



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution à l'étude du trafic intracellulaire de la cathepsine C humaine

Fondaire, Aurélie

Award date:
2004

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU TRAFIC INTRACELLULAIRE DE LA CATHEPSINE C HUMAINE

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

Aurélie Fondaire
Août 2004

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Chimie Physiologique
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.42.62. - Téléfax: + 32(0)81.72.42.72.
E-mail: michel.jadot@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Contribution à l'étude du trafic intracellulaire de la cathepsine C humaine

FONDAIRE Aurélie

Résumé

L'objectif de ce travail consiste en une première étape vers l'étude du trafic de la cathepsine C humaine. De nombreuses études sur la biosynthèse, la maturation et le trafic de diverses protéases lysosomales ont déjà été réalisées. Il reste cependant intéressant d'étudier la cathepsine C qui présente des particularités propres. Parmi les aspects les plus intéressants de la biosynthèse et du trafic des cathepsines lysosomales, notons le déroutage massif de certains précurseurs dans les milieux extracellulaires de plusieurs lignées tumorales. Les conséquences de ce déroutage ne sont pas connues avec précision. Les expériences de détection de la cathepsine C humaine par western blotting nous ont appris que si la procathepsine C est sécrétée dans les milieux de culture cellulaires testés, elle ne l'est que de façon peu efficace. Cette conclusion est à considérer avec prudence vu la difficulté avec laquelle nos western blotting ont révélé une sécrétion de procathepsine D dans les milieux. Par contre, lorsque l'utilisation d'une base faible (NH_4Cl) conduit à l'hypersécrétion attendue de la cathepsine D dans les cellules HepG2, nous n'observons toujours pas de signal extracellulaire pouvant correspondre à la procathepsine C. Si cette absence de sécrétion de la procathepsine C n'est pas liée à un problème dans la technique de détection, cette observation pourrait suggérer un mécanisme de transport de la procathepsine C particulièrement peu dépendant des récepteurs au mannose 6-phosphate. Nos expériences de marquage métabolique, concernant la sécrétion éventuelle de la procathepsine C, ne nous ont fourni que des résultats peu convaincants et ce pour deux raisons: premièrement, il nous est très difficile de détecter de façon univoque une forme moléculaire pouvant correspondre au précurseur, et deuxièmement, l'unique tentative de détection de la procathepsine C éventuellement libérée dans les milieux suite à l'incubation des cellules en présence de NH_4Cl n'a pas donné de résultats concluants. Nos résultats semblent en tout cas indiquer que le comportement de la procathepsine C ne reproduit pas les observations concernant la cathepsine D rapportées dans la littérature et confirmées par notre travail.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Août 2004

Promoteur: Prof. M. Jadot

Co-promoteur: Dr. F. Mainferme

Remerciements

Parvenue au terme de mon mémoire, je tiens à remercier le Professeur Michel Jadot, promoteur de ce travail, pour m'avoir accueillie dans le laboratoire de Chimie Physiologique et pour avoir guidé mon travail avec patience et gentillesse.

Je remercie également le Docteur Francis Mainferme pour m'avoir formée aux techniques de laboratoire et pour tout le temps qu'il a consacré aux nombreuses corrections de ce travail.

Merci aux membres du jury, les Professeurs et Docteurs Pierre Devos, Isabelle Hamer, Virginie Santilman et Stéphanie Zdanov, pour avoir consacré le temps nécessaire à l'évaluation de mon travail.

Ma reconnaissance va aussi aux membres du laboratoire de Chimie Physiologique et particulièrement à Marie-France Médart-Leruth pour son assistance technique.

Je remercie aussi mes proches qui ont été patients et m'ont soutenue lors de mes longues études; Papa et Maman pour leurs encouragements et la correction orthographique.

Merci enfin à Marielle, Violette, Caroline et Fan-Fan pour tous les moments de convivialité et de bonne humeur, particulièrement à Gez et Virginie pour leur fidèle solidarité.

Table des matières

| | |
|---|----|
| <u>Table des matières</u> | 1 |
| <u>I. Introduction</u> | 2 |
| 1. Le lysosome | 2 |
| 1.1. Généralités | 2 |
| 1.2. Les lysosomes comme compartiment terminal de dégradation..... | 2 |
| 1.3. Autres fonctions des lysosomes..... | 3 |
| 1.4. Sécrétion des lysosomes | 5 |
| 2. Les protéines lysosomales | 5 |
| 2.1. Les protéines lysosomales solubles | 5 |
| 2.1.1. Les cathepsines C et D..... | 6 |
| 2.1.2. Ciblage des enzymes lysosomales solubles..... | 9 |
| 2.1.3. Voie dépendante du Man 6-P | 9 |
| 2.1.4. Biosynthèse et phosphorylation..... | 10 |
| 2.1.5. Rôle des MPRs dans le tri et l'endocytose d'enzymes lysosomales | 11 |
| 2.1.6. Protéines adaptatrices | 12 |
| 2.1.7. Transport des enzymes lysosomales par voie indépendante du mannose 6-phosphate | 13 |
| 2.1.8. Effets des bases faibles sur le tri et la maturation des enzymes lysosomales dans les cellules humaines..... | 14 |
| 2.2. Protéines de la membrane lysosomale..... | 15 |
| 3. Fonctions physiologiques de la cathepsine C | 15 |
| 3.1. Le syndrome de Papillon-Lefèvre | 16 |
| 3.2. Cathepsine C et syndrome de fatigue chronique | 17 |
| 3.3. La cathepsine C de mastocytes et la survie dans la septicémie | 17 |
| <u>II. Matériels et méthodes</u> | 19 |
| 1. Cultures cellulaires | 19 |
| 1.1. Maintien des cultures..... | 19 |
| 1.2. Traitement des cellules en culture avec le chlorure d'ammonium | 19 |
| 2. Homogénats cellulaires | 19 |
| 3. Mesure d'activité spécifique de la cathepsine C | 20 |
| 3.1. L'activité de la cathepsine C | 20 |
| 3.2. Dosage des protéines | 20 |
| 4. Gel d'électrophorèse 15 % | 21 |
| 5. Anticorps primaires utilisés dans ce travail..... | 21 |
| 6. Marquage métabolique et immunoprécipitation..... | 21 |
| 7. Western Blotting..... | 23 |
| 8. Immunofluorescence | 24 |
| <u>III. But du travail</u> | 25 |
| <u>III. Résultats et discussions</u> | 26 |
| 1. Western blotting | 29 |
| 1.1. Détection de la cathepsine C par western blotting en utilisant l'anticorps anti-cathepsine C humaine..... | 29 |
| 1.2. Effet du chlorure d'ammonium sur la sécrétion de la cathepsine C..... | 35 |
| 2. Marquage métabolique et immunoprécipitation..... | 40 |
| 3. Conclusions | 48 |
| <u>IV. Bibliographie</u> | 50 |

Liste des abréviations

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
AP : protéine adaptatrice
ATP : adenosine triphosphate
BSA : "bovine serum albumine", albumine sérique bovine
CD-MPR : récepteur au mannose 6-phosphate dépendant des cations
CFS : syndrome de fatigue chronique
CI-MPR : récepteur au mannose 6-phosphate indépendant des cations
dPBS : PBS contenant 0,005 % de CaCl₂
DPPI : dipeptidyl peptidase I (cathepsine C)
DTT : dithiothréitol
EDTA : éthylènediamine tétraacétate de sodium
FITC : isothiocyanate de fluorescéine
GGA : "Golgi localized, γ adaptin ear homology domain, ARF binding"
HRP : "horseradish peroxidase", peroxydase de raifort
IL-6 : interleukine-6
kDa : kiloDalton
LAMP : "lysosomal associated membrane protein"
Man 6-P : mannose 6-phosphate
ML-II : mucopolysaccharide II
MPRs : récepteurs au mannose 6-phosphate
PBS : phosphate-buffered saline, solution saline tamponnée au phosphate
RER : réticulum endoplasmique rugueux
RNA (ARN) : acide ribonucléique
SDS : dodécylsulfate de sodium
SRP : "signal recognition particle"
TGN : réseau trans Golgien

I. Introduction

1. Le lysosome

1.1. Généralités

Les lysosomes ont été découverts en 1949 par le Professeur Christian de Duve. Le lysosome est une structure cytoplasmique délimitée par une simple membrane et contient dans sa matrice des enzymes hydrolytiques. Les hydrolases acides, présentes dans la matrice des lysosomes, sont actives de façon optimale à pH acide et sont capables de dégrader la plupart des macromolécules biologiques (acides nucléiques, protéines, polysaccharides et lipides) en produits de faible poids moléculaire. D'un point de vue fonctionnel les lysosomes ont été pendant longtemps considérés uniquement comme le compartiment majeur de dégradation intracellulaire dans les cellules eucaryotes (Kornfeld & Mellman, 1989). Notre intérêt se portera principalement sur deux de ces enzymes hydrolytiques qui sont les cathepsines C et D.

La membrane lysosomale permet de concentrer les hydrolases acides (les concentrations de certaines des enzymes protéolytiques dans les lysosomes approchent la gamme du millimolaire) et facilite l'établissement d'un environnement à pH faible nécessaire pour avoir une activité efficace des hydrolases. La membrane rassemble les hydrolases acides et facilite ainsi leurs activités coopératives. De plus elle protège les autres structures cytosoliques des effets négatifs que ces enzymes auraient si elles étaient libérées dans le cytoplasme.

1.2. Les lysosomes comme compartiment terminal de dégradation

Les lysosomes sont caractérisés comme étant des vacuoles denses aux électrons contenant une variété d'hydrolases dont l'activité dépend de l'environnement acide et qui sont responsables de la dégradation de macromolécules internalisées (via l'endocytose) et endogènes (par l'autophagie) (Kornfeld & Mellman, 1989). Cependant, suite aux découvertes récentes, cette définition simple devra être élargie.

Les lysosomes représentent la destination finale pour une fraction significative de tout le trafic intracellulaire. Ils sont la destination finale de beaucoup de matériaux endocytés et autophagiques qui doivent être détruits. La dégradation lysosomale est critique pour beaucoup de processus physiologiques incluant le turn-over de protéines cellulaires normales, la destruction de protéines anormales, la régulation des récepteurs de surface, la libération de nutriments endocytés, l'élimination d'organismes pathogènes et la présentation des antigènes (Mullins & Bonifacino, 2001)

Les macromolécules extracellulaires et des composants de la membrane plasmique sont internalisés par endocytose et peuvent arriver aux lysosomes. Il existe différents types d'endocytoses: la phagocytose pour la capture de particules de grande taille est effectuée essentiellement par des cellules spécialisées (les phagocytes professionnels: neutrophiles, monocytes et macrophages). La membrane plasmique forme des pseudopodes qui entourent le matériel à endocyter. Il y a ensuite formation d'un phagosome, puis transfert du matériel phagocyté vers les lysosomes. Le deuxième type d'endocytose, plus efficace, se fait par l'intermédiaire de récepteurs localisés dans la membrane plasmique. Les complexes se rassemblent dans la membrane plasmique pour faire apparaître des puits recouverts de clathrine. Les complexes sont internalisés par invagination des puits pour former des vésicules tapissées de clathrine (Gruenberg, 2001).

Le matériel internalisé passe séquentiellement par au moins deux sous-populations d'endosomes distinctes correspondant aux endosomes précoces, situés près de la membrane plasmique, et aux endosomes tardifs. Les endosomes sont des vésicules et tubules acides non tapissés, et ils contiennent une concentration variable, mais habituellement faible, d'enzymes hydrolytiques. Le pH acide des endosomes permet la dissociation des complexes ligands-récepteurs. Les molécules destinées à la dégradation passent des endosomes tardifs aux lysosomes, riches en hydrolases, où elles sont dégradées (Kornfeld & Mellman, 1989). D'autres types d'endocytoses indépendantes de la clathrine existent (Nichols & Lippincott-Schwartz, 2001), telles que les cavéoles qui sont de petites invaginations de la membrane plasmique, mais il n'est pas clair que le matériel endocyté de cette façon puisse arriver aux lysosomes. La macropinocytose (formant de larges vésicules d'endocytose) permet le recyclage de la membrane plasmique et la capture non-sélective du fluide extracellulaire.

1.3. Autres fonctions des lysosomes

Une définition fonctionnelle des lysosomes comme la destination finale intracellulaire pour les protéines solubles internalisées par endocytose fournit un critère simple et cohérent pour établir l'identité des lysosomes. Il évite la confusion due à l'hétérogénéité morphologique typique des lysosomes (en raison des variations dans leur contenu de matériel internalisé et/ou partiellement dégradé, ce qui rend difficile leur identification microscopique réalisée uniquement sur base de leur apparence) dans différents types de cellules, ou entre les lysosomes et les endosomes dans une cellule.

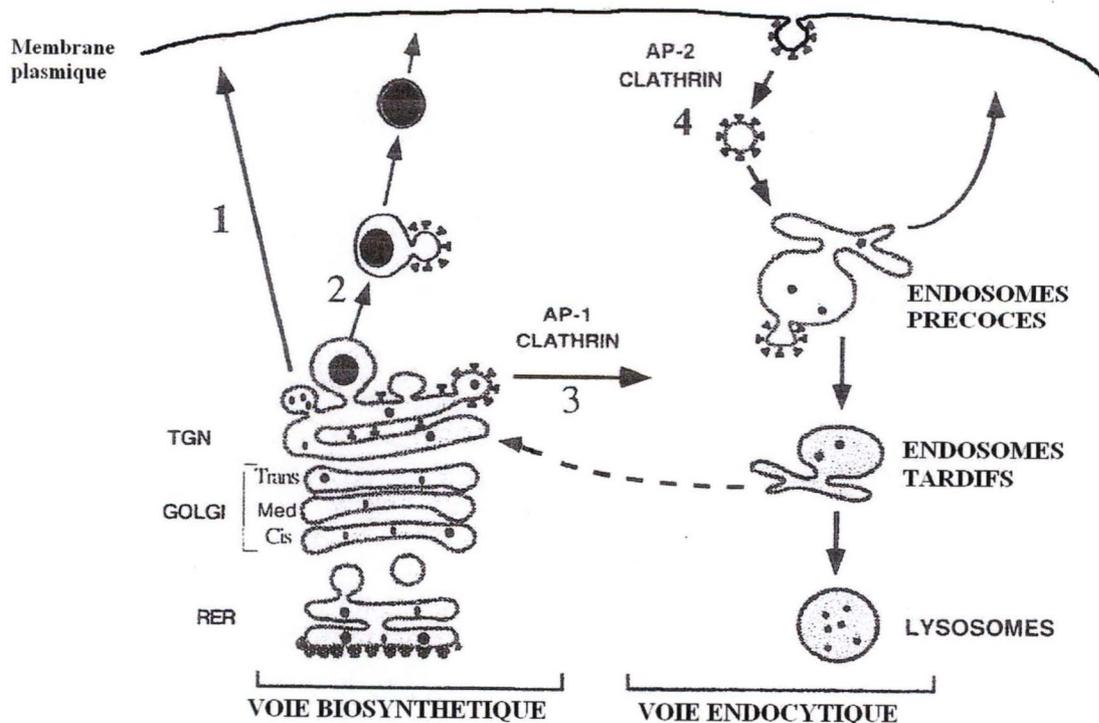


Fig. 1: Tri des protéines dans le réseau transgolgien, la voie endocytaire et la voie biosynthétique (d'après Le Borgne et Hoflack, 1998).

Cependant, les lysosomes servent aussi de compartiment terminal pour le transport intracellulaire d'enzymes lysosomales nouvellement synthétisées (Voir plus loin). Les lysosomes reçoivent l'apport de la voie endocytaire et de la voie biosynthétique (Fig. 1) et partagent un nombre de caractéristiques avec les vésicules impliquées dans leur formation. Comme pendant l'endocytose, la voie de la biosynthèse d'enzymes nécessite le transport à travers de multiples compartiments avant d'atteindre les lysosomes: passage par le Golgi, sortie par l'intermédiaire de vésicules tapissées et livraison après passage par le post-Golgi, à des vacuoles acides qui correspondent probablement aux endosomes. Avant d'atteindre les lysosomes de densité plus lourde, beaucoup d'hydrolases acides subissent un ou plusieurs clivages protéolytiques de leur forme précurseur zymogène (Kornfeld & Mellman, 1989). C'est au niveau des compartiments acides que les précurseurs d'enzymes lysosomales se dissocient des récepteurs spécifiques au mannose 6-phosphate.

Les lysosomes ne sont pas des organelles isolées mais ils sont en relation et échangent du matériel avec d'autres organites cellulaires. Les lysosomes, lors des premières observations au microscope, semblaient se former par bourgeonnement à partir de l'appareil de Golgi (de Duve et Wattiaux, 1966). Ce qui révélait la présence de lysosomes primaires nouvellement synthétisés et de lysosomes secondaires (après fusion avec des endosomes ou des phagosomes) où la dégradation enzymatique aurait eu lieu. Il existe maintenant quatre hypothèses pour expliquer la biogenèse des lysosomes et elles font intervenir les organites des voies d'endocytose et de sécrétion (voir Fig. 2).

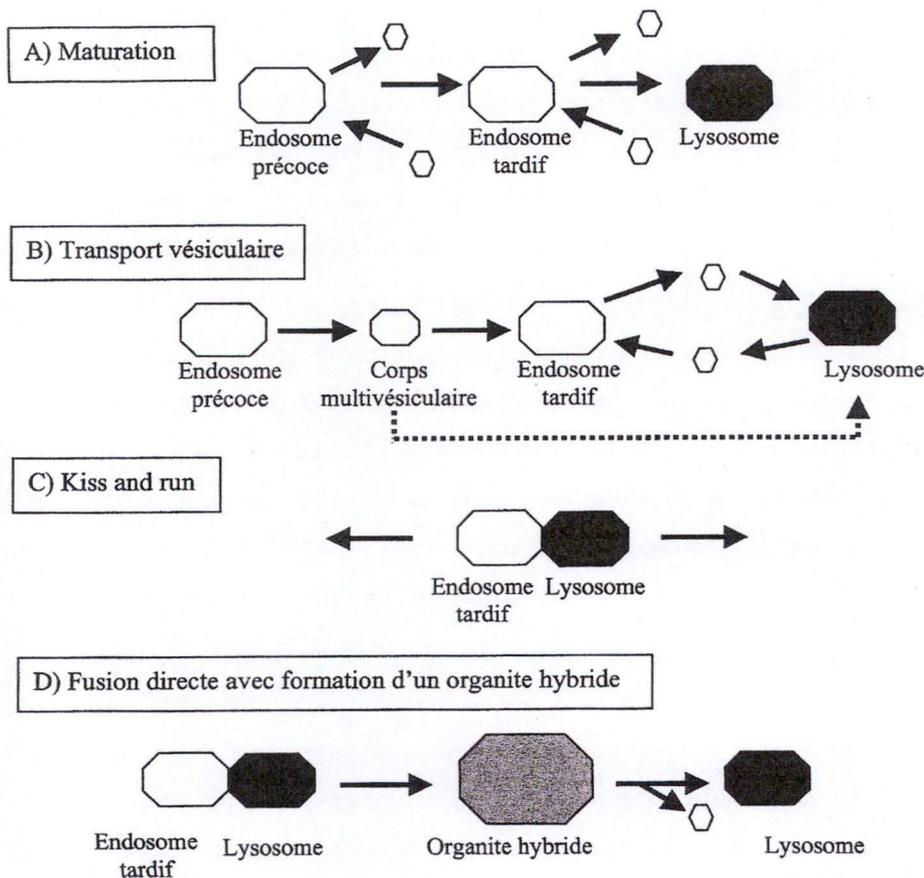


Fig. 2: Hypothèses pour la biogenèse des lysosomes et leurs relations avec les endosomes (Fig. Santilman., V., 2002, d'après (Luzio et al., 2000)).

La première hypothèse est celle de la maturation: des vésicules venant de la membrane plasmique fusionneraient en endosomes précoces. Ensuite l'endosome précoce recevrait des vésicules arrivant du réseau trans-golgien ce qui, par maturation, le ferait devenir endosome tardif puis lysosome. Dans la deuxième hypothèse, il y aurait des transports vésiculaires des endosomes précoces vers les endosomes tardifs puis vers les lysosomes. La troisième hypothèse se nomme «kiss and run»: des fusions et fissions transitoires entre les endosomes et les lysosomes permettraient des échanges de matériel par l'intermédiaire de pores de fusion. La dernière hypothèse implique un contact puis fusion entre endosomes tardifs et lysosomes. Le lysosome servant de 'réservoir à enzymes lysosomales' fusionnerait avec les endosomes pour y déverser son contenu et permettre une hydrolyse qui dans ce modèle serait principalement prélysosomale (Luzio et al., 2000).

1.4. Sécrétion des lysosomes

Les lysosomes sont les organites de dégradation terminaux mais il semble qu'ils possèdent une machinerie moléculaire leur permettant de fusionner sur commande avec la membrane plasmique (Andrews, 2002). Cette propriété a d'abord été mise en évidence pour d'autres organites apparentés aux lysosomes. Ce sont des organites au pH acide qui contiennent des hydrolases et des protéines membranaires lysosomales et ne possèdent pas de MPRs (par exemple les mélanosomes) (Dell'Angelica et al., 2000). Ensuite, il a été montré que les cellules possédant des lysosomes classiques peuvent réaliser l'exocytose de leurs lysosomes en réponse à une augmentation du Ca^{+2} intracellulaire (Rodríguez et al., 1997). Il y a plusieurs hypothèses quant à la fonction physiologique de l'exocytose dépendante du Ca^{+2} . Cette exocytose pourrait être nécessaire pour que la cellule se débarrasse des quantités excessives de matériel non digéré. Ou cette exocytose serait impliquée dans la réparation de la membrane plasmique lorsque celle-ci est endommagée ce qui se traduit par un influx de calcium immédiat (Reddy et al., 2001).

2. Les protéines lysosomales

2.1. Les protéines lysosomales solubles

Une cinquantaine d'hydrolases lysosomales ont été identifiées (von Figura et Hasilik, 1986). La dégradation de macromolécules dans les lysosomes se fait grâce à ces hydrolases acides (voir dans le Tableau 1 les enzymes lysosomales majeures). Ces enzymes sont contenues dans la lumière des lysosomes à l'exception de la β -glucocérébrosidase qui est une protéine ancrée en membrane et le précurseur de la phosphatase acide qui est également membranaire (bien que sa forme mature soit soluble). Ces enzymes catalysent des réactions de type $A-B + H_2O \rightarrow A-H + B-OH$.

Nous nous intéresserons ici principalement à deux de ces hydrolases, les cathepsine C et D qui sont toutes deux des protéases.

| Protéases | Glycosidases | Nucléases | Lipases |
|---|---|---|---|
| Cathepsine D Cathepsine B Cathepsine H Cathepsine L Tripeptidyl peptidase Dipeptidyl peptidase I Dipeptidyl peptidase II Arginyl aminopeptidase (cathepsine H) Peptidyl dipeptidase C (cathepsine B) Carboxypeptidase A Carboxypeptidase B Prolyl carboxypeptidase Tyrosine carboxypeptidase Dipeptidase I Dipeptidase II | Hyaluronidase Heparin endoglucuronidase Heparan sulfate endoglycosidase Lysozymeb α-L-Fucosidase α-Galactosidase β-Galactosidase α-Glucosidase β-Glucosidase α-N-Acetylgalactosaminidase α-N-Acetylglucosaminidase β-N-Acetylglucosaminidase β-Glucuronidase α-L-Iduronidase α-Mannosidase β-Mannosidase Neuraminidase β-Aspartylglucosylaminase Chondroitin 6-sulfatase Heparin sulfamatase Iduronosulfatase Sulfatases A and B | Ribonuclease II Deoxyribonuclease II Exonuclease (5'- terminal) Acid phosphatase | Triacylglycerol lipase Phospholipase A1 Phospholipase A2 Phosphatidate phosphatase Acylsphingosine deacylase Sphingomyelin phosphodiesterase |

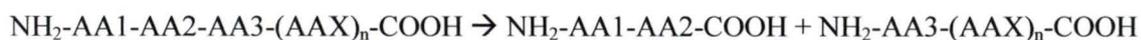
Tableau 1: Enzymes lysosomales majeures de la voie métabolique groupées selon les principales classes de substrats naturels sur lesquels elles agissent.

2.1.1. Les cathepsines C et D

Nous allons maintenant décrire les deux protéases lysosomales solubles auxquelles nous avons consacré notre travail, les cathepsines C et D.

1. La cathepsine C

La cathepsine C fait partie des protéases, une catégorie d'hydrolases solubles, et plus précisément des protéases à cystéine (Chapman et al., 1997). Les protéases lysosomales à cystéine requièrent un environnement réducteur et légèrement acide pour avoir une activité optimale. Les protéases à cystéine, exception faite de la cathepsine C, sont des endopeptidases. La cathepsine C est une dipeptidyl aminopeptidase, c'est-à-dire une exopeptidase qui catalyse l'excision de dipeptides de l'extrémité amino-terminale de protéines substrats (Mc Donald et al., 1969) selon la réaction suivante:



La cathepsine C est importante dans la dégradation intracellulaire de protéines et semble être un coordinateur central pour l'activation de beaucoup de protéases à sérine dans les cellules immunes et inflammatoires (voir plus loin).

Toutes les protéases lysosomales des mammifères sont connues sous le vocable de cathepsines. Le terme cathepsine désignait auparavant une protéase, qui n'était pas apparentée à la pepsine, active à pH acide. Ce terme a évolué pour décrire ensuite toutes les protéases acides intracellulaires. Il y a 4 classes de protéases: les protéases à acide aspartique (dont fait partie la cathepsine D, voir plus loin), les métalloprotéases, les protéases à sérine et les protéases à cystéine (McGrath, 1999).

La cathepsine C fait partie du groupe des protéases à cystéine de la famille de la papaïne. Les protéases à cystéine de la famille des papaïnes partagent des similarités de séquence aussi bien que de structure tridimensionnelle. Les données structurales sont un argument pour affirmer qu'elles résultent d'un ancêtre commun. Ces enzymes sont exprimées dans une grande variété de cellules (à l'exception des cathepsines S et K) et l'opinion générale voulait que leur fonction principale était de dégrader les protéines non sélectivement à l'intérieur du lysosome bien que sous des conditions spéciales, le plus souvent résultant de conditions pathologiques, elles peuvent aussi être trouvées à l'extérieur des lysosomes. Il est devenu évident que ces enzymes peuvent être impliquées dans une gamme de tâches cellulaires spécifiques beaucoup plus large qu'en tant que simples enzymes de 'ménage'. D'ailleurs, certaines d'entre elles ont présenté des distributions restreintes à des tissus spécifiques et sont probablement impliquées dans des processus cellulaires plus spécialisés (Turk, B. et al.2000).

Les protéases à cystéine sont largement distribuées à travers les organismes vivants. (Turk,B. et al.2000). Les protéases à cystéine de la famille des papaïnes sont les plus abondantes parmi les protéases à cystéine. La famille comprend la papaïne, d'autres protéases végétales, et les cathepsines lysosomales B, H, L, S, C et K (Turk,B. et al 1997). Les cathepsines B, H, C, et L sont ubiquitaires dans les lysosomes d'animaux. Tandis que la cathepsine S et K ont une localisation plus réduite (Turk,B. et al., 1997), l'expression de la cathepsine K est élevée dans les ostéoclastes et la cathepsine S est principalement exprimée au niveau de la rate, dans les cellules présentatrices d'antigène incluant les lymphocytes B, les macrophages et les cellules dendritiques (Chapman et al., 1997).

La plupart des protéases à cystéine lysosomales de la famille des papaïnes sont relativement de petites protéines monomériques avec un poids moléculaire compris entre 20 et 35 kDa et avec une activité endopeptidase, la cathepsine C faisant encore exception puisque c'est une enzyme oligomérique (tétramérique) ayant un poids moléculaire de 200 kDa (Mc Donald et al., 1969; Turk,B. et al.2000).

Toutes ces enzymes sont actives de façon optimale à pH légèrement acide (bien que leur pH optimal pour la dégradation de substrats synthétiques varie de 5,5 pour la cathepsine L à 6,8 pour la cathepsine H).

L'organisation du gène de la cathepsine C humaine est distincte de la structure complexe des gènes des autres enzymes appartenant au groupe des papaïnes. Le gène de la cathepsine C humaine, une simple copie qui couvre approximativement 3,5 kilobases, comprend deux exons divisés par un seul intron, et est exprimé comme un simple transcrit. Le gène de la cathepsine C (CTSC) est localisé dans la région chromosomique 11q14.1-q14.3 (Rao, N.V. et al, 1996).

L'homologie de séquence en acides aminés de la cathepsine C est relativement faible par rapport aux autres membres de ce groupe de protéases. (Selvaraju et al. 2003).

La structure de la cathepsine C a été étudiée chez de nombreuses espèces et elle semble être bien conservée. La cathepsine C est synthétisée sous forme d'un précurseur de 462 acides aminés composé d'un peptide signal de 24 acides aminés du côté N-terminal. Vient ensuite un très long propeptide de 205 acides aminés, d'une partie mature composée d'une chaîne α ou chaîne lourde de 164 acides aminés et d'une chaîne β ou chaîne légère de 69 acides aminés. Le précurseur de la cathepsine C possède un très long propeptide par rapport à celui des autres enzymes de la même famille.

La similarité de séquence du propeptide avec les autres enzymes de sa famille est très faible alors que les chaînes α et β possèdent 30 à 40% de similarité. Le précurseur de 51 kDa est clivé à plusieurs endroits lors de la maturation protéolytique (voir Fig. 3). Les clivages permettent la libération de la chaîne β de 8 kDa et de la chaîne α de 21 kDa. Il y a plusieurs sites de clivage dans le propeptide qui permettent l'apparition de fragments de taille assez importante du propeptide, environ 18-19 kDa, qui restent associés au deux autres chaînes (Mainferme et al., 1985; Munoz et al., 1993; Cigic & Pain, 1999; Santilman, V., 2002).

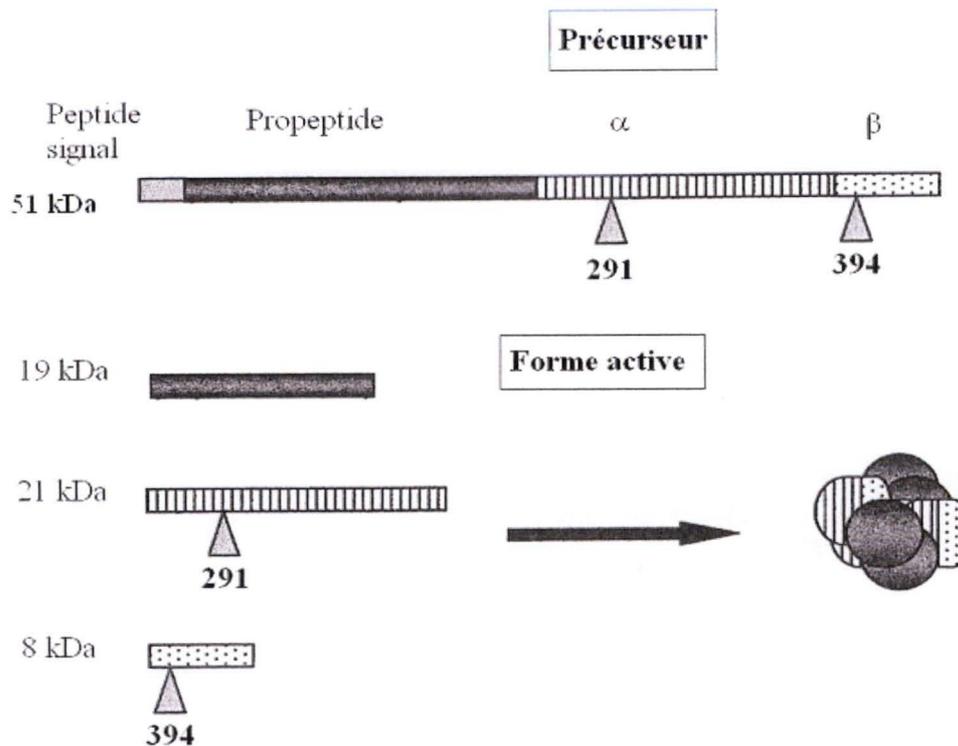


Fig. 3: Représentation schématique de la structure de la cathepsine C (d'après Santilman, V., 2002).

La cathepsine C est un tétramère. Comme on vient de le dire, chaque monomère de la cathepsine C est composé d'une chaîne α , d'une chaîne β et d'un propeptide résiduel. Ce propeptide résiduel semble avoir plusieurs rôles dont une fonction de chaperonne intramoléculaire en stabilisant et repliant l'enzyme, et est indispensable pour le maintien de l'activité enzymatique de la cathepsine C (Cigic et al., 2000).

De plus ce propeptide fournit 3 des 4 chaînes oligosaccharidiques de la procathepsine C, la quatrième se trouvant sur la chaîne α . Ces trois chaînes portées par le propeptide sont les seules à permettre à la cathepsine C d'être transportée vers les lysosomes par la voie dépendante du Man 6-P, de subir la maturation protéolytique et d'acquieser son activité enzymatique (Isidoroh et al., 1991; Santilman et al., 2002). La quatrième chaîne oligosaccharidique n'acquiesce pas le signal Man 6-P. La phosphotransférase reconnaît des déterminants protéiques à la surface des enzymes lysosomales et il semble que les chaînes les plus éloignées de ces déterminants protéiques ne soient pas utilisées (Warner et al.,

2002). De plus, cette quatrième chaîne oligosaccharidique acquiert probablement une structure de type complexe (Santilman, V., 2002).

L'activité enzymatique de la cathepsine C est influencée par ses chaînes oligosaccharidiques car leur présence ou leur absence modifierait la flexibilité de l'extrémité N terminale du propeptide qui stabilise le substrat dans la poche du site actif (Olsen et al, 2001). Seule la forme tétramérique de la cathepsine C est active (Horn et al., 2002). Une seule chaîne oligosaccharidique dans le propeptide suffit pour permettre la formation du tétramère (Santilman et al., 2002).

2. La cathepsine D

La cathepsine D fait également partie des protéases lysosomales solubles (Barrett, 1977). Elle fait partie de la classe des protéases à acide aspartique. La cathepsine D a été très étudiée, c'est la cathepsine pour laquelle nous possédons le plus d'informations. Elle est synthétisée dans le réticulum endoplasmique sous la forme d'un précurseur de 52 kDa. L'enzyme est ensuite transportée aux lysosomes et subit un processus de maturation protéolytique produisant d'abord une forme intermédiaire de 48 kDa. Cette forme est ensuite clivée pour engendrer la forme mature lysosomale de 31 kDa. Une proportion de la cathepsine D synthétisée peut prendre le chemin de la sécrétion. Cette proportion dépend du type cellulaire (Gieselmann et al., 1983; Rijnboutt et al., 1992).

Le précurseur de la cathepsine D possède deux chaînes saccharidiques contenant des résidus mannose qui peuvent acquérir le signal Man 6-P. La cathepsine D peut donc atteindre les lysosomes via la voie dépendante du Man 6-P (Kornfeld & Mellman, 1989). Mais la cathepsine D pourrait aussi emprunter une voie indépendante du Man 6-P (Diment et al., 1988; Rijnboutt et al., 1991).

2.1.2. Ciblage des enzymes lysosomales solubles

Les cathepsines lysosomales sont synthétisées sous la forme de préproenzymes. A hauteur du réticulum endoplasmique, la séquence signal est clivée et les procathepsines subissent une maturation protéolytique et oligosaccharidique. Les oligosaccharides acquièrent le signal Man 6-P et ils peuvent donc être reconnus par les récepteurs spécifiques au Man 6-P (voir plus loin). Les cathepsines lysosomales se dirigent ainsi vers les lysosomes en passant par les endosomes. Là dans l'environnement acide des endosomes tardifs ou des lysosomes, elles sont libérées sous leur forme mature et active.

La protéolyse limitée est une étape cruciale puisqu'elle contrôle l'activité protéolytique des cathepsines et de nombreuses autres protéases. Le propeptide peut être clivé à plusieurs sites pendant l'activation, éliminant ou diminuant de ce fait sa fonction inhibitrice, comme observé pour les cathepsines L, K et C, bien que le dernier soit une exception puisqu'une grande partie de la proregion reste liée à la partie catalytique également dans l'enzyme mature. Le propeptide est nécessaire pour le transport, la stabilité des enzymes et permet à celles-ci d'adopter leurs conformations tridimensionnelles (Cigic et al., 2000).

2.1.3. Voie dépendante du Man 6-P

Dans beaucoup de cellules de mammifères, le transport aux lysosomes des précurseurs d'enzymes lysosomales nouvellement synthétisées dépend de leur identification spécifique par des récepteurs pour le mannose 6-phosphate (MPRs). Les précurseurs de la plupart des enzymes lysosomales solubles possèdent un signal de reconnaissance qui est le Man 6-P. Ce processus peut être scindé en trois étapes: d'abord, la modification sélective des hydrolases lysosomales par des enzymes qui synthétisent le marqueur de reconnaissance

phosphomannosyl; en second lieu, l'identification de ce marqueur par des récepteurs pour le Man 6-P; et troisièmement, le transport sélectif d'enzymes liées aux lysosomes via les récepteurs au Man 6-P (Kornfeld et Mellman, 1989).

2.1.4. Biosynthèse et phosphorylation

Les étapes initiales dans la biosynthèse des enzymes lysosomales solubles sont identiques à celles des protéines sécrétées. Les enzymes lysosomales solubles sont synthétisées sur des polysomes associés au réticulum endoplasmique rugueux (RER). La synthèse commence par un peptide signal de 15 à 20 acides aminés hydrophobes. Ce signal est reconnu par la SRP (signal recognition particle) quand il émerge du ribosome. Ce complexe ainsi formé interagit avec un récepteur de la membrane du RER, ce qui permet la translocation de la protéine en formation dans la lumière du RER. La formation de l'enzyme continue alors dans la lumière du RER. La séquence signal est ensuite clivée et des oligosaccharides N-liés sont ajoutés à la protéine de manière cotraductionnelle dans la citerne du RER (voir Fig. 4). Cela se fait aux sites de glycosylation qui comprennent une asparagine dans une séquence consensus: Asn-X-Ser/Thr. L'oligosaccharide préformé (trois résidus glucoses, neuf résidus mannoses et deux résidus N-acetylglucosamine) est fourni par un intermédiaire lipidique, le dolichol phosphate, inséré dans la membrane du RER. Les oligosaccharides ainsi transférés sur les protéines aident à leur repliement. Après leur transfert, les arbres oligosaccharidiques subissent des modifications. Et cela jusque dans l'appareil de Golgi. Différents types d'oligosaccharides N-liés peuvent être obtenus suivant les modifications subies.

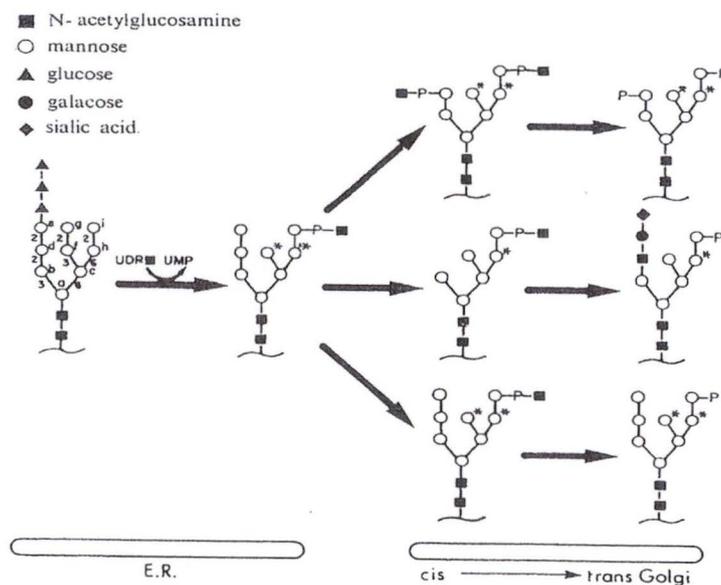


Fig. 4: Transformation des oligosaccharides N-liés (d'après Kornfeld & Mellman, 1989).

La première réaction propre à la synthèse des enzymes lysosomales est l'acquisition du signal de reconnaissance Man 6-P et semble se produire peu de temps après l'exportation du RER (soit dans l'appareil de Golgi et le réseau trans-golgien). Les résidus phosphomannosyl sont générés au moyen de l'action concertée de deux enzymes distinctes. D'abord, une transférase (UDP-N-acetylglucosamine: enzyme lysosomale N-acetylglucosamine-1-phosphotransférase) possédant un site catalytique qui peut effectuer le transfert d'un N-acetylglucosamine-1-phosphate du UDP-GlcNAc à un ou plusieurs résidus mannose sur les enzymes lysosomales

pour mener à un intermédiaire phosphodiester (Bao et al., 1996). L'enzyme de démasquage, la N-acetylglucosamine-1-phosphodiester-N-acetylglucosaminidase, intervient ensuite pour enlever le résidu N-acetylglucosamine et ainsi générer le phosphomonoester actif (Kornfeld et Mellman, 1989). Cette enzyme est présente dans le réseau trans-golgien et c'est là que le signal Man 6-P est formé et qu'il est reconnu par les récepteurs spécifiques.

2.1.5. Rôle des MPRs dans le tri et l'endocytose d'enzymes lysosomales

Le signal Man 6-P est reconnu dans le réseau trans-golgien par deux récepteurs différents : le CI-MPR (récepteur Man 6-P cation indépendant) et le CD-MPR (récepteur Man 6-P cation-dépendant). Ces deux récepteurs sont des glycoprotéines membranaires de type I (Fig. 5).

Le CD-MPR et le CI-MPR ont respectivement un poids moléculaire de 46 kDa et de 300 kDa. Le CD-MPR possède un domaine extracytoplasmique fortement glycosylé de 156 acides aminés contenant certains résidus palmitoylés, une région transmembranaire de 25 acides aminés et un domaine cytoplasmique de 67 acides aminés. Il existe sous forme de dimère avec un seul site de liaison au Man 6-P par polypeptide (Dahms et Kornfeld, 1989; Dahms et Hancock, 2002).

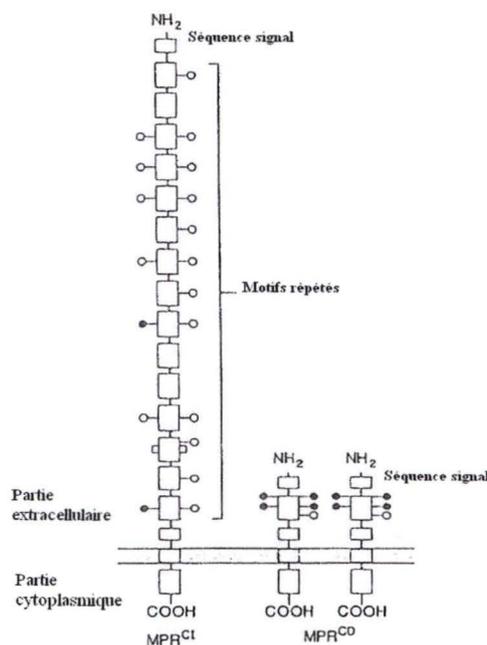


Fig. 5: Représentation schématique des MPRs (d'après Dahms et al., 1989).

Le CI-MPR est composé d'un domaine extracytoplasmique long de 2269 acides aminés qui est constitué par la répétition de 15 motifs de 145 acides aminés et comportant de nombreux sites potentiels de N-glycosylation, d'une région transmembranaire de 23 acides aminés et d'un domaine cytoplasmique de 163 acides aminés. Ce domaine extracytoplasmique contient deux sites de liaison au Man 6-P (Kornfeld, 1992). Le CI-MPR peut exister sous forme monomérique, mais aussi sous forme dimérique stabilisée par la liaison de ligands multivalents (Byrd et al., 2000).

Les rôles respectifs des CI-MPR et CD-MPR dans le tri des enzymes lysosomales nouvellement synthétisées et dans l'endocytose d'enzymes extracellulaires ont été définis. Les cellules déficientes en CI-MPR ciblent encore 30 à 40 % de leurs enzymes nouvellement synthétisées aux lysosomes (Gabel et al., 1983). Quand des anticorps qui bloquent la liaison du ligand au CD-MPR sont ajoutés à de telles cellules, la sécrétion des hydrolases acides est augmentée. Cela est compatible à un rôle du CD-MPR dans le tri d'enzymes lysosomales (Stein et al., 1987). De plus, quand des anticorps anti-CI-MPR sont ajoutés, les cellules qui expriment les deux MPRs n'hypersécrètent pas les enzymes lysosomales. D'autre part, l'addition d'anticorps anti-CI-MPR induit la sécrétion lysosomale d'enzymes, même en présence de CD-MPR fonctionnel (Stein et al., 1987; Nolan et al., 1987; Braulke et al., 1989). Ces données indiquent que les deux récepteurs participent au triage des enzymes lysosomales, et que le CI-MPR est le récepteur dominant dans ce processus car il peut compenser la perte du CD-MPR. La transfection de lignées cellulaires déficientes en CI-MPR avec l'ADNc codant pour le CI-MPR résulte en l'expression du récepteur et en la correction complète ou presque complète du défaut d'hypersécrétion. Quand le même type de cellules est transfecté avec de l'ADNc de CD-MPR, l'hypersécrétion des enzymes lysosomales est seulement partiellement corrigée, ce qui renforce la conclusion que le CD-MPR est moins efficace que le CI-MPR dans le tri d'enzymes lysosomales (Kyle et al., 1989).

Ces observations ont été confirmées par des études *in vivo* sur des souris knock-out (Sohar et al., 1998). Le taux de protéines sécrétées porteuses du Man 6-P est plus élevé chez les souris déficientes en MPRs que chez les souris normales. De plus, les souris déficientes en CD-MPR ou en CI-MPR n'ont pas le même profil de protéines sécrétées. Donc, les deux MPRs auraient bien des fonctions distinctes pour le transport des enzymes lysosomales même si la perte du CI-MPR perturbe plus la fonction lysosomale. Les enzymes lysosomales peuvent avoir une affinité différente pour chaque récepteur (Dittmer et al., 1997; Sleat & Lobel, 1997).

Bien plus de différences frappantes entre les deux récepteurs ont été identifiées quand ils ont été examinés pour leur capacité d'internaliser les enzymes lysosomales extracellulaires. Ces études révèlent que seul le CI-MPR est efficace dans l'endocytose négociée par des récepteurs, et le CD-MPR est presque entièrement inefficace. L'incapacité du CD-MPR à la fonction d'endocytose reflète sa pauvre liaison de ligand à la surface cellulaire plutôt que son manque de recyclage à la membrane plasmique (Stein et al., 1987).

2.1.6. Protéines adaptatrices

Les enzymes qui sont liées aux MPRs vont sortir du réseau transgolgien dans les vésicules recouvertes de clathrine (Fig. 6). Les MPRs sont liés à la clathrine via des protéines adaptatrices. On pensait auparavant que l'assemblage de la clathrine sur les vésicules se faisait grâce à l'interaction d'AP-1 (qui est un complexe de protéines adaptatrices) avec les parties cytoplasmiques des MPRs (Dell'Angelica & Payne, 2001). Il est possible qu'AP-1 joue un rôle, mais plusieurs études récentes ont montré que ce serait plutôt des membres de la famille des protéines GGA's (Golgi-localized, γ adaptin ear-containing, ARF-binding) qui feraient la liaison entre les MPRs et la clathrine (voir revue Bonifacino, 2004). Sur les MPRs le signal cible fait partie d'un groupe d'acides aminés principalement acides suivis d'un motif di-leucine situé près de l'extrémité C-terminale de la partie cytoplasmique des MPRs (Chen et al., 1997; Johnson & Kornfeld, 1992). Ce signal est reconnu par un domaine VHS amino-terminal des membres de la famille des GGAs (Puertollano et al., 2001).

Lorsque les MPRs arriveront aux endosomes, le lien entre les MPRs et les enzymes lysosomales sera rompu et les récepteurs pourront être recyclés vers le réseau transgolgien. C'est le même motif di-leucine situé dans la partie cytoplasmique des MPRs qui fonctionne pour son recyclage (Tikkanen et al., 2000). Deux autres protéines, PACS1 (phosphofurin acidic cluster sorting protein 1) et TIP47 (tail interacting protein of 47 kDa) sont requises pour le recyclage vers le réseau transgolgien (Dahms & Hancock, 2002; Diaz & Pfeffer, 1998).

Les MPRs peuvent également être transportés des endosomes vers la membrane plasmique pour être exprimés en surface (Breuer et al., 1997). Au pH extracellulaire, le CI-MPR peut lier des enzymes qui portent le signal Man 6-P. Ce qui permet la recapture par endocytose d'enzymes lysosomales qui n'ont pas été correctement dirigées (Hille-Rehfeld, 1995). Par contre le CD-MPR au pH extracellulaire ne peut pas lier les enzymes porteuses du signal Man 6-P. Mais d'après des études de surexpression de CD-MPR dans divers types cellulaires, le trafic du CD-MPR vers la membrane plasmique pourrait constituer un mécanisme de sécrétion régulée de ligands porteurs du Man 6-P dans le milieu extracellulaire (Chao et al., 1990).

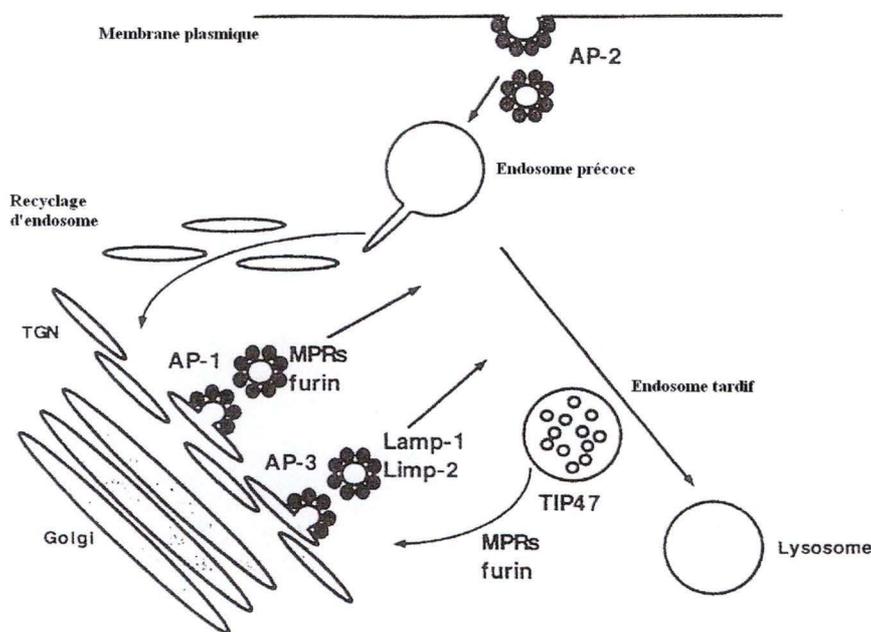


Fig. 6: Les MPRs et les hydrolases lysosomales acides qui y sont liées sont ciblés au système endosomal/lysosomal via la voie dépendante d'AP1. Arrivées aux endosomes, les hydrolases acides se dirigent vers les lysosomes et les MPRs sont recyclés vers le réseau trans-golgien (d'après Rouillé et al., 2000).

2.1.7. Transport des enzymes lysosomales par voie indépendante du mannose 6-phosphate

Tandis que les MPRs jouent un rôle majeur dans le transport intracellulaire d'enzymes lysosomales nouvellement synthétisées, plusieurs données expérimentales suggèrent qu'il peut aussi y avoir des mécanismes additionnels ou alternatifs pour le ciblage d'enzymes vers les lysosomes.

Les fibroblastes ML-II (fibroblastes des patients atteints de mucopolysaccharidose II, maladie caractérisée par une accumulation de mucopolysaccharides et de glycolipides) montrent une déficience en hydrolases acides au niveau des lysosomes. Ces hydrolases sont par contre détectées en quantité accrue dans le sérum des patients et dans les milieux de culture de cellules isolées à partir de leurs tissus. L'absence du marqueur Man 6-P chez les patients atteints de ML-II est due à une déficience en phosphotransférase. Cependant dans les fibroblastes ML-II, par exemple, toutes les enzymes lysosomales ne sont pas sécrétées de manière aberrante. Plusieurs types cellulaires dont les hépatocytes, certains leucocytes, et d'autres types cellulaires chez les patients atteints de ML-II ne manifestent pas un désordre de stockage et ont les niveaux normaux d'enzymes lysosomales. Ils maintiennent donc des taux normaux d'enzymes lysosomales malgré leur déficience en phosphotransférase. Les enzymes lysosomales exprimées par ces types cellulaires sont identiques à celles exprimées dans les cellules qui sont affectées par le défaut de ML-II.

Ces observations suggèrent que certains types cellulaires disposent d'un (ou de) mécanisme(s) alternatif(s) pour cibler leurs enzymes lysosomales, ou pour accumuler les enzymes exogènes, la base pour le transport lysosomal d'enzymes dans ces cellules est inconnue.

D'autre part, le transport des enzymes lysosomales par une voie alternative à celle du Man 6-P pourrait faire intervenir une association membranaire transitoire indépendante du Man 6-P. Cette association a été mise en évidence pour la cathepsine D dans les endosomes des macrophages de rat (Diment et al., 1988), dans les cellules HepG2 (Rijnbouts et al., 1991) et dans les cellules mammaires cancéreuses (Capony et al., 1994) mais également pour la cathepsine C dans les cellules de l'hépatome de rat 7777 de Morris (Burge et al., 1991).

2.1.8. Effets des bases faibles sur le tri et la maturation des enzymes lysosomales dans les cellules humaines.

Les bases faibles, telles que par exemple le NH_4Cl ou la chloroquine, exercent des effets sur le tri, le transport et la maturation des hydrolases lysosomales et en particulier de la cathepsine D dans plusieurs lignées de cellules humaines (fibroblastes, cellules HepG2, U937, monocytes). Ces drogues empêchent la ségrégation de la cathepsine D nouvellement synthétisée le long de la voie de sécrétion. La cinétique de transport du précurseur de la cathepsine D est retardée, et cela s'accompagne de son hypersécrétion. Des concentrations plus élevées des drogues peuvent arrêter complètement le transport intracellulaire. L'ampleur de l'inhibition de la ségrégation change parmi les différents types de cellules humaines étudiées. Ainsi, dans les fibroblastes la sécrétion peut être stimulée pour excéder 80 %, alors que dans les cellules U937 la sécrétion ne peut pas être augmentée au-dessus de 50 % bien que les deux types de cellules aient le même taux basique de sécrétion (approximativement 10 % de la cathepsine D synthétisée). Des mécanismes de tri pH-indépendants contribuent au ciblage de la cathepsine D dans les cellules U937. La maturation de la cathepsine D restante en cellules est caractéristiquement changée selon la drogue utilisée (Isidoro et al., 1997).

Les enzymes lysosomales, liées aux récepteurs MPRs, sont transportées aux lysosomes (comme il est décrit plus haut). Arrivées dans un organite endolysosomal suffisamment acide, le récepteur est séparé de son ligand. Mais en présence de bases faibles, l'augmentation du pH des organites acides empêche la séparation du récepteur Man 6-P de l'enzyme lysosomale. Le transport des enzymes lysosomales est donc perturbé. Les MPRs saturés ne peuvent qu'entraîner les enzymes lysosomales vers l'extérieur de la cellule (voir plus haut). La sécrétion des précurseurs est donc stimulée et l'endocytose médiée par récepteur est inhibée (Brulke, 1987).

Les manipulations expérimentales, telles que le traitement de cellules avec des bases faibles lysosomotropes (par exemple NH_4Cl ou chloroquine), mènent donc à la sécrétion de précurseurs d'enzymes nouvellement synthétisés partant du Golgi. Ces précurseurs déroutés ne subissent donc pas la maturation, ce qui entraîne une diminution de production de nouvelles formes matures. Cependant l'incubation des cellules avec ces drogues n'a que peu ou pas d'effet sur la rétention de ces formes matures précédemment synthétisées et résidant dans les lysosomes. Ainsi ni les enzymes lysosomales ni le contenu lysosomal non digéré ne sont libérés de la plupart des cellules, ce qui démontre la nature en grande partie unidirectionnelle du transport des macromolécules solubles à ce compartiment. Dans certaines conditions cependant, quelques cellules libèrent le contenu lysosomal extracellulairement (voir plus haut).

2.2. Protéines de la membrane lysosomale

L'identification des lysosomes est facilitée par la présence de caractéristiques principales comprenant les protéines intégrales de la membrane lysosomale qui sont fortement glycosylées appelées lamps (lysosome-associated membrane proteins), limps, ou lgps (Kundra & Kornfeld, 1999). A noter toutefois que selon le type cellulaire, une fraction plus ou moins importante de la population de ces protéines lysosomales réside dans les endosomes. En plus, les lysosomes sont typiquement dépourvus de récepteurs mannose 6-phosphate (MPRs) cation-dépendants (CD) et cation-indépendants (CI), ce qui les distingue du compartiment endosomal tardif. Ces caractéristiques du lysosome sont partagées avec une famille d'organelles, les 'lysosome-related organelles', qui exécutent des fonctions spécifiques des cellules indépendantes de la dégradation. Cette famille inclut les granules lytiques, les corps denses de plaquettes, les mélanosomes, et les granules de pigments d'insecte. Sur base des similarités entre les lysosomes et les 'lysosomes-related organelles', ils pourraient partager des origines communes dans la cellule (Mullins et Bonifacino, 2001).

Une autre protéine membranaire d'importance présente dans la membrane plasmique est l'**H⁺/ATPase**, transporteur membranaire qui permet de garder le pH acide à l'intérieur du lysosome. Le transport d'H⁺ dans la lumière du lysosome se fait aux dépens du clivage de molécules d'ATP.

La phosphatase acide lysosomale constitue un cas particulier. En effet, sous sa forme précurseur, elle est transportée aux lysosomes via la surface cellulaire comme une protéine transmembranaire (Braun et al., 1989). Son transport, une fois sortie du réseau trans-golgien, implique un va-et-vient entre la membrane plasmique et les endosomes, pour finalement atteindre les lysosomes et être détachée de la membrane par une protéolyse.

3. Fonctions physiologiques de la cathepsine C

La cathepsine C est fortement exprimée dans différents tissus tels que les cellules du système immunitaire (leucocytes, polymorphonucléaires, macrophages alvéolaires et leurs précurseurs), dans les poumons, les reins et autres tissus épithéliaux. Ses fonctions principales seraient la dégradation lysosomale non sélective de protéines mais, comme d'autres protéases, elle possède aussi un rôle d'activateur de processus immunologiques. (Selvaraju et al. 2003). De nouvelles fonctions ont été découvertes entraînant un regain d'intérêt pour cette protéine.

La cathepsine C clive et active diverses protéines dont certaines peuvent être lysosomales (par exemple la neuraminidase, le facteur plaquettaire XIII et la fibronectine). La cathepsine C active des protéases à sérine impliquées dans le processus immunitaire. L'activité de la cathepsine C est particulièrement élevée dans les lymphocytes T cytotoxiques et dans les cellules myéloïdes. La cathepsine C est localisée, dans ces cellules, dans des granules de sécrétion qui contiennent également d'autres protéases à sérine (granzymes A, B, K, élastase, chymase et cathepsine G). Ces protéases sont inactives tant qu'elles possèdent un propeptide de 2 acides aminés. La cathepsine C capable d'enlever des dipeptides serait logiquement impliquée dans l'activation de ces enzymes. L'utilisation d'un inhibiteur de cathepsine C a permis de confirmer cette hypothèse car il diminue l'activité du granzyme A, de l'élastase et de la cathepsine G (McGuire et al., 1993). Par la suite, d'autres études ont montré que la cathepsine C est le principal activateur des protéases à sérine des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules myéloïdes.

3.1. Le syndrome de Papillon-Lefèvre

Le syndrome de Papillon-Lefèvre (PLS) est une maladie autosomique récessive rare de kératinisation dont la prévalence est de 1 pour 4 millions. La maladie est caractérisée par une périodontite grave et précoce et par une hyperkératose palmoplantaire (hyperkératose des paumes, des plantes des pieds et parfois des genoux, des coudes et des articulations). Le syndrome se manifeste à l'âge de deux ou trois ans et mène à la perte prématurée de la dentition (aussi bien les dents de lait que les dents permanentes). Les patients sont habituellement édentés dans les premières années de l'adolescence (vers l'âge de 15 ans). Les deux sexes sont également affectés et il n'y a aucune prédominance ethnique. Le syndrome de Papillon-Lefèvre se manifeste chez les homozygotes avec une fréquence accrue chez les individus consanguins. Le mécanisme pathologique exact de ces événements cliniques reste spéculatif.

Les mutations dans le gène de la cathepsine C ont également comme conséquences le syndrome de Haim-Munk (HMS) et la périodontite prépubertaire qui sont deux variantes alléliques du syndrome de Papillon-Lefèvre. La manifestation clinique commune de ces syndromes est une périodontite grave précoce.

Il a été suggéré que la cathepsine C est impliquée dans une grande variété de réponses immunes et inflammatoires qui incluent l'activation de cellules phagocytaires et lymphocytes T, menant à l'élimination finale des pathogènes. Par conséquent, l'inactivation de la cathepsine C, due aux mutations, peut résulter dans le blocage de ces réponses menant à l'infection des gencives et des tissus environnants par des microbes pathogènes, menant finalement à la perte des dents. Environ 20% des patients montrent une susceptibilité accrue aux infections dues à des dysfonctionnements des lymphocytes et des leucocytes. La cathepsine C pourrait aussi influencer la progression de la maladie périodontique par son rôle dans la différenciation ou la desquamation épithéliale. Puisque l'épithélium représente la première ligne de défense contre des microbes pathogènes, leur différenciation anormale due au gène de la cathepsine C mutant peut altérer la barrière mécanique contre les microbes pathogènes périodontiques.

Une déficience en cathepsine C est associée à ce syndrome de Papillon-Lefèvre. Les mutations menant au PLS sont localisées sur le chromosome 11 dans la région q14-q21 où le gène de la cathepsine C (CTSC) est également localisé (Selvaraju et al. 2003). Le nombre total de mutations décrites dans le gène de la cathepsine C est actuellement de 41. De ces mutations connues, 11 sont des mutations non-sens, 20 sont des mutations miss-sens, 2

sont des insertions, 7 sont des délétions et 1 est une mutation de site d'épissage. Ces mutations sont dispersées à travers la région codante du gène CTSC (Selvaraju et al. 2003). Les mutations introduisent généralement un codon stop prématuré dans le gène de la cathepsine C. L'enzyme encodée par ce gène est donc tronquée ce qui entraîne une perte de fonction. En plus, la protéine tronquée ne peut pas être transportée jusqu'au lysosome. Certaines mutations peuvent aussi réduire l'activité de la cathepsine C par l'affaiblissement de la transcription, qui aurait comme conséquence des niveaux très bas de messagers, menant au phénotype de la maladie chez les patients.

3.2. Cathepsine C et syndrome de fatigue chronique

Le syndrome de fatigue chronique (CFS) est une maladie multifactorielle de pathologie complexe et d'étiologie inconnue. Ce phénomène médical est en augmentation et mène à un niveau d'invalidité chronique élevé. Il y a de nombreuses hypothèses qui tentent d'expliquer les caractéristiques primaires de cette maladie c'est-à-dire une fatigue persistante avec des rechutes. Une d'entre elles implique l'activation du système immunitaire comme dispositif central. Elle est appuyée par la surexpression d'un certain nombre de cytokines importantes chez les sujets malades.

L'identification des gènes surexprimés chez les patients CFS a ajouté du poids à l'idée que ce syndrome est caractérisé par des changements subtils dans le système immunitaire. Ainsi, onze courtes 'expressed sequence tags' (ESTs) ont été identifiées comme étant surexprimées dans les lymphocytes des patients. Une de ces séquences correspond au gène de la cathepsine C. Le CFS serait donc une maladie caractérisée par la surexpression des gènes dont certains sont connus pour être associés à l'activation de système immunitaire (Powell et al., 2003).

Il a été montré que le CFS fait suite à la répétition fréquente d'infections aiguës. La diversité des agents infectieux qui peuvent prédisposer au CFS suggère que la caractéristique centrale de cette maladie soit une réponse anormale de l'hôte à l'infection. La surexpression de cytokines pro-inflammatoires a été rapportée. Ces cytokines pro-inflammatoires sont les médiateurs probables de ces syndromes. Une cytokine immunosuppressive (TGF β) a été montrée dans un certain nombre d'études comme étant sur-régulée. Ceci peut représenter une tentative de l'hôte à réagir à une réponse immune exagérée ou inadéquate, ou peut être induit par des pathogènes essayant de résister à la réponse de l'hôte.

3.3. La cathepsine C de mastocytes et la survie dans la septicémie

La septicémie est une maladie léthale pour laquelle il y a peu de traitement. La cathepsine C active les protéases à sérine associées aux granules, dont plusieurs jouent des rôles importants dans la réponse de l'hôte à l'infection bactérienne. Le syndrome de la septicémie est la conséquence de la réponse de l'hôte pour tenter d'enrayer l'infection bactérienne et est caractérisé par l'hypotension, la diminution de la perfusion d'organe, la thrombose microvasculaire, et l'ischémie d'organes, qui mènent au dysfonctionnement d'organes et à la mort. Les cellules immunitaires reconnaissent la présence des bactéries envahissantes et initient la réponse de l'hôte en libérant les cytokines qui recrutent les cellules inflammatoires et activent les cellules immunes adaptatives pour produire des anticorps spécifiques de pathogènes. Quand les cytokines et les cellules inflammatoires sont présentes en nombre suffisant, les pathogènes sont éliminés sans conséquence défavorable. Les quantités excessives de cytokines pro- et anti-inflammatoires mènent à la septicémie et à la mort.

Le rôle de la cathepsine C dans la septicémie a été montré par comparaison de souris dépourvues de cathepsine C (*DPPI^{-/-}*) et possédant de la cathepsine C (*DPPI^{+/+}*) dans le modèle de la péritonite septique (Mallen-St Clair et al., 2004). Les souris *DPPI^{-/-}* survivent bien mieux à la septicémie que les souris *DPPI^{+/+}*. Ces travaux indiquent que chez les souris l'absence de cathepsine C dans les mastocytes est responsable de l'avantage de survie. Parmi plusieurs cytokines examinées dans le fluide péritonéal et le sérum, l'IL-6 est fortement et différenciellement exprimée dans les souris *DPPI^{-/-}* par comparaison avec les souris *DPPI^{+/+}*. La suppression de l'expression de l'IL-6 dans les souris *DPPI^{-/-}* élimine l'avantage de survie. C'est l'augmentation d'IL-6 dans les souris septiques *DPPI^{-/-}* qui semble donc protéger ces souris contre la mort, ceci peut être lié à l'activation réduite de tryptase de mastocytes et d'autres peptidases, modifiées par la cathepsine C, qui clivent l'IL-6 in vitro. Ces résultats indiquent que la cathepsine C de mastocytes nuit à l'hôte septique et qu'elle pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de la septicémie.

II. Matériels et méthodes

1. Cultures cellulaires

1.1. Maintien des cultures

Les cellules HepG2 (cellules humaines de lignée tumorale d'hépatocarcinome), WI38 (fibroblastes humains), MDA-MB-231 (cellules tumorales humaines provenant d'un carcinome mammaire) et Cos-7 (fibroblastes rénaux d'origine simienne transformés par le virus SV40) sont incubées dans des boîtes de culture de 75 cm² dans un incubateur à 37° C en présence de 5 % de CO₂ dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Biowhittaker : Walkersville, MD) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (FCS) et des antibiotiques streptomycine et pénicilline (Biowhittaker).

Quand les cellules sont confluentes, la propagation de la lignée cellulaire est réalisée de la manière suivante: les cellules sont lavées avec environ 15 ml d'une solution saline isotonique, l'HBSS (Hank's Balanced Solution, Biowhittaker). Elles sont ensuite détachées du fond de la boîte par un traitement avec 5 ml de trypsine (et EDTA) pendant quelques secondes pour permettre à la trypsine de pénétrer entre les cellules (solution de trypsinisation contenant 0,5 g/l de trypsine 1 :250 et 0,2 g/l d'EDTA, Biowhittaker). La trypsine est alors retirée et les cellules sont replacées dans l'incubateur à 37° C pendant quelques instants. Quand les cellules commencent à se détacher, elles sont resuspendues dans du milieu DMEM. Les différentes lignées cellulaires ne poussant pas à la même vitesse, différentes dilutions sont appliquées suivant la lignée cellulaire pour obtenir des cellules confluentes au moment voulu.

1.2. Traitement des cellules en culture avec le chlorure d'ammonium

Pour les expériences de western blotting, les cellules sont cultivées dans des boîtes de petri de 10 cm de diamètre. Elles sont incubées pendant une nuit avec 5 ml de milieu sans sérum contenant 10 % (soit 0,5 ml) de chlorure d'ammonium.

Pour les expériences de marquage métabolique long sur les cellules cultivées dans des boîtes à 6 puits, elles sont incubées pendant une nuit avec 0,5 ml de milieu complet contenant 10 % de chlorure d'ammonium par puits (soit 50 µl par puits).

2. Homogénats cellulaires

Pour faciliter les manipulations, les cellules prévues pour les expériences sont cultivées dans des boîtes de petri de 75 cm² ou dans des boîtes à 6 puits (9 cm²/ puits).

- Homogénats pour western blotting et mesure d'activité

Les boîtes de petri contenant les cellules sont placées sur de la glace. On récolte les milieux correspondants et on les centrifuge pendant 5 minutes à 1000 tours par minute (rpm). On lave les cellules 3 fois avec 10 ml de PBS glacé. On traite ensuite les cellules avec 1 ml de tampon de lyse dénaturant placé également dans la glace. Le tampon de lyse contient du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,4 et du triton X-100 0,2 %. On détache les cellules à l'aide d'un grattoir. Ensuite on congèle et décongèle deux fois (à moins 20° C pendant 10 min). On transfère enfin le tampon de lyse contenant les cellules dans des tubes eppendorf. On centrifuge à 12000 tours par minute (rpm) pendant 15 min et on retransfère le surnageant dans de nouveaux tubes.

- Homogénats pour immunoprécipitation

Pour les expériences d'immunoprécipitation, les cellules ont été cultivées et marquées soit dans des boîtes de petri, soit dans des boîtes à 6 puits. Pour faire les homogénats cellulaires, on place les boîtes dans la glace. On récolte les milieux correspondants et on les centrifuge 5 minutes à 1000 rpm. On lave les cellules 3 fois avec du PBS glacé (10 ml de PBS pour les boîtes de petri ou 3 ml par puits pour les boîtes à 6 puits). On traite ensuite les cellules avec du tampon de lyse (1 ml de tampon de lyse pour les boîtes de petri ou 0,5 ml par puits pour les boîtes à 6 puits). Ce tampon de lyse non-dénaturant est également placé dans la glace et il contient par 2 ml de tampon: 1,67 ml d'eau; 0,2 ml Tris 0,5 M pH 7,4; 0,04 ml Triton X-100 10 %; 0,05 ml IAA; 0,01 ml PMSF; 0,01 ml EDTA; 0,004 ml de leupeptine, aprotinine et pepstatine. On détache les cellules à l'aide d'un grattoir. On congèle et décongèle 2 fois (à moins 20° C pendant 10 min) et on transfère le tampon de lyse contenant les cellules dans des tubes eppendorf. On ajoute 10 µl de protamine sulfate 3 % frais non glacé. On place 10 min dans la glace puis on centrifuge pendant 20 min à 13500 rpm. On transfère alors le surnageant dans de nouveaux tubes eppendorf.

3. Mesure d'activité spécifique de la cathepsine C

L'activité spécifique est égale à l'activité enzymatique divisée par la quantité de protéines totale. On doit donc mesurer la concentration en protéines et la quantité de cathepsine C de chacun des homogénats.

3.1. L'activité de la cathepsine C

La mesure de l'activité de la cathepsine C est réalisée en utilisant le substrat glycyl-arginyl-7-amido-4-méthylcoumarine (substrat GAMc) à pH 5 dans du tampon acétate contenant: 9,7 mg H-Gly-Arg-AMC hydrochloride salt; 10 ml d'acétate 0,5 M à pH 5 le tout porté à 50 ml avec de l'eau distillée (Jadot et al., 1984).

Les homogénats cellulaires (60 µl + 190 µl d'eau) sont incubés dans un bain à 37° C pendant 30 minutes dans un volume final de réaction de 0,5 ml contenant: 0,25 ml de substrat GAMc (0,25 mM) du tampon acétate 50 mM pH 5,5 et 0,05 ml d'activateur. L'activateur contient du chlorhydrate de thioéthylamine 1 mM et 0,05 % de triton X-100 (des réducteurs de groupe thiol, car la cathepsine C est une enzyme à thiols SH et ions chlorure).

Après le temps de réaction donné (30 min), la réaction est arrêtée en ajoutant 1 ml de fixateur: tampon glycine 50 mM pH 10,5 contenant de l'EDTA 50 mM et 0,5 % de Triton X-100.

La méthylcoumarine libérée est déterminée en mesurant la fluorescence au spectrofluorimètre (Ex à 365 nm, Em à 450 nm). L'activité est exprimée en unités arbitraires de fluorescence /ml (UAF).

3.2. Dosage des protéines

On place 0,1 ml de la dilution d'homogénat (par exemple: 10 µl de l'échantillon + 90 µl d'eau). On ajoute 1 ml de mixture alcaline composée de 10 ml de Na₂CO₃ NaOH (carbonate de sodium et NaOH), 0,1 ml de mélange tartrate de sodium/tartrate de potassium 4 % et de 0,1 ml de sulfate de cuivre (CuSO₄) 2 %. On laisse agir pendant 10 min puis on ajoute 0,1 ml de réactif de Folin (Folin dilué 3 fois) et on laisse de nouveau agir 10 min. On lit ensuite l'absorbance à 660 nm au spectrophotomètre. Le dosage des protéines est exprimé en mg /ml. L'étalon utilisé contient de la sérum albumine bovine à 0,25 mg /ml

Les valeurs d'activités spécifiques sont exprimées en unités arbitraires de fluorescence (UAF) sur la concentration en protéines:

$$\text{Act sp} = \frac{\text{UAF}}{\text{mg /ml}}$$

4. Gel d'électrophorèse 15 %

Composition du gel de polyacrylamide à 15 % :

Le gel de séparation est composé de :

- 12,5 ml de Protogel (mélange acrylamide – bisacrylamide)
- 5 ml de Tris-HCl 2 M pH 8,8
- 25 µl de Temed
- 0,125 ml de SDS 10 %
- 7,25 ml d'eau
- 0,15 ml d'APS 10 %

On coule un peu d'eau pour recouvrir le gel et le protéger de l'oxygène pour qu'il polymérise convenablement. On laisse polymériser pendant 45 min-1 h.

Le gel d'empilement est composé de :

- 2 ml de Protogel
- 1,75 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8
- 0,0125 ml de Temed
- 0,0625 ml de SDS 10 %
- 8,5 ml d'eau
- 0,125 ml d'APS 10 %

On place le peigne et on laisse polymériser pendant 20 min.

5. Anticorps primaires utilisés dans ce travail

L'anticorps anti-cathepsine C humaine commercial (anti-cathepsine C (H-144); sc 13986 Santa Cruz Biotechnology, Inc.) est un anticorps polyclonal fabriqué chez un lapin et dirigé contre un peptide synthétique situé entre les acides aminés 291 à 394.

L'anticorps anti-cathepsine D humaine est un anticorps polyclonal fabriqué chez un lapin (Dako Corporation Carpinteria, code: n° A0561).

L'anticorps anti-cathepsine C de rat a été obtenu au laboratoire par F. Mainferme. C'est un anticorps polyclonal obtenu en injectant la cathepsine C purifiée à un lapin avec de l'adjuvant de Freund. Les immunoglobulines ont été purifiées à partir du sang de ce lapin en utilisant une colonne de DEAE cellulose équilibrée dans du tampon phosphate de potassium 10 mM à pH 7,8.

6. Marquage métabolique et immunoprécipitation

Les cellules, qui ont été mises en culture dans des boîtes de petri de 75 cm², sont soumises à une période de jeûne d'une heure. Pour cela, les cellules sont lavées 3 fois avec 5 ml de milieu DMEM déficient ne contenant pas de méthionine (DMEM Dulbecco's modified Eagle's medium) (Biowhittaker : Walkersville, MD) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (FCS) et des antibiotiques streptomycine et pénicilline (Biowhittaker).

Puis on incube pendant une heure avec 5 ml de milieu DMEM déficient à 37° C et 5 % CO₂. Ensuite, le milieu déficient est retiré et les cellules sont incubées avec 5 ml de milieu de marquage pendant 5, 6 ou 16 heures. Le milieu de marquage est composé, pour une boîte de petri de 10 cm de diamètre, de 5 ml de milieu déficient, de 0,5 ml de FCS (sérum de veau fœtal) dialysé stérile et de 300 µCi/boîte de Met ³⁵S Promix. On incube le temps voulu dans l'étuve à 37° C et 5 % de CO₂.

Pour les expériences réalisées dans les boîtes de cultures à 6 puits, les cellules sont lavées 3 fois avec 3 ml de milieu déficient /puits, puis incubées pendant une heure avec 2 ml de milieu déficient à 37° C et 5 % CO₂. Le milieu de jeûne est ensuite remplacé par 0,5 ml/puits de milieu de marquage composé (pour marquer 6 puits) de 3 ml de milieu déficient, 0,3 ml de FCS dialysé stérile et 100 µCi/puits de Met ³⁵S Promix. On incube le temps voulu dans l'étuve à 37° C et 5 % de CO₂.

Afin de vérifier si l'incorporation du marqueur radioactif par les cellules s'est bien déroulée, un comptage de la radioactivité est faite dans le milieu de marquage: dans une fiole on place 100 µl d'eau, 2 µl de milieu de marquage et 4 ml d'aqualuma. Les échantillons sont placés au compteur à scintillation (Beckman). On compte la radioactivité pendant 1 minute.

- Milieux

Après le temps d'incubation, les milieux sont prélevés dans un tube conique dans la glace et on centrifuge 5 min à 1000 rpm. On décante et on le garde dans la glace. On ajoute le tampon contenant, pour 5 ml de milieu: 0,5 ml de Tris 0,5 M pH 7,4; 0,1 ml de Triton X-100 10 %; 0,125 ml IAA; 0,025 ml PMSF; 0,025 ml EDTA; 0,01 ml de leupeptine; 0,01 ml d'aprotinine et 0,01 ml de pepstatine

- Cellules

Les homogénats cellulaires sont préparés après le marquage métabolique comme cela est expliqué au point 2.

On mesure la radioactivité des milieux récoltés et des extraits cellulaires comme expliqué plus haut.

Les échantillons d'extrait cellulaire et de milieu préalablement marqués subissent deux préabsorptions de 30 minutes à 4° C sur le carrousel avec 50 µl d'une suspension homogénéisée de protéine A-SépharoseTM CL-4B (Amersham : Piscataway, NJ). Entre les deux préabsorptions, on centrifuge pendant 5 min à 12000 rpm. On décante les surnageants que l'on transfère dans de nouveaux tubes et on élimine les culots dans une poubelle prévue à cet effet.

Production des immunocomplexes:

- Les extraits cellulaires sont ensuite ultracentrifugés dans la Beckman de table OptimaTM munie du petit rotor (TLA 120,1; 120K RPM; S.N. 95U389) pendant 10 min à 50000 rpm. On décante et on transfère le surnageant dans de nouveaux tubes.
- Les milieux sont directement traités comme suit.

Les extraits cellulaires et les milieux sont mélangés à l'immunomix composé, pour 100 ml d'immunomix, de: 500 mg d'albumine de sérum bovin, 1 g de Triton X-100 et 10 ml de PBS 10 x et 500 mg de DOC (désoxycholate de sodium) le tout porté à 100 ml avec de l'eau.

On ajoute alors 2 à 5 µl d'anticorps anti-cathepsine C (ou anti-cathepsine D). On laisse sur le carrousel à 4° C pendant toute la nuit.

Le lendemain, on ajoute 50 µl de suspension homogène de protéine A-Sépharose, on place au carrousel à 4° C pendant 30 min, on centrifuge pendant 5 min à 12000 rpm dans la microfuge.

On enlève le surnageant et on garde les culots. On lave les culots 2 fois à froid avec 1 ml d'immunomix contenant 0,2 % de SDS. Puis une fois avec 1 ml d'immunomix contenant du KCl 2 M. On lave encore 1 fois les culots à température ambiante avec du tampon dit 'Neufeld' Buffer contenant pour 100 ml: 0,1 g de SDS, 3,5 g de NaCl et 50 mg de NP40 que l'on amène à pH 8,6 avec du NaOH dilué. On lave enfin 2 fois avec 1 ml de PBS dilué 10 fois. Entre chaque lavage, on centrifuge 5 min à 12000 rpm à la microfuge.

Ensuite pour dissocier les polypeptides radioactifs associés aux billes de sépharose, on ajoute à chaque culot 15 µl d'eau et 15 µl de solution contenant: 1 % de SDS, 0,015 % de bleu de bromophénol, 25 % de glycérol et ru Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 (solution SOL). On place les tubes dans le bloc chauffant pendant 5 min à 95° C. On centrifuge enfin 5 min à 12000 rpm afin d'éliminer le protéine A-SepharoseTM et on décante les surnageants qu'on transfère dans de nouveaux tubes, on jette les culots. On peut ensuite charger les échantillons sur un gel à 10 ou 15 %. On utilise 1 µl d'étalon C₁₄ auquel on ajoute 19 µl d'eau et 20 µl de SOL que l'on chauffe également pendant 5 min à 95° C. Les polypeptides sont visualisés par un appareil CycloneTM (Packard BioScience Company: Meriden, CT) en utilisant des écrans de stockage au phosphore.

7. Western Blotting

Les échantillons à faire migrer sur un gel de polyacrylamide à 15 % sont préparés comme suit. Les milieux récoltés (5 ml) vont être concentrés environ 2,5 fois grâce à des concentrateurs (Millipore UFV2BGC40 cut off 10 kDa). Ensuite on prend 20 µl d'échantillon (extrait cellulaire ou milieu concentré 2,5 fois) et 20 µl de solubilisateur. On fait chauffer pendant 5 min à 95° C. On peut alors charger les échantillons sur le gel à 15 %. On laisse migrer à 20-30 milliampères pendant environ 4 h.

Transfert sur membrane:

Le gel est découpé et mesuré puis placé dans du tampon de blotting pendant 15 min. Le tampon de blotting est composé de 15,15 g de Tris; 72 g de glycine; 1 l de méthanol que l'on porte à

5 l avec de l'eau distillée. On découpe ensuite le feuillet aux mêmes dimensions que le gel. Le feuillet étant hydrophobe, il est d'abord traité au méthanol pendant 15 sec. puis transféré lui aussi dans le tampon de blotting pendant 10 min. On prépare ensuite des feuilles de papier wattman de 3 mm découpées aux mêmes dimensions. On place le feuillet et le gel entre les papiers wattman de façon à ce que le feuillet soit placé du côté de la borne positive étant donné que les protéines (qui sont négatives) vont se diriger de la membrane vers l'électrode positive. On remplit la cuve avec le tampon de blotting. Le transfert se fait pendant toute la nuit à 100 milliampères.

Le lendemain, on achève le transfert à 500 milliampères pendant 30 min. Ensuite on arrête le transfert et on sèche le feuillet entre du papier wattman 3 mm.

On prépare le PBST-lait (ou le PBST-BSA 3 %) et le PBST:

Le PBST est composé de: Tris 0,025 M pH 7,4 ; NaCl 0,15 M ; Tween 0,025 %.

Le PBST-lait contient en plus: 3 % de lait en poudre et 0,5 % de BSA (albumine sérum bovin).

Le PBST-BSA 3% contient en plus du PBST 3 % de BSA.

Le feuillet est placé dans du méthanol pour être réhydraté. Il est lavé 3 fois avec de l'eau. Il est ensuite saturé sous agitation pendant 30 min dans environ 150 ml de PBST-lait (ou pendant 45 min dans le PBST-BSA). Toujours sous agitation, le feuillet est incubé pendant 1 heure avec l'anticorps anti-cathepsine C (Ac αh dapI) dilué 1 µl/ 300 µl. Ou avec l'anticorps

anti-cathepsine D dilué 1 µl/ 3000 µl. Après l'heure d'incubation on fait 2 lavages de 10 min sous agitation avec du PBST. Puis 2 autres lavages de 10 min dans du PBST lait (ou de 20 min dans du PBST-BSA).

On incube alors pendant 1 h avec l'anticorps secondaire: un anticorps anti-lapin fabriqué chez une chèvre et qui est couplé à la peroxydase de raifort (HRP). Cet anticorps est dilué 1 µl/ 1000 µl.

Après incubation avec l'anticorps secondaire, on lave de nouveaux 3 fois le feuillet avec environ 150 ml de PBST.

Ensuite, on révèle le feuillet sur un film photographique grâce à une solution de chemiluminescence (Western lightning chemiluminescence. Reagent Plus, substrat: oxidizing reagent and enhanced luminol reagent, Perkin ElmerTM, Life sciences), suivant les indications du fabricant.

On incube le feuillet pendant une minute avec le mélange chemiluminescent, puis on expose une minute sur un film photographique.

8. Immunofluorescence

Les cellules sont passées 1 ou 2 jours avant l'expérience. Les cellules vont être cultivées sur des lamelles porte-objet (préalablement flambées à l'alcool) dans des boîtes à 6 puits contenant 2 ml de milieu DMEM. On compte le nombre de cellules par ml. Puis les cellules sontensemencées dans des boîtes à 6 puits pour arriver à une confluence correcte pour l'expérience (c'est-à-dire environ 70 à 80 %). On trypsinise puis on resuspend les cellules dans 10 ml de milieu.

Solution à préparer:

- dPBS: PBS 1 x (pour 1 l à partir de stock 10 x : 100 ml) et CaCl₂ 0,005 % pH 7,4;
- dPBS-Triton: dPBS contenant 0,2 % de Triton pour la perméabilisation;
- dPBS-BSA 2 % pour la saturation des sites de fixation aspécifiques;
- PAF 4 % frais dilué dans du dPBS.

Toutes les solutions sont filtrées.

On enlève le milieu de culture et on fait 3 lavages de 5 min avec du dPBS. Ensuite on fixe les cellules avec 2 ml de PAF 4 % fraîchement préparé pendant 10 min. On réalise de nouveau 3 lavages de 5 min avec le dPBS. On perméabilise ensuite les cellules avec 2 ml de dPBS-Triton 0,2 % pendant 10 min. On lave 3 fois pendant 5 min avec le dPBS. Ensuite on sature les sites de fixation aspécifiques de l'anticorps avec 2 ml de dPBS-BSA 2 % pendant 10 min. On lave une fois avec le dPBS puis on incube avec l'anticorps primaire dilué dans du dPBS-BSA 2 % pendant 2 heures dans l'obscurité. L'incubation se fait sur des gouttes de 20 µl de la dilution de l'anticorps. Les gouttes sont déposées sur du parafilm recouvrant un support plat (une lame de verre). Les lamelles sont retournées, cellules face vers le bas, sur les gouttes. On les place dans une chambre humide, afin d'éviter l'évaporation des gouttes, et dans le noir. Après les 2 heures d'incubation, on refait 3 lavages de 5 min dans le dPBS. On incube ensuite avec l'anticorps secondaire (anticorps anti-lapin couplé à l'Alexa vert dilué 1/1000) pendant 45 min de la même façon que l'anticorps primaire. On lave 3 fois 5 min avec le dPBS. On incube 30 min avec 2 ml de TOPRO qui va colorer les noyaux en bleu (2 µl de Topro dilué dans 160 µl de RNase A) à raison de 20 µl par lamelle. On lave encore 3 fois 5 min dans le dPBS. On monte ensuite les lamelles sur des lames avec du Mowiol (chauffé à 53° C). Les lames sont laissées pendant toute la nuit à 4° C pour avoir une bonne fixation. On peut alors observer les lames au microscope confocal.

III. But du travail

La cathepsine C est une hydrolase lysosomale soluble. Contrairement à la plupart des protéases à cystéine de la famille des papaïnes qui sont relativement de petites protéines monomériques et qui ont une activité endopeptidase, la cathepsine C est une enzyme oligomérique et possède une activité exopeptidasique, elle catalyse l'excision de dipeptides de l'extrémité amino-terminale de protéines substrats (Mc Donald et al., 1969).

La structure et la séquence de la cathepsine C ont été étudiées chez de nombreuses espèces et elle semble être bien conservée. La cathepsine C de rat est synthétisée sous forme d'un précurseur composé d'un peptide signal du côté N-terminal, d'un très long propeptide, d'une partie mature composée d'une chaîne α et d'une chaîne β .

Beaucoup d'études ont déjà été réalisées sur la biosynthèse et la maturation de diverses hydrolases acides. Il reste cependant intéressant d'étudier la cathepsine C qui présente des particularités dans sa structure tétramérique et son long propeptide résiduel.

Parmi les aspects les plus intéressants de la biosynthèse et du trafic des cathepsines lysosomales, nous noterons le déroutage massif des précurseurs de certaines cathepsines dans plusieurs lignées tumorales (Hasilik et al., 1984; Capony et al., 1989; Capony et al., 1994; Isidoro et al., 1997). Il a été montré par exemple, dans le cas de la cathepsine D, une hypersécrétion de son précurseur dans les milieux extracellulaires, allant de pair avec le potentiel invasif de la lignée étudiée (Capony et al., 1994). Des observations du même type ont été faites en ce qui concerne la sécrétion des précurseurs de la cathepsine B et de la cathepsine L par exemple (Colella & Casey, 2003).

La sécrétion des précurseurs d'enzymes lysosomales dans les cellules cancéreuses est tout à fait particulière. Les études sur la cathepsine D ont porté, entre autre, sur le tri perturbé de la cathepsine D dans les cellules tumorales (Isidoro et al., 1997; Capony et al., 1994), sur une voie indépendante du man 6-P que cette hydrolase acide pourrait prendre pour arriver aux lysosomes dans les cellules HepG2 (Rijnboutt et al., 1991), et aussi sur l'association membranaire de la cathepsine D dans les endosomes de macrophages (Diment et al., 1988). Les conséquences du déroutage des procathepsines dans les cellules cancéreuses ne sont pas connues avec précision. On a d'abord pensé à leur possible action hydrolytique extracellulaire capable de contribuer au remodelage de la matrice extracellulaire et ainsi de faciliter l'invasion. On a également montré le potentiel mitogène de la procathepsine D extracellulaire (Rocheffort, H., 1990; Glondu et al., 2001).

Il serait fort intéressant de se pencher sur la biosynthèse et sur le trafic intracellulaire de la cathepsine C dans des cellules tumorales humaines, un projet qui a été rendu longtemps impossible dans notre laboratoire du fait de la non disponibilité d'un bon anticorps contre la cathepsine C humaine. La mise à disposition dans le commerce d'un anticorps anti-cathepsine C humaine (anti-cathepsine C (H-144) ; SC 13986 Santa Cruz Biotechnology, Inc.) nous a conduits à reprendre les expériences sur le trafic et le ciblage de la cathepsine C dans un modèle humain. Nous avons donc voulu, dans ce travail, tester cet anticorps afin de voir dans quelles conditions expérimentales il pouvait être utilisé afin de suivre la maturation et la biosynthèse de la cathepsine C humaine dans divers types cellulaires.

Les divers types cellulaires choisis pour notre étude sont les cellules HepG2 (cellules humaines de lignée tumorale d'hépatocarcinome), les fibroblastes WI 38, les cellules MDA-MB-231 (cellules tumorales humaines provenant d'un carcinome mammaire). Ces diverses lignées de cellules humaines ont été choisies pour leur intérêt dans les recherches portant sur la biosynthèse et la maturation d'hydrolases acides. Ces cellules ont une sensibilité propre au NH_4Cl et ont des comportements différents notamment en ce qui concerne le taux de sécrétion des précurseurs d'enzymes lysosomales. Chaque type cellulaire sécrète la forme précurseur de la cathepsine D en quantité différente, en absence et en présence de NH_4Cl .

III. Résultats et discussions

Beaucoup d'études ont été réalisées sur la biosynthèse et la maturation de diverses hydrolases acides, notamment les cathepsines D et L. La cathepsine D est celle qui a été la plus étudiée et pour laquelle nous connaissons le plus d'informations. Nous allons donc nous baser sur ces données connues (comme contrôle) dans notre travail concernant la cathepsine C. Les études sur la cathepsine D ont porté, entre autre, sur le transfert et le ciblage dans des conditions de vie normales, sur le tri perturbé de la cathepsine D dans les cellules tumorales (Isidoro et al., 1997), sur une voie indépendante du man 6-P que cette hydrolase acide peut prendre pour arriver aux lysosomes dans les cellules HepG2 (Rijnbout et al., 1991), et aussi sur l'association membranaire de la cathepsine D dans les endosomes de macrophages (Diment et al., 1988).

Comme déjà signalé ci-dessus, des études ont été réalisées au laboratoire sur la cathepsine C au moyen d'un anticorps anti-cathepsine C de rat. Nous souhaitions contribuer à l'étude de la biosynthèse de la cathepsine C humaine mais, ce projet a longtemps été freiné par le fait que nous ne disposions pas d'un anticorps anti-cathepsine C adéquat. Plusieurs essais de purification d'un anticorps anti-cathepsine C humaine sont notamment restés infructueux. Récemment, la mise à disposition dans le commerce d'un anticorps anti-cathepsine C humaine (anti-cathepsine C (H-144) ; SC 13986 Santa Cruz Biotechnology, Inc.) nous a ouvert la possibilité de reprendre les expériences sur le trafic et le ciblage de la cathepsine C dans un modèle humain. C'est un anticorps polyclonal dirigé contre un peptide synthétique situé entre les acides aminés 291 à 394 (voir Fig. 7). Il reconnaît un site unique sur la chaîne α de la cathepsine C.

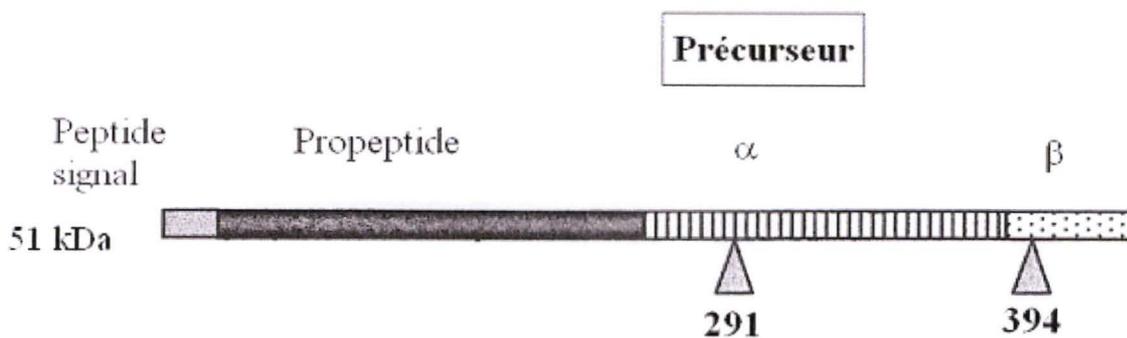


Fig. 7: Représentation schématique de la structure du précurseur de la cathepsine C. L'anticorps anti-cathepsine C est un anticorps polyclonal dirigé contre un peptide synthétique situé entre l'acide aminé 291 et 394 indiqués par un triangle.

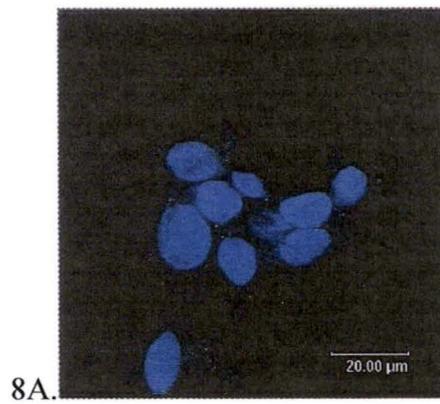
Nous avons donc voulu, dans ce travail, tester cet anticorps pour voir dans quelles conditions expérimentales il pourrait être utilisé afin de suivre la maturation et la biosynthèse de la cathepsine C humaine dans divers types cellulaires humains.

Les divers types cellulaires choisis pour notre étude sont les cellules HepG2 (cellules humaines de lignée tumorale d'hépatocarcinome), les fibroblastes WI 38, les cellules MDA-MB-231 (cellules tumorales humaines provenant d'un carcinome mammaire). Ces diverses lignées de cellules humaines ont été choisies pour leur intérêt dans les recherches portant sur la biosynthèse et la maturation d'hydrolases acides. Ces cellules ont une sensibilité propre au NH_4Cl et ont des comportements différents notamment en ce qui concerne le taux de sécrétion des précurseurs d'enzymes lysosomales. Chaque type cellulaire sécrète la forme précurseur de la cathepsine D en quantité différente, en absence et en présence de NH_4Cl .

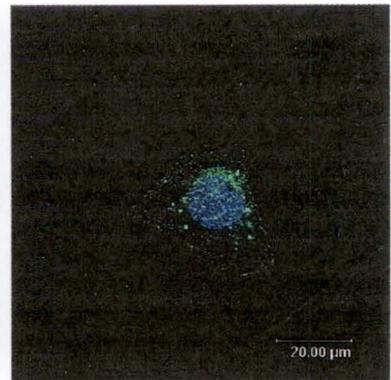
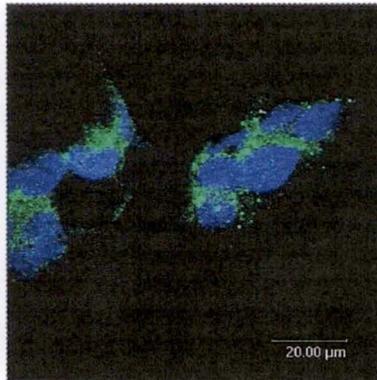
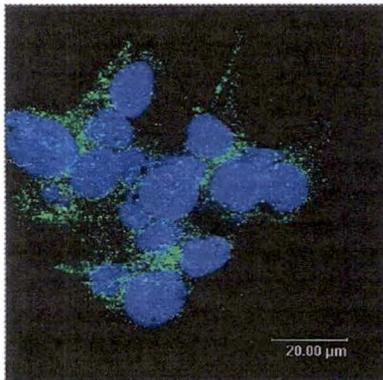
Les fibroblastes WI38 ne sécrètent que peu de procathepsine D. Les cellules HepG2 sécrètent naturellement une quantité non négligeable de la procathepsine D. Cette sécrétion est décrite comme étant accrue par la présence de chlorure d'ammonium (Isidoro et al., 1997). Enfin les cellules MDA-MB-231 sécrètent en absence de chlorure d'ammonium déjà une grande quantité de la procathepsine D et l'effet du chlorure d'ammonium sur la sécrétion est limité. La quantité de forme mature de la cathepsine D présente dans les extraits cellulaires peut diminuer sous l'effet de l'augmentation de la sécrétion de formes précurseurs qui ne sont alors plus disponibles pour subir la maturation.

Au début de notre travail, nous avons réalisé quelques expériences d'immunofluorescence sur les cellules HepG2 pour y comparer les signaux obtenus avec notre anticorps anti-cathepsine C et un anticorps dirigé contre une autre cathepsine lysosomale: la cathepsine D. Les résultats obtenus sont visibles à la figure 8. Nous avons coloré les noyaux en bleu grâce au TOPRO. Le contrôle effectué sans anticorps primaire (Fig. 8A) ne montre que ce marquage nucléaire et aucun signal d'un marquage par l'anticorps secondaire, couplé à la molécule fluorescente (en vert). La figure 8B nous montre, en plus du marquage nucléaire bleu, un signal vert correspondant au marquage de la cathepsine C. Ce signal ponctué semble compatible avec un marquage des lysosomes. L'utilisation de cet anticorps anti-cathepsine C humaine commercial semble donner des résultats du même type que ceux obtenus avec un anticorps anti-cathepsine D humain (Fig. 8C).

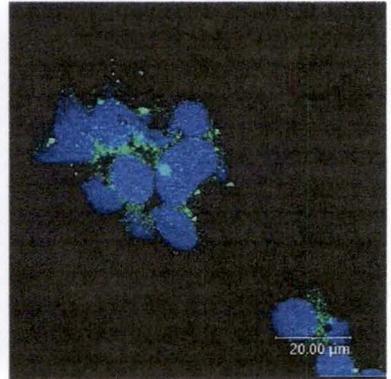
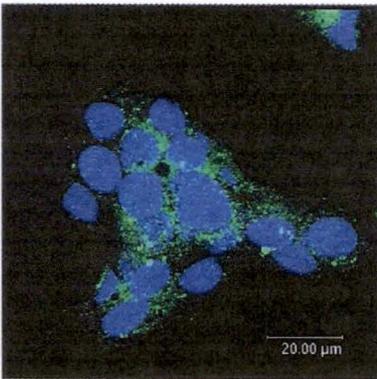
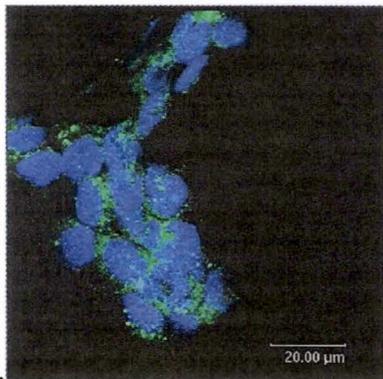
Bien sûr, nous sommes conscients que ces résultats sont insuffisants pour démontrer un marquage lysosomal sans expériences de co-localisation plus précises. Nous les avons toutefois estimés suffisamment encourageants pour entamer des travaux biochimiques à l'aide de cet anticorps. Nous avons donc réalisé une série d'expériences préliminaires à des recherches sur la biosynthèse d'hydrolases acides en utilisant d'autres techniques, le western blotting et le marquage métabolique suivi d'une immunoprécipitation.



8A.



8B.



8C.

Fig. 8: Détection de la cathepsine C et de la cathepsine D par immunofluorescence dans les cellules HepG2. Les cellules sont comptées etensemencées 2 jours avant l'expérience dans des boîtes à 6 puits (1000000 cellules par puits). Les cellules sont ensuite traitées pour la microscopie par immunofluorescence. Elles sont fixées, perméabilisées puis incubées avec l'anticorps primaire anti-cathepsine C dilué 1/150 (Fig. 8B) ou avec l'anticorps anti-cathepsine D dilué 1/1000 (Fig. 8C). Les cathepsines C et D sont détectées par incubation avec un anticorps secondaire anti-lapin dilué 1/1000 qui est conjugué au FITC (molécule fluorescente). Les cellules sont aussi incubées avec du TOPRO qui va marquer les noyaux en bleu. Le contrôle (Fig. 8A) est réalisé sans anticorps primaire.

1. Western blotting

La méthode du western blotting est assez peu utilisée pour étudier la biosynthèse d'hydrolases acides telles que la cathepsine D. La technique du western blotting a toutefois été utilisée dans des analyses d'expression, de maturation et de sécrétion de la cathepsine D (Dragonetti et al., 2000) et des études sur les formes moléculaires de la cathepsine D (Démou et al, 1999).

Nous avons voulu tester si la détection des formes précurseurs et matures de la cathepsine C humaine peut être réalisée à l'aide de l'anticorps anti-cathepsine C humaine dans les différentes lignées cellulaires par western blotting. Et nous avons par la suite essayé de visualiser l'effet du chlorure d'ammonium sur la sécrétion de la cathepsine C comme cela a été fait pour la cathepsine D.

Rappelons que la cathepsine C est synthétisée sous forme d'un précurseur de 55 kDa environ. Ce précurseur va être clivé en plusieurs endroits lors de sa maturation (Cigic & Pain, 1999) (voir Fig. 3). Les clivages permettent la libération d'une chaîne α de 21 kDa et d'une chaîne β de 8 kDa. Le long propeptide est également clivé pour produire un fragment de 18 kDa environ (propeptide résiduel ou chaîne γ) qui reste associé aux deux autres chaînes.

1.1. Détection de la cathepsine C par western blotting en utilisant l'anticorps anti-cathepsine C humaine

Les premières expériences de détection de la cathepsine C par western blotting ont été réalisées sur les cellules HepG2 et les fibroblastes WI38. Les cellules ont été ensemencées 2 ou 3 jours avant l'expérience dans des boîtes de petri de 10 cm de diamètre. Les cellules formant un tapis confluent, les milieux de culture sont récoltés et les cellules sont lavées au PBS, puis lysées pour obtenir les extraits cellulaires. Les extraits cellulaires et les milieux correspondants sont ensuite utilisés pour réaliser un western blotting en utilisant l'anticorps anti-cathepsine C humaine.

Sur l'image obtenue du gel complet (Fig. 9), nous pouvons voir à gauche l'échelle de poids moléculaire. Nous observons des bandes correspondant à la forme précurseur de la cathepsine C (notée par la suite P) dont le poids moléculaire est compris entre 59 et 52 kDa (la moyenne observée est à 55 kDa +/- 4 SD sur 7 mesures) et cela uniquement au niveau des extraits cellulaires. Une bande, dont on ne connaît pas la nature, est présente dans les extraits cellulaires, à un niveau de poids moléculaire un peu plus élevé que la forme précurseur. Aucune bande de plus petit poids moléculaire n'est reconnue. L'anticorps semble donc ne reconnaître qu'une seule chaîne peptidique correspondant très probablement à la forme précurseur de la cathepsine C. L'anticorps serait donc incapable de reconnaître la forme mature, de plus faible poids moléculaire (la chaîne α de 21 kDa), de la cathepsine C humaine. Nous n'observons les bandes correspondant au précurseur de la cathepsine C que dans les extraits cellulaires, aucune bande pouvant correspondre au précurseur n'est observée dans les milieux correspondants. Dans ces milieux on observe seulement quelques bandes de très haut poids moléculaire. Il est possible que ces bandes correspondent en partie à du matériel reconnu par l'anticorps et qui ne pénètre pas dans le gel.

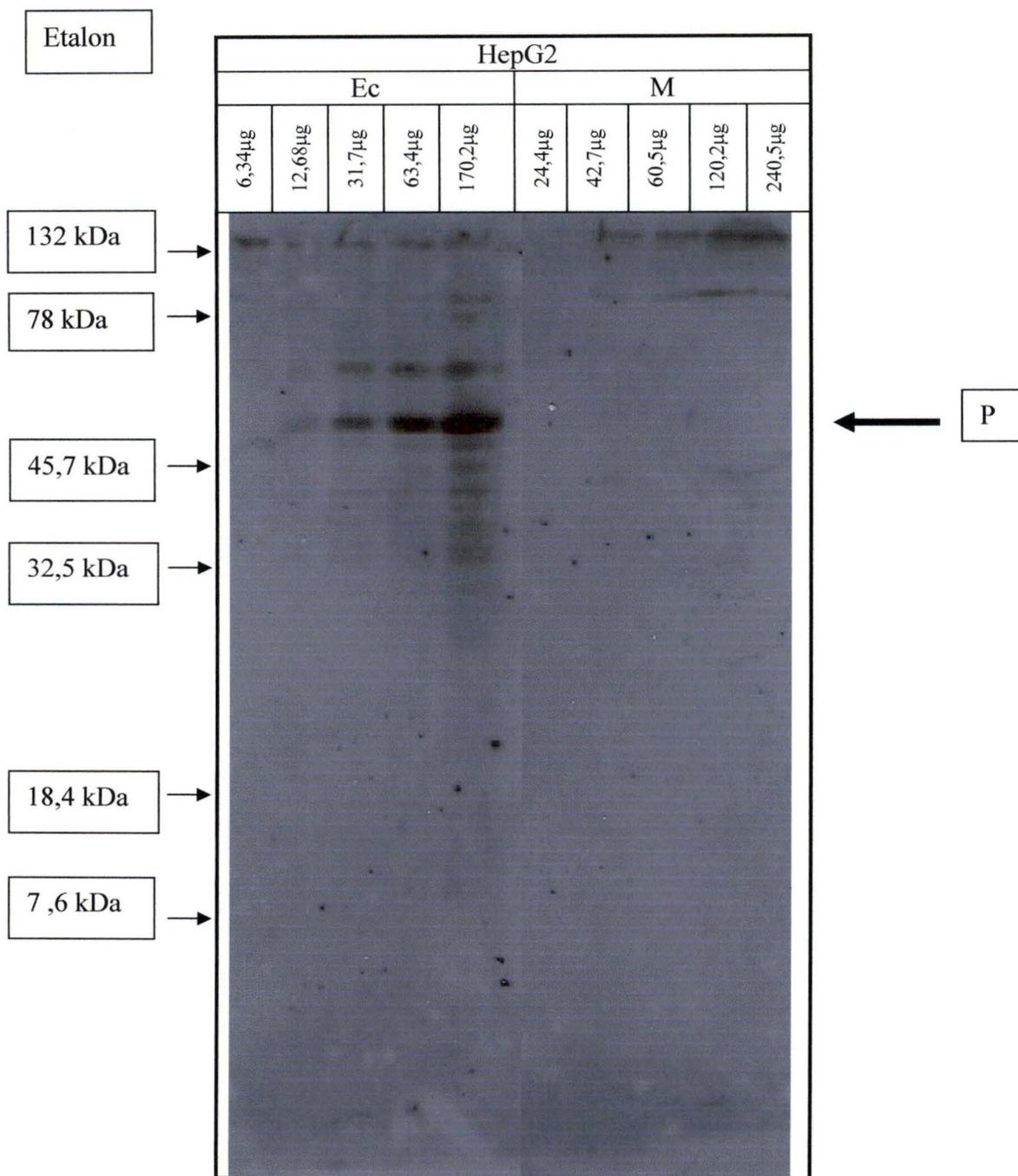


Fig. 9: Visualisation de la cathepsine C par western blotting dans les extraits cellulaires des cellules HepG2 et dans les milieux de culture correspondants. Les cellules HepG2 ont été cultivées dans des boîtes de petri de 10 cm de diamètre. Trois jours après, quand les cellules sont confluentes, les milieux sont récoltés, et les cellules lavées au PBS, puis lysées. Des quantités croissantes d'extraits cellulaires (Ec) et de milieux (M) correspondants de cellules HepG2 sont chargés sur un gel d'électrophorèse à 15 % (la quantité de matériel chargée est indiquée en µg de protéines). Après transfert sur une membrane, la présence de polypeptides dérivés de la cathepsine C est recherchée par western blotting. La membrane est saturée avec du PBST-lait puis incubée pendant 1 heure avec l'anticorps anti-cathepsine C humain dilué 1/300. Après rinçage, elle est incubée avec l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase qui est dilué 1/1000.

Des expériences du même type ont été répétées à plusieurs reprises sur les cellules HepG2. Les résultats obtenus (Fig. 10A et 10B) confirment nos premières observations.

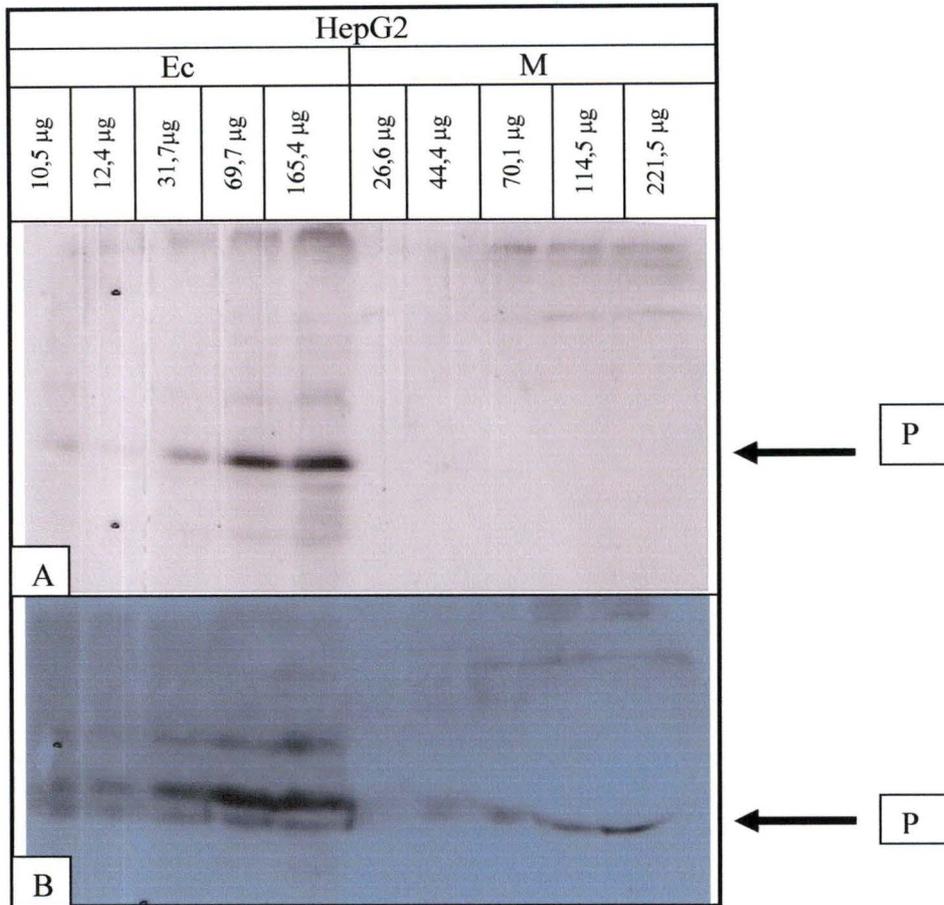


Fig. 10: Visualisation de la cathepsine C par western blotting dans les milieux de culture et les extraits cellulaires des cellules HepG2 (Fig. 10A et 10B). Les cellules HepG2 ont été cultivées dans des boîtes de petri de 10 cm de diamètre. Quand les cellules sont confluentes, les milieux sont récoltés. Les cellules sont lavées au PBS, puis lysées. Des quantités croissantes d'extraits cellulaires (Ec) et de milieux correspondants (M) de cellules HepG2 sont chargées sur un gel d'électrophorèse à 15 % (la quantité de matériel chargée est indiquée en µg de protéines). Après transfert sur une membrane la présence de polypeptides dérivés de la cathepsine C est recherchée par western blotting. La membrane est saturée avec du PBST-lait puis incubée pendant 1 heure avec l'anticorps anti-cathepsine C humain dilué 1/300. Après rinçage, elle est incubée avec l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase et dilué 1/1000.

Nous observons un signal correspondant vraisemblablement à la forme précurseur (P) de la cathepsine C au niveau des extraits cellulaires. Aucune bande de plus petit poids moléculaire, qui correspondrait à la forme mature de la cathepsine C, n'est reconnue. Comme dans la figure 9, aucune bande précurseur n'est observée dans les milieux à la figure 10A. Cependant nous avons observé une seule fois dans les milieux de culture cellulaire des bandes de faible intensité pouvant correspondre à la forme précurseur de la cathepsine C (Fig. 10B). On observe toujours, dans les milieux, des bandes non identifiées de faible intensité et de très haut poids moléculaire.

Nous avons ensuite réalisé des expériences du même type sur les fibroblastes WI38 (Fig. 11). Nous observons des résultats similaires à ceux obtenus dans les cellules HepG2.

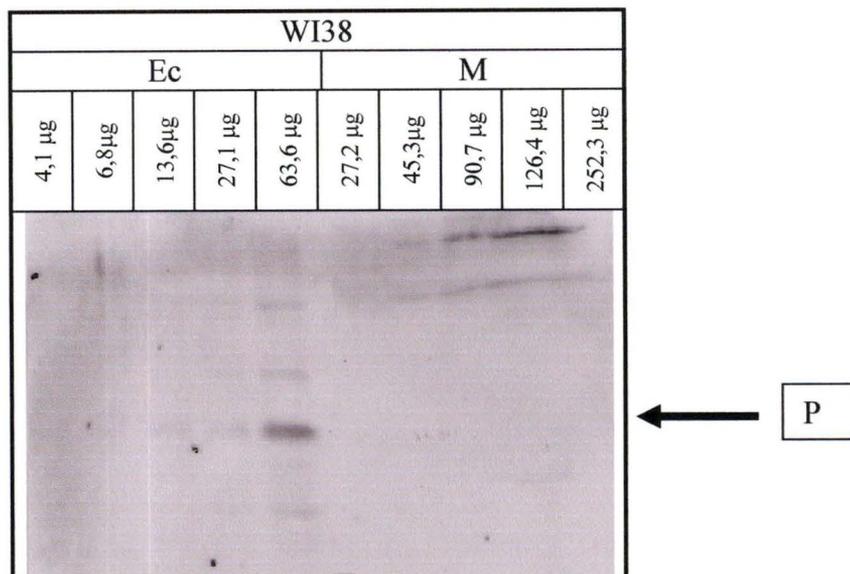


Fig. 11: Visualisation de la cathepsine C par western blotting dans les milieux de culture et les extraits cellulaires des fibroblastes WI38. Les cellules ont été cultivées dans des boîtes de petri de 10 cm de diamètre. Quatre jours plus tard, quand les cellules sont confluentes, les milieux sont récoltés. Les cellules sont lavées au PBS, puis lysées.

Des quantités croissantes d'extraits cellulaires (Ec) et de milieux (M) correspondants de fibroblastes WI 38 sont chargées sur un gel d'électrophorèse à 15 % (la quantité de matériel chargée est indiquée en µg de protéines). Après transfert sur une membrane nous avons recherché la présence de polypeptides dérivés de la cathepsine C par western blotting. La membrane est saturée avec du PBST-lait puis incubée pendant 1 heure avec l'anticorps anti-cathepsine C humain dilué 1/300. Après rinçage, elle est incubée avec l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase dilué 1/1000.

A noter enfin que ces résultats nous montrent également qu'il semble y avoir une réponse relativement linéaire entre l'intensité du signal des bandes observées pour la cathepsine C humaine et la quantité d'extraits cellulaires des cellules HepG2 et WI38 et des milieux correspondants déposés sur le gel d'électrophorèse à 15 %.

En ce qui concerne les résultats obtenus sur les fibroblastes WI38, ils correspondent à ceux décrits pour la cathepsine D. Dans les cellules WI 38, la procathepsine D n'est pas sécrétée de manière naturelle. Il est décrit dans la littérature (Isidoro et al., 1997) qu'une partie de la procathepsine D est sécrétée de manière naturelle dans les cellules HepG2. On s'attendait donc à une observation correspondante en ce qui concerne la cathepsine C. Nos observations nous font penser que la cathepsine C ne serait pas sécrétée de manière naturelle dans les cellules HepG2 contrairement à la cathepsine D. Cependant, le fait de ne pas observer de bande correspondant à la forme précurseur de la cathepsine C dans les milieux de culture peut être lié à un problème de sensibilité de notre détection. Nous ne pouvons pas exclure non plus que les formes présentes dans les milieux soient dégradées, car nous n'ajoutons pas d'inhibiteur de protéase dans les milieux récoltés.

Il est surprenant de ne pas observer de forme mature de la cathepsine C humaine dans les extraits cellulaires. Nous pourrions l'expliquer par le fait que l'épitope reconnu par l'anticorps disparaîtrait pendant la maturation de la cathepsine C, ou la configuration de la protéine empêcherait l'anticorps d'accéder à cet épitope une fois la protéine sous forme mature (voir Fig. 3).

Lors des expériences de mises au point du western blotting, nous avons réalisé de la même façon des essais complémentaires avec d'autres types cellulaires qui ne concernent pas directement notre étude. Les résultats sont toutefois intéressants à mentionner car ils confirment nos observations précédentes. Nous avons en effet obtenu des résultats du même type avec les fibroblastes immortalisés par infection au virus SV 40 (notés par la suite fibroblastes SV40) et des cellules d'hépatome de rat, les cellules H4 (Fig. 12).

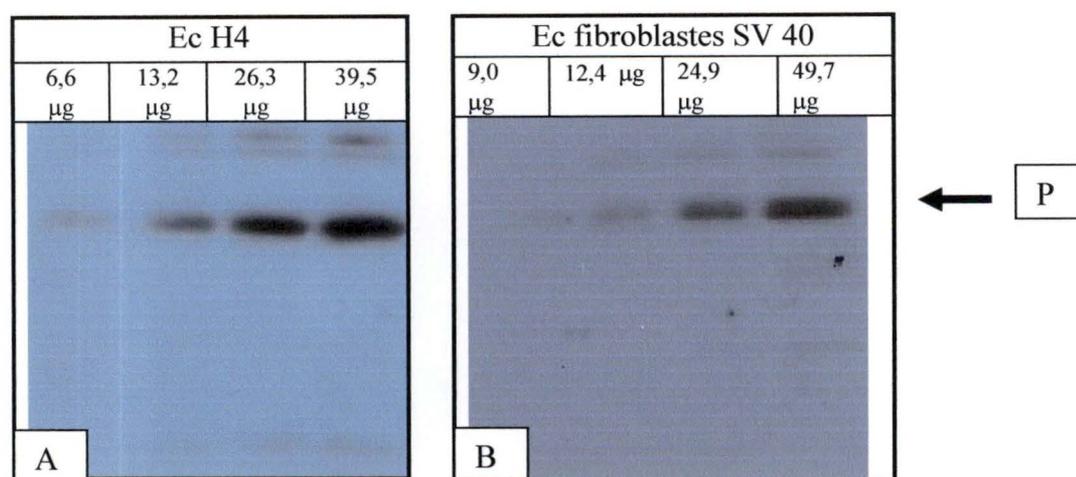


Fig. 12: Visualisation de la cathepsine C par western blotting dans les extraits cellulaires des cellules H4 (Fig. 12A) et des fibroblastes SV40 (Fig. 12B) et dans les extraits cellulaires des fibroblastes SV40 concentrés environ 2,5 fois. (Fig. 12B). Après avoir cultivé des cellules H4 et fibroblastes SV40 dans des boîtes de petri de 10 cm de diamètre pour arriver à un tapis de cellules confluentes, les cellules ont été lavées au PBS puis lysées. Nous avons chargé des quantités croissantes d'extraits cellulaires (Ec) de cellules H4 ou de fibroblastes SV40, sur un gel d'électrophorèse à 15 % (la quantité de matériel chargé est indiquée en µg de protéine). Après transfert sur une membrane nous avons recherché la présence de polypeptides dérivés de la cathepsine C par western blotting. La membrane est saturée avec du PBST-lait puis incubée pendant 1 heure avec l'anticorps anti-cathepsine C humain dilué 1/300. Après rinçage, elle est incubée avec l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase, dilué 1/1000.

Les résultats que nous avons obtenus avec ces cellules sont identiques à ceux présentés par les cellules WI38 et HepG2. Nous observons les bandes correspondant à la forme précurseur (P) de la cathepsine C dans les extraits cellulaires des cellules H4, et des fibroblastes SV40. Aucune bande de plus petit poids moléculaire, qui correspondrait à la forme mature de la cathepsine C, n'est reconnue. L'anticorps ne reconnaît qu'une seule chaîne peptidique correspondant à la forme précurseur de la cathepsine C. Nous n'avons pas analysé les milieux cellulaires correspondants dans ces expériences complémentaires. Nous avons, par la suite, pu disposer de cellules MDA-MB-231. Les résultats (non montrés) que nous avons obtenus avec ces cellules sont identiques à ceux présentés par les cellules WI38, HepG2, H4 et fibroblastes SV40.

Les nombreuses études concernant la biosynthèse et le trafic de la cathepsine D nous fournissent les données nécessaires pour pouvoir comparer, mais aussi contrôler, les résultats que nous obtenons pour la cathepsine C. Comme nous l'avons expliqué, les résultats que nous avons obtenus pour la cathepsine C diffèrent des résultats connus pour la cathepsine D pour deux raisons: nous n'observons que des bandes correspondant à la forme précurseur de la cathepsine C dans les extraits cellulaires, et généralement aucune bande correspondant à la forme précurseur dans les milieux et ce, quel que soit le type de cellules testées. Il nous a semblé important de répéter le même type d'expériences, avec les mêmes lignées cellulaires, en nous intéressant cette fois à la cathepsine D pour laquelle des résultats nous sont disponibles dans la littérature.

La forme précurseur de 52 kDa de la cathepsine D subit, lors de son transport intracellulaire, un processus de maturation protéolytique produisant la forme mature lysosomale de 31 kDa. Nous avons commencé par réaliser de la même façon des expériences de western blotting, en utilisant l'anticorps anti-cathepsine D humaine, sur les cellules HepG2 (Fig. 13).

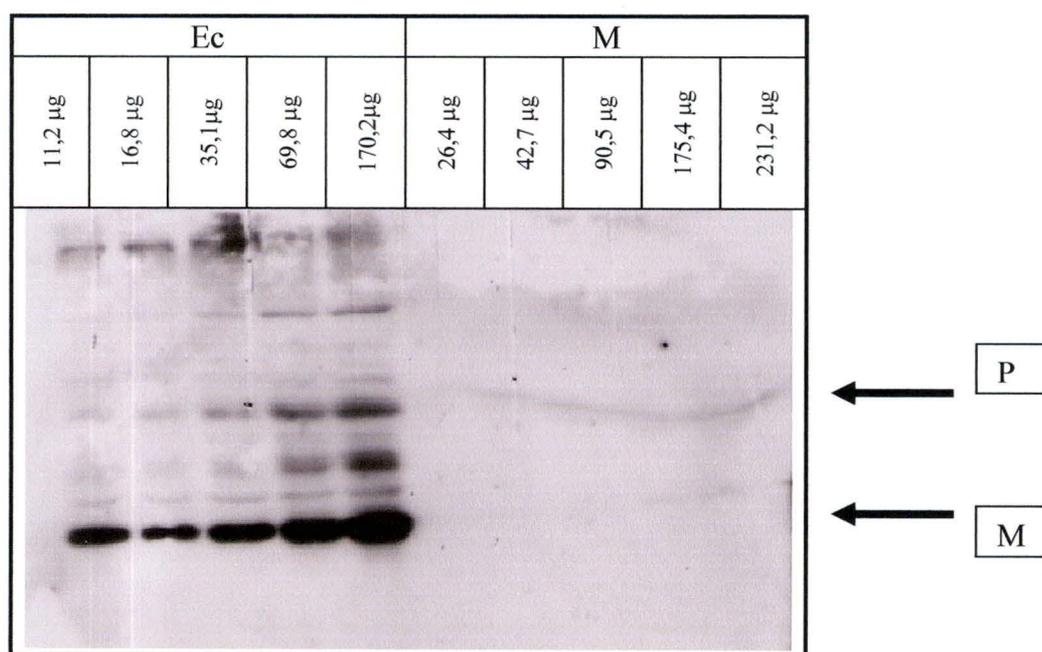


Fig. 13: Visualisation de la cathepsine D par western blotting dans les milieux de culture et les extraits cellulaires des cellules HepG2. Les cellules HepG2 ont été cultivées dans des boîtes de petri de 10 cm de diamètre. Trois jours plus tard, quand les cellules sont confluentes, nous récoltons les milieux de culture, nous lavons les cellules au PBS et nous les lysons. Nous avons chargé des quantités croissantes d'extraits cellulaires (Ec) et de milieux (M) correspondants sur un gel d'électrophorèse à 15 % (la quantité de matériel chargé est indiquée en µg de protéine). Après transfert sur une membrane nous avons recherché la présence de polypeptides dérivés de la cathepsine D par western blotting. La membrane est saturée avec du PBST-lait puis incubée pendant 1 heure avec l'anticorps anti-cathepsine D humaine dilué 1/3000. Après rinçage, elle est incubée avec l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase dilué 1/1000.

Au niveau des extraits cellulaires, nous observons les résultats attendus avec des bandes dont le poids moléculaire d'environ 52 kDa (la moyenne observée est à 52 kDa +/- 2 SD sur 6 mesures) peut correspondre à la forme précurseur (notée par la suite P) de la cathepsine D. Nous observons également des bandes dont le poids moléculaire est compris entre 38 et 31 kDa (la moyenne observée est à 32 kDa +/- 6 SD sur 6 mesures) correspondant à la forme mature (notée M par la suite) de la cathepsine D. Nous observons que l'intensité des bandes correspondant aux différentes formes de la cathepsine D diffère. L'intensité des bandes correspondant à la forme mature est logiquement (en tenant compte de la technique de détection utilisée et du temps de demi-vie de la cathepsine D) beaucoup plus importante que celle des autres formes de la cathepsine D.

Nous pouvons donc observer la forme précurseur et la forme mature de la cathepsine D dans les extraits cellulaires alors que nous ne pouvions pas observer de forme mature pour la cathepsine C dans les expériences précédentes.

Nous n'observons les bandes correspondant au précurseur de la cathepsine D que dans les extraits cellulaires, aucune bande précurseur n'est clairement détectée dans les milieux de culture correspondants, contrairement à ce qui est écrit dans la littérature (Isidoro et al., 1997). Cela peut être dû à une quantité trop faible de précurseurs dans les milieux.

Cependant, certaines expériences de western blotting présentées dans la littérature, sont réalisées après concentration des échantillons au moyen, par exemple, d'une colonne de chromatographie sur Con A-Sépharose (Kawabata et al., 1993). Ce qui pourrait expliquer la différence de résultats obtenus. Quoi qu'il en soit, ces observations réalisées à l'aide de l'anticorps anti-cathepsine D nous incitent à la plus grande prudence pour interpréter la non détection de la procathepsine C dans les milieux de culture cellulaire (Fig. 9, 10 et 11).

La sécrétion de forme précurseur dans les milieux de culture peut être nettement plus visible suite à l'ajout de chlorure d'ammonium dans les milieux de culture. Etant donné que la sécrétion de la forme précurseur de la cathepsine D dans les milieux de culture des cellules HepG2 n'est pas facilement détectable, nous avons décidé de répéter le même genre d'expériences après avoir traité les cellules à l'aide du NH_4Cl .

1.2. Effet du chlorure d'ammonium sur la sécrétion de la cathepsine C

La sécrétion de forme précurseur de certaines hydrolases dans les milieux de culture peut parfois être nettement plus élevée sous l'effet du chlorure d'ammonium.

Rappelons que les enzymes lysosomales sont dirigées vers les lysosomes par l'intermédiaire du récepteur au Man 6-P. Normalement, dans les endosomes, sous l'effet de l'acidification, l'enzyme lysosomale se sépare du récepteur. Mais en présence de bases faibles, le pH des vésicules acides augmente ce qui empêche cette séparation. Le transport des enzymes lysosomales est donc perturbé. La sécrétion des précurseurs est stimulée.

Le traitement de cellules avec le NH_4Cl , mène donc à la sécrétion de précurseurs d'enzymes nouvellement synthétisés, mais a peu ou pas d'effet sur la rétention des enzymes précédemment synthétisés, les formes matures, résidant dans les lysosomes.

Nous avons donc voulu observer l'effet de cette base faible sur la sécrétion de la procathepsine C.

Les bases faibles, telles que le NH_4Cl , exercent des effets sur le tri, le transport et la maturation de nombreux précurseurs d'enzymes lysosomales dont la cathepsine D dans plusieurs lignées de cellules humaines. Ces drogues permettent à la procathepsine D nouvellement synthétisée d'être déroutée vers la voie de sécrétion. Le degré d'inhibition de la ségrégation (ou la quantité de protéines qui sont déroutées) change en fonction des types de cellules humaines étudiées.

L'utilisation du chlorure d'ammonium présente un double intérêt pour notre étude. Outre le fait que cette base faible doit nous renseigner sur la possible hypersécrétion de la procathepsine C, nous pourrions aussi espérer l'utiliser pour étudier la réponse relative des différentes lignées cellulaires au NH_4Cl . Les différentes lignées cellulaires sont en effet décrites comme étant plus ou moins sensibles au chlorure d'ammonium; elles sécrètent des quantités différentes de précurseurs dans les milieux de culture.

Nous avons d'abord vérifié si nous obtenions les résultats décrits dans la littérature pour la cathepsine D, dans les divers types cellulaires étudiés, sous l'effet du chlorure d'ammonium, avant d'entamer le même travail en ce qui concerne la cathepsine C. Nous avons commencé par étudier l'effet du NH_4Cl sur la sécrétion de la cathepsine D dans les cellules HepG2 (Fig. 14).

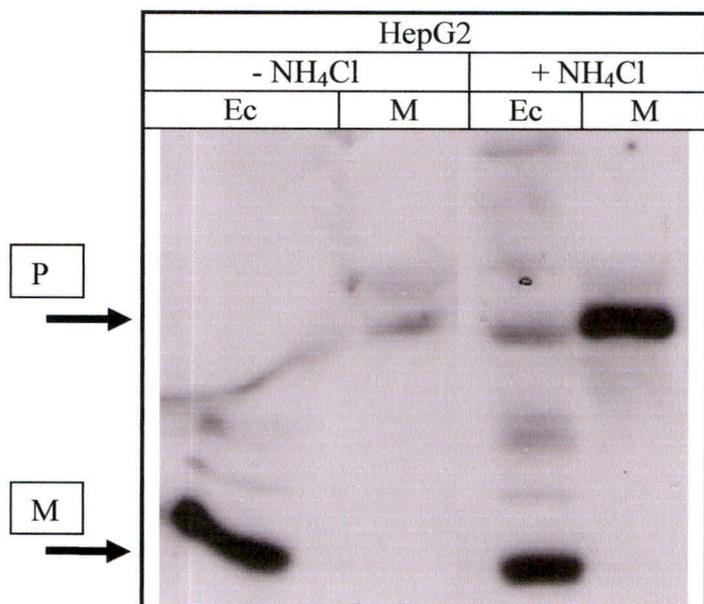


Fig. 14: Visualisation par western blotting de l'effet du NH_4Cl sur la sécrétion de la cathepsine D dans les cellules HepG2 (Fig. 14) en absence et en présence de NH_4Cl . Les cellules ont été cultivées dans des boîtes de petri de 10 cm de diamètre. Elles ont été incubées pendant une nuit en absence ou en présence de NH_4Cl . Nous avons récolté les milieux de culture, lavé les cellules au PBS et nous les avons lysées (voir méthodes). Nous avons chargé 69,7 μg de protéine pour les extraits cellulaires (Ec) et 49,7 μg de protéine pour les milieux correspondants (M) sur un gel d'électrophorèse à 15 % (les milieux sont concentrés environ 2,5 fois). Après transfert sur une membrane nous avons recherché la présence de polypeptides dérivés de la cathepsine D par western blotting. La membrane est saturée avec du PBST-lait puis incubée pendant 1 heure avec l'anticorps anti-cathepsine D humain dilué 1/3000. Après rinçage, elle est incubée avec l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase dilué 1/1000.

Pour observer l'effet du chlorure d'ammonium sur la sécrétion de la forme précurseur de la cathepsine D, nous avons incubé les cellules HepG2 pendant une nuit en absence ou en présence de NH_4Cl .

Nous observons, dans les extraits cellulaires des HepG2 (Fig. 14), des bandes correspondant aux formes précurseur et mature de la cathepsine D. Au niveau du milieu de culture des cellules non traitées, nous retrouvons, dans cette expérience, un signal faible correspondant à la forme précurseur de la cathepsine D sécrétée. Les résultats obtenus correspondent ici à ce qui est décrit dans la littérature. La présence de NH_4Cl fait apparaître nettement une hypersécrétion de la cathepsine D dans les milieux. De plus, en présence de chlorure d'ammonium, nous observons peut-être une légère diminution de l'intensité de la bande correspondant à la forme mature dans les extraits cellulaires traités au chlorure d'ammonium.

Nous avons ensuite voulu observer l'effet de la base faible NH_4Cl sur la sécrétion de précurseur de la cathepsine C dans les cellules HepG2 et MDA-MB-231 (fig. 15) et dans les cellules WI38 (résultats non montrés). Après avoir incubé les cellules pendant une nuit en présence et en absence de NH_4Cl nous avons récolté les milieux de culture et les homogénats cellulaires correspondants. Nous avons concentré les milieux environ 2,5 fois. Et nous avons chargé les échantillons sur le gel d'électrophorèse 15 %.

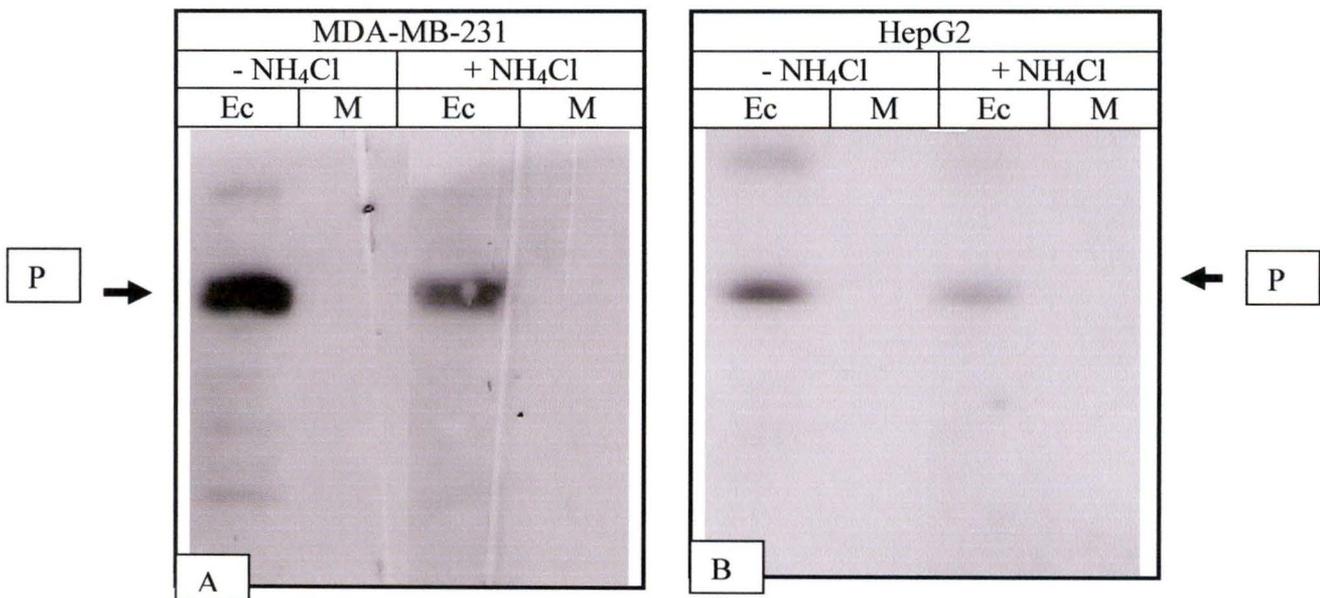


Fig. 15: Visualisation par western blotting de l'effet du NH_4Cl sur la sécrétion de la cathepsine C dans les cellules HepG2 (Fig. 15A) et dans les cellules MDA-MB-231 (Fig. 15B) en absence et en présence de NH_4Cl .

Les extraits cellulaires et les milieux ont été obtenus comme pour l'expérience précédente et le western blotting a été réalisé de la même façon (voir légende Fig. 14). Nous avons chargé $69,7 \mu\text{g}$ de protéines pour les extraits cellulaires (Ec) et $49,7 \mu\text{g}$ de protéines pour les milieux correspondants (M) pour les HepG2, et $42,2 \mu\text{g}$ de protéines pour les extraits cellulaires et $68,6 \mu\text{g}$ de protéines pour les milieux en ce qui concerne les cellules MDA-MB-231, sur un gel d'électrophorèse à 15 %. Les milieux sont concentrés environ 2,5 fois.

Nous observons (Fig. 15) des bandes d'environ 58-53 kDa correspondant à la forme précurseur de la cathepsine C uniquement au niveau des extraits cellulaires. Les mêmes résultats sont observés pour tous les types cellulaires étudiés. Même après traitement au chlorure d'ammonium, nous n'observons pas l'apparition, dans les milieux, de bandes correspondant à la forme précurseur de la cathepsine C dans aucune des lignées cellulaires étudiées. Nous observons seulement, pour ces deux lignées, que l'intensité de la bande correspondant à la forme précurseur de la cathepsine C est diminuée au niveau des extraits cellulaires.

Au vu de ces résultats nous nous sommes demandé si le fait de ne pas voir de forme précurseur de la cathepsine C dans les milieux de culture, non traités et après traitement au chlorure d'ammonium, était dû aux propriétés intrinsèques des cellules HepG2 et MDA-MB-231 qui ne sécrèteraient pas la forme précurseur de la cathepsine C de manière naturelle, ni suite au traitement au chlorure d'ammonium, ou si l'absence de bandes correspondant à la forme précurseur de la cathepsine C pourrait s'expliquer par le fait que nous n'ajoutons pas d'inhibiteurs de protéases dans les milieux de culture récoltés. Nous allons, dans les expériences suivantes, ajouter les inhibiteurs de protéases dans les milieux récoltés pour voir s'il se pourrait que les formes sécrétées de la cathepsine D et C soient dégradées, ce qui expliquerait qu'elles ne soient alors plus visibles.

Nous avons également, par la suite, essayé une autre technique de lavage, recommandée pour le western blotting (Harlow & Lane, 1988). Nous avons remplacé le PBST lait habituel par du PBST-BSA 3 %. Malheureusement cette technique s'est avérée donner des images moins nettes.

Nous avons voulu étudier, comme précédemment, l'effet du chlorure d'ammonium sur la sécrétion de la cathepsine D dans les cellules HepG2 (Fig. 16A) et dans les cellules MDA-MB-231 (Fig. 16B). Nous avons cette fois ajouté les inhibiteurs de protéases dans les milieux récoltés. Ces protéases vont donc être inhibées et ne pourront pas dégrader les formes précurseurs éventuellement sécrétées dans les milieux.

Ces résultats nous montrent, dans les extraits cellulaires des deux lignées cellulaires étudiées, des bandes de 52 kDa et de 31 kDa correspondant respectivement aux formes précurseurs et matures de la cathepsine D (Fig. 16A et 16B). Ces résultats sont fort semblables à ceux qui ont déjà été observés dans les expériences précédentes. Au niveau des milieux on observe des bandes de 52 kDa correspondant à la forme précurseur de la cathepsine D qui a été sécrétée. Cela avait déjà été observé pour les cellules HepG2 (Fig. 14A) sans inhibiteurs de protéase. Dans les milieux traités au chlorure d'ammonium on observe une augmentation de l'intensité des bandes de la forme précurseur sécrétée.

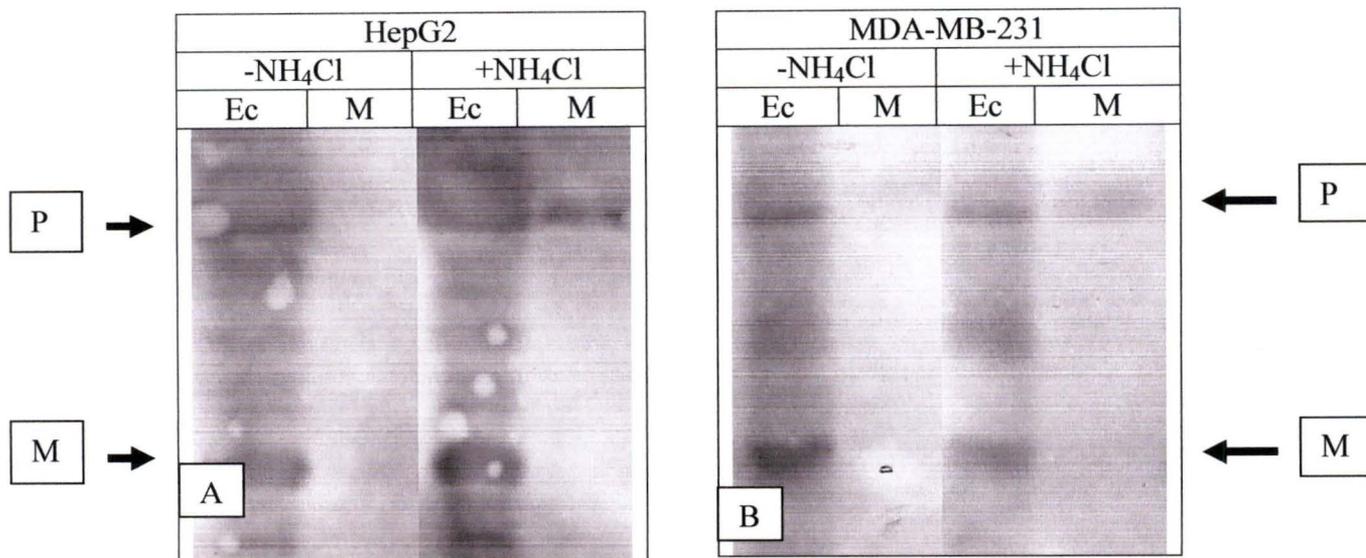


Fig. 16: Visualisation par western blotting de l'effet du NH_4Cl sur la sécrétion de la cathepsine D dans les cellules HepG2 (Fig. 16A) et dans les cellules MDA-MB-231 (Fig. 16B) en absence et en présence de NH_4Cl . Les extraits cellulaires et les milieux ont été obtenus comme pour les expériences précédentes (voir légende Fig. 14) et le western blotting a été réalisé en saturant la membrane avec du PBST-BSA 3 % puis incubée pendant 1 heure avec l'anticorps anti-cathepsine D humain dilué 1/3000. Après rinçage, elle est incubée avec l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase, dilué 1/1000. Nous avons chargé sur un gel d'électrophorèse à 15 %: 69,7 μg de protéines pour les extraits cellulaires (Ec) et 49,7 μg de protéines pour les milieux correspondants (M) pour les HepG2, et 42,2 μg de protéines pour les extraits cellulaires et 68,6 μg de protéines pour les milieux en ce qui concerne les cellules MDA-MB-231.

Nous avons voulu procéder de la même façon pour tester l'effet du NH_4Cl sur la sécrétion de la cathepsine C dans les cellules HepG2 (Fig. 17).

Les résultats obtenus pour la cathepsine C semblent les mêmes que ceux obtenus dans les expériences précédentes, même si ce western blotting est de qualité particulièrement médiocre. Nous observons les bandes correspondant à la forme précurseur de la cathepsine C dans les extraits cellulaires. Mais, nous n'observons toujours pas de forme précurseur au niveau des milieux ni en absence, ni en présence de NH_4Cl , ce qui laisserait penser qu'il n'y aurait, contrairement à la cathepsine D, pas de sécrétion de la cathepsine C que ce soit en absence ou en présence de NH_4Cl .

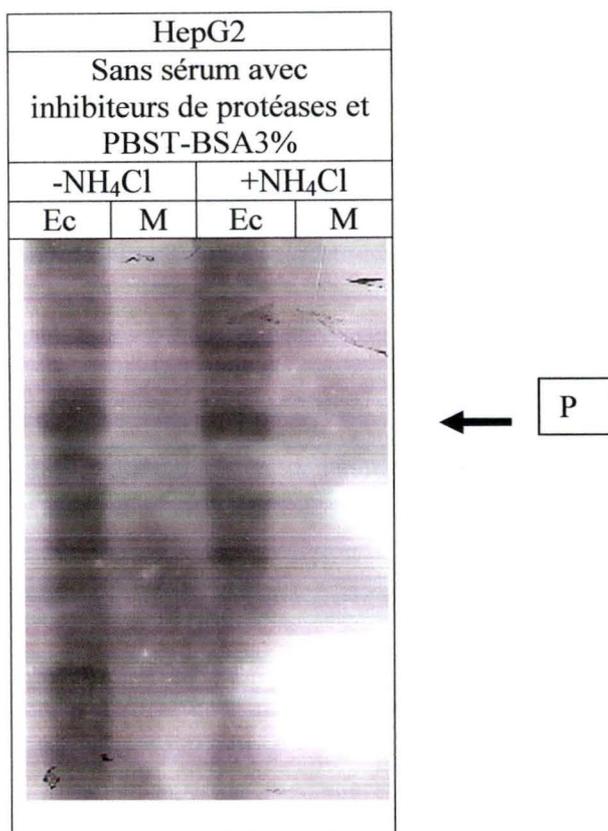


Fig. 17: Visualisation, par western blotting, de l'effet du NH₄Cl sur la sécrétion de la cathepsine C dans les cellules HepG2 en absence et en présence de NH₄Cl. Les extraits cellulaires et les milieux ont été obtenus comme dans les expériences précédentes (voir légende Fig. 14). Le western blotting a été réalisé en saturant la membrane avec du PBST-BSA 3 %, puis en l'incubant pendant 1 heure avec l'anticorps anti-cathepsine C humain dilué 1/300. Après rinçage, elle est incubée avec l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydas dilué 1/1000. Nous avons chargé sur un gel d'électrophorèse à 15 %: 69,7 µg de protéines pour les extraits cellulaires (Ec) et 49,7 µg de protéines pour les milieux correspondants (M). Les milieux sont concentrés environ 2,5 fois.

2. Marquage métabolique et immunoprécipitation

Dans la littérature, il y a relativement peu d'études concernant la maturation et la sécrétion de protéases lysosomales, telles que la cathepsine D, basées sur l'utilisation du western blotting. Une autre façon de procéder beaucoup plus fréquente, dans l'objectif de suivre la biosynthèse d'hydrolases lysosomales, est d'avoir recours à la technique du marquage métabolique suivi d'une immunoprécipitation.

La technique du western blotting permet de visualiser, de façon rapide et propre, les diverses formes de la protéine d'intérêt à l'état stationnaire. Un marquage métabolique court (pulse) suivi éventuellement de temps de chasse (chase) de durées variables permet de visualiser la structure moléculaire du petit groupe de molécules synthétisées pendant le pulse. Ainsi, nous pouvons observer au cours du temps la maturation protéique. Cette méthode a aussi l'avantage d'être plus sensible que la méthode du western blotting.

Nous avons donc réalisé une série de tests permettant de savoir si l'anticorps anti-cathepsine C humaine était à même de réagir avec les polypeptides associés à la cathepsine C, et afin de préciser les conditions optimales de son emploi. Rappelons l'intérêt de cet outil dans les conditions de notre étude qui a pour objectif ultime d'analyser la cathepsine C humaine, sa maturation et la sécrétion éventuelle de son précurseur.

Dans cette première phase de mise au point, nous avons réalisé des marquages longs qui permettent de voir les différentes formes de la cathepsine, puisqu'on est alors arrivé à un moment où la maturation des protéines marquées a eu lieu.

La réalisation d'expériences de marquages métaboliques suivi d'une immunoprécipitation de la cathepsine C nécessitait plusieurs mises aux points. N'ayant que peu de repères au départ nous avons voulu comparer les résultats d'immunoprécipitation de la cathepsine C de rat transfectée dans des cellules Cos, lorsque cette immunoprécipitation est réalisée à l'aide de l'anticorps anti-cathepsine C de rat préparé au laboratoire, ou à l'aide de l'anticorps anti-cathepsine C humaine, principal outil de notre étude. Nous n'avons bien sûr au départ de cette expérience aucune garantie concernant les capacités de l'anticorps, dirigé contre la protéine humaine, à reconnaître la protéine de rat. Un point encourageant à cet égard était toutefois le résultat positif du western blotting réalisé sur les cellules de rat (H4) à l'aide de l'anticorps anti-cathepsine C humaine.

Nous avons donc fait un contrôle sur des cellules Cos transfectées avec l'ADNc codant pour la cathepsine C de rat. L'efficacité de la transfection a été vérifiée par le dosage de l'activité de la cathepsine C dans les extraits cellulaires obtenus. Nous observons (Fig. 18) les résultats attendus pour l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-cathepsine C de rat. Nous pouvons voir la forme précurseur de la cathepsine C de rat (P) à environ 56 kDa. Et dans la zone M allant des poids moléculaires de 25 à 23 kDa nous voyons les chaînes matures de la cathepsine C (Santilman, V., 2002).

Lorsque les mêmes échantillons (extraits cellulaires et milieux) sont cette fois immunoprécipités à l'aide de l'anticorps anti-cathepsine C humaine (Fig. 18B), nous ne reproduisons pas les résultats obtenus avec l'anticorps dirigé contre la protéine de rat. En effet, le produit de l'immunoprécipitation réalisée à partir de l'extrait cellulaire montre une «trainée» de radioactivité qui ne permet pas de voir la forme précurseur même si elle était présente. L'anticorps anti-cathepsine C humain ne permet pas non plus de voir la forme mature de la cathepsine C de rat transfectée. Ces résultats montrent clairement que dans ces conditions, les anticorps anti-cathepsine humains sont incapables de conduire à la précipitation de la cathepsine C de rat transfectée dans les cellules Cos. La différence est tout aussi marquée dans les pistes correspondant aux immunoprécipités réalisés à partir des milieux, où seul l'anticorps dirigé contre la cathepsine C de rat révèle la sécrétion attendue d'une partie du précurseur (Santilman, V., 2002). Même si nous espérons une réaction croisée plus efficace, l'incapacité de l'anticorps anti-humain à immunoprécipiter la protéine de rat, ce n'est pas en soi un résultat surprenant. Il nous a conduits à mettre au point l'immunoprécipitation de la cathepsine C endogène après marquage métabolique de cellules humaines.

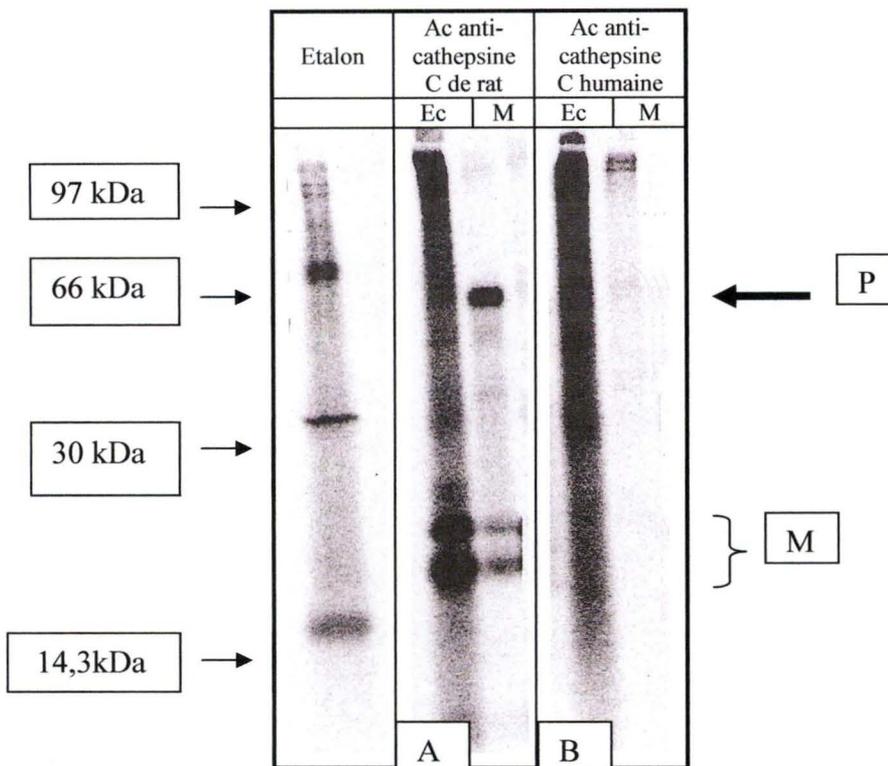


Fig. 18: Marquage métabolique long de la cathepsine C de rat transfectée dans des cellules Cos. Les cellules ont été cultivées dans des boîtes de culture à 6 puits (9 cm²/puits). Elles ont été incubées pendant une nuit en présence ou en absence de NH₄Cl, puis marquées avec de la méthionine ³⁵S radioactive pendant 16 heures. Après marquage métabolique long des cellules, l'immunoprécipitation a été réalisée avec l'anticorps anti-cathepsine C de rat (Fig. 18A) ou avec l'anticorps anti-cathepsine C humaine (Fig 18B).

Les milieux de culture ont été récoltés et les inhibiteurs de protéase y ont été ajoutés. Les cellules ont été lavées au PBS, puis lysées. Les extraits cellulaires (Ec) et les milieux (M) ont été préabsorbés sur la protéine A-Sépharose. Les immunocomplexes ont été obtenus en incubant pendant une nuit les extraits cellulaires et les milieux avec l'anticorps anti-cathepsine C de rat ou l'anticorps anti-cathepsine C humaine. La protéine A-Sépharose a été utilisée ensuite pour aller chercher les complexes antigène-anticorps. Nous avons chargé les échantillons sur un gel d'électrophorèse 15%. Les polypeptides sont visualisés par un appareil CycloneTM.

Des cellules HepG2 ont été marquées pendant 16 heures. Les lysats cellulaires et les milieux de culture ont été récoltés pour y réaliser l'immunoprécipitation de la cathepsine C. Nous avons voulu comparer, dans cette expérience, l'immunoprécipitation réalisée à l'aide de la protéine G ou de la protéine A-Sépharose. Nous avons obtenu des résultats semblables selon les deux méthodes (Fig. 19), et nous avons par la suite utilisé la protéine A-Sépharose pour réaliser les immunoprécipitations.

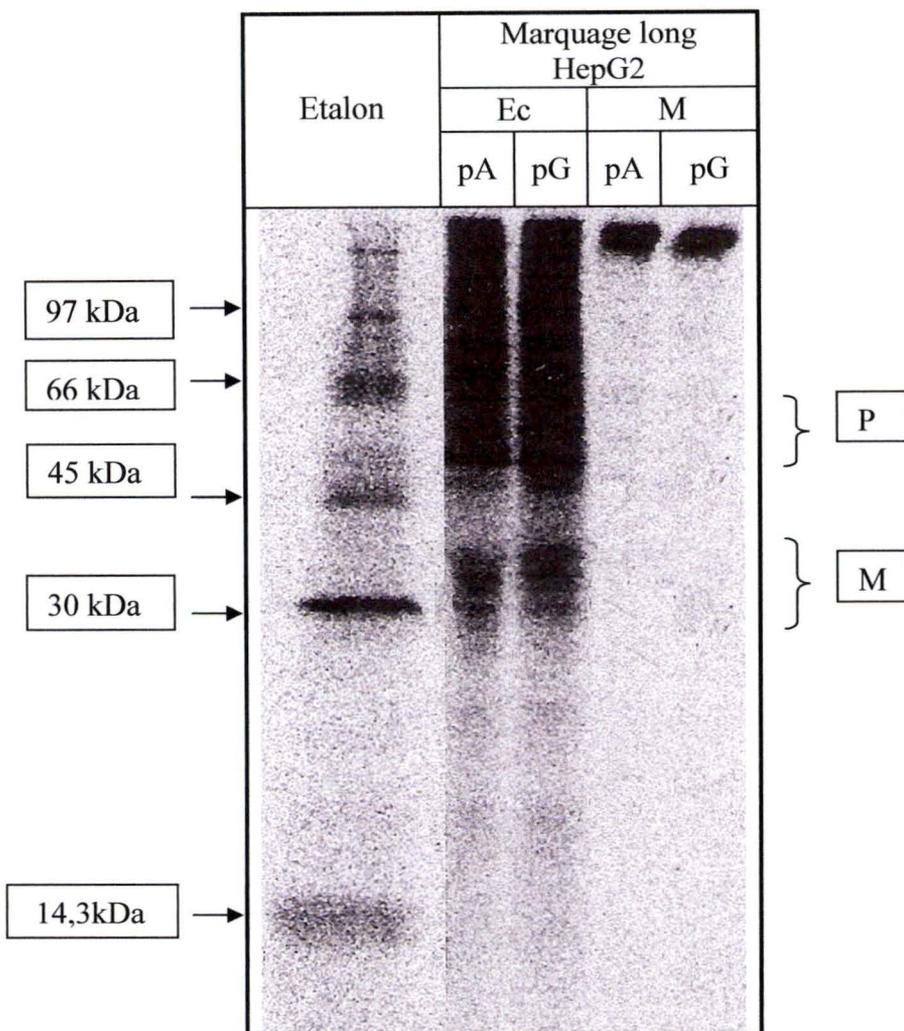


Fig. 19: Marquage métabolique long de la cathepsine C dans les cellules HepG2 et immunoprécipitation avec l'anticorps anti-cathepsine C humain. Les cellules ont été marquées avec de la méthionine ^{35}S radioactive pendant 16 heures. Les milieux de culture ont été récoltés et les inhibiteurs de protéase y ont été ajoutés. Les cellules ont été lavées au PBS puis lysées dans le tampon de lyse non dénaturant. Les extraits cellulaires (Ec) et les milieux (M) ont été préabsorbés avec soit la protéine G (pG) soit la protéine A-Sépharose (pA) et les immunocomplexes ont été réalisés en incubant pendant une nuit les extraits cellulaires avec $10\ \mu\text{l}$ d'anticorps anti-cathepsine C humains et les milieux avec $5\ \mu\text{l}$ d'anticorps. Après lavages des immunoprécipités, réalisés soit à l'aide de la protéine G soit de la protéine A-Sépharose, les échantillons ont été analysés sur un gel d'électrophorèse 15 %. Les polypeptides dérivés de la cathepsine C ont été ensuite visualisés à l'aide d'un appareil CycloneTM.

La qualité de l'immunoprécipitation ne nous permet pas de voir clairement le précurseur. Nous observons en effet un grand nombre de bandes dans la gamme de haut poids moléculaire, là où devrait être visualisée la forme précurseur de la cathepsine C dans les extraits cellulaires (zone P). Par contre, nous pouvons voir, pour la première fois, dans une deuxième zone, un ensemble de chaînes peptidiques de plus faible poids moléculaire de 36 à 22 kDa qui pourraient correspondre aux formes matures de la cathepsine C (Santilman, V., 2002) (indiqué M dans la figure). L'anticorps anti-cathepsine C humain serait donc capable

d'immunoprécipiter des chaînes peptidiques, alors que nous observions seulement la forme précurseur de la cathepsine C par la méthode du western blotting. En ce qui concerne l'immunoprécipitation réalisée à partir des milieux de culture, nous n'observons aucune bande dans les milieux, en accord avec nos résultats de western blotting. Notons la quantité importante de radioactivité qui ne pénètre pas dans le gel. La nature du matériel retrouvé à cet endroit est inconnue.

Nous avons testé différentes conditions en espérant améliorer la qualité de nos immunoprécipitations.

Les profils de migration obtenus ne révèlent pas de différences selon que les échantillons aient été traités ou non avec le DTT. Le DTT n'a apparemment pas d'effet sur la solubilisation des différents polypeptides de la cathepsine C. Dans les expériences suivantes nous utiliserons la solution SOL ne contenant pas de DTT. Comme dans l'expérience précédente, la forme marquée P où devrait apparaître la procathepsine C est couverte d'un grand nombre de chaînes peptidiques. Par contre, plusieurs peptides correspondants vraisemblablement aux formes matures (M) apparaissent plus clairement dans la gamme de 25-30 kDa. Lorsque ce même gel est soumis à une exposition prolongée, nous pouvons voir des signaux apparaître dans les milieux (Fig. 20B). Toutefois, le poids moléculaire de ces peptides ne semble pas correspondre au précurseur de la cathepsine C.

Nous avons essayé de solubiliser les échantillons immunoprécipités dans une solution de solubilisation (SOL) contenant ou non du DTT (Fig. 20). La présence de cet agent réducteur pourrait en effet permettre de dissocier plus aisément les polypeptides et peut-être contribuer à dissocier les agrégats qui ne rentrent pas dans le gel d'électrophorèse (Fig. 19).

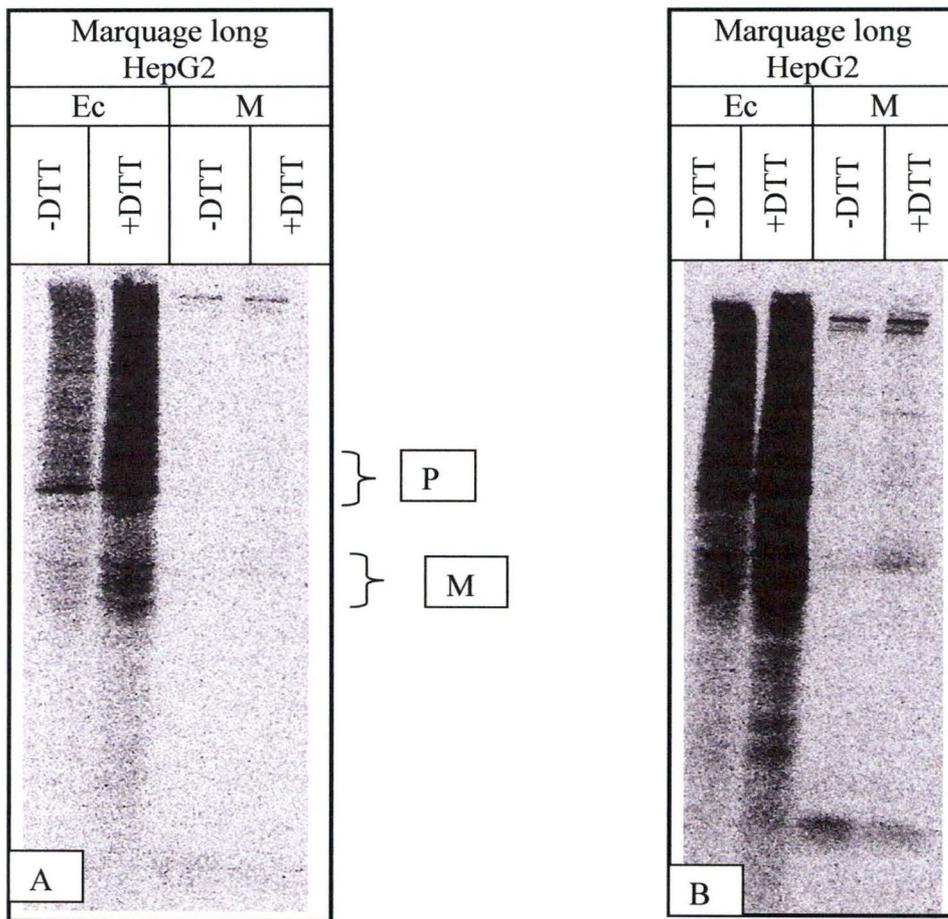


Fig. 20: Visualisation de la cathepsine C après marquage métabolique long des cellules HepG2 et immunoprécipitation avec l'anticorps anti-cathepsine C humaine. Nous voyons ici le même gel exposé pendant 48 heures (Fig. A) ou 72 heures (Fig. B). Le marquage, la récolte des milieux et l'obtention des extraits cellulaires ont été réalisés comme pour l'expérience précédente (voir légende Fig. 19). Les extraits cellulaires (Ec) et les milieux (M) ont été préabsorbés avec la protéine A-Sépharose. Nous avons réalisé les immunocomplexes en incubant pendant une nuit les extraits cellulaires et les milieux avec l'anticorps anti-cathepsine C humaine. Nous avons solubilisé les immunoprécipités obtenus en présence ou en absence de DTT. Nous avons chargé les échantillons sur un gel d'électrophorèse 15 %. Les polypeptides dérivés de la cathepsine C ont été ensuite visualisés à l'aide d'un appareil CycloneTM.

Comme nous l'avons expliqué précédemment, le NH_4Cl pourrait constituer un moyen d'amplifier la sécrétion de la procathepsine C (voir plus haut). Nous avons donc voulu utiliser la technique du marquage métabolique sur des cellules traitées au NH_4Cl et analyser les milieux et les extraits cellulaires. Dans un premier temps nous avons étudié, comme contrôle, la sécrétion de la procathepsine D. Nous avons fait ces expériences sur les cellules HepG2 et MDA-MB-231. Les résultats obtenus étant similaires pour les deux types cellulaires, nous ne montrerons ici que les résultats obtenus sur les cellules HepG2.

Les résultats obtenus pour la cathepsine D en présence et en absence de NH_4Cl pour les cellules HepG2 (Fig. 21A), avec l'anticorps anti-cathepsine D humaine, sont ceux attendus, ils correspondent en effet aux résultats présentés dans la littérature (Isidoro et al., 1997).

Nous observons des bandes correspondant à la forme précurseur de la cathepsine D (P) ayant un poids moléculaire d'environ 50 kDa. Ensuite nous pouvons voir la forme intermédiaire de la cathepsine D dont le poids moléculaire est de 45 kDa (I). Et enfin, la forme mature de la cathepsine D (M) de poids moléculaire de 31 kDa. Nous observons comme il est décrit dans la littérature (Isidoro et al., 1997), une augmentation de l'intensité des bandes correspondant aux formes précurseurs de la cathepsine D dans le milieu qui a été traité au chlorure d'ammonium. Ceci est, rappelons-le, la conséquence d'un déroutage de la procathepsine D vers la voie de la sécrétion suite au dysfonctionnement des MPRs incapables de relarguer leur ligand dans des structures endosomales trop alcalines. Nous observons d'autre part une diminution de l'intensité de la bande correspondant à la forme mature (M) de la cathepsine D dans les extraits cellulaires traités au chlorure d'ammonium, ce qui paraît logique suite au déroutage d'une partie du précurseur.

Ces résultats obtenus pour la cathepsine D humaine, et qui correspondent à ce qui était attendu, nous confirment que la technique que nous utilisons est adaptée. Nous avons donc décidé de réaliser la même expérience en immunoprécipitant cette fois la cathepsine C. Les résultats obtenus en ce qui concerne la cathepsine C humaine ne sont pas clairs (Fig. 21A). Lorsque ce même gel est soumis à une exposition prolongée, nous pouvons voir des signaux apparaître dans les milieux testés au NH_4Cl (Fig. 21B). Nous n'avons aucune certitude quant à l'identité du matériel immunoprécipité dans les milieux dans ces conditions. La zone où devrait se trouver la forme mature de la cathepsine C est notée M'. Il semblerait que la forme précurseur de la cathepsine C (au niveau de P') soit sécrétée dans les milieux de culture en présence de NH_4Cl . Cette expérience devrait être répétée, d'autant que le profil de l'immunoprécipitation obtenue dans les extraits cellulaires, en particulier en absence de NH_4Cl , ne reproduit pas le profil que nous avons observé dans les expériences précédentes (Fig.19 et 20).

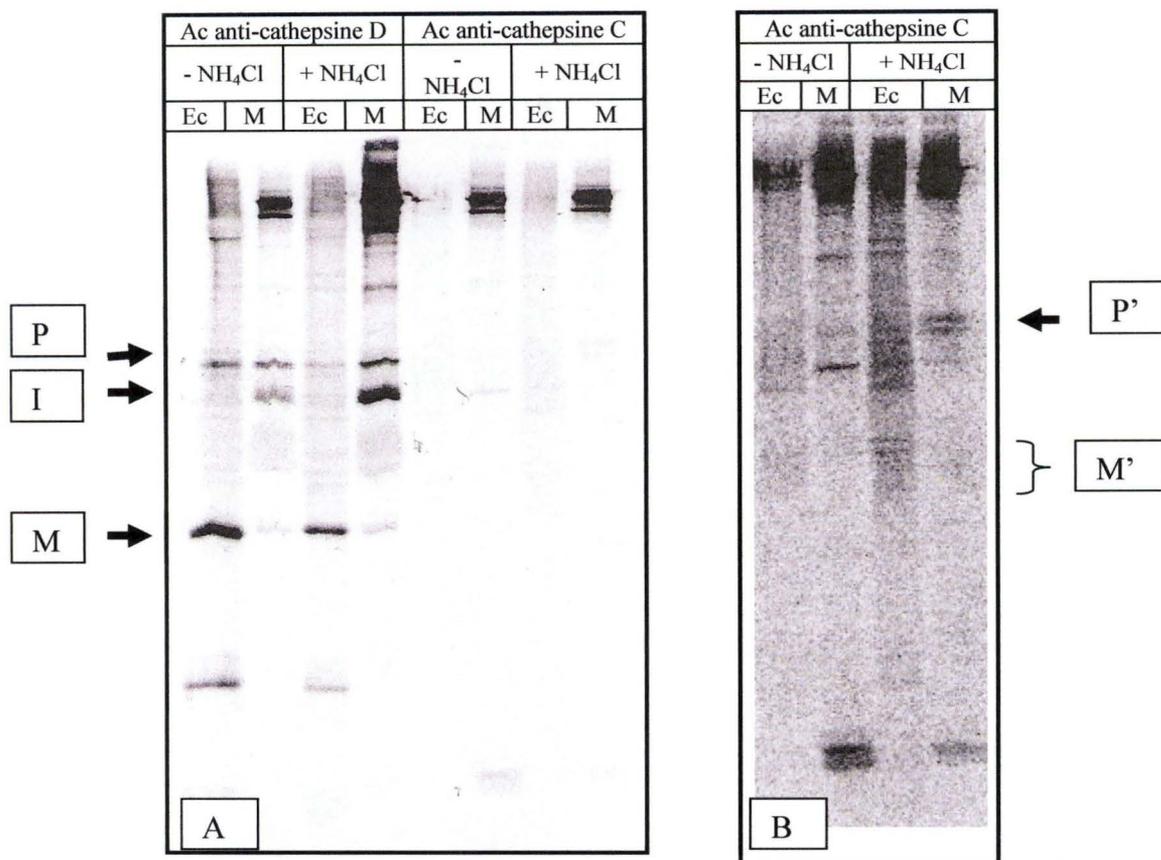


Fig. 21: Effet du chlorure d'ammonium sur la sécrétion de la cathepsine D et de la cathepsine C dans les cellules HepG2. Visualisation après marquage métabolique long des cellules HepG2 et immunoprécipitation avec l'anticorps anti-cathepsine D humaine ou avec l'anticorps anti-cathepsine C humaine. Les cellules ont été cultivées dans des boîtes à 6 puits. Elles ont été incubées pendant une nuit en présence ou en absence de NH₄Cl. Elles ont été marquées avec de la méthionine radioactive pendant 16 heures. Nous avons récolté les milieux de culture et nous y avons ajouté les inhibiteurs de protéase. Nous avons lavé les cellules au PBS et nous les avons lysées. Nous avons préabsorbé les extraits cellulaires (Ec) et les milieux (M) sur la protéine A-Sépharose. Nous avons réalisé les immunocomplexes en incubant pendant une nuit les extraits cellulaires et les milieux avec l'anticorps anti-cathepsine D humaine ou l'anticorps anti-cathepsine C humaine. Nous avons réalisé les différents lavages. Nous avons chargé les échantillons sur un gel d'électrophorèse 15 %. Nous avons ensuite visualisé les polypeptides dérivés à l'aide de l'appareil cyclone. Les figures A et B présentent le même gel soumis à des temps d'exposition différents.

3. Conclusions

L'objectif de ce travail consistait en une première étape vers l'étude du trafic de la cathepsine C humaine. De nombreuses études sur la biosynthèse, la maturation et le trafic de protéases lysosomales ont déjà été réalisées. La cathepsine D a été notamment la plus étudiée. Ces études ont été, entre autres, consacrées au tri perturbé de la cathepsine D dans les cellules tumorales (Isidoro et al., 1997), à une voie indépendante du man 6-P que cette hydrolase acide peut prendre pour arriver aux lysosomes dans les cellules HepG2 (Rijnboutt et al., 1991), et aussi à l'association membranaire de la cathepsine D dans les endosomes de macrophages (Diment et al., 1988).

Des études ont été réalisées au laboratoire sur la cathepsine C au moyen d'un anticorps anti-cathepsine C de rat. Malheureusement, l'anticorps utilisé alors ne permettait pas de réaliser des études sur la cathepsine C humaine car il n'y a pas de réaction croisée. Par la suite, plusieurs essais pour préparer un anticorps anti-cathepsine C humaine sont restés infructueux. Récemment, la mise à disposition dans le commerce d'un anticorps anti-cathepsine C humaine (anti-cathepsine C (H-144) ; SC 13986 Santa Cruz Biotechnology, Inc.) nous a ouvert la possibilité de reprendre les expériences sur le trafic et le ciblage de la cathepsine C dans un modèle humain. Nous avons donc voulu, dans ce travail, tester cet anticorps pour voir dans quelles conditions expérimentales il pourrait éventuellement être utilisé afin de suivre la maturation et la biosynthèse de la cathepsine C humaine dans divers types cellulaires.

Nous avons voulu observer la sécrétion éventuelle des précurseurs de la cathepsine C humaine en conditions normales et en présence de NH_4Cl qui perturbe le tri, le transport et la maturation d'enzymes lysosomales transportées par le CI-MPR. Le transport intracellulaire des précurseurs d'enzymes lysosomales nouvellement synthétisées vers les lysosomes dépend généralement de la reconnaissance spécifique entre leur signal Man 6-P et les récepteurs au Man 6-P (MPRs). Mais plusieurs données expérimentales suggèrent qu'il peut aussi y avoir des mécanismes alternatifs (indépendants de ces récepteurs MPRs) pour le ciblage d'enzymes vers les lysosomes.

Les observations microscopiques, tout à fait préliminaires, réalisées en immunofluorescence dans des cellules humaines montrent que l'anticorps anti-cathepsine C détecte des structures d'apparence vésiculaire très semblables à celles obtenues à l'aide de l'anticorps dirigé contre notre marqueur lysosomal de référence: la cathepsine D.

La détection de la cathepsine C humaine peut se faire en western blotting. Toutefois, nous avons noté, de manière reproductible, une absence de signal pouvant correspondre aux produits de la maturation protéolytique de la cathepsine C. D'autre part, ces expériences nous ont appris que si la procathepsine C est sécrétée dans les milieux de culture des cellules que nous avons testées, elle ne l'est que de façon fort peu marquée. Cette dernière conclusion est toutefois à considérer avec prudence tenant compte de la difficulté avec laquelle nos western blotting ont révélé une sécrétion de procathepsine D dans les milieux.

Par contre, lorsque l'utilisation d'une base faible (NH_4Cl) conduit à l'hypersécrétion attendue de la cathepsine D dans les cellules HepG2, nous n'observons toujours pas de signal extracellulaire pouvant correspondre à la procathepsine C. Si cette absence de sécrétion de la procathepsine C n'est pas liée à un problème dans la technique de détection que nous utilisons, cette observation pourrait suggérer un mécanisme de transport de la procathepsine C particulièrement peu dépendant des récepteurs au mannose 6-phosphate. Si cette observation se vérifiait, il serait intéressant de la considérer en relation avec des résultats plus anciens

obtenus dans notre laboratoire (Burge et al, 1991) et qui montraient une association membranaire de la cathepsine C, indépendante du mannose 6-phosphate. Nos expériences de marquages métaboliques nous ont permis de montrer que cette technique a l'avantage, contrairement au western blotting, de permettre une détection des formes matures de la cathepsine C à l'aide de l'anticorps dirigé contre la protéine humaine. Cette propriété est intéressante si nous voulons dans le futur aborder de manière plus fine le trafic intracellulaire de la cathepsine C. Par contre, en ce qui concerne la sécrétion éventuelle de la procathepsine C, les résultats obtenus à l'aide des marquages métaboliques sont peu convaincants et ce pour deux raisons: premièrement, il nous fut très difficile de détecter de façon univoque une forme moléculaire pouvant correspondre au précurseur (que ce soit dans les extraits cellulaires ou dans les milieux), et deuxièmement, notre unique tentative de détection de la procathepsine C éventuellement libérée dans les milieux suite à l'incubation des cellules en présence de NH_4Cl n'a pas donné de résultats concluants. Considérés dans leur ensemble, nos résultats semblent en tout cas indiquer que le comportement de la procathepsine C ne reproduit pas les observations concernant la cathepsine D rapportées dans la littérature et confirmées par notre travail.

IV. Bibliographie

Andrews, N. W.

Regulated secretion of conventional lysosomes.
Trends Cell Biol. **10**, 316-321 (2000).

Andrews, N. W.

Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship.
J Cell Biol. **158**, 389-394 (2002).

Bao, M., Elmendorf, B. J., Booth, J. L., Drake, R. R. & Canfield, W. M.

Bovine UDP-N-acetylglucosamine: lysosomal-enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransférase. II. Enzymatic characterization and identification of the catalytic subunit.
J Biol Chem. **271**, 31446-31451.

Barrett, A. J.

Human cathepsin D.
Adv Exp Med Biol. **95**, 291-300 (1977).

Bonifacio, J. S.

The GGA proteins: adaptators on the move.
Nat Rev Mol Cell Biol. **5**, 23-32 (2004).

Braulke, T., Geuze, H.J., Slot, J.W., Hasilik, A. & von Figura, K.

On the effects of weak bases and monensin on sorting and processing of lysosomal enzymes in human cells.
Eur J Cell Biol. **43**, 316-21 (1987).

Braulke, T., Tippmer, S., Neher, E. & von Figura, K.

Regulation of mannose 6-phosphate/IGF-II receptor expression at the cell surface by mannose 6-phosphate, insuline-like growth factors, and epidermal growth factor.
EMBO J. **8**, 681-686 (1989).

Braun, M., Waheed, A. & von Figura, K.

Lysosomal acid phosphatase is transported to lysosomes via the cell surface.
EMBO J. **8**, 3633-3640 (1989).

Breuer, P., Korner, C., Boker, C., Herzog, A., Pohlmann, R. & Braulke, T.

Serine phosphorylation site of the 46-kDa mannose 6-phosphate receptor is required for transport to the plasma membrane in Madin-Darby canine kidney and mouse fibroblast cells.
Mol Biol Cell. **8**, 567-576 (1997).

Burge, V., Mainferme, F. & Wattiaux, R.

Transient membrane association of the precursors of cathepsin C during their transfert into lysosomes.
Biochem J. **275**, 797-800 (1991).

Byrd, J. C., Park, J. H., Schaffer, B. S., Garmroudi, F. & MacDonald, R. G.

Dimerization of the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor.
J Biol Chem. **275**, 18647-18656 (2000).

Capony, F., Braulke, T., Rougeot, C., Roux, S., Montcourrier, P. & Rochefort, H.
Specific mannose 6-phosphate receptor-independent sorting of procathepsin D in breast cancer cells.

Exp Cell Res. **215**, 154-163 (1994).

Chao, H. H., Waheed, A., Pohlmann, R., Hille, A. & von Figura, K.
Mannose 6-phosphate receptor dependent secretion of lysosomal enzymes.

Embo J. **9**, 3507-3513 (1990).

Chapman, H.A., Riese, R. J. & Shi, G. P.
Emerging roles for cysteine proteases in human biology.

Annu Rev Physiol. **59**, 63-88 (1997).

Chen, H. J., Yuan, J. & Lobel, P.

Systematic mutational analysis of the cation independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor cytoplasmic domain. An acidic cluster containing a key aspartate is important for function in lysosomal enzyme sorting.

J Biol Chem. **272**, 7003-7012 (1997).

Cigic, B., Dahl, S. W. & Pain, R. H.

The residual pro-part of cathepsin C fulfills the criteria required for an intramolecular chaperone in folding and stabilizing the human proenzyme.

Biochemistry. **39**, 12382-12390 (2000).

Cigic, B., Krizaj, I., Kralj, B., Turk, V., Pain, R. H.

Stoichiometry and heterogeneity of the pro-region chain in tetrameric human cathepsin C.

Biochim Biophys Acta. **1382**, 143-150 (1998).

Cigic, B. & Pain, R. H.

Competitive inhibition of cathepsin C by guanidinium ions and re-examination of substrate inhibition.

Biochem Biophys Res Commun. **258**, 6-10 (1999).

Clair, J. M-S., Pham, C. T.N., Villalta, S. A., Caughey, G. H. & Wolters, P. J.

Mast cell dipeptidyl peptidase I mediates survival from sepsis.

J Clin Invest. **113**, 628-634 (2004).

Colella, R. & Casey, S. F.

Decreased activity of cathepsins L + B and decreased invasive ability of PC3 prostate cancer cells.

Biotech Histochem. **78**, 101-108 (2003).

Dahms, N. M. & Hancock, M. K.

P-type lectins.

Biochim Biophys Acta. **1572**, 317-340 (2002).

Dahms, N. M. & Kornfeld, S.

The cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Structural requirements for mannose 6-phosphate binding and oligomerization.

J Biol Chem. **264**, 11458-11467 (1989).

- Dahms, N. M., Lobel, P. & Kornfeld, S.
Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting.
J Biol Chem. **264**, 12115-12118 (1989).
- de Duve, C. & Wattiaux, R.
Functions of lysosomes.
Annu Rev Physiol. **28**, 435-492 (1966).
- Dell'Angelica, E. C., Mullins, C., Caplan, S. & Bonifacino, J. S.
Lysosome-related organelles.
Fased J. **14**, 1265-1278 (2000).
- Dell'Angelica, E. C. & Payne, G. S.
Intracellular cycling of lysosomal enzyme receptors: cytoplasmic tails' tales.
Cell. **106**, 395-398 (2001).
- Diaz, E. & Pfeffer, S. R.
TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking.
Cell. **93**, 433-443 (1998).
- Diment, S., Leech, M. S. & Stahl, P. D.
Cathepsin D is membrane-associated in macrophage endosomes.
J Biol Chem. **263**, 6901-6907 (1988).
- Dittmer, F., Pohlmann, R. & von Figura, K.
The phosphorylation pattern of oligosaccharides in secreted procathepsin D is glycosylation site-specific and independent of the expression of mannose 6-phosphate receptors.
J Biol Chem. **272**, 852-858 (1997).
- Dolenc, I., Turk, B., Pungercic, G., Ritonja, A. & Turk, V.
Oligomeric structure and substrate induced inhibition of human cathepsin C.
J Biol Chem. **270**, 21626-21631 (1995).
- Faulhaber, J., Fensom, A. & Hasilik, A.
Abnormal lysosomal sorting with an enhanced secretion of cathepsin D precursor molecules bearing monoester phosphate groups.
Eur J Cell Biol. **77**, 134-140 (1998).
- Gabel, C. A., Goldberg, D. E. & Kornfeld, S.
Identification and characterization of cells deficient in the mannose 6-phosphate receptor: evidence for an alternate pathway for lysosomal enzyme targeting.
Proc Natl Acad Sci U S A. **80**, 775-779 (1983).
- Gieselmann, V., Pohlmann, R., Hasilik, A. & von Figura, K.
Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultured human fibroblasts.
J Cell Biol. **97**, 1-5 (1983).

- Glondou, M., Coopman, P., Laurent-Matha, V., Garcia, M., Rochefort, H. & Liaudet-Coopman, E.
A mutated cathepsin-D devoid of its catalytic activity stimulates the growth of cancer cells.
Oncogene. **18**, 6920-6929 (2001)
- Gruenberg, J.
The endocytic pathway: a mosaic of domains.
Nat Rev Mol Cell Biol. **2**, 721-730 (2001).
- Harlow, Ed., Lane, D.,
Antibodies a laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory. 497 (1988).
- Hasilik, A.
The early and late processing of lysosomal enzymes: proteolysis and compartmentation.
Experientia. **48**, 130-151 (1992).
- Hille-Rehfeld, A.
Mannose 6-phosphate receptors inserting and transport of lysosomal enzymes.
Biochim Biophys Acta. **1241**, 177-194 (1995).
- Horn, M., Baudys, M., Voburka, Z., Kluh, I., Vondrsek, J. & Mares, M.
Free-thiol Cys331 exposed during activation process is critical for native tetramer structure of cathepsin C (dipeptidyl peptidase I).
Protein Sci. **11**, 933-943 (2002).
- Isidoroh, K., Muno, D., Sato, N. & Kominami, E.
Molecular cloning of cDNA for rat cathepsin C. Cathepsin C, a cysteine proteinase with an extremely long propeptide.
J Biol Chem. **266**, 16312-16317 (1991).
- Isidoro, C., Baccino, F. M. & Hasilik, A.
Mis-sorting of procathepsin D in metastogenic tumor cells is not due to impaired synthesis of the phosphomannosyl signal.
Int J Cancer. **70**, 561-566 (1997).
- Johnson, K. F. & Kornfeld, S.
A His-Leu-Leu sequence near the carboxyl terminus of the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is necessary for the lysosomal enzyme sorting function.
J Biol Chem. **267**, 17110-17115 (1992).
- Kawabata, T., Nishimura, Y., Higaki, M., Kato, K.
Purification and processing of rat liver procathepsin B.
J Biochem. **113**, 389-394 (1993).
- Kornfeld, S.
Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors.
Annu Rev Biochem. **61**, 307-330 (1992).

- Kornfeld, S. & Mellman, I.
The biogenesis of lysosomes.
Annu Rev Cell Biol. **5**, 483-525 (1989).
- Kundra, R. & Kornfeld, S.
Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis.
J Biol Chem. **274**, 31039-31046 (1999).
- Kyle, J. W., Nolan, C. M., Oshima, A., Sly, W. S.
Expression of human cation-independent mannose 6-phosphate receptor cDNA in receptor-negative mouse P388D₁ cells following gene transfer.
J. Biol. Chem. **263**, 16230-16235 (1989).
- Le Borgne, R. & Hoflack, B.
Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells.
Biochim Biophys Acta. **1404**, 195-209 (1998).
- Luzio J. P., Rous, B. A., Bright, N. A., Pryor, P. R., Mullock, B. M. & Piper, R. C.
Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis.
J Cell Sci. **113 (Pt 9)**, 1515-1524 (2000).
- Mahajan, V.K., Thakur, N.S., Sharma, N.L.
Papillon-Lefèvre Syndrome.
Indian Pediatrics **40**, 1197-1200 (2003).
- Mallen-St Clair, J., Pham, C. T., Villalta, S. A., Caughey, G.H. & Wolters, P.J.
Mast cell dipeptidyl peptidase I mediates survival from sepsis.
J. Clin. Invest. **113**, 628-634 (2004).
- Mainferme, F., Wattiaux, R. & von Figura, K.
Synthesis, transport and processing of cathepsin C in morris hepatoma 7777 cells and rat hepatocytes.
Eur J Biochem. **153**, 211-216 (1985).
- McDonald, J. K., Zeitman, B. B., Reilly, T. J. & Ellis, S.
New observations on the substrate specificity of cathepsin C (dipeptidyl aminopeptidase I). Including the degradation of beta-corticotropin and other peptide hormones.
J Biol Chem. **244**, 2693-2709 (1969).
- McGrath, M. E.
The lysosomal cysteine proteases.
Annu Rev Biophys Biomol Struct. **28**, 181-204 (1999).
- McGuire, M. J., Lipsky, P. E. & Thiele, D. L.
Generation of active myeloid and lymphoid granule serine proteases requires processing by the granule thiol protease dipeptidyl peptidase I.
J Biol Chem. **266**, 2458-2467 (1993).

- McIntyre, G. F. & Erickson, A. H.
Procathepsins L and D are membrane-bound in acidic microsomal vesicles.
J Biol Chem. **266**, 15438-15445 (1991).
- Muno, D., Ishidoh, K., Ueno, T. & Kominami, E.
Processing and transport of the precursor of cathepsin C during its transfer into lysosomes.
Arch Biochem Biophys. **306**, 103-110 (1993).
- Mullins, C. & Bonifacino, J. S.
The molecular machinery for lysosome biogenesis.
Bioessays. **23**, 333-343 (2001).
- Nichols, B & Lippincott-Schwartz, J.
Endocytosis without clathrin coats.
Trends Cell Biol. **11**, 406-412 (2001).
- Nolan, C. M., Creek, K. E., Grubb, J. & Sly, W. S.
Antibody to the phosphomannosyl receptor inhibits receptor recycling in fibroblasts.
J Cell Biochem. **35**, 137-151 (1987).
- Olsen, J. G., Kadziola, A., Lauritzen, C., Pedersen, J., Larsen, S. & Dahl, S. W.
Tetrameric dipeptidyl peptidase I directs substrate specificity by use of the residual pro-part domain.
FEBS Lett. **506**, 201-206 (2001).
- Powell, R., Ren, J., Lewith, G., Barclay, W., Holgate, S. & Almond, J.
Identification of novel expressed sequences, up-regulated in the leucocytes of chronic fatigue syndrome patients.
Clin Exp Allergy. **33**, 1-7 (2003).
- Puertollano, R., Aguilar, R. C., Gorshkova, I., Crouch, R. J. & Bonifacino, J. S.
Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs.
Science. **292**, 1712-1716 (2001).
- Rao, N.V., Rao, G. V. & Hoidal, J. R.
Human dipeptidyl-peptidase I. Gene characterization, localization, and expression.
J Biol Chem. **272**, 10260-10265 (1997).
- Reddy, A., Caler, E. V. & Andrews, N. W.
Plasma membrane repair is mediated by Ca(+2)-regulated exocytosis of lysosomes.
Cell. **106**, 157-169 (2001).
- Rijnboutt, S., Aerts, H. M., Geuze, H. J., Tager, J. M. & Strous, G. J.
Mannose 6-phosphate-independent membrane association of cathepsin D, glucocerebrosidase, and sphingolipid-activating protein in HepG2 cells.
J Biol Chem. **266**, 4862-4868 (1991a).
- Rijnboutt, S., Kal, A. J., Geuze, H. J., Aerts, H. & Strous, G. J.
Mannose 6-phosphate-independent targeting of cathepsin D to lysosomes in HepG2 cells.
J Biol Chem. **266**, 23586-23592 (1991b).

Rijnboutt, S., Stoorvogel, W., Geuze, H. J. & Strous, G. J.
Identification of subcellular compartments involved in biosynthetic processing of cathepsin D.

J Biol Chem. **267**, 15665-15672 (1992).

Rochefort, H.

Cathepsin D in breast cancer.

Breast Cancer Res Treat. **16**, 3-13 (1990)

Rodriguez, A., Webster, P., Ortego, J. & Andrews, N. W.

Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells.

J Cell Biol. **137**, 93-104 (1997).

Rouillé, Y., Rohn, W. & Hoflack, B.

Targeting of lysosomal proteins.

Cell & Develop Biol. **11**, 165-171 (2000).

Santilman, V.

Importance du propeptide dans la maturation biosynthétique de la cathepsine C de rat.

Presses universitaires de Namur. (2002).

Santilman, V., Jadot, M. & Mainferme, F.

Importance of the propeptide in the biosynthetic maturation of rat cathepsin C.

Eur J Cell Biol. **81**, 654-663 (2002).

Selvaraju, V., Markandaya, M., Venkata, P., Prasad, S., Sathyan, P., Sethuraman, G., Srivastava, S.C., Thakker, N. & Kumar, A. (2003) Mutation analysis of the cathepsin C gene in Indian families with Papillon-Lefèvre syndrome, *BMC Medical Genetics*, 4,

Sleat, D. E. & Lobel, P.

Ligand binding specificities of the two mannose 6-phosphate receptors.

J Biol Chem. **272**, 731-738 (1997).

Sohar, I., Sleat, D., Gong Liu, C., Ludwig, T. & Lobel, P.

Mouse mutants lacking the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor are impaired in lysosomal enzyme transport: comparison of cation-independent and cation-dependent mannose 6-phosphate receptor-deficient mice.

Biochem J. **330**, 903-908 (1998).

Stein, M., Zijderhand-Bleekemolen, J. E., Geuze, H., Hasilik, A. & von Figura, K.

Mr 46,000 mannose 6-phosphate specific receptor: its role in targeting of lysosomal enzymes.

EMBO J. **6**, 2677-2681 (1987).

Tikkanen, R., Obermuller, S., Denzer, K., Pungitore, R., Geuze, H. J., von Figura, K. & Honing, S.

The dileucine motif within the tail of MPR46 is required for sorting of the receptor in endosomes.

Traffic. **1**, 631-640 (2000).

Turk, B., Turk, D. & Turk, V.

Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers.

Biochim Biophys Acta. **1477**, 98-111 (2000).

Turk, B., Turk, V. & Turk, D.

Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors.

Biol Chem. **378**, 141-150 (1997).

Turk, D., Janjic, V., Stern, I., Podobnik, M., Lamba, D., Dahl, S. W., Lauritzen, C., Pedersen, J., Turk, V. & Turk, B.

Structure of human dipeptidyl peptidase I (cathepsin C): exclusion domain added to an endopeptidase framework creates the machine for activation of granular serine proteases.

Embo J. **20**, 6570-6582 (2001a).

von Figura, K. & Hasilik, A.

Lysosomal enzymes and their receptors.

Annu Rev Biochem. **55**, 167-193 (1986).

Warner, J. B., Thalhauser, C., Tao, K. & Sahagian, G. G.

Role of N-linked oligosaccharide flexibility in mannose phosphorylation of lysosomal enzyme cathepsin L.

J Biol Chem. **277**, 41897-41905 (2002).

Yaghootfam, A., Schestag, F., Dierks, T. & Gieselmann, V.

Recognition of arylsulfatase A and B by the UDP-N-acetylglucosamine: lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-phosphotransferase, *J Biol Chem.* **278**, 32653-32661 (2003).

SECRETARIAT BIOLOGIE
F.U.N.D.P.
Rue de Bruxelles, 59
B 5000 NAMUR (Belgique)
Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20

25 AOUT 2004