat de la peroxydase (DAB, 0.025 % Sigma) et de son cofacteur (H_2O_2 , 0.08 %), provoquant la formation d'un précipité brun caractéristique.

G. NORTHERN BLOTS

Marquage de la sonde. L'ADNc de l'Onzin est radiomarqué par incorporation de [α - ^{32}P] dCTP grâce au kit Rediprime (Amersham, RPN1633). L'activité spécifique de la sonde avant hybridation est de 10^9 cpm/ μg ADN. Les acides nucléiques non incorporés sont éliminés par passage sur une colonne d'exclusion (Micro Bio-Spin Chromatography Columns, BIO-RAD 732-6224).

Préhybridation et Hybridation. Les membranes commerciales (BD Biosciences ; Multiple Tissue Expression Array 636903, Human MTN Blot 7760-1) sont préhybridées pendant 30 minutes à 65°C, dans la solution ExpressHyb (BD Biosciences) contenant 0,1 % d'ADN de saumon dénaturé. L'hybridation de la sonde est réalisée pendant 14 h à 65°C, dans la solution ExpressHyb contenant 0,01 % d'ADN de saumon dénaturé et la sonde radiomarquée (5 ng/ml).

Lavages. Les lavages sont réalisés à 65°C, dans des bains successifs de SSC, 0.1 % SDS, de concentration décroissante en SSC (de 2X à 0,5X).

Exposition et mesures. Les membranes sont ensuite enrobées dans un film plastique, placées dans une cassette et exposées pendant 14 h à un écran phosphore (Molecular Dynamics). Le signal est analysé au Phosphorimager (Molecular Imager FX, Biorad).

H. MARQUAGE METABOLIQUE DE CELLULES 32D AU PALMITATE TRITIE

1/ Marquage métabolique

40 x 10⁶ cellules 32D (American Type Culture Collection, USA) sont incubées pendant 20 h à 37°C, dans du milieu RPMI contenant 10 % SVF, 10 % IL3 de souris (BD Bioscience 354040), 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 2,5 g/l glucose, Antibiotique/Antimycotique (Gibco, 15240 : pénicilline, streptomycine, amphotéricine) et 200µCi/ml de ³H-acide palmitique (Amersham TRK909). Les cellules sont récoltées, lavées 3 fois dans du PBS et lysées dans 1 ml de tampon contenant 50 mM Tris pH7,5, 100 mM NaCl, 1 % TritonX100, 0.2 % Deoxycholate, inhibiteurs de protéases (Complete, Roche, 11-873-580-001). Le lysat est centrifugé pendant 10 min à 10000 g pour éliminer les débris cellulaires non solubilisés.

2/ Immunoprécipitation

Toutes les incubations sont réalisées à 4°C, sur une roue tournante. Le lysat est incubé en présence de 30 µl de billes de sépharose couplées à la Protéine G (Amersham, 17-0618-01) pour éliminer les protéines susceptibles de se lier aux billes de façon non spécifique, dans les étapes successives. Les billes sont éliminées par centrifugation à 10000g pendant 10 minutes et le surnageant est séparé en trois aliquotes (300 µl). Ces aliquotes sont incubés pendant 14 h en présence de 10 µg d'anticorps purifiés anti β-actine (Sigma), 15 µl de sérum de lapin immunisé contre le peptide N-terminal de l'Onzin de rat ou 15 µl de sérum pré-immun du lapin correspondant. Après cela, les anticorps sont piégés par incubation pendant 2 h en présence de 30 µl de billes de sépharose couplées à la Protéine G. Les billes sont récoltées par centrifugation pendant 10 minutes à 10000 g et lavées 3 fois dans un tampon de lyse contenant 50 mM Tris pH7,5, 100 mM NaCl, 1 % TritonX100, 0.2 % Deoxycholate. Les anticorps et les protéines immunoprécipitées sont éluées pendant 10 minutes à 95°C, dans 40 µl de bleu de Laemmli 2 fois concentré (pH 6.8 pour l'actine, pH 11 pour l'Onzin et le non-immun).

3/ Séparation sur gel et exposition

30 et 10 µl de chaque échantillon sont déposés sur deux gels SDS-PAGE de 15 % de polyacrylamide. Après migration, un des gels est déshydraté pendant 2 h dans un « gel dryer » (Biorad). Il est ensuite exposé à un film autoradiographique (Kodak, BioMax XAR film, 853-2665) pendant 2 mois, à -80°C. Les protéines séparées sur le deuxième gel sont transférées sur une membrane de PVDF comme décrit précédemment (voir partie intitulée « Marqueurs de compartiments intracellulaires, Westerns blots »). La membrane est découpée en deux bandes : l'une, correspondant à la condition « actine », est incubée en présence de l'anticorps anti-actine ; l'autre, correspondant aux conditions « Onzin » et « non immun », est incubée en présence de l'anticorps anti-Onzin (peptide C-terminal).

I. CONSTRUCTION DE LA SOURIS TRANSGENIQUE TG-ONZIN

1/ Construction génétique

Pour la construction de la souris transgénique TG-Onzin, la séquence codante de l'Onzin murine est placée sous le contrôle d'un promoteur ubiquiste, Elongation Factor 1a (EF1 α), permettant (théoriquement) l'expression de la protéine dans toutes les cellules de l'animal. Pour cela, la séquence codante de l'Onzin (339 pb, gi:21105852) est insérée en aval du promoteur EF1 α et en amont d'une séquence polyadénylation, dans un plasmide contenant les éléments indispensables à son amplification en bactérie (ColE1 Origin) ainsi qu'un gène de sélection (résistance à l'ampicilline). Ce plasmide est ensuite digéré par des enzymes de restriction en amont du promoteur et en aval de la séquence de polyadénylation, générant ainsi le transgène d'une longueur totale de 1750 pb, contenant :

- le promoteur ubiquiste de EF1 α
- la séquence codante pour l'Onzin de souris
- une queue PolyA stabilisant l'ARNm

Il est purifié sur gel d'agarose (Kit QiaEx, Qiagen) et dilué dans l'eau.

2/ Construction de la souris TG-Onzin par transgénèse additionnelle

La souris TG-Onzin a été construite en collaboration avec l'Atelier de Transgénèse du DRDC (CEA), dirigé par Muriel Vernet. Le transgène est micro-injecté dans des zygotes B6D2F2 qui sont ensuite transférés dans 12 femelles pseudogestantes B6CBAF1. Ces femelles ont donné naissance à 73 souriceaux, dont 10 ont intégré une ou plusieurs copies du transgène dans leur génome (criblage par PCR sur ADN génomique, Polymerase Chain Reaction).

3/ Criblage des descendance

Le criblage des souris TG-Onzin est effectué dans un premier temps par PCR et dans un deuxième temps par Western blot, ces deux techniques étant complémentaires. En effet, alors que la PCR permet de mettre en évidence l'intégration du transgène dans le génome des souris transgéniques, le Western blot permet d'évaluer l'expression de la protéine codée par ce transgène. Ainsi, sur les dix lignées positives après criblage par PCR (présence du transgène dans le génome), seules deux lignées sont positives en Western blot (Onzin sur-exprimée dans tous les organes, en comparaison à la souris négative en criblage par PCR).

Les deux lignées TG-Onzin obtenues sont « backcrossées » au minimum deux fois dans un fond génétique C57Bl/6J avant d'être utilisées dans les différentes expériences.

CHAPITRE III. *Résultats*

**A. EXPRESSION ET LOCALISATION DE L'ONZIN DANS DIFFERENTS ORGANES
MURINS ET HUMAINS**

1/ Introduction

Au moment où ce travail a débuté, les seules données disponibles relatives à l'expression tissulaire de l'Onzin provenaient des banques EST (Expressed Sequence Tag). Les données recueillies étaient en faveur d'une expression ubiquitaire du gène codant pour cette protéine. Les marqueurs de séquence exprimée (ou EST) sont des séquences partielles d'ADN complémentaire obtenues par transcription des ARN messagers présents dans un échantillon biologique. Ils permettent le séquençage à grande échelle des ARN messagers tissulaires, afin d'évaluer les taux d'expression des gènes. Si cette technique comporte un grand nombre d'avantages pour l'étude rapide de la dynamique des systèmes biologiques, elle présente tout de même de nombreux biais dont il faut tenir compte lorsque l'on veut obtenir des informations relatives à l'expression tissulaire d'un gène. En particulier, les informations présentes dans les banques EST ne traduisent pas rigoureusement des différences d'expression entre les ARN messagers. En effet, par un processus complexe appelé « normalisation » (Soares et al. 1994), le nombre de copies de gènes fortement et modérément exprimés est réduit à celui de gènes rares dans les banques. Afin d'apporter plus de précision à ces informations de type « haut débit », nous avons étudié la distribution de l'Onzin par Northern blot à partir d'extraits d'ARN issus de différents tissus humains.

Par ailleurs, les Northern blots n'apportent pas d'informations définitives sur la distribution réelle de la protéine. En effet, de nombreux travaux ont montré qu'il n'y avait pas toujours une bonne corrélation entre niveaux d'ARNm et abondance de la protéine correspondante (MacKay et al. 2004). Dans le but de caractériser la nouvelle protéine que l'on venait de découvrir par analyse protéomique, nous avons donc entrepris l'étude de sa distribution tissulaire et cellulaire dans différents organes de rats et de souris. Nous verrons dans cette partie que l'Onzin est présente en

quantités inégales et dans des cellules bien spécifiques, au niveau des différents organes murins.

Dans cette partie, nous avons accordé une attention toute particulière à la localisation de l'Onzin dans le foie de souris, étant donné que la plus grande partie de l'étude de la distribution intracellulaire de la protéine sera réalisée à partir de cet organe. Pour cette étude, nous devons comparer les caractéristiques biochimiques du compartiment auquel l'Onzin est associée à celles des différents compartiments des cellules de résidence de cette protéine. Or, la découverte de l'Onzin dans un extrait de foie total ne suffit pas à identifier les cellules dans lesquelles l'Onzin est présente. En effet, comme nous l'avons présenté en introduction de ce travail, le foie est un organe relativement hétérogène. Les hépatocytes (ou cellules parenchymateuses) occupent 78 % du volume total du foie. Les cellules non parenchymateuses, c'est-à-dire les cellules endothéliales, cellules de Kupffer, cellules de Ito et cellules du canal biliaire occupent 6 % de ce volume, les 16 % restant correspondant aux espaces vides. La morphologie, la fonction et la composition des différents constituants des cellules hépatiques varient considérablement d'un type cellulaire à l'autre. Il est donc important, pour pouvoir essayer de rapprocher les caractéristiques biochimiques du compartiment de résidence de l'Onzin à un compartiment connu, de tout d'abord identifier la population cellulaire dans laquelle l'Onzin est localisée dans le foie. Nous avons donc étudié la distribution de l'Onzin dans cet organe en faisant appel à des approches morphologique et biochimique. Par ailleurs, nous avons complété cette étude grâce à la construction d'une souris transgénique dans laquelle l'Onzin est exprimée de façon ubiquiste, sous le contrôle d'un promoteur fort.

2/ Expression de l'Onzin dans différentes lignées cellulaires et différents tissus humains

Nous avons évalué les niveaux d'expression de l'Onzin dans différents organes et lignées cellulaires humaines par Northern blot. Pour cela, nous avons incubé deux membranes commerciales différentes (BD biosciences, #7760-1 et #636903), sur lesquelles sont présents des ARN extraits de différents tissus humains, en présence

d'une sonde marquée au ^{32}P , correspondant à la séquence totale de l'ADNc de l'Onzin humaine. Au préalable, nous avons pris soin de vérifier, *in silico*, la spécificité de la sonde, en interrogeant les bases de données relatives à l'espèce humaine à l'aide du logiciel BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Le résultat de l'hybridation de la sonde radiomarquée sur la membrane BD-7760-1 est présenté dans la figure 12. Cette membrane correspond à un Northern blot classique réalisé à partir des ARN extraits de huit organes humains : le cœur, le cerveau, le placenta, le poumon, le foie, le muscle squelettique, le rein et le pancréas. Suite à l'hybridation de la sonde radiomarquée décrite plus haut, une bande unique d'environ 1700 paires de bases apparaît dans trois organes : le foie, le placenta et, de façon moindre, le poumon.

Si ce résultat ne suffit pas à affirmer avec certitude que la sonde que nous avons employée est spécifique de l'Onzin, il apporte néanmoins des informations qui nous permettent de le penser : (1) une seule bande apparaît dans différentes pistes du Northern, même après une exposition longue (une semaine) ; (2) le signal apparaissant dans la piste correspondant au placenta va dans le sens de données déjà publiées sur l'Onzin humaine qui précisent que le messenger codant pour cette protéine est présent en grande quantité dans cet organe (Galaviz-Hernandez et al. 2003) ; (3) nous savons, sur la base de nos données expérimentales sur l'Onzin, que la protéine est présente dans le foie de rat. Etant donné l'homologie forte entre les protéines humaine et murine, il n'est pas surprenant de constater que l'ARN encodant l'Onzin soit présent dans le foie humain.

Nous avons ensuite voulu élargir l'étude de l'expression de l'Onzin à un plus grand nombre de tissus et lignées cellulaires d'origine humaine. Pour cela, nous avons hybridé la même sonde que celle utilisée précédemment sur une deuxième membrane commerciale sur laquelle sont greffés les ARN extraits de 75 tissus humains différents. Pour la conception de cette membrane, les ARN ont été déposés en quantités égales et immobilisés sous forme de spots. Cette membrane ne permet donc pas d'apporter d'information quant à la taille de l'ARN mis en évidence par la sonde.

Cependant, nous avons montré que, dans les huit organes humains testés précédemment, la sonde ne s'hybride qu'à un seul ARN, fort probablement celui de l'Onzin. Nous pouvons donc envisager que ce soit également le cas pour le matériel biologique présent sur cette deuxième membrane.

La figure 13 montre que l'Onzin est différentiellement exprimée par les organes et les différentes lignées cellulaires chez l'Homme. C'est dans l'ensemble du tube digestif et dans les organes et cellules de type immunitaire que l'expression de l'Onzin est la plus forte. Une très faible quantité d'ARN de l'Onzin est détectée dans le cerveau, avec une expression un peu plus prononcée au niveau de l'hypophyse. L'Onzin est également exprimée dans le placenta, dans le poumon et le foie, en accord avec les informations amenées par l'hybridation de la première membrane. Cependant, bien que les signaux soient un peu faibles, les niveaux d'expression relative de l'Onzin au sein de ces trois organes sont différents de ce qu'ils étaient suite à l'hybridation de la première membrane (figure 12). Une normalisation approximative des quantités d'ARN déposées sur ces deux membranes est sans doute à l'origine de ces variations.

Nous avons été surpris par la présence de signal au niveau de deux contrôles négatifs de la membrane, l'ADN humain et l'ADN bactérien. Pour expliquer le signal présent sur le spot correspondant à l'ADN humain, nous pouvons envisager que la sonde que nous avons employée, qui correspond à la totalité de la séquence codante de l'Onzin, se soit hybridée sur la région de l'ADN qui comporte un des exons du gène codant pour cette protéine. Par ailleurs, le génome humain renferme, au niveau de chromosome 12 (séquence 12.131105400-12.131105850), un pseudogène de l'Onzin présentant 94 % d'homologie avec 88 % de la séquence codante pour la protéine (bases 40 à 348 de l'ADNc de l'Onzin). Il est donc également envisageable que la sonde se soit hybridée au pseudogène de l'Onzin.

En revanche, nous ne pouvons expliquer la présence de signal au niveau du spot d'ADN bactérien. En effet, la séquence de la sonde hybridée ne semble proche d'aucun gène de E.Coli, d'après des recherches à l'aide du logiciel BLAST dans les banques de données.

3/ Distribution de l'Onzin dans différents organes et tissus de souris

Comme nous l'avons précisé en introduction de ce travail, les séquences d'Onzin humaine et murine sont identiques à 82 %. Pour l'étude de la distribution tissulaire de la protéine dans l'organisme, nous avons utilisé des tissus prélevés chez la souris.

L'abondance relative de l'Onzin dans 34 organes de souris a été évaluée par Western blot à l'aide de trois anticorps polyclonaux différents dirigés contre des peptides N et C-terminaux de la protéine murine. Ces trois anticorps ont tous révélé une bande à 14 kDa dans différents organes, avec quelques bandes de plus hauts poids moléculaires. Ces bandes sont considérées comme du signal non spécifique, étant donné que : (1) elles ne correspondent pas à la taille attendue de l'Onzin et (2) elles varient selon la nature des anticorps polyclonaux.

La figure 14 montre que l'Onzin est présente en quantités très variables dans les différents organes de souris. L'Onzin est majoritairement présente dans les organes immunitaires et dans l'ensemble du tractus intestinal, où l'expression du gène est la plus forte chez l'Homme.

L'analyse du sérum de rat et de souris nous a permis de mettre en évidence une différence notable de distribution de l'Onzin entre ces deux animaux. En effet, nous avons détecté la présence de l'Onzin dans le sérum de rat et non dans le sérum de souris. Comme le montre la figure 15, l'Onzin présente dans le sérum de rat est associée aux fractions les plus légères du gradient de KBr. Ces fractions ont un aspect opalescent et une couleur légèrement orangée. Ces caractéristiques correspondent aux lipoprotéines telles qu'elles ont été décrites par Poumay et collaborateurs dans leurs

06" □□5/ Distribution de l'Onzin des fractions N et P après centrifugation
uthor>Poumay</Author><Year>1985</Year><RecNum>214</RecNum><MDL><R
EFERENCE_TYPE>0</REFERENCE_TYPE><REFNUM>214</REFNUM><ACC
SSION_NUMBER>4086949</ACCESSION_NUMBER><VOLUME>26</VOLU
ME><NUMBER>12</NUMBER><YEAR>1985</YEAR><DATE>Dec</DATE><
TITLE>Rapid preparative isolation of concentrated low density lipoproteins and of
lipoprotein-deficient serum using vertical rotor gradient
ultracentrifugation</TITLE><PAGES>1476-

80</PAGES><AUTHORS><AUTHOR>Poumay,

4/ Distribution de l'Onzin dans différentes cellules de rate de souris

L'étude par Western blot que nous venons de présenter a mis en évidence la présence importante de l'Onzin dans l'ensemble des organes du système immunitaire. Nous avons voulu préciser cette localisation en étudiant la distribution relative de la protéine entre les principales cellules composant le système immunitaire de la souris.

Pour cela, nous avons comparé la quantité d'Onzin présente dans la rate de différentes souris : des souris sauvages, des souris CD3 $\epsilon^{-/-}$ (Malissen et al. 1995) dépourvues de lymphocytes T et des souris RAG2 $^{-/-}$ (Shinkai et al. 1992) ne possédant ni lymphocytes B, ni lymphocytes T. Comme le montre la figure 16, la population cellulaire dans laquelle est majoritairement présente l'Onzin n'est pas lymphocytaire. En effet, l'Onzin est présente en quantité comparable dans la rate des différentes souris qui diffèrent par leur type ou nombre de lymphocytes.

Nous avons ensuite isolé, par cytométrie en flux, les cellules de la rate de souris sauvages en trois populations : les lymphocytes B, les lymphocytes T et les cellules « non B, non T ». La figure 16 confirme les résultats précédents : bien qu'elle soit présente dans les lymphocytes B et T, l'Onzin de la rate de souris est majoritairement localisée dans une population cellulaire non lymphocytaire.

5/ Localisation cellulaire de l'Onzin déterminée par des approches morphologiques

Nous avons étudié, par immunohistochimie et immunofluorescence, la localisation cellulaire de l'Onzin dans l'intestin grêle, le thymus, la rate, le rein et le foie, de souris et de rat.

a) L'intestin grêle

Les Northern et Western blots réalisés à partir d'échantillons humains et murins montrent que l'Onzin est à la fois fortement exprimée et présente

abondamment dans l'ensemble du tube digestif. Nous avons voulu préciser notre étude sur la distribution de l'Onzin dans cet ensemble d'organes à un niveau cellulaire et avons choisi pour cela la portion la plus longue du tube digestif, l'intestin grêle. Dans cet organe, l'Onzin suit exactement la même distribution chez le rat que chez la souris ; nous présenterons donc uniquement les résultats obtenus chez la souris.

L'intestin est un tube musculaire tapissé d'une muqueuse, constituée d'un épithélium spécialisé reposant sur une *lamina propria* et d'une fine couche musculuse responsable des mouvements intestinaux localisés et du maintien de l'architecture de la muqueuse. La muqueuse subit des transitions brutales à quatre niveaux du tractus intestinal, permettant la séparation de l'intestin en quatre régions fonctionnellement différentes.

L'intestin grêle est constitué d'une muqueuse de type « absorptive ». Cette muqueuse présente de nombreuses projections en forme de doigts vers la lumière intestinale. L'épithélium qui la constitue est formé d'une seule couche de cellules (entérocytes) terminées, en leur pôle apical, par de nombreux microvillis formant la bordure en brosse.

La figure 17 permet de localiser l'Onzin sur des coupes d'intestin grêle de souris. Sur l'ensemble des images, nous pouvons remarquer que l'Onzin se partage entre la bordure en brosse et le cytosol des cellules formant les villosités de cet organe. Les images obtenues par immunofluorescence permettent la visualisation simultanée des noyaux, de l'Onzin et de la protéine endo-lysosomale LAMP1 sur une même coupe de tissu. Dans le cytosol des entérocytes, le signal dû à la présence de l'Onzin est réparti en deux entités. La première et la plus importante, est située dans la région subnucléaire de ces cellules polarisées. Le signal observé est proche de celui obtenu après coloration histologique de l'appareil de Golgi dans le même type de cellules (figure 18). La deuxième fraction d'Onzin située dans le cytoplasme des entérocytes colocalise partiellement avec LAMP1, dans les régions apicales des cellules.

b) Le rein

Comme nous venons de le montrer, l'Onzin semble abondante au niveau de la bordure en brosse de l'intestin grêle. Nous avons voulu savoir si l'Onzin suivait également une telle distribution dans un organe possédant le même type de bordure en brosse, le rein. L'étude de la distribution de l'Onzin dans le rein a été réalisée chez le rat et chez la souris. Etant donné que la localisation de l'Onzin dans le rein de ces deux animaux diffère, nous présentons ici les deux séries de résultats.

Le rein est constitué de plusieurs millions d'unités fonctionnelles et structurales élémentaires, les néphrons, chacun formé d'un corpuscule rénal et d'un long tubule rénal sinueux. Les corpuscules sont situés dans la région périphérique du rein, appelée « cortex ». Les tubules rénaux, tapissés de cellules épithéliales, s'étendent du corpuscule jusqu'au canal collecteur de l'urine. Ils sont segmentés en quatre régions morphologiquement et fonctionnellement différentes : le tubule proximal, la boucle de Henlé, le tubule distal et enfin le tubule collecteur.

Le tubule proximal rénal est formé de cellules épithéliales qui sont terminées, au niveau de leur pôle apical, par de hauts microvilli formant une épaisse bordure en brosse. Comme le montre la figure 19, chez la souris, l'Onzin est présente dans le cytoplasme de ces cellules. Chez le rat, la situation est totalement différente : c'est au niveau de la bordure en brosse que se localise principalement l'Onzin.

c) La rate

L'étude par Northern et Western blots fait ressortir un deuxième ensemble d'organes dans lequel l'Onzin est présente en quantité importante : les organes immunitaires. Nous avons donc également voulu aborder l'étude de la distribution de l'Onzin dans ces organes par une approche morphologique.

La rate est un organe immunitaire secondaire situé dans la partie supérieure de l'abdomen. Macroscopiquement, elle apparaît constituée de petits nodules de couleur

blanche, appelés « pulpe blanche », inclus dans une matrice rouge, appelée « pulpe rouge ». La pulpe blanche est formée par des agrégats lymphoïdes, alors que la pulpe rouge, formant la plus grosse partie de l'organe, est principalement constituée de tissus vasculaires.

La figure 20 montre que l'Onzin est majoritairement présente au niveau de la pulpe blanche de la rate de souris et plus précisément au sein des macrophages de la zone marginale et des lymphocytes B.

d) Le thymus

Le thymus est constitué de nombreux lobules, chacun divisé en deux zones distinctes : une région médullaire formant le cœur du lobule et une région corticale formant la périphérie. Comme le montre la figure 21, c'est au niveau de la zone médullaire du thymus que l'Onzin est la plus abondante. Cette région est constituée d'une trame épithéliale importante, peuplée de diverses cellules, principalement des cellules présentatrices d'antigènes intervenant dans le processus de maturation des lymphocytes T. Au centre de la région médullaire du thymus sont présents les corpuscules de Hassall, constitués de lamelles concentriques. Ils naissent par agrégation de groupes de cellules épithéliales kératinisées, probablement par un processus de dégénérescence. La figure 21 montre l'abondance de l'Onzin au niveau de ces corpuscules.

e) Le foie

Le foie est constitué de millions d'unités identiques, les lobules, dont l'architecture et la morphologie sont détaillées dans le chapitre « Introduction bibliographique » de ce document.

Nous avons étudié la distribution de l'Onzin dans le foie de rat, de souris contrôles (C57Bl/6) et de souris transgéniques exprimant l'Onzin sous le contrôle

d'un promoteur ubiquiste fort. Ces souris, appelées « TG-Onzin », surexpriment donc l'Onzin dans l'ensemble des cellules de leur organisme.

Les figures 22a, 22c et 23a montrent que l'Onzin, absente des cellules parenchymateuses, est localisée dans une population cellulaire minoritaire du foie de rat et de souris, située entre les hépatocytes. A plus fort grossissement (figures 22b, 22d et 23b), nous pouvons remarquer que la grande majorité des cellules contenant l'Onzin sont grandes, de forme étoilée et sont localisées dans les sinusoides : ce sont les cellules de Kupffer. Ces cellules sont les macrophages résidents du foie, participant, entre autre, au système de défense de cet organe. Par ailleurs, l'Onzin est présente dans quelques cellules endothéliales, qui forment la paroi des sinusoides du foie.

La résolution du signal obtenu par immunocytochimie n'est pas suffisante pour permettre d'évaluer la localisation intracellulaire de l'Onzin dans les cellules de Kupffer. La résolution du signal est, en revanche, augmentée par la technique d'immunofluorescence. La figure 23 montre que l'Onzin est localisée dans le cytoplasme des cellules de Kupffer. L'aspect granuleux du signal laisse penser que l'Onzin pourrait être associée à des vésicules ou à des agrégats cytoplasmiques.

Dans les souris TG-Onzin, l'Onzin reste présente en grande quantité dans les cellules de Kupffer, mais un nouveau signal apparaît au niveau des hépatocytes (figures 22e-f, 23c-d). Ce signal prend tantôt la forme de grains, tantôt de fines lignes longeant un ou plusieurs côtés de la cellule. Il s'agit de la portion de la membrane plasmique de l'hépatocyte formant le canalicule biliaire, appelée pôle « apical » ou « canaliculaire », qui apparaît différemment en fonction du plan de coupe (voir chapitre I : Introduction bibliographique).

6/ Séparation des cellules du foie par perfusion de collagénase

Nous avons voulu préciser, par une approche autre que morphologique, la localisation cellulaire de l'Onzin dans le foie de souris. Pour cela, les cellules du foie

ont été séparées par perfusion *in situ* de collagénase, une enzyme capable de dégrader les matrices extracellulaires (voir chapitre « Techniques expérimentales »). Les cellules hépatiques ainsi dissociées les unes des autres ont ensuite été isolées par centrifugation, en tirant profit de la différence de taille importante qui existe entre les hépatocytes et les cellules sinusoidales. L'observation microscopique des cellules isolées a révélé l'absence de cellules sinusoidales contaminantes dans la préparation de cellules parenchymateuses (cellules de grande taille), mais la présence d'une quantité non négligeable d'hépatocytes dans la fraction correspondant aux cellules sinusoidales (petites cellules rondes). Nous avons ensuite comparé, par Western blot, les niveaux d'Onzin présents dans une même quantité de protéines issues des deux populations cellulaires isolées.

Comme le montre la figure 24A, l'Onzin est très majoritairement présente dans les cellules sinusoidales du foie de souris. Ce résultat est cohérent avec les informations apportées par l'approche morphologique utilisée précédemment. Cependant, une faible quantité d'Onzin est détectée dans la fraction correspondant aux cellules parenchymateuses. Nous ne pouvons pas complètement exclure la possibilité que la présence de l'Onzin au sein de ces cellules du foie soit due à la contamination de cet échantillon par des cellules non parenchymateuses que nous n'aurions pas détecté par observation morphologique après centrifugation.

Nous avons ensuite étudié la distribution cellulaire de l'Onzin dans le foie de souris TG-Onzin, après séparation des cellules du foie par la même méthode que celle appliquée pour les souris contrôles. Comme le montre la figure 24B, l'Onzin est présente en quantité importante dans les hépatocytes et dans les cellules sinusoidales issues de ces souris, puisqu'un dépôt de six fois moins de matériel que celui déposé pour les souris sauvages suffit à la détection de la protéine par Western blot. A quantité de protéines totales égales, l'Onzin est, comme pour les souris sauvages, plus abondante dans les cellules sinusoidales que dans les hépatocytes.

7/ Discussion

Au commencement de ce travail, les seules données relatives à l'expression de l'Onzin dans l'organisme de différentes espèces étaient fournies par les banques EST. L'Onzin y était décrite comme une protéine ubiquiste, autant chez l'Homme que chez la souris. Dans cette partie, nous avons approfondi l'étude de l'expression tissulaire de l'Onzin chez l'Homme et de sa distribution dans différents organes de rat et de souris.

Ces études soulignent une bonne corrélation entre l'expression du gène codant l'Onzin dans les tissus humains et la présence de la protéine dans les différents organes de souris : l'Onzin se localise dans les tissus où elle est synthétisée. Cette caractéristique n'est pas partagée par toutes les protéines. Par exemple, certaines protéines peuvent utiliser la voie sanguine pour circuler à travers l'organisme et rejoindre leurs cellules cibles. Ainsi, les travaux de Bartholeyns et collaborateurs (Bartholeyns et al. 1975) montrent que les lysosomes de foie de rat renferment des quantités importantes de RNase neutre, identique à celle synthétisée dans le pancréas et originaire de la circulation sanguine.

L'absence d'Onzin dans le sérum de souris est en accord avec la cohérence qu'il existe entre les données d'expression et la distribution de la protéine dans les organes de cet animal. Par ailleurs, la présence de l'Onzin dans la bordure en brosse des tubules proximaux rénaux du rat et non de la souris, peut s'expliquer par le fait que cette protéine est présente dans le sérum de rat. En effet, du fait de sa petite taille (12 kDa), l'Onzin sérique est capable de passer le filtre glomérulaire et ainsi se retrouver dans l'urine primitive. En théorie, cette urine primitive entre dans le tubule rénal où il va subir une série de réabsorptions sélectives d'eau et de diverses molécules comme les protéines. Les travaux de Glass et al. (Glass et al. 1985) ont montré la réabsorption de lipoprotéines au niveau de la bordure en brosse des tubules proximaux rénaux, là où l'Onzin est localisée chez le rat. Nous n'avons pas concentré nos travaux sur ce point précis et nous ne pouvons démontrer expérimentalement de lien direct entre la présence de l'Onzin dans le sérum et sa localisation au niveau de la bordure en brosse du tubule proximal chez le rat. Cependant, le fait que chez la souris,

l'Onzin, absente du sérum, n'est pas présente au niveau de cette membrane épithéliale absorptive, rend ce lien envisageable.

Notre étude de l'expression et de la distribution de l'Onzin dans différents organes souligne la localisation de l'Onzin dans des cellules bien spécifiques au sein de certains tissus. En effet, la protéine se localise principalement dans les cellules immunitaires et dans les cellules épithéliales intestinales.

Les travaux d'immunohistochimie et d'immunofluorescence que nous avons réalisés à partir de foie de rat et de souris ont permis de mettre en évidence la présence importante de l'Onzin dans les cellules de Kupffer, macrophages du foie. Bien que la présence de l'Onzin n'ait pas été détectée dans les hépatocytes de souris par ces techniques, l'analyse des différentes cellules hépatiques séparées par perfusion de collagénase laisse penser que l'Onzin pourrait être présente en faibles quantités dans les cellules parenchymateuses. Dans le foie de souris transgéniques sur-exprimant la protéine dans l'ensemble des cellules de l'organisme, l'Onzin reste abondante dans les cellules de Kupffer, mais elle est également visible dans une région bien particulière de l'hépatocyte : la membrane plasmique apicale constituant les parois du canalicule biliaire. Nous pouvons émettre deux hypothèses pour expliquer ce nouveau signal. La première serait de dire que l'Onzin visualisée au niveau de cette membrane particulière de l'hépatocyte est un artefact dû à l'expression d'une protéine exogène dans ces cellules. Ainsi, la membrane canaliculaire de l'hépatocyte, dépourvue d'Onzin chez la souris sauvage, comporterait une nouvelle protéine dans les souris TG-Onzin. La deuxième hypothèse envisageable serait d'imaginer que le signal visualisé dans le foie des souris transgéniques équivaut qualitativement au signal présent dans le foie d'une souris sauvage, mais qu'il y est simplement quantitativement plus marqué. La souris transgénique nous aurait donc permis de rehausser le signal « Onzin » dans le foie de souris, sans en modifier la localisation. Cette hypothèse est appuyée par la quantification du signal « Onzin » obtenu par Western blot après séparation des cellules du foie par perfusion de collagénase. En effet, nous avons montré que le rapport entre l'Onzin de la fraction hépatocytaire et l'Onzin de la fraction non parenchymateuse, est quasiment le même dans les souris

sauvages que dans les souris transgéniques. Ainsi, on ne visualiserait pas l'Onzin dans les hépatocytes de souris sauvages parce que la protéine n'y serait pas présente en quantité suffisante pour y être détectée par immunohistochimie ou immunofluorescence.

Le pôle biliaire de l'hépatocyte est structurellement identique au pôle apical des entérocytes de l'intestin grêle. Sa surface totale est augmentée par la présence de microvilli dont la structure est maintenue par des filaments d'actine. Nous avons montré, par immunohistochimie et immunofluorescence, que l'Onzin est présente en quantité importante au niveau de la bordure en brosse de l'intestin grêle. Si sa présence au niveau de cette membrane spécialisée est en relation avec la fonction qu'elle pourrait jouer dans ce type de membrane, alors sa localisation au niveau du pôle apical de l'hépatocyte, que l'on soupçonne étant donné le signal « Onzin » obtenu dans le foie de la souris TG-Onzin, serait tout à fait justifiée. Ce point particulier a été étudié en analysant la distribution de l'Onzin après fractionnement subcellulaire de foie de souris par centrifugation (voir partie B du chapitre « Résultats »).

L'étude en immunofluorescence réalisée sur le foie et l'intestin de souris permet de visualiser l'Onzin à un niveau subcellulaire, de manière beaucoup plus précise que par immunohistochimie. Dans les entérocytes de l'intestin grêle, l'Onzin est présente au niveau de la bordure en brosse et dans le cytoplasme. Cette fraction cytoplasmique est séparée en deux entités ; la première, située dans la région apicale de l'entérocyte (connue pour sa richesse en lysosomes), colocalise partiellement avec LAMP1, marqueur endo-lysosomal. La deuxième, située juste au dessus du noyau de la cellule polarisée, semble être associée à l'appareil de Golgi. En effet, le signal ressemble fortement à celui que l'on obtient par coloration spécifique de l'appareil de Golgi en histologie (figure 18). Cependant, pour des raisons techniques, nous n'avons pas pu confirmer cela par un comarquage avec un anticorps dirigé contre une protéine du réseau trans-golgien (TGN38).

Ainsi, l'Onzin située dans le cytoplasme des entérocytes serait associée dans les deux cas à un organite intracellulaire ; la colocalisation de la protéine avec LAMP1

est un argument supplémentaire, qui s'ajoute à celui de la découverte de l'Onzin dans un échantillon de lysosomes de foie de rat par spectrométrie de masse, pour envisager un lien entre la protéine et le lysosome.

Dans le foie de souris, l'Onzin est détectée par immunofluorescence dans les cellules de Kupffer. Le signal obtenu est clairement localisé dans le cytoplasme de la cellule et prend un aspect granuleux supportant l'idée de l'association de la protéine avec des vésicules ou des agrégats dans le cytoplasme des cellules de Kupffer. Malheureusement, nous n'avons pas pu obtenir des images satisfaisantes de la protéine LAMP1 sur les coupes de foie, l'autofluorescence (probablement due à la nature du tissu) gênant la visualisation du signal spécifique.

Dans la partie qui suit, nous allons approfondir l'étude de la localisation intracellulaire de l'Onzin dans le foie, par une approche biochimique utilisant des techniques de centrifugation.

**B. DISTRIBUTION DE L'ONZIN APRES FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE DE
FOIE DE SOURIS PAR CENTRIFUGATION**

1/ Introduction

L'analyse protéomique qui a mené, au laboratoire, à la découverte de l'Onzin a été réalisée à partir d'un échantillon enrichi en lysosomes. Cet échantillon a été préparé par des techniques de centrifugation à partir d'un homogénat de foie de rat. Cependant, les résultats d'une telle analyse ne peuvent être considérés comme une preuve définitive de la localisation de la protéine dans les lysosomes hépatiques. En effet, on ne peut complètement exclure l'éventualité de la localisation de l'Onzin dans un compartiment qui contaminerait la préparation de lysosomes dans laquelle l'Onzin a été identifiée.

Nous avons donc voulu étudier de manière fine la localisation intracellulaire de la protéine à partir du foie. Pour des raisons stratégiques, nous avons cependant décidé d'utiliser le foie de souris et non le foie de rat, dans nos différentes expériences. La première motivation de cette décision est venue de la découverte de l'Onzin dans le sérum de rat, alors qu'elle est absente du sérum de souris. Aussi, l'utilisation du foie de rat dans nos différentes expériences aurait compliqué l'interprétation de nos résultats, puisqu'il aurait fallu tenir compte de « deux » Onzins d'origine différente : une Onzin endogène synthétisée par les cellules de l'organe et une possible Onzin exogène, pouvant arriver dans le foie par endocytose de l'Onzin circulante. Le sérum de souris étant dépourvu de cette protéine, il est possible de travailler sur cet organe sans tenir compte d'une Onzin exogène.

La deuxième raison pour laquelle nous avons décidé d'utiliser la souris et non le rat pour nos expériences vient de notre désir d'utiliser la souris transgénique TG-Onzin pour différentes expériences et de comparer les résultats obtenus chez cette souris avec ceux obtenus chez un animal sauvage.

Pour cela, nous séparerons les différents compartiments subcellulaires présents dans l'homogénat de foie en tirant profit de leurs caractéristiques physico-chimiques, comme la taille ou la densité. Ensuite, nous comparerons la distribution de l'Onzin dans les différentes fractions, à celle de marqueurs protéiques de compartiment intracellulaires dans le but de chercher un marqueur dont le profil de distribution serait identique à celui de l'Onzin. Cependant, il nous faudra tenir compte dans nos interprétations des résultats qui ont été obtenus lors de l'étude de la distribution cellulaire de l'Onzin dans le foie de souris : l'Onzin se localise principalement dans une population minoritaire du foie, les cellules de Kupffer et sans doute également dans une région particulière de la membrane plasmique de la population majoritaire, les hépatocytes.

Chacune des expériences sera réalisée à partir de foies issus de deux types de souris : des souris sauvages de souche C57Bl/6 et des souris transgéniques TG-Onzin.

2/ Distribution de l'Onzin dans les différentes fractions isolées par centrifugation différentielle

Après homogénéisation du foie de la souris, nous avons utilisé la centrifugation différentielle, afin de séparer les compartiments intracellulaires présents dans l'homogénat en cinq fractions, selon le schéma de de Duve (1955).

Comme le montre la figure 25, le profil de distribution de l'Onzin dans les différentes fractions est semblable chez la souris transgénique et chez la souris témoin. Ce profil ne ressemble à aucun des marqueurs étudiés. L'Onzin se retrouve en grande partie dans la fraction N, contenant environ 50 % de l'activité de la phosphodiesterase alcaline (marqueur de la membrane plasmique). Cependant, une quantité presque aussi importante d'Onzin est retrouvée dans les fractions M et L, contenant environ 70 % des lysosomes du foie, comme le montre la distribution de la β -hexosaminidase. Comme c'est le cas pour cette hydrolase acide, le taux de purification le plus élevé de l'Onzin est atteint dans la fraction L. Par ailleurs, aucune trace d'Onzin n'est

retrouvée dans la fraction S contenant les éléments non sédimentables du foie (dans les conditions de centrifugation permettant l'obtention de la fraction P).

Nous avons ensuite étudié le comportement de l'Onzin des fractions N, M, L et P, après centrifugation isopycnique, en utilisant différents types de gradients. Les fractions M et L ont été analysées ensemble, par préparation d'une fraction ML, dite « mitochondriale totale », rassemblant la majeure partie des lysosomes du foie.

3/ Distribution de l'Onzin de la fraction mitochondriale totale après centrifugation isopycnique

a) Gradients de Percoll

L'aspect granuleux du signal « Onzin » obtenu par immunofluorescence dans les cellules de Kupffer, peut s'expliquer par l'association de l'Onzin à des vésicules ou à des agrégats cytoplasmiques. Pour trancher entre ces deux possibilités, nous avons utilisé des gradients de Percoll préparés avec des solutions de différentes concentrations en saccharose (0.25, 0.50 et 0.75 M). La densité d'équilibration d'une vésicule varie dans ces différents gradients en fonction de la densité du saccharose et de la pression osmotique exercée par ce soluté si la vésicule est osmotiquement active. En revanche, la densité d'équilibration d'un agrégat restera constante, quelle que soit la concentration en saccharose utilisée.

La figure 26 montre que la densité de l'Onzin contenue dans une fraction ML, soit environ 50 % de l'Onzin totale du foie, varie entre les trois gradients de Percoll préparés : la distribution de cette protéine glisse vers le fond du gradient lorsque la concentration en saccharose augmente. La β -galactosidase, la catalase et la cytochrome oxydase, contenues dans des organites vésiculaires différents, sont également affectées par l'augmentation de concentration en saccharose et se déplacent vers le fond du gradient.

b) Gradients de saccharose et de Nycodenz

Comme nous l'avons précisé précédemment, la densité des organites intracellulaires dépend aussi bien de leurs propriétés intrinsèques que des propriétés du milieu dans lequel ils sont immergés. Le saccharose est le milieu le plus couramment utilisé pour former des gradients de densité. Ce milieu présente la particularité de pouvoir passer à travers la membrane de certains organites, modifiant ainsi leurs caractéristiques biochimiques, comme leur densité. Par ailleurs, étant donné son faible poids moléculaire, le saccharose possède un pouvoir osmotique élevé qui va également entraîner une augmentation de la densité intrinsèque de certains organites au cours de leur migration dans un gradient.

La figure 27 présente les distributions de l'Onzin et de différents marqueurs de compartiments subcellulaires dans des fractions ML réalisées à partir de foies de souris sauvage ou transgénique, après centrifugation dans des gradients de saccharose. Dans les deux cas, l'Onzin s'équilibre autour d'une densité de $1,17 \text{ g/cm}^3$, loin des lysosomes représentés par la β -hexosaminidase et de Rab7, marqueur des endosomes tardifs. En revanche, sa distribution est quasiment superposable à celles de la phosphodiesterase alcaline et de CD98, deux marqueurs de la membrane plasmique.

Lorsque des organites osmotiquement actifs sont placés dans un gradient de Nycodenz, leur densité d'équilibre va être modifiée par rapport à ce qu'elle était dans un gradient de saccharose, principalement en raison de la différence de pression osmotique de ces deux composés (Wattiaux and Wattiaux-De Coninck 1983). Les lysosomes, par exemple, s'équilibrent autour d'une densité de $1,21 \text{ g/cm}^3$ dans un gradient de saccharose et $1,13 \text{ g/cm}^3$ dans un gradient de Nycodenz. Les mitochondries, quant à elles, sont beaucoup moins affectées par le changement de milieu de gradient. En effet, leur densité moyenne passe de $1,20 \text{ g/cm}^3$ dans un gradient de saccharose à $1,16 \text{ g/cm}^3$ en gradient de Nycodenz. La séparation de ces deux organites est donc plus évidente dans un gradient de Nycodenz que dans un gradient de saccharose.

Les profils de distribution, en gradients de Nycodenz, de l'Onzin et des compartiments intracellulaires analysés précédemment dans les gradients de saccharose sont représentés dans la figure 28. Nous pouvons constater que l'Onzin est, cette fois-ci, nettement séparée des membranes plasmiques représentées par la phosphodiesterase. Par ailleurs, les écarts de densité entre l'Onzin, la β -hexosaminidase et Rab7 sont légèrement augmentés.

Notons, ici aussi, que la densité d'équilibration de l'Onzin d'une fraction mitochondriale totale est la même, que la fraction ML provienne d'un foie de souris sauvage ou de souris transgénique.

4/ Effet de la digitonine sur l'Onzin des fractions L et P

Les compositions lipidique et protéique des membranes biologiques varient dans les différents compartiments intracellulaires, procurant à chaque membrane des propriétés biochimiques et structurales uniques.

Le cholestérol est un lipide distribué de façon hétérogène entre les différents compartiments subcellulaires. Si les membranes plasmiques du foie sont particulièrement riches en cholestérol, les membranes du réticulum endoplasmique en sont, quant à elles, quasiment dépourvues (Bretscher and Munro 1993).

Nous avons voulu savoir si le compartiment auquel l'Onzin est associée renferme du cholestérol. Pour cela, nous avons incubé, *in vitro*, une fraction LP avec de la digitonine. Par un mécanisme non encore parfaitement élucidé, cette molécule s'intercale dans les membranes contenant du cholestérol, induisant une augmentation de leur densité (Wibo et al. 1981).

Dans la figure 29, nous avons établi les distributions de l'Onzin et de marqueurs de différents compartiments subcellulaires, avant et après traitement d'une fraction LP par la digitonine, cette fraction LP ayant été préparée à partir de foies de souris sauvage et transgénique. Chez les deux animaux, la digitonine entraîne un glissement des distributions de l'Onzin, de la phosphodiesterase alcaline, de CD98 et peut être de Rab7, vers les densités plus lourdes du gradient de saccharose. Ce résultat nous montre que l'Onzin est associée à un compartiment contenant du cholestérol.

Avant traitement, la distribution de la β -hexosaminidase est parfaitement unimodale, établie autour d'une densité de $1,20 \text{ g/cm}^3$. La digitonine modifie de façon évidente cette distribution, provoquant le déplacement d'environ 45 % de la protéine autour d'une densité de $1,14 \text{ g/cm}^3$, sans modifier celle des 55 % restant. Ce déplacement peut probablement être attribué à l'activation d'une partie des lysosomes par la digitonine, c'est-à-dire à leur rupture et la fuite de leur contenu dans le milieu dans lequel la fraction LP initiale a été préparée. Dans cette logique, lorsque cette fraction déposée en surface du gradient est soumise à un champ centrifuge, les granules migrent dans le gradient, entraînant la portion d'hydrolases qu'ils contiennent, alors que les hydrolases ayant été libérées sous l'effet de la digitonine restent dans les premières fractions du gradient.

Notons qu'il n'y a pas de différences notables entre les distributions des différentes protéines dans les gradients établis à partir de foie de souris sauvage ou transgénique.

5/ Distribution de l'Onzin des fractions N et P après centrifugation isopycnique

Lors de l'homogénéisation du foie, les membranes plasmiques des cellules hépatiques sont déchirées. Les petits fragments générés forment des petites particules sphériques qui, du fait de leur petite taille, vont sédimenter dans la fraction P. Les fragments de grande taille vont sédimenter dans la fraction N. Ainsi, comme le montre la distribution de la phosphodiesterase alcaline dans un fractionnement total obtenu par centrifugation différentielle, ce sont les fractions N et P qui renferment la majeure partie de la membrane plasmique des cellules hépatiques (voir figure 25).

Etant donné l'abondance de l'Onzin dans ces deux fractions, nous avons voulu comparer sa distribution à celle de marqueurs de la membrane plasmique dans des gradients de densité établis à partir des fractions N et P. Même si ces fractions ne renferment qu'une quantité minimale de lysosomes, nous avons également établi dans ces gradients la distribution de certaines hydrolases acides.

La fraction N est composée, comme nous venons de le dire, de longs fragments de membrane plasmique, mais également de noyaux et de débris cellulaires. Les membranes forment souvent des agrégats de grande taille qui restent en suspension dans le milieu d'homogénéisation. Ainsi, la séparation des différents composants en gradient de densité est peu aisée et n'est jamais aussi nette que lorsque l'on utilise des fractions ML ou P. Les noyaux, en revanche, peuvent être facilement séparés du reste des constituants de la fraction N dans un gradient de Nycodenz. C'est ce type de gradient que nous avons utilisé pour analyser les fractions nucléaires des foies de souris sauvage et transgénique. Comme le montre la figure 30, dans le foie des deux types de souris, les distributions de l'Onzin, la β -hexosaminidase, la β -glucuronidase et la phosphodiesterase alcaline se superposent dans les régions peu denses du gradient de Nycodenz. En revanche, la séparation entre ces protéines et les noyaux est nette, ces derniers s'équilibrant dans les régions lourdes du gradient.

Nous avons établi les distributions de l'Onzin et des mêmes marqueurs que ceux utilisés pour le gradient N dans un gradient de densité de saccharose à partir d'une fraction P. Comme le montre la figure 31, le profil de distribution de ces différentes protéines est similaire chez la souris sauvage et chez la souris TG-Onzin. Cependant, hormis celles de la β -hexosaminidase et de la β -glucuronidase, les distributions des protéines ne se superposent pas dans ces gradients : l'Onzin s'équilibre à une densité inférieure à celles des autres protéines étudiées.

6/ Discussion

Dans cette partie, nous avons étudié la distribution intracellulaire de l'Onzin dans le foie de souris sauvages et de souris transgéniques, par le biais de techniques de centrifugation.

L'association de près de la moitié de l'Onzin hépatique à des structures qui sédimentent dans la fraction « mitochondriale totale » est en accord à la fois avec les données de protéomique et les données morphologiques. En effet, l'analyse par spectrométrie de masse nous a permis de proposer l'association de l'Onzin à un

compartiment de type lysosomal et l'étude par immunofluorescence a suggéré son association à des vésicules ou des agrégats présents dans le cytoplasme des cellules de Kupffer.

D'après notre étude par centrifugation différentielle, l'autre moitié de l'Onzin totale du foie sédimente dans les fractions N et P. La différence des distributions, dans un gradient de Nycodenz, de l'Onzin et des noyaux contenus dans la fraction N écarte la possibilité que l'Onzin soit présente en quantité suffisante dans ce compartiment subcellulaire pour expliquer l'origine du signal « Onzin » de cette fraction. Nous suggérons que ce signal soit dû à l'association de l'Onzin aux membranes plasmiques d'un ou de plusieurs types de cellules du foie.

L'étude, par immunofluorescence, de la distribution intracellulaire de l'Onzin dans le foie de souris sauvages n'a pas permis la mise en évidence de l'Onzin au niveau de la membrane plasmique des cellules de Kupffer (figure 23). De plus, les travaux de Amar-Cortese et collaborateurs (Amar-Cortese et al. 1985) ont montré que chez le rat, les membranes plasmiques des cellules de Kupffer sédimentent principalement dans la fraction P et non dans la fraction N, contrairement à celles des hépatocytes. Si l'on suppose que cette propriété des membranes des cellules de Kupffer de rat est conservée chez la souris, alors la présence massive de l'Onzin dans la fraction N ne peut s'expliquer par la localisation de cette protéine au niveau de la membrane plasmique des cellules de Kupffer. De plus, le nombre de cellules endothéliales contenant l'Onzin semble négligeable, d'après notre étude en immunohistologie. Nous ne pouvons donc pas raisonnablement proposer que la quantité de signal « Onzin » présent dans la fraction N provienne de la présence de cette protéine à la membrane plasmique de ces cellules. Nous proposons donc, pour expliquer la présence importante de l'Onzin dans la fraction N, que la protéine soit présente à la membrane plasmique des cellules parenchymateuses et plus précisément au niveau de leur pôle apical formant les parois du canalicule biliaire (voir chapitre « Introduction bibliographique »).

Imaginons néanmoins une autre hypothèse possible pour expliquer la localisation d'une telle quantité d'Onzin dans la fraction N issue d'un foie de souris sauvage, hypothèse qui ne reposerait pas sur la présence de l'Onzin au niveau de la membrane plasmique des hépatocytes. Par exemple, imaginons que l'Onzin est uniquement présente dans les cellules de Kupffer, mais dans un compartiment « particulier » sédimentant en grande partie dans la fraction N. Dans ce cas, l'apparition d'une « nouvelle » Onzin, située au niveau de la membrane des hépatocytes formant le canalicule biliaire dans le foie des souris transgéniques, devrait se répercuter de manière évidente sur le profil de sédimentation de l'Onzin dans les différentes fractions isolées par centrifugation différentielle. En effet, comme le montrent les travaux de Evans (Evans 1980), les membranes spécialisées formant le canalicule biliaire sédimentent très largement dans la fraction N. Ceci devrait se traduire par l'augmentation drastique de la portion d'Onzin sédimentant dans cette fraction, lorsque le fractionnement est réalisé à partir de foie de souris transgénique, comparativement au foie de souris sauvage. Or, ce n'est pas ce que mettent en évidence les travaux de Evans et al. (Evans et al. 1980) : le même pourcentage d'Onzin est retrouvé dans les fractions N de foies issues des deux types de souris. Ceci vient donc appuyer à nouveau l'hypothèse proposant que l'origine de la présence massive de l'Onzin dans la fraction N, chez la souris sauvage, soit la localisation de cette protéine au niveau de la membrane plasmique des hépatocytes et, plus précisément, au niveau des parois du canalicule biliaire.

Comme nous l'avons expliqué précédemment, après homogénéisation du foie, les membranes plasmiques sédimentent dans les fractions N et P. Nous avons discuté de la localisation de l'Onzin dans la fraction N et l'avons assimilée à la portion de protéine associée à la membrane plasmique des cellules parenchymateuses. Cependant, volontairement, nous n'avons pas inclus dans notre discussion la portion d'Onzin sédimentant dans la fraction P, qui représente environ 15 % de l'Onzin totale du foie. En effet, en plus des petits fragments de membrane plasmique, la fraction P contient des fragments de réticulum endoplasmique, des fragments de l'appareil de Golgi, des vésicules d'endocytose précoce et d'autres organites minoritaires. La comparaison de la distribution de l'Onzin d'une fraction P, dans un gradient de

densité, avec différents marqueurs de compartiments subcellulaires n'a pas permis l'identification du compartiment de résidence de cette protéine présente dans cette fraction. Par ailleurs, la différence de densité entre l'Onzin et la phosphodiesterase alcaline ne suffit pas à exclure l'association de l'Onzin à la membrane plasmique. En effet, la phosphodiesterase alcaline est répartie de façon relativement homogène sur la membrane plasmique des cellules du foie (Bartles et al. 1985). L'Onzin que nous soupçonnons être associée à la membrane plasmique, quant à elle, pourrait être concentrée au niveau des canalicules biliaires. Il n'est donc pas surprenant, dans ce cas, de constater une différence de densité entre l'Onzin et la phosphodiesterase alcaline, puisque ces protéines seraient localisées dans des régions de la membrane plasmiques aux propriétés physicochimiques différentes (Evans 1970).

Nous ne pouvons pas, au vue des données dont nous disposons sur l'Onzin à l'issue du fractionnement par centrifugation différentielle ou isopycnique, déterminer l'origine de la portion d'Onzin associée à cette fraction P.

Le traitement *in vitro* d'une fraction LP par la digitonine provoque le glissement de la distribution de l'Onzin vers le fond du gradient. Ce résultat nous indique que le compartiment auquel l'Onzin de la fraction LP est associée contient du cholestérol. Aussi, nous pouvons exclure l'association éventuelle de l'Onzin au réticulum endoplasmique, puisque ce compartiment ne contient pas ou peu de cholestérol (Bretscher and Munro 1993), le rendant insensible au traitement à la digitonine (Wibo et al. 1981). Cependant, l'effet de la digitonine sur la densité de l'Onzin ne nous permet pas de déduire la nature exacte du compartiment de résidence de cette protéine. En effet, si ce traitement a un effet connu sur la densité des membranes plasmiques (Wibo et al. 1981), il est également susceptible d'affecter la densité de tous les organites intracellulaires qui contiennent du cholestérol.

L'étude en immunofluorescence que nous avons présentée dans la première partie de ce travail a montré l'association de l'Onzin à des structures pouvant être considérées comme des vésicules ou des agrégats cytoplasmiques, dans les cellules de Kupffer. Afin de tester ces deux possibilités, nous avons analysé la distribution de l'Onzin de la fraction ML dans des gradients de Percoll préparés dans des solutions de

saccharose de différente concentration. La densité de l'Onzin varie, dans ces gradients, en fonction de la concentration en saccharose utilisée, comme c'est le cas pour les marqueurs du lysosome, du peroxyosome et de la mitochondrie. Cette information démontre que l'Onzin de la fraction ML, soit environ la moitié de l'Onzin hépatique totale, est associée à une vésicule et non un agrégat cytoplasmique.

Les expériences de fractionnement subcellulaire que nous avons présentées dans cette partie ont été réalisées à partir d'homogénats de foie. Ces homogénats représentent une mixture d'organites issus des différentes cellules composant cet organe. A première vue, les résultats que nous avons obtenus nous permettent de dire que l'Onzin n'est pas associée au lysosome. En effet, en analysant, dans trois types de gradients différents, des fractions ML contenant la majeure partie des lysosomes du foie, la densité d'équilibration de l'Onzin est toujours différente de celle des marqueurs lysosomaux considérés. Cependant, il est indispensable de prendre certaines précautions dans l'interprétation de nos données, puisque les marqueurs utilisés ne sont pas forcément représentatifs de la population cellulaire hépatique dans laquelle l'Onzin se localise, c'est-à-dire les cellules de Kupffer. En particulier, nous pouvons envisager que les lysosomes des cellules de Kupffer aient une densité différente de celle des lysosomes des hépatocytes. Notons cependant que des travaux réalisés chez le rat ont montré que les lysosomes des cellules sinusoidales étaient légèrement plus denses que ceux des cellules parenchymateuses (Jadot et al. 1986), ce qui n'irait pas dans le sens de l'hypothèse proposée ci-dessus, étant donné que l'Onzin est associée à un compartiment plus « léger » que les lysosomes hépatiques tels qu'ils sont caractérisés par les marqueurs que nous avons étudiés (figure 25 et 26). Cependant, nos travaux ont été réalisés chez la souris et, à notre connaissance, aucune donnée n'est actuellement disponible concernant la différence éventuelle de densité des lysosomes des différentes cellules hépatiques chez cet animal.

Afin de poursuivre notre étude visant à mieux cerner l'éventuelle relation qui existe entre l'Onzin et le lysosome, nous avons eu recours à une technique visant à modifier spécifiquement la densité de cet organite dans les cellules sinusoidales. Le

comportement de l'Onzin suite à un tel traitement sera étudié par centrifugation dans la partie qui suit.

**C. EFFET D'UNE INJECTION D'INVERTASE SUR LA VITESSE DE SEDIMENTATION
ET LA DENSITE DU COMPARTIMENT AUQUEL L'ONZIN EST ASSOCIEE**

1/ Introduction

L'Onzin a été découverte initialement dans un échantillon de lysosomes de foie de rat. L'étude en centrifugation différentielle, qui apporte une information « quantitative » que l'analyse de spectrométrie de masse n'avait pas apportée, montre qu'une fraction importante de l'Onzin est associée à la fraction « mitochondriale totale » contenant la majeure partie des lysosomes du foie. Par ailleurs, l'étude par immunofluorescence de la localisation de l'Onzin dans le foie de souris, montre que l'Onzin est associée à des vésicules internes des cellules de Kupffer. Ces données nous ont amené à envisager l'association de l'Onzin du foie à un compartiment de la voie endocytaire.

La distribution de l'Onzin après centrifugation isopycnique montre, quant à elle, que cette protéine n'est pas localisée dans la population de lysosomes hépatiques majoritaires. Etant donné que l'Onzin est principalement présente dans les cellules de Kupffer (cellules minoritaires du foie), les résultats obtenus par centrifugation isopycnique ne peuvent être interprétés comme une démonstration définitive de la localisation de l'Onzin dans un compartiment non-lysosomal du foie. Pour approfondir la possibilité de la localisation de l'Onzin dans le lysosome des cellules de Kupffer, il faudrait disposer d'un marqueur des lysosomes de ces cellules, ou d'une molécule capable de provoquer le déplacement spécifique de ces lysosomes en gradient de densité.

La capacité de reconnaissance puis d'endocytose d'une molécule par une cellule du foie est déterminée par le type de récepteur présent à sa membrane plasmique. Le foie est notamment caractérisé par une distribution hétérogène de certains récepteurs aux glycoprotéines, menant ainsi à la capture spécifique des glycoprotéines circulantes, en fonction de la nature de leur chaîne glucidique

(Hubbard et al. 1979). Le récepteur à mannose ou N-acétylglucosamine, par exemple, est localisé majoritairement sur les cellules sinusoïdales (cellules endothéliales et cellules de Kupffer), puisque ce sont ces cellules qui sont principalement responsables de l'endocytose des protéines mannosylées comme l'ahexosamino-orosomucoïde et la β -glucuronidase (Achord et al. 1978, Schlesinger et al. 1978, Hubbard et al. 1979). Une autre protéine mannosylée, l'invertase de levure, a été utilisée pour étudier les compartiments endocytaires des cellules sinusoïdales (Jadot et al. 1985, Jadot et al. 1986).

L'invertase de levure est une protéine de 270 kDa composée de deux sous-unités identiques de 60 kDa. Chaque sous-unité est liée de façon covalente à neuf chaînes de types « haut mannose » longues de 26 à 54 résidus mannose (Lehle et al. 1979), représentant 50 à 60 % de la masse totale de la protéine. L'abondance de ces groupements glucidiques est probablement à l'origine de l'étonnante stabilité de l'invertase dans le foie lorsque celle-ci est injectée à l'animal par voie intraveineuse. En effet, les travaux de Jacques (1968) ont montré que l'activité de l'invertase de levure, une fois la protéine injectée, avait dans le foie une demi-vie de 5,6 jours. Par ailleurs, Parkes (1980) montre que l'activité de l'invertase injectée dans le foie persiste d'autant moins longtemps que la protéine est déglycosylée.

Dans ses travaux réalisés *in vivo* chez le rat, Michel Jadot utilise l'invertase de levure pour étudier la voie endocytaire des cellules non parenchymateuses du foie. Il montre notamment que cette protéine passe par plusieurs compartiments intermédiaires de la voie endocytaire avant de rejoindre le lysosome (Jadot et al. 1986). Tirant profit de l'étonnante stabilité de l'invertase dans le foie, il montre, par des techniques de centrifugation, que lorsque l'invertase est injectée en quantité importante à un rat, elle s'accumule massivement dans les lysosomes des cellules qui l'ont capturée, provoquant l'augmentation drastique de leur densité (Jadot et al. 1985).

Comme nous l'avons vu précédemment, le terme « cellules sinusoïdales » regroupe les cellules endothéliales, les cellules de Kupffer, les cellules de Ito et les « Pit Cells ». Dans cette partie, nous emploierons ce terme pour parler des cellules

cibles de l'invertase, c'est-à-dire les cellules endothéliales et les cellules de Kupffer, cellules majoritaires (77 %) de ce groupe (Blouin et al. 1977).

Dans le travail qui suit, nous avons utilisé les données disponibles sur l'endocytose de l'invertase par le foie de rat (Jadot et al. 1985, Jadot et al. 1986) pour étudier la distribution intracellulaire de l'Onzin dans le foie de souris.

Dans un premier temps, l'invertase a été employée comme traceur de la voie endocytaire des cellules sinusoidales, parmi lesquelles se trouvent les cellules de résidence de l'Onzin. Pour cela, nous avons injecté une « faible » quantité d'invertase à une souris afin de suivre le chemin de cette protéine dans le foie total par des techniques de centrifugation. La distribution de l'Onzin a été comparée à celle de l'invertase tout au long de son parcours dans la voie endocytaire.

Ensuite, nous avons induit un déplacement des lysosomes des cellules sinusoidales vers le fond d'un gradient de densité en injectant une dose « massive » d'invertase à la souris. Le comportement de l'Onzin a été observé dans ce même gradient afin de répondre à la question de la localisation éventuelle de l'Onzin dans le lysosome.

2/ Distribution cellulaire de l'invertase capturée par le foie de souris

Plusieurs travaux réalisés chez le rat montrent que les cellules non parenchymateuses sont inégalement affectées par l'injection d'invertase. Par exemple, Hubbard et collaborateurs (Hubbard et al. 1979) précisent que les cellules endothéliales capturent deux à six fois plus de protéines mannosylées que les cellules de Kupffer. Nous voulons étudier les effets de l'injection de l'invertase chez la souris. Or, à notre connaissance, aucune donnée de la littérature n'apporte d'information précise quant à la participation relative des cellules de Kupffer et des cellules endothéliales dans l'endocytose de protéines mannosylées chez ce rongeur.

Afin de savoir si l'on peut envisager d'utiliser l'invertase dans le but d'étudier la localisation intracellulaire de l'Onzin dans le foie de souris, il est nécessaire de vérifier si, après injection de doses légères ou lourdes d'invertase à l'animal, la

protéine atteint les cellules de Kupffer. Nous avons pour cela réalisé une étude morphologique de la distribution de l'invertase dans le foie de souris 12 h après injection intraveineuse de deux différentes doses : une dose dite « légère » de 25 µg et une dose « lourde » de 2 mg. Comme le montre la figure 32, l'invertase est présente dans les cellules endothéliales et dans les cellules de Kupffer quelle que soit la dose injectée.

3/ Distribution de l'invertase après centrifugation différentielle

a) Injection d'une dose « légère »

Dans leurs travaux, Jadot et collaborateurs montrent que l'injection de 25 µg d'invertase pour 100 g de poids de rat permet de tracer la voie endocytaire des cellules non parenchymateuses sans modifier la densité des différents compartiments (Jadot et al. 1985). Nous avons donc commencé par injecter 8 µg d'invertase à une souris adulte (pesant environ 25 g) afin d'utiliser cette protéine comme traceur. Cette dose s'est avérée suffisante pour repérer la protéine en Western blot. Cependant, une telle dose imposait de charger sur le gel une quantité importante de protéines totales, ce qui entraînait une perturbation de l'étape de migration sur gel SDS-PAGE. Afin de pouvoir plus aisément détecter l'invertase par Western blot dans les différentes fractions de foie de souris isolées après centrifugation différentielle ou isopycnique, nous avons augmenté la dose injectée à 25 µg. Auparavant, nous avons vérifié que cette dose supérieure ne modifiait pas la densité des lysosomes en gradient de densité 180 minutes ou 12 h après injection, comparativement à la densité à laquelle ils s'équilibraient lorsque 8 µg d'invertase étaient injectés (résultats non montrés).

Nous avons alors étudié la localisation intracellulaire de l'invertase dans le foie de souris en comparant, dans les différentes fractions isolées par centrifugation différentielle, sa distribution à celle de différents marqueurs, à des temps croissants après son injection (25 µg). La figure 33 montre que l'invertase se trouve associée à des organites qui sédimentent de plus en plus vite lorsque le temps séparant l'injection et le sacrifice de l'animal augmente. Cinq minutes après l'injection, environ 40 % de

l'invertase du foie est déjà associée à la fraction ML contenant la majeure partie des lysosomes du foie. Une quantité non négligeable d'invertase (20 %) est cependant associée à la fraction P, contenant 25 % de l'activité de la phosphodiesterase alcaline, marqueur de la membrane plasmique. Lorsque 10 minutes se sont écoulées entre l'injection et le sacrifice de l'animal, la portion d'invertase associée à la fraction ML atteint environ 80 %. L'invertase adopte alors un profil de distribution comparable à celui de la β -galactosidase dans le fractionnement, avec un enrichissement important dans la fraction L. L'invertase contenue dans la fraction P devient dès lors négligeable. Ce profil « ML » est maintenu 30, 180 minutes et 12 h après l'injection.

Notons que la quantité d'invertase, évaluée par Western blot, reste stable 12 h après l'injection.

b) Injection d'une dose « lourde »

La dose « alourdissante » d'invertase a été choisie selon des critères qui seront décrits un peu plus loin dans cette partie.

La figure 34 présente l'effet d'une injection « lourde » (2 mg) sur la vitesse de sédimentation des compartiments qui renferment l'invertase. Elle montre que lorsqu'une quantité importante d'invertase est injectée à l'animal, le coefficient de sédimentation des granules contenant la protéine injectée augmente : le pic d'invertase qui est présent dans la fraction L lorsqu'une faible quantité de protéine est injectée disparaît ; la quasi-totalité de l'invertase s'associe avec la fraction M. Elle acquiert donc un profil de type mitochondrial, semblable à celui adopté par l'OSCP (Olygomycin Sensitivity Conferring Protein, voir (MacLennan and Asai 1968, MacLennan and Tzagoloff 1968). Les hydrolases lysosomales dont nous avons déterminé le profil de distribution ne réagissent pas de la même manière à l'injection d'une dose importante d'invertase. En effet, les distributions de la β -mannosidase et de l'arylsulfatase ne sont pas affectées par ce traitement, alors que celui de la β -hexosaminidase l'est. Le pic d'activité que présente normalement la β -hexosaminidase dans la fraction L disparaît et, comme l'invertase, elle acquiert un profil semblable à

celui de l'OSCP. La différence de réponse des différentes hydrolases à l'injection d'invertase vient probablement de l'hétérogénéité des lysosomes du foie. La vitesse de sédimentation de l'Onzin, quant à elle, n'est pas affectée par l'injection d'une dose lourde d'invertase.

4/ Distribution de l'invertase après centrifugation isopycnique

a) Injection d'une dose « légère »

Des gradients de densité de saccharose ont été réalisés à partir des fractions où l'invertase est présente en quantité significative, soit les fractions P et ML, 5 minutes après injection et la fraction ML, 5, 10, 30, 180 minutes et 12 heures après injection.

La figure 35 représente le chemin suivi par l'invertase dans un gradient de densité en fonction du temps écoulé entre son injection et le sacrifice de l'animal. 5 minutes après l'injection, la distribution de l'invertase est superposée à celle de l'Onzin dans les gradients réalisés à partir des fractions ML et P. Les distributions des deux protéines restent superposées dans le gradient ML, à la densité moyenne de 1,17 g/cm³, jusqu'à 10 minutes après l'injection, puis l'invertase s'éloigne de l'Onzin en descendant progressivement dans le gradient. L'invertase finit par s'équilibrer, dès 180 minutes après l'injection, à la densité 1,22 g/cm³, légèrement supérieure à celle des lysosomes représentés par la β -galactosidase.

b) Injection d'une dose « lourde »

Nous avons injecté trois quantités différentes d'invertase pour alourdir les lysosomes des cellules qui la capturent. La plus faible quantité « lourde » injectée a été choisie en tenant compte des doses utilisées par Jadot et al. dans leurs travaux sur le rat, en les adaptant à la souris comme nous l'avions fait pour calculer les doses « légères » à injecter. Chez le rat, ces auteurs injectent 0,9 mg d'invertase par 100 g de rat pour obtenir l'alourdissement des lysosomes. Nous avons donc commencé par injecter 0,2 mg à une souris adulte de 20-25 g. Cependant, cette quantité injectée n'a

pas provoqué l'augmentation de la densité des lysosomes contenant l'invertase. En effet, la densité d'équilibration de l'invertase injectée à 0,2 mg ou à 25 µg (dose légère) est identique dans un gradient de densité de saccharose réalisé à partir de la fraction ML. Nous avons donc augmenté progressivement la quantité injectée, jusqu'à obtenir un déplacement significatif de l'invertase en gradient de saccharose. Ce déplacement est comparable à celui obtenu chez le rat par Jadot et al. lorsque l'on injecte 0,85 mg ou 2 mg d'invertase à l'animal.

La figure 36 représente l'effet d'une injection « lourde » d'invertase, 12 h après l'injection, sur la densité des granules qui la contiennent, de la β-hexosaminidase et du compartiment auquel l'Onzin est associée. Suite à une injection massive, la distribution de l'invertase glisse vers le fond du gradient et s'équilibre autour d'une densité de 1,26 g/cm³. Cependant, la courbe présente un épaulement vers la densité à laquelle s'équilibre l'invertase lorsqu'elle est injectée en faible quantité, soit 1,22 g/cm³. La distribution de la β-hexosaminidase, qui est unimodale (autour de 1,21 g/cm³) lorsqu'une faible quantité d'invertase est injectée, devient bimodale, avec l'apparition d'un nouveau pic se superposant à celui de l'invertase injectée en dose massive (1,26 g/cm³). Comme le proposent Jadot et collaborateurs pour l'arylsulfatase, ce glissement d'une partie de la β-hexosaminidase vers le fond du gradient pourrait correspondre à un enrichissement de cette enzyme dans les lysosomes des cellules non parenchymateuses (Jadot et al. 1986).

La densité d'équilibration de l'Onzin n'est, quant à elle, aucunement modifiée par cette injection.

5/ Discussion

Nous avons utilisé l'invertase de levure dans le but d'investiguer l'hypothèse de la localisation de l'Onzin dans les lysosomes des cellules de Kupffer. En effet, les travaux de Jadot et collaborateurs (Jadot et al. 1985, Jadot et al. 1986) démontrent qu'après injection intraveineuse d'invertase à des rats, la protéine injectée (1) aboutit dans les lysosomes des cellules qui la capturent, c'est-à-dire les cellules sinusoidales, après avoir transité dans les différents compartiments de la voie endocyttaire et (2)

provoque une augmentation significative de la densité de ces lysosomes lorsque la quantité injectée est importante. L'étude de la distribution cellulaire de l'Onzin dans le foie ayant révélé la localisation majoritaire de l'Onzin dans les cellules de Kupffer, l'injection de l'invertase devrait modifier la densité du compartiment de résidence de l'Onzin si celle-ci est localisée dans le lysosome.

La majorité des travaux concernant la capture sélective dans le foie des protéines mannosylées, comme l'invertase, ont été réalisés chez le rat et non chez la souris. Ces travaux montrent que ces protéines glycosylées sont capturées spécifiquement par les cellules sinusoidales (Achord et al. 1978, Schlesinger et al. 1978, Hubbard et al. 1979) et majoritairement par les cellules endothéliales (Hubbard et al. 1979). Le rôle des cellules de Kupffer dans la capture des protéines à mannose ou N-acétylglucosamine semble donc mineur dans le foie de rat, comparativement au rôle joué par les cellules endothéliales dans ce processus. Cependant, les travaux de Parise et collaborateurs (Parise et al. 1982) montrent que la situation est en réalité plus complexe et que les cellules de Kupffer jouent un rôle essentiel dans ce type de capture.

Nous avons donc cherché à connaître la distribution cellulaire de l'invertase dans le foie de souris après son injection intraveineuse en quantités « légère » et « lourde ». Cette étude montre que la protéine exogène est présente à la fois dans les cellules endothéliales et dans les cellules de Kupffer, 12 h après l'injection, quelle que soit la dose injectée.

Cependant, il faut rester prudent quant à l'interprétation de ces données morphologiques qui n'apportent pas de réelles informations « quantitatives ». En effet, si la méthode de détection par immunohistochimie a permis de détecter la présence de l'invertase dans les cellules endothéliales et dans les cellules de Kupffer, elle ne permet pas de distinguer de façon fiable une différence éventuelle de la quantité d'invertase respectivement internalisée par ces deux types cellulaires. Nous pouvons dès lors nous demander si l'invertase injectée a atteint les cellules de Kupffer en quantité suffisante pour (1) être considérée comme un traceur de leur voie endocytaire

après injection d'une dose légère et (2) pouvoir provoquer un alourdissement de leurs lysosomes après injection d'une dose massive.

Nous avons injecté une quantité faible d'invertase et suivi son chemin dans un gradient à des temps croissants après injection, dans le but d'utiliser cette protéine exogène comme traceur de la voie intracellulaire des cellules dans lesquelles est située l'Onzin. Cela n'est évidemment possible que si l'invertase injectée a réellement atteint ces cellules. Nous avons visualisé l'invertase dans les cellules de Kupffer et dans les cellules endothéliales 12 h après son injection en quantité légère. Or, nous avons vu, lors de l'étude cinétique de la distribution de l'invertase dans un gradient de densité, que la densité d'équilibre de la protéine exogène ne variait pas entre 180 minutes et 12 heures après son injection. De plus, cette distribution reste unimodale à tous les temps considérés. Ainsi, il est fort probable que l'invertase que l'on visualise dans des gradients de densité, à des temps croissants après son injection (5, 10, 30, 180 minutes et 12 heures), soit localisée dans des granules issus des deux types cellulaires dans lesquelles l'invertase est visualisée 12 h après son injection. L'invertase passe donc par les différents compartiments intracellulaires des cellules de Kupffer ; à ce titre, elle peut être considérée comme un traceur de la voie endocytaire des cellules contenant l'Onzin.

La distribution de l'invertase injectée en faible quantité à des temps croissants séparant son injection et le sacrifice de l'animal suit le profil d'une protéine endocytée comme le décrivent Jadot et collaborateurs (1986), autant dans les différentes fractions isolées par centrifugation différentielle, que dans des gradients de densité. En utilisant de l'invertase radiomarquée à l'iode, ces auteurs montrent qu'une minute après son injection, l'invertase est associée en majeure partie à la fraction P et proposent que cela témoigne de sa présence au niveau de « vésicules pinocytaires ». Pour notre part, nous ne disposons pas d'information concernant la distribution de l'invertase dans le foie de souris une minute après son injection. En effet, la méthode de détection de l'invertase que nous avons employée (Western blot) n'est pas assez sensible pour permettre de visualiser les faibles quantités de protéine présentes dans les différentes fractions isolées par centrifugation différentielle ou isopycnique, une minute après son

injection. Néanmoins, la distribution de l'invertase que nous mettons en évidence à des temps croissants après son injection suit, globalement, un profil très proche de celui décrit par Jadot et collaborateurs chez le rat. L'invertase est initialement en partie associée à la fraction P, puis acquiert un profil de type lysosomal, c'est-à-dire qu'elle s'associe à la fraction mitochondriale totale, avec un enrichissement important dans la fraction L.

En centrifugation différentielle, le profil de distribution de l'Onzin dans les fractions M, L et P est proche de celui de l'invertase aux temps les plus courts suivant son injection (dose légère), soit 5 et 10 minutes. Lorsque l'on fractionne en gradients de densité P et ML obtenues à ces temps précoces, la distribution de l'Onzin est même superposable à celle de l'invertase. Si nous considérons que l'Onzin sédimentant dans ces fractions M, L et P est associée à la voie endocytaire, l'hypothèse la plus vraisemblable que nous puissions envisager serait que l'invertase passe, au début de son cheminement intracellulaire dans la voie endocytaire, par la vésicule à laquelle est associée l'Onzin. Cela signifierait alors que l'Onzin est localisée au niveau des vésicules d'endocytose précoce. Une des expériences à envisager pour confirmer cette hypothèse serait l'étude en microscopie électronique de la distribution intracellulaire de l'Onzin et de l'invertase dans les cellules de Kupffer, à différents temps séparant l'injection de l'invertase et le sacrifice de l'animal. Il faudrait dans ce cas réaliser, pour chaque point de cinétique, un comarquage permettant de visualiser les deux protéines dans le même échantillon, en utilisant des anticorps secondaires couplés à des billes d'or de différents diamètres. Nous n'avons pas pu, jusqu'à présent, obtenir des résultats satisfaisants en microscopie électronique (sur des coupes de foie) avec nos différents anticorps dirigés contre des peptides de l'Onzin. Une telle expérience n'a donc pas pu être réalisée.

Nous pouvons néanmoins déduire de ces expériences utilisant l'invertase comme traceur de la voie endocytaire des cellules sinusoidales une information importante : la densité à laquelle s'équilibre l'Onzin dans un gradient établi à partir d'une fraction mitochondriale totale ne correspond pas à celle des lysosomes des cellules de Kupffer. En effet, lorsque l'invertase a atteint le lysosome, elle se distribue

autour d'une densité de $1,22 \text{ g/cm}^3$ dans un gradient saccharose. Or, l'Onzin s'équilibre à une densité de $1,17 \text{ g/cm}^3$ dans le même type de gradient.

Notons ici que ces résultats semblent être en contradiction avec les images que nous avons présentées en première partie de ce travail, montrant une colocalisation partielle de LAMP1 et de l'Onzin dans les entérocytes (figure 17). Cependant, LAMP1 n'est pas un marqueur exclusif du lysosome. En effet, cette protéine est également présente dans les endosomes tardifs (Griffiths et al. 1988), qui pourraient avoir une densité différente de $1,22 \text{ g/cm}^3$ dans les cellules sinusoidales du foie. Par ailleurs, les cellules sinusoidales du foie sont très différentes des entérocytes. Nous ne pouvons par conséquent pas exclure que la distribution intracellulaire de l'Onzin puisse être différente dans des cellules aussi éloignées que les entérocytes et les cellules de Kupffer.

L'interprétation de l'expérience pour laquelle une dose alourdissante d'invertase a été injectée nécessite de prendre certaines précautions. En effet, si nous disposons d'une somme d'éléments nous permettant de penser que l'invertase injectée à dose légère peut être considérée comme un traceur de la voie endocytaire des cellules de Kupffer, nous ne pouvons pas affirmer avec certitude que cette protéine, injectée massivement, est endocytée en quantités suffisantes par les cellules de Kupffer pour provoquer l'augmentation de la densité de leurs lysosomes. Notre prudence se justifie notamment par le fait que les données actuellement disponibles dans la littérature montrent que le récepteur à mannose, responsable de la capture de l'invertase injectée, est préférentiellement situé sur les cellules endothéliales (Hubbard et al. 1979). Par ailleurs, nos résultats expérimentaux montrent que si la majeure partie de l'invertase injectée en dose lourde se distribue autour d'une densité $1,26 \text{ g/cm}^3$ en gradient de saccharose, une quantité non négligeable de protéine injectée s'équilibre autour d'une densité de $1,22 \text{ g/cm}^3$, soit une densité comparable à celle à laquelle s'équilibre l'invertase injectée en dose légère (figure 36). Aussi, nous ne pouvons exclure la possibilité que la population de lysosomes alourdis par l'injection d'invertase corresponde aux lysosomes des cellules endothéliales, qui auraient endocyté la plus grosse partie de la protéine et que la quantité plus faible d'invertase

s'équilibrant à une densité de $1,22 \text{ g/cm}^3$ soit présente dans les lysosomes des cellules de Kupffer, moins aptes à capturer la protéine injectée.

Cependant, même en supposant que la densité des lysosomes des cellules de Kupffer n'ait pas été affectée par le traitement lourd d'invertase, il reste évident que la densité d'équilibration de l'invertase, injectée en dose faible ou en dose massive, est très différente de celle de l'Onzin. Ceci démontre que l'Onzin n'est pas associée aux granules dans lesquels se situe l'invertase à des temps longs après son injection, c'est-à-dire les lysosomes.

D. EFFET D'UNE INJECTION DE TRITON WR-1339 SUR L'ONZIN

1/ Introduction

Nos expériences basées sur l'utilisation de l'invertase démontrent que l'Onzin n'est pas localisée dans les lysosomes des cellules de Kupffer. Ces résultats viennent contredire l'hypothèse à partir de laquelle nos travaux sur l'Onzin ont débuté. Nous avons donc voulu confirmer ces résultats en utilisant une autre molécule capable d'induire la modification de la densité des lysosomes des cellules hépatiques.

Dans les années 1960, Robert Wattiaux a étudié l'influence de l'injection de Triton WR-1339 sur les lysosomes hépatiques de rat (Wattiaux et al. 1963 ; Wattiaux 1966). Ce détergent non ionique provoque dans un premier temps une augmentation considérable de la lipémie et de la synthèse de cholestérol (Bucher 1959). Présent dans la circulation sanguine de l'animal, le Triton WR-1339 est endocyté par un grand nombre d'organes, principalement par le foie. Il s'accumule progressivement dans le compartiment terminal de la voie endocyttaire, le lysosome, entraînant la modification de ses propriétés physiques, biochimiques et morphologiques (voir figure 37). Les mitochondries et peroxysomes ne sont pas affectés par ce traitement. Parmi les différentes modifications du lysosome induites par le Triton WR-1339, la plus spectaculaire est sans doute la diminution drastique de sa densité due à l'accumulation de molécules de faible densité comme le détergent lui-même, mais également de nombreux lipides (lipoprotéines, phospholipides) probablement issus, en partie, de la circulation sanguine (Hayashi et al. 1981). En condition physiologique, les lipides accumulés dans le lysosome sont rapidement dégradés par différentes lipases. Dans le cas d'un lysosome surchargé de Triton (« tritosome »), les lipases lysosomales sont inhibées par le détergent (Hayashi et al. 1981) comme l'est la lipoprotéine lipase des cellules endothéliales (Szajewski and Scanu 1963, Sheorain et al. 1980), menant à l'accumulation d'un grand nombre de lipides dans la lumière du lysosome. Ainsi, les lysosomes de foie de rat, qui se distribuent classiquement autour d'une densité 1,21 g/cm³ en gradient de densité saccharose, s'équilibrent à une densité d'environ 1,11

g/cm³ lorsque l'animal a reçu, quatre jours auparavant, une injection de Triton WR-1339. En gradient de densité, le déplacement d'une protéine du foie d'une densité égale à celle des lysosomes vers les densités légères du gradient après injection de Triton WR-1339 est donc un argument très fort en faveur de la localisation de la protéine en question au niveau du lysosome.

L'ensemble des effets du Triton WR-1339 sur les lysosomes ont été observés chez le rat. Néanmoins, cette molécule est utilisée depuis plusieurs années chez la souris dans le laboratoire dirigé par Michel Jadot (Laboratoire de Chimie Physiologique, Namur, Belgique). Les effets observés sur les lysosomes hépatiques de cet animal semblent très proches de ceux auparavant observés chez le rat en gradient de densité. Nous avons donc utilisé la souris pour l'étude de l'effet de ce détergent non-ionique doux sur le compartiment auquel l'Onzin est associée.

Dans ce chapitre, nous verrons comment l'utilisation de Triton WR-1339 démontre l'appartenance de l'Onzin à la voie endocytaire et met en évidence une relation étroite entre l'Onzin et le lysosome.

Pour les différentes expériences que nous allons présenter, des souris de souche NMRI, pesant autour de 22-25 g, reçoivent une injection intraveineuse de 17 mg de Triton WR-1339. Les animaux sont sacrifiés quatre jours après l'injection, excepté dans les expériences relatives à l'étude de la cinétique de l'effet du Triton WR-1339. Dans ce cas, les délais séparant l'injection du sacrifice sont précisés dans la légende des figures.

2/ Effet de l'injection de Triton WR-1339 sur la vitesse de sédimentation de l'Onzin

Comme le montre la comparaison des figures 38 et 25, l'injection de Triton WR-1339 n'a pas d'effet sensible sur la vitesse de sédimentation des lysosomes, des membranes plasmiques, des endosomes tardifs, des mitochondries et du compartiment auquel l'Onzin est associée. En effet, le profil de distribution, dans les fractions

sédimentables, de la β -hexosaminidase, de la phosphodiesterase alcaline, de Rab7, de l'OSCP et de l'Onzin, quatre jours après injection de Triton WR-1339, ressemble fortement au profil de distribution de ces protéines dans le foie d'un animal contrôle. Cependant, l'injection de détergent modifie les distributions de la β -hexosaminidase et de l'Onzin dans la fraction non sédimentable. En effet, la proportion de β -hexosaminidase augmente significativement et l'Onzin apparaît, dans la fraction S issue du foie d'un animal traité, alors qu'elle est totalement absente de cette fraction obtenue à partir de foie d'une souris contrôle.

L'augmentation de l'activité des hydrolases acides dans la fraction S est probablement attribuable à la modification morphologique des lysosomes induite par le Triton : les tritosomes sont plus volumineux que les lysosomes et donc plus enclins à se rompre mécaniquement lors des manipulations. Lorsque cela se produit, le contenu de ces granules est relargué dans la fraction soluble S. Il ne s'agit pas d'une augmentation globale de l'activité des enzymes en présence de Triton, puisque l'activité moyenne totale mesurée dans les différentes fractions, rapportée à la masse de foie, est environ la même que celle mesurée chez l'animal témoin. En ce qui concerne l'Onzin, sa présence dans la fraction S, visible dès 24 h suivant l'injection de Triton, est un résultat tout à fait surprenant, puisque cela n'avait jamais été observé après fractionnement du foie d'une souris contrôle. L'origine de cette forme soluble de l'Onzin sera discutée plus loin dans cette partie.

3/ Cinétique de l'effet de l'injection de Triton WR-1339 sur la densité de l'Onzin

Les travaux de Wattiaux (1966) ont montré que l'allègement des lysosomes débute presque immédiatement après l'injection de Triton WR-1339 à un rat et atteint son maximum aux environs du quatrième jour suivant cette injection. Nous avons voulu étudier l'évolution de la densité de l'Onzin au cours du temps, sous l'effet d'une injection de Triton WR-1339, lorsque le sacrifice de l'animal est séparé de l'injection d'une durée de zéro à quatre jours.

La figure 39 montre que le Triton WR-1339 provoque un déplacement drastique de l'Onzin et des lysosomes vers les densités légères du gradient. Si la distribution de l'Onzin est clairement distincte de celle de la β -galactosidase avant l'injection, cette distinction devient de moins en moins évidente lorsque le temps séparant l'injection de Triton WR-1339 et le sacrifice de l'animal augmente. En effet, dès 24 h après l'injection, la courbe de distribution de la β -galactosidase recouvre totalement celle de l'Onzin dans le gradient. Ceci reste vrai jusqu'à la fin de la cinétique, soit quatre jours après l'injection.

L'effet du Triton WR-1319 sur les densités médianes d'équilibre de l'Onzin, de la β -galactosidase et de la phosphodiesterase alcaline est représenté dans la figure 40. Les courbes de l'Onzin et de la β -galactosidase, séparées avant l'injection, évoluent quasiment en parallèle au cours du temps. Les densités médianes de distribution de ces deux protéines diminuent progressivement pour se rejoindre parfaitement en fin de cinétique, soit dès 70 h après l'injection, à une densité de $1,11 \text{ g/cm}^3$. Cette figure montre donc que le lysosome et le compartiment auquel l'Onzin est associée répondent de manière très similaire à l'injection de détergent. En revanche, la densité médiane d'équilibre de la phosphodiesterase alcaline n'est pas affectée par ce traitement et reste constante à tous les temps après l'injection.

4/ Effet du Triton WR-1339 sur la liaison de l'Onzin à la membrane

a) Nature de la liaison de l'Onzin à la membrane

Nous n'avons jamais constaté, au cours des diverses expériences réalisées à partir de foie de souris contrôles, la présence de l'Onzin dans la fraction S isolée par centrifugation différentielle. Avant d'aborder l'étude de l'effet du Triton WR-1339 sur la liaison de l'Onzin à la membrane, nous avons souhaité étudier la nature de cette liaison dans le foie d'un animal contrôle. Pour cela, nous avons préparé une fraction ML à partir de foie de souris n'ayant subi aucun traitement préalable et nous l'avons soumise à un choc osmotique (dilution dans l'eau) ou à trois cycles de congélation/décongélation, afin de rompre les vésicules contenues dans cette fraction.

Après avoir sédimenté les membranes contenues dans cette fraction, nous les avons incubées en présence de substances capables de solubiliser les protéines périphériques associées aux membranes par liaisons ioniques, ou par interactions hydrophobes. Les résultats de ces expériences sont présentés dans la figure 41.

Comme le montre cette figure, l'Onzin reste associée à la fraction membranaire après avoir subi des traitements visant à perturber les liaisons ioniques (NaCl 1 M ; NaOH 0.1 M, Na₂CO₃ 100 mM pH 11) et les ponts disulfures (DTT, TCEP). Par ailleurs, la liaison de l'Onzin à la membrane ne dépend pas de cations divalents, puisque le traitement à l'EDTA (4 mM) ne permet pas sa solubilisation. En revanche, cette liaison est très sensible au Triton-X100, puisqu'une concentration de 0,1 % suffit à solubiliser la quasi totalité de la protéine, alors que l'Onzin reste associée à la membrane en présence de 0,1 % SDS. Pour simplifier la figure, nous n'avons présenté que les résultats obtenus sur une fraction ML dont les vésicules ont été rompues à l'Ultra-Turax et non par des cycles de congélation/décongélation, les deux expériences aboutissant à des résultats identiques.

b) Solubilisation de l'Onzin par choc osmotique

L'Onzin apparaît progressivement dans la fraction S isolée par centrifugation différentielle, lorsque le temps séparant l'injection de Triton WR-1339 et le sacrifice de l'animal augmente. Cette fraction contient les éléments cytoplasmiques non sédimentables dans les conditions d'obtention de la fraction P, mais aussi le contenu des organites qui se seraient rompus suite à l'injection de Triton WR-1339. Afin de tester la présence de l'Onzin au sein d'un tritosome, nous avons étudié l'effet d'un choc osmotique progressif sur la latence de l'Onzin, en utilisant une fraction ML préparée à partir de foie de souris injectée au Triton WR-1339 quatre jours avant son sacrifice.

La figure 42 montre que lorsque l'on incube la fraction ML dans des solutions de saccharose de concentrations décroissantes, l'Onzin est progressivement relarguée dans le milieu comme le sont la β -hexosaminidase et la β -glucuronidase. Ceci

démontre la localisation de l'Onzin dans le lumen d'une vésicule osmotiquement active contenue dans la fraction tritosomale (ML d'un animal injecté au Triton WR-1339), sous une forme non sédimentable dans les conditions de centrifugation appliquées (voir légende de la figure 42).

c) Cinétique de solubilisation de l'Onzin de la fraction tritosomale

Afin de déterminer le moment à partir duquel l'Onzin est solubilisée suite à l'injection de Triton WR-1339, nous avons soumis les fractions ML isolées aux temps variables après l'injection de détergent à des chocs osmotiques (dilution dans l'eau) et isolé les membranes des éléments solubles par centrifugation à haute vitesse. La figure 43 montre que l'Onzin ne devient soluble dans le tritosome qu'à partir de 24 h après l'injection de Triton WR-1339. Par ailleurs, la quantité d'Onzin soluble est d'autant plus importante que le temps séparant l'injection de Triton WR-1339 et le sacrifice de l'animal augmente.

d) Association physique de l'Onzin à une molécule de faible densité

Nous nous sommes interrogée sur la cause de la solubilisation de l'Onzin qui se produit au sein de son compartiment de résidence, chez des souris qui ont subi une injection de Triton WR-1339. Etant donné que, d'une part, la taille de la protéine (observée par Western blot) n'est pas modifiée par ce traitement et que, d'autre part, l'Onzin est toujours reconnue en Western blot par les anticorps dirigés à la fois contre les peptides N et C-terminaux, nous pouvons raisonnablement écarter la possibilité d'un clivage protéolytique de la protéine qui conduirait à son détachement de la membrane. Nous avons donc envisagé la solubilisation de l'Onzin par son association à des molécules solubles dans ce compartiment, la détachant ainsi physiquement de la membrane. Si l'on suppose que l'Onzin est associée à la membrane luminale de son compartiment de résidence, ce « détachement » pourrait être provoqué par affinité de l'Onzin avec une molécule soluble présente dans le lumen de l'organite. Cette possibilité est appuyée par le fait que l'injection de Triton WR-1339 à un rat provoque l'accumulation progressive d'une quantité très importante de phospholipides ou de

lipoprotéines dans le tritosome (Hayashi et al. 1981). Ainsi, la diminution drastique de la densité des lysosomes de foie de rat après traitement au Triton WR-1339 peut être attribuée en grande partie à l'accumulation de molécules de nature lipidique. La modification du contenu des lysosomes de foie de souris suite à l'injection de ce détergent non-ionique n'a pas été décrite dans la littérature. Cependant, la similarité de comportement en centrifugation des lysosomes de ces deux espèces de rongeur laisse à penser que le même type de molécules pourrait s'accumuler dans les lysosomes de rat et de souris, suite à l'injection de Triton WR-1339.

Cependant, nous pouvons également envisager un autre mécanisme aboutissant à la solubilisation de l'Onzin à l'intérieur du tritosome. Etant donné la nature chimique du Triton WR-1339, il est envisageable que l'Onzin soit solubilisée par « effet détergent ». En effet, quelle que soit la topologie de l'Onzin dans son organite de résidence en l'absence de Triton, ce détergent pourrait « l'extraire » de la bicouche lipidique.

Parmi les différentes molécules susceptibles de pouvoir solubiliser l'Onzin, nous avons donc envisagé les molécules de faible densité comme les lipides, ou le Triton WR-1339 lui-même. Pour tester notre hypothèse, une fraction ML de foie de souris injectée au Triton WR-1339 quatre jours avant le sacrifice a été préparée. Nous avons soumis les vésicules présentes dans cette fraction ML à un choc osmotique (dilution dans l'eau), afin d'en libérer le contenu soluble dans le milieu. Après centrifugation, le surnageant a été ajusté à une densité de $1,26 \text{ g/cm}^3$ et chargé en dessous d'un gradient de saccharose. La figure 44 montre que lorsque l'on soumet le gradient à une force centrifuge importante, l'Onzin remonte dans ce gradient jusqu'à une densité inférieure ou égale à $1,08 \text{ g/cm}^3$, alors que les hydrolases acides restent dans le fond du gradient. Ceci démontre l'association de l'Onzin à une molécule de faible densité.

e) Effet in vitro du Triton WR-1339 sur la liaison de l'Onzin à la membrane

Une hypothèse pouvant expliquer la flottaison de l'Onzin, telle qu'elle a été observée et décrite ci-dessus, serait le « décapage » de la face interne de la membrane du granule contenant l'Onzin, par ce détergent. L'Onzin serait donc libérée dans la lumière de la vésicule par effet détergent, se liant à des molécules de Triton WR-1339. Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'Onzin remonte à une densité de 1,08 g/cm³, proche de celle du Triton WR-1339 (1,05 à 1,08 g/cm³).

Nous avons voulu étudier, *in vitro*, l'effet de ce détergent sur la liaison de l'Onzin à la membrane, afin de tester notre hypothèse. Pour cela, nous avons homogénéisé une fraction ML obtenue à partir de foie de souris contrôles, à l'aide d'un Ultra-Turax. La fraction contenant désormais les vésicules rompues a été diluée dans un tampon à pH 5.5, contenant des concentrations croissantes de Triton WR-1339. Ces concentrations ont été choisies en fonction d'une étude analytique menée sur des tritosomes de foie de rat, montrant que le Triton WR-1339 peut atteindre des concentrations très élevées au sein de ces organites, quatre jours après l'injection (Robert Wattiaux, communication personnelle).

La figure 45 montre que, dans les conditions appliquées, quelle que soit la concentration en Triton WR-1339, l'Onzin reste associée à la membrane même après 24 h d'incubation à 37°C.

5/ Discussion

Nous avons utilisé le Triton WR-1339 dans le but d'influencer la densité de l'ensemble des lysosomes hépatiques par une molécule autre que l'invertase.

Les études morphologiques sur le foie de rat ont montré qu'une injection de Triton WR-1339 à l'animal provoquait l'accumulation de détergent à la fois dans les lysosomes des hépatocytes (figure 46) et des cellules de Kupffer (figure 47) (Wattiaux et al. 1963 ; Wattiaux 1966). Si l'Onzin est effectivement localisée dans les lysosomes de ces cellules, sa densité devrait être fortement diminuée par une injection de Triton

WR-1339. Dans ce chapitre, nous décrivons l'effet de l'injection de ce détergent non-ionique sur la densité de l'Onzin et sur sa liaison à la membrane de son compartiment de résidence.

Nous pouvons retenir deux informations principales de l'étude de l'évolution de la densité de l'Onzin et des lysosomes à des temps variables après l'injection de Triton WR-1339. Tout d'abord, cette expérience montre que la densité du compartiment de résidence de l'Onzin est fortement affectée par le détergent, autant que le sont les lysosomes. En effet, l'Onzin est progressivement déplacée vers les densités légères du gradient, lorsque le temps séparant l'injection du détergent et le sacrifice de l'animal augmente. Par ailleurs, cette étude montre que le compartiment de résidence de l'Onzin, clairement distinct des lysosomes repérés par l'activité β -galactosidase avant traitement au Triton WR-1339, se rapproche progressivement des lysosomes au cours de sa migration vers le sommet du gradient, induite par l'injection de ce détergent. En effet, dès 24 heures après l'injection, la distribution de la β -galactosidase recouvre la totalité de la distribution de l'Onzin dans le gradient de densité. Quatre jours après l'injection de Triton WR-1339, les densités médianes d'équilibre des distributions de ces deux protéines sont parfaitement identiques ($1,11 \text{ g/cm}^3$). Tout se passe donc comme si le compartiment de résidence de l'Onzin, initialement distinct des lysosomes, était, sous l'effet du Triton WR-1339, progressivement devenu un tritosome.

Ainsi, l'utilisation du Triton WR-1339, connu pour son influence remarquable sur la densité des lysosomes hépatiques, apporte des informations qui pourraient sembler contradictoires avec celles amenées par les expériences faisant usage de l'invertase. Comment imaginer que l'Onzin soit située dans un compartiment des cellules de Kupffer qui ne soit pas un lysosome et qui soit pourtant « sensible » au Triton WR-1339, alors que ce détergent est connu pour son accumulation dans les lysosomes du foie ? Nous pensons que ces éléments « contradictoires » peuvent s'expliquer si l'on tient compte de la nature de la molécule employée.

En effet, nous décrivons dans cette partie l'apparition de l'Onzin sous une forme soluble, située à l'intérieur de son compartiment chargé en Triton WR-1339, compartiment que nous pouvons dès lors appeler « tritosome ». Or, dans l'ensemble des échantillons issus d'animaux non traités que nous avons analysés depuis le début de ce travail, nous avons constaté que l'Onzin se trouvait toujours liée aux membranes, même suite à des traitements visant à décrocher les protéines périphériques. Aussi, si le Triton WR-1339 peut induire une modification aussi majeure sur la liaison de l'Onzin à la membrane de son compartiment, nous pouvons tout à fait envisager que ce détergent puisse avoir un effet considérable sur la composition générale de ce compartiment.

L'apparition de l'Onzin sous forme soluble nous amène à envisager la possibilité que l'Onzin puisse être progressivement déplacée de son compartiment d'origine vers le lysosome suite au traitement Triton WR-1339. Ainsi, l'Onzin pourrait être « shiftée » vers les densités légères du gradient du fait de son transfert dans un organite qui est affecté par le détergent, alors que le compartiment initial de résidence de l'Onzin, lui, ne le serait pas. Cependant, l'Onzin ne devient soluble dans son compartiment de résidence qu'à partir de 24 h suivant l'injection de Triton WR-1339. Or, 24 h après l'injection de Triton WR-1339, l'Onzin s'est déjà déplacée significativement dans le gradient (shift de $0,04 \text{ g/cm}^3$). Aussi, du fait d'une incohérence dans la succession chronologique des phénomènes, il est impossible que ce soit sa solubilisation, puis son transfert vers le lysosome, qui explique la modification de sa densité, du moins jusqu'à 24 h après l'injection de Triton WR-1339.

Par ailleurs, nous pouvons envisager que l'Onzin qui shifte après injection de Triton WR-1339 est une Onzin exogène qui proviendrait de la circulation sanguine, du fait de l'injection. Cette Onzin serait endocytée par les cellules de Kupffer et s'accumulerait dans le lysosome devenant progressivement un tritosome. Pour tester cette hypothèse, nous avons montré que l'Onzin est absente du sang de souris, qu'elle ait reçu ou non une injection de Triton WR-1339. De plus, une étude par Western blot a montré que (1) la quantité totale d'Onzin présente dans la fraction « ML + S » d'une souris traitée au Triton WR-1339 est la même que celle présente dans la fraction « ML

+ S » d'une souris contrôle et (2) que le profil de distribution de l'Onzin dans les différentes fractions isolées par centrifugation différentielle est le même dans le foie d'une souris traitée que dans celui d'une souris non traitée au Triton WR-1339. Nous parlons cette fois de fraction « ML + S » afin de tenir compte dans les calculs de la portion d'Onzin présente dans les vésicules de la fraction ML d'un animal Triton qui est relarguée dans la fraction soluble (S) par rupture d'une partie des vésicules lors des manipulations.

Aussi, le shift de l'Onzin suite à l'injection de Triton WR-1339 semble être attribuable à une modification de la densité du compartiment de résidence de cette protéine et non au transfert de l'Onzin endogène vers le lysosome, ou à l'accumulation d'une Onzin exogène (sérique) dans ce compartiment.

Interrogeons nous désormais sur l'origine de la solubilisation de l'Onzin. L'expérience de flottaison montre que l'Onzin présente dans la lumière du tritosome est liée à une molécule de faible densité. Quelle molécule de cette nature a pu provoquer le décrochement de l'Onzin de la membrane à laquelle elle est pourtant fortement liée ? Comme nous l'avons précisé précédemment, de nombreux lipides s'accumulent dans le tritosome suite à l'injection de détergent. Nous pouvons donc envisager que l'Onzin ait quitté la membrane à laquelle elle est rattachée, par affinité forte pour un ou plusieurs lipides anormalement présents dans sa vésicule de résidence. Ce modèle suggère que l'Onzin soit située sur la face luminale de cette vésicule. Pour tester cette hypothèse, nous avons essayé d'étudier, par quatre approches différentes, la topologie de l'Onzin à la membrane de sa vésicule de résidence lorsque celle-ci n'est pas surchargée en Triton WR-1339. Malheureusement, pour des raisons relevant des propriétés biochimiques de la protéine, ou de limitations techniques, nous n'avons pas pu déterminer si l'Onzin se localise sur la face interne ou externe de la vésicule.

Cependant, nous avons montré de façon très préliminaire, par marquage métabolique au palmitate tritié, que l'Onzin de la lignée cellulaire 32D (progéniteurs myéloïdes de souris) est palmitoylée (figure 48). Cette modification post-traductionnelle permet l'ancrage des protéines périphériques à la membrane, par rajout d'un acide gras, le palmitate, sur une ou plusieurs cystéines (Resh 1999). La

palmitoylation n'a été décrite, jusqu'à présent, que pour les protéines localisées au niveau du feuillet cytosolique de la membrane plasmique (Zuber et al. 1989) ou des organites internes (Casey 1995). Il est donc probable que l'Onzin soit accolée à la face externe du compartiment auquel elle est associée, dans ces cellules 32D. Cependant, n'ayant pas pu obtenir de renseignements quant à sa forme palmitoylée éventuelle dans les cellules de Kupffer, nous ne pouvons nous appuyer uniquement sur ces derniers résultats (qui, par ailleurs, doivent être confirmés par reproduction de l'expérience) pour affirmer que ce que nous constatons dans les cellules 32D soit également vrai dans les cellules de Kupffer.

Néanmoins, (1) cette expérience de palmitoylation, (2) l'absence de peptide signal dans la séquence de la protéine et (3) l'acétylation du peptide N-terminal de l'Onzin (modification fréquente pour les protéines dont l'extrémité N-terminale est située dans le cytosol) détectée par spectrométrie de masse, sont trois arguments qui nous permettent d'envisager que l'Onzin est probablement située, en condition physiologique, sur la face externe de sa vésicule de résidence. Ceci rend donc peu probable l'hypothèse selon laquelle l'Onzin serait solubilisée par affinité pour un lipide avec lequel elle serait rentrée en contact dans le tritosome.

Par ailleurs, l'incubation *in vitro* de vésicules rompues d'une fraction mitochondriale totale en présence de Triton WR-1339 montre que l'Onzin ne peut être détachée de la membrane par simple effet détergent. Pour démontrer cela, nous avons essayé de nous rapprocher le plus possible des conditions rencontrées à l'intérieur d'une vésicule chargée en Triton WR-1339 en terme de concentration, de pH et de température. *In vivo*, le détergent s'accumule progressivement dans la vésicule pour atteindre une concentration maximale, trois jours après l'injection (voir étude cinétique). La concentration en Triton est probablement maintenue à un niveau proche de la concentration maximale pendant au moins 24 h, puisque la densité médiane d'équilibration des lysosomes reste la même, trois ou quatre jours après l'injection (voir figure 40). En incubant *in vitro* pendant 24 h, à 37°C, les membranes de la fraction ML en présence d'une concentration importante de Triton WR-1339, nous avons mimé la phase de « palier » que rencontrent probablement les protéines situées à l'intérieur d'une vésicule dans laquelle s'est accumulé le Triton WR-1339 pendant

trois à quatre jours, soit les concentrations en Triton les plus élevées qu'elles puissent rencontrer. Ces conditions n'ayant pas suffi à permettre la solubilisation de l'Onzin, nous pouvons en déduire que l'Onzin n'est pas solubilisée, dans le tritosome, par simple effet détergent, ou que certaines conditions indispensables à la solubilisation de cette protéine n'ont pas été respectées dans notre test.

En effet, l'injection de Triton WR-1339 ne provoque pas seulement le changement du contenu luminal de sa vésicule d'accumulation. La taille de cette vésicule augmente considérablement, laissant supposer des changements drastiques dans la composition générale de sa membrane. Nous ne pouvons, *in vitro*, mimer l'ensemble des changements induits, au niveau de la vésicule d'accumulation du détergent, par l'injection de Triton, mais nous pouvons proposer qu'ils soient à l'origine de la localisation luminale de l'Onzin, liée à une molécule de faible densité. Par exemple, le Triton WR-1339 présent en concentration élevée, au sein du compartiment de résidence de l'Onzin (dont la membrane serait « dilatée » et le contenu modifié), pourrait déclencher, par un mécanisme inconnu, l'invagination ou l'extraction de particules lipidiques issues de la membrane et ainsi la formation dans la lumière du tritosome, de petites vésicules ou structures lipoprotéiques contenant la protéine. Etant donné que ces processus n'ont pas été étudiés expérimentalement, nous n'en discuterons pas de façon détaillée.

Ainsi, les résultats que nous présentons dans cette partie nous permettent de conclure que l'Onzin n'est pas associée à un lysosome, mais qu'elle est sans doute dans un compartiment en lien dynamique avec cet organite. En effet, le Triton WR-1339 s'accumule dans le compartiment de résidence de l'Onzin, en quantité suffisante pour (1) induire la diminution drastique de la densité de ce compartiment et (2) provoquer des changements considérables de la liaison de l'Onzin à la membrane.

**E. LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE L'ONZIN DANS LES MACROPHAGES
PERITONEAUX DE SOURIS**

1/ Introduction

Nous avons jusqu'ici tenté de déterminer la localisation intracellulaire de l'Onzin à partir de foie de souris. Ce choix était notamment motivé par le fait que l'Onzin n'est pas présente dans les lignées cellulaires classiquement utilisées. En combinant des techniques morphologiques et biochimiques, nous sommes parvenue à la conclusion que l'Onzin hépatique se localise principalement dans une population minoritaire du foie, les cellules de Kupffer, associée à des vésicules probablement en relation avec la voie endocytaire. Cependant, nous n'avons pas pu déterminer précisément le compartiment de résidence de l'Onzin.

L'une des difficultés que nous rencontrons provient de l'hétérogénéité cellulaire du foie. En effet, du fait du manque de marqueurs de compartiments intracellulaires spécifiques des cellules de Kupffer, nous ne pouvons localiser dans un gradient de densité, parmi l'ensemble des organites présents, ceux qui sont originaires de cette population minoritaire de cellules.

L'isolement des cellules de Kupffer par perfusion de collagénase est très difficilement envisageable à partir de foie de souris, étant donné la faible quantité de cellules que l'on parvient à isoler par cette technique. Ainsi, si nous voulons étudier la localisation intracellulaire de l'Onzin de souris à partir d'un échantillon cellulaire homogène, nous devons choisir un matériel autre que le foie.

Les cellules de Kupffer sont les macrophages résidents du foie. Synthétisées dans la moelle osseuse comme les autres cellules immunitaires, c'est au cours du développement embryonnaire que ces cellules migrent dans le foie pour s'y installer définitivement (Naito et al. 1990). Au sein de ce tissu, les cellules de Kupffer vont s'adapter et se différencier quelque peu des autres macrophages de l'organisme. Les

différences entre les cellules de Kupffer et les autres macrophages de l'organisme s'observent par exemple au niveau des molécules sécrétées par ces cellules suite à leur activation (Decker et al. 1989). Cependant, ils restent très proches, morphologiquement et fonctionnellement, de l'ensemble des macrophages de l'organisme.

Aussi, pour étudier la distribution de l'Onzin dans une population cellulaire homogène, nous avons choisi d'utiliser des macrophages de souris. Nous avons travaillé à partir de cultures primaires de macrophages prélevés dans le péritoine de la souris, source abondante de ce type de cellules.

Dans cette partie, nous présenterons l'étude de la distribution intracellulaire de l'Onzin dans les macrophages péritonéaux, appartenant à la même « famille » que les cellules de Kupffer, population de résidence de l'Onzin dans le foie. Nous utiliserons pour cette étude des techniques biochimiques et morphologiques et nous comparerons ces résultats à ceux obtenus sur le foie total.

2/ Distribution de l'Onzin après centrifugation isopycnique

La localisation intracellulaire de l'Onzin a été étudiée par centrifugation à partir de macrophages péritonéaux issus de souris C57Bl/6.

Nous avons comparé la distribution de l'Onzin à celle de six protéines marqueurs de différents compartiments intracellulaires dans un gradient de saccharose réalisé à partir d'une fraction MLP contenant 60 % des protéines de l'homogénat initial. Comme le montre la figure 49, la β -hexosaminidase et la β -glucuronidase, marqueurs lysosomaux, s'équilibrent, dans ce gradient, autour de $1,22 \text{ g/cm}^3$, soit à une densité légèrement supérieure à celle à laquelle ils s'équilibraient dans un gradient réalisé à partir d'une fraction ML de foie de souris. Ceci permet une séparation nette de ces marqueurs et de la phosphodiesterase alcaline et CD98, marqueurs de la membrane plasmique, qui s'équilibrent autour d'une densité $1,15 \text{ g/cm}^3$. Nous avons également établi dans ce gradient la distribution de deux marqueurs de compartiments

intermédiaires de la voie endocytaire, Rab5 et Rab7, marqueurs des endosomes respectivement précoces et tardifs. Comme le montre cette figure 49, Rab5 s'équilibre à une densité de $1,155 \text{ g/cm}^3$, bien inférieure à celle de l'Onzin, mais proche de celles de la phosphodiesterase alcaline et de CD98. Rab7, quant à elle, se distribue autour d'une densité de $1,21 \text{ g/cm}^3$, soit une densité très proche de celles de la β -hexosaminidase et de la β -glucuronidase.

La distribution de l'Onzin dans ce gradient de densité est clairement bimodale, avec environ 55 % de la protéine s'équilibrant autour d'une densité $1,18 \text{ g/cm}^3$ et 45 % à une densité comparable à celle de la β -hexosaminidase, la β -glucuronidase et Rab7, soit $1,22 \text{ g/cm}^3$.

3/ Distribution intracellulaire de l'Onzin étudiée par immunofluorescence

La localisation intracellulaire de l'Onzin dans les macrophages péritonéaux de souris a également été étudiée par immunofluorescence. Pour cela, nous avons indifféremment utilisé trois des quatre anticorps polyclonaux dirigés contre des peptides N ou C-terminaux de l'Onzin, avec lesquels nous avons obtenu le même type de signal.

Nous avons également comparé les distributions de l'Onzin et de trois autres marqueurs de compartiments de la voie endocytaire, LAMP1, l'acide lysobisphosphatidique (LBPA) et Rab5 en superposant les signaux obtenus avec les différents anticorps spécifiques.

La figure 50 indique clairement que les données morphologiques vont dans le sens des données biochimiques obtenues à partir du même type cellulaire. Tout d'abord, comme le montrent les images A1, A2 et A3, l'Onzin est présente dans un système vésiculaire intracellulaire très développé, dont une partie contient la protéine LAMP1, marqueur des endosomes tardifs/lysosomes (Griffiths et al. 1988). Par ailleurs, les images B1, B2 et B3 montrent que l'Onzin colocalise également partiellement avec le LBPA, très enrichi dans les corps multivésiculaires/endosomes tardifs, mais absent des lysosomes (Kobayashi et al. 1998). En revanche, aucune colocalisation n'est observée entre l'Onzin et EEA1 (images C1, C2 et C3), marqueur

des endosomes précoces (Simonsen et al. 1998). Nous n'avons malheureusement pas pu obtenir de marquage satisfaisant de la membrane plasmique avec les différents anticorps commerciaux que nous avons utilisés, mais nous pouvons néanmoins, par observation de la morphologie de la cellule, constater que l'Onzin est clairement absente de cette structure.

La mise en évidence de l'Onzin en immunofluorescence requiert, avant l'incubation avec l'anticorps, un démasquage des cellules fixées au tampon citrate (voir chapitre II : Techniques expérimentales). En revanche, ce traitement gêne la reconnaissance de TGN38, protéine située dans le réseau trans-golgien, par son anticorps. Nous n'avons donc pas pu obtenir de comarquage entre l'Onzin et TGN38. Cependant, comme le montre la comparaison des images A1 (ou B1) et D1, l'allure générale du signal obtenu en présence des anticorps dirigés contre l'Onzin et TGN38 est très différent. En effet, l'Onzin est associée à un système vésiculaire diffus dans le cytoplasme, comme LAMP1, alors que TGN38 est présent au niveau de structures plus indépendantes, plus allongées et moins diffuses. Sur la base de cette comparaison, nous pouvons conclure que l'Onzin n'est pas associée de façon évidente, dans les macrophages péritonéaux, au réseau trans-golgien.

Enfin, nous n'avons jamais détecté la présence de l'Onzin dans le noyau de ces cellules.

4/ Discussion

Dans cette partie, nous confirmons et précisons, dans des macrophages péritonéaux de souris, un certain nombre de résultats obtenus sur la localisation intracellulaire de l'Onzin dans un foie total, par des techniques similaires à celles dont nous avons fait usage pour cet organe. Comparativement à l'étude à partir de foie total, l'étude de la localisation subcellulaire de l'Onzin dans les macrophages péritonéaux par centrifugation est facilitée du fait de l'homogénéité de la population cellulaire employée. Pour l'immunofluorescence, les images que nous présentons sont d'une résolution nettement supérieure à celles présentées pour l'étude du foie. De plus, contrairement au foie, nous pouvons, dans ces cellules, réaliser des comarquages

de l'Onzin et de différents marqueurs de compartiments subcellulaires pour préciser l'identité du compartiment de résidence de l'Onzin.

Nous avons étudié la distribution de l'Onzin et de différents marqueurs de compartiments subcellulaires dans un gradient de densité réalisé à partir d'une fraction MLP, dans le but de rassembler dans un même gradient l'ensemble des compartiments de la voie endocytaire, ainsi qu'une partie importante de la membrane plasmique de ces cellules.

Dans un gradient réalisé à partir d'une fraction quelconque issue du foie total, nous devons, pour nos interprétations, tenir compte du fait que les marqueurs dont nous établissons les distributions étaient représentatifs de la population cellulaire majoritaire de l'organe. Ici, du fait de l'homogénéité de la population cellulaire à partir de laquelle la fraction MLP est préparée, les marqueurs dont nous avons établi les distributions dans le gradient reflètent véritablement le compartiment auquel ils appartiennent.

Nos expériences ont confirmé nos hypothèses précédentes, à savoir que l'Onzin est proche des compartiments « endosome tardifs / lysosomes », dans les macrophages. En effet, la distribution de l'Onzin dans un gradient de densité réalisé à partir d'une fraction MLP de macrophages péritonéaux est bimodale. Si 55 % de la protéine s'équilibre à une densité comparable à celle d'aucun des marqueurs considérés dans ce gradient, les 45 % restant se distribuent autour d'une densité égale à celle des lysosomes et de Rab7. Les images d'immunofluorescence nous précisent que cette fraction d'Onzin, se superposant à la distribution des endosomes tardifs/lysosomes dans le gradient MLP, est physiquement associée à ces compartiments. En effet, nous avons pu visualiser une superposition partielle de l'Onzin avec LAMP1, marqueur endo-lysosomal et avec le LBPA, marqueur des endosomes tardifs / corps multivésiculaires, dans le cytoplasme des macrophages péritonéaux.

Pour confirmer l'association de l'Onzin aux corps multivésiculaires, enrichis en lipide LPBA (Kobayashi et al. 1998), nous nous sommes intéressé à un compartiment particulier qui se forme au sein des corps multivésiculaires : les exosomes. Comme nous l'avons détaillé en introduction de ce travail, ces petites vésicules d'environ 50 nm de diamètre se forment par invagination de la membrane externe du corps multivésiculaire (endosome tardif particulier) (Raposo et al. 1996, Fevrier and Raposo 2004) . Dans les cellules d'origine hématopoïétique, les corps multivésiculaires chargés de vésicules internes sont capables de fusionner avec la membrane plasmique de la cellule et de libérer ces vésicules (dès lors appelées « exosomes ») dans le milieu extérieur. Nous avons isolé, par centrifugation, des exosomes à partir du surnageant d'une culture primaire de cellules dendritiques issues de la moelle osseuse de souris (voir chapitre II : techniques expérimentales). Une quantité très importante d'Onzin a été détectée par Western blot dans ces exosomes, dont la composition protéique, proche de celle auparavant publiée par le groupe d'Amigorena (Thery et al. 2001), a été déterminée par LC/MS/MS (voir Annexes, tableau 4).

Par ailleurs, nos expériences menées sur les macrophages péritonéaux confirment un autre résultat obtenu à partir de foie de souris : l'Onzin n'est pas présente au niveau de la membrane plasmique de ces cellules. D'une part, dans le gradient de densité réalisé à partir de la fraction MLP de macrophages péritonéaux, la distribution de l'Onzin est nettement séparée de celle des marqueurs de la membrane plasmique. D'autre part, en immunofluorescence, nous pouvons aisément constater que, si l'Onzin forme un système vésiculaire intracellulaire abondant, elle n'est pas, en revanche, localisée au niveau de la membrane plasmique des macrophages péritonéaux.

Nos résultats montrent également que l'Onzin n'est pas associée aux endosomes précoces. En effet, la séparation des distributions de l'Onzin et de Rab5, dans le gradient de densité réalisé à partir d'une fraction MLP, est évidente. Ce résultat est confirmé par l'étude par immunofluorescence qui montre que l'Onzin et

EEA1, marqueur des endosomes précoces (Simonsen et al. 1998), sont situés dans des vésicules différentes.

Confrontons à présent les résultats obtenus jusqu'ici sur la localisation de l'Onzin dans un foie total à ceux présentés dans cette partie, sur les macrophages péritonéaux. La découverte de l'Onzin dans des lysosomes purifiés, la sédimentation de cette protéine en quantités non négligeables dans la fraction « mitochondriale totale » et la visualisation de l'Onzin par immunofluorescence dans un système de type vésiculaire dans les cellules de Kupffer, sont les premiers arguments qui nous ont amené à envisager l'association d'une fraction de l'Onzin à un lysosome. Le déplacement de la totalité de l'Onzin de la fraction mitochondriale vers les densités légères du gradient, sous l'effet du Triton WR-1339 nous conforte grandement dans cette hypothèse. Cependant, plusieurs éléments montrent que si le compartiment de résidence de l'Onzin est proche du lysosome, il n'est pas pour autant un lysosome. En effet, la distribution de l'Onzin dans un gradient de densité établi à partir d'une fraction ML de foie n'est pas superposable à celle des lysosomes tracés suite à l'injection d'une faible quantité d'invertase à une souris.

Les résultats que nous présentons dans cette partie sur les cellules péritonéales nous permettent d'affirmer qu'une fraction importante de l'Onzin est associée aux endosomes tardifs/lysosomes de ces cellules. Même si nous n'avions pas pu mettre en évidence de façon directe cette fraction au sein des cellules de Kupffer dans un foie total, nous supposons néanmoins une relation très étroite entre la protéine et ces granules. Nous pensons que cette relation est modulée de façon légèrement différente dans les diverses cellules dans lesquelles l'Onzin se localise.

**F. EFFET DE LA PHAGOCYTOSE DE BILLES DE LATEX SUR DISTRIBUTION
INTRACELLULAIRE DE L'ONZIN**

1/ Introduction

Tenant compte, d'après les données biochimiques et morphologiques que nous avons obtenues jusqu'ici, que l'Onzin peut être localisée au sein de la voie endocytaire, nous nous sommes intéressée à un autre compartiment de cette voie, le phagosome.

La phagocytose est le processus biologique par lequel certaines cellules internalisent des particules de grande taille destinées à être dégradées par les enzymes lysosomales. Au moment de sa formation, le phagosome, à pH neutre, est dépourvu de toute capacité hydrolytique. Une série d'évènements rapides de fusion-fission entre le phagosome et les différents compartiments de la voie endocytaire va progressivement aboutir au transfert de matériel hydrolytique dans la lumière du phagosome, devenu alors un phagolysosome fonctionnel (Desjardins et al. 1994). En plus du transfert rapide d'une partie du contenu luminal des granules de la voie endocytaire, les protéines de la membrane des vésicules sont également transférées au phagosome au cours de sa maturation (Joiner et al. 1990, Pitt et al. 1992), même si ce processus peut nécessiter des périodes de temps relativement longues (Desjardins et al. 1994).

Ainsi, si l'Onzin est effectivement présente dans la voie endocytaire, elle est susceptible d'entrer en contact avec le phagosome au cours de la maturation de ce dernier. Pour chercher l'éventuelle présence de l'Onzin au sein de ce compartiment, nous avons provoqué la formation de « phagosomes-latex » dans deux types de cellules : les macrophages péritonéaux et les cellules de Kupffer. En effet, l'utilisation du latex, introduit par Weissman et Korn (Weissman and Korn 1967), permet d'investiguer, *in vitro* et *in vivo*, la biologie du phagosome. L'un des grands avantages de cette méthode est la possibilité d'isoler, sur la base de leur densité, des phagosomes formés par ingestion de billes de latex, avec une grande pureté (Wetzel and Korn

1969). C'est ce qu'ont notamment réalisé Garin et collaborateurs, pour permettre l'identification d'environ 140 protéines associées au phagosome-latex des cellules J774, par spectrométrie de masse (Garin et al. 2001).

Dans cette partie, nous allons présenter comment, par des approches biochimiques et morphologiques basées sur l'utilisation de billes de latex, nous mettons en évidence la présence de l'Onzin au sein du phagosome des cellules de Kupffer et des macrophages péritonéaux.

2/ Effet de l'injection de billes de latex sur la densité de l'Onzin du foie de souris

La phagocytose de billes de latex *in vivo* a été étudiée par différents groupes, chez le rat (Dan and Wake 1985) ou la souris (Rodloff et al. 1986). Après injection intraveineuse, les billes de latex sont répandues dans l'organisme par la circulation sanguine et sont capturées par les différents phagocytes avec lesquels elles entrent en contact. C'est notamment le cas des macrophages alvéolaires du poumon (Myrvik et al. 1993) ou des cellules de Kupffer du foie (Dan and Wake 1985). Ce sont ces dernières que nous avons voulu cibler dans l'expérience que nous présentons ici, pour travailler sur l'hypothèse de la localisation de l'Onzin au sein du phagosome.

Du fait de leur nature hydrophobe, les billes de latex ont tendance à s'agréger une fois mises en solution. Afin d'éviter ce phénomène qui pourrait gêner leur circulation dans le sang, nous avons pris soin d'utiliser des billes carboxylées permettant la liaison d'une variété de protéines à leur surface. Nous avons recouvert ces billes par l'albumine bovine (Desjardins and Scianimanico 1998), afin de limiter au maximum la liaison non spécifique de différents peptides sanguins au cours du transport des billes dans la circulation de la souris.

Une heure et demi après l'injection intraveineuse de 2×10^9 particules à la souris, le foie est prélevé puis homogénéisé. L'extrait phagosomal est alors préparé par centrifugation et les phagosomes-latex sont enrichis sur gradient discontinu de saccharose, établi selon le protocole de Desjardins et Scianimanico (1998).

La figure 51 montre que l'Onzin est en partie associée aux phagosomes-latex. En effet, lorsque la souris a reçu une injection de latex, environ 30 % de l'Onzin totale chargée au niveau de l'avant dernière couche du gradient de saccharose remonte, sous l'effet d'un champ centrifuge, à l'interface entre les couches 10 et 25 % de saccharose, d'une densité respective de 1,04 et 1,11 g/cm³. L'Onzin est donc présente dans le gradient à l'endroit où l'on visualise la fine bande de billes de latex opaques. Lorsque l'animal ne reçoit pas d'injection de latex, mais que les billes sont simplement rajoutées *in vitro* à l'extrait avant la préparation du gradient, l'Onzin ne remonte pas à ce niveau dans le gradient.

Notons que, après internalisation ou non de billes de latex, une quantité importante d'Onzin remonte dans la couche composée de 35 % de saccharose, mais également à l'interface entre cette couche et la couche supérieure, à 25 % de saccharose. Ceci n'est pas étonnant au vue des résultats que nous avons présentés précédemment (figure 27). En effet, dans un gradient de densité, l'Onzin s'équilibre autour d'une densité 1,17 g/cm³, correspondant à une concentration en saccharose de 38 %, inférieure à la concentration de la couche 25 %. Il est donc fortement probable que l'Onzin qui ne remonte pas dans le gradient à l'interface où remontent les billes de latex soit la fraction d'Onzin qui correspond au compartiment où elle se trouve normalement localisée en l'absence d'une activité phagocytaire provoquée.

3/ Effet de la phagocytose de billes de latex sur l'Onzin des macrophages péritonéaux de souris

a) Isolement des phagosomes par centrifugation dans un gradient discontinu

Après le prélèvement des macrophages péritonéaux de souris C57Bl/6, les cellules, réparties en deux groupes, ont été mises en culture pendant 72 h. L'un des deux groupes a ensuite été incubé en présence de billes de latex pendant 1h30, à 37°C. Pour chacune de ces deux conditions, les cellules ont ensuite été homogénéisées dans

un tampon isotonique et les phagosomes ont été isolés sur un gradient discontinu de saccharose préparé comme précédemment.

Comme le montre la figure 52, 10 % de l'Onzin issue du groupe de cellules ayant été incubées en présence des billes de latex, remonte dans le gradient à l'interface entre les couches 10 et 25 % de saccharose, c'est-à-dire à l'endroit où remontent les billes de latex. Lorsque les billes de latex sont ajoutées après l'étape d'homogénéisation des macrophages, l'Onzin n'est pas présente à ce niveau dans le gradient de densité.

Nous avons alors identifié, par spectrométrie de masse, les protéines présentes à l'interface des couches 10 et 25 % de saccharose, dans les deux gradients. Nous considérons que les protéines qui sont véritablement associées au phagosome sont celles qui ne figurent pas parmi les protéines identifiées à partir de cellules qui ont été incubées avec les billes de latex après l'étape d'homogénéisation (voir Annexes, tableau 2). Parmi ces protéines (voir Annexes, tableau 3) figurent de nombreuses protéines attendues, d'origine phago-lysosomale connue, comme l'ATP synthase vacuolaire ou les protéines LAMPs. Par ailleurs, nous avons été surpris par l'identification d'une protéine jusque là inconnue, la Q8CBU7, parmi les protéines majoritaires de cet échantillon.

b) Etude par immunofluorescence

Nous avons ensuite étudié, par immunofluorescence, la localisation de l'Onzin au sein de macrophages péritonéaux ayant ingéré des billes de latex fluorescentes. Pour cela, les macrophages sont incubés en présence de billes d'un micron de diamètre pendant dix minutes (période dite « d'internalisation »). Les cellules sont ensuite lavées et remises en culture dans un milieu dépourvu de billes, pour une période plus au moins longue, dite de « chasse ».

Comme le montre la figure 53, alors que l'Onzin n'est pas associée aux billes de latex pour des temps de chasse inférieurs à une heure, elle apparaît de plus en plus

abondamment à la périphérie des billes lorsque les temps de chasse se rallongent. Six heures après la période d'internalisation, toutes les billes phagocytées sont associées à l'Onzin. LAMP1, marqueur des endosomes tardifs/lysosomes, suit exactement le même comportement que l'Onzin. Par ailleurs ces deux protéines colocalisent en partie dans le cytoplasme des macrophages, à tous les temps de chasse considérés.

La figure 54 permet de localiser plus précisément l'Onzin et LAMP1 au niveau de phagosomes-latex formés au cours de six heures de chasse. Sur ces images obtenues à fort grossissement, nous pouvons constater que ces deux protéines forment un anneau total ou partiel autour des billes de latex.

4/ Discussion

Dans les différentes expériences que nous avons réalisées, nous avons formé des phagosomes par mise en contact des cellules avec des billes de latex de diamètre proche d'un micron. Du fait de leur taille importante, l'unique mécanisme pouvant mener à la capture de telles particules est la phagocytose (Desjardins and Griffiths 2003). Ce processus biologique est assuré quasi exclusivement par des cellules spécialisées de la famille des polymorphonucléaires et de la lignée monocyttaire, dont les macrophages péritonéaux et les cellules de Kupffer du foie.

Les phagosomes des cellules de Kupffer, comme ceux des macrophages péritonéaux, ont été purifiés sur gradient de densité en tirant profit de la faible densité de ces compartiments lorsqu'ils sont chargés de billes de latex. Nous avons analysé par spectrométrie de masse les protéines contenues dans la préparation de phagosomes issus des deux types de cellules étudiées. Cependant, nous n'avons présenté que les résultats de l'analyse des phagosomes de macrophages péritonéaux de souris. En effet, un trop grand nombre de protéines, de localisations intracellulaires diverses, avaient été identifiées dans les phagosomes des cellules de Kupffer. Cela peut sans doute s'expliquer du fait de la quantité importante de protéines chargées dans le gradient.

Pour vérifier l'association de l'Onzin aux phagosomes des cellules de Kupffer, nous avons comparé le profil de distribution de cette protéine dans les différentes couches et interfaces du gradient de densité réalisé à partir de foie de souris ayant reçu une injection de latex et celui réalisé à partir de foies de souris contrôles. Cette étude montre clairement qu'une fraction de l'Onzin intracellulaire est associée aux phagosomes formés *in vivo*, dans les cellules de Kupffer.

Dans le cas du gradient réalisé à partir de macrophages péritonéaux, l'extrait déposé dans le gradient est beaucoup moins complexe, diminuant ainsi fortement la probabilité que des protéines non-associées au phagosome remontent en quantités suffisantes pour être détectées par spectrométrie de masse. L'analyse de cet échantillon révèle la grande pureté des phagosomes isolés. Parmi les protéines identifiées figure l'Onzin. Nous avons confirmé ce résultat par Western blot, en comparant la distribution de l'Onzin dans les différentes fractions du gradient contrôle et du gradient « latex ». L'ensemble de ces résultats confirme donc l'association de l'Onzin au phagosome des macrophages péritonéaux.

Après centrifugation, seules les particules de très faible densité sont sensées remonter dans les gradients, à l'interface des couches 10 et 25 % de saccharose. C'est sur ce principe que nous avons isolé les phagosomes-latex. Cependant, pour nous assurer que les protéines identifiées sont bien associées à ce compartiment, nous avons pris soin de réaliser des gradients contrôles réalisés à partir d'extraits de cellules n'ayant pas phagocyté le latex. Nous aurions pu considérer, comme contrôle négatif de la préparation de phagosomes-latex, l'interface entre les couches 10 et 25 % du gradient réalisé directement à partir cet extrait, interface composée des éventuelles protéines qui seraient remontées à cette densité sous l'effet du champ centrifuge. Mais nous avons voulu prendre une deuxième précaution : celle de considérer l'éventuelle liaison non spécifique des billes de latex avec différentes protéines de l'homogénat initial. En effet, il est possible que certains phagosomes se soient rompus lors des étapes d'homogénéisation des cellules, mettant alors en contact les billes « nues » (puisque non protégées par la membrane du phagosome) avec des protéines de l'homogénat. Etant donné la nature des billes, il est possible que certaines protéines se

soient alors liées au latex par liaisons électrostatiques et aient été entraînées avec ces particules entre les couches 10 et 25 % du gradient.

Aussi, pour nos contrôles négatifs, nous avons injecté *in vitro*, dans l'homogénat de cellules n'ayant pas phagocyté de billes, une quantité de latex égale à celle injectée *in vivo* à la souris, dans le cas des cellules de Kupffer, ou mise en contact avec les macrophages péritonéaux en culture, pour stimuler leur phagocytose.

Dans ces gradients contrôles, nous constatons que plusieurs protéines remontent à l'interface à laquelle sont supposés ne remonter que les phagosomes-latex (Garin et al. 2001). Nous avons soustrait ces protéines à notre liste de protéines associées au phagosome, identifiées par spectrométrie de masse.

Les travaux que nous présentons dans cette partie montrent que l'Onzin peut interagir avec les phagosomes formés dans les cellules de Kupffer et dans les macrophages péritonéaux de souris. Or, le phagosome interagit successivement avec différents organites de la voie endocytaire, dont les endosomes précoces (Mayorga et al. 1991, Alvarez-Dominguez et al. 1996), les endosomes tardifs (Rabinowitz et al. 1992, Desjardins et al. 1994) et les lysosomes (Jahraus et al. 1994). Au vue de nos résultats, il est donc tentant de penser que l'Onzin, présente au sein de la voie endocytaire, apparaît au niveau du phagosome du fait d'échanges entre son granule d'origine et le phagosome. Ainsi, l'association tardive de l'Onzin au phagosome pourrait s'expliquer par la localisation de cette protéine au niveau de la membrane de sa vésicule de résidence. En effet, les travaux de Desjardins et collaborateurs (Desjardins et al. 1994) montrent que les protéines de la membrane des compartiments tardifs de la voie endocytaire n'apparaissent en quantités significatives au niveau de la membrane du phagosome qu'après des périodes de chasse de six heures, les transferts de membranes se faisant probablement selon une cinétique plus longue que celle des protéines luminales. Ceci est appuyé par la démonstration, dans nos expériences, que l'Onzin s'associe aux billes de latex en même temps que LAMP1.

Ainsi, en nous servant des propriétés de fusion du phagosome avec différents compartiments de la voie endocytaire et en montrant que l'Onzin pouvait interagir

avec le phagosome, nous avons démontré, une fois de plus, la localisation de l'Onzin au sein de la voie endocytaire.

Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales et perspectives

Notre laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années au lysosome, compartiment terminal de la voie endocytaire. La stratégie que nous avons choisie pour approfondir les connaissances de ce compartiment intracellulaire a été l'identification de ses constituants protéiques. Pour cela, nous avons notamment réalisé une analyse par spectrométrie de masse des membranes d'une fraction de foie de rat fortement enrichie en lysosomes. Cette analyse a mené à la découverte de l'Onzin, une petite protéine riche en cystéines, pour laquelle aucune information n'était alors disponible. Nous avons décidé d'étudier la localisation intracellulaire de cette protéine, considérant que sa découverte au sein de cette préparation enrichie en lysosomes ne constituait pas une preuve définitive de son association à ce compartiment. En effet, nous ne pouvons exclure qu'un certain nombre de protéines non lysosomales aient été isolées au sein de l'échantillon, en même temps que les lysosomes.

Nous avons commencé l'étude de la distribution intracellulaire de l'Onzin à partir de foie de souris. Ce choix a été motivé par le fait que (1) cette protéine est absente des lignées cellulaires immunitaires classiquement utilisées, (2) cette protéine a été initialement découverte dans un échantillon de foie de rat, (3) les séquences d'Onzin de rat et de souris sont identiques à 97 %, (4) l'Onzin est absente du sérum de souris, (5) les travaux portant sur l'étude des compartiments intracellulaires du foie abondent dans la littérature, ce qui nous donnait plus de chances d'intégrer nos résultats dans un ensemble de connaissances déjà établies.

Notre étude biochimique et morphologique de la localisation intracellulaire de l'Onzin hépatique indique que cette protéine semble être partagée entre les membranes plasmiques des hépatocytes et des vésicules cytoplasmiques présentes dans les cellules de Kupffer. Nous nous sommes interrogée sur la nature des vésicules auxquelles l'Onzin pourrait être associée. Etant donné que l'Onzin a initialement été

découverte dans un échantillon très enrichi en lysosomes, nous avons voulu tester l'hypothèse de l'association de cette protéine aux lysosomes.

Après fractionnement subcellulaire par centrifugation isopycnique de la fraction « mitochondriale totale » contenant la majeure partie des lysosomes du foie, nous avons pu conclure que l'Onzin n'est pas associée aux lysosomes. Cependant, il est important de prendre certaines précautions car les marqueurs que nous avons considérés pour parvenir à cette conclusion pourraient ne pas être représentatifs de la population cellulaire minoritaire dans laquelle l'Onzin est située, à savoir les cellules de Kupffer. Pour davantage creuser l'hypothèse de la localisation de l'Onzin au sein d'un lysosome, nous avons (1) tracé la voie endocyttaire des cellules de Kupffer et (2) induit la modification de la densité des lysosomes hépatiques.

L'invertase injectée à une souris est capturée dans le foie par les cellules sinusoidales, c'est-à-dire les cellules endothéliales et les cellules de Kupffer. Même si ces deux types de cellules ne présentent pas la même capacité à capturer la protéine injectée, nous pouvons raisonnablement considérer que l'invertase est présente dans l'appareil endocyttaire des deux types cellulaires, pouvant dès lors être considérée comme un traceur de leur voie endocyttaire. Lorsque cette molécule atteint le lysosome, sa densité d'équilibre est très différente de celle de l'Onzin, confirmant que l'Onzin n'est pas associée au lysosome.

Le triton WR-1339 est un détergent non-ionique connu pour son effet drastique sur la densité des lysosomes de l'ensemble des cellules hépatiques. La densité du compartiment auquel l'Onzin est associée est fortement affectée par ce traitement. Alors que la distribution de ce compartiment en gradient de densité est très éloignée de celle du lysosome avant traitement, les distributions de ces deux organites se rapprochent progressivement suite à l'injection, pour finalement parfaitement se superposer en fin de migration. Aussi, si le compartiment de résidence de l'Onzin, en conditions physiologiques, est différent du lysosome, il acquiert, suite à l'injection de Triton WR-1339, les propriétés biochimiques de cet organite modifié : il devient un tritosome.

Ces expériences soulignent donc un rapport étroit entre l'Onzin et le lysosome, soutenant l'idée de la localisation de l'Onzin au sein de la voie endocytaire. La démonstration de l'association de l'Onzin au phagosome des cellules de Kupffer et des macrophages péritonéaux vient confirmer cette idée.

La localisation de l'Onzin dans un compartiment proche du lysosome a également été confirmée, par des approches biochimique et morphologique, dans les macrophages péritonéaux, cellules partageant de nombreux points communs (origine, morphologie, fonction) avec les cellules de Kupffer dans lesquelles l'Onzin est majoritairement présente dans le foie. Par ailleurs, l'utilisation de ces cellules a permis de proposer la localisation de l'Onzin au sein des endosomes tardifs, ce qui est cohérent avec l'association de l'Onzin aux exosomes sécrétés par les cellules dendritiques de souris.

Ainsi, sur la base de la somme d'informations que ce travail a apporté quant à la localisation intracellulaire de l'Onzin dans un macrophage, nous avons construit un schéma permettant de positionner l'Onzin au sein de la voie endocytaire (figure 55). Dans ce schéma, nous associons l'Onzin à un compartiment vésiculaire en lien dynamique avec le lysosome mais différent, à l'état d'équilibre, du lysosome. L'invertase injectée passerait par ce compartiment avant d'atteindre le lysosome dans lequel elle s'accumule. Le Triton WR-1339, du fait de sa nature chimique, modifierait la dynamique entre le lysosome, devenu un tritosome et le compartiment de résidence de l'Onzin, amenant l'Onzin à être progressivement associée, à l'état d'équilibre, à un tritosome. La solubilisation de l'Onzin au sein de ce tritosome viendrait d'un changement direct (ex : extraction de particules lipidiques de la membrane « modifiée ») ou indirect (ex : déclenchement d'un mécanisme d'invagination de petits fragments de membrane plasmique), survenant suite à l'injection de Triton WR-1339.

De manière plus générale, nous pensons que le positionnement de l'Onzin au sein de la voie endocytaire doit désormais être précisé par microscopie électronique,

sur des coupes de foie de souris contrôles et de souris ayant reçu une injection de Triton WR-1339 ou d'invertase. Nous pourrions par exemple vérifier, en suivant la cinétique d'endocytose d'une faible quantité d'invertase couplée à des particules d'or, si (et à quel moment) cette molécule co-localise avec l'Onzin. Par ailleurs, nous pourrions regarder si, après injection de Triton WR-1339, l'Onzin est située dans un compartiment surchargé au sein duquel une activité phosphatase acide peut être détectée.

La microscopie électronique nous permettrait également de vérifier une hypothèse que nous avons émise au cours de notre travail pour expliquer l'ensemble des résultats obtenus sur la localisation intracellulaire de l'Onzin. La présence de l'Onzin (1) dans la voie endocytaire, (2) au sein d'un compartiment non lysosomal qui contient du LBPA et la protéine LAMP1, (3) dans les exosomes de cellules dendritiques et (4) dans la lumière d'une vésicule (ce qu'aucun élément de la séquence de cette protéine ne permet d'expliquer), sont autant d'éléments qui nous permettent de proposer l'association de l'Onzin au corps multivésiculaire. Cependant, nous n'avons pas pu tester cette hypothèse de façon non ambiguë, du fait de l'absence de marqueurs protéiques de ce compartiment. Un tel marqueur aurait pu, en effet, nous permettre de déterminer la distribution des corps multivésiculaires dans les gradients de densité que nous avons réalisés et de comparer cette distribution à celle de l'Onzin. Nous proposons désormais de tirer profit de la morphologie toute particulière du corps multivésiculaire pour l'identifier, en microscopie électronique et vérifier ainsi l'association éventuelle de l'Onzin à ce compartiment.

Nous avons tenté de réaliser une étude par microscopie électronique en utilisant les différents anticorps dirigés contre des peptides de l'Onzin (collaboration avec Marc Pypaert, Yale University School of Medicine, USA). Nous avons obtenu, lors de notre première tentative, un signal très intense sur des coupes d'intestin de souris. Ce signal était présent au niveau des corps multivésiculaires, des saccules de Golgi et de vésicules ressemblant à des endosomes (figure 56). Cette distribution est en accord avec celle que nous avons mise en évidence en utilisant d'autres techniques, notamment l'immunofluorescence, ce qui nous encourage à penser que le signal est spécifique. Cependant, pour des raisons que nous ne pouvons expliquer, nous n'avons

jamais pu reproduire ce marquage dans les expériences qui ont suivi, ni sur des coupes d'intestin, ni sur des coupes de foie. Nous pensons qu'il est indispensable de poursuivre nos efforts visant à retrouver les conditions expérimentales permettant de mettre en évidence l'Onzin par microscopie électronique.

Dans le travail que nous avons réalisé, nous avons toujours essayé d'identifier le compartiment de résidence de l'Onzin en le comparant à différents marqueurs d'organites intracellulaires. Il s'est avéré que, hormis plusieurs jours après injection de Triton WR-1339, le compartiment auquel l'Onzin est associée ne ressemble jamais parfaitement à un compartiment identifiable par les différents marqueurs classiques utilisés. Aussi, nous proposons désormais de procéder différemment en nous basant sur de récents travaux publiés par le groupe de Matthias Mann (Foster et al. 2006). Ce groupe a établi, en utilisant des outils de protéomique quantitative, la distribution de dix compartiments intracellulaires de foie de souris, dans un gradient de densité, en identifiant, de façon systématique, les différents constituants de ces compartiments (1404 protéines au total). Nous proposons de réaliser, avec les outils en cours de développement au laboratoire, une étude similaire sur un gradient de densité réalisé à partir d'une fraction MLP de macrophages péritonéaux, afin de déterminer la composition protéique du compartiment de résidence de l'Onzin.

Nous désirons désormais confronter les résultats que nous avons obtenus jusqu'ici sur la localisation intracellulaire de l'Onzin à ceux récemment publiés par Rogulski et collaborateurs (Rogulski et al. 2005). Ce groupe a étudié par une approche morphologique la localisation intracellulaire de la protéine de fusion Onzin-EBFP après transfection transitoire de cellules Cos 7. Il montre que l'Onzin-EBFP est localisée dans le noyau et le cytoplasme des cellules transfectées, lorsque celles-ci sont en phase de croissance et qu'elle rejoint la membrane plasmique lorsque les cellules rentrent en apoptose. Nos travaux ont porté sur l'étude de la localisation intracellulaire de l'Onzin endogène dans les cellules de Kupffer et dans les macrophages péritonéaux. Que ce soit par des approches biochimiques ou morphologiques, nous n'avons jamais constaté la présence de l'Onzin dans le noyau ou sous forme soluble dans le cytoplasme de ces cellules. Par ailleurs, nous avons

provoqué l'apoptose de macrophages péritonéaux de souris en culture en utilisant trois différentes drogues, dont celle utilisée par Rogulski et collaborateurs, c'est-à-dire la VP-16. Contrairement à ce que décrit ce groupe, nous n'avons pas constaté de translocation de l'Onzin du cytoplasme vers la membrane plasmique dans ces cellules apoptotiques.

Parallèlement à nos travaux sur la localisation intracellulaire de l'Onzin endogène, nous avons construit différents vecteurs permettant l'expression de l'Onzin fusionnée aux tags myc, FLAG et GFP. Ces vecteurs ont été transfectés transitoirement dans des cellules HeLa, Cos 5, Rat 2 et la localisation de l'Onzin taggée a été observée par imagerie confocale. De façon surprenante, nous avons constaté que la localisation intracellulaire de la protéine de fusion variait en fonction du tag fusionné à l'Onzin. Ainsi, l'Onzin-GFP était préférentiellement située dans le cytoplasme et le noyau des différentes cellules, l'Onzin-myc semblait s'agréger ponctuellement dans le cytoplasme, alors que l'Onzin-FLAG formait une sorte de réseau dans le cytosol des cellules. Nous n'avons jamais observé de signaux comparables à ceux obtenus en utilisant un anticorps dirigé contre l'Onzin endogène dans différentes cellules comme les macrophages péritonéaux, les cellules de Kupffer ou les entérocytes.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les problèmes rencontrés lors de l'utilisation de l'Onzin fusionnée à un tag, telle que Rogulski et nous-même l'avons fait. Tout d'abord, nous pouvons imaginer que la présence du tag perturbe l'adressage naturel de l'Onzin à son compartiment de résidence, pourtant présent dans les cellules transfectées. En deuxième possibilité, nous pouvons supposer que le compartiment de résidence de l'Onzin, spécifique de certaines cellules, n'est pas présent dans les cellules employées par Rogulski et nous même. L'Onzin endogène n'étant pas détectée en Western blot dans les lignées cellulaires de type fibroblaste, comme celles utilisées pour ces transfections transitoires, nous pouvons envisager que ces cellules ne sont pas « équipées » pour accueillir une Onzin exogène dont l'expression est forcée par la transfection. Dans les deux cas, nous pensons que l'étude de la

localisation intracellulaire d'une protéine par expression de la protéine fusionnée à un tag n'est pas une stratégie adaptée à l'étude de l'Onzin.

Par ailleurs, comme l'équipe de Prochownik (Li et al. 2006), nous nous sommes intéressé au cours de ce travail à la fonction de l'Onzin. Du fait de la forte concentration en cystéines dans la séquence de cette protéine, nous avons creusé le lien éventuel qui pourrait exister entre cette protéine et les métaux (fer, zinc, cuivre). Enfin, étant donné la fonction de l'Onzin démontrée par le groupe de Prochownik dans des modèles cellulaires, nous avons testé le rôle anti-apoptotique de l'Onzin dans l'organisme, en utilisant les souris transgéniques que nous avons construites. Dans les différentes expériences que nous avons réalisées, nous n'avons pas mis en évidence d'effet de la surexpression de l'Onzin sur la survie des cellules immunitaires. Ces résultats doivent être confirmés et l'étude de la fonction de l'Onzin doit désormais être élargie à d'autres types cellulaires, en tenant compte notamment de la distribution très spécifique de cette protéine dans l'organisme.

Annexes

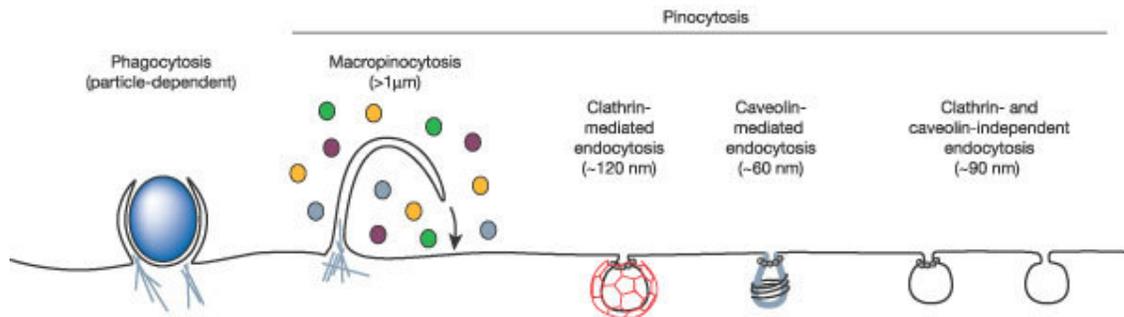
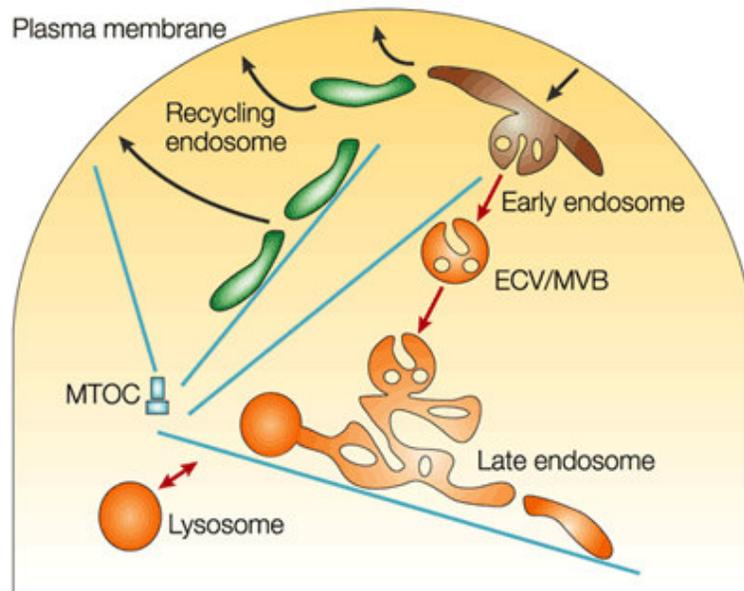


Figure 1 : *Différentes voies d'entrée par endocytose dans la cellule de mammifère.*
 Les macromolécules ou les particules peuvent être internalisées par endocytose, voie physiologique subdivisée en deux mécanismes distincts selon la taille et la nature du composé internalisé. **La phagocytose** permet l'internalisation de particules solides de grande taille, suite à la projection d'extensions membranaires autour de cette particule. **La pinocytose** aboutit à l'entrée de macromolécules ou de particules de petite taille (dépendamment ou indépendamment de la clathrine ou la cavéoline) ou de grandes quantités de liquide (macropinocytose).
 Extrait de Conner and Schmid 2003.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 2 : Représentation schématique de la voie endocytaire des cellules de mammifères.

Les molécules internalisées transitent dans un premier temps par l'**endosome précoce** où elles sont triées. Certains récepteurs sont recyclés vers la membrane plasmique *via* les **endosomes de recyclage**. Les molécules destinées à être dégradées transitent par la dernière station de tri de la voie endocytaire, les **endosomes tardifs**, avant d'aboutir au lysosome. Notons ici que l'existence et la morphologie de cet endosome tardif pourrait être dépendantes du type cellulaire considéré.

ECV/MVB: Vésicule « carrier » endosomale / corps multivésiculaire ; **MTOC** : centre organisateur des microtubules.

Extrait de Gruenberg 2001.

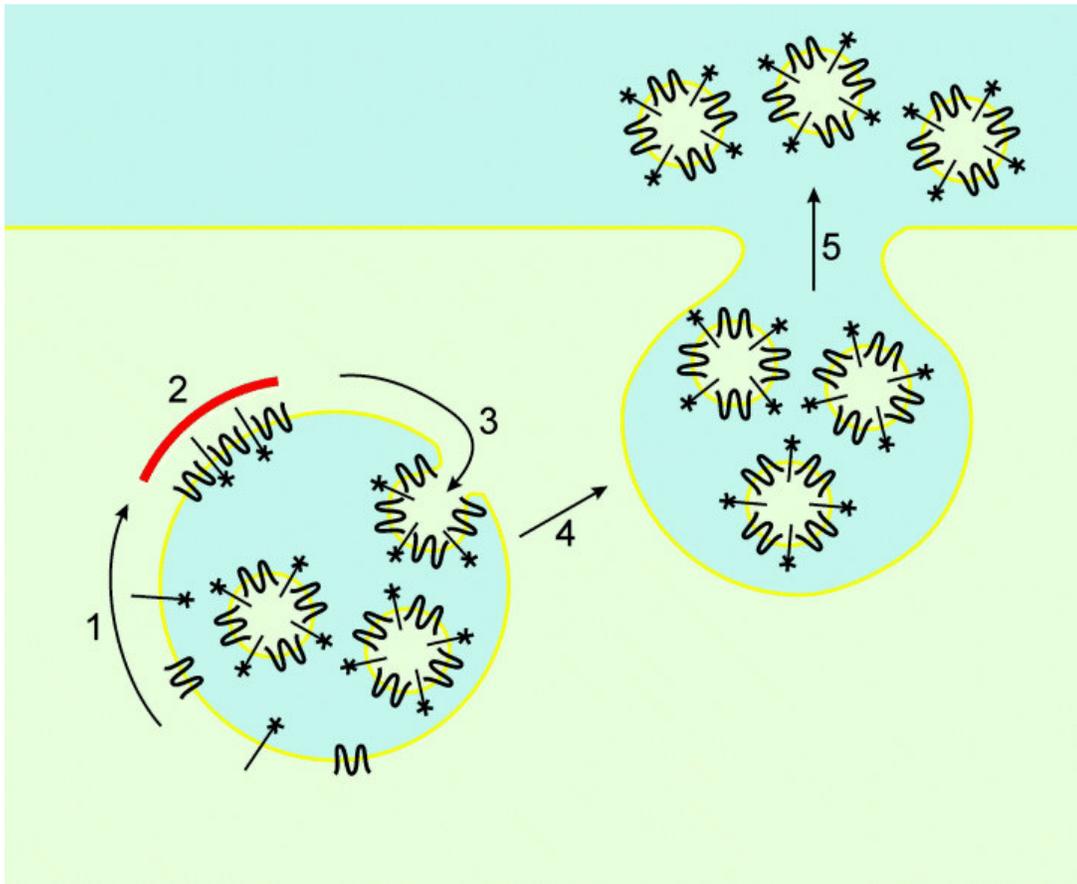
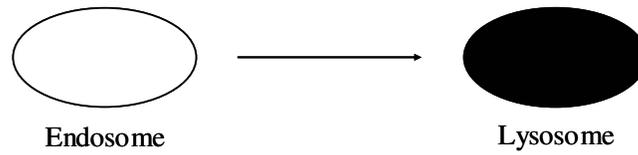


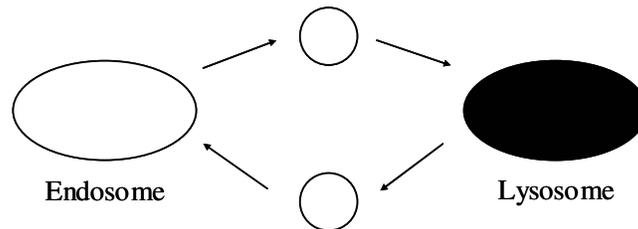
Figure 3 : *Biogenèse des exosomes.*

Les exosomes contiennent des protéines membranaires sélectionnées (1) au moment de leur formation dans le corps multivésiculaire (CMV). La machinerie de sélection des protéines (2) à la membrane du CMV implique notamment le système d'ubiquitination, la machinerie ESCRT et les rafts. Les protéines membranaires sélectionnées sont concentrées en patches (2) qui sont incorporés par bourgeonnement d'une vésicule vers le lumen du CMV (3). Les exosomes sont libérés dans le milieu extracellulaire par fusion du CMV avec la membrane plasmique (5).
Extrait de Stoorvogel et al. 2002.

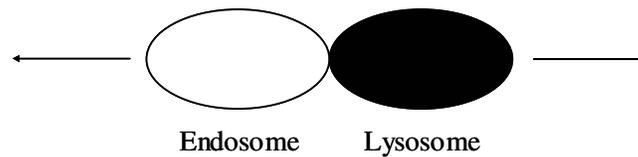
1/ Maturation



2/ Transport vésiculaire



3/ « Kiss and run »



4/ Organite hybride, fusion-fission

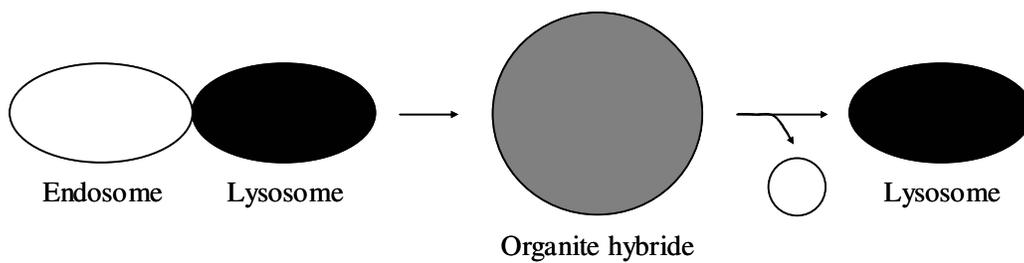


Figure 4 : Représentation schématique des hypothèses expliquant le transfert de matériel des endosomes tardifs aux lysosomes.
Voir le texte pour les détails de chaque hypothèse.
Modifié à partir de Luzio et al. 2005.

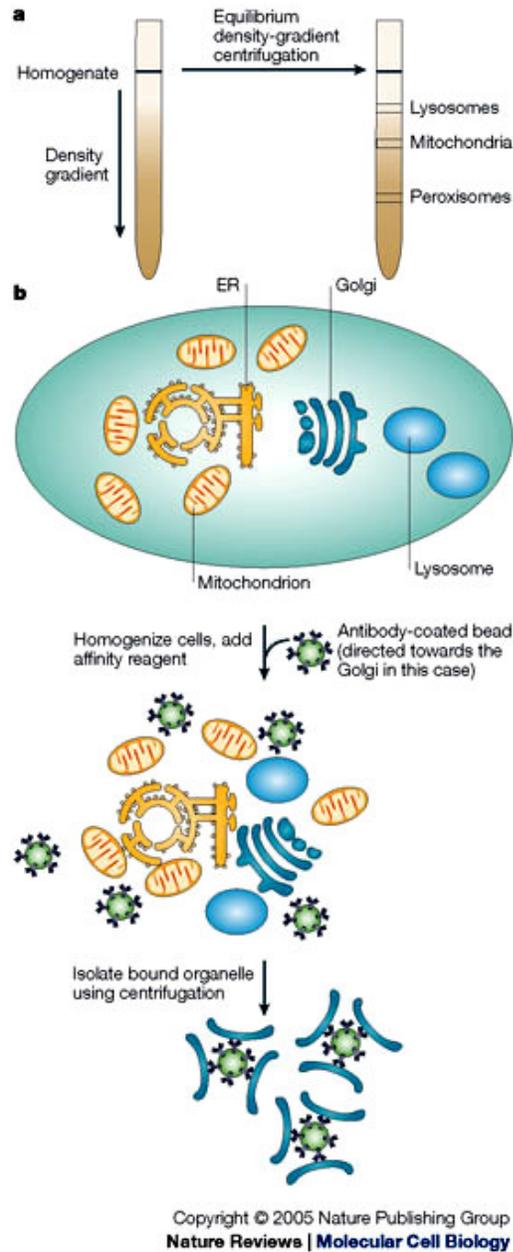


Figure 5 : Exemples de méthodes d'enrichissement en organites à partir d'un homogénat cellulaire.

Les techniques de centrifugation (**a**) permettent de séparer les organites intracellulaires contenus dans un mélange complexe comme un homogénat en fonction de leur taille et de leur densité. Un des principes du fractionnement subcellulaire par affinité est illustré en (**b**). Après incubation de l'homogénat total en présence de billes recouvertes d'anticorps, le compartiment cible est isolé par centrifugation permettant la sédimentation des billes.

ER : Réticulum endoplasmique.

Extrait de Yates et al. 2005.

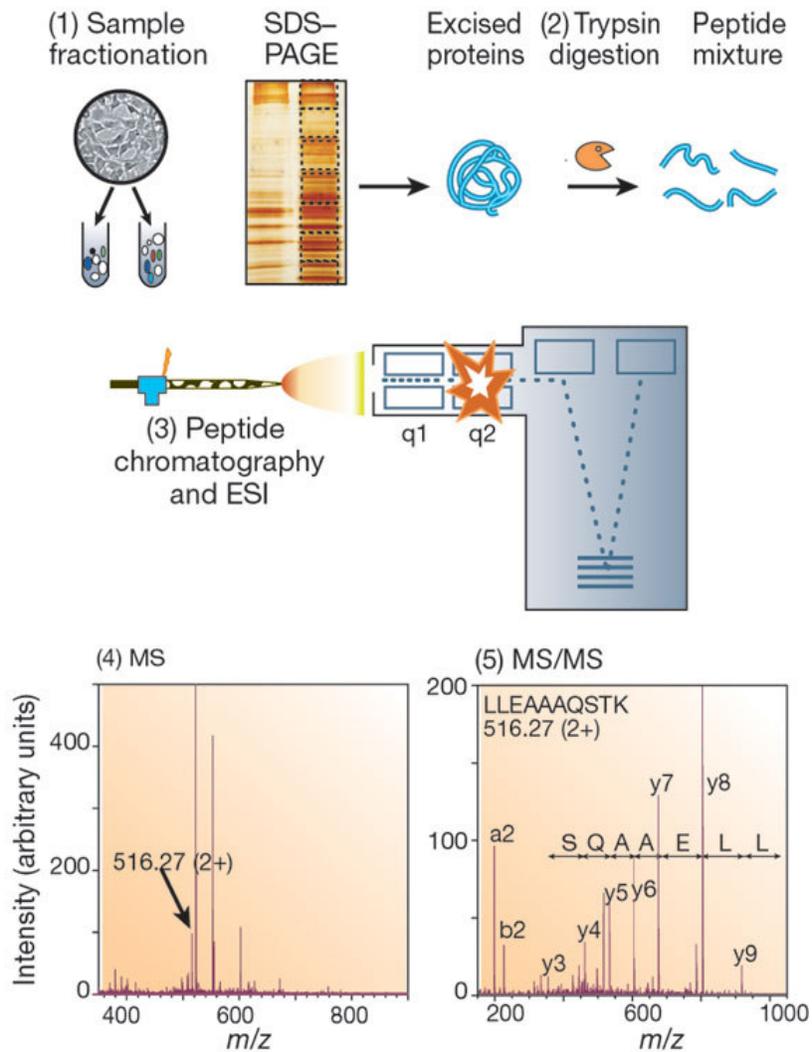
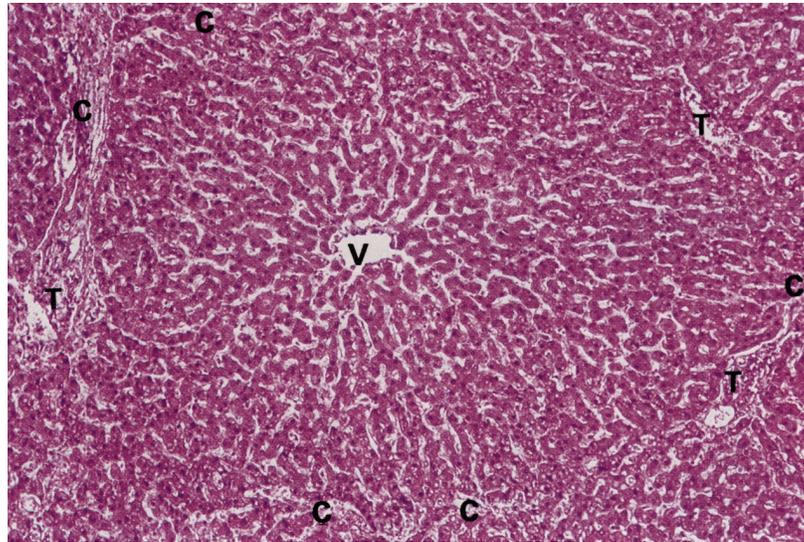


Figure 6 : Principe général de l'analyse des protéines par spectrométrie de masse.

(1) L'échantillon biologique est enrichi en un compartiment intracellulaire donné. Les protéines contenues dans ce compartiment isolé sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE ; le gel est découpé en fines bandes et les protéines contenues dans ces bandes sont digérées par la trypsine (2). Le mélange de peptides tryptiques ainsi obtenu est injecté dans un analyseur couplant la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse (3). L'analyse des différents peptides génère des spectres MS (4) ou MS/MS (5) qui permettent d'identifier les peptides injectés, et, par conséquent, les protéines de l'échantillon biologique étudié.

Extrait de Aebersold et al. 2003.

A



B

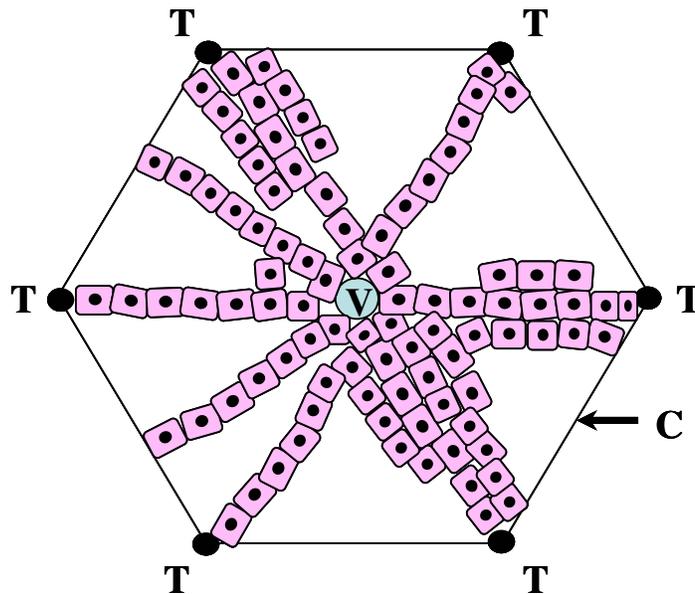


Figure 7 : Le lobule hépatique.

A : Coupe de foie colorée à l'hémalum-éosine, montrant l'organisation d'un lobule hépatique. Extrait de Young and Heath 2000.

B : Représentation schématique d'un lobule. Les hépatocytes (cellules rectangulaires) sont organisées en travées concentriques orientées des espaces portes (T) vers la veine centrolobulaire (V). Le tissu situé à la périphérie du lobule est riche en collagène (C).

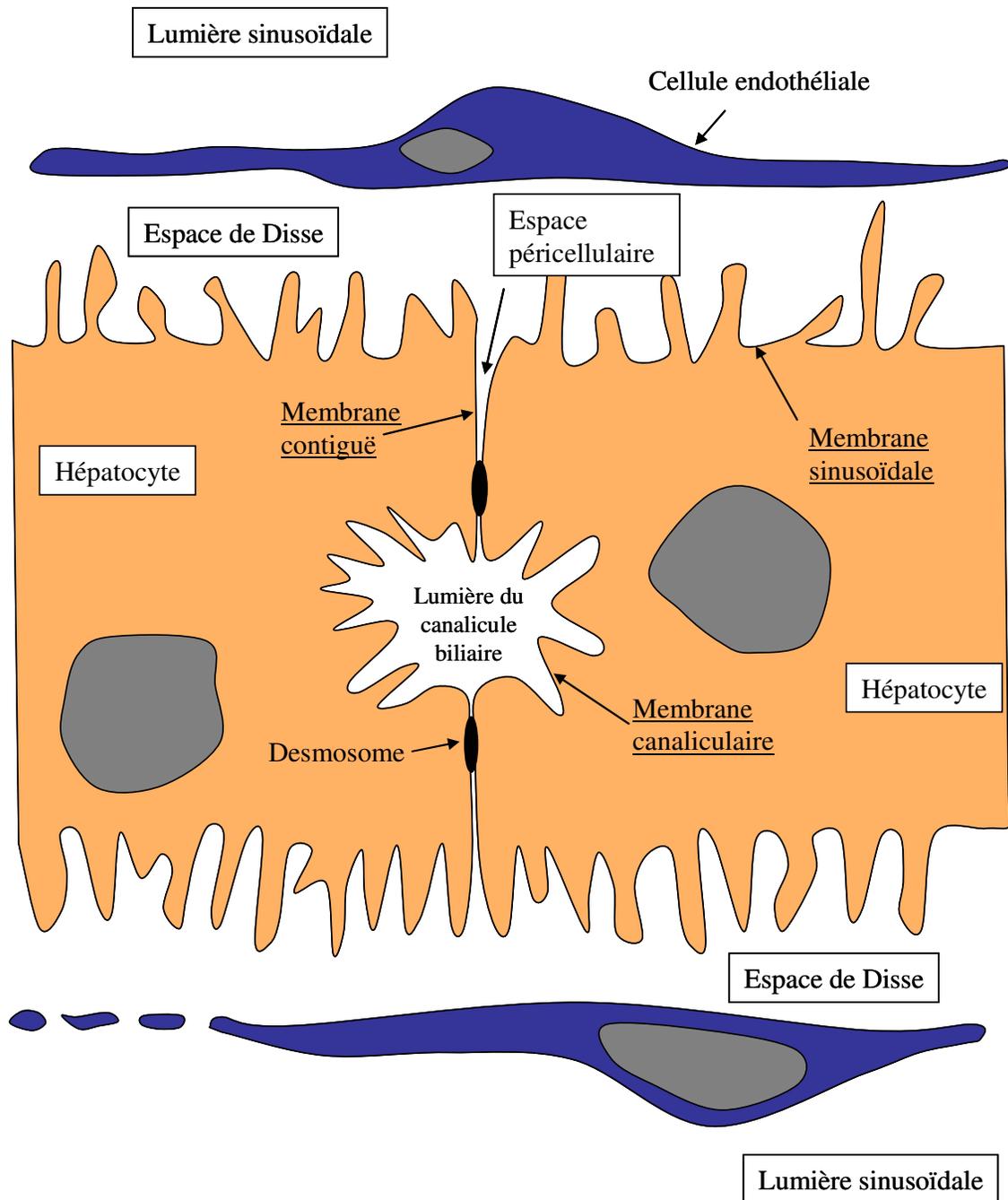


Figure 8 : *Les différents domaines membranaires de l'hépatocyte.*

La membrane sinusoidale, en contact avec l'espace de Disse, et la membrane contiguë, située entre deux hépatocytes, constituent le **pôle basolatéral** de l'hépatocyte. La membrane qui forme les parois du canalicule biliaire constitue le **pôle apical** de la cellule.

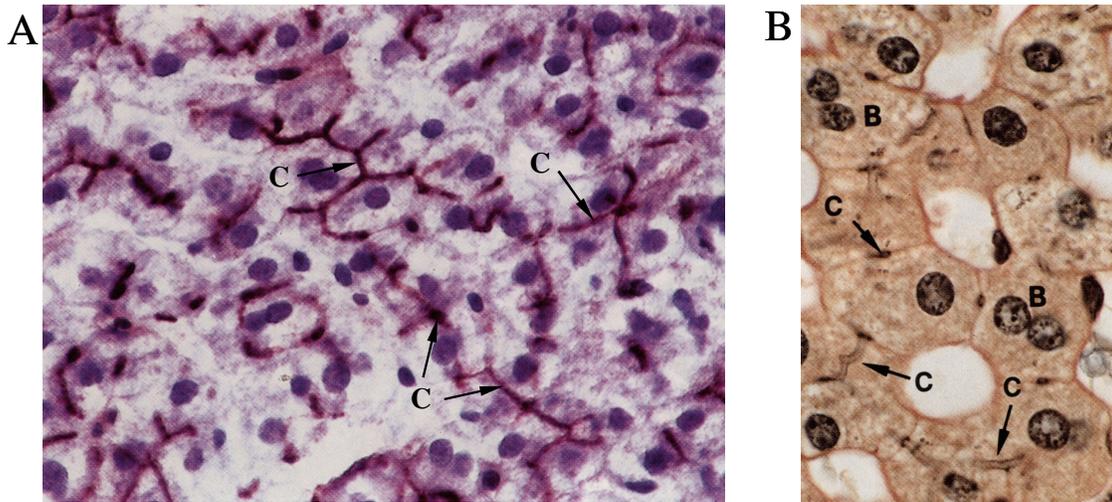


Figure 9 : *Mise en évidence des canalicules biliaires sur des coupes de foie de rat.*
Les canalicules biliaires (c) sont visualisés en (A) par mise en évidence de l'ATPase présente sur la coupe ou par coloration à l'hématoxiline ferreux (B).
Extrait de Young and Heath 2000.

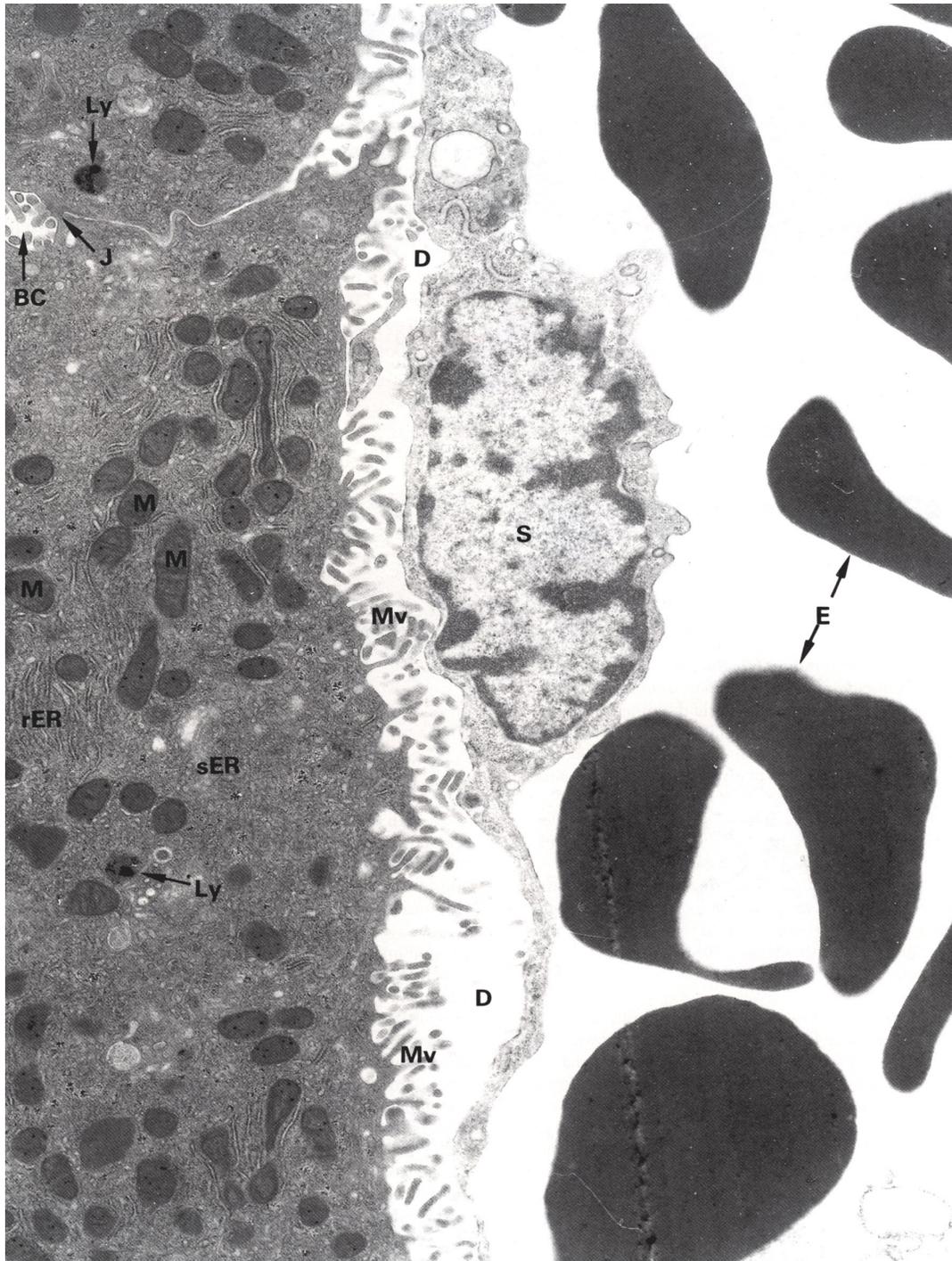


Figure 10 : *Coupe de foie de rat.*

Cette image, obtenue par microscopie électronique, permet de visualiser les trois types de membranes de l'hépatocyte : le canalicule biliaire (**BC**), séparé de l'espace péricellulaire par des jonctions serrées (**J**), la membrane contiguë entre deux cellules et la membrane sinusoidale formant des microvilli (**Mv**) dans l'espace de Disse (**D**). On distingue également une cellule endothéliale aplatie (**S**) formant la paroi du sinusoides, dans lequel de nombreux érythrocytes (**E**) sont présents.

Ly : lysosome ; **sER** et **rER** : réticulum endoplasmique lisse et rugueux ; **M** : mitochondrie.

Extrait de Young and Heath 2000.

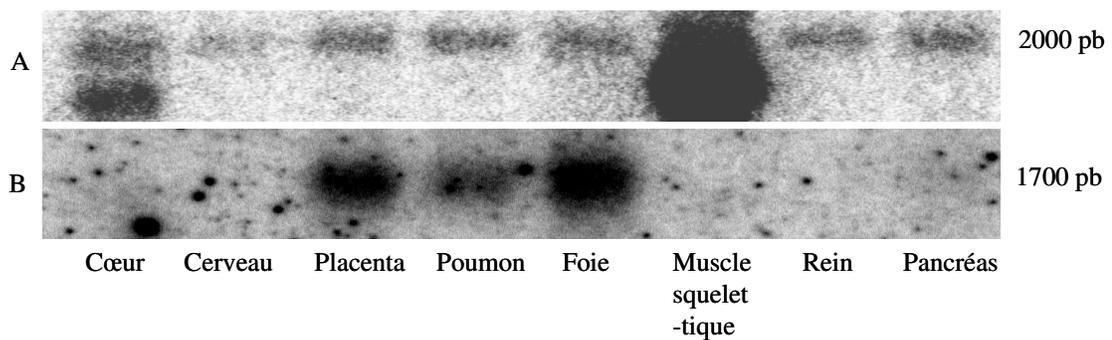


Figure 12 : *Expression relative de l'Onzin dans huit organes humains.*

Le Northern blot commercial BD 7760-1, comportant une quantité égale d'ARN extraits de huit tissus humains, est incubée en présence d'une sonde radiomarquée au ^{32}P correspondant à une partie de la séquence de l'ADNc de l'actine (**A**) et à la séquence totale de l'ADNc de l'Onzin humaine (**B**).

En (**A**) : une bande est présente aux environs de 2000 pb dans chacune des pistes du Northern et une deuxième bande correspondant à un ARNm légèrement plus petit est présente dans les pistes correspondant au cœur et au muscle squelettique. La bande supérieure correspond probablement à l'ARNm encodant la sous unité β de l'actine, ubiquitaire ; la bande inférieure pourrait correspondre à la sous unité α de l'actine, spécifique des muscles lisses, du myocarde et des muscles squelettiques.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Cerveau total	Cervelet gauche	Substance noire	Cœur	Œsophage	Colon transverse	Rein	Poumon	Foie	Leukemia HL-60	Cerveau fœtal	ARN total de levure
B	Cortex cérébral	Cervelet droit	Noyau Accubens	Aorte	Estomac	Colon descendant	Muscle squelettique	Placenta	Pancréas	HeLa S3	Cœur fœtal	ARNt de levure
C	Lobe frontal	Corps calleux	Thalamus	Atrium gauche	Duodénum	Rectum	Rate	Vessie	Glande surrénale	Leukemia K562	Rein fœtal	ARNr de E.Coli
D	Lobe pariétal	Amygdale	Hypophyse	Atrium droit	Jéjunum		Thymus	Utérus	Glande thyroïde	Leukemia MOLT-4	Foie fœtal	ADN de E.Coli
E	Lobe Occipital	Noyau Caudé	Moelle épinière	Ventricule gauche	Iléon		Leucocytes périphériques	Prostate	Glande salivaire	Lymphome de Burkitt, Raji	Rate fœtale	Poly r(A)
F	Lobe temporal	Hippocampe		Ventricule droit	Iloécécum		Ganglion lymphatique	Testicule	Glande mammaire	Lymphome de Burkitt, Daudi	Thymus fœtal	C ₀ t-1 ADN humain
G	Gyrus Post-central	Medulla Oblongue		Septum interventriculaire	Appendice			Ovaire		carcinome colorectal, SW480	Poumon fœtal	ADN humain 100ng
H	Pons	Putamen		Apex du cœur	Colon ascendant		Trachée			carcinome pulmonaire, A549		ADN humain 500ng

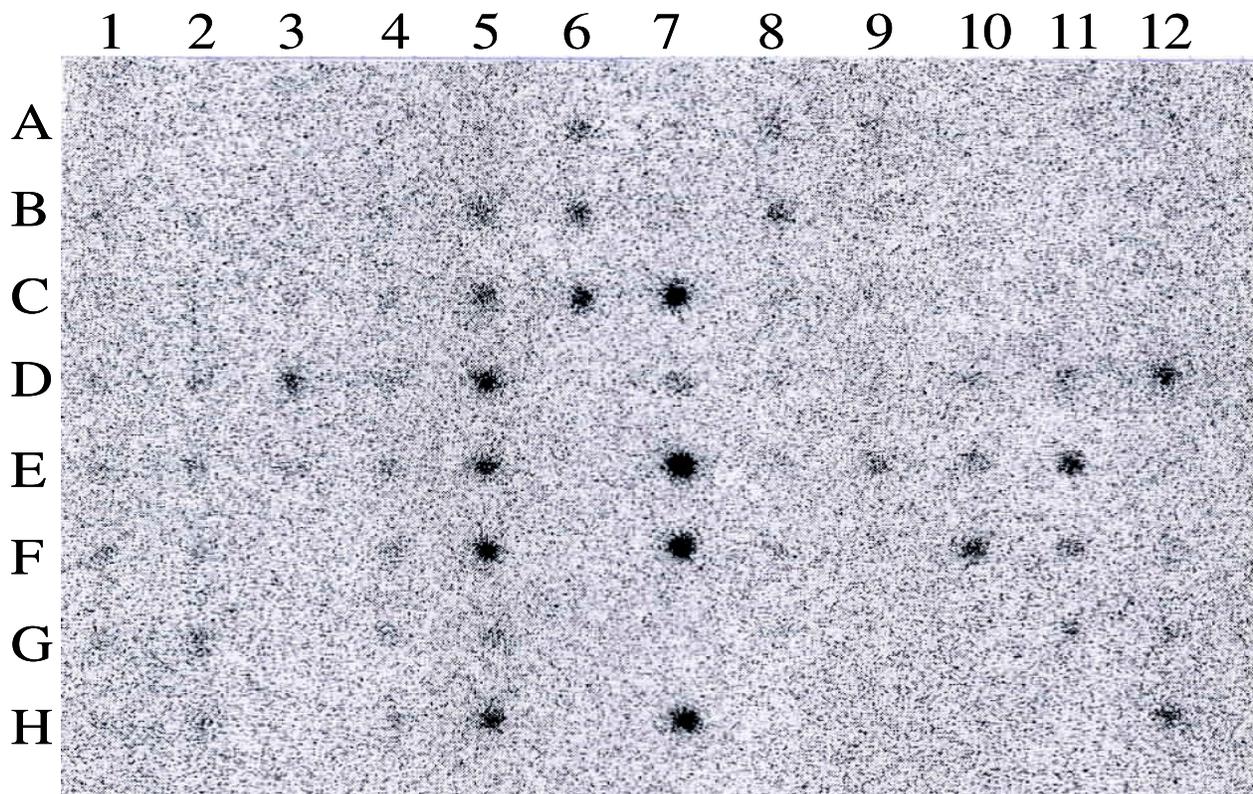
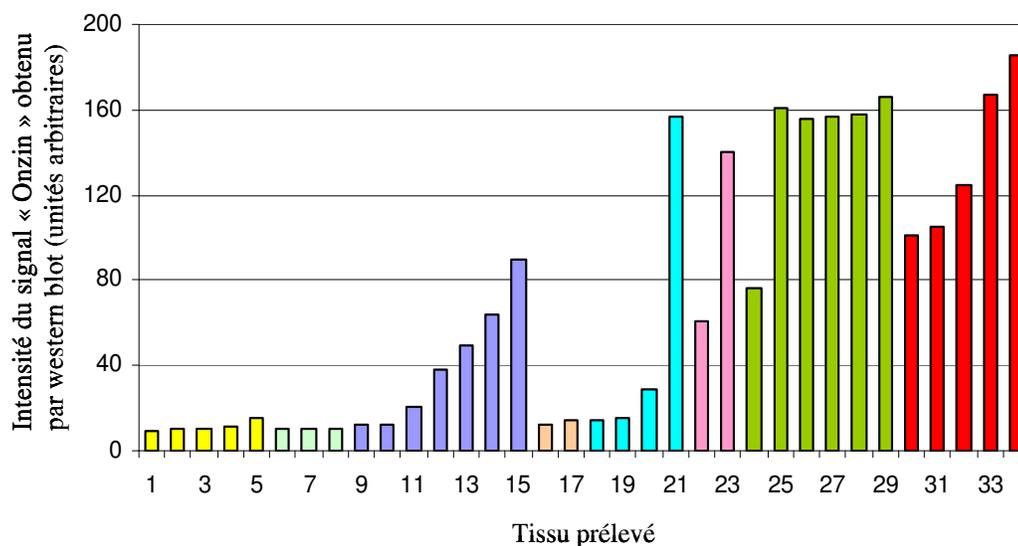


Figure 13: Expression relative de l'Onzin dans 75 cellules et tissus humains.

La membrane commerciale BD 636903, sur laquelle les ARN totaux extraits de 75 cellules ou tissus humains sont déposés en des dot-spots, est incubée en présence d'une sonde radiomarquée au ^{32}P correspondant à la séquence totale de l'ADNc de l'Onzin humaine. L'origine des différents spots est précisée dans le tableau.



1. Oeil 2. Muscle 3. Vx Sanguins 4. Oesophage 5. Trachée	9. Cœur 10. Pancréas 11. Rein 12. Poumon 13. Vessie 14. Foie 15. Vésicule biliaire	18. Testicules 19. Vésicule séminale 20. Épididyme 21. Canaux déférents	26. Intestin Grêle 27. Cæcum 28. Colon 29. Rectum
6. Cervelet 7. Bulbe olfactif 8. Cerveau	16. Gld salivaires 17. Gld surrénales	22. Ovaires 23. Utérus	30. Moelle Osseuse 31. Ganglions 32. Plaques de Peyer 33. Rate 34. Thymus

Figure 14 : *Distribution de l'Onzin dans 34 organes de souris.*

Les organes de souris C57Bl/6 sont homogénéisés au Potter dans un tampon de lyse contenant 50mM Tris pH 7.5, 100mM NaCl, 1% TritonX100, 0.2% Deoxycholate, inhibiteurs de protéases. Après dosage des protéines par la méthode BCA, la présence de l'Onzin au sein de 25 µg de protéines totales de chaque organe est évaluée par Western blot. Les signaux obtenus après exposition d'un film autoradiographique (voir chapitre II : Techniques expérimentales) sont quantifiés par le logiciel Scion (NIH, USA) et représentés en ordonnée de ce graphique.

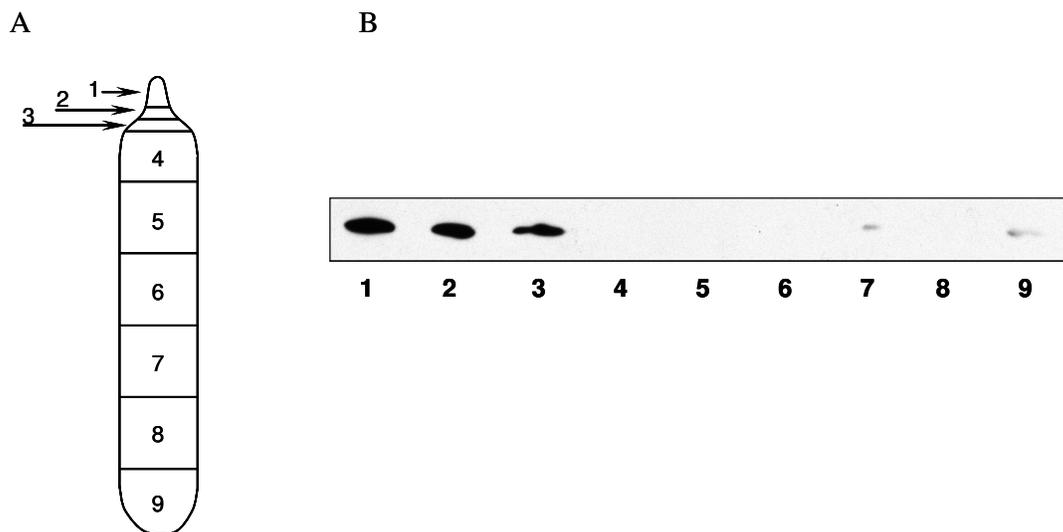


Figure 15 : Distribution de l'Onzin après centrifugation à haute vitesse de sérum de rat alourdi au KBr.

Le sérum issu du prélèvement de 5 rats Wistars nourris *ad libitum* est ajusté à une densité de $1,25 \text{ g/cm}^3$, par ajout de KBr. Le sérum (5,5 ml) est injecté dans un tube Quick Seal (Beckman) et centrifugé pendant 17 h à 50000 RPM, à 10°C , dans un rotor vertical VTi65 (Beckman). Le tube est ensuite sectionné en 9 fractions selon le schéma **A**, et la présence de l'Onzin dans 5 μl de chaque fraction (désalée par centrifugation sur colonne Microcon YM-10, Millipore) est détectée par Western blot (**B**).

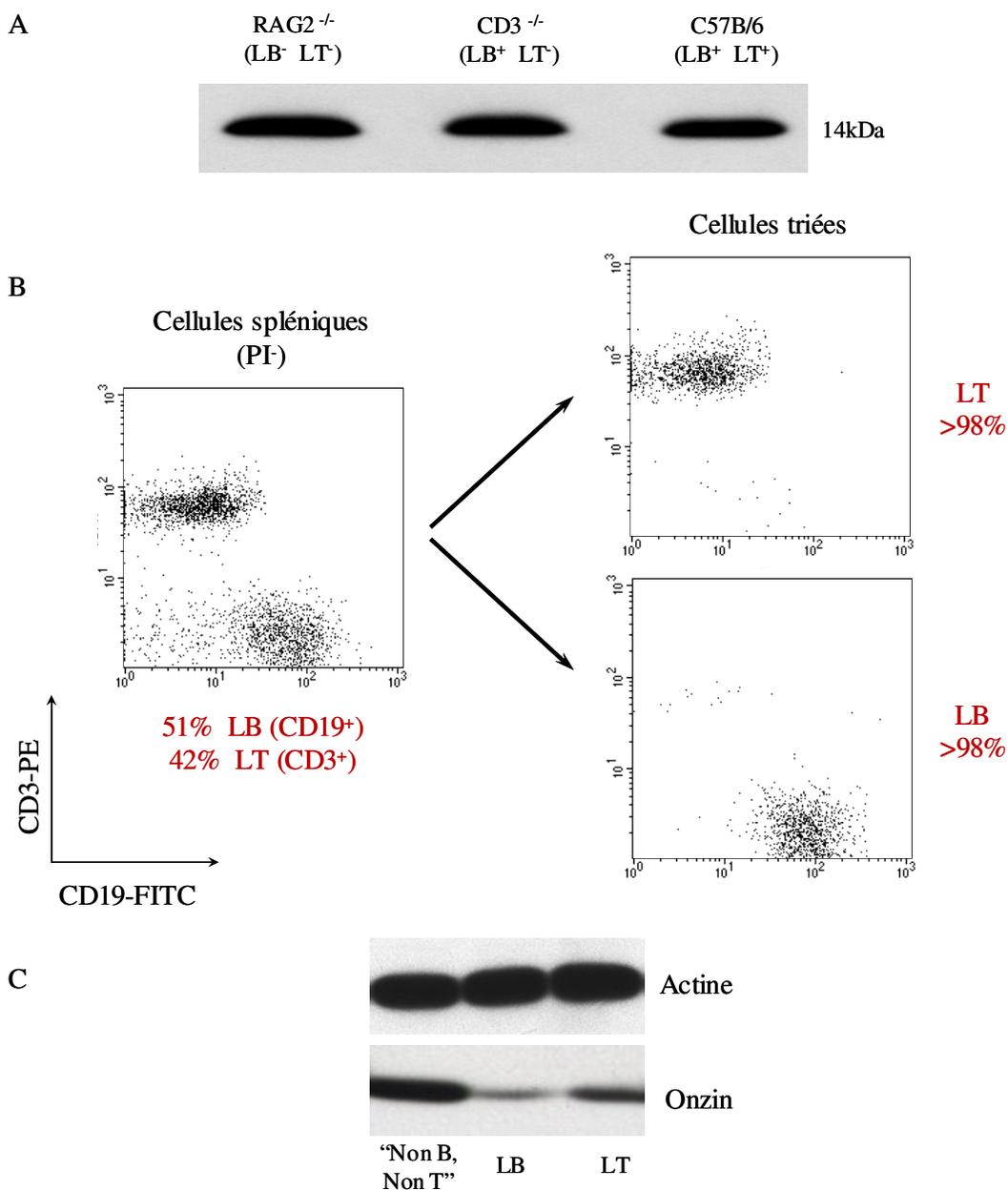


Figure 16 : Distribution de l'Onzin dans différentes populations cellulaires de rate de souris.

A : Les rates de souris RAG2^{-/-}, CD3^ε^{-/-} et C57Bl/6 sont homogénéisées au Potter dans un tampon de lyse contenant 50mM Tris pH 7.5, 100mM NaCl, 1% TritonX100, 0.2% Deoxycholate, inhibiteurs de protéases. La présence de l'Onzin dans 15µg de chaque échantillon est détectée par Western Blot.

B : Les rates de deux souris C57B/6 sont dissociées dans du PBS/ 3% SVF. Après marquage avec des anticorps anti-CD19 et anti-CD3 couplés, respectivement, au FITC et au PE, les lymphocytes B (LB, CD19⁺ CD3⁻) et les lymphocytes T (LT, CD19⁻ CD3⁺) sont isolés des autres cellules spléniques (CD19⁻ CD3⁻) au trieur de cellules (MoFlow, Dako Cytomation). La composition des populations lymphocytaires isolées est ensuite analysée par cytométrie en flux (FACSCalibur, Becton Dickinson).

C : La présence de l'Onzin dans 10 à 15 µg de protéines de chaque population cellulaire isolée est détectée par Western Blot. Les quantités de protéines déposées ont été ajustées en fonction de l'intensité du signal d'actine. « Non B, Non T » : CD19⁻ CD3⁻, PI : Iodure de Propidium.

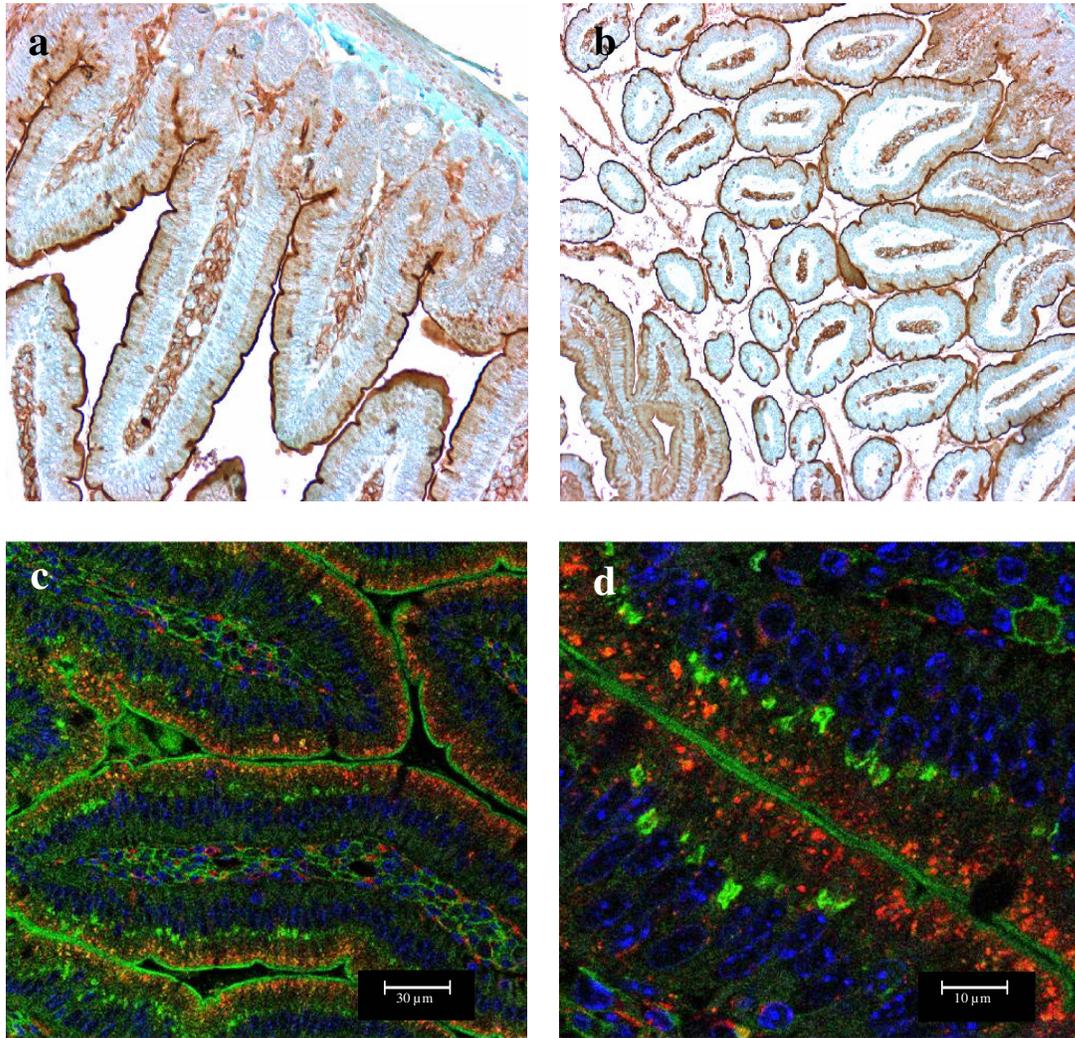


Figure 17 : *Distribution de l'Onzin dans l'intestin grêle de souris. Etude par immunohistologie et immunofluorescence.*

a, b : La présence d'Onzin se traduit par la formation d'un précipité brun sur la coupe.

c, d : Onzin en vert, LAMP1 en rouge, noyaux en bleu (Hoechst). Orange : superposition des signaux rouge et vert.

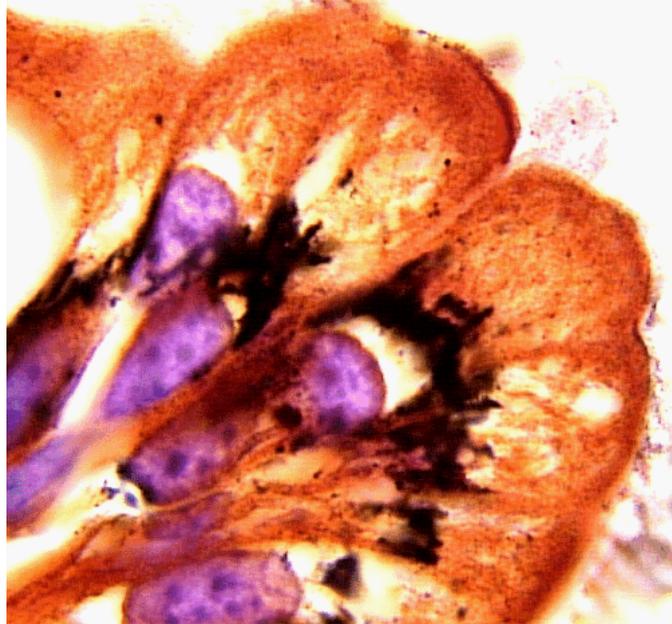


Figure 18 : *Coloration histologique de l'appareil de Golgi d'une cellule épithéliale intestinale d'Amphiuma (amphibien).*

Sur cette image, l'appareil de Golgi apparaît comme une structure noire située au dessus du noyau de la cellule polarisée.

Image issue de <http://biodidac.bio.uottawa.ca>.

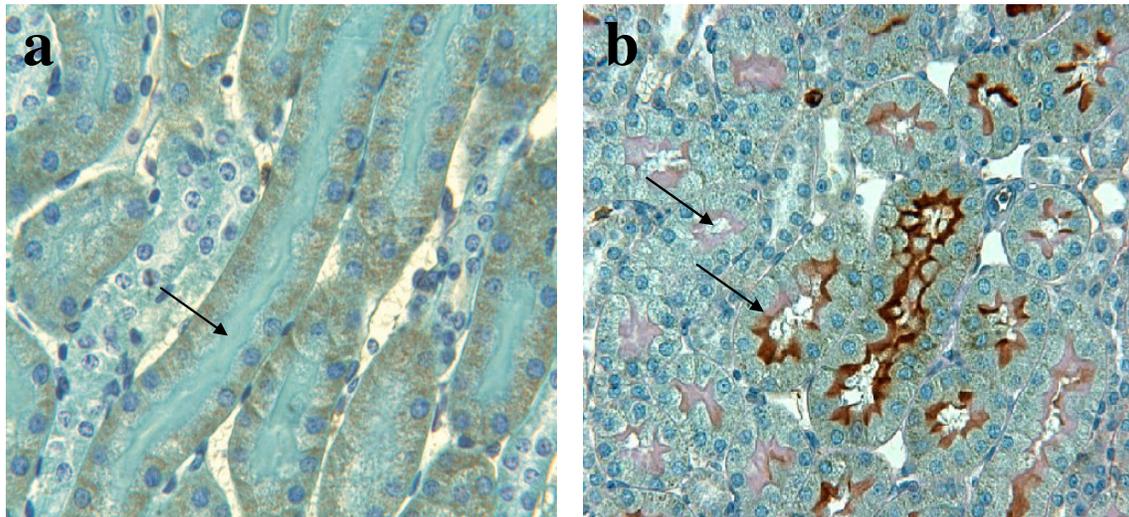


Figure 19 : *Distribution de l'Onzin au sein des tubules proximaux de reins de souris et de rat.*

La présence de l'Onzin se traduit par la formation d'un précipité brun sur la coupe. Les flèches pointent vers la bordure en brosse des cellules épithéliales qui tapissent les tubules proximaux.

a : Rein de souris

b : Rein de rat

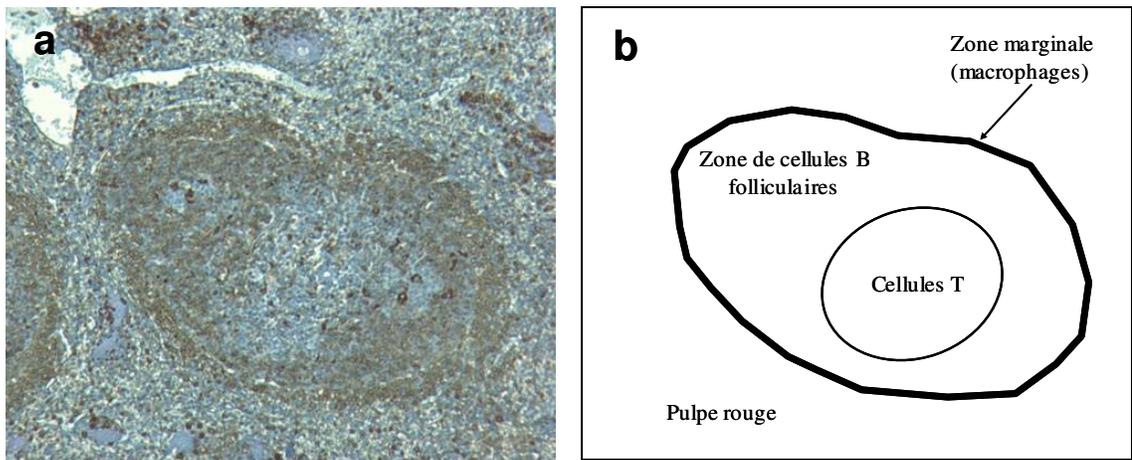


Figure 20 : *Distribution cellulaire de l'Onzin dans la pulpe blanche de la rate de souris.*
a : Image obtenue par immunohistochimie. La présence d'Onzin se traduit par la formation d'un précipité brun sur la coupe.
b : Représentation schématique des différentes régions observées dans l'image « **a** ».

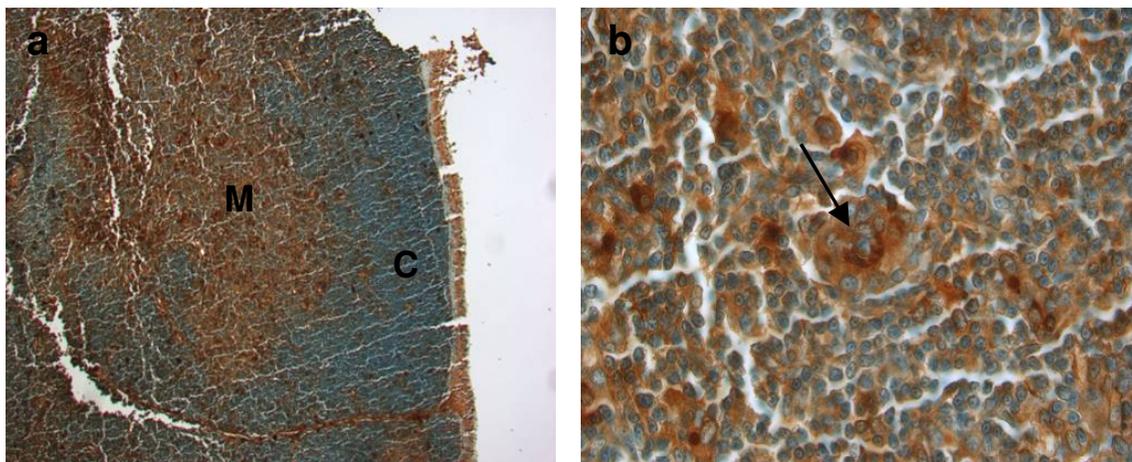


Figure 21 : *Distribution de l'Onzin dans le thymus de souris.*
a : Distribution de l'Onzin au sein d'un lobule thymique. **C** : cortex ; **M** : medulla.
b : Fort grossissement de la région médullaire du lobule, montrant, au centre, un corpuscule de Hassall (flèche).

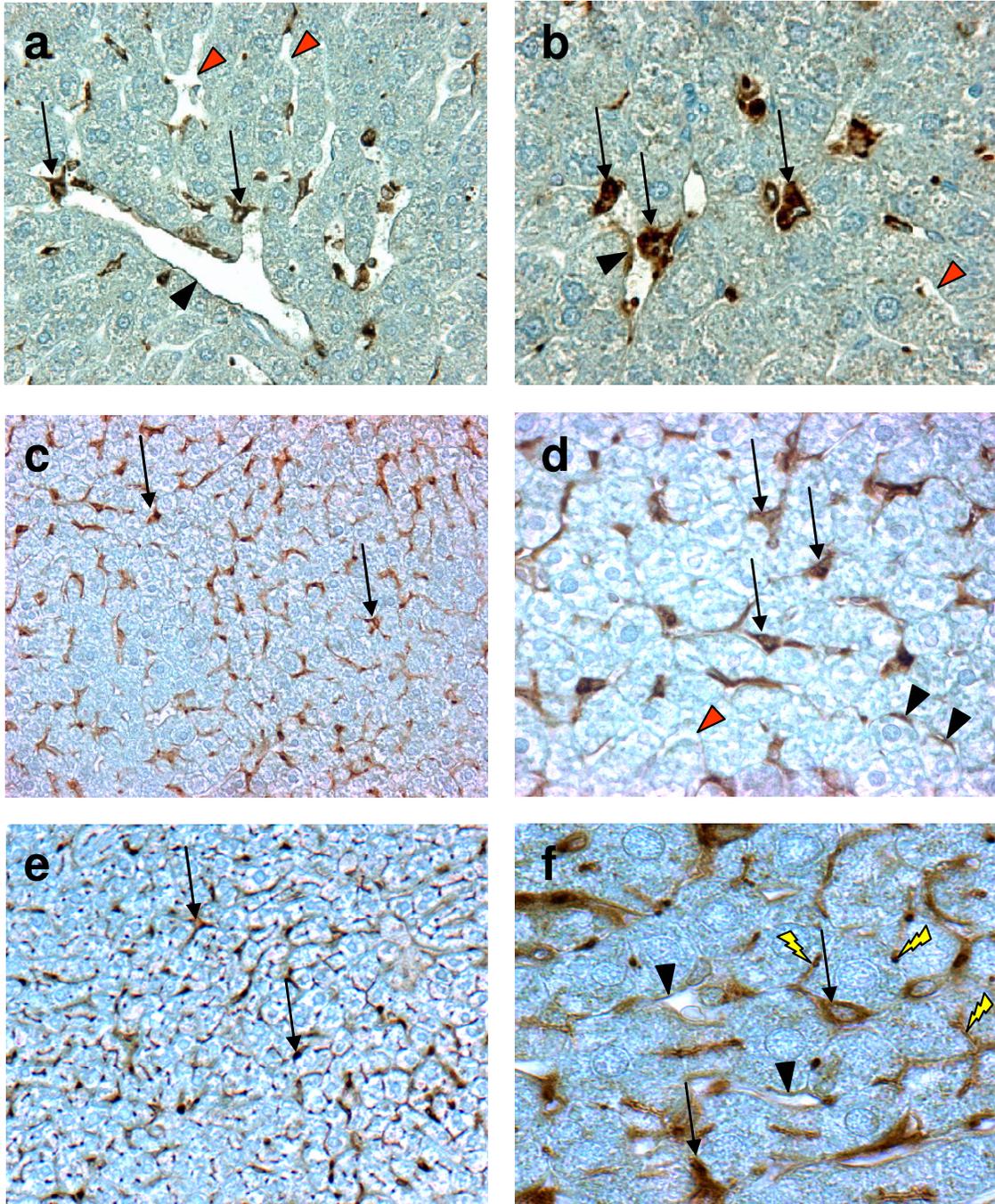


Figure 22 : *Distribution de l'Onzin dans le foie de rat, de souris sauvages et de souris TG-Onzin. Etude par immunohistochimie.*

a (x100), **b** (x250) : Foie de rat

c (x20), **d** (x200) : Foie de souris C57Bl/6

e (x20), **f** (x200) : Foie de souris TG-Onzin

Flèche : cellule de Kupffer ; **tête de flèche noire** : cellule endothéliale marquée ; **tête de flèche rouge** : cellule endothéliale non marquée ; **éclair jaune** : canalicule biliaire.

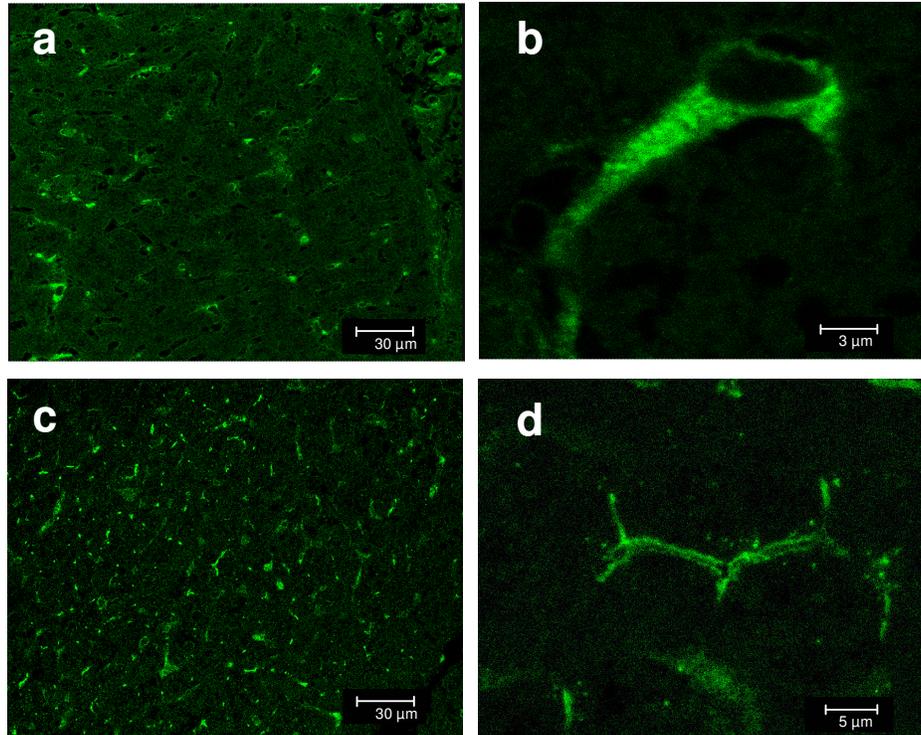


Figure 23 : *Distribution de l'Onzin dans le foie de souris sauvage et transgénique. Etude par immunofluorescence.*

a : Foie de souris C57Bl/6

b : Fort grossissement d'une cellule de Kupffer du foie de souris C57Bl/6

c : Foie de souris TG-Onzin

d : Fort grossissement de canalicules biliaires dans le foie de souris TG-Onzin

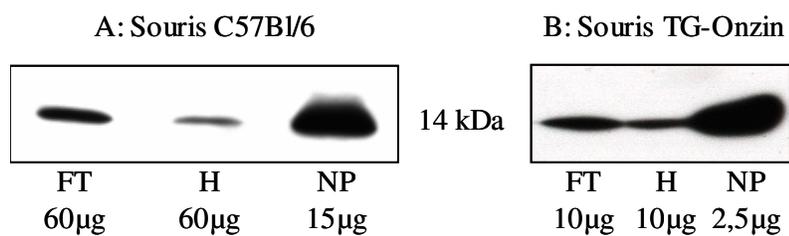


Figure 24: *Distribution de l'Onzin dans les cellules parenchymateuses et non parenchymateuses de foies de souris sauvage et transgénique, isolées après séparation cellulaire par perfusion de collagénase.*

Les hépatocytes (**H**) et les cellules non parenchymateuses (**NP**) de souris C57Bl/6 (**A**) et TG-Onzin (**B**) sont séparées par perfusion *in situ* de collagénase. La présence de l'Onzin au sein des populations cellulaires isolées par centrifugation est déterminée par Western blots, pour lesquels des quantités variables de protéines de chaque fraction sont déposées, comme indiqué sur la figure.

FT: Foie Total

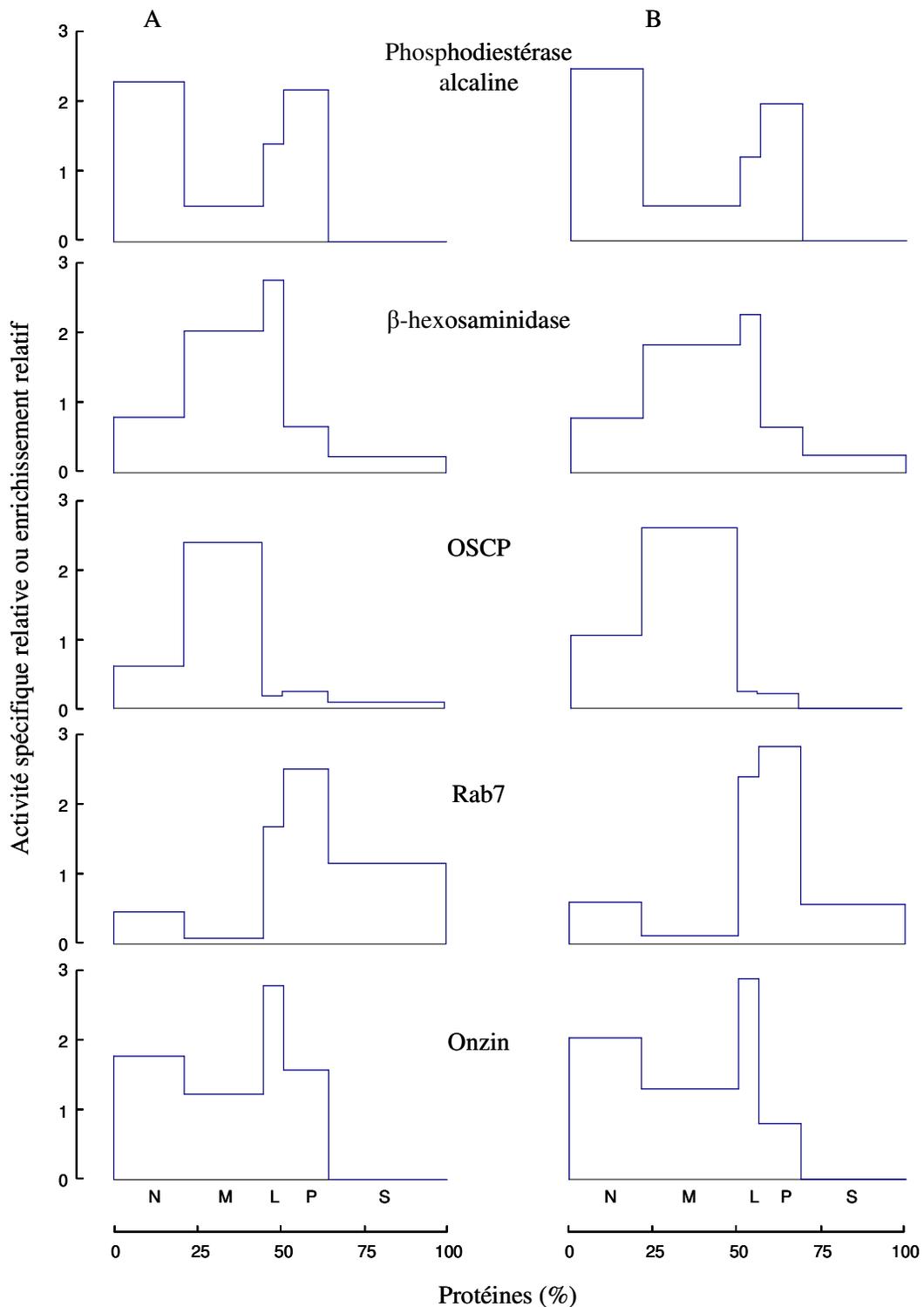


Figure 25 : Distribution de l'Onzin et de marqueurs de différents compartiments intracellulaires, dans les fractions isolées par centrifugation différentielle à partir de foies de souris sauvage (A) et transgénique (B).

Phosphodiesterase alcaline : membrane plasmique ; **β-hexosaminidase** : lysosomes ; **OSCP** (Oligomycin Sensitivity Conferring Protein) : mitochondrie ; **Rab7** : endosomes tardifs.

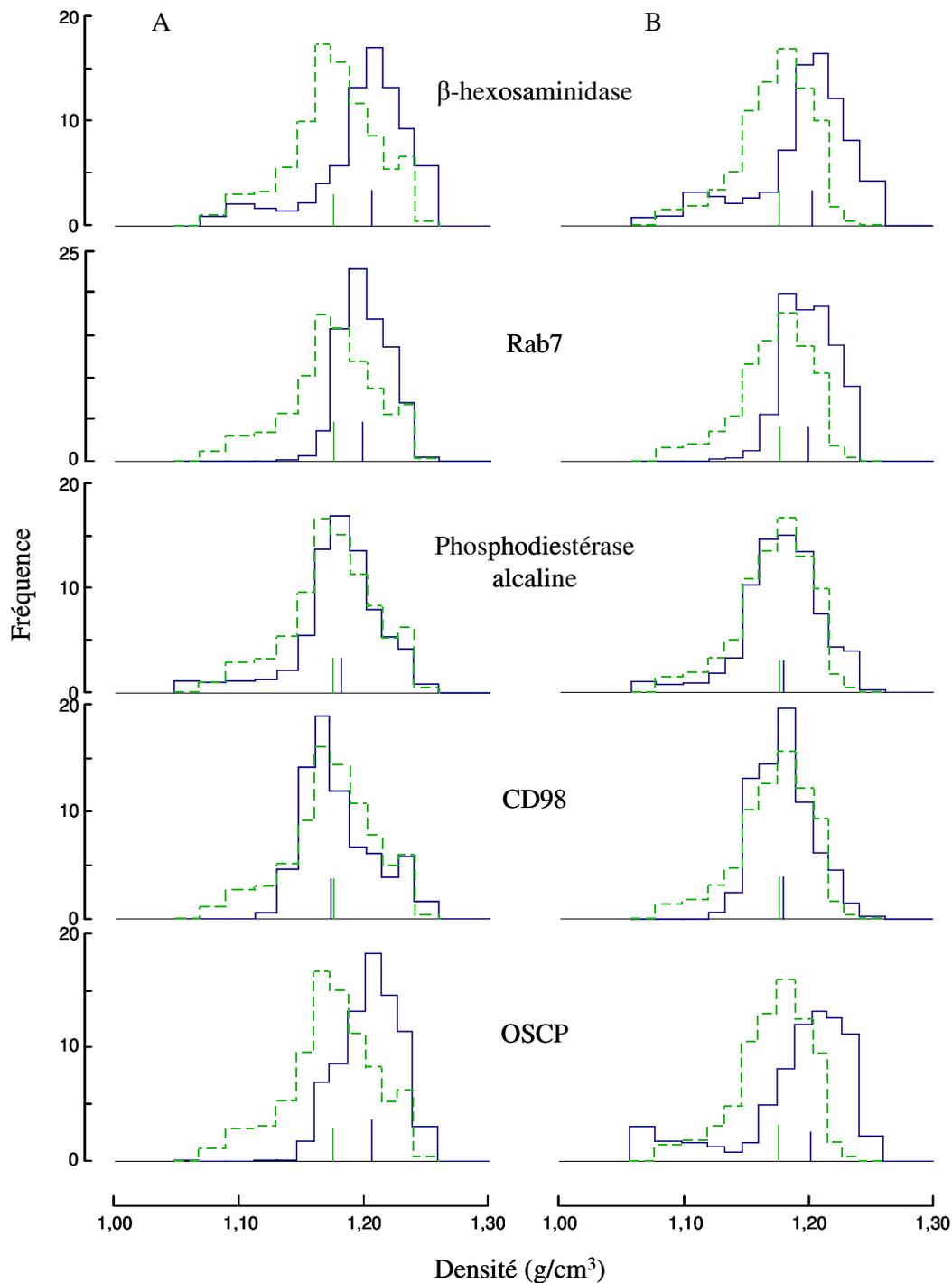


Figure 27 : Comparaison de la distribution de l'Onzin à celle de marqueurs de différents compartiments intracellulaires après centrifugation isopycnique de fractions ML de foies de souris sauvage et transgénique, dans un gradient de saccharose.

Des fractions ML préparées à partir de foies de souris C57Bl/6 (A) ou TG-Onzin (B) sont déposées à la surface de gradients de saccharose s'étendant de 1,09 à 1,26 g/cm³. Les centrifugations sont réalisées à 39000 RPM dans un rotor SW55Ti, pendant 2h30, à 4°C. Les distributions en traits pleins bleus sont celles des marqueurs dont le nom figure au dessus du graphique ; la distribution de l'Onzin est représentée sur chaque graphique en traits pointillés verts.

CD98 : membrane plasmique.

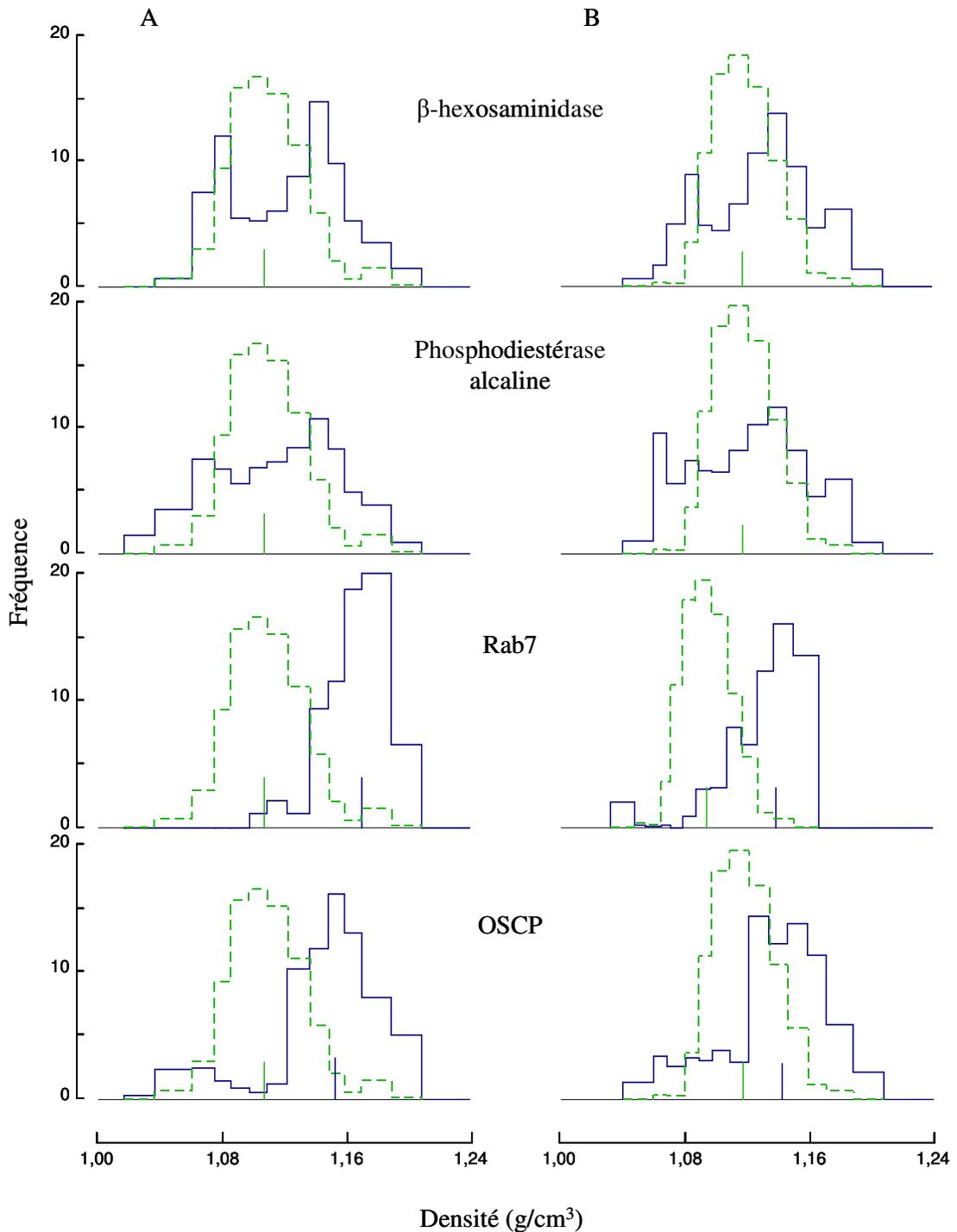


Figure 28 : Distribution de l'Onzin et de marqueurs de différents compartiments intracellulaires après centrifugation isopycnique de fractions ML de foies de souris sauvage et transgénique, dans un gradient de Nycodenz.

Des fractions ML préparées à partir de foies de souris C57Bl/6 (A) ou TG-Onzin (B) sont déposées à la surface de gradients de Nycodenz s'étendant de 1.05 à 1.20 g/cm³. Les centrifugations sont réalisées à 39000 RPM dans un rotor SW55Ti, pendant 2h30, à 4°C. Les distributions en traits pleins bleus sont celles des marqueurs dont le nom figure au dessus du graphique ; la distribution de l'Onzin est représentée sur chaque graphique en traits pointillés verts.

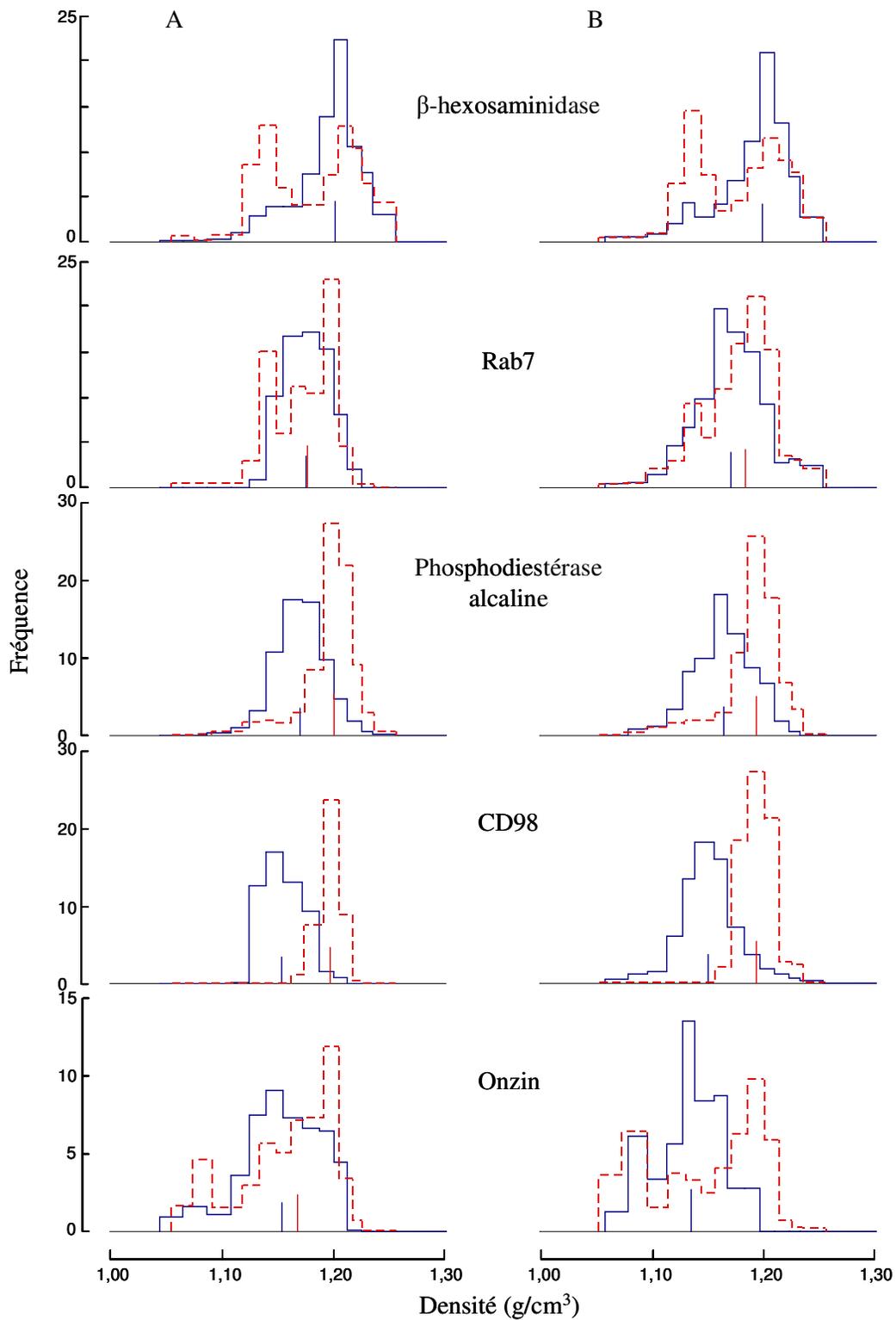


Figure 29 : Effet de la digitonine sur la densité de l'Onzin et de marqueurs de différents compartiments intracellulaires, après centrifugation isopycnique d'une fraction LP dans un gradient de saccharose.

Des fractions LP préparées à partir de foies de souris C57Bl/6 (A) ou TG-Onzin (B) sont incubées (traits pointillés rouges) ou non (traits pleins bleus) pendant 30 minutes à 4°C, dans une solution de saccharose 0,25 M contenant 2 mg de digitonine par mg de protéine. Les fractions sont centrifugées dans un rotor SW55Ti, à 39000 RPM, pendant 14h, à 4°C, dans un gradient de saccharose s'étendant de 1,09 à 1,26 g/cm³.

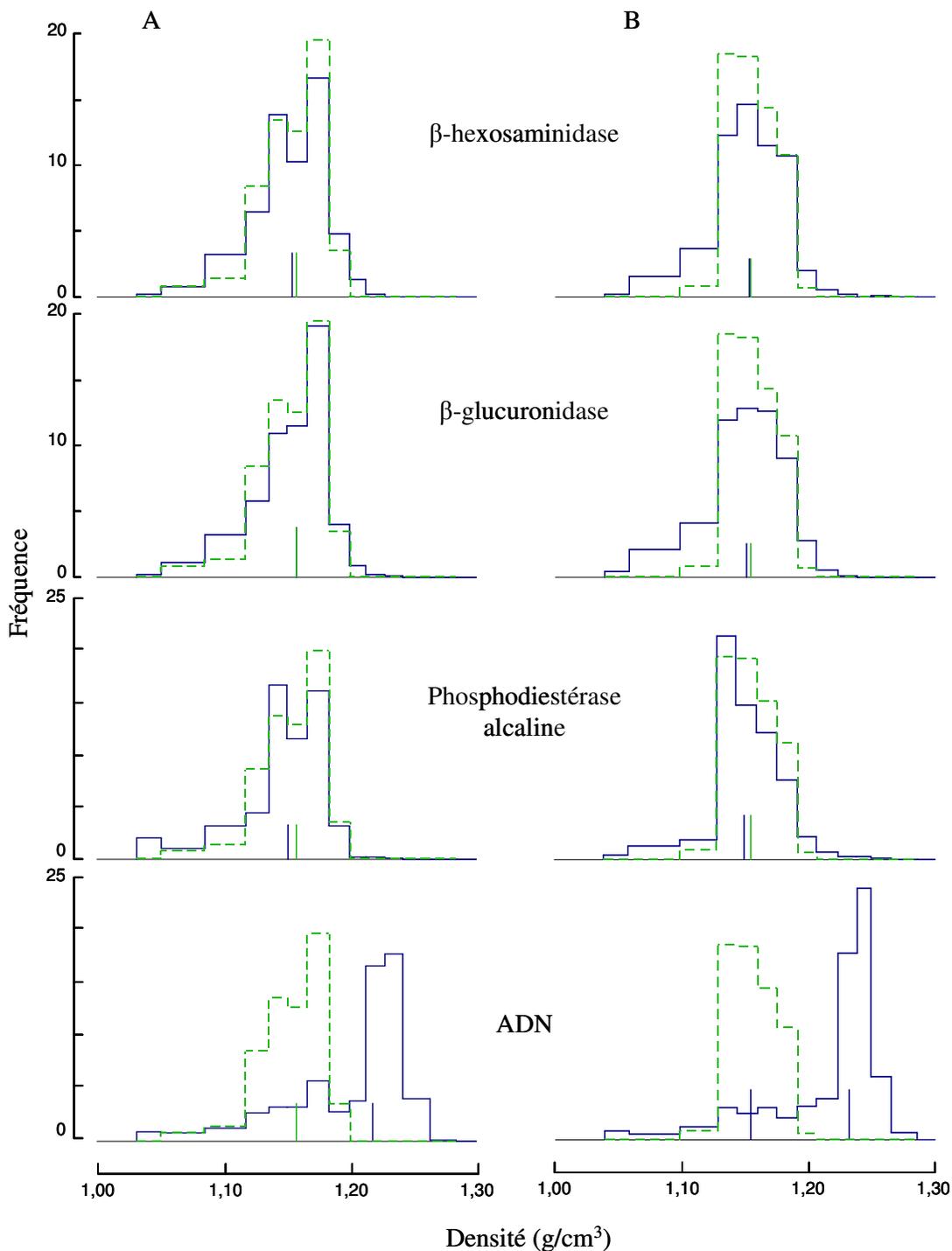


Figure 30 : Distribution de l'Onzin et de marqueurs de différents compartiments intracellulaires après centrifugation isopycnique de fractions N de foies de souris sauvage et transgénique, dans un gradient de Nycodenz.

Des fractions N préparées à partir de foies de souris C57Bl/6 (A) ou TG-Onzin (B) sont déposées à la surface de gradients de Nycodenz s'étendant de 1.1 à 1.28 g/cm³. Les centrifugations sont réalisées à 39000 RPM dans un rotor SW55Ti, pendant 2h30, à 4°C. Les distributions en traits pleins bleus sont celles des marqueurs dont le nom figure au dessus du graphique ; la distribution de l'Onzin est représentée dans chaque graphique en traits pointillés verts.

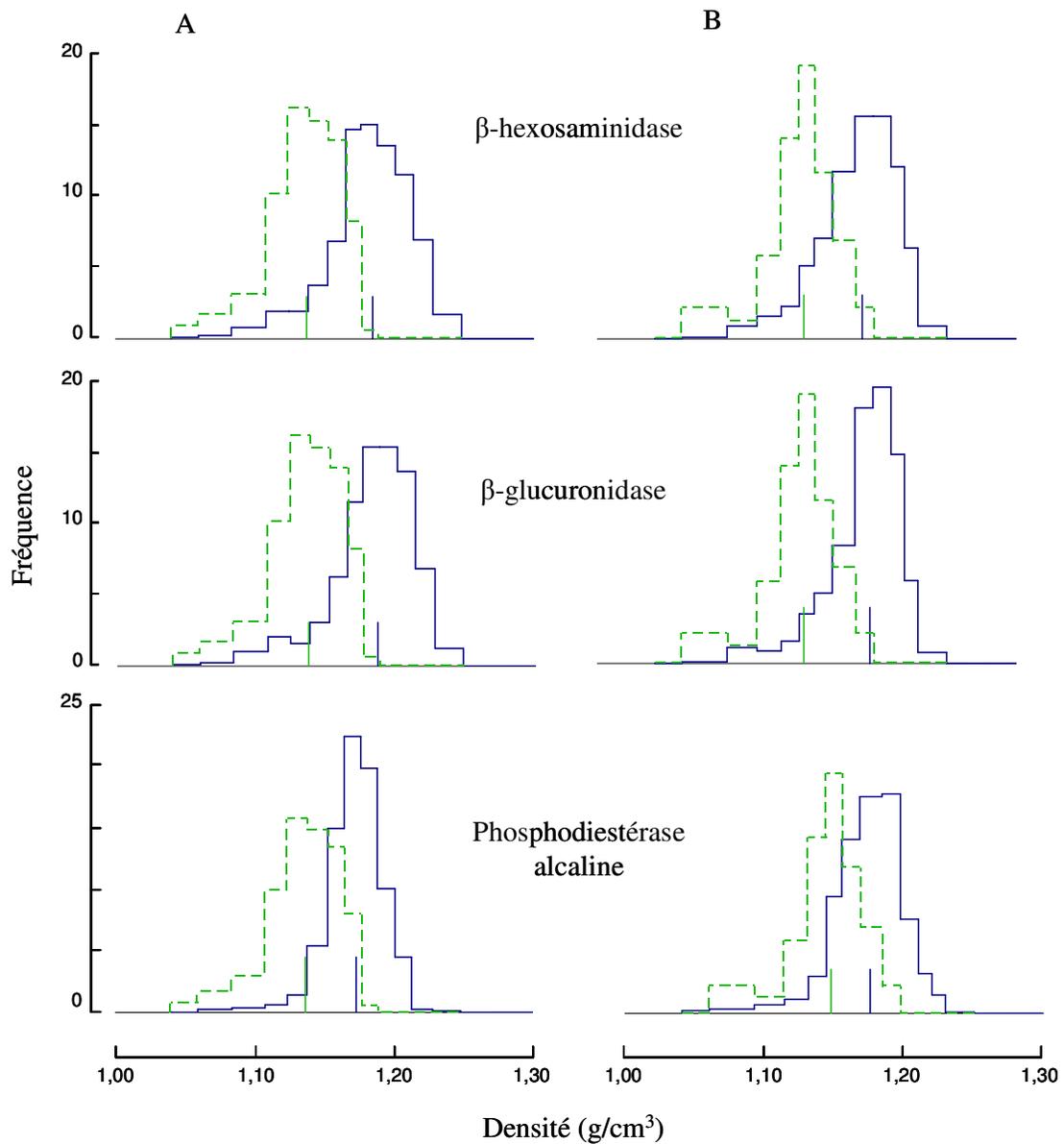


Figure 31 : Distribution de l'Onzin et de marqueurs de différents compartiments intracellulaires après centrifugation isopycnique de fractions P de foies de souris sauvage et transgénique, dans un gradient de saccharose.

Des fractions P préparées à partir de foies de souris C57Bl/6 (A) ou TG-Onzin (B) sont déposées à la surface de gradients de saccharose s'étendant de 1.09 à 1.26 g/cm³. Les centrifugations sont réalisées à 39000 RPM dans un rotor SW55Ti, pendant 14h, à 4°C. Les distributions en traits pleins bleus sont celles des marqueurs dont le nom figure au dessus du graphique ; la distribution de l'Onzin est représentée sur chaque graphique en traits pointillés verts.

β-glucuronidase : lysosome.

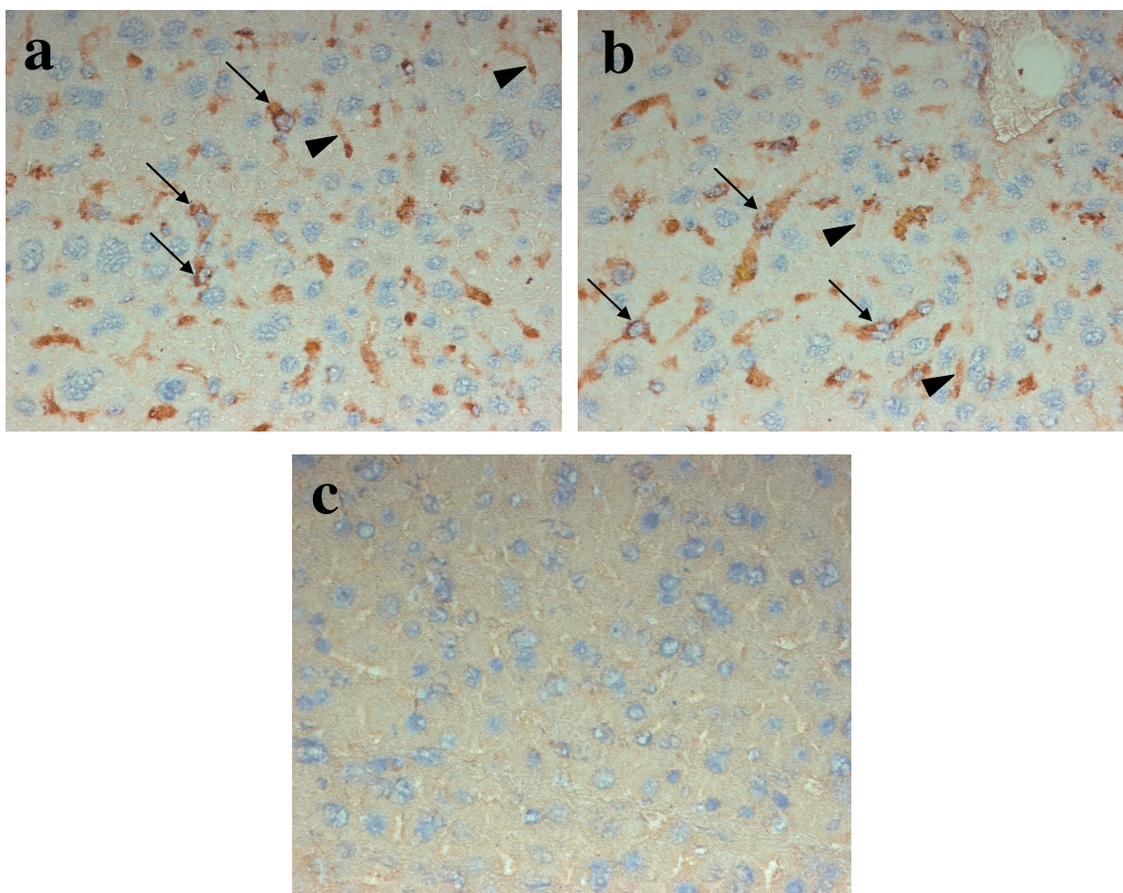


Figure 32 : *Distribution cellulaire de l'invertase dans le foie de souris après injection de doses lourde et légère.*

12 h après injection intraveineuse de 25 µg d'invertase (**a**), de 2 mg d'invertase (**b**) ou de NaCl (**c**) à des souris NMRI, les foies sont prélevés, congelés et préparés à l'immunohistochimie (anticorps polyclonal anti-invertase). La présence d'invertase sur la coupe se traduit par la formation d'un précipité brun.

Flèche : cellule de Kupffer ; **tête de flèche** : cellule endothéliale.

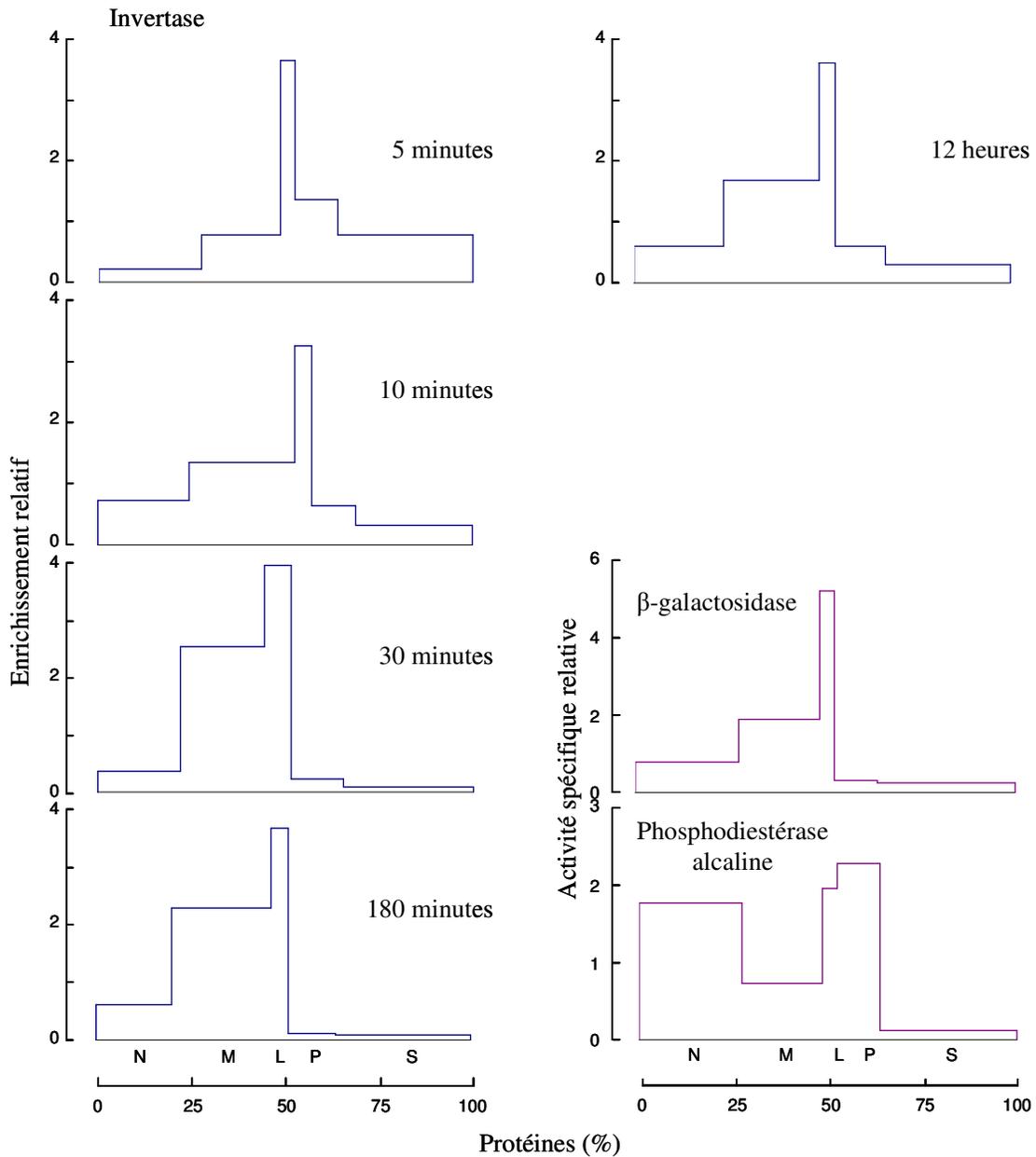


Figure 33 : Distribution de l'invertase injectée à faible dose, dans les différentes fractions isolées par centrifugation différentielle, à des temps variables après l'injection. Les distributions de la β -galactosidase et de la phosphodiesterase dans ces fractions, constantes à tous les temps de cinétique, sont représentées en bas à droite de la figure.
 β -galactosidase : lysosomes.

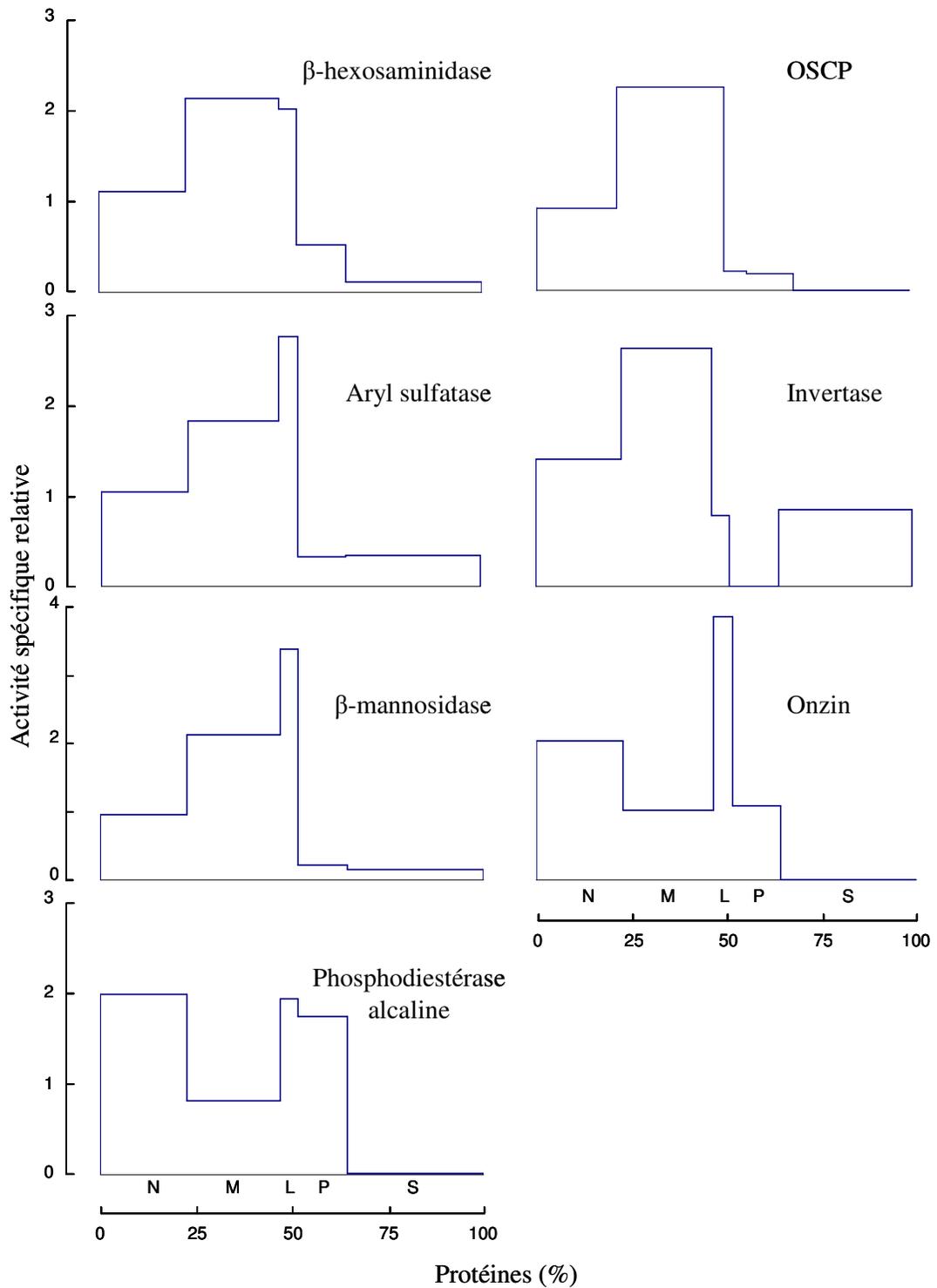


Figure 34 : Distribution de l'invertase, de l'Onzin et de marqueurs de différents compartiments intracellulaires dans les fractions isolées par centrifugation différentielle, après injection d'une dose lourde d'invertase.

Les profils de distribution, dans ces fractions, de l'invertase, de l'Onzin et de différents marqueurs sont établis 12 h après l'injection de 2 mg d'invertase à une souris.

β -mannosidase et Arylsulfatase : lysosomes.

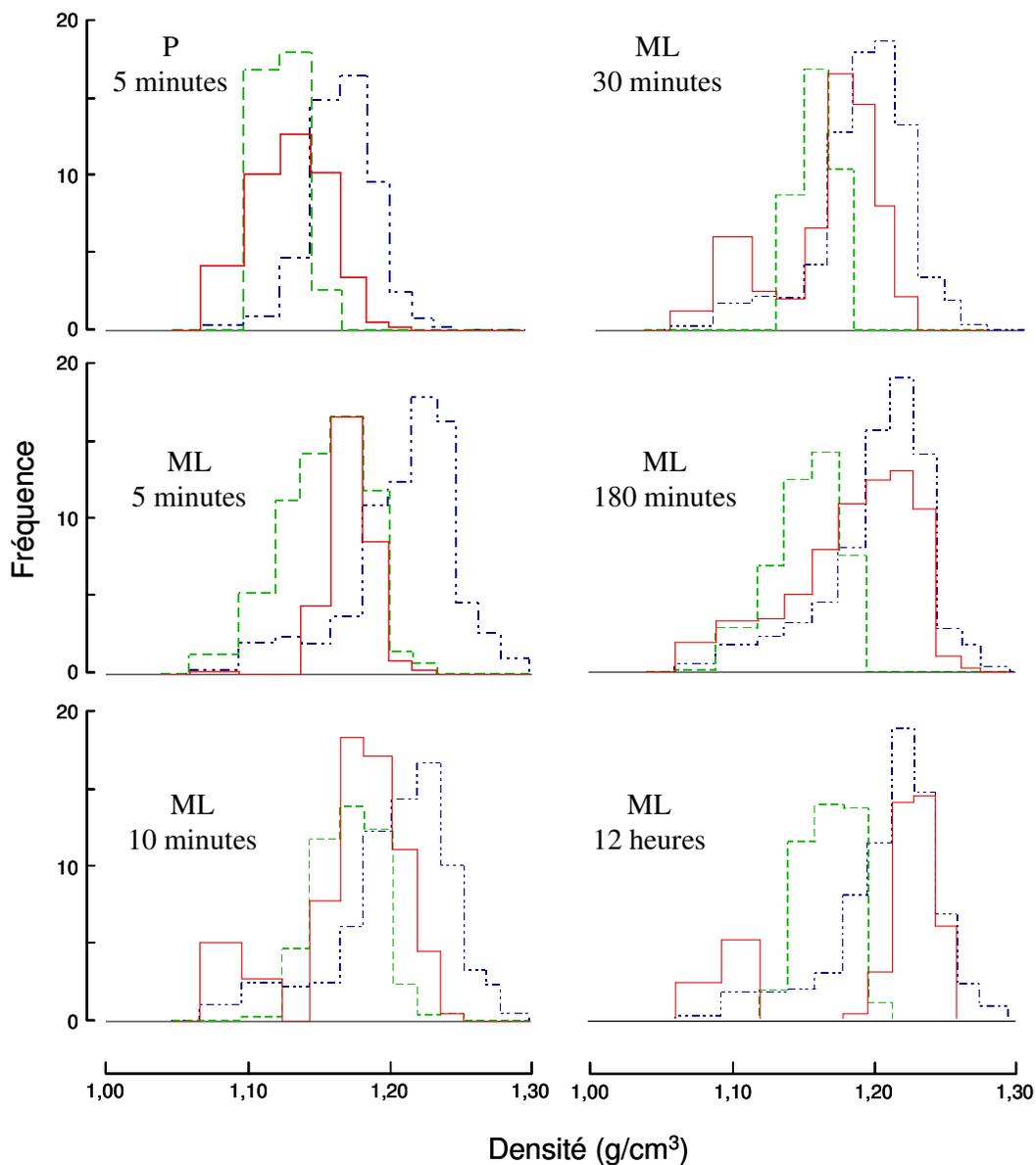


Figure 35 : Distribution de l'invertase, de l'Onzin et de la β -hexosaminidase après centrifugation isopycnique dans un gradient de saccharose de fractions ML et P de foie de souris ayant reçu une injection d'une dose légère d'invertase.

Des fractions ML préparées à partir de foies de souris NMRI ayant reçu une injection de 25 μ g d'invertase 5 min, 10 min, 30 min, 180 min ou 12 h avant le sacrifice, sont centrifugées dans des gradients de saccharose s'étendant de 1,09 à 1,32 g/cm³. Les centrifugations sont réalisées à 39000 RPM dans un rotor SW55Ti, pendant 2h30, à 4°C. Les distributions en traits pleins rouges sont celles de l'invertase, celles en traits pointillés bleus sont les distributions de la β -hexosaminidase et celles de l'Onzin sont représentées en traits pointillés verts.

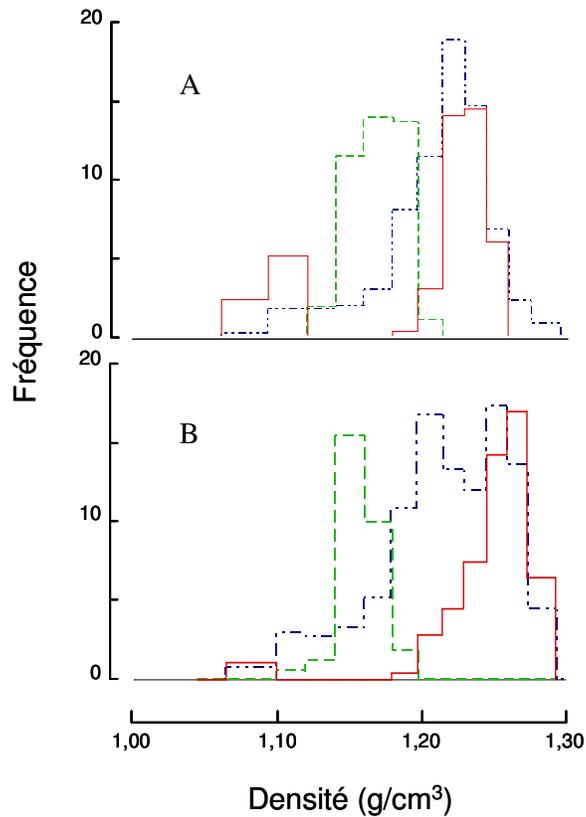


Figure 36 : *Effet de la dose injectée sur la distribution de l'invertase, de l'Onzin et de la β -hexosaminidase, après centrifugation isopycniqne de fractions ML dans un gradient de saccharose.*

Des fractions ML préparées à partir de foies de souris NMRI ayant reçu une injection de 25 μ g (A) et 2 mg (B) d'invertase 12 h avant le sacrifice, sont centrifugées dans des gradients de saccharose s'étendant de 1.09 à 1.32 g/cm^3 . Les centrifugations sont réalisées à 39000 RPM dans un rotor SW55Ti, pendant 2h30, à 4°C. Les distributions en traits pleins rouges sont celles de l'invertase, celles en traits pointillés bleus sont les distributions de la β -hexosaminidase et celles de l'Onzin sont représentées en traits pointillés verts.

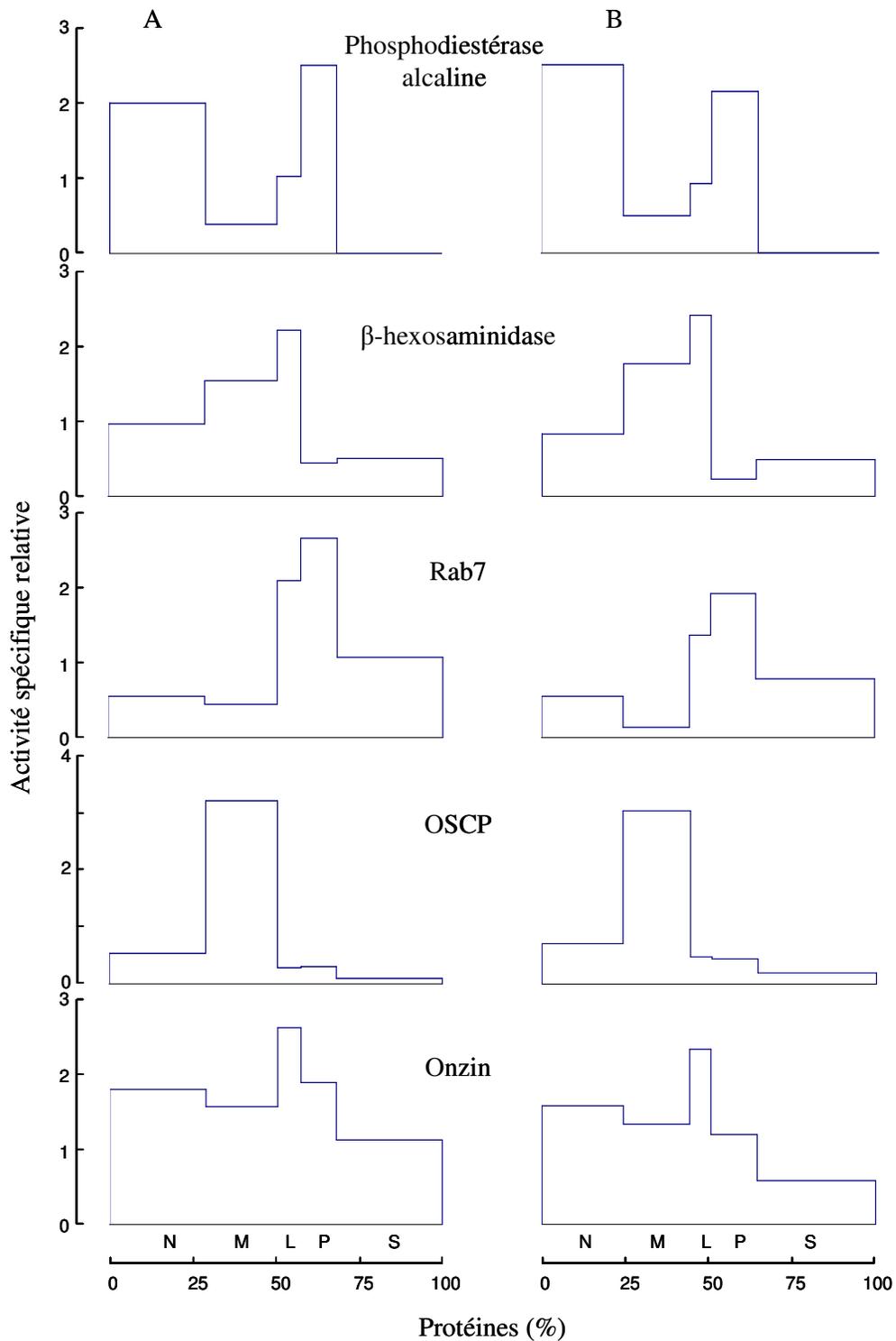


Figure 38 : Distribution de l'Onzin et de marqueurs de différents compartiments intracellulaires, dans les fractions isolées par centrifugation différentielle à partir de foies de souris sauvage (A) et transgénique (B). Effet d'une injection de Triton WR-1339.

Pour ces expériences, les souris ont reçu une injection de Triton WR-1339 quatre jours avant leur sacrifice.

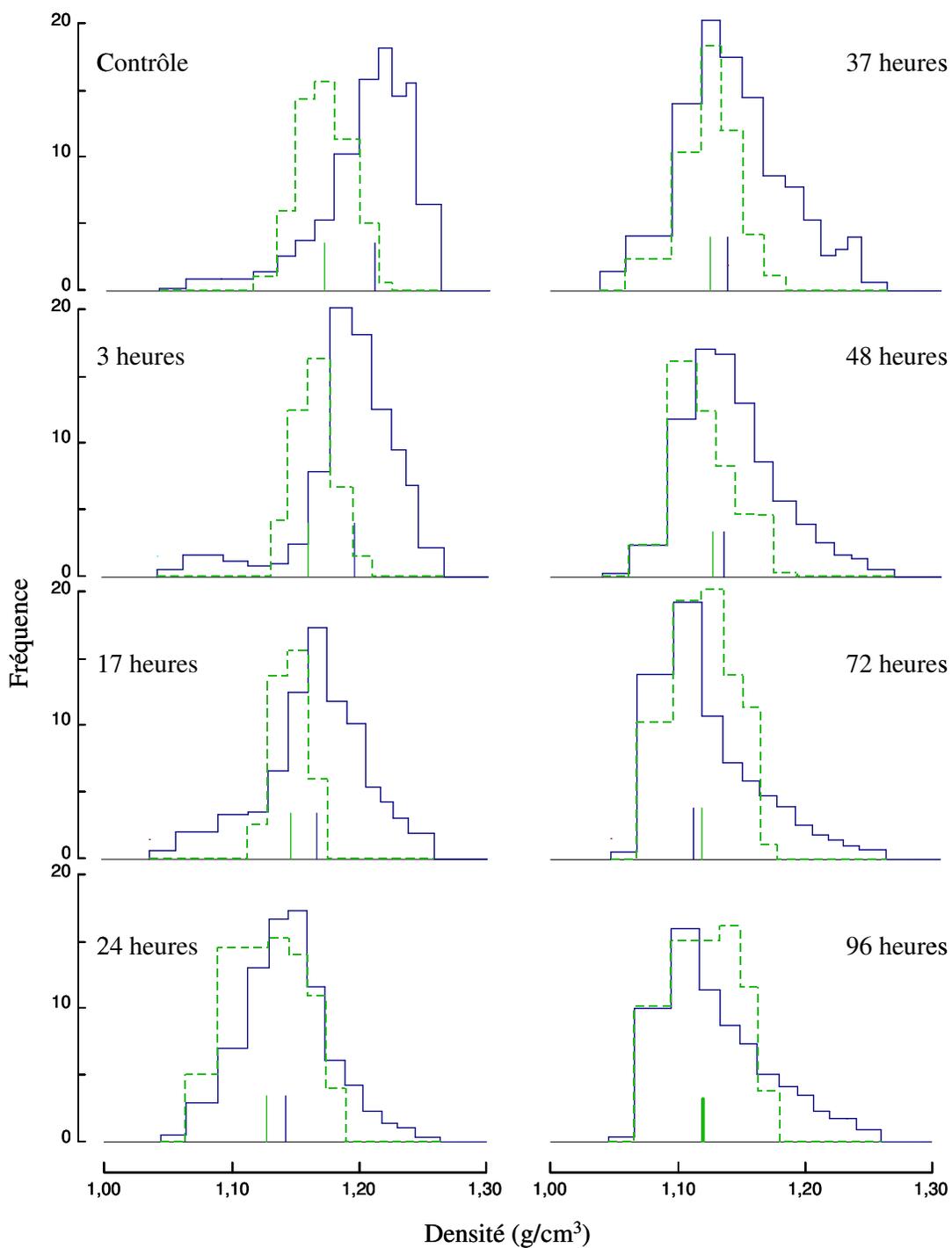


Figure 39 : Distribution de l'Onzin et de la β -galactosidase après centrifugation isopycnique, dans des gradients de saccharose, de fractions ML de foies de souris ayant reçu une injection de Triton WR-1339 à des temps variables avant le sacrifice.

Des fractions ML préparées à partir de foies de souris NMRI ayant reçu une injection de Triton WR-1339 3h, 17h, 24h, 37h, 48h, 72h ou 96h avant le sacrifice, sont centrifugées dans des gradients de saccharose s'étendant de 1.09 à 1.26 g/cm³. Les centrifugations sont réalisées à 39000 RPM dans un rotor SW55Ti, pendant 2h30, à 4°C. Les distributions en traits pleins bleus sont celles de la β -galactosidase et celles de l'Onzin sont représentées en traits pointillés verts. La souris contrôle a reçu une injection de NaCl 96h avant le sacrifice.

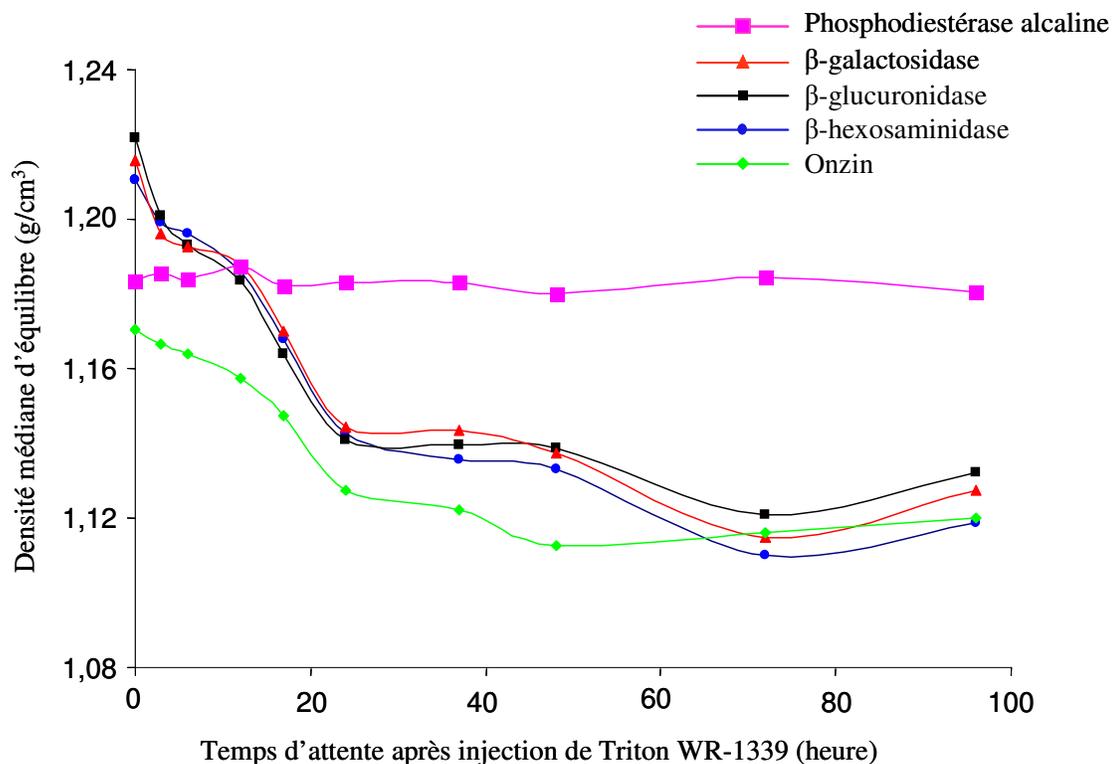


Figure 40 : Évolution des densités médianes d'équilibre de l'Onzin, de la phosphodiesterase alcaline et de diverses hydrolases lysosomales, après centrifugation isopycnique de fractions ML en gradient de saccharose, en fonction du temps après l'injection de Triton WR-1339.

Les médianes des distributions présentées dans la figure 39 et celles de la distribution de la phosphodiesterase alcaline, sont rapportées sur ce graphique. Deux points de cinétique intermédiaires (6h et 12h) ont été rajoutés afin de préciser la première partie de la courbe.

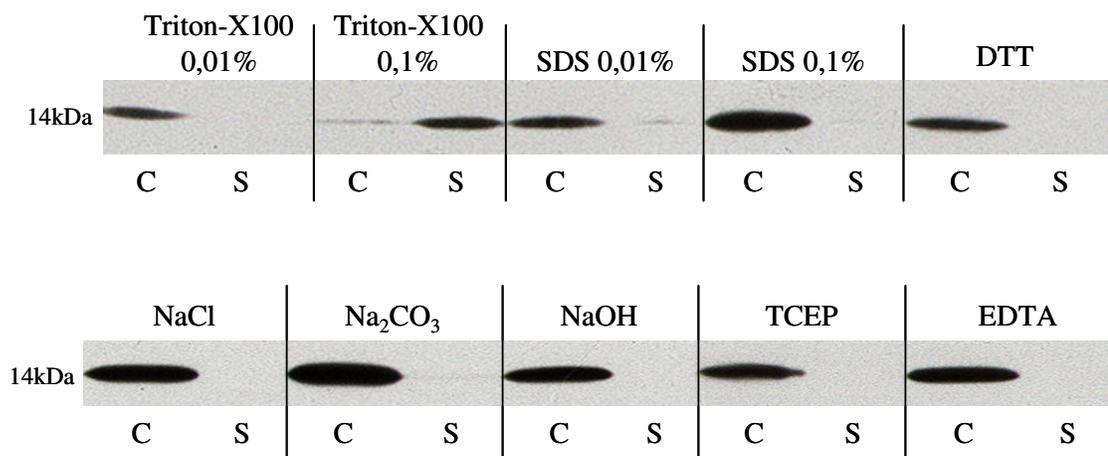


Figure 41 : *Effet de différents traitements chimiques sur la liaison de l'Onzin à la membrane.*

Une fraction ML de foie de souris NMRI n'ayant subi aucun traitement préalable est diluée dans l'eau. Les membranes, isolées par centrifugation à 45000 RPM dans un rotor TLA 100.3 pendant 1h, sont remises en solution dans un volume d'eau égal au triple du volume occupé par les membranes sédimentées. Cette fraction est alors répartie dans différents tubes, et incubée à température ambiante pendant 15 min, dans l'une des solutions suivantes :

0,01 ou 0,1 % **Triton X100** dans du PBS

0,01 ou 0,1 % **SDS** dans du PBS

1 M **NaCl** dans l'eau

100 mM **Na₂CO₃** (pH 11) dans l'eau

0,1 M **NaOH** dans l'eau

4 mM **EDTA** (pH 8) dans l'eau

La réduction des ponts disulfures a été réalisée par incubation pendant 1 h à 4°C dans :

10 mM **DTT** dans 50 mM Tris pH 8

10 mM **TCEP** dans PBS

Après ces périodes d'incubation, les membranes (**C**) sont séparées des éléments solubles (**S**) par centrifugation (comme décrit ci-dessus). Les membranes sont remises en solution dans un petit volume de PBS, à l'exception de la condition « TCEP » pour laquelle les membranes sont récupérées dans une solution de PBS contenant 20mM NEM. La présence de l'Onzin dans les différentes fractions est détectée par Western blot.

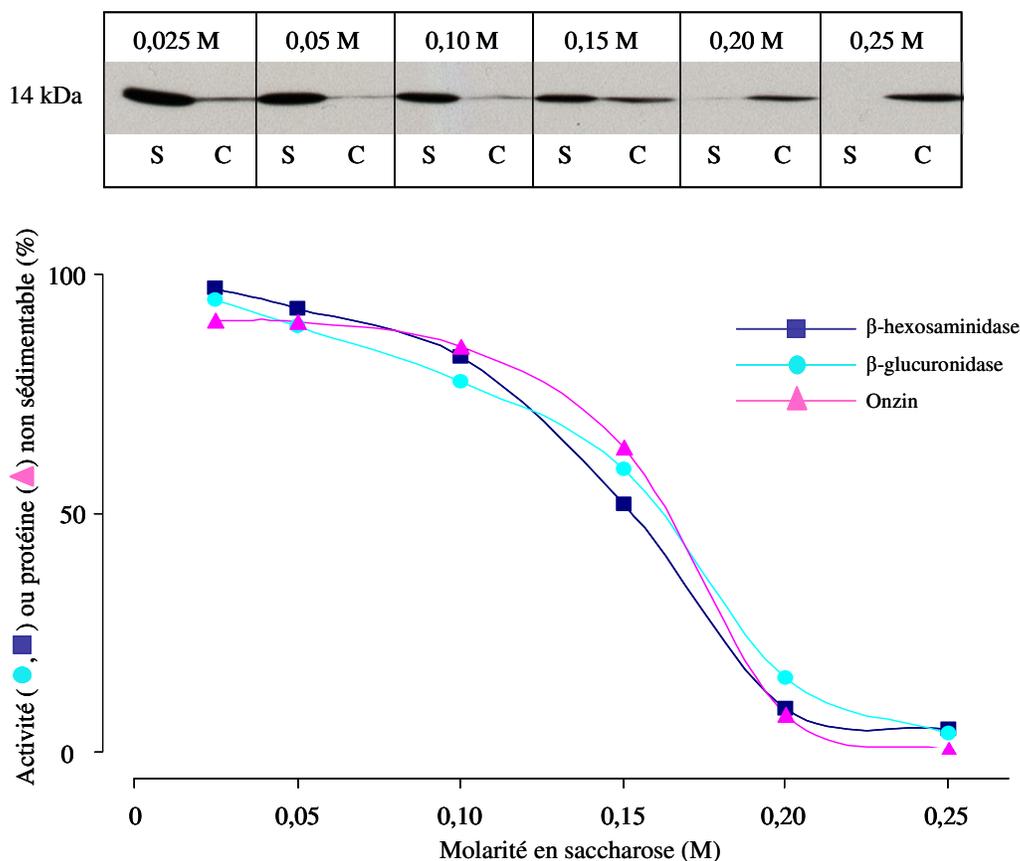


Figure 42 : Effet de la tonicité du milieu sur la libération de l'Onzin, de la β -hexosaminidase et de la β -glucuronidase contenues dans une fraction ML de foie de souris traitée au Triton WR-1339.

Une fraction ML préparée à partir de foie de souris NMRI ayant reçu une injection de Triton WR-1339 quatre jours avant le sacrifice, est incubée dans des solutions de saccharose de tonicité décroissante (0,25 M – 0,20 M – 0,15 M – 0,10 M – 0,05 M – 0,025 M) pendant 15 min à 4°C. Les membranes sont alors sédimentées à 45000 RPM dans un rotor TLA 100.3, pendant 18 min, à 4°C. La présence de l'Onzin dans les fractions sédimentables (C) et non sédimentables (S) isolées est détectée par Western blot, à l'aide des anticorps dirigés contre les parties N ou C-terminales de la protéine, indifféremment. Les activités non sédimentables des hydrolases (ou l'Onzin non sédimentable) sont exprimées en % des activités non sédimentables mesurées (ou de l'Onzin non sédimentable détectée) dans les tests incubés en présence de Triton X-100 (activité totalement solubilisée).

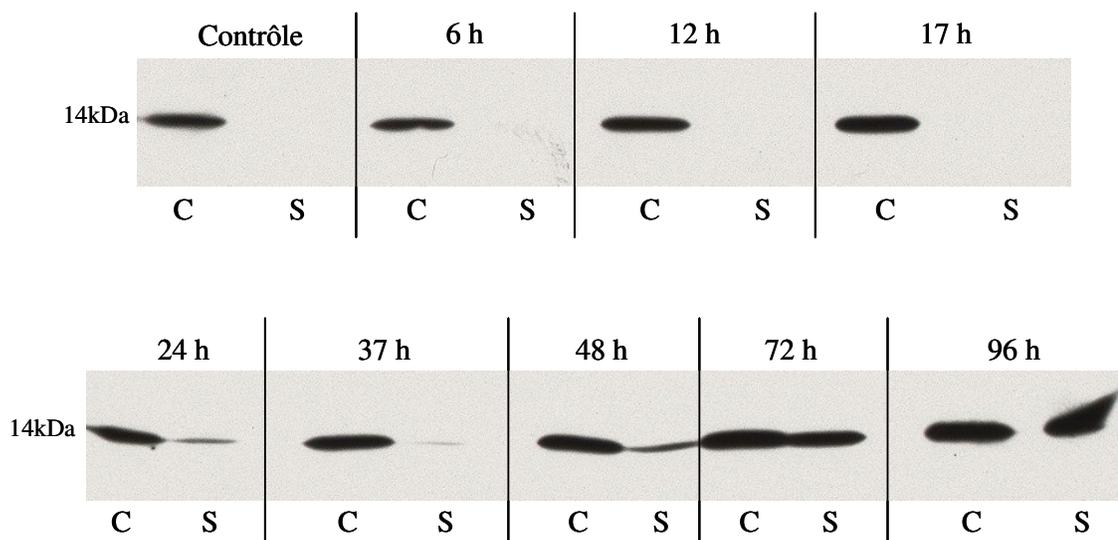


Figure 43 : *Effet in vivo du Triton WR-1339 sur la solubilisation de l'Onzin de fractions ML, à des temps variables après l'injection.*

Des fractions ML préparées à partir de foies de souris NMRI ayant reçu une injection de Triton WR-1339 6h, 12h, 17h, 24h, 37h, 48h, 72h ou 96h avant le sacrifice, sont congelées, décongelées, et diluées dans l'eau. Les membranes sont alors sédimentées à 45000 RPM dans un rotor TLA 55, pendant 1h, à 4°C. La présence de l'Onzin dans les fractions sédimentables (C) et non sédimentables (S) isolées, est détectée par Western blot.

La souris contrôle a reçu une injection de NaCl 96h avant le sacrifice.

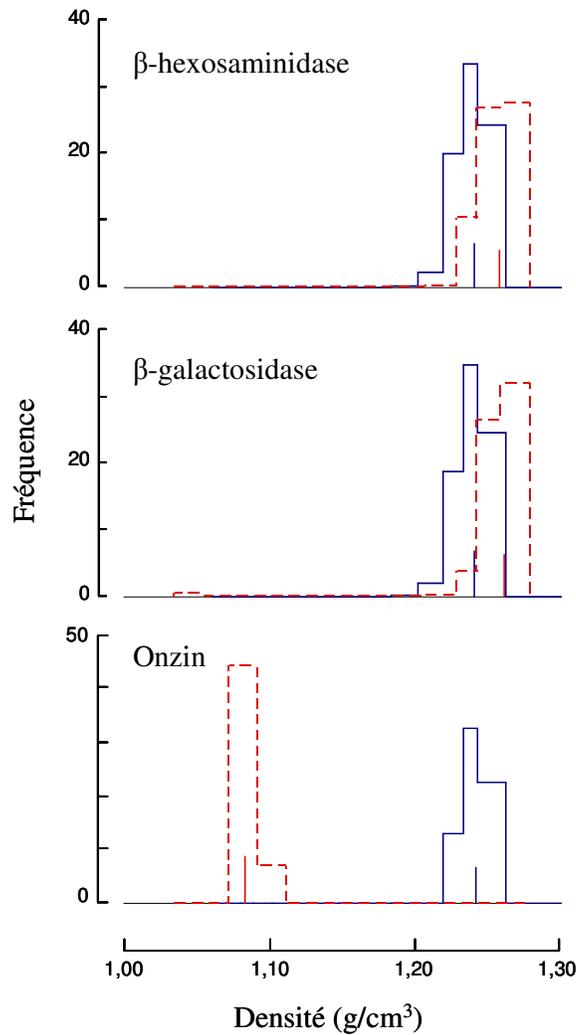


Figure 44 : Effet du champ centrifuge sur la densité d'équilibration de l'Onzin, de la β -galactosidase et de la β -hexosaminidase contenues dans les tritosomes. Expérience de flottaison.

Une fraction ML de foie de souris ayant reçu une injection de Triton WR-1339 quatre jours avant le sacrifice est diluée dans l'eau. Les membranes sont éliminées par centrifugation, et le surnageant, ajusté à une densité de $1,26 \text{ g/cm}^3$, est déposé au fond de deux gradients s'étendant de $1,034$ à $1,22 \text{ g/cm}^3$. L'un des gradients est centrifugé pendant 42 h à 64000 RPM dans un rotor SW65, à 4°C (distributions représentées en traits pointillés rouges). Le gradient contrôle est conservé à 4°C pendant cette période (distributions en traits pleins bleus).

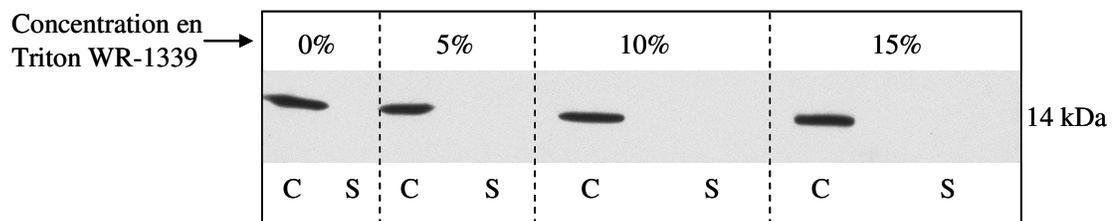


Figure 45 : *Effet in vitro du Triton WR-1339 sur la liaison de l'Onzin aux membranes d'une fraction ML.*

Une fraction ML de foie de souris NMRI non traitée est soumise à trois cycles d'une minute dans un Ultra-Turax. Les membranes sont sédimentées à 45000 RPM pendant 45 minutes à 4°C, dans un rotor TLA 100.3, puis sont incubées à 37°C, dans un tampon 50 mM citrate pH5,5 contenant de l'azide, pendant 12 ou 24 h en présence de Triton WR-1339 à 0%, 5%, 10% ou 15%. Après ces délais, les membranes (C) sont isolées des éléments solubles (S) par centrifugation identique à la première, et la présence de l'Onzin est détectée dans chacune des fractions par Western blot. Les résultats étant identiques après 12 ou 24 h d'incubation, seuls ceux obtenus après la période d'incubation la plus longue sont présentés dans cette figure.

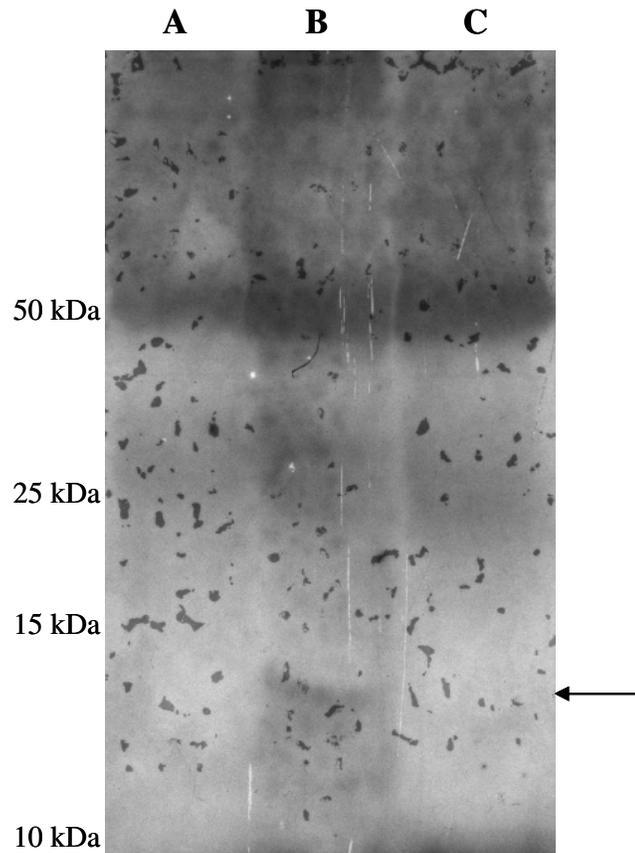


Figure 48 : *Marquage métabolique de l'Onzin des cellules 32D au ^3H -palmitate.*
 40x10⁶ cellules 32D sont incubées pendant 20 h dans un milieu de culture contenant 200 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^3H -acide palmitique. Les cellules sont récoltées, lavées 3 fois dans du PBS, et lysées dans un tampon contenant 50 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 1% TritonX100, 0.2% Deoxycholate, inhibiteurs de protéases (Roche cocktail). Le lysat est séparé en trois aliquotes, qui sont incubés en présence d'anticorps anti-actine (A), de sérum de lapin immunisé (B) ou non (C) avec le peptide N-terminal de l'Onzin de rat. Les protéines immunoprécipitées (voir chapitre II : Techniques expérimentales) sont séparées sur gel SDS-PAGE (15% acrylamide). Le gel est déshydraté et exposé à un film autoradiographique pendant 2 mois, à -80°C.
 La flèche se situe à la taille attendue pour l'Onzin (12 à 14 kDa).

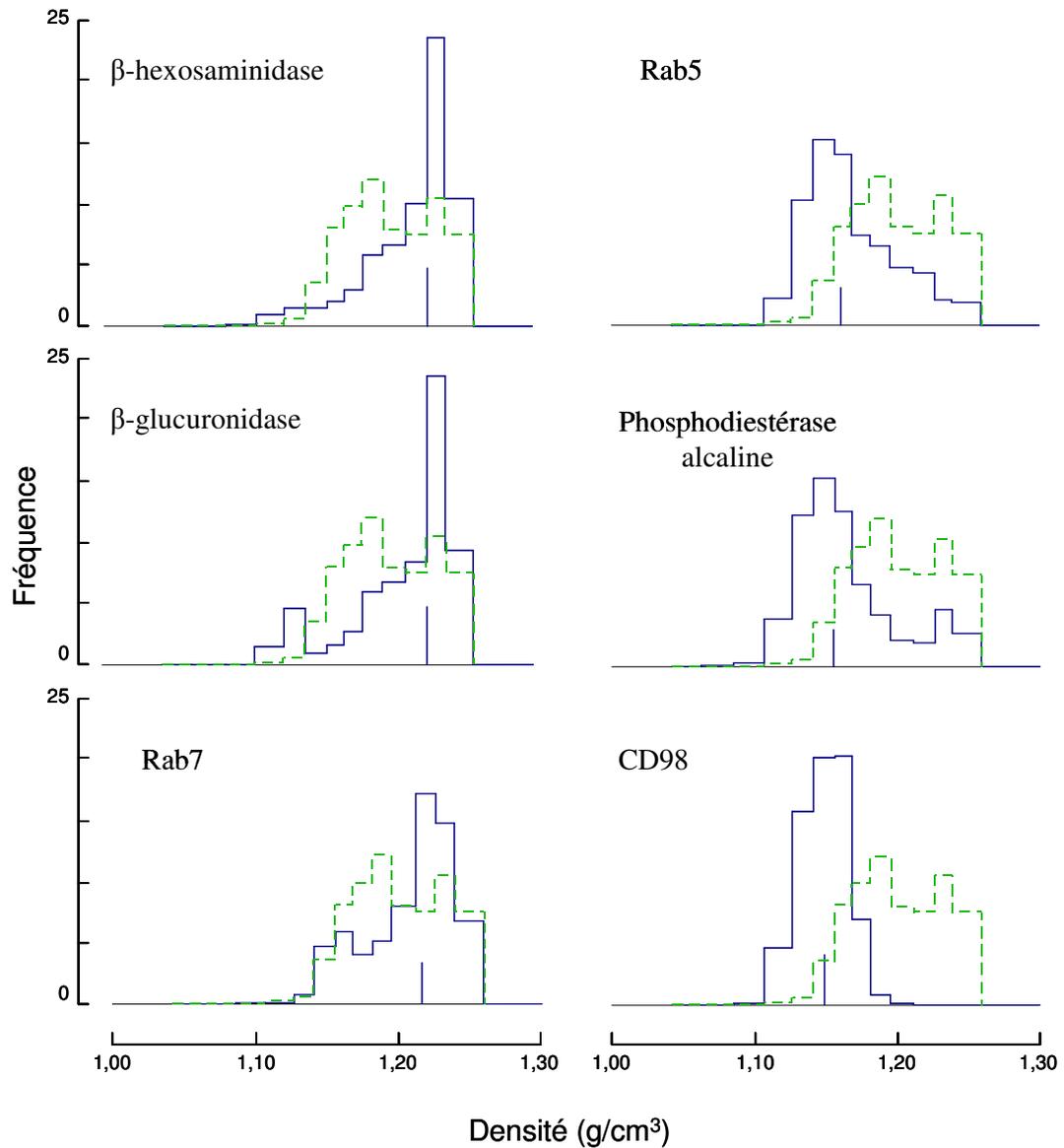


Figure 49 : Distribution de l'Onzin et de marqueurs de différents compartiments intracellulaires après centrifugation isopycnique, dans un gradient de saccharose, d'une fraction MLP de macrophages péritonéaux de souris.

Une fraction MLP de macrophages péritonéaux issus de 40 souris C57Bl/6 est déposée à la surface d'un gradient de saccharose s'étendant de 1.09 à 1.26 g/cm³. Le gradient est centrifugé à 39000 RPM dans un rotor SW55Ti, pendant 14 h, à 4°C. Les distributions en traits pleins bleus sont celles des marqueurs dont le nom figure au dessus des graphiques ; la distribution de l'Onzin est représentée sur chaque graphique en traits pointillés verts.

Rab5 : endosomes précoces.

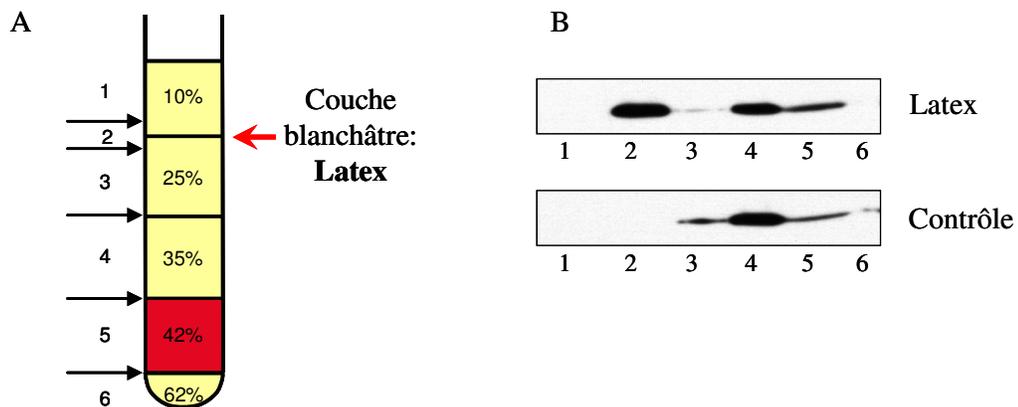


Figure 51 : *Effet de l'injection de billes de latex sur la densité de l'Onzin de foie de souris.*

1h30 après l'injection intraveineuse de 2×10^9 particules de latex ($0,9 \mu\text{m}$ de diamètre) ou de NaCl à des souris NMRI, les foies sont prélevés et homogénéisés au Dounce. Des « extraits phagosomiaux » sont préparés par centrifugation de ces homogénats à 1000 g pendant 7 minutes. 2×10^9 particules de latex sont alors incubées pendant 30 min (à 4°C) *in vitro* dans l'extrait issu de la souris ayant reçu une injection de NaCl (**contrôle**). Les extraits phagosomiaux sont ajustés à une concentration en saccharose de 42 %, et coulés dans des tubes Beckman SW41, selon le schéma **A**. Les gradients sont alors centrifugés à 24000 RPM , pendant 1h à 4°C , dans un rotor SW41. Sur le schéma **A**, les flèches noires indiquent l'endroit où le gradient a été sectionné pour obtenir les fractions de 1 à 6. La présence de l'Onzin dans les différentes fractions est détectée par Western blots (**B**), pour lesquels $30 \mu\text{l}$ des fractions 1 à 4, et $6 \mu\text{l}$ des fractions 5-6 ont été déposés.

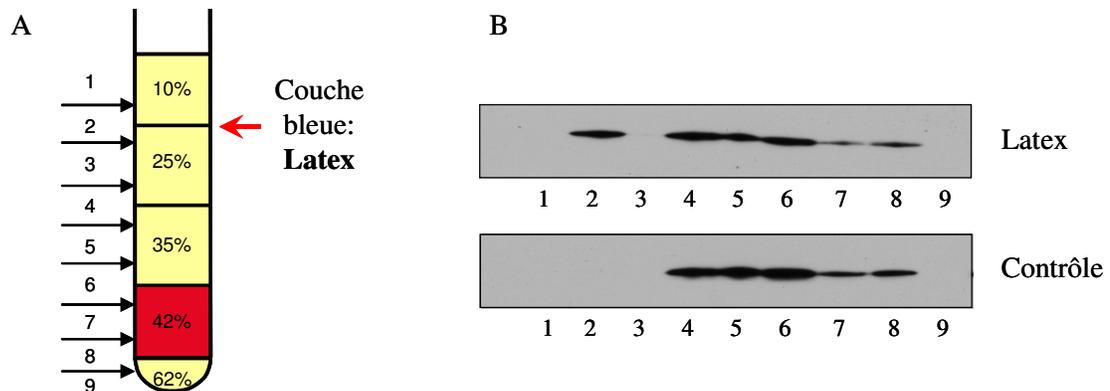


Figure 52 : Effet de la phagocytose de billes de latex sur la densité de l'Onzin des macrophages péritonéaux de souris.

Les macrophages prélevés dans le péritoine de 40 souris C57Bl/6 sont répartis en deux groupes et mis en culture pendant 24 h. L'un des groupes est incubé en présence de billes de latex (0,05%) de 1 μm de diamètre, à 37°C, pendant 1h30 (**latex**). Les macrophages des deux groupes sont homogénéisés séparément dans un Dounce et deux extraits phagosomaux sont préparés par centrifugation à 1000 g pendant 7 minutes. 2×10^9 particules de latex sont alors incubées à 4°C *in vitro* pendant 30 minutes, dans l'extrait des macrophages n'ayant pas internalisé les billes (**contrôle**). Les extraits phagosomaux sont ajustés à une concentration en saccharose de 42 %, et coulés dans des tubes Beckman SW41, selon le schéma A. Les gradients sont alors centrifugés à 24000 RPM, pendant 1h à 4°C, dans un rotor SW41. Sur le schéma A, les flèches noires indiquent l'endroit où le gradient a été sectionné pour obtenir les fractions de 1 à 9. La présence de l'Onzin dans les différentes fractions est détectée par Western blots (B), pour lesquels 30 μl des fractions 1 à 5, et 6 μl des fractions 6 à 9 ont été déposés.

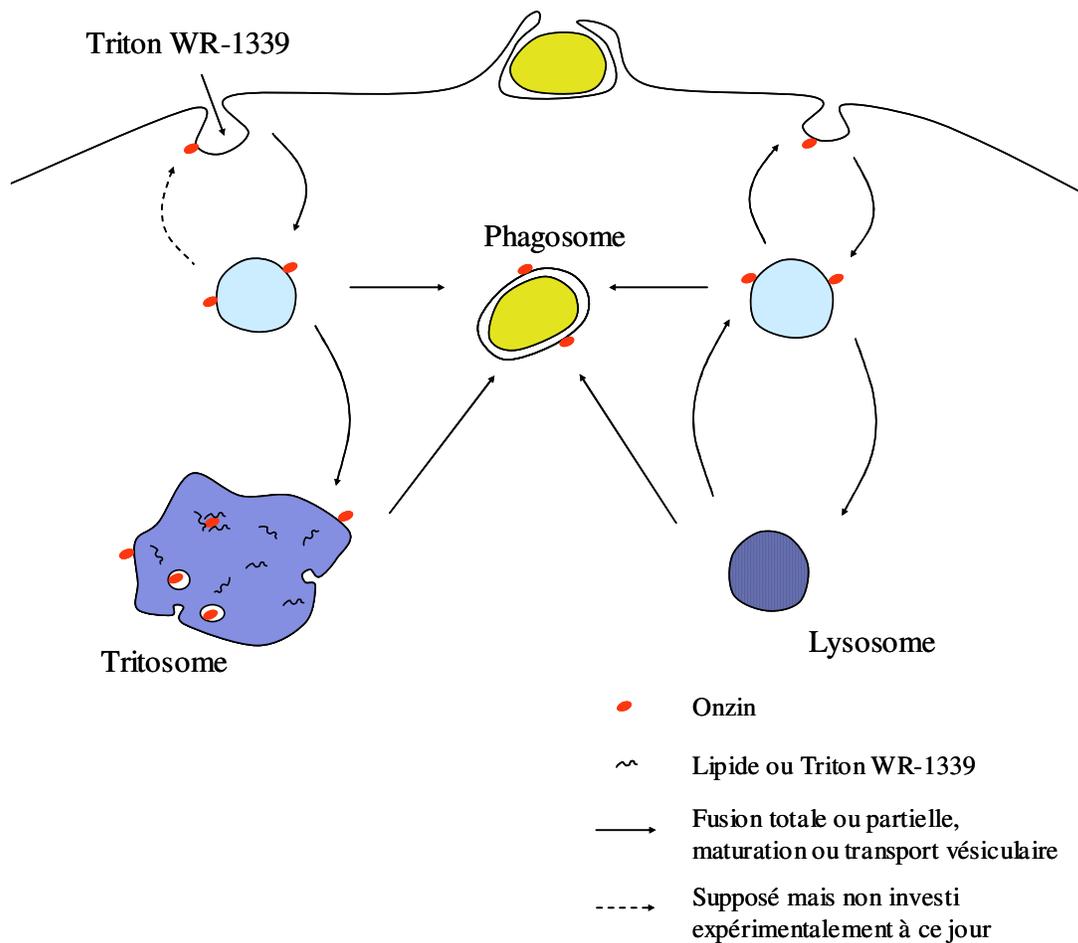


Figure 55 : Positionnement de l'Onzin dans la voie endocytaire.

En conditions physiologiques (**voie de droite**), et à l'état d'équilibre, l'Onzin est associée à un compartiment de la voie endocytaire qui est différent du lysosome, mais qui entretient des relations dynamiques avec cet organelle. L'invertase endocytée par la cellule passe par le compartiment auquel l'Onzin est associée, mais ne s'y accumule pas. L'endocytose de Triton WR-1339 (**voie de gauche**) modifie la composition, la morphologie et la biochimie du lysosome, dans lequel il s'accumule. Ces changements se répercutent sur la dynamique qu'entretiennent le compartiment contenant l'Onzin et le lysosome modifié : à l'état d'équilibre, l'Onzin est associée, dans sa totalité, au tritosome. L'Onzin atteint le phagosome suite à des fusions totales ou partielles entre le compartiment auquel elle est associée et le phagosome. Les différences de localisation de l'Onzin au sein des cellules de Kupffer (100 % de l'Onzin est associée à une vésicule intracellulaire de densité très différente de celle des endosomes tardifs/lysosomes), des cellules péritonéales (une grande partie de l'Onzin est dans une vésicule de densité proche des endosomes/lysosomes) et des entérocytes (l'Onzin est également présente au niveau de la membrane plasmique) sont dues à des modulations de la dynamique du compartiment contenant l'Onzin avec le lysosome et la membrane plasmique.

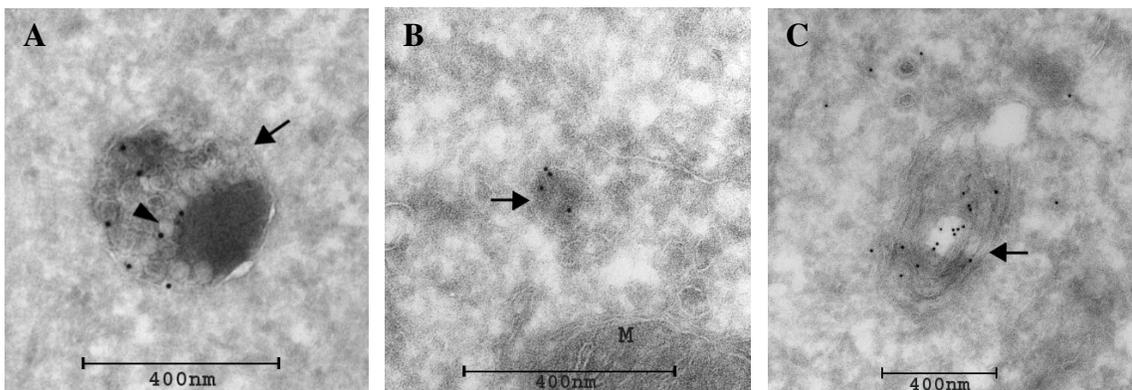


Figure 56 : *Distribution de l'Onzin au sein de différents compartiments intracellulaires d'une cellule épithéliale intestinale de souris. Étude par microscopie électronique.*

La présence de l'Onzin est révélée par incubation avec un anticorps primaire polyclonal dirigé contre la partie N-terminale de la protéine, suivi de l'incubation avec un anticorps secondaire couplé à des billes d'or. Les flèches pointent vers :

A: Corps multivésiculaire. La tête de flèche montre l'association de l'Onzin aux vésicules internes de cet organite.

B: Endosome. (M : mitochondrie).

C: Saccules de l'appareil de Golgi.

Protéines identifiées	Numéro d'accèsion TREMBL/ SwissProt	Score MASCOT	Nbr de peptides identifiés
(P02535) Keratin, type I cytoskeletal 10 (Cytokeratin 10)	K1C10_MOUSE	277,82	5
(P04104) Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin 1)	K2C1_MOUSE	210,67	3
(Q6IFX2) Type I keratin KA22	Q6IFX2_MOUSE	159,98	3
(Q61869) Keratin 2 epidermis	Q61869_MOUSE	137,37	3
(Q9QWL7) Keratin, type I cytoskeletal 17 (Cytokeratin 17)	K1C17_MOUSE	129,97	3
(Q9QZ85) Interferon-inducible GTPase	Q9QZ85_MOUSE	127,82	2
(Q6NXH9) Type II keratin Kb36	Q6NXH9_MOUSE	108,39	2
(P16858) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_MOUSE	102,86	3
(P18760) Cofilin-1 (Cofilin, non-muscle isoform)	COF1_MOUSE	89,15	1
(P11679) Keratin, type II cytoskeletal 8 (Cytokeratin 8)	K2C8_MOUSE	68,32	1
(P84078) ADP-ribosylation factor 1	ARF1_MOUSE	66,32	1
(P35700) Peroxiredoxin 1 (EC 1.11.1.15) (Thioredoxin peroxidase 2)	PRDX1_MOUSE	60,17	2
(P32020) Nonspecific lipid-transfer protein, mitochondrial precursor	NLTP_MOUSE	41,25	1
(Q62523) Zyxin	ZYX_MOUSE	41,13	1
(Q7SIG6) Development and differentiation-enhancing factor 2	DDEF2_MOUSE	34,22	1
(Q80SX0) Mus musculus 3 days neonate thymus cDNA	Q80SX0_MOUSE	32,93	1
(Q61282) Aggrecan core protein precursor	PGCA_MOUSE	30,73	1
(P24452) Macrophage capping protein	CAPG_MOUSE	25,95	1
(P62835) Ras-related protein Rap-1A (Ras-related protein Krev-1)	RAP1A_MOUSE	25,42	1
(Q8C7C3) Mus musculus 2 days neonate thymus thymic cells cDNA	Q8C7C3_MOUSE	22,90	1
(Q9DAU9) Mus musculus adult female placenta cDNA	Q9DAU9_MOUSE	22,47	1
(Q91ZC7) Mas-related G-protein coupled receptor member A5	MRGA5_MOUSE	22,26	1
(Q8C5S8) Mus musculus adult male testis cDNA	Q8C5S8_MOUSE	20,38	1
(Q8BGC0) HIV TAT specific factor 1, RIKEN full-length e	Q8BGC0_MOUSE	20,30	1

Tableau 2 : *Protéines identifiées par spectrométrie de masse dans la condition « contrôle » de la préparation de phagosomes-latex de macrophages péritonéaux.*
Voir chapitre II : « Techniques expérimentales » pour les détails de l'analyse protéomique.

Tableau 3 (page suivante): *Protéines identifiées par spectrométrie de masse dans la condition « Latex » de la préparation de phagosomes-latex de macrophages péritonéaux.*
Voir chapitre II : « Techniques expérimentales » pour les détails de l'analyse protéomique.
Les protéines grisées sont celles qui apparaissent également dans la condition « contrôle » (voir tableau 2).

Protéines identifiées	Numéro d'accèsion TREMBL/SwissProt	Score MASCOT	Nbr de peptides identifiés
(P02535) Keratin, type I cytoskeletal 10 (Cytokeratin 10)	K1C10_MOUSE	281,65	5
(P04104) Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin 1)	K2C1_MOUSE	215,81	3
(Q8CBU7) Mus musculus adult male urinary bladder cDNA	Q8CBU7_MOUSE	158,25	2
(Q6IFX2) Type I keratin KA22	Q6IFX2_MOUSE	150,04	3
(Q61869) Keratin 2 epidermis	Q61869_MOUSE	138,58	3
(P54116) Erythrocyte band 7 integral membrane protein (Stomatin)	STOM_MOUSE	119,05	3
(P18242) Cathepsin D precursor (EC 3.4.23.5)	CATD_MOUSE	115,28	3
(P50518) Vacuolar ATP synthase subunit E (EC 3.6.3.14)	VATE_MOUSE	113,24	2
(Q6NXH9) Type II keratin Kb36	Q6NXH9_MOUSE	106,37	2
(P62814) Vacuolar ATP synthase subunit B, brain isoform	VATB2_MOUSE	105,87	3
(P50516) Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	VATA1_MOUSE	102,59	3
(P35700) Peroxiredoxin 1 (EC 1.11.1.15) (Thioredoxin peroxidase 2)	PRDX1_MOUSE	100,31	3
(Q5F2A8) CD68 antigen	Q5F2A8_MOUSE	91,91	2
(Q9Z2K1) Keratin, type I cytoskeletal 16 (Cytokeratin 16)	K1C16_MOUSE	79,97	2
(P51863) Vacuolar ATP synthase subunit d (EC 3.6.3.14)	VA0D_MOUSE	77,28	2
(O70439) Syntaxin-7	STX7_MOUSE	73,57	1
(Q9CQW2) Mus musculus 10 days embryo whole body cDNA	Q9CQW2_MOUSE	70,34	2
(Q9JI48) Placenta-specific gene 8 protein (C15 protein) (Onzin)	PLAC8_MOUSE	66,97	1
(P35278) Ras-related protein Rab-5C	RAB5C_MOUSE	65,89	2
(O88531) Palmitoyl-protein thioesterase 1 precursor (EC 3.1.2.22)	PPT1_MOUSE	63,58	1
(P16858) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	G3P_MOUSE	61,50	2
(P17897) Lysozyme C, type P precursor (EC 3.2.1.17)	LYSCP_MOUSE	52,28	1
(P15089) Mast cell carboxypeptidase A precursor (EC 3.4.17.1)	CBPA3_MOUSE	49,65	1
(Q923L7) Eosinophil-associated ribonuclease 6	Q923L7_MOUSE	46,93	1
(Q91XZ2) Protocadherin beta 8	Q91XZ2_MOUSE	43,27	1
(P49945) Ferritin light chain 2 (Ferritin L subunit 2)	FRIL2_MOUSE	39,63	1
(Q80SX0) Mus musculus 3 days neonate thymus cDNA	Q80SX0_MOUSE	39,05	1
(P11438) Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 precursor	LAMP1_MOUSE	38,20	1
(O70404) Vesicle-associated membrane protein 8 (VAMP-8)	VAMP8_MOUSE	38,18	1
(Q7SIG6) Development and differentiation-enhancing factor 2	DDEF2_MOUSE	34,48	1
(P11835) Integrin beta-2 precursor	ITB2_MOUSE	31,62	1
(P62737) Actin, aortic smooth muscle (Alpha-actin 2)	ACTA_MOUSE	30,62	1
(Q9Z256) ATP receptor P2X4 subunit isoform a	Q9Z256_MOUSE	30,59	1
(Q8C2C1) Mus musculus 2 days neonate thymus thymic cells cDNA	Q8C2C1_MOUSE	29,99	1
(Q8C6Z4) Mus musculus adult female mammary gland cDNA	Q8C6Z4_MOUSE	29,59	1
(Q9WV54) Acid ceramidase precursor (EC 3.5.1.23)	ASAH1_MOUSE	27,92	1
(P16675) Lysosomal protective protein precursor (Cathepsin A)	PPGB_MOUSE	26,97	1
(O89033) Cell division control protein 6 homolog	CDC6_MOUSE	26,97	1
(Q920F2) Type II keratin 5	Q920F2_MOUSE	26,86	1
(Q6AXH2) 1300013D05Rik protein	Q6AXH2_MOUSE	26,65	1
(Q8C545) Mus musculus adult male hypothalamus cDNA	Q8C545_MOUSE	25,86	1
(Q9Z1T1) Adapter-related protein complex 3 beta 1 subunit	AP3B1_MOUSE	25,23	1
(Q61282) Aggrecan core protein precursor	PGCA_MOUSE	22,82	1
(O08788) Dynactin-1 (150 kDa dynein-associated polypeptide)	DYNA_MOUSE	22,36	1
(P46062) Signal-induced proliferation associated protein 1 (Sipa-1)	SIPA1_MOUSE	21,76	1
(P97429) Annexin A4 (Annexin IV)	ANXA4_MOUSE	21,20	1
(P17047) Lysosome-associated membrane glycoprotein 2 precursor	LAMP2_MOUSE	20,30	1
(O88844) Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDHC_MOUSE	20,22	1

Tableau 4 (ci-dessous): Protéines identifiées par spectrométrie de masse dans la préparation d'exosomes de cellules dendritiques de souris.

Voir chapitre II : « Techniques expérimentales » pour les détails de l'analyse protéomique.

Protéines identifiées	Numéro d'accension NCBI	Score MASCOT	Nbr de peptides identifiés
Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	gi 1351867	970,58	17
actin, gamma 1 propeptide	gi 4501887	968,75	17
put. beta-actin (aa 27-375) [Mus musculus]	gi 49868	828,12	15
Hsc70-ps1 [Rattus norvegicus]	gi 56385	700,78	15
beta 5-tubulin; beta 1b tubulin [Homo sapiens]	gi 29788785	644,79	12
integrin alpha M (Cd11b); macrophage antigen alpha	gi 6680484	497,02	10
alpha-enolase; 2-phospho-D-glycerate hydrolase [Mus musculus]	gi 12963491	489,72	8
programmed cell death 6 interacting protein [Mus musculus]	gi 6755002	472,13	10
tubulin alpha-3 chain - Chinese hamster	gi 90217	461,15	9
beta tubulin [Cricetulus griseus]	gi 537407	385,28	8
talin	gi 227256	358,42	8
unnamed protein product [Mus musculus]	gi 26326929	353,73	8
Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 84)	gi 123681	344,09	5
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Mus musculus]	gi 20832385	334,24	7
CD18 antigen preprotein [Mus musculus]	gi 50343	330,27	6
RIKEN cDNA 1300007C21 [Mus musculus]	gi 33239435	326,54	5
similar to Tubulin alpha-4 chain (Alpha-tubulin 4) [Rattus norvegicus]	gi 27685243	322,24	8
myosin heavy chain IX [Mus musculus]	gi 20137006	322,23	7
Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP 86)	gi 1170383	308,04	5
GTP-binding protein (G-alpha-i2) [Rattus norvegicus]	gi 13591955	305,26	6
unnamed protein product [Cricetulus griseus]	gi 49435	262,09	6
moesin [Rattus norvegicus]	gi 13540689	257,54	5
leucine arylaminopeptidase 1	gi 6678664	256,69	5
hypothetical protein XP_346863 [Rattus norvegicus]	gi 34882918	240,20	4
profilin [Rattus norvegicus]	gi 1628436	237,90	5
syndecan binding protein; syntenin; [Mus musculus]	gi 7949150	228,48	4
similar to Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1)	gi 34881719	227,90	5
annexin A1; lipocortin 1 [Mus musculus]	gi 6754570	226,15	4
annexin II - rat	gi 2143593	219,38	4
lipoprotein lipase [Cricetulus griseus]	gi 19550345	210,13	4
Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein [Mus musculus]	gi 15928599	197,91	4
alpha-macroglobulin precursor - guinea pig	gi 2144118	197,22	4
carboxypeptidase N, polypeptide 1	gi 13507644	191,33	3
G protein beta 2 subunit [Mus musculus]	gi 984551	190,18	4
Hemoglobin alpha chain	gi 122484	185,80	4
Mfge8 protein [Mus musculus]	gi 13278112	182,58	4
heat shock rotein 70 [Rattus rattus]	gi 415898	179,95	3
unnamed protein product [Mus sp.]	gi 52851	173,96	3
coagulation factor 2; coagulation factor II [Rattus norvegicus]	gi 12621076	170,64	4
M2 pyruvate kinase [Rattus norvegicus]	gi 206205	170,05	4
14-3-3 zeta [Mus musculus]	gi 1526539	167,33	3

enolase 3, beta muscle [Mus musculus]	gil6679651	164,53	2
Rap1b	gil595280	163,32	3
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 precursor	gil3024062	157,39	3
Complement C3 precursor [Contains: C3a anaphylatoxin]	gil544053	154,02	3
Iqgap1 protein [Mus musculus]	gil27370648	150,15	3
cofilin 1, non-muscle [Mus musculus]	gil6680924	149,96	3
Gelsolin [Rattus norvegicus]	gil51260019	149,12	3
serine (or cysteine) proteinase inhibitor	gil18252782	149,10	3
annexin A4; annexin IV [Mus musculus]	gil7304889	147,59	3
Hemoglobin alpha chain	gil122450	141,52	3
unnamed protein product [Mus musculus]	gil12845853	136,05	3
eukaryotic translation initiation factor 4A2 [Mus musculus]	gil7305019	135,60	2
mouse counterpart for human pigment epithelium-derived factor	gil1747298	133,15	2
similar to CG31613-PA [Rattus norvegicus]	gil34876364	126,26	3
annexin A5; annexin V [Mus musculus]	gil6753060	125,26	2
EH-domain containing 1 [Mus musculus]	gil22477515	124,67	2
Macrophage capping protein (Myc basic motif homolog-1)	gil729023	116,89	2
Hemoglobin beta chain	gil122596	116,40	3
CD81 antigen	gil549047	114,16	2
Blvrb protein [Mus musculus]	gil13879286	108,25	2
S-adenosylhomocysteine hydrolase [Mus musculus]	gil7709980	103,16	3
similar to Ac2-248 [Rattus norvegicus]	gil34880787	101,49	2
unnamed protein product [Cricetulus longicaudatus]	gil49496	96,43	2
phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3) - rat	gil112127	89,51	2
similar to FLJ00343 protein [Rattus norvegicus]	gil34881882	88,17	2
clathrin, heavy polypeptide (Hc) [Rattus norvegicus]	gil9506497	86,20	2
similar to Alpha enolase (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase)	gil34876757	82,24	1
lactate dehydrogenase 1, A chain [Mus musculus]	gil6754524	53,14	1
glucose phosphate isomerase	gil309268	75,68	1
GTP-binding protein, 23K - rat	gil92022	75,03	2
actin related protein 2/3 complex, subunit 2 [Mus musculus]	gil23621467	74,47	2
cDNA sequence BC032204 [Mus musculus]	gil24418903	74,24	2
rab GDI beta [Rattus norvegicus]	gil396433	46,59	1
phosphoglycerate mutase type B subunit [Rattus sp.]	gil8248819	71,24	1
coronin-like actin binding protein	gil6753492	70,43	2
unnamed protein product [Mus musculus]	gil929677	40,23	1
Phosphogluconate dehydrogenase [Mus musculus]	gil15030150	66,27	2
alpha-fetoprotein	gil191765	65,74	1
tumor susceptibility gene 101 protein [Mus musculus]	gil11230780	64,48	1
capping protein alpha 1 subunit [Mus musculus]	gil595917	61,17	1
L-CA variant 3 [Rattus norvegicus]	gil56560	57,85	1
trypsin (EC 3.4.21.4) II precursor - rat	gil67548	57,48	1
Arp3b-pending protein [Mus musculus]	gil31418623	57,18	1
argininosuccinate synthetase	gil192065	57,09	1
S100 calcium binding protein A11	gil21886811	53,13	1
Na K-ATPase beta-3 subunit [Mus musculus]	gil2384742	52,99	1
placenta-specific 8; onzin [Mus musculus]	gil21105853	51,91	1
unnamed protein product [Mus musculus]	gil12857620	50,83	1
O910001A06Rik protein [Mus musculus]	gil15030175	50,35	1
alpha-1-inhibitor III	gil554403	47,49	1

Annexes

keratin complex 2, basic [Mus musculus]	gil9910294	44,58	1
non-muscle myosin light chain 3	gil435585	43,39	1
calcium binding protein (AA 1-64) [Mus musculus]	gil53250	43,25	1
similar to Caspase recruitment domain protein 12	gil34862480	42,65	1
Fc receptor, IgE, gamma polypeptide [Mus musculus]	gil6753830	40,94	1
Crystal Structure Of A Mammalian 2-Cys Peroxiredoxin, Hbp23.	gil6435548	40,32	1
myosin heavy chain I, brain - mouse (fragment)	gil423511	40,26	1
keratin 14 [Rattus norvegicus]	gil2443314	40,17	1
Murine Carbonic Anhydrase Iv Complexed With Brinzolamide	gil4699804	38,98	1

Références bibliographiques

A

- Achord, D. T., F. E. Brot, C. E. Bell, and W. S. Sly. 1978.** Human beta-glucuronidase: in vivo clearance and in vitro uptake by a glycoprotein recognition system on reticuloendothelial cells. *Cell* 15: 269-78.
- Adachi, Y., B. U. Bradford, W. Gao, H. K. Bojes, and R. G. Thurman. 1994.** Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology* 20: 453-60.
- Aebersold, R., and M. Mann. 2003.** Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422: 198-207.
- Alvarez-Dominguez, C., A. M. Barbieri, W. Beron, A. Wandinger-Ness, and P. D. Stahl. 1996.** Phagocytosed live *Listeria monocytogenes* influences Rab5-regulated in vitro phagosome-endosome fusion. *J Biol Chem* 271: 13834-43.
- Amar-Costesec, A., M. Prado-Figueroa, H. Beaufay, J. F. Nagelkerke, and T. J. van Berkel. 1985.** Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. IX. Nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase: a plasma membrane enzyme prominently found in Kupffer cells. *J Cell Biol* 100: 189-97.
- Andersen, J. S., and M. Mann. 2006.** Organellar proteomics: turning inventories into insights. *EMBO Rep* 7: 874-9.
- Aniento, F., N. Emans, G. Griffiths, and J. Gruenberg. 1993.** Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J Cell Biol* 123: 1373-87.
- Arias, I.M., H. Popper, D. Schachter and D.A. Shafritz. 1982.** The liver – Biology and pathology. Raven Press NY.
- Arii, S., and M. Imamura. 2000.** Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 7: 40-8.

B

- Babst, M., D. J. Katzmann, W. B. Snyder, B. Wendland, and S. D. Emr. 2002.** Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell* 3: 283-9.
- Bagshaw, R. D., D. J. Mahuran, and J. W. Callahan. 2005.** A proteomic analysis of lysosomal integral membrane proteins reveals the diverse composition of the organelle. *Mol Cell Proteomics* 4: 133-43.
- Bakker, A. C., P. Webster, W. A. Jacob, and N. W. Andrews. 1997.** Homotypic fusion between aggregated lysosomes triggered by elevated $[Ca^{2+}]_i$ in fibroblasts. *J Cell Sci* 110 (Pt 18): 2227-38.
- Bananis, E., S. Nath, K. Gordon, P. Satir, R. J. Stockert, J. W. Murray, and A. W. Wolkoff. 2004.** Microtubule-dependent movement of late endocytic vesicles in vitro: requirements for Dynein and Kinesin. *Mol Biol Cell* 15: 3688-97.
- Bartholeyns, J., C. Peeters-Joris, and P. Baudhuin. 1975.** Hepatic nucleases. Extrahepatic origin and association of neutral liver ribonuclease with lysosomes. *Eur J Biochem* 60: 385-93.

- Bartles, J. R., L. T. Braiterman, and A. L. Hubbard. 1985.** Endogenous and exogenous domain markers of the rat hepatocyte plasma membrane. *J Cell Biol* 100: 1126-38.
- Baudhuin, P., H. Beaufay, and C. De Duve. 1965.** Combined biochemical and morphological study of particulate fractions from rat liver. Analysis of preparations enriched in lysosomes or in particles containing urate oxidase, D-amino acid oxidase, and catalase. *J Cell Biol* 26: 219-43.
- Beaufay, H., D. S. Bendall, P. Baudhuin, R. Wattiaux, and C. De Duve. 1959.** Tissue fractionation studies. 13. Analysis of mitochondrial fractions from rat liver by density-gradient centrifuging. *Biochem J* 73: 628-37.
- Beaufay, H., P. Jacques, P. Baudhuin, O. Z. Sellinger, J. Berthet, and C. De Duve. 1964.** Tissue fractionation studies. 18. Resolution of mitochondrial fractions from rat liver into three distinct populations of cytoplasmic particles by means of density equilibration in various gradients. *Biochem J* 92: 184-205.
- Beguinet, L., R. M. Lyall, M. C. Willingham, and I. Pastan. 1984.** Down-regulation of the epidermal growth factor receptor in KB cells is due to receptor internalization and subsequent degradation in lysosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 2384-8.
- Berthier, R., C. Martinon-Ego, A. M. Laharie, and P. N. Marche. 2000.** A two-step culture method starting with early growth factors permits enhanced production of functional dendritic cells from murine splenocytes. *J Immunol Methods* 239: 95-107.
- Blouin, A., R. P. Bolender, and E. R. Weibel. 1977.** Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J Cell Biol* 72: 441-55.
- Bonifacino, J. S., and A. M. Weissman. 1998.** Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 19-57.
- Bonifacino, J. S., and L. M. Traub. 2003.** Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 72: 395-447.
- Boonen, M., I. Hamer, M. Boussac, A. F. Delsaute, B. Flamion, J. Garin, and M. Jadot. 2006.** Intracellular localization of p40, a protein identified in a preparation of lysosomal membranes. *Biochem J* 395: 39-47.
- Boussac, M. 2001.** Etudes protéomiques de compartiments de la voie endocyttaire. Thèse de l'Université Joseph Fourier, Grenoble, France.
- Bouwens, L., and E. Wisse. 1987.** Immuno-electron microscopic characterization of large granular lymphocytes (natural killer cells) from rat liver. *Eur J Immunol* 17: 1423-8.
- Bretscher, M. S., and S. Munro. 1993.** Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science* 261: 1280-1.
- Bright, N. A., M. J. Gratian, and J. P. Luzio. 2005.** Endocytic delivery to lysosomes mediated by concurrent fusion and kissing events in living cells. *Curr Biol* 15: 360-5.
- Brotherus, J., O. Renkonen, W. Fischer, and J. Herrmann. 1974.** Novel stereoconfiguration in lyso-bis-phosphatidic acid of cultured BHK-cells. *Chem Phys Lipids* 13: 178-82.
- Brown, M. S., R. G. Anderson, and J. L. Goldstein. 1983.** Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins. *Cell* 32: 663-7.

- Brunet, S., P. Thibault, E. Gagnon, P. Kearney, J. J. Bergeron, and M. Desjardins. 2003.** Organelle proteomics: looking at less to see more. *Trends Cell Biol* 13: 629-38.
- Bucher, N.L.R. 1959.** Ciba Found. Symp., "The biosynthesis of Terpenes and Sterols", 46 (de Reuck, A.V.S. et Cameron, M.P., Eds, J. et A. Churchill, Ltd., Londres).
- Burnside, J., and D. L. Schneider. 1982.** Characterization of the membrane proteins of rat liver lysosomes. Composition, enzyme activities and turnover. *Biochem J* 204: 525-34.

C

- Carstea, E. D., J. A. Morris, K. G. Coleman, S. K. Loftus, D. Zhang, C. Cummings, J. Gu, M. A. Rosenfeld, W. J. Pavan, D. B. Krizman, J. Nagle, M. H. Polymeropoulos, S. L. Sturley, Y. A. Ioannou, M. E. Higgins, M. Comly, A. Cooney, A. Brown, C. R. Kaneski, E. J. Blanchette-Mackie, N. K. Dwyer, E. B. Neufeld, T. Y. Chang, L. Liscum, J. F. Strauss, 3rd, K. Ohno, M. Zeigler, R. Carmi, J. Sokol, D. Markie, R. R. O'Neill, O. P. van Diggelen, M. Elleder, M. C. Patterson, R. O. Brady, M. T. Vanier, P. G. Pentchev, and D. A. Tagle. 1997.** Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 277: 228-31.
- Casey, P. J. 1995.** Protein lipidation in cell signaling. *Science* 268: 221-5.
- Conner, S. D., and S. L. Schmid. 2003.** Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422: 37-44.

D

- Dan, C., and K. Wake. 1985.** Modes of endocytosis of latex particles in sinusoidal endothelial and Kupffer cells of normal and perfused rat liver. *Exp Cell Res* 158: 75-85.
- Darte, C., and H. Beaufay. 1983.** Analytical subcellular fractionation of cultivated mouse resident peritoneal macrophages. *J Exp Med* 157: 1208-28.
- Dautry-Varsat, A., A. Ciechanover, and H. F. Lodish. 1983.** pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 2258-62.
- Davenport, J. B. 1964.** Separation of Subcellular Particles by Density-Gradient Electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 88: 177-90.
- Davis, N. G., J. L. Horecka, and G. F. Sprague, Jr. 1993.** Cis- and trans-acting functions required for endocytosis of the yeast pheromone receptors. *J Cell Biol* 122: 53-65.
- De Duve, C., B. C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux, and F. Appelmans. 1955.** Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J* 60: 604-17.
- De Duve, C. 1963.** Ciba Found. Symp., "Lysosomes", 126 (de Reuck, A.V.S. et Cameron, M.P., Eds, J. et A. Churchill, Ltd., Londres).
- De Duve, C., and R. Wattiaux. 1966.** Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* 28: 435-92.

- Decker, T., M. L. Lohmann-Matthes, U. Karck, T. Peters, and K. Decker. 1989.** Comparative study of cytotoxicity, tumor necrosis factor, and prostaglandin release after stimulation of rat Kupffer cells, murine Kupffer cells, and murine inflammatory liver macrophages. *J Leukoc Biol* 45: 139-46.
- Desjardins, M., and G. Griffiths. 2003.** Phagocytosis: latex leads the way. *Curr Opin Cell Biol* 15: 498-503.
- Desjardins, M., L. A. Huber, R. G. Parton, and G. Griffiths. 1994.** Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol* 124: 677-88.
- Desjardins, M., and S. Scianimanico. 1998.** Isolation of Phagosomes from Professional and Nonprofessional Phagocytes, in "Cell Biology: a laboratory handbook". Academic Press.
- Domon, B., and R. Aebersold. 2006.** Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 312: 212-7.
- Dunn, W. A., T. P. Connolly, and A. L. Hubbard. 1986.** Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by rat hepatocytes: receptor pathway. *J Cell Biol* 102: 24-36.

E

- Edman, P., and G. Begg. 1967.** A protein sequenator. *Eur J Biochem* 1: 80-91.
- Einstein, R., and C. A. Gabel. 1991.** Cell- and ligand-specific dephosphorylation of acid hydrolases: evidence that the mannose 6-phosphatase is controlled by compartmentalization. *J Cell Biol* 112: 81-94.
- Evans, W. H. 1970.** Fractionation of liver plasma membranes prepared by zonal centrifugation. *Biochem J* 116: 833-42.
- Evans, W. H. 1980.** A biochemical dissection of the functional polarity of the plasma membrane of the hepatocyte. *Biochim Biophys Acta* 604: 27-64.

F

- Felder, S., K. Miller, G. Moehren, A. Ullrich, J. Schlessinger, and C. R. Hopkins. 1990.** Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. *Cell* 61: 623-34.
- Fernandez-Borja, M., R. Wubbolts, J. Calafat, H. Janssen, N. Divecha, S. Dusseljee, and J. Neefjes. 1999.** Multivesicular body morphogenesis requires phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Curr Biol* 9: 55-8.
- Ferro, M., D. Salvi, H. Riviere-Rolland, T. Vermat, D. Seigneurin-Berny, D. Grunwald, J. Garin, J. Joyard, and N. Rolland. 2002.** Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: identification and subcellular localization of new transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11487-92.
- Fevrier, B., and G. Raposo. 2004.** Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* 16: 415-21.
- Foster, L. J., C. L. de Hoog, Y. Zhang, X. Xie, V. K. Mootha, and M. Mann. 2006.** A mammalian organelle map by protein correlation profiling. *Cell* 125: 187-99.

- Foti, M., A. Mangasarian, V. Piguet, D. P. Lew, K. H. Krause, D. Trono, and J. L. Carpentier. 1997.** Nef-mediated clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol* 139: 37-47.
- Friedman, S. L. 1993.** Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 328: 1828-35.
- Futter, C. E., L. M. Collinson, J. M. Backer, and C. R. Hopkins. 2001.** Human VPS34 is required for internal vesicle formation within multivesicular endosomes. *J Cell Biol* 155: 1251-64.

G

- Gagescu, R., N. Demaurex, R. G. Parton, W. Hunziker, L. A. Huber, and J. Gruenberg. 2000.** The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components. *Mol Biol Cell* 11: 2775-91.
- Gagnon, E., S. Duclos, C. Rondeau, E. Chevet, P. H. Cameron, O. Steele-Mortimer, J. Paiement, J. J. Bergeron, and M. Desjardins. 2002.** Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110: 119-31.
- Galaviz-Hernandez, C., C. Stagg, G. de Ridder, T. S. Tanaka, M. S. Ko, D. Schlessinger, and R. Nagaraja. 2003.** Plac8 and Plac9, novel placental-enriched genes identified through microarray analysis. *Gene* 309: 81-9.
- Garin, J., R. Diez, S. Kieffer, J. F. Dermine, S. Duclos, E. Gagnon, R. Sadoul, C. Rondeau, and M. Desjardins. 2001.** The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* 152: 165-80.
- Geuze, H. J., J. W. Slot, G. J. Strous, H. F. Lodish, and A. L. Schwartz. 1983.** Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis. *Cell* 32: 277-87.
- Gibbs, R. A., G. M. Weinstock, M. L. Metzker, D. M. Muzny, E. J. Sodergren, S. Scherer, G. Scott, D. Steffen, K. C. Worley, P. E. Burch, G. Okwuonu, S. Hines, L. Lewis, C. DeRamo, O. Delgado, S. Dugan-Rocha, G. Miner, M. Morgan, A. Hawes, R. Gill, Celera, R. A. Holt, M. D. Adams, P. G. Amanatides, H. Baden-Tillson, M. Barnstead, S. Chin, C. A. Evans, S. Ferriera, C. Fosler, A. Glodek, Z. Gu, D. Jennings, C. L. Kraft, T. Nguyen, C. M. Pfannkoch, C. Sitter, G. G. Sutton, J. C. Venter, T. Woodage, D. Smith, H. M. Lee, E. Gustafson, P. Cahill, A. Kana, L. Doucette-Stamm, K. Weinstock, K. Fectel, R. B. Weiss, D. M. Dunn, E. D. Green, R. W. Blakesley, G. G. Bouffard, P. J. De Jong, K. Osoegawa, B. Zhu, M. Marra, J. Schein, I. Bosdet, C. Fjell, S. Jones, M. Krzywinski, C. Mathewson, A. Siddiqui, N. Wye, J. McPherson, S. Zhao, C. M. Fraser, J. Shetty, S. Shatsman, K. Geer, Y. Chen, S. Abramzon, W. C. Nierman, P. H. Havlak, R. Chen, K. J. Durbin, A. Egan, Y. Ren, X. Z. Song, B. Li, Y. Liu, X. Qin, S. Cawley, A. J. Cooney, L. M. D'Souza, K. Martin, J. Q. Wu, M. L. Gonzalez-Garay, A. R. Jackson, K. J. Kalafus, M. P. McLeod, A. Milosavljevic, D. Virk, A. Volkov, D. A. Wheeler, Z. Zhang, J. A.**

- Bailey, E. E. Eichler, E. Tuzun et al. 2004.** Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428: 493-521.
- Gillooly, D. J., I. C. Morrow, M. Lindsay, R. Gould, N. J. Bryant, J. M. Gaullier, R. G. Parton, and H. Stenmark. 2000.** Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *Embo J* 19: 4577-88.
- Glass, C., R. C. Pittman, M. Civen, and D. Steinberg. 1985.** Uptake of high-density lipoprotein-associated apoprotein A-I and cholesterol esters by 16 tissues of the rat in vivo and by adrenal cells and hepatocytes in vitro. *J Biol Chem* 260: 744-50.
- Greenberg, S., K. Burridge, and S. C. Silverstein. 1990.** Colocalization of F-actin and talin during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J Exp Med* 172: 1853-6.
- Griffiths, G., B. Hoflack, K. Simons, I. Mellman, and S. Kornfeld. 1988.** The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* 52: 329-41.
- Griffiths, G. 1996.** On vesicles and membrane compartments. *Protoplasma* 195: 37-58.
- Gruenberg, J. 2001.** The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 721-30.
- Gruenberg, J., and F. R. Maxfield. 1995.** Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol* 7: 552-63.
- Gruenberg, J., and H. Stenmark. 2004.** The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 317-23.
- Gruenberg, J., G. Griffiths, and K. E. Howell. 1989.** Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J Cell Biol* 108: 1301-16.

H

- Hannig, K. 1964.** [a New Development for Continuous, Carrier-Free Electrophoresis. On the Separation of High-Molecular Weight and Thickly Dispersed Particles.]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 338: 211-27.
- Harding, C., J. Heuser, and P. Stahl. 1983.** Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 97: 329-39.
- Hayashi, H., S. Niinobe, Y. Matsumoto, and T. Suga. 1981.** Effects of Triton WR-1339 on lipoprotein lipolytic activity and lipid content of rat liver lysosomes. *J Biochem (Tokyo)* 89: 573-9.
- Helenius, A., I. Mellman, D. Wall and A. Hubbard. 1983.** Endosomes. *Trends Biochem. Sci.* 8: 245-50.
- Hers, H. G. 1963.** alpha-Glucosidase deficiency in generalized glycogenstorage disease (Pompe's disease). *Biochem J* 86: 11-6.
- Hicke, L., and R. Dunn. 2003.** Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 141-72.
- Hoflack, B., K. Fujimoto, and S. Kornfeld. 1987.** The interaction of phosphorylated oligosaccharides and lysosomal enzymes with bovine liver cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 262: 123-9.
- Holtzman, E. 1989.** Lysosomes. Plenum Press, NY, USA.

- Hopkins, C. R. 1983.** Intracellular routing of transferrin and transferrin receptors in epidermoid carcinoma A431 cells. *Cell* 35: 321-30.
- Houde, M., S. Bertholet, E. Gagnon, S. Brunet, G. Goyette, A. Laplante, M. F. Princiotta, P. Thibault, D. Sacks, and M. Desjardins. 2003.** Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425: 402-6.
- Hsu, D. H., P. Paz, G. Villaflor, A. Rivas, A. Mehta-Damani, E. Angevin, L. Zitvogel, and J. B. Le Pecq. 2003.** Exosomes as a tumor vaccine: enhancing potency through direct loading of antigenic peptides. *J Immunother* 26: 440-50.
- Hubbard, A. L., G. Wilson, G. Ashwell, and H. Stukenbrok. 1979.** An electron microscope autoradiographic study of the carbohydrate recognition systems in rat liver. I. Distribution of ¹²⁵I-ligands among the liver cell types. *J Cell Biol* 83: 47-64.
- Hughson, E. J., and C. R. Hopkins. 1990.** Endocytic pathways in polarized Caco-2 cells: identification of an endosomal compartment accessible from both apical and basolateral surfaces. *J Cell Biol* 110: 337-48.

I

- Ikonen, E. 2001.** Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 13: 470-7.

J

- Jacques, P.J. 1968.** Epuration plasmique de protéines étrangères, leur capture et leur destinée dans l'appareil vacuolaire du foie. Thèse de l'Université Catholique de Louvain, Bruxelles, Belgique.
- Jadot, M., S. Wattiaux-De Coninck, and R. Wattiaux. 1985.** Effect on lysosomes of invertase endocytosed by rat-liver. *Eur J Biochem* 151: 485-8.
- Jadot, M., S. Misquith, F. Dubois, S. Wattiaux-De Coninck, and R. Wattiaux. 1986.** Intracellular pathway followed by invertase endocytosed by rat liver. *Eur J Biochem* 161: 695-700.
- Jadot, M. 1987.** Chemin intracellulaire suivi par l'invertase endocytée par le foie : une analyse biochimique. Thèse des Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix, Namur, Belgique.
- Jadot, M., L. Lin, D. E. Sleat, I. Sohar, M. S. Hsu, J. Pintar, F. Dubois, S. W. Coninck, S. Wattiaux-De Coninck, and P. Lobel. 1999.** Subcellular localization of mannose 6-phosphate glycoproteins in rat brain. *J Biol Chem* 274: 21104-13.
- Jahraus, A., B. Storrie, G. Griffiths, and M. Desjardins. 1994.** Evidence for retrograde traffic between terminal lysosomes and the prelysosomal/late endosome compartment. *J Cell Sci* 107 (Pt 1): 145-57.
- Jin, M., and M. D. Snider. 1993.** Role of microtubules in transferrin receptor transport from the cell surface to endosomes and the Golgi complex. *J Biol Chem* 268: 18390-7.

- Johnstone, R. M., M. Adam, J. R. Hammond, L. Orr, and C. Turbide. 1987.** Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 262: 9412-20.
- Joiner, K. A., S. A. Fuhrman, H. M. Miettinen, L. H. Kasper, and I. Mellman. 1990.** *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science* 249: 641-6.
- Journet, A., A. Chapel, S. Kieffer, F. Roux, and J. Garin. 2002.** Proteomic analysis of human lysosomes: application to monocytic and breast cancer cells. *Proteomics* 2: 1026-40.
- Journet, A., A. Chapel, S. Kieffer, M. Louwagie, S. Luche, and J. Garin. 2000.** Towards a human repertoire of monocytic lysosomal proteins. *Electrophoresis* 21: 3411-9.
- Jungermann, K. and N. Katz. 1982.** Metabolic heterogeneity of liver parenchyma ; in: *Metabolic compartmentation*. Academic press London. P411-435.
- Jutras, I., and M. Desjardins. 2005.** Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 511-27.

K

- Kasper, D., F. Dittmer, K. von Figura, and R. Pohlmann. 1996.** Neither type of mannose 6-phosphate receptor is sufficient for targeting of lysosomal enzymes along intracellular routes. *J Cell Biol* 134: 615-23.
- Katzmann, D. J., M. Babst, and S. D. Emr. 2001.** Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106: 145-55.
- Katzmann, D. J., G. Odorizzi, and S. D. Emr. 2002.** Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 893-905.
- Kil, S. J., and C. Carlin. 2000.** EGF receptor residues leu(679), leu(680) mediate selective sorting of ligand-receptor complexes in early endosomal compartments. *J Cell Physiol* 185: 47-60.
- Klose, J., and U. Kobalz. 1995.** Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 16: 1034-59.
- Knight, A., E. Hughson, C. R. Hopkins, and D. F. Cutler. 1995.** Membrane protein trafficking through the common apical endosome compartment of polarized Caco-2 cells. *Mol Biol Cell* 6: 597-610.
- Kobayashi, T., E. Stang, K. S. Fang, P. de Moerloose, R. G. Parton, and J. Gruenberg. 1998.** A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* 392: 193-7.

L

- Lehle, L., R. E. Cohen, and C. E. Ballou. 1979.** Carbohydrate structure of yeast invertase. Demonstration of a form with only core oligosaccharides and a form with completed polysaccharide chains. *J Biol Chem* 254: 12209-18.

- Leighton, F., B. Poole, H. Beaufay, P. Baudhuin, J. W. Coffey, S. Fowler, and C. De Duve. 1968.** The large-scale separation of peroxisomes, mitochondria, and lysosomes from the livers of rats injected with triton WR-1339. Improved isolation procedures, automated analysis, biochemical and morphological properties of fractions. *J Cell Biol* 37: 482-513.
- Li, Y., K. Rogulski, Q. Zhou, P. J. Sims, and E. V. Prochownik. 2006.** The negative c-Myc target onzin affects proliferation and apoptosis via its obligate interaction with phospholipid scramblase 1. *Mol Cell Biol* 26: 3401-13.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-75.
- Luche, S., V. Santoni, and T. Rabilloud. 2003.** Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 3: 249-53.
- Ludwig, T., H. Munier-Lehmann, U. Bauer, M. Hollinshead, C. Ovitt, P. Lobel, and B. Hoflack. 1994.** Differential sorting of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient fibroblasts. *Embo J* 13: 3430-7.
- Luo, D. Z., D. Vermijlen, B. Ahishali, V. Triantis, G. Plakoutsi, F. Braet, K. Vanderkerken, and E. Wisse. 2000.** On the cell biology of pit cells, the liver-specific NK cells. *World J Gastroenterol* 6: 1-11.
- Luzio, J.P., P.R. Pryor, S.R. Gray, M. Gratian, R.C. Piper and N.A. Bright. 2005.** Membrane traffic to and from lysosomes. *Biochem. Soc. Symp.* 72: 77-86.

M

- MacKay, V. L., X. Li, M. R. Flory, E. Turcott, G. L. Law, K. A. Serikawa, X. L. Xu, H. Lee, D. R. Goodlett, R. Aebersold, L. P. Zhao, and D. R. Morris. 2004.** Gene expression analyzed by high-resolution state array analysis and quantitative proteomics: response of yeast to mating pheromone. *Mol Cell Proteomics* 3: 478-89.
- MacLennan, D. H., and J. Asai. 1968.** Studies on the mitochondrial adenosine triphosphatase system. V. Localization of the oligomycin-sensitivity conferring protein. *Biochem Biophys Res Commun* 33: 441-7.
- MacLennan, D. H., and A. Tzagoloff. 1968.** Studies on the mitochondrial adenosine triphosphatase system. IV. Purification and characterization of the oligomycin sensitivity conferring protein. *Biochemistry* 7: 1603-10.
- Malissen, M., A. Gillet, L. Ardouin, G. Bouvier, J. Trucy, P. Ferrier, E. Vivier, and B. Malissen. 1995.** Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *Embo J* 14: 4641-53.
- Martinez, F., E. R. Abril, D. L. Earnest, and R. R. Watson. 1992.** Ethanol and cytokine secretion. *Alcohol* 9: 455-8.
- Matsuo, H., J. Chevallier, N. Mayran, I. Le Blanc, C. Ferguson, J. Faure, N. S. Blanc, S. Matile, J. Dubochet, R. Sadoul, R. G. Parton, F. Vilbois, and J. Gruenberg. 2004.** Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* 303: 531-4.
- Maxfield, F. R., J. Schlessinger, Y. Shechter, I. Pastan, and M. C. Willingham. 1978.** Collection of insulin, EGF and alpha2-macroglobulin in the same patches on the surface of cultured fibroblasts and common internalization. *Cell* 14: 805-10.

- Mayor, S., S. Sabharanjak, and F. R. Maxfield. 1998.** Cholesterol-dependent retention of GPI-anchored proteins in endosomes. *Embo J* 17: 4626-38.
- Mayorga, L. S., F. Bertini, and P. D. Stahl. 1991.** Fusion of newly formed phagosomes with endosomes in intact cells and in a cell-free system. *J Biol Chem* 266: 6511-7.
- Mayran, N., R. G. Parton, and J. Gruenberg. 2003.** Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells. *Embo J* 22: 3242-53.
- McCormack, A. L., D. M. Schieltz, B. Goode, S. Yang, G. Barnes, D. Drubin, and J. R. Yates, 3rd. 1997.** Direct analysis and identification of proteins in mixtures by LC/MS/MS and database searching at the low-femtomole level. *Anal Chem* 69: 767-76.
- Meikle, P. J., J. J. Hopwood, A. E. Clague, and W. F. Carey. 1999.** Prevalence of lysosomal storage disorders. *Jama* 281: 249-54.
- Mellman, I. 1996.** Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 575-625.
- Mullock, B. M., J. H. Perez, T. Kuwana, S. R. Gray, and J. P. Luzio. 1994.** Lysosomes can fuse with a late endosomal compartment in a cell-free system from rat liver. *J Cell Biol* 126: 1173-82.
- Mullock, B. M., N. A. Bright, C. W. Fearon, S. R. Gray, and J. P. Luzio. 1998.** Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J Cell Biol* 140: 591-601.
- Murphy, R. F. 1991.** Maturation models for endosome and lysosome biogenesis. *Trends Cell Biol* 1: 77-82.
- Myrvik, Q. N., A. G. Gristina, G. Giridhar, and H. Hayakawa. 1993.** Particle-induced in vivo priming of alveolar macrophages for enhanced oxidative responses: a novel system of cellular immune augmentation. *J Leukoc Biol* 54: 439-43.

N

- Naito, M., K. Takahashi, and S. Nishikawa. 1990.** Development, differentiation, and maturation of macrophages in the fetal mouse liver. *J Leukoc Biol* 48: 27-37.
- Nishino, I., J. Fu, K. Tanji, T. Yamada, S. Shimojo, T. Koori, M. Mora, J. E. Riggs, S. J. Oh, Y. Koga, C. M. Sue, A. Yamamoto, N. Murakami, S. Shanske, E. Byrne, E. Bonilla, I. Nonaka, S. DiMauro, and M. Hirano. 2000.** Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* 406: 906-10.

O

- Odorizzi, G., M. Babst, and S. D. Emr. 1998.** Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell* 95: 847-58.
- Odorizzi, G., M. Babst, and S. D. Emr. 2000.** Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends Biochem Sci* 25: 229-35.

P

- Pan, B. T., K. Teng, C. Wu, M. Adam, and R. M. Johnstone. 1985.** Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 101: 942-8.
- Parise, E., M.E. Taylor and J.A. Summerfield. 1982.** Localization of a carbohydrate mediated glycoprotein receptor on hepatic sinusoidal cells; in: *Sinusoidal Liver Cells*, pp 287-296, Knook D.L. and E. Wisse, Ed Elsevier Biomedical Press.
- Parks, A.C. 1980.** Intermediates in the degradation of yeast invertase. Thesis, University of New York, Buffalo, USA.
- Pastan, I. and M.C. Willingham. 1983.** Receptor mediated endocytosis: coated pits, receptosomes and the Golgi. *Trends Biochem Sci.* 8: 250-254.
- Pasternak, S. H., R. D. Bagshaw, M. Guiral, S. Zhang, C. A. Ackerley, B. J. Pak, J. W. Callahan, and D. J. Mahuran. 2003.** Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and gamma-secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane. *J Biol Chem* 278: 26687-94.
- Petiot, A., J. Faure, H. Stenmark, and J. Gruenberg. 2003.** PI3P signaling regulates receptor sorting but not transport in the endosomal pathway. *J Cell Biol* 162: 971-9.
- Piguet, V., F. Gu, M. Foti, N. Demaux, J. Gruenberg, J. L. Carpentier, and D. Trono. 1999.** Nef-induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of beta-COP in endosomes. *Cell* 97: 63-73.
- Pitt, A., L. S. Mayorga, A. L. Schwartz, and P. D. Stahl. 1992.** Transport of phagosomal components to an endosomal compartment. *J Biol Chem* 267: 126-32.
- Poumay, Y., and M. F. Ronveaux-Dupal. 1985.** Rapid preparative isolation of concentrated low density lipoproteins and of lipoprotein-deficient serum using vertical rotor gradient ultracentrifugation. *J Lipid Res* 26: 1476-80.

R

- Rabinowitz, S., H. Horstmann, S. Gordon, and G. Griffiths. 1992.** Immunocytochemical characterization of the endocytic and phagolysosomal compartments in peritoneal macrophages. *J Cell Biol* 116: 95-112.
- Raposo, G., H. W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C. V. Harding, C. J. Melief, and H. J. Geuze. 1996.** B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183: 1161-72.
- Rawlings, N. D., and A. J. Barrett. 1999.** Tripeptidyl-peptidase I is apparently the CLN2 protein absent in classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Biochim Biophys Acta* 1429: 496-500.
- Resh, M. D. 1999.** Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1451: 1-16.

- Roberts, C. J., G. Pohlig, J. H. Rothman, and T. H. Stevens. 1989.** Structure, biosynthesis, and localization of dipeptidyl aminopeptidase B, an integral membrane glycoprotein of the yeast vacuole. *J Cell Biol* 108: 1363-73.
- Rodloff, A. C., J. Becker, D. K. Blanchard, T. W. Klein, H. Hahn, and H. Friedman. 1986.** Inhibition of macrophage phagocytosis by *Bacteroides fragilis* in vivo and in vitro. *Infect Immun* 52: 488-92.
- Roederer, M., J. R. Barry, R. B. Wilson, and R. F. Murphy. 1990.** Endosomes can undergo an ATP-dependent density increase in the absence of dense lysosomes. *Eur J Cell Biol* 51: 229-34.
- Rogulski, K., Y. Li, K. Rothermund, L. Pu, S. Watkins, F. Yi, and E. V. Prochownik. 2005.** Onzin, a c-Myc-repressed target, promotes survival and transformation by modulating the Akt-Mdm2-p53 pathway. *Oncogene* 24: 7524-41.

S

- Sato, T. K., M. Overduin, and S. D. Emr. 2001.** Location, location, location: membrane targeting directed by PX domains. *Science* 294: 1881-5.
- Schlesinger, P. H., T. W. Doebber, B. F. Mandell, R. White, C. DeSchryver, J. S. Rodman, M. J. Miller, and P. Stahl. 1978.** Plasma clearance of glycoproteins with terminal mannose and N-acetylglucosamine by liver non-parenchymal cells. Studies with beta-glucuronidase, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, ribonuclease B and agalacto-orosomucoid. *Biochem J* 176: 103-9.
- Schmid, S., R. Fuchs, M. Kielian, A. Helenius, and I. Mellman. 1989.** Acidification of endosome subpopulations in wild-type Chinese hamster ovary cells and temperature-sensitive acidification-defective mutants. *J Cell Biol* 108: 1291-300.
- Schmid, S. L., R. Fuchs, P. Male, and I. Mellman. 1988.** Two distinct subpopulations of endosomes involved in membrane recycling and transport to lysosomes. *Cell* 52: 73-83.
- Sheff, D. R., E. A. Daro, M. Hull, and I. Mellman. 1999.** The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *J Cell Biol* 145: 123-39.
- Sheorain, V. S., T. Nageswara Rao, and D. Subrahmanyam. 1980.** On the inhibition of lipoprotein lipase by Triton WR 1339. *Enzyme* 25: 81-6.
- Shinkai, Y., G. Rathbun, K. P. Lam, E. M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, A. M. Stall, and et al. 1992.** RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68: 855-67.
- Simonsen, A., R. Lippe, S. Christoforidis, J. M. Gaullier, A. Brech, J. Callaghan, B. H. Toh, C. Murphy, M. Zerial, and H. Stenmark. 1998.** EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* 394: 494-8.
- Sleat, D. E., I. Sohar, H. Lackland, J. Majercak, and P. Lobel. 1996.** Rat brain contains high levels of mannose-6-phosphorylated glycoproteins including lysosomal enzymes and palmitoyl-protein thioesterase, an enzyme implicated in infantile neuronal lipofuscinosis. *J Biol Chem* 271: 19191-8.

- Sleat, D. E., S. R. Kraus, I. Sohar, H. Lackland, and P. Lobel. 1997a.** alpha-Glucosidase and N-acetylglucosamine-6-sulphatase are the major mannose-6-phosphate glycoproteins in human urine. *Biochem J* 324 (Pt 1): 33-9.
- Sleat, D. E., R. J. Donnelly, H. Lackland, C. G. Liu, I. Sohar, R. K. Pullarkat, and P. Lobel. 1997b.** Association of mutations in a lysosomal protein with classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Science* 277: 1802-5.
- Sleat, D. E., H. Lackland, Y. Wang, I. Sohar, G. Xiao, H. Li, and P. Lobel. 2005.** The human brain mannose 6-phosphate glycoproteome: a complex mixture composed of multiple isoforms of many soluble lysosomal proteins. *Proteomics* 5: 1520-32.
- Sleat, D. E., Y. Wang, I. Sohar, H. Lackland, Y. Li, H. Li, H. Zheng, and P. Lobel. 2006.** Identification and Validation of Mannose 6-Phosphate Glycoproteins in Human Plasma Reveal a Wide Range of Lysosomal and Non-lysosomal Proteins. *Mol Cell Proteomics* 5: 1942-1956.
- Soares, M. B., M. F. Bonaldo, P. Jelene, L. Su, L. Lawton, and A. Efstratiadis. 1994.** Construction and characterization of a normalized cDNA library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9228-32.
- Stahn, R., K. P. Maier, and K. Hannig. 1970.** A new method for the preparation of rat liver lysosomes. Separation of cell organelles of rat liver by carrier-free continuous electrophoresis. *J Cell Biol* 46: 576-91.
- Steinberg, S. J., C. P. Ward, and A. H. Fensom. 1994.** Complementation studies in Niemann-Pick disease type C indicate the existence of a second group. *J Med Genet* 31: 317-20.
- Storrie, B. 1988.** Assembly of lysosomes: perspectives from comparative molecular cell biology. *Int Rev Cytol* 111: 53-105.
- Storrie, B., and M. Desjardins. 1996.** The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? *Bioessays* 18: 895-903.
- Strous, G. J., and R. Govers. 1999.** The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J Cell Sci* 112 (Pt 10): 1417-23.
- Szajewski, J. M., and A. Scanu. 1963.** Effect of triton WR-1339 on the heparin-induced plasma lipoprotein lipase activity in dogs. *Acta Med Pol* 4: 15-20.

T

- They, C., L. Duban, E. Segura, P. Veron, O. Lantz, and S. Amigorena. 2002.** Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* 3: 1156-62.
- They, C., M. Boussac, P. Veron, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, J. Garin, and S. Amigorena. 2001.** Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 166: 7309-18.
- Town, M., G. Jean, S. Cherqui, M. Attard, L. Forestier, S. A. Whitmore, D. F. Callen, O. Gribouval, M. Broyer, G. P. Bates, W. van't Hoff, and C. Antignac. 1998.** A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet* 18: 319-24.
- Trouet, A. 1964.** [Immunization of rabbits by hepatic lysosomes from rats treated with Triton WR 1339]. *Arch Int Physiol Biochim* 72: 698-700.

- Tycko, B., and F. R. Maxfield. 1982.** Rapid acidification of endocytic vesicles containing alpha 2-macroglobulin. *Cell* 28: 643-51.
- Tyers, M., and M. Mann. 2003.** From genomics to proteomics. *Nature* 422: 193-7.

U

- Urbanowski, J. L., and R. C. Piper. 2001.** Ubiquitin sorts proteins into the intraluminal degradative compartment of the late-endosome/vacuole. *Traffic* 2: 622-30.

V

- van der Sluijs, P., M. Hull, P. Webster, P. Male, B. Goud, and I. Mellman. 1992.** The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* 70: 729-40.
- van Deurs, B., P. K. Holm, L. Kayser, K. Sandvig, and S. H. Hansen. 1993.** Multivesicular bodies in HEp-2 cells are maturing endosomes. *Eur J Cell Biol* 61: 208-24.
- van Renswoude, J., K. R. Bridges, J. B. Harford, and R. D. Klausner. 1982.** Receptor-mediated endocytosis of transferrin and the uptake of Fe in K562 cells: identification of a nonlysosomal acidic compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 6186-90.
- Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan et al. 2001.** The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-51.
- Verheijen, F. W., E. Verbeek, N. Aula, C. E. Beerens, A. C. Havelaar, M. Joosse, L. Peltonen, P. Aula, H. Galjaard, P. J. van der Spek, and G. M. Mancini. 1999.** A new gene, encoding an anion transporter, is mutated in sialic acid storage diseases. *Nat Genet* 23: 462-5.
- Vida, T., and B. Gerhardt. 1999.** A cell-free assay allows reconstitution of Vps33p-dependent transport to the yeast vacuole/lysosome. *J Cell Biol* 146: 85-98.

Vines, D. J., and M. J. Warburton. 1999. Classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis fibroblasts are deficient in lysosomal tripeptidyl peptidase I. *FEBS Lett* 443: 131-5.

von Figura, K., and A. Hasilik. 1986. Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu Rev Biochem* 55: 167-93.

W

Waterston, R. H., K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J. F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An, S. E. Antonarakis, J. Attwood, R. Baertsch, J. Bailey, K. Barlow, S. Beck, E. Berry, B. Birren, T. Bloom, P. Bork, M. Botcherby, N. Bray, M. R. Brent, D. G. Brown, S. D. Brown, C. Bult, J. Burton, J. Butler, R. D. Campbell, P. Carninci, S. Cawley, F. Chiaromonte, A. T. Chinwalla, D. M. Church, M. Clamp, C. Clee, F. S. Collins, L. L. Cook, R. R. Copley, A. Coulson, O. Couronne, J. Cuff, V. Curwen, T. Cutts, M. Daly, R. David, J. Davies, K. D. Delehaunty, J. Deri, E. T. Dermitzakis, C. Dewey, N. J. Dickens, M. Diekhans, S. Dodge, I. Dubchak, D. M. Dunn, S. R. Eddy, L. Elnitski, R. D. Emes, P. Eswara, E. Eyra, A. Felsenfeld, G. A. Fewell, P. Flicek, K. Foley, W. N. Frankel, L. A. Fulton, R. S. Fulton, T. S. Furey, D. Gage, R. A. Gibbs, G. Glusman, S. Gnerre, N. Goldman, L. Goodstadt, D. Grafham, T. A. Graves, E. D. Green, S. Gregory, R. Guigo, M. Guyer, R. C. Hardison, D. Haussler, Y. Hayashizaki, L. W. Hillier, A. Hinrichs, W. Hlavina, T. Holzer, F. Hsu, A. Hua, T. Hubbard, A. Hunt, I. Jackson, D. B. Jaffe, L. S. Johnson, M. Jones, T. A. Jones, A. Joy, M. Kamal, E. K. Karlsson et al. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520-62.

Wattiaux, R., M. Wibo and P. Baudhuin. 1963. *Ciba Found. Symp.*, "Lysosomes", 176 (de Reuck, A.V.S. et Cameron, M.P., Eds, J. et A. Churchill, Ltd., Londres).

Wattiaux, R. 1966. Etude expérimentale de la surcharge des lysosomes. Thèse de l'Université Catholique de Louvain – Faculté de Médecine, Bruxelles, Belgique.

Wattiaux, R., S. Wattiaux-De Coninck, M. F. Ronveaux-dupal, and F. Dubois. 1978. Isolation of rat liver lysosomes by isopycnic centrifugation in a metrizamide gradient. *J Cell Biol* 78: 349-68.

Wattiaux, R. and S. Wattiaux-De Coninck. 1983. Separation of cell organelles. In "Iodinated density gradient media. A practical approach", Ed D. Rickwood I.R.L. Press Ltd. Oxford 119-137.

Wattiaux, R., M. Jadot, F. Dubois, and S. Wattiaux-De Coninck. 1996. Phagocytosis by rat liver: relationships between phagosomes and lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 220: 569-74.

Weisman, R. A., and E. D. Korn. 1967. Phagocytosis of latex beads by *Acanthamoeba*. I. Biochemical properties. *Biochemistry* 6: 485-97.

Wetzel, M. G., and E. D. Korn. 1969. Phagocytosis of latex beads by *Acanthamoeba castellanii* (Neff). 3. Isolation of the phagocytic vesicles and their membranes. *J Cell Biol* 43: 90-104.

Wibo, M., D. Thines-Sempoux, A. Amar-Costesec, H. Beaufay, and D. Godelaine. 1981. Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver VIII. Subfractionation of preparations enriched with plasma membranes, outer mitochondrial membranes, or Golgi complex membranes. *J Cell Biol* 89: 456-74.

Widmann, J. J., R. S. Cotran, and H. D. Fahimi. 1972. Mononuclear phagocytes (Kupffer cells) and endothelial cells. Identification of two functional cell types in rat liver sinusoids by endogenous peroxidase activity. *J Cell Biol* 52: 159-70.

Y

Yamashiro, D. J., B. Tycko, S. R. Fluss, and F. R. Maxfield. 1984. Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway. *Cell* 37: 789-800.

Yates, J. R., 3rd, A. Gilchrist, K. E. Howell, and J. J. Bergeron. 2005. Proteomics of organelles and large cellular structures. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 702-14.

Young, B., and J.W. Heath. 2000. Wheather's Functional Histology, fourth edition. Churchill Livingstone, Elsevier Science.

Z

Zuber, M. X., S. M. Strittmatter, and M. C. Fishman. 1989. A membrane-targeting signal in the amino terminus of the neuronal protein GAP-43. *Nature* 341: 345-8.