



THESIS / THÈSE

MASTER IN BIOLOGY

Etude de l'effet d'une surcharge lysosomale sur l'activité transcriptionnelle de la cellule

Goblet, Sophie

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

**Étude de l'effet d'une surcharge lysosomale sur l'activité
transcriptionnelle de la cellule**

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

Sophie GOBLET

Juin 2004

Étude de l'effet d'une surcharge lysosomale sur l'activité transcriptionnelle de la cellule

GOBLET Sophie

Résumé

Les organites subcellulaires tels que les mitochondries, le réticulum endoplasmique ou les lysosomes ne sont pas des entités isolées au sein des cellules. Il est à présent bien établi que ces organites communiquent avec le noyau, particulièrement en cas de dysfonctionnement. Cette communication moléculaire rétrograde induit souvent, *in fine*, une modification de l'expression de gènes nucléaires. Des avancées récentes montrent qu'une communication moléculaire semble également exister entre le lysosome et le noyau. Cet organite est responsable de nombreuses pathologies associées à un phénomène de surcharge lysosomale induite par l'accumulation de matériel non dégradé dans l'organite. Cependant, contrairement à la communication initiée par la mitochondrie ou le réticulum endoplasmique qui commence à être décrite, on ne connaît rien des mécanismes impliqués dans la communication moléculaire, ni des voies de signalisation activées entre le lysosome altéré et le noyau.

Dans ce travail, nous avons exploité un modèle de surcharge lysosomale induite par une accumulation de saccharose sur des cellules 143B, un type cellulaire différent de celui auquel il est communément fait appel pour ce type de travaux dans la littérature. Nous avons validé ce modèle en étudiant la réponse cellulaire à la surcharge par une analyse du niveau d'expression et de maturation de plusieurs marqueurs lysosomaux comme LAMP-1, LAMP-2 et la cathepsine D. Nous avons également dosé l'activité de plusieurs hydrolases acides dans ces conditions.

Le concept de communication rétrograde implique que le lysosome renseigne le noyau sur son état d'activité à travers l'activation de facteurs de transcription capables de modifier l'expression de gènes nucléaires codant en particulier pour des protéines lysosomales.

Nous avons dès lors recherché des facteurs de transcription susceptibles d'être spécifiquement activés en réponse à une surcharge lysosomale induite par le saccharose. Parmi les facteurs étudiés (GATA-4, NF-kB, c-Myc, AP-1, CREB, YY-1, Sp1, SREBP-1, C/EBP α et β), choisis sur base rationnelle à partir de la littérature et de l'analyse *in silico* de promoteurs de gènes codant pour des protéines lysosomales, nous avons montré que seule l'activation et la translocation nucléaire du facteur SREBP-1 semble être spécifique de la réponse à la surcharge en saccharose. En effet, les autres facteurs étaient également activés par la présence de maltose, un disaccharide dégradé par la cellule et dès lors vraisemblablement inapte à provoquer une surcharge du lysosome. Nous avons donc contribué à mieux comprendre l'effet d'une surcharge lysosomale sur l'état d'activité de plusieurs facteurs de transcription susceptibles de jouer un rôle dans l'expression différentielle de gènes dans ces conditions.

À Thierry Arnould, bourreau infatigable, pour ses critiques franches, son aide ininterrompue et son engagement absolu,

À Michel Jadot, pour son aide, pour sa précision, sa mesure, sa concision et sa parfaite disponibilité,

Pour votre compétence et pour les heures de travail que vous m'avez consacrées ;

À tous ceux qui m'ont aidée, portée et supportée,

À Philippe, qui a merveilleusement accompli cette dure tâche au quotidien,

À mes parents, pour leur support à distance, pour tout ce qu'ils ont toujours fait et font pour moi, pour leur souci de mon bien-être,

À Ann et à Véro, toujours disponibles au bout du fil,

Au bureau des mémorants,

Et à ma Choupi qui, infailliblement, m'a remonté le moral (ou a partagé mes idées noires...),

À tous les sourires du labo : Catherine, Noëlle, Edouard, Christelle, Valérie, François, Martine, Andrée, et tous les autres ;

À tous ceux qui m'ont subie et m'ont accordé une part de leur temps,

Aux membres du jury,

À tous : Merci !

Liste des abréviations

AC	Adénylate Cyclase
ACTH	Adrenocorticotropique Hormone
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNmt	ADN mitochondrial
AMPc	AMP-cyclique
AP-1	Activator Protein-1
Arl7	ADP Ribolysation Factor-Like 7
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ATF	Activating Transcription Factor
ATP	Adénosine triphosphate
b-HLH	basic Helix-Loop-Helix
BSA	Bovine Serum Albumin
b-ZIP	basic-leucine Zipper
C/EBP	CCAAT/Enhancer-Binding Protein
CaMKIV	Calmoduline kinase IV
CBP	CREB Binding Protein
CKII	Casein Kinase II
CMV	Cytomégalovirus
COX	Cyclooxygénase
CRE	cAMP-Responsive Element
CREB	cAMP-Responsive Element-Binding protein
CREM	cAMP-Responsive Element Modulator
Ct	Cycle Treshold
CTL	Contrôle(s)
DHG	Dulbecco's modified eagle's medium High Glucose
DMSO	Dimethyl Sulfoxyde
DRB	5,6-Dichloro-1-b-D-ribofuranosylbenzimidazole
dNTP	Déoxynucléotide triphosphate
DO	Densité optique
DSS	DNA Salmon Sperm
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylène diamine tétra acétate
EKLF	Erythroid Kruppel-Like Factor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FADH ₂	Flavine adénine dinucléotide réduit
FOG	Friend of GATA
FSH	Follicle-Stimulating Hormone
GABP	GA-binding protein
GCase	Glucocérébrosidase
GDI	GDP Dissociation Inhibitor
GDP	Guanosine-5'-diphosphate
GRP	Glucose-Regulated Protein

GSK	Glycogen Synthase Kinase
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
HB	Hypotonic Buffer
HDA	Histone déacétylase
HE1	Human Epididymis 1
HKG	House Keeping Gene
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
HRP	Horse Radish Peroxidase
HSP	Heat Shock Protein
ICD	I-Cell Disease
IgG	Immunoglobuline G
IKAP	IKK Complex-Associated Protein
I κ B	Inhibitor of κ B
IKK	I κ B kinase
IKK γ	aussi appelé NEMO : NF- κ B Essential Modulator
IL-1	Interleukine 1
JNK	c-JUN NH ₂ -terminal Kinase
KID	Kinase-Inducible Domain
LAL	Lipase acide lysosomale
LAMP	Lysosome Associated Membrane Protein
LDL	Low Density Lipoprotein
LGP	Lysosomal Glycoprotein
LH	Luteinizing Hormone
LIMP	Lysosomal Integral Membrane Protein
M	Maltose
MAP	Mitogen-Activated Protein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEF	Myocyte Enhancer Factor
MEK	MAPK/ERK Kinase
MEKK	MEK Kinase
MME	Membrane mitochondriale externe
MMI	Membrane mitochondriale interne
MSK	Mitogen/Stress-activated Kinase
MZF1	Myeloïd Zinc Finger-1
NAC	Non Amplification Control
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NEMO	NF- κ B Essential Modulator, aussi appelé IKK γ
NF-AT	Nuclear Factor of Activated T cells
NF- κ B	Nuclear Factor-Kappa B
NF-Y	Nuclear Factor Y
NF- γ	Nuclear Factor-Gamma
NIK	NF- κ B Inducing Kinase
NPC	Niemann Pick type C
NRF	Nuclear Respiratory Factor
NTC	No Template Control
ONPG	O-nitrophényl galactopyranoside
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEA3	Polyoma Enhancer Activator 3
PFA	Paraformaldéhyde

PI(3)K	Phosphatidylinositol-(3)-OH-Kinase
PIB	Phosphatase Inhibitor Buffer
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PK	Protein Kinase
PMA	Phorbol 12-myristate-13 acétate
PMT	PhotoMulTiplicateur
PNPP	p-NitroPhényl Phosphate
PP2A	Protein Phosphatase 2 A
PPAR γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma
PVDF	PolyVinylDiène fluoride
Rab-7L1	Rab-7-like 1
RE	Réticulum endoplasmique
RER	Réticulum endoplasmique rugueux
RHD	Rel Homology Domain
RLDL	Récepteur aux LDL
RLU	Relative Light Unit
RMIC	Renal Medullary Interstitial Cell
ROS	Reactive Oxygen Species
Rpm	Rotations par minute
RT	Reverse Transcription
Rtg	Return-to-growth
S	Saccharose
S1p	Site-1 protease
S2p	Site-2 protease
SB	Sample Buffer
SCAP	SREBP-Cleavage Activating Protein
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Ser	Sérine
SF	Steroidogenic Factor
siRNA	short interfering ARN
Sp1	Specificity protein 1
Spi2A	Serpin 2A
SRE	Sterol Regulatory Element
SREBP	Sterol Regulatory Element Binding Protein
SRX	Sex determining Region Y
STATx	Signal Transducers and Activators of Transcription x
SVF	Sérum de veau fœtal
TAD	Transcription Activation Domain
TAF	TBP-Associated Factor
TAK	Transforming Growth Factor β -Activated Kinase 1
TBP	TATA box-binding protein
TBS	Tris Buffer Saline
Thr	Thréonine
TIM	Translocase of Inner Membrane
Tm	Température de « melting »
TMB	Tetra-Methyl Benzidine
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TNR1	Tumor Necrosis Factor Receptor type 1
TOM	Translocase of Outer Membrane
TRRAP	Transactivation/Transformation-Domain Associated Protein

UPR	Unfolded Protein Response
UPRE	Unfolded Protein Response Element
USF	Upstream Stimulatory Factor
VDAC	Voltage Dependant Anion Channel
YY-1	Ying Yang-1

Table des matières

I. INTRODUCTION	1
I.1. Avant-propos	1
I.1.1 Communication moléculaire interorganites mitochondrie-noyau induite par une inhibition de l'activité mitochondriale	1
I.1.1.1 Structure et fonctions de la mitochondrie	1
I.1.1.1.1 Membranes mitochondriales, espace intermembranaire et matrice	1
I.1.1.2 Communication moléculaire interorganites	3
I.1.1.2.1 Communication noyau-mitochondrie : la mitobiogenèse	3
I.1.1.2.2 Communication mitochondrie-noyau : la communication rétrograde	3
I.1.2 Communication moléculaire interorganites réticulum endoplasmique-noyau	4
I.1.2.1 Fonctions du réticulum endoplasmique (RE).....	4
I.1.2.2 Dysfonctionnement : voies de signalisation RE-noyau	5
I.2. Cadre du mémoire	6
I.2.1 Etudes antérieures	6
I.2.1.1 Conséquences de la surcharge.....	6
I.2.1.2 C-Myc	7
I.2.1.3 C/EBPs (CCAAT/enhancer-binding proteins).....	8
I.2.1.4 Sp1 (Specificity protein 1)	9
I.2.1.5 YY-1 (Yin Yang-1).....	10
I.2.1.6 NF-kB.....	10
I.2.1.7 GATA.....	11
I.2.1.8 CREB (Cyclic-AMP Responsive Element-Binding protein).....	12
I.2.1.9 AP-1 (Activator Protein-1).....	13
I.2.2 Communication moléculaire interorganites lysosome-noyau.....	13
I.2.2.1 Structure des lysosomes	13
I.2.2.1.1 Membrane	13
I.2.2.1.2 Compartiment luminal	15
I.2.2.1.2.1 La Glucocérébrosidase (GCCase)	16
I.2.2.1.2.2 L'α-glucosidase	16
I.2.2.1.2.3 Les cathepsines	16
I.2.2.1.2.4 Sialidases	17
I.2.2.2 Fonctions.....	18
I.2.2.2.1 Rôle des lysosomes dans la dégradation protéique	18
I.2.2.2.1.1 L'endocytose.....	18
I.2.2.2.1.2 La crinophagie	18
I.2.2.2.1.3 La macroautophagie.....	19
I.2.2.2.1.4 La microautophagie	19
I.2.2.2.1.5 L'autophagie médiée par des chaperonnes	19
I.2.2.2.2 Rôle des lysosomes dans l'homéostasie du cholestérol intracellulaire..	19
I.2.2.2.3 Rôle des lysosomes dans la mort cellulaire	20
I.2.2.3 Trafic intracellulaire.....	20
I.2.2.4 La biogenèse lysosomale	21
I.2.2.5 Dysfonctionnement : surcharge lysosomale	22
I.2.2.5.1 I-cell disease (ICD, mucopolidose II).....	22
I.2.2.5.1.2 Maladie de Niemann-Pick C1 (NP-C).....	22

I.2.2.5.1.3	Maladie de Batten ou « juvenil neuronal ceroid lipofuscinosis ».....	23
I.2.2.5.1.4	G _{MI} gangliosidose.....	23
I.2.2.5.2	Surcharges induites artificiellement.....	24
I.3.	Objectifs et stratégies.....	24
II.	MATERIEL ET METHODES.....	25
II.1.	Culture cellulaire.....	25
II.1.1	Matériel.....	25
II.1.2	Sous-cultures.....	25
II.2.	Modèle expérimental d'induction d'une surcharge lysosomale	25
II.3.	Dosage des protéines par la méthode de Bradford	26
II.4.	Dosages d'activité d'hydrolases lysosomales	26
II.4.1	Principe	26
II.4.2	Matériels.....	26
II.4.3	Méthodes.....	27
II.4.3.1	Sous-cultures, incubation et préparation des lysats clairs.....	27
II.4.3.2	Composition des tampons de réaction	27
II.4.3.3	Dosage enzymatique	27
II.5.	Western blotting.....	28
II.5.1	Principe	28
II.5.2	Méthodes.....	28
II.5.2.1	Sous-cultures, incubations et préparation des lysats clairs	28
II.5.2.2	Préparation des échantillons.....	28
II.5.2.3	Gels et migration.....	29
II.5.2.4	Transfert des protéines sur une membrane de PVDF	29
II.5.2.5	Incubation de la membrane avec les anticorps et révélation.....	29
II.6.	Marquage en immunofluorescence et microscopie confocale	30
II.6.1	Principe de la technique	30
II.6.2	Principe du microscope confocal	30
II.6.3	Méthodes.....	31
II.6.3.1	Sous-cultures.....	31
II.6.3.2	Solutions, anticorps et équipements.....	31
II.6.3.3	Protocole de marquage en immunofluorescence	32
II.7.	Visualisation et estimation de l'abondance de la population lysosomale par un marquage à l'aide de la sonde LysoTracker Red	32
II.7.1	Principe	32
II.7.2	Méthodes.....	33
II.7.2.1	Sous-cultures.....	33
II.7.2.2	Marquage	33
II.8.	Test de liaison à l'ADN en multipuits des facteurs de transcription : GATA-4 et C/EBP-α.....	33
II.8.1	Principe du test.....	33

II.8.2	Extraction nucléaire	34
II.8.2.1	Solutions.....	34
II.8.2.2	Méthodes.....	34
II.8.2.2.1	Sous-cultures.....	34
II.8.2.2.2	Extraction nucléaire	34
II.8.3	Dosage de l'activité de liaison des facteurs de transcription à leur séquence consensus	35
II.8.3.1	Solutions et matériel.....	35
II.8.3.2	Méthodes.....	35
II.8.3.2.1	Fixation du trappeur dans les puits d'une plaque 96 puits tapissés par la streptavidine	35
II.8.3.2.2	Liaison du facteur de transcription d'intérêt	36
II.8.3.2.3	Fixation des anticorps primaires sur le facteur de transcription	36
II.8.3.2.4	Fixation des anticorps secondaires couplés à la peroxydase.....	36
II.8.3.2.5	Révélation	36
II.9.	Transfection transitoire et gènes rapporteurs luciférase	36
II.9.1	Principe	36
II.9.2	Plasmides utilisés au cours de ce travail	37
II.9.3	Méthodes.....	38
II.9.3.1	Sous-cultures et transfection	38
II.9.3.2	Dosage des activités luciférase et β -galactosidase.....	39
II.9.3.2.1	Dosage de l'activité luciférase	39
II.9.3.2.1.1	Principe	39
II.9.3.2.1.2	Lyse cellulaire.....	39
II.9.3.2.1.3	Dosage de l'activité luciférase.....	39
II.9.3.2.1.4	Dosage de l'activité β -galactosidase	39
II.10.	Réaction d'amplification en chaîne en temps réel (Real-Time PCR).....	40
II.10.1	Principe	40
II.10.2	Méthodes.....	40
II.10.2.1	Sous-cultures, incubations et extraction de l'ARN total.....	40
II.10.2.2	Recherche des couples de primers à partir de la séquence d'ARN messenger.....	41
II.10.2.3	La transcription inverse ou RT.....	41
II.10.2.4	Détermination des courbes de dilutions.....	41
II.10.2.5	Quantification de l'expression des gènes LAMP-1, LAMP-2 et Rab-7	42
II.10.2.6	Analyse des résultats.....	42
II.11.	Recherche « in silico » de sites de liaison potentiels pour des facteurs de transcription dans des promoteurs de gènes nucléaires codant pour des protéines lysosomales.....	42
II.11.1	Recherche du gène nucléaire codant pour une protéine lysosomale ou de la protéine codée par un gène nucléaire d'intérêt	42
II.11.2	Recherche de la séquence promotrice du gène d'intérêt via le numéro d'accèsion.....	42
II.11.3	Recherche de sites consensus de liaison potentiels pour des facteurs de transcription au sein de la séquence promotrice	43
II.11.4	Analyse des données obtenues à partir de la séquence promotrice annotée des sites de liaison potentiels pour des facteurs de transcription	43

III. RESULTATS ET DISCUSSION.....	44
III.1. Caractérisation d'un modèle de surcharge lysosomale induite par du saccharose 100 mM dans des cellules 143B	44
III.1.1.1 Effet d'une surcharge lysosomale en saccharose sur l'expression de LAMP-1, LAMP-2 et Rab-7	44
III.1.1.2 Mise en évidence de l'abondance de la protéine LAMP-2 par immunofluorescence en microscopie confocale	45
III.1.1.3 Effet d'une surcharge en saccharose sur l'abondance de la population lysosomale.....	46
III.1.1.4 Etude de l'abondance de la protéine LAMP-2 dans des cellules 143B contrôles, incubées en présence de saccharose ou de maltose 100 mM	46
III.1.1.5 Mesures d'activités d'enzymes lysosomales.....	47
III.1.1.6 Réponse de la cathepsine D	48
III.1.1.7 Conclusions.....	48
III.2. Etude de l'état d'activation de différents facteurs de transcription potentiellement impliqués dans la réponse rétrograde lysosome-noyau en réponse à la surcharge lysosomale.....	49
III.2.1 Quantification des taux de transcrits de LAMP-1, LAMP-2 et Rab-7 par la technique de « real-time PCR »	49
III.2.2 Analyse <i>in silico</i> du promoteur de gènes nucléaires codant pour des protéines lysosomales	51
III.2.3 Etude de l'état d'activation des facteurs de transcription C/EBPs.....	52
III.2.3.1 Dosage de l'activité de liaison du facteur de transcription C/EBP α à sa séquence consensus.....	52
III.2.3.2 Mise en évidence de l'abondance et de la localisation du facteur de transcription C/EBP β en immunofluorescence.....	52
III.2.3.3 Transfection de cellules 143B avec un système rapporteur luciférase sous le contrôle du promoteur du gène C/EBP α	53
III.2.4 Etude de l'état d'activation du facteur NF-kB.....	53
III.2.4.1 Mise en évidence de l'abondance et de la localisation du facteur de transcription NF-kB en immunofluorescence	54
III.2.4.2 Etude de l'activité transactivatrice de NF-kB par transfection d'un système rapporteur luciférase.....	54
III.2.4.3 Dosage de l'activité de liaison du facteur de transcription GATA-4 à sa séquence consensus.....	54
III.2.5 Etude de l'activité transactivatrice des facteurs de transcription CREB et AP-1 par transfection de systèmes rapporteurs luciférase.....	55
III.2.6 Etude de l'activité transactivatrice du facteur de transcription c-Myc par transfection transitoire d'un système rapporteur luciférase	55
III.2.6.1 Mise en évidence de l'abondance et de la localisation des facteurs c-Myc, phospho-c-Myc et Max en immunofluorescence	56
III.2.7 Transfection transitoire de cellules 143B avec un système rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle d'un fragment du promoteur du gène codant pour le RLDL	58
III.2.8 Etude de l'état d'activation du facteur de transcription Sp1	59
III.2.8.1 Mise en évidence de l'abondance et de la localisation du facteur de transcription Sp1 en immunofluorescence	59

III.2.8.2	Etude de l'activité transactivatrice de Sp1 par transfection transitoire de cellules avec un système rapporteur luciférase	59
III.2.9	Etude de l'état d'activation du facteur de transcription YY-1	60
III.2.9.1	Mise en évidence de l'abondance et de la localisation du facteur de transcription YY-1 en immunofluorescence	60
III.2.9.2	Etude de l'activité transactivatrice du facteur YY-1 par transfection transitoire des cellules avec un système rapporteur luciférase	60
III.2.10	Etude de l'état d'activation du facteur de transcription SREBP	60
III.2.10.1	Analyse en Western blotting de l'abondance du facteur de transcription SREBP-1	61
III.2.10.2	Mise en évidence de l'abondance et de la localisation du facteur de transcription SREBP en immunofluorescence	61
IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		63
V. BIBLIOGRAPHIE		69

I. Introduction

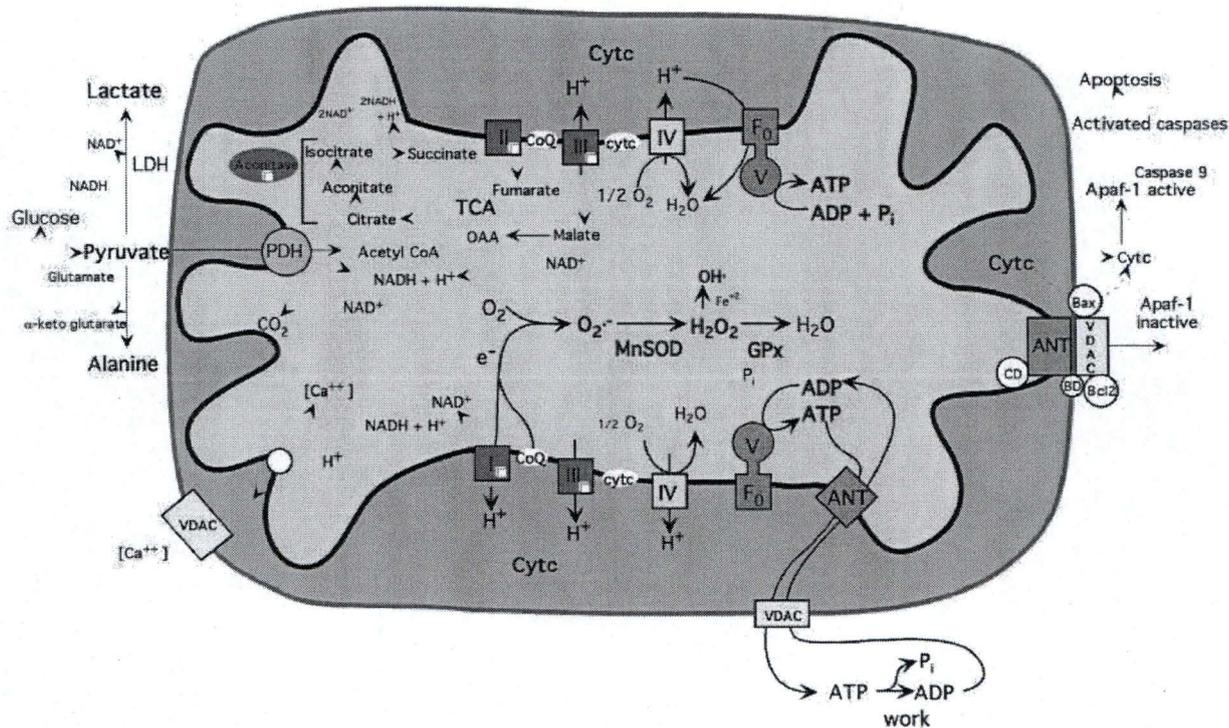


Figure I.1 : Activités mitochondriales en relation avec le flux électronique de la chaîne respiratoire. Ce schéma illustre les relations entre les phosphorylations oxydatives mitochondriales, la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène comme O_2^- , H_2O_2 et OH^\bullet et l'initiation de l'apoptose suite à l'activation du mtPTP (mitochondrial Permeability Transition Pore) formé par VDAC, ANT (Adenine Nucleotide Translocator), Bax, Bcl2, le récepteur aux benzodiazépines (BD) et la cyclophiline D (CD) aux points de contact entre la MMI (Membrane Mitochondriale Interne) et la MME (Membrane Mitochondriale Externe).

Les complexes enzymatiques respiratoires impliqués dans les phosphorylations oxydatives comportent les complexes I (NADH : ubiquinone oxydoréductase), II (succinate : ubiquinone oxydoréductase), III (ubiquinol : cytochrome c oxydoréductase), IV (cytochrome c oxydase), et V (ATP synthase). Le pyruvate est transporté et métabolisé dans la mitochondrie par la PDH (Pyruvate Déshydrogénase), qui génère l'acétyl-CoA. Ce dernier entrera dans le cycle des acides tricarboxyliques (TCA) combiné à l'oxaloacétate. La LDH (Lactate Déshydrogénase) convertit l'excès de pyruvate ainsi que le NADH en lactate.

(D'après Wallace *et al.*, 1999)

I. Introduction

I.1. *Avant-propos*

Les organites ou structures subcellulaires ont été longtemps considérés comme des entités isolées, n'interagissant les unes avec les autres que dans le contexte du transport intracellulaire de métabolites ou de protéines néo-synthétisées. Cette perception de l'organisation membranaire intracellulaire fut remise en question par la découverte de plusieurs systèmes de communication actifs entre des organites permettant à ceux-ci de contribuer au déclenchement des réponses cellulaires les plus adaptées aux conditions du moment. Ces réponses passent souvent, mais pas toujours, par des modifications de l'expression de gènes nucléaires. Citons par exemple la réponse transcriptionnelle déclenchée par l'accumulation dans le réticulum endoplasmique de protéines incapables d'acquérir leur conformation normale [Chapman, Sidrauski, 1998] ou induite par une diminution de la concentration en cholestérol dans la membrane du réticulum endoplasmique [Smith, Osborne, 1990]. Citons également la réponse nucléaire à une modification de la perméabilité de la membrane mitochondriale, qui culmine au déclenchement de la mort cellulaire par apoptose [Ferri et Kroemer, 2001]. Le cœur de notre recherche est l'étude des mécanismes moléculaires et des voies de signalisation activées par la cellule en réponse à un dysfonctionnement lysosomal.

Les organites subcellulaires comme les mitochondries, les lysosomes et le réticulum endoplasmique ne sont donc pas des compartiments isolés au sein des cellules eucaryotes de mammifères [Ferri et Kroemer, 2001]. De plus, de nombreuses pathologies sont causées par ou associées à un dysfonctionnement de ces organites. Chez l'homme, on compte plus d'une centaine de maladies associées au dysfonctionnement mitochondrial et une quarantaine associées au dysfonctionnement lysosomal. Cependant, nous ne connaissons encore rien sur les voies de signalisation moléculaire rétrogrades entre le lysosome non fonctionnel et le noyau conduisant à l'apparition du phénotype pathologique. Cette lacune apparaît nettement lorsqu'on compare l'état des connaissances sur la communication rétrograde entre le lysosome et le noyau à celui de la communication rétrograde de la mitochondrie ou du réticulum endoplasmique.

Dans les paragraphes suivants, nous examinerons la structure, les fonctions et les voies de communication rétrogrades entre la mitochondrie ou le réticulum endoplasmique et le noyau. Nous aborderons ensuite la problématique particulière du dysfonctionnement naturel ou induit du lysosome. Nous définirons enfin nos objectifs et stratégies d'étude.

I.1.1 **Communication moléculaire interorganites mitochondrie-noyau induite par une inhibition de l'activité mitochondriale**

I.1.1.1 **Structure et fonctions de la mitochondrie**

I.1.1.1.1 **Membranes mitochondriales, espace intermembranaire et matrice**

La figure I.1 présente la structure générale de la mitochondrie ainsi que ses activités en rapport avec le flux électronique de la chaîne respiratoire. La mitochondrie comporte deux membranes délimitant un espace intermembranaire et la matrice. La membrane mitochondriale externe (MME) est la plus perméable aux ions et petites molécules, grâce à la présence de porines (VDAC : Voltage-Dependent Anion Channel). La translocase TOM (Translocase of Outer Membrane) permet l'importation de presque toutes les protéines (99%) codées par le génome nucléaire et synthétisées dans le cytosol [Pfanner et Wiedemann, 2002]. Si la destination finale de la protéine est autre que matricielle, l'importation pourra être

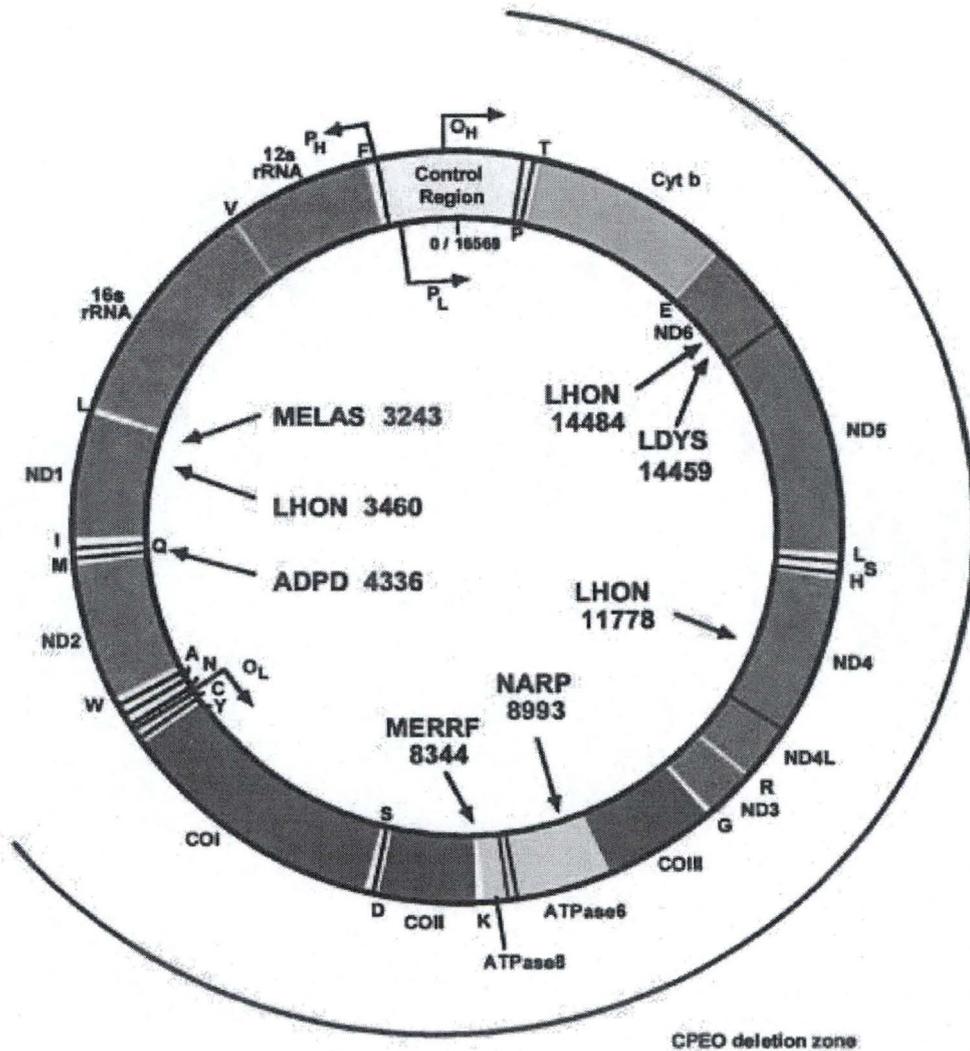


Figure I.2 : Schéma représentant la carte de l'ADN mitochondrial humain.

L'ADN mitochondrial humain code pour 7 des 43 sous-unités du complexe I (ND 1, 2, 3, 4, 4L, 5 et 6), 1 des 11 sous-unités du complexe III (cyt b, cytochrome b), 3 des 13 sous-unités du complexe IV (COI, II et III), et 2 des 16 sous-unités du complexe V (ATPases 6 et 8). Il code aussi pour les ARNr 12S et 16S et pour 22 ARNt. L'origine de réplication (OH) du brin lourd (Heavy) et les promoteurs des brins lourd et léger (PH et PL) impliqués dans la transcription et la réplication sont indiqués.

Des dysfonctionnements de l'organe, résultats de mutations ou de délétions dans le génome mitochondrial peuvent survenir dans de nombreuses situations pathologiques.

Les positions des mutations ponctuelles associées à ou responsables de certaines maladies mitochondriales sont également représentées, avec leur position nucléotidique et l'acronyme des pathologies ou syndromes générés : ADPD (Autosomal Dominant Parkinson Disease), LHON (Leber's Hereditary Optic Neuropathy), NARP (Neurogenic muscle weakness, Ataxia and Retinitus Pigmentosa), MERRF (Myoclonic Epilepsy and Ragged-Red Fibers), MELAS (Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, LActacidosis, Stroke).

(D'après Wallace *et al.*, 1999)

bloquée sélectivement au niveau des membranes externe ou interne ou dans l'espace intermembranaire [Horst, Azem, 1997 ; Bauer, Hofmann, 2000].

La membrane mitochondriale interne (MMI) est imperméable à la plupart des ions, ce qui permet le maintien du potentiel de membrane mitochondrial $\Delta\psi_m$. Néanmoins, le passage de certaines molécules à travers celle-ci est rendu possible grâce à la présence de TIM (Translocase of Inner Membrane) [Pfanner et Wiedemann, 2002]. Sa conformation en crêtes rend sa surface plus importante, optimisant les réactions se déroulant à son niveau, telles que les phosphorylations oxydatives.

L'espace intermembranaire est un lieu important de la production d'énergie, puisque c'est à ce niveau que s'établit le potentiel de membrane mitochondrial $\Delta\psi_m$. De plus, on y observe une accumulation de nombreuses molécules délocalisables à caractère pro-apoptotique. Le cytochrome c est un exemple de protéine pro-apoptotique [Goldstein, Waterhouse, 2000].

Enfin, la matrice mitochondriale assure le stockage de nombreux ions et est le siège de réactions métaboliques telles que les réactions du cycle de Krebs ou de la β -oxydation des acides gras. Elle renferme également l'ADN mitochondrial, ainsi que les machineries de réplication et de transcription du génome mitochondrial. Celui-ci est constitué de 2 à 10 molécules d'ADN circulaire double brins par mitochondrie. Chez les mammifères, l'ADN mitochondrial ne contient que 37 gènes : 13 gènes codant des polypeptides participant aux phosphorylations oxydatives, les gènes des ARN ribosomiques 12S et 16S et les 22 gènes codant les ARN de transfert requis pour la synthèse des protéines mitochondriales. Toutes les autres protéines mitochondriales sont codées par des gènes nucléaires. Ceci suggère une coordination et une communication moléculaire entre les deux génomes. Le génome mitochondrial humain, schématisé à la figure I.2, renferme 16569 paires de bases, comporte de courtes séquences intergéniques mais ne contient pas d'intron – ce qui génère des produits de transcription polycistroniques maturés ultérieurement par des RNAses spécifiques.

La mitochondrie a pour rôle principal la production d'énergie sous forme d'ATP. Des coenzymes réduits, à savoir le NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) et le FADH₂ (Flavine adénine dinucléotide réduit) transfèrent leurs électrons respectivement au niveau des complexes I et II de la chaîne de transporteurs d'électrons (représentée à la figure I.1). Les électrons transitent alors jusqu'à l'accepteur final : l'oxygène. L'énergie libérée au cours de ce transfert permet l'expulsion de protons dans l'espace intermembranaire par les complexes I, III et IV. Cette accumulation de protons est responsable du potentiel électrochimique mitochondrial établi de part et d'autre de la MMI (entre -180 et -220 mV) [Ganitkevich, 2003]. Pour les mitochondries couplées, le retour des protons dans la matrice est utilisé pour générer l'ATP par l'enzyme F₀-F₁ ATPsynthase, qui convertit ainsi un potentiel de membrane en énergie chimique. Signalons encore que les phosphorylations oxydatives représentent une source endogène majeure de radicaux libres dérivés de l'oxygène comme O₂⁻, H₂O₂ et OH⁻.

La mitochondrie joue également un rôle primordial dans l'homéostasie du calcium [Ganitkevich, 2003]. Elle peut l'accumuler en conditions basales ou lorsque la concentration locale en calcium augmente. La mitochondrie peut également relibérer lentement le calcium dans le cytosol par un système d'antiport échangeant deux ions Na⁺ contre un ion Ca²⁺.

Dans le cadre de cette introduction centrée sur la communication moléculaire rétrograde induite par un dysfonctionnement de l'organite, nous ne détaillerons pas d'avantage les aspects liés à la structure et aux fonctions des mitochondries.

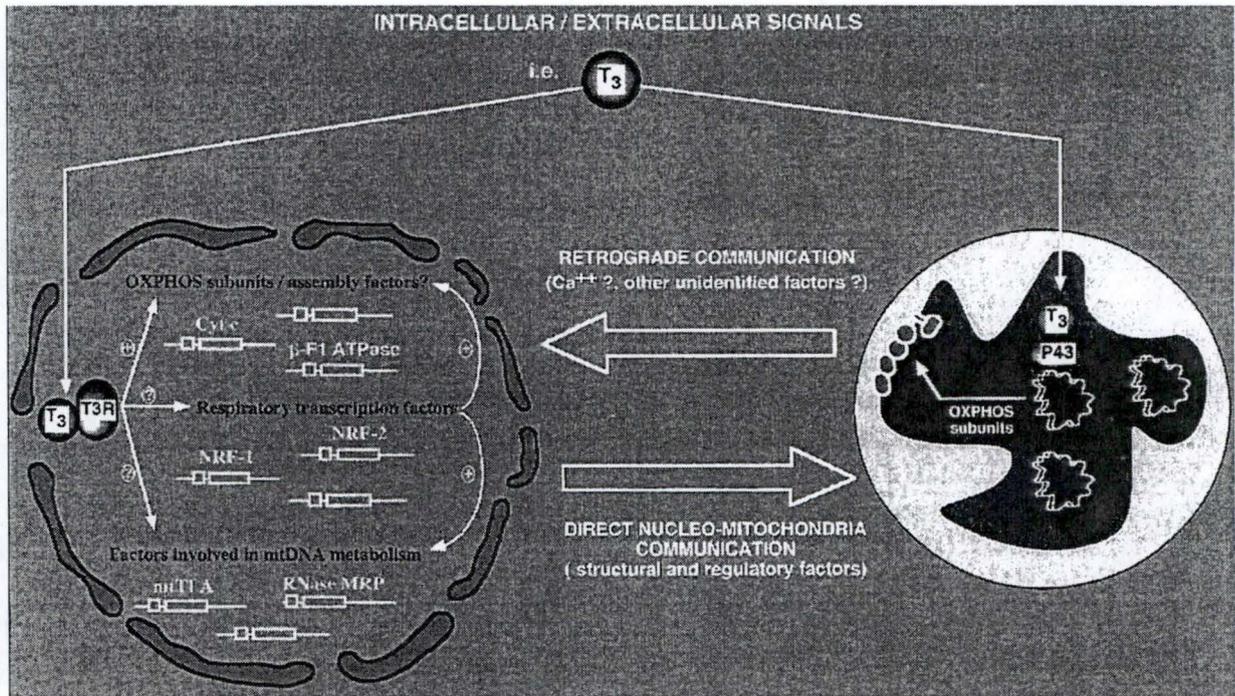


Figure I.3 : Schéma illustrant les communications directe et rétrograde noyau-mitochondrie reprenant les mécanismes potentiellement impliqués dans cette communication. NRF-1 et / ou NRF-2 régule(nt) l'expression des gènes nucléaires codant des protéines impliquées dans les phosphorylations oxydatives et des facteurs impliqués dans la réplication de l'ADNmt et la synthèse mitochondriale de protéines tels que le mtTFA et le composant ARN de la RNase MRP. Les facteurs assurant les structures et la régulation des phosphorylations oxydatives sont importés dans les mitochondries et participent directement à la biogenèse de la chaîne respiratoire ou indirectement en contrôlant la réplication et la transcription de l'ADNmt (communication noyau-mitochondriale directe). L'hormone thyroïdienne T₃ régule l'expression de gènes codés par le génome mitochondrial, un effet médié par le récepteur à T₃ mitochondrial (p43) et contrôle l'expression de gènes nucléaires codant des sous-unités respiratoires par sa liaison au récepteur T_{3R}.

(D'après Garesse *et al.*, 2001)

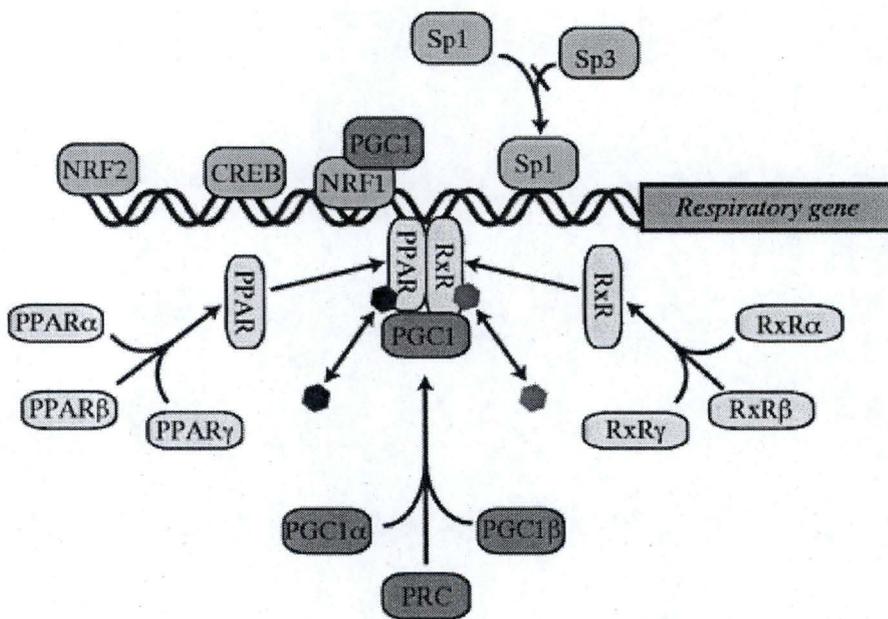


Figure I.4 : Cette figure reprend les principaux régulateurs de la transcription agissant au niveau du promoteur d'un gène nucléaire type codant pour des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les gènes mitochondriaux ne possèdent pas de boîte TATA et leur expression constitutive est souvent médiée par des facteurs de transcription de la famille Sp1 (Specificity protein 1). De plus, les promoteurs des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales possèdent souvent des sites de liaison pour CREB, PPAR, NRF-1 et NRF-2.

(D'après Moyes *et al.*, 2003)

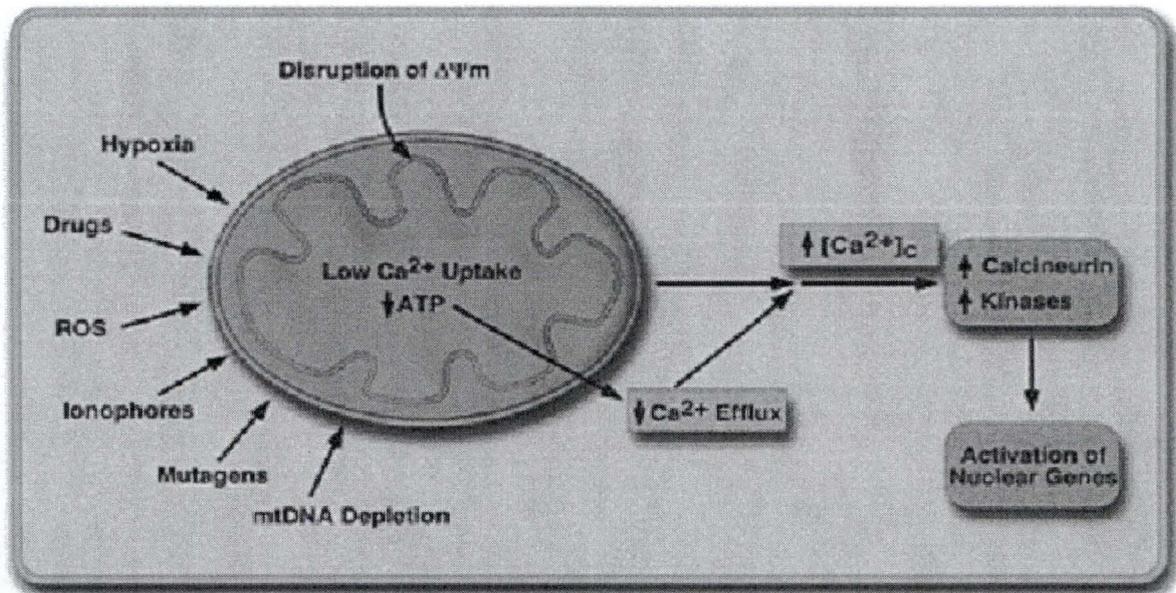


Figure I.5 : Schéma illustrant l'implication d'une augmentation de la concentration en calcium cytosolique libre $[Ca^{2+}]_c$ dans la voie de signalisation rétrograde entre les mitochondries et le noyau.

La dissipation du potentiel de membrane mitochondrial et la réduction du contenu en ATP induites par des causes aussi variées que l'hypoxie, des drogues, des dérivés radicalaires de l'oxygène (ROS), des ionophores ou la déplétion en ADNmt affectent l'homéostasie du calcium dépendante de la mitochondrie et réduit son accumulation dans la matrice mitochondriale. Une augmentation de la concentration en calcium cytosolique active alors la calcineurine et plusieurs kinases dont l'activité est dépendante du calcium.

(D'après Butow *et al.*, 2004)

I.1.1.2 Communication moléculaire interorganites

I.1.1.2.1 Communication noyau-mitochondrie : la mitobiogenèse

L'activité de la chaîne respiratoire dépend de l'expression de plusieurs centaines de gènes codés par le génome nucléaire et de seulement treize gènes codés par le génome mitochondrial.

Les niveaux d'expression des enzymes mitochondriales peuvent varier selon les besoins énergétiques de la cellule (jusqu'à 100 fois dans les muscles squelettiques des mammifères). Lorsque des changements dans la demande énergétique subsistent pendant de longues périodes, la plupart des cellules peuvent répondre en modifiant leur taux de biogenèse mitochondriale [Moyes et Hood, 2003]. De tels changements globaux dans le contenu mitochondrial requièrent la coordination de l'expression de centaines de gènes localisés dans le noyau et des gènes codés par l'ADNmt [Leary, Lyons, 2003]. La biogenèse mitochondriale nécessite donc une régulation coordonnée de l'expression des deux génomes, ce qui est illustré à la figure I.3.

L'expression des gènes codant les protéines impliquées dans les phosphorylations oxydatives dépend essentiellement de facteurs de transcription spécifiques. Par exemple, le promoteur du gène de la sous-unité α de l'ATP synthase est régulé par les facteurs de transcription YY-1 (Ying Yang 1) et USF2 (Upstream Stimulatory Factor 2) [Breen et Jordan, 1998], tandis que la sous-unité β dépend de NRF2 (Nuclear Respiratory Factor 2)/GABP (GA-binding protein) et Sp1 (Specificity protein 1) [Zaid, Li, 1999]. La figure I.4 montre les principaux régulateurs de la transcription agissant au niveau du promoteur d'un gène nucléaire type codant pour des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale.

I.1.1.2.2 Communication mitochondrie-noyau : la communication rétrograde

La communication moléculaire rétrograde mitochondrie-noyau est un processus par lequel les cellules répondent aux altérations de l'activité mitochondriale par des changements dans l'expression de gènes nucléaires codant ou non des protéines mitochondriales suite à l'activation de voies de signalisation [Butow et Avadhani, 2004].

Initialement mise en évidence chez les levures *Saccharomyces cerevisiae* $\rho 0$ (déplétées en ADNmt), la voie de signalisation impliquée dans la communication intergénomique chez la levure dépend de trois acteurs : Rtg-1 (Return-to-growth-1) et Rtg-3, codant pour des facteurs de transcription de la famille b-HLH (basic Helix-Loop-Helix) [Liao et Butow, 1993] et Rtg-2, un membre de la famille des heat-shock protéines impliqué dans la translocation de Rtg-1 et Rtg-3 dans le noyau [Sekito, Liu, 2002]. Dans le noyau, ces facteurs activent l'expression de plusieurs gènes, dont *CIT2* (l'isoforme peroxisomale de la citrate synthase). La communication mitochondrie-noyau existe également chez les plantes et plusieurs exemples ont été décrits dans les cellules de mammifères ayant une production d'ATP mitochondriale compromise [Marusich, Robinson, 1997].

Lorsque l'activité mitochondriale est inhibée, l'organite est capable de communiquer avec les autres compartiments cellulaires et de libérer ou de modifier l'abondance de messagers comme le calcium et les ROS (Reactive Oxygen Species). Ceux-ci modifient alors l'état d'activité de plusieurs voies de communication impliquant des kinases et des phosphatases.

La dissipation du potentiel de membrane mitochondrial et une capacité de production d'ATP diminuée dans des mitochondries de cellules C2C12 déplétées en ADNmt conduisent à une augmentation de la concentration du calcium cytosolique qui est responsable de la réponse cellulaire [Biswas, Adebajo, 1999]. L'implication d'une augmentation du calcium cytosolique dans la voie de signalisation rétrograde est illustrée à la figure I.5. En 2002, Arnould *et al.* ont rapporté une nouvelle voie de signalisation également dépendante du

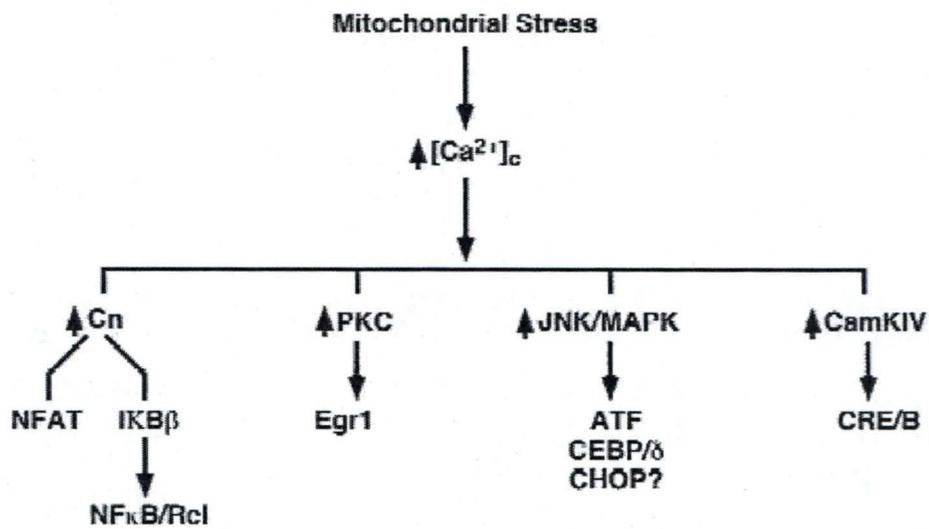


Figure I.6 : Cette figure illustre l'activation de facteurs cytoplasmiques et nucléaires dans différents types cellulaires en réponse à un stress mitochondrial. Une concentration élevée en calcium cytosolique active des protéines phosphatases, comme la calcineurine (Cn), et de nombreuses kinases dépendantes du calcium, comme certaines PKC, la JNK et la CamKIV, qui phosphorylent et activent de nombreux facteurs de transcription.

(D'après Butow *et al.*, 2004)

calcium et activée lors du dysfonctionnement mitochondrial induit par la déplétion en ADNmt impliquant la voie calcium/calmoduline kinase-CREB (cAMP-Responsive Element-Binding protein). La CaMKIV (Calmoduline kinase IV) est spécifiquement activée par un dysfonctionnement mitochondrial, et est responsable de la phosphorylation du facteur de transcription CREB sur la sérine 133 dans ces conditions [Arnould, Vankoningsloo, 2002]. Dans cette étude, les auteurs ont également montré que CREB phosphorylé est impliqué dans la perte de la prolifération cellulaire lors du dysfonctionnement mitochondrial.

Donc, dans les cellules de mammifères, CREB – qui est un régulateur du cycle et du programme de différenciation cellulaire – est un facteur de transcription activé et impliqué dans la voie de signalisation rétrograde entre les mitochondries dont l'activité est inhibée et le noyau [Arnould, Vankoningsloo, 2002]. La figure I.6 illustre différentes voies de signalisation cellulaires pouvant être activées suite à une augmentation de calcium cytosolique induite par un stress mitochondrial.

Les ROS jouent également un rôle dans la communication moléculaire rétrograde mitochondrie-noyau. La production accrue de ROS par la mitochondrie peut induire l'expression de certains gènes comme celui codant la glutathione peroxydase [Brambilla, Cairo, 1997] et le cytochrome c1 [Suzuki, Kumagai, 1998]. L'expression de ces gènes est probablement sous le contrôle de facteurs de transcription dont l'activité est fonction de l'état redox de la cellule, comme par exemple NF- κ B (Nuclear Factor-Kappa B) dont nous reparlerons ultérieurement.

D'autres organites que les mitochondries sont également capables de communiquer avec le noyau et de générer des signaux de stress lors de leur dysfonctionnement. C'est le cas du RER (réticulum endoplasmique rugueux) lorsque la charge protéique est trop importante ou que les protéines qui s'accumulent dans sa lumière sont mal conformées [Chapman, Sidrauski, 1998].

I.1.2 Communication moléculaire interorganites réticulum endoplasmique-noyau

I.1.2.1 Fonctions du réticulum endoplasmique (RE)

Le RE est un centre de stockage important du calcium cellulaire et la concentration intraluminaire y atteint 1 mM, soit 10000 fois plus que dans le cytosol. Son environnement luminal oxydant, propice à la formation de ponts disulfures intramoléculaires (entre des résidus cystéines), en fait également le premier composant de la voie de sécrétion des protéines nouvellement synthétisées qui y acquièrent leur conformation. En effet, c'est dans le RE que les protéines multimériques réalisent leur conformation, l'assemblage de leurs sous-unités, et que les glycoprotéines acquièrent leurs motifs de glycosylation. La prise de conformation de la protéine est réalisée par des chaperonnes résidentes comme Bip/GRP78 et GRP94 (Glucose-Regulated Proteins), qui sont des homologues des HSPs (Heat Shock Proteins) cytoplasmiques. Le RE contient aussi d'autres chaperonnes de type lectin-like comme la calnexine et la calréticuline.

Comme observé pour les mitochondries, l'abondance et la composition du RE peuvent varier selon l'état de différenciation cellulaire (par exemple, entre un lymphocyte B mature et immature) ou selon les types cellulaires. En effet, les hépatocytes ou les cellules de Leydig, spécialisées dans la synthèse des stéroïdes, possèdent des abondances différentes de RE lisse et rugueux [Chapman, Sidrauski, 1998].

Le RE est également le lieu de synthèse cellulaire du cholestérol. Les SREBPs (Sterol Regulatory-Element binding Proteins) sont les facteurs de transcription qui permettent de faire le lien entre le déficit et la synthèse de cholestérol. Les SREBPs sont des membres

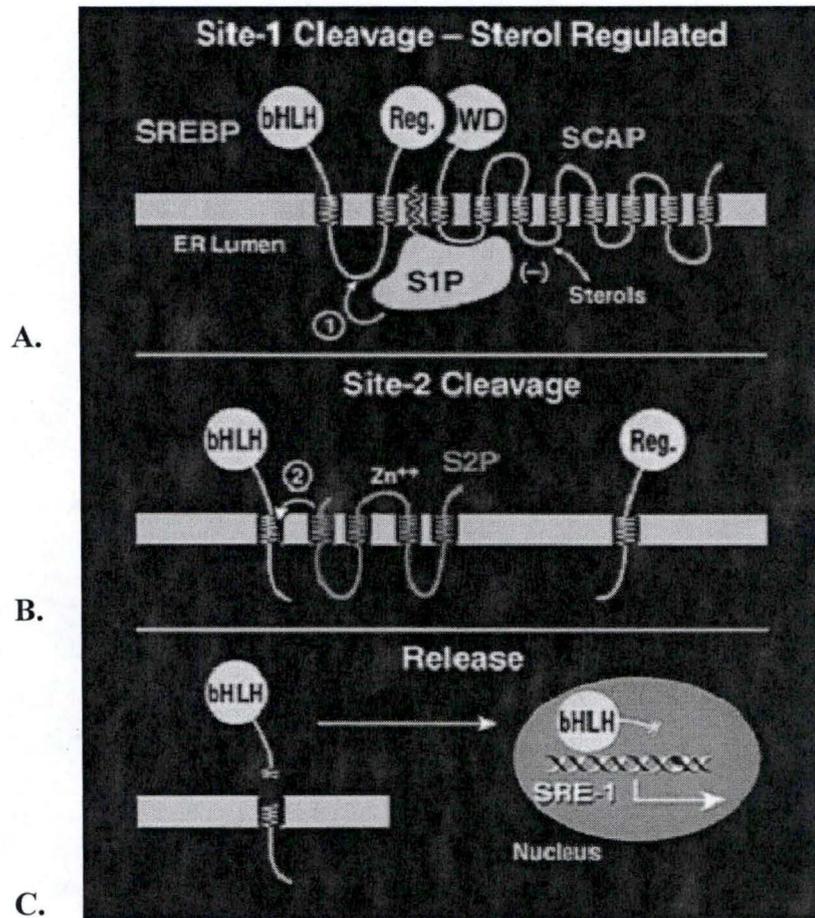


Figure I.7 : Mécanisme d'activation protéolytique de SREBP dans la membrane du réticulum endoplasmique.

Ce clivage protéolytique est initié par la sérine protéase Site 1p (S1p), qui reconnaît le complexe SCAP-SREBP et clive SREBP dans la boucle luminale (A). Ce clivage a lieu lorsque les cellules sont privées de stérols. Une fois les deux fragments de SREBP séparés, S2p, la seconde enzyme, clive le domaine NH₂-terminal b-Zip-HLH de SREBP (B).

Après ce second clivage protéolytique, le domaine NH₂-terminal b-Zip-HLH de SREBP quitte la membrane du RE (C) et entre dans le noyau où il transactive des gènes cibles contrôlant la synthèse de stérols.

(D'après Brown *et al.*, 1999)

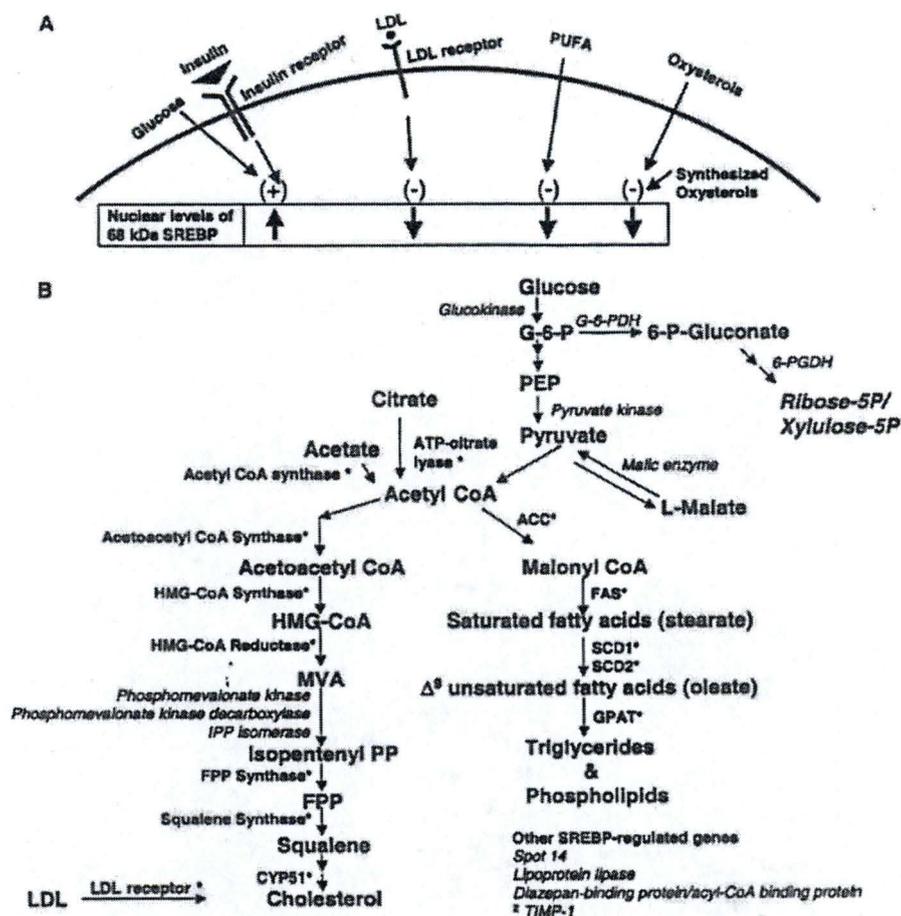


Figure I.8 : De nombreux signaux régulent la maturation ainsi que l'activité de SREBP et contrôlent l'expression des gènes cibles de ce facteur.

(A) Ce modèle illustre l'effet d'une prise cellulaire augmentée de LDL, d'oxystérols ou de PUFA (PolyUnsaturated Fatty Acid), d'une activation par l'insuline ou d'une augmentation de l'incorporation de glucose sur la formation de SREBPs actifs.

(B) Description des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse du cholestérol, des triglycérides et des phospholipides qui sont activés en réponse à une activation de SREBP. Les gènes contenant un ou plusieurs sites SREs fonctionnels dans leur promoteur sont indiqués par un astérisque. Parmi ces gènes, ceux qui sont activés en réponse à une déplétion cellulaire en stérols ou en réponse à la surexpression de SREBP sont indiqués en italique.

La surexpression d'enzymes comme l'ATP citrate lyase, la G-6-PDH et la PGDH conduit à une augmentation de la synthèse de NADPH et/ou d'acétyl-CoA, deux molécules essentielles à la synthèse des acides gras et du cholestérol.

PGDH : 6-Phosphogluconate déshydrogénase

G-6-P : glucose-6-phosphate

G-6-PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase

PEP : phosphoénolpyruvate

MVA : acide mévalonique

FPP : farnésyl diphosphate

IPP: isopentényl diphosphate

TIMP-1 : inhibiteur tissulaire de la métalloprotéase-1

(D'après Edwards *et al.*, 2000)

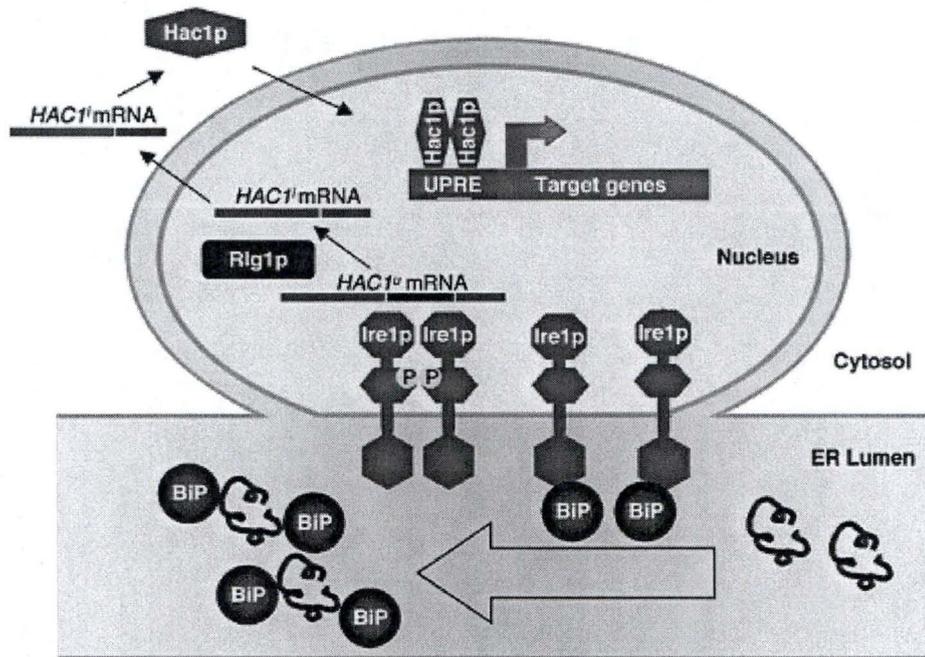


Figure I.9 : Illustration reprenant la voie de signalisation UPR chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'accumulation de protéines mal conformées diminue l'abondance de la chaperonne Bip liée à la kinase Ire1p et favorise sa dimérisation. Ire1p est alors phosphorylée par transphosphorylation et le domaine endonucléase de cette enzyme est activé. Au travers de l'action de Ire1p et de l'ARNt ligase (Rlg1p), le transcrit constitutivement exprimé de Hac1p, un facteur de transcription UPR-spécifique, est mûré par l'épissage d'un intron. Ceci conduit à la synthèse de la protéine. Hac1p est finalement transloqué dans le noyau et se lie à la séquence consensus UPRE présente dans le promoteur des gènes cibles pour induire leur expression.

(D'après Spear *et al.*, 2001)

inhabituels de la famille des facteurs de transcription b-HLH, puisqu'ils contiennent une tyrosine à la place de l'arginine conservée dans le domaine basique chez tous les autres membres de cette famille.

Deux gènes, SREBP-1 et SREBP-2 codent trois protéines SREBP, chacune ayant une masse moléculaire approximative de 125 kDa, localisées dans les membranes du RE. Le gène SREBP-2 code une seule protéine qui partage 50 % d'identité avec SREBP-1. Par l'usage de promoteurs alternatifs, le gène SREBP-1 code pour deux protéines, SREBP-1a et SREBP-1c, qui diffèrent seulement dans la longueur de leurs domaines de transactivation NH₂-terminal. Tous les gènes activés par les SREBPs contiennent un motif SRE (Sterol Regulatory Element) dans leur promoteur. Chaque protéine SREBP possède trois motifs fonctionnels : un fragment NH₂-terminal de 68 kDa contenant un domaine « b-HLH leucin zipper », un domaine central contenant deux domaines transmembranaires liés par un court domaine (31 acides aminés) se trouvant dans la lumière du réticulum endoplasmique ou du Golgi, et un domaine régulateur C-terminal [Brown et Goldstein, 1999]. Lorsque la concentration en stérols cellulaire diminue, par exemple suite à un appauvrissement en LDL (Low Density Lipoprotein) exogènes ou suite à l'inhibition de la HMG-CoA (3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A) réductase par la lovastatine, le domaine NH₂-terminal de 68 kDa est libéré de la membrane du réticulum endoplasmique, migre dans le noyau et se lie aux SRE dans les promoteurs des gènes cibles, avec pour résultat une activation de l'expression des gènes cibles. Dans les cellules privées de stérols, SCAP (SREBP-Cleavage Activating Protein) fonctionne comme une protéine chaperonne et transporte la forme précurseur de SREBP depuis le RE vers un compartiment contenant la sérine protéase S1p (Site-1 protéase). Ce phénomène est illustré à la figure I.7 [Nohturfft, DeBose-Boyd, 1999 ; Sakai et Rawson, 2001].

Dans le Golgi, la forme active de S1p clive la boucle luminale des SREBPs pour générer deux fragments liés à la membrane. Le clivage des SREBPs médié par S1p a lieu avant le dernier clivage médié par S2p (Site-2 protéase), une métalloprotéase à zinc. Ce clivage par S2p conduit à la libération du domaine NH₂-terminal transcriptionnellement actif [Brown et Goldstein, 1999]. Les gènes cibles des SREBPs actuellement identifiés comportent la plupart des gènes impliqués dans le contrôle de la synthèse du cholestérol, la prise des LDL, la synthèse et la désaturation des acides gras, la synthèse des triglycérides et le métabolisme du glucose. La figure I.8 résume l'ensemble des signaux qui régulent la maturation et l'activité de SREBP et l'expression de ses gènes cibles.

I.1.2.2 Dysfonctionnement : voies de signalisation RE-noyau

Des altérations peuvent survenir dans le repliement des protéines au sein du RE. La présence et l'accumulation de ces protéines mal conformées dans la lumière du RE sont détectées et un signal est envoyé au noyau, conduisant à l'augmentation de l'expression de gènes codant pour des chaperonnes résidentes du RE ainsi que des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse des phospholipides. Cette voie de signalisation est la réponse UPR (Unfolded Protein Response). Les acteurs principaux intervenant dans cette réponse sont schématisés à la figure I.9.

Ire1p est une enzyme bifonctionnelle possédant une activité RNase à son extrémité C-terminale et une activité endoribonucléase spécifique. Au repos, elle est maintenue sous forme monomérique inactive dans la lumière du RE suite à sa liaison avec la chaperonne Bip/GRP78. Son activation survient suite à des changements dans l'environnement du RE. Bip n'est plus capable de séquestrer Ire1p et cette dernière subit une transphosphorylation suite à son homodimérisation. Ire1p catalyse ensuite, par son activité RNase, l'épissage non conventionnel (non médié par le spliceosome) du pré-ARNm du gène *HAC1* (Homology to ATF (Activating Transcription Factor) and CREB1). Les deux exons résultant de cet épissage

sont ensuite ligués par une ARNt ligase codée par RLG1 et la protéine Hac1p est alors synthétisée. Hac1p est un facteur de transcription de la famille des b-ZIP (basic-leucine Zipper) et un homologue des facteurs ATF/CREB capable de se lier aux UPREs (Unfolded Protein Response Elements) des gènes cibles de la réponse UPR. Les UPREs sont des séquences CANTG palindromiques semblables aux E-Box. Les gènes cibles codent essentiellement des chaperonnes de type GRPs qui catalysent le repliement et l'assemblage des protéines ainsi que des enzymes impliquées dans la synthèse des phospholipides. L'action transactivatrice coordonnée de Hac1p sur l'expression de plusieurs gènes nucléaires codant des protéines du RE permet donc d'expliquer l'augmentation de la biogenèse du RE lors de la réponse UPR [Spear et Ng, 2001].

Lorsque le défaut de conformation ne peut être corrigé, les protéines sont rétrotransloquées à travers la membrane du RE par le translocon Sec61, elles sont déglycosylées et ubiquitinées avant d'être dégradées par le protéasome 26S [Kopito, 1997].

I.2. Cadre du mémoire

Tel qu'illustré pour la mitochondrie et le réticulum endoplasmique, il est probable que les lysosomes communiquent également avec le noyau dans le cadre d'un dysfonctionnement et que des voies de signalisation rétrogrades complexes entre cet organe et le noyau soient alors activées. Ce mémoire s'insère dans cette problématique. En effet, si la littérature contient un grand nombre d'informations sur la structure, les fonctions et les pathologies associées aux dysfonctionnements du lysosome, les modalités d'une communication entre le lysosome et le noyau ainsi que les voies de communication impliquées entre ces deux compartiments subcellulaires sont peu étudiées et encore inconnues.

I.2.1 Etudes antérieures

Karageorgos *et al.* (1997) ont émis l'hypothèse que la surcharge lysosomale – l'accumulation au sein du lysosome d'un substrat non dégradable – conduirait à initier des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de l'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines lysosomales. Ces auteurs ont utilisé deux types de modèles d'étude visant à démontrer que la biogenèse lysosomale est un processus régulé [Karageorgos, Isaac, 1997] [Cohn et Ehrenreich, 1969].

Le premier modèle implique le traitement de fibroblastes de peau humains cultivés en présence de saccharose 100 mM conduisant à la formation de sucrosomes (lysosomes gonflés et chargés de saccharose). Le saccharose est rapidement internalisé et stocké, en raison de l'absence d'invertase dans ces cellules.

Les seconds modèles d'étude consistent en l'utilisation de lignées de fibroblastes de peau de patients atteints de maladies de surcharge lysosomale telles que les maladies de Pompe ou les mucopolysaccharidoses de type II. Dans ces modèles, la surcharge peut être corrigée par l'internalisation d'enzymes recombinantes [Karageorgos, Isaac, 1997].

I.2.1.1 Conséquences de la surcharge

Dans des fibroblastes de peau humains incubés en présence de saccharose 100 mM pendant 21 jours, on remarque une augmentation significative de LAMP-1 (Lysosome Associated Membrane Protein - 1) tant au niveau protéique qu'au niveau de son transcrit. Cette augmentation est corrélée avec la formation de sucrosomes, mais également avec une augmentation apparente de la taille des vacuoles de stockage lysosomales [Karageorgos, Isaac, 1997]. Dans cette étude, il a également été montré que l'abondance des transcrits codant pour la protéine LAMP-2 et pour les récepteurs au mannose 6-phosphate augmente dans les cellules accumulant des sucrosomes [Karageorgos, Isaac, 1997].

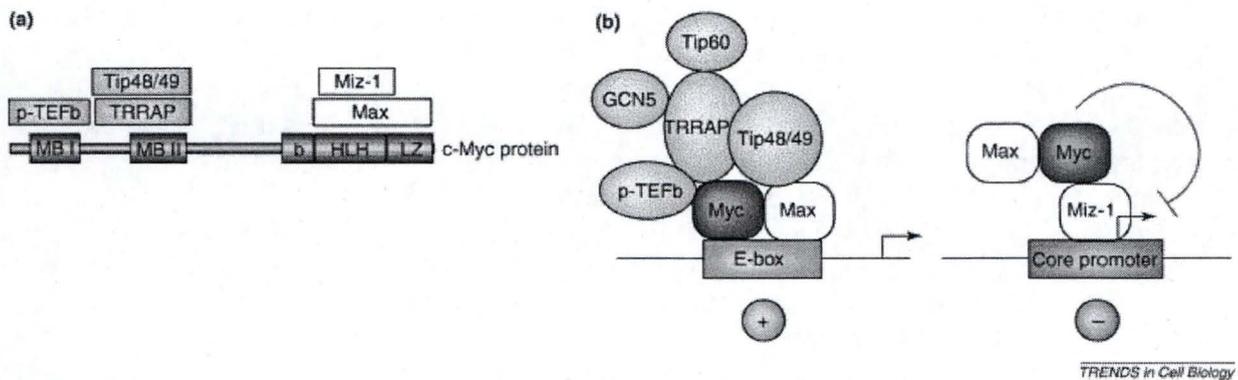


Figure I.10 : Illustration des complexes transcriptionnels formés par c-Myc.

- (a) Diagramme de la protéine Myc avec les domaines fonctionnels connus et les protéines partenaires qui s'y lient. MBI et MBII= Myc boxes I et II, qui sont des domaines hautement conservés dans le domaine NH2-terminal de Myc.
- (b) Interactions protéine-protéine de Myc au sein des complexes activateurs et répresseurs de la transcription.

(D'après Wanzel *et al.*, 2003)

Ces résultats indiquent que la régulation de la biogenèse lysosomale dans des désordres de surcharge semble impliquer une régulation de l'expression de plusieurs protéines lysosomales à un niveau transcriptionnel [Reitman, Varki, 1981 ; Karageorgos, Isaac, 1997].

Très récemment, en utilisant la technologie des damiers à ADN, Wooley *et al.* (2004) ont publié une étude sur l'analyse de l'expression différentielle de gènes induite par une surcharge en saccharose dans des lignées de fibroblastes de peau humains. Ils démontrent que dans les lignées de fibroblastes humains incubés en présence de saccharose, on observe une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le trafic des vésicules lysosomales, les petites protéines liant le GTP (Guanosine-5'-triphosphate), Rab-7L1 (Rab-7-Like 1) et Arl7 (ADP Ribosylation Factor-Like 7) mais aussi de l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol et dans le métabolisme des acides gras [Helip-Wooley et Thoene, 2004].

Dans ces différentes études, il apparaît donc que, suite à un dysfonctionnement lysosomal induit par une surcharge de l'organite, des signaux moléculaires sont générés, ce qui conduit à modifier l'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines lysosomales ou autres. Cependant, les voies de signalisation et les facteurs de transcription impliqués dans cette communication moléculaire ne sont pas connus. C'est pour tenter de mieux comprendre ces mécanismes que nous avons entrepris cette étude.

L'étude des voies de signalisation rétrogrades lysosome-noyau potentiellement impliquées dans l'expression de gènes codant pour des protéines lysosomales nous a conduit à étudier l'état d'activation de plusieurs facteurs de transcription lors d'une surcharge lysosomale.

Nous avons pour cela commencé par sélectionner quelques facteurs de transcription candidats et susceptibles d'intervenir dans ces voies de signalisation. Cette sélection s'est faite selon trois critères. Premièrement, en consultant la littérature portant sur la régulation des gènes codant pour les protéines lysosomales, afin de tenter de détecter d'éventuels régulateurs communs. Ensuite, par une analyse *in silico* des promoteurs de plusieurs gènes connus pour être régulés différemment en présence de saccharose. Enfin, il nous a fallu tenir compte des outils d'étude de ces facteurs disponibles au laboratoire (anticorps, constructions rapporteurs, tests de liaison à l'ADN en TransAM). Ces critères nous ont permis d'établir la liste de candidats suivante : c-Myc, C/EBPs (CCAAT/Enhancer-Binding Protein), Sp1, YY-1, NF-kB, GATA, CREB, AP-1 (Activator Protein 1) et SREBP-1. Ces facteurs seront étudiés dans ce travail. Nous allons donc brièvement présenter quelques aspects de ces facteurs, comme leur mode d'action et d'activation et certains de leurs gènes cibles. La famille des facteurs de transcription SREBPs a été décrite précédemment au point I.1.2.1.

I.2.1.2 c-Myc

La famille de proto-oncogènes *myc* comprend trois membres principaux : *c-myc*, *N-myc* et *L-myc* [Malynn, de Alboran, 2000]. La protéine c-Myc est impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaires, dans le contrôle de l'apoptose et dans la tumorigenèse (Nisen, 1986). c-Myc induit également l'autophagie, et cette fonction est indépendante de l'apoptose ou de la tumorigenèse [Tsuneoka, Umata, 2003].

Deux régions de la protéine Myc sont requises pour ses activités biologiques : un domaine d'activation de la transcription NH₂-terminal (TAD – Transcription Activation Domain) incluant les boîtes Myc I et II et le domaine spécifique de liaison à l'ADN C-terminal b-HLH-Zip. c-Myc se lie à des séquences d'ADN spécifiques (E-Boxes : CACGTG) en formant un hétérodimère avec Max via le domaine b-HLH-Zip, comme illustré à la figure I.10. Ce complexe recrute plusieurs cofacteurs sur l'ADN et contribue ainsi à l'activation du promoteur du gène cible. Par exemple, Myc interagit avec TRRAP (Transactivation/Transformation-Domain Associated Protein), qui recrute les histones acétyl

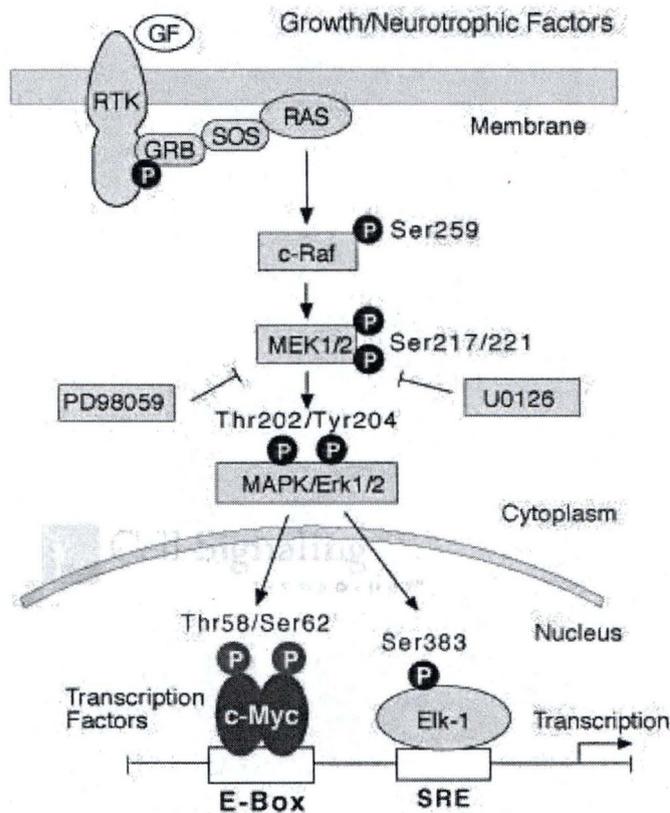


Figure I.11 : Schéma illustrant l'activation de la cascade de signalisation Ras par des signaux régulateurs de croissance. Ras active la voie de signalisation Raf-MEK-ERK, ce qui conduit à la phosphorylation de la protéine c-Myc nouvellement synthétisée sur la sérine 62, puis ensuite sur la thréonine 58 par la GSK-3 β , ce qui constitue le signal clé pour la dégradation de c-Myc. Les agents PD98059 et U0126 inhibent les MEK 1/2, ce qui interrompt la voie de signalisation MAPK/Erk 1 / 2 conduisant à la phosphorylation des résidus Ser 62 et Thr 58. Cette inhibition de phosphorylation conduit à la stabilisation de c-Myc.

(D'après Cell Signaling)

transférases Gcn5 et Tip60 [Wanzel, Herold, 2003]. La transactivation par Myc entre en compétition avec les protéines Mad, qui forment également des hétérodimères avec Max, et qui lient les mêmes séquences sur l'ADN que les complexes Myc-Max. Les hétérodimères Myc-Mad recrutent des complexes répresseurs sur les promoteurs [Ayer, Lawrence, 1995].

La régulation temporelle de l'accumulation de c-Myc est essentielle pour une prolifération cellulaire normale. Le temps de demi-vie court (20-30 min) de c-Myc est déterminé par la phosphorylation de deux résidus spécifiques et très conservés (Thr58/Ser62) trouvés chez tous les membres de la famille Myc de mammifères. Une fois ces deux résidus phosphorylés, la dégradation de c-Myc par la voie ubiquitine-protéasome 26S est initiée. Les signaux régulateurs de croissance n'induisent pas seulement la transcription du gène *c-myc* mais activent également la cascade de signalisation dépendante de Ras, qui a une action double sur la stabilité de c-Myc [Nesbit, Tersak, 1999]. Tout d'abord, Ras active la voie de signalisation Raf-MEK-ERK (Raf – MAPK/ERK Kinase – Extracellular Signal-Regulated Kinase), ce qui conduit à la phosphorylation de la protéine c-Myc nouvellement synthétisée sur la sérine 62. Cette phosphorylation est nécessaire pour une phosphorylation subséquente sur la thréonine 58 par la GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase-3 β), qui constitue le signal clé pour la dégradation de c-Myc [Nesbit, Tersak, 1999], comme illustré à la figure I.11. Ensuite, Ras active la voie PI(3)K (phosphatidylinositol-(3)-OH-kinase)/Akt qui inhibe GSK-3 β , ce qui prévient la phosphorylation de la thréonine 58 et permet la stabilisation de c-Myc. La déphosphorylation de c-Myc sur la sérine 62 est essentielle pour la dégradation de c-Myc. Cette déphosphorylation est réalisée par la PP2A (Protein Phosphatase 2 A). Une augmentation de l'abondance de c-Myc obtenue suite à une surexpression de la protéine ou par une inhibition de sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome 26S résulte en l'accumulation de la protéine dans le nucléole des cellules, une localisation rare pour un facteur de transcription [Arabi, Rustum, 2003]. Or, Andersen *et al.* ont montré lors d'une étude protéomique des nucléoles humains que la composition protéique du nucléole n'est pas statique et peut changer significativement selon l'état métabolique de la cellule [Andersen, Lyon, 2002]. Cela suggère une nouvelle voie de régulation de c-Myc, dans laquelle une interaction stable de celui-ci avec le nucléole le maintient hors de son lieu fonctionnel dans le nucléoplasme. De plus, dans les cellules exprimant des taux élevés de c-Myc, des systèmes protéasomes sont également associés aux nucléoles qui séquestrent c-Myc. Il n'a pas encore été prouvé qu'ils participent à une éventuelle dégradation de c-Myc au niveau des nucléoles [Arabi, Rustum, 2003].

c-Myc, surexprimé dans les cellules tumorales, induit également la biogenèse des ribosomes et la synthèse protéique en régulant l'activité de facteurs de traduction et l'efficacité de la maturation de l'ARNr (ARN ribosomique). Cette régulation pourrait être un mécanisme important par lequel c-Myc induit la croissance et initie la tumorigenèse [Schlosser, Holzel, 2003].

I.2.1.3 C/EBPs (CCAAT/enhancer-binding proteins)

Les C/EBPs appartiennent à une famille de facteurs de transcription présentant des homologies structurales et fonctionnelles entre eux. Les membres de cette famille sont : C/EBP α , - β , - γ , - δ , - ϵ , et - ζ . Le facteur de transcription C/EBP « type » contient un domaine d'activation, une région de liaison à l'ADN et un domaine de dimérisation « leucine zipper » contenant sept répétitions de résidus leucines qui forment une structure « coiled-coil » en hélice α [Vinson, Hai, 1993]. Les interactions électrostatiques entre les acides aminés le long de l'interface de dimérisation déterminent la spécificité de la formation du dimère, soit avec d'autres membres de la famille C/EBP, soit avec des facteurs de transcription des familles NF- κ B et Fos/Jun [Vinson, Hai, 1993]. La dimérisation est un prérequis à la liaison à l'ADN.

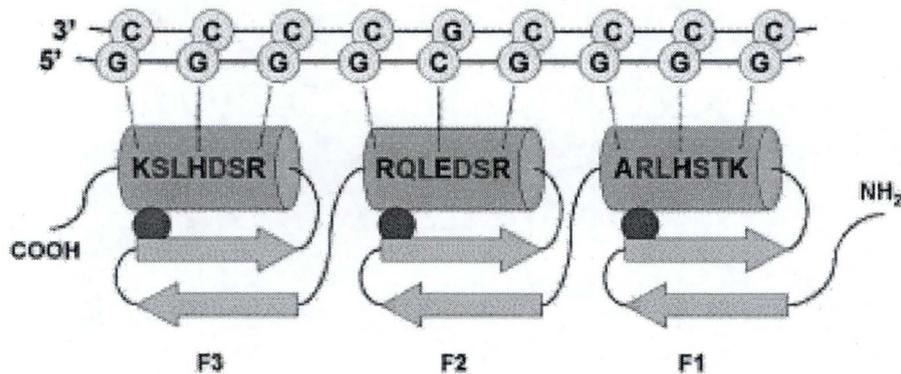


Figure I.12 : Illustration des doigts de zinc de la famille des facteurs de transcription Sp. Les doigts individuels (F1, F2 et F3) sont représentés. Les flèches illustrent les plans β et les cylindres illustrent les hélices α dont certains résidus interagissent avec les bases de l'ADN. Les interactions entre les plans β et les hélices α sont stabilisées par un ion de zinc. Les séquences de l'ADN, qui contient une boîte GC classique (5'GGGGCGGG3'), sont représentées comme une double rangée de boules.

(D'après Bouwman *et al.*, 2002)

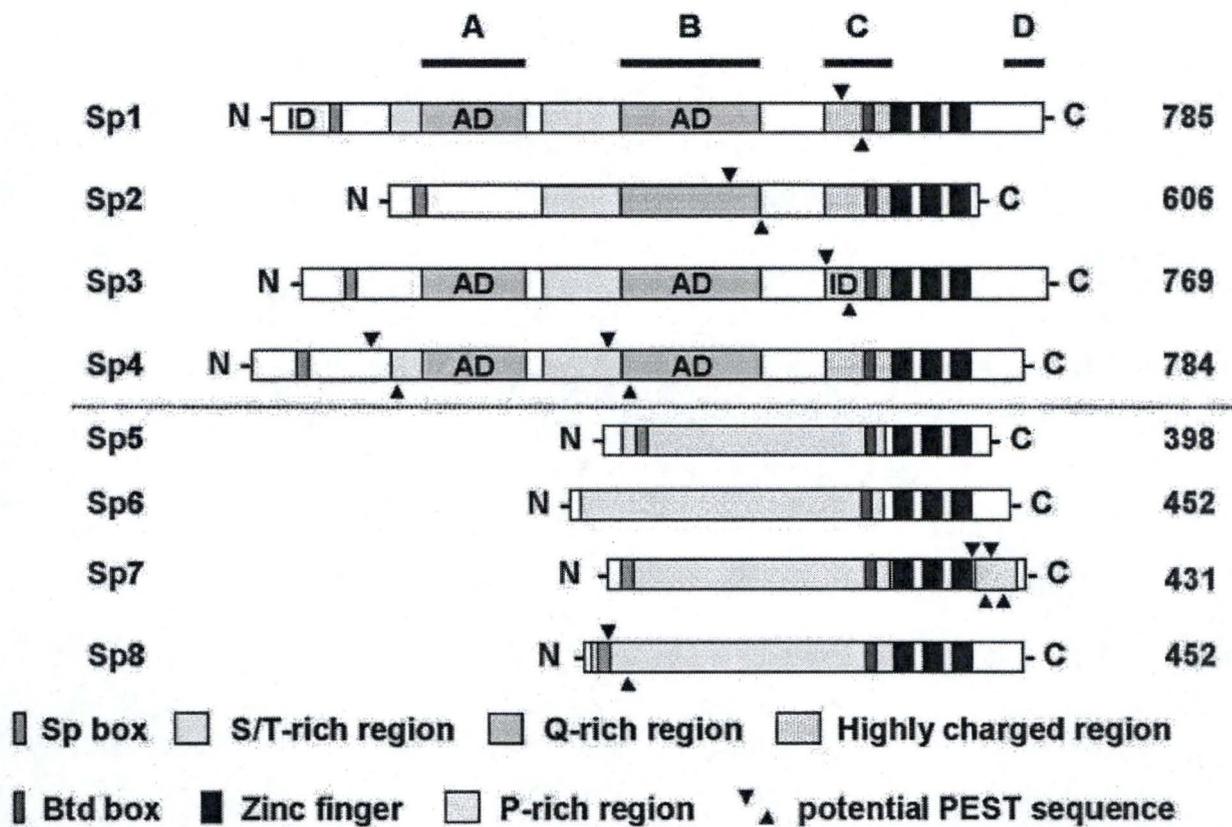


Figure I.13 : Illustration des motifs structuraux dans les facteurs Sp. Les boîtes Sp et Btd, les régions riches en sérine et thréonine, les régions riches en glutamine et très chargées, ainsi que les doigts de zinc et les domaines d'activation (AD) et d'inhibition (ID) sont indiqués. Les domaines A, B, C et D de Sp1 sont représentés par les barres noires.

(D'après Bouwman *et al.*, 2002)

La spécificité de liaison à l'ADN est déterminée, quant à elle, par la surface de contact avec l'ADN qui implique vingt acides aminés en amont du domaine « leucine zipper ». Les domaines responsables de l'activation et/ou de la répression transcriptionnelle sont localisés dans la région NH₂-terminale de la protéine [Lekstrom-Himes et Xanthopoulos, 1998]. Cette famille de protéines joue des rôles essentiels dans le contrôle de la prolifération, dans la différenciation cellulaire ainsi que la réponse inflammatoire. Avec PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma) et SREBP-1, les C/EBPs sont par exemple décrits comme des régulateurs clés de la différenciation adipocytaire [Rosen, Walkey, 2000].

L'intérêt pour cette famille de facteurs de transcription dans le cadre de notre étude portant sur la communication moléculaire lysosome-noyau est né de l'article de Wooley *et al.* (2004). Ces auteurs ont montré que l'ARNm de C/EBP est plus abondant dans des cellules exposées au saccharose. Ces auteurs ont donc postulé que l'expression différentielle de gènes induite par la surcharge en saccharose pourrait être coordonnée, au moins en partie, par ce facteur de transcription [Helip-Wooley et Thoene, 2004].

A ce stade, les liens existant entre les C/EBPs et les gènes nucléaires codant pour des protéines lysosomales sont peu connus. Cependant, il fut démontré que les C/EBPs participent à la régulation des gènes codant la glucocérébrosidase et la protéine activatrice du G_{M2} (Ganglioside M2), tous deux surexprimés dans des cellules incubées en présence de saccharose [Moran, Galperin, 1997 ; Schepers, Lemm, 2000].

I.2.1.4 Sp1 (Specificity protein 1)

Sp1 est une protéine à doigts de zinc qui se lie à des séquences riches en GC au niveau des promoteurs de gènes cibles (figure I.12). Sp1 est un facteur de transcription ubiquiste qui joue un rôle dans la transcription de nombreux gènes [Kadonaga, Carner, 1987]. Les membres de la famille Sp peuvent fonctionner comme activateurs ou répresseurs en fonction du promoteur sur lequel ils se lient et des co-régulateurs avec lesquels ils interagissent (Kaczynski, 2003). D'autres membres de cette famille sont connus : Sp2, Sp3, Sp4, Sp5, Sp6, Sp7 et Sp8. Sp1, 2, 3 et 4 forment un sous-groupe basé sur leur structure modulaire similaire (figure I.13). Sp1, 3 et 4 contiennent deux domaines de transactivation essentiels (A et B) pour l'activation de la transcription. Près de ces domaines A et B, des séquences riches en résidus sérine et thréonine peuvent être la cible de modifications post-traductionnelles, telles que des glycosylations ou des phosphorylations par des kinases telles que la PKA (Protein Kinase A), et la CKII (Casein Kinase II). Par exemple, la phosphorylation d'une thréonine appartenant au deuxième domaine en doigt de zinc inhibe la liaison à l'ADN de Sp1 et donc diminue l'expression de ses gènes cibles [Roos, Su, 1997].

Sp1 est impliqué dans l'activation d'un grand nombre de gènes, tels que des gènes régulés par le cycle cellulaire et des « housekeeping genes » (Brandeis, 1994 371). En effet, Sp1 est important dans la régulation de certains promoteurs ne contenant pas de boîte TATA et peut fonctionner dans le recrutement ou la stabilisation du complexe d'initiation de la transcription TFIID via un facteur de liaison [Pugh et Tjian, 1991].

Sp1 joue un rôle dual dans le promoteur du récepteur aux LDL (RLDL). Il permet une activation basale requise pour un faible niveau d'expression et participe à la régulation de l'expression du récepteur dépendante du niveau de stérols cellulaires. Son rôle dans cette dernière implique son interaction avec SREBP lié à une séquence dans le promoteur du RLDL. La liaison simultanée de SREBP et Sp1 alignerait des domaines spécifiques de chaque protéine facilitant les interactions protéine/protéine et permettrait une activation synergique de la transcription du RLDL par ces deux facteurs [Sanchez, Yieh, 1995].

La lipase acide lysosomale humaine (LAL) est une hydrolase requise pour le clivage des esters de cholestérol et des triglycérides dérivés des lipoprotéines plasmatiques. La région

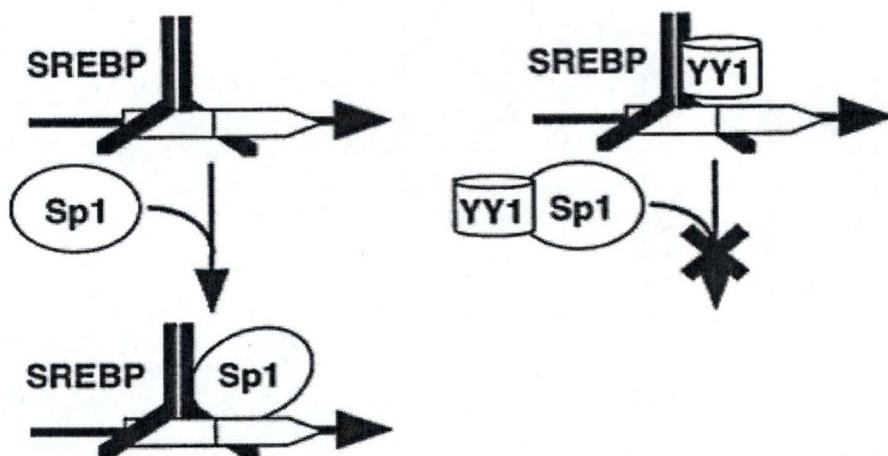


Figure I.14 : Modèle schématique expliquant la régulation de l'expression du récepteur aux LDL.

L'activation de l'expression du gène codant le récepteur aux LDL est sous le contrôle des facteurs SREBP et Sp1. Lorsque l'abondance de YY-1 est suffisante, ce facteur se lie à SREBP et Sp1 pour empêcher leur interaction au niveau du promoteur et inhibe donc l'expression du gène.

YY-1 est donc un facteur de transcription capable de réprimer l'expression du gène du récepteur aux LDL suite à la séquestration du facteur Sp1 et à sa liaison à SREBP.

(D'après Bennet *et al.*, 1999)

promotrice de la LAL est riche en GC et ne contient pas de boîte TATA classique [Ye, Dinarello, 1993]. Un élément répondant au PMA (phorbol 12-myristate-13 acétate) a été identifié dans la région -182 et -107 pb en amont du site d'initiation de la transcription [Ries, Buchler, 1998]. Deux sites de liaison pour le facteur de transcription Sp1 ont été identifiés à l'intérieur de cette région mais seule la délétion du site se trouvant à -114 résulte en une quasi complète élimination des expressions basale et induite du gène LAL par le PMA [Ries, Buchler, 1998].

I.2.1.5 YY-1 (Yin Yang-1)

Ce facteur de transcription est un membre ubiquiste de 65 kDa appartenant également à la famille des protéines à doigts de zinc. Il possède quatre motifs à doigts de zinc, se lie à la séquence d'ADN 5'-CCAT-3' ou 5'-ACAT-3' et peut activer ou réprimer l'expression des gènes qu'il régule. En fonction de sa concentration, des facteurs avec lesquels il interagit et des séquences bordant sa séquence consensus dans le promoteur, il sera activateur ou répresseur des gènes cibles [Yao, Yang, 2001]. Des exemples de promoteurs pouvant être régulés par YY-1 sont c-Myc, c-Fos, p53, α -actine, GRP78 et la β -caséine [Shi, Lee, 1997].

Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer la répression par YY-1. Ceux-ci incluent l'inhibition de la liaison d'une protéine activatrice à un site de reconnaissance, un changement possible dans la topologie de l'ADN induite par la liaison de YY-1 à l'ADN [Natesan et Gilman, 1993], et le recrutement d'une histone déacétylase (HDA), qui peut conduire à une diminution localisée dans l'acétylation d'histones [Yang, Inouye, 1996]. Un exemple de répression par YY-1 est rencontré dans le promoteur du RLDL, où il empêche l'interaction activatrice et synergique entre SREBP et Sp1, ce qui conduit à inhiber l'expression du gène codant le RLDL (figure I.14).

De nombreux gènes régulés par la concentration cellulaire en stérols (codant pour le RLDL, la HMG-CoA réductase, la « fatty acid synthase », ...) contiennent des sites de liaison potentiels pour YY-1 dans leur promoteur. Ces sites consensus sont chevauchants ou adjacents à des sites de liaison pour d'autres facteurs de transcription comme NF-Y (Nuclear factor-Y), Sp1 ou SREBP [Thomas et Seto, 1999].

Les mécanismes d'activation de l'expression génique par YY-1 sont complexes [Shi, Lee, 1997]. En reconnaissant des éléments en amont, YY-1 peut conduire à l'activation de la transcription via des interactions avec d'autres facteurs de transcription liés à l'ADN (CREB, Sp1) [Natesan et Gilman, 1993] ou en recrutant des protéines co-activatrices ne se liant pas à l'ADN comme des histones acétyltransférases (HAT) comme CBP (CREB Binding Protein)/p300 [Yao, Yang, 2001]. De plus, une interaction directe avec une protéine liée à la boîte TATA (TBP : TATA Box-binding Protein) ou des protéines associées à cette dernière comme TAF (TBP-Associated Factor) a été démontrée [Austen, Luscher, 1997]. Enfin, YY-1 peut interagir avec des composants de la matrice nucléaire, qui peuvent affecter la fonction de YY-1 en le séquestrant dans certaines parties du noyau [Bushmeyer et Atchison, 1998].

I.2.1.6 NF- κ B

Les protéines Rel appartiennent à deux classes. L'une contient RelA (p65), RelB et c-Rel. Les protéines de cette classe contiennent un « RHD » (Rel Homology Domain) dans le domaine NH₂-terminal responsable de la dimérisation et de la liaison à l'ADN ainsi que des domaines modulant la transcription dans le domaine C-terminal. La seconde classe contient les facteurs NF- κ B1 et NF- κ B2 synthétisés sous forme de larges précurseurs (p105 et p100). Une protéolyse dépendante de l'ubiquitine clive les domaines C-terminaux, conduisant aux formes matures des protéines de liaison à l'ADN (p50 et p52) [Ghosh, May, 1998].

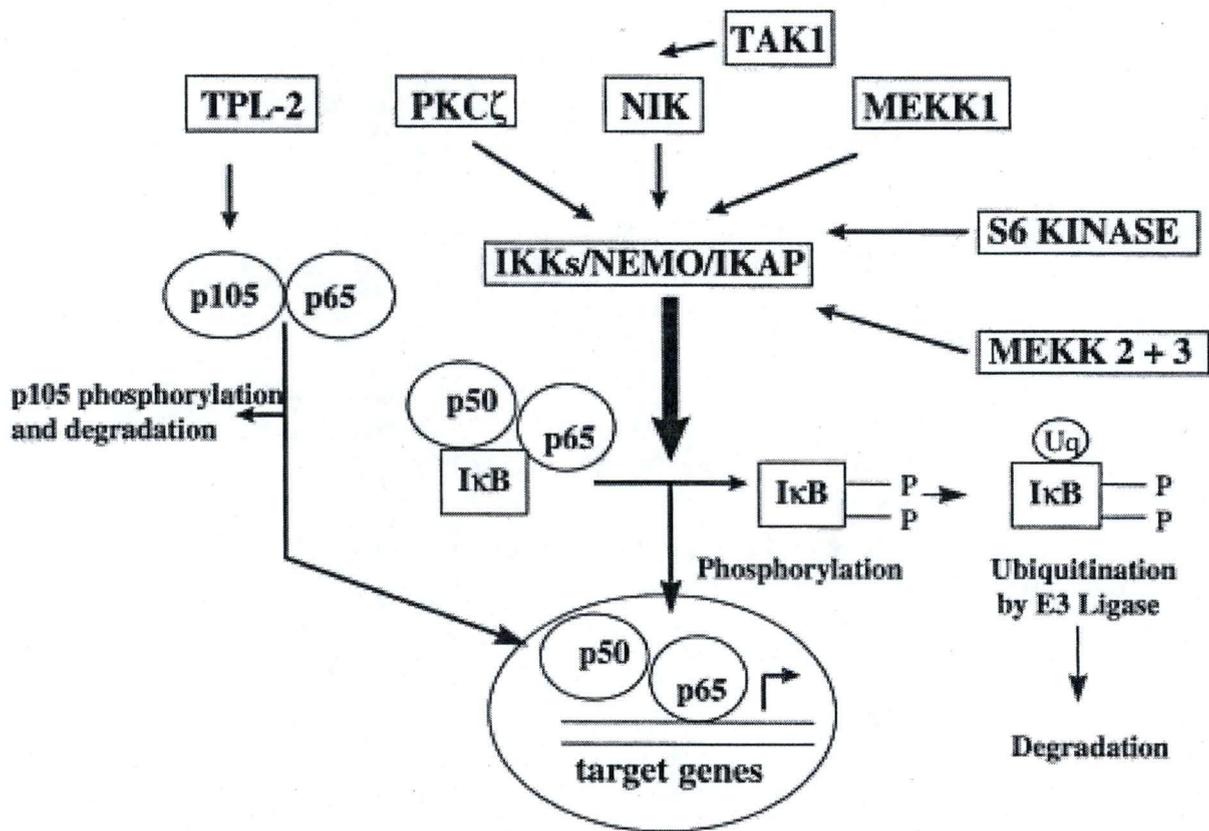


Figure I.15 : Mécanismes de régulation de l'activation du facteur de transcription NF-κB. Des signaux extracellulaires activent des voies de transduction du signal conduisant à l'activation de nombreuses kinases activant les IKKs (IκB Kinases). NEMO et IKAP (IKK complex-Associated Protein) sont essentiels pour l'activité de IKK. Une fois phosphorylé par les IKKs, IκB est ubiquitiné par une E3 ligase spécifique, puis dégradé par le protéasome 26S. Le complexe p50 / p65 transloque dans le noyau et active ses gènes cibles. Les kinases agissant en amont de IKK incluent NIK (NF-κB Inducing Kinase), MEKK 1, 2 et 3 (MAPK/ERK kinase kinase1, 2 et 3), TAK1 (Transforming growth factor-Activated Kinase1), la protéine kinase C ξ et la S6 kinase. Une voie alternative pour l'activation de NF-κB, indépendante de IκB, implique la kinase TPL-2 (Tumor Progression Locus-2 kinase) qui peut phosphoryler p105, ce qui conduit à sa maturation en p50.

(D'après Bowie *et al.*, 2000)

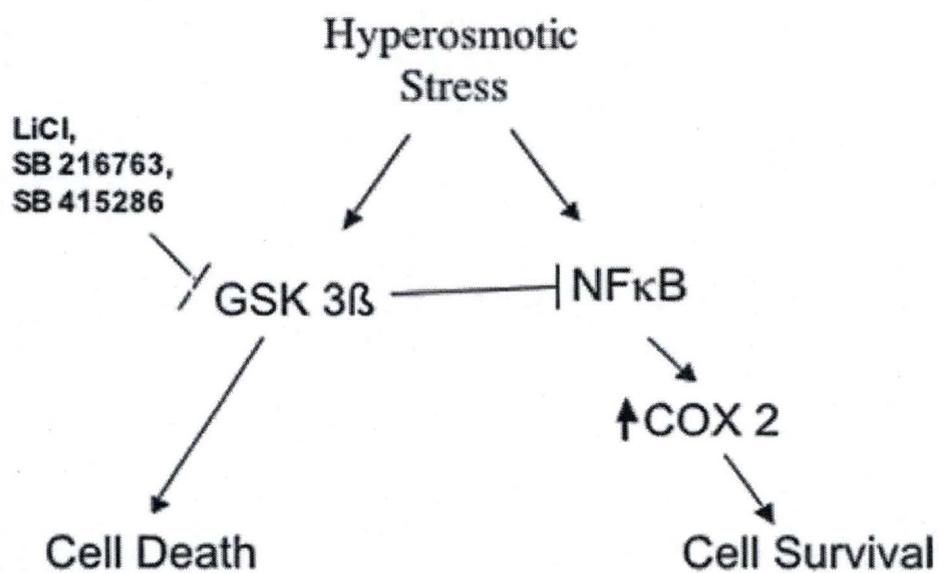


Figure I.16 : Voies de signalisation biochimiques induites par un stress hyperosmotique et conduisant à la survie cellulaire ou à la mort par apoptose.

(D'après Rao *et al.*, 2004)

Les formes les plus fréquentes de NF- κ B impliquent les dimères composés de RelA, c-Rel et de p50, maintenus sous forme inactive dans le cytoplasme par leurs inhibiteurs spécifiques, les protéines I κ B (Inhibitor of κ B). Une première voie d'activation de NF- κ B est stimulée par les infections virales et microbiennes et des cytokines pro-inflammatoires, qui active le complexe IKK (I κ B kinase). Le modèle de régulation de l'activation de NF- κ B est illustré à la figure I.15. IKK phosphoryle I κ B lié à NF- κ B au niveau de deux sérines (S32 et S36) conservées à l'intérieur du domaine régulateur NH₂-terminal. Cette phosphorylation mène à la dégradation dépendante de l'ubiquitine des I κ Bs par le protéasome 26S et permet au dimère NF- κ B libéré de transloquer dans le noyau. De nombreuses kinases peuvent phosphoryler I κ B comme IKK α et IKK β [Stancovski et Baltimore, 1997]. Elles prennent part à un large complexe multiprotéique appelé le « IKK signalosome », qui contient IKAP (IKK Complex-Associated Protein) et NEMO (NF- κ B Essential Modulator, aussi appelé IKK γ). Certains régulateurs et activateurs en amont de l'activité des IKK comme NIK (NF- κ B Inducing Kinase), MEKK1 (Mitogen-Activated Protein Kinase/ERK Kinase Kinase 1), TAK1 (Transforming Growth Factor β -Activated Kinase 1), la protéine kinase C ζ , MEKK 2 et 3 et la kinase S6 sont identifiés [Bowie et O'Neill, 2000].

NF- κ B est activé dans plusieurs types cellulaires en réponse à une grande variété de stimuli et conditions, qui comprennent des produits viraux et bactériens, des cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 (Interleukine 1), et le TNF α (Tumor Necrosis Factor α), des stress intracellulaires tels que la surcharge protéique dans le RE, et des stress extracellulaires par les radiations UV ou l'H₂O₂ (stress oxydatif) [Bowie et O'Neill, 2000].

Une étude menée par Rao *et al.* (2004) sur des cellules RMICs (Renal Medullary Interstitial Cells) a montré l'implication du facteur NF- κ B dans la réponse au stress osmotique [Rao, Hao, 2004]. Dans ces cellules, l'activité de la GSK-3 β initie une voie de signalisation importante contribuant à la mort cellulaire par apoptose induite par un stress hyperosmotique. L'activité constitutive de la GSK-3 β inhibe l'activité de NF- κ B. L'activité de la GSK-3 β peut être inhibée par la phosphorylation de la sérine 9 dans le domaine NH₂-terminal [Cross, Alessi, 1995]. L'inhibition de la GSK-3 β induit la levée de l'inhibition de NF- κ B qui participe alors à la surexpression de l'expression de COX2 (CycloOXygenase 2) mais en plus protège les cellules RMICs de la mort induite par un stress osmotique. NF- κ B joue donc un rôle majeur dans la régulation de COX2 par la GSK-3 β [Rao, Hao, 2004]. Ce mécanisme est schématisé à la figure I.16. Il a aussi été montré qu'un stress hyperosmotique stimule la liaison de NF- κ B à l'ADN et l'activité transcriptionnelle dépendante de ce facteur. Un effet, un choc hyperosmotique peut conduire à l'activation des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) p38 et p42/44, ce qui conduira à l'activation des IKKs, et à l'activation de NF- κ B [Nemeth, Deitch, 2002].

Enfin, NF- κ B peut protéger de l'apoptose induite par le lysosome en régulant l'expression du gène codant pour Spi2A. Spi2A est un inhibiteur spécifique des cathepsines lysosomales dont la cathepsine B. Spi2A peut donc inhiber la cathepsine B libérée dans le cytosol. Spi2A (Serpine 2A) prévient ainsi de l'apoptose initiée au niveau du lysosome (ce mécanisme sera détaillé au point I.2.2.2.3) en inhibant le clivage de Bid par la cathepsine B et l'activation subséquente des caspases par des protéines libérées par la mitochondrie [Kagedal, Zhao, 2001].

I.2.1.7 GATA

Les six facteurs GATA exprimés dans les cellules de mammifères peuvent être divisés en deux sous-groupes en fonction des homologies entre les séquences primaires en acides aminés et les spécificités d'expression spatio-temporelle : GATA-1/2/3 et GATA-4/5/6 [Tremblay et Viger, 2003]. Toutes les protéines GATA contiennent un domaine de liaison à l'ADN

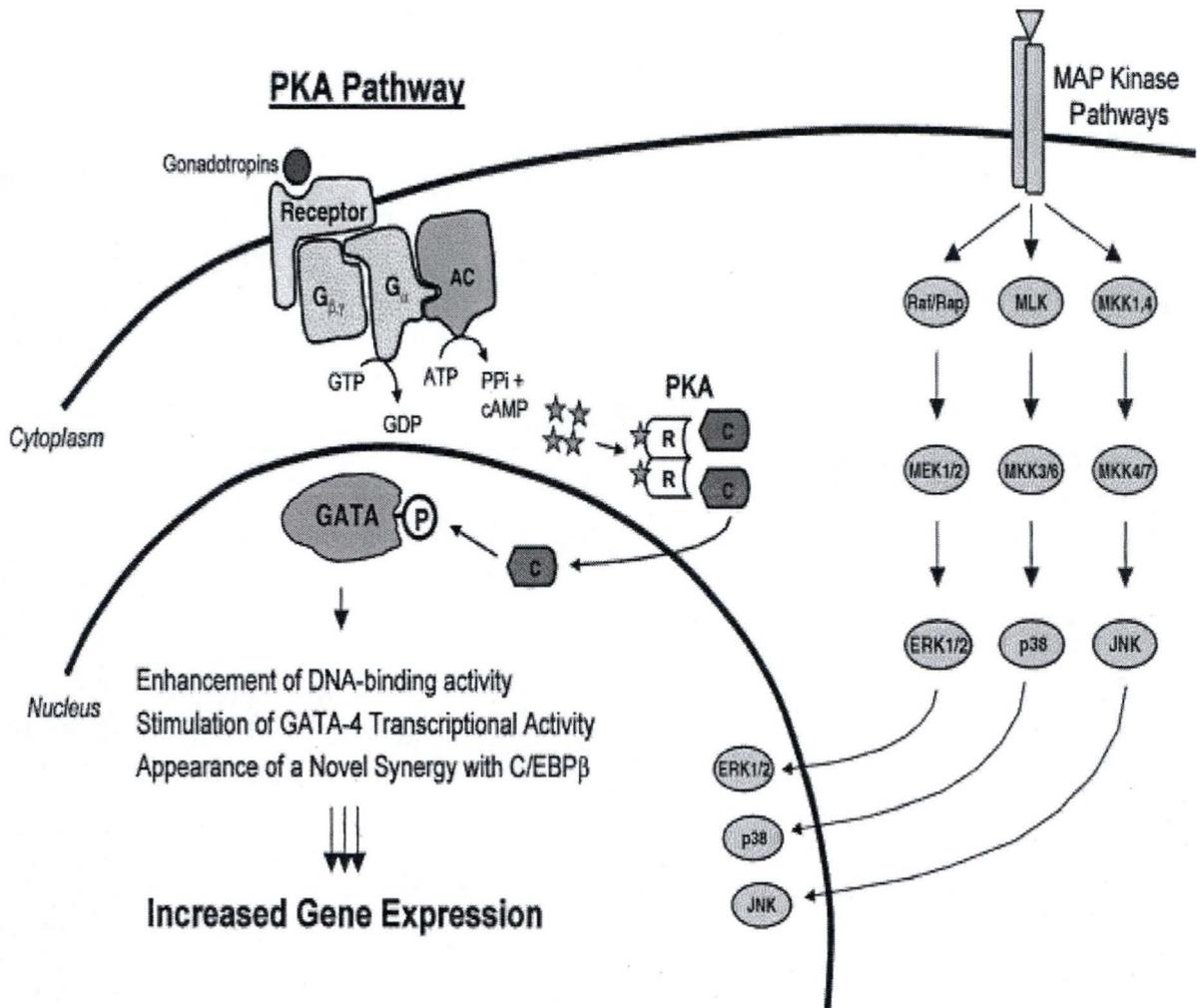


Figure I.17 : Modulation de l'expression de gènes cibles des facteurs GATA suite à leur phosphorylation. Deux voies de signalisation connues peuvent induire la phosphorylation de GATA : la voie AMPc / PKA et la voie des MAP kinases. Dans la voie AMPc / PKA, la liaison d'hormones à leur récepteur couplé aux protéine G active l'adénylate cyclase (AC) qui augmente la production d'AMPc cellulaire à partir de l'ATP. L'AMPc cyclique lie alors la sous-unité R (régulatrice) de la PKA (protéine kinase A), ce qui permet la dissociation de la sous-unité C (catalytique) et sa translocation dans le noyau où elle peut phosphoryler les facteurs GATA (GATA 4 et GATA 6).

GATA-4 peut aussi être phosphorylé directement par Erk1/2, p38 et JNK suite à l'activation de voies MAP kinases stimulées par des signaux mitogéniques et de stress.

La phosphorylation de GATA médiée par l'une ou l'autre voie contribue à augmenter la liaison du facteur à l'ADN, à augmenter son activité transcriptionnelle et à modifier ses interactions avec d'autres facteurs comme C/EBPβ. La résultante est une augmentation de l'expression des gènes cibles de GATA.

(D'après Tremblay *et al.*, 2003)

conservé et composé de deux domaines à doigts de zinc composés du motif Cys-X2-Cys-X17-Cys-X2-Cys. Le doigt de zinc du domaine C-terminal est requis pour la reconnaissance site-spécifique et la liaison à l'ADN par le motif WGATAR central. Le domaine NH₂-terminal contribue à la spécificité et à la stabilité de la liaison à l'ADN [Omichinski, Trainor, 1993]. Les gènes *GATA-1/2/3* sont principalement exprimés dans les lignées cellulaires hématopoïétiques [Orkin, 1992] où ils régulent l'expression de gènes spécifiques de la différenciation des lymphocytes T, des cellules érythroïdes et des mégacaryocytes [Orkin, 1998]. Les gènes *GATA-4/5/6* sont exprimés de façon prédominante dans le cœur, l'intestin, les gonades et les glandes surrénales [Molkentin, 2000]. La spécificité fonctionnelle des facteurs GATA est réalisée par des interactions protéine-protéine avec d'autres facteurs. Par exemple, les facteurs *GATA-1/2/3* interagissent avec des facteurs tels que AP-1, Sp1, EKLf (Erythroid Kruppel-Like Factor) et *GATA-4* interagit avec MEF-2 (Myocyte Enhancer Factor-2) et C/EBP β . En plus de ces facteurs interagissant avec GATA, on a aussi identifié une famille de larges protéines à doigts de zinc NH₂-terminaux nommés FOG-1 et FOG-2 (Friends of GATA) [Tsang, Visvader, 1997 ; Holmes, Turner, 1999]. Ces protéines ne se lient pas directement à l'ADN, mais agissent comme co-répresseurs ou co-activateurs de l'activité transcriptionnelle dépendante des protéines GATA [Tremblay et Viger, 2003].

Les tissus stéroïdogènes expriment abondamment deux facteurs GATA : *GATA-4* et *GATA-6*. Ces facteurs semblent donc jouer un rôle important dans la stéroïdogénèse, ce qui paraît être confirmé par la présence de plusieurs sites de liaison potentiels pour le facteur GATA dans des promoteurs de gènes stéroïdogènes, tels que SF-1 (Steroidogenic Factor 1), la 17 β -hydroxystéroïdes déhydrogénase de type 1 et l'aromatase P-450 [Tremblay et Viger, 2003]. La stéroïdogénèse est essentiellement régulée par les hormones pituitaires ACTH (Adrenocorticotropie Hormone), LH (Luteinizing Hormone) et FSH (Follicle-Stimulating Hormone) et est principalement médiée par la voie de signalisation dépendante de l'AMPc (AMP-cyclique), conduisant à l'activation de la PKA. En effet, la liaison des hormones pituitaires à leurs récepteurs couplés aux protéines G stimule l'activité de l'AC (Adénylate Cyclase) qui augmente la production intracellulaire d'AMPc. L'AMPc lie alors la sous-unité régulatrice de la PKA permettant la dissociation de sa sous-unité catalytique et la translocation de celle-ci dans le noyau où elle peut phosphoryler les facteurs GATA. Des analyses de la séquence en acides aminés de *GATA-4* ont révélé la présence d'un résidu sérine 261 entre les deux doigts de zinc du domaine de liaison à l'ADN qui constitue le site phosphoaccepteur de *GATA-4* ciblé par la PKA en réponse à la stimulation par l'AMPc dans les cellules stéroïdogènes. La phosphorylation de *GATA-4* active sa liaison à l'ADN et ses propriétés transactivatrices au niveau des promoteurs des gènes cibles. La modulation de l'expression des gènes stéroïdogéniques par les facteurs GATA phosphorylés est schématisée à la figure I.17. De plus, cette phosphorylation module la capacité de *GATA-4* à coopérer avec d'autres facteurs [Tremblay, Hamel, 2002]. La voie de signalisation des MAPK semble aussi être un régulateur important de l'activité des facteurs GATA.

I.2.1.8 CREB (Cyclic-AMP Responsive Element-Binding protein)

La famille des activateurs transcriptionnels CREB répondant à l'AMPc comprend CREB, CREM (cAMP-Responsive Element Modulator) et ATF-1 [Mayr et Montminy, 2001] [Servillo, Della Fazia, 2002]. La structure primaire de CREB révèle un domaine central de 60 acides aminés contenant un site de phosphorylation pour la PKA, ainsi que plusieurs sites de phosphorylation potentiels pour les caséines kinases I et II [Brindle, Linke, 1993], PKC, AKT, MSK-1 (Mitogen/Stress-activated Kinase-1) et les calcium-calmoduline kinases II et IV [Mayr et Montminy, 2001]. Un domaine de dimérisation b-ZIP est localisé dans la région C-terminale chez tous les membres de la famille CREB. CREB est activé par la phosphorylation de la sérine 133 en réponse, parmi d'autres signaux, à une augmentation de la concentration

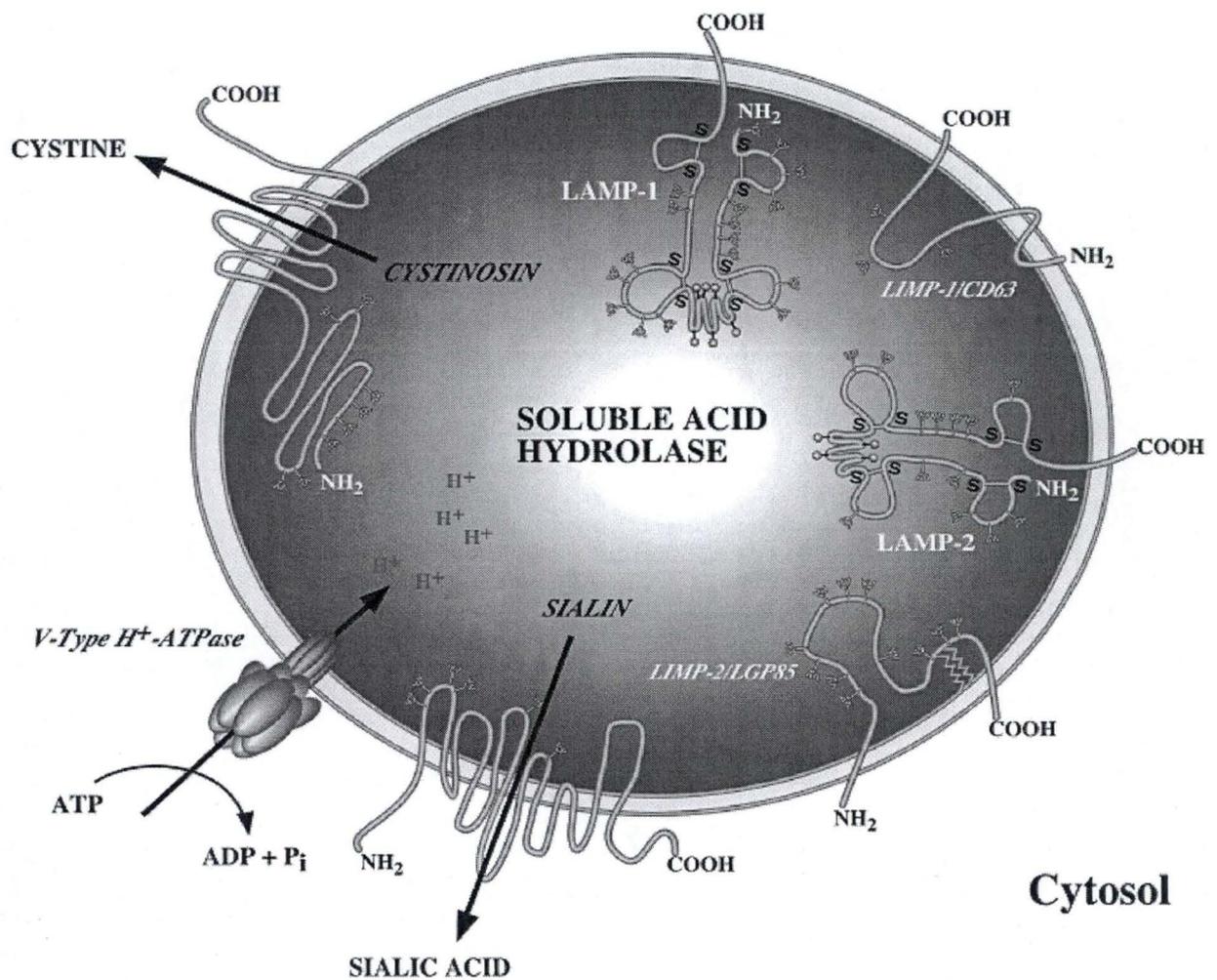


Figure I.18 : Constituants majeurs de la membrane lysosomale.

Topologie des protéines de la membrane lysosomale LAMP-1, LAMP-2, LIMP-1-CD63 et LIMP-2/LGP85. La pompe H⁺-ATPase est essentielle pour l'acidification de la lumière lysosomale et les 2 transporteurs de membrane, cystinosine et sialine. Les sites putatifs de O- et N-glycosylation sur le domaine luminal des protéines sont indiqués. LAMP, Lysosome-Associated Membrane Protein; LIMP, Lysosomal Integral Membrane Protein; LGP, Lysosomal Membrane Glycoprotein.

(D'après Eskelinen *et al.*, 2003)

en AMPc. La phosphorylation de CREB sur la sérine 133 permet le recrutement du co-activateur transcriptionnel CBP qui a également une activité histone acétyltransférase [Servillo, Della Fazia, 2002] et de P300 [Mayr et Montminy, 2001].

CREB active les gènes répondant à l'AMPc en se liant comme un homo- ou un hétéro-dimère à une séquence CRE (cAMP-response Element), TGACGTCA [Tinti, Yang, 1997]. Cependant, on ne sait pas encore si la dimérisation suit ou précède la liaison à l'ADN de ce facteur. Plusieurs études ont montré que la liaison de CREB à la séquence CRE pourrait être trop rapide pour procéder par la liaison d'un dimère préformé à l'ADN. Ces études suggèrent plutôt un modèle dans lequel les monomères CREB lient l'ADN et ensuite dimérisent sur la séquence CRE [Wu, Spiro, 1998 ; Kohler, Metallo, 1999]. Le domaine de transactivation de CREB est bipartite, consistant en un domaine d'activation carboxy-terminal constitutif (CAD : acides aminés 160-238) et un domaine inductible (KID : Kinase-Inducible Domain) qui entrent en synergie en réponse à la stimulation par l'AMPc [Quinn, 1993].

CREB est un régulateur du cycle et du programme de différenciation cellulaire. Dans le foie, CREB semble réguler des enzymes impliquées dans la néoglucogenèse telle que la phospho-énol pyruvate carboxykinase [Quinn et Granner, 1990]. CREB peut également promouvoir la respiration cellulaire en activant le gène du cytochrome c [Herzig, Scacco, 2000]. Enfin, rappelons l'implication de ce facteur dans la réponse rétrograde mitochondrienoyau induite par une déplétion en ADNmt, abordée précédemment au point I.1.1.2.2.

I.2.1.9 AP-1 (Activator Protein-1)

AP-1 est un facteur de transcription dimérique qui contient les membres des familles protéiques JUN (c-Jun, Jun-B, Jun-D) et FOS (c-Fos, Fos-B, Fra-1). Les dimères protéiques rencontrés le plus souvent sont composés de c-Fos/c-Jun et c-Jun/c-Jun [Reddy et Mossman, 2002].

Ce facteur de transcription peut être activé par la voie des MAP kinases. Cette voie, qui joue un rôle central dans les réponses cellulaires aux mitogènes comme la prolifération et la différenciation cellulaires ou dans la réponse à des stress variés conduisant à l'apoptose, inclut les ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases), JNK (c-JUN NH₂-terminal Kinase) et p38 [Kim et Iwao, 2003].

L'activité transactivatrice de AP-1 peut être régulée par la composition du dimère formé, le taux de transcription des protéines du dimère, des modifications post-traductionnelles ainsi que des interactions avec d'autres protéines [Eferl et Wagner, 2003].

I.2.2 Communication moléculaire interorganites lysosome-noyau

I.2.2.1 Structure des lysosomes

I.2.2.1.1 Membrane

La membrane lysosomale a une fonction essentielle de séquestration des hydrolases acides. Elle protège ainsi les autres constituants cellulaires d'une dégradation par ces hydrolases. Elle maintient le pH intralysosomal entre 5,2 et 5,5 grâce à une pompe à protons de type H⁺-ATPase [Forgac, 1999]. Certaines des protéines de membrane lysosomale médient des fonctions essentielles du lysosome, comme la translocation des acides aminés, des acides gras et des hydrates de carbone résultant de la dégradation hydrolytique par les hydrolases lysosomales. De plus, les protéines de membrane lysosomale sont impliquées dans les processus de fusion de type homotypique ou avec des membranes d'autres organites, incluant endosomes, phagosomes et membranes plasmiques [Fukuda, 1991]. La figure I.18 reprend les acteurs principaux de la membrane lysosomale.

Environ vingt systèmes de transport de petites molécules au travers de la membrane lysosomale ont été décrits, mais seuls les produits de deux gènes, codant pour la cystinosine et pour la sialine, impliquées respectivement dans le transport de la cystine et de l'acide sialique, ont été analysés de façon détaillée. La cystinosine comprend 367 acides aminés et traverse sept fois la membrane. L'extrémité NH₂-terminale est hautement glycosylée et réside dans la lumière lysosomale. Le domaine C-terminal est cytosolique et contient un signal de ciblage lysosomal. La sialine contient douze domaines transmembranaires et ne comprend pas de signal de ciblage lysosomal. Ce transporteur n'est donc probablement pas exclusivement localisé dans la membrane lysosomale [Eskelinen, Tanaka, 2003]. D'autres protéines de membrane lysosomale médient notamment le transport d'ions et d'acides aminés [Sawada, Jardine, 1993].

Les cinq protéines de membrane lysosomale majeures sont LAMP-1, LAMP-2, LIMP-1, LIMP-2 (Lysosomal Integral Membrane Protein -1 et -2) et la phosphatase lysosomale acide [Kuronita, Eskelinen, 2002]. Des protéines membranaires intégrales hautement glycosylées, comme les protéines LAMPs et les protéines LIMPs constituent environ 50 % des protéines de la membrane lysosomale [Marsh, Schmid, 1987].

LAMP-1 et LAMP-2 sont des protéines distinctes, mais hautement homologues. Leur structure et leur masse moléculaire sont similaires (leur masse moléculaire est comprise entre 90 et 120 kDa). Les gènes codant pour les protéines LAMP-1 et LAMP-2 sont distincts et ont probablement divergé tôt dans l'évolution, comme le suggère leur localisation sur des chromosomes différents [Fukuda, 1991].

LAMP-1 et LAMP-2 possèdent de courts domaines cytoplasmiques de 11 acides aminés contenant des motifs tyrosine capables d'interagir avec les complexes adaptateurs (APS) pour leur sortie du trans-Golgi et l'adressage aux lysosomes. Le domaine intraluminal est glycosylé avec quelques O-glycanes et un grand nombre (16 à 20) de N-glycanes. Ces glycosylations représentent environ 60 % de la masse totale de ces protéines, faisant de celles-ci les protéines les plus hautement glycosylées connues. Ces protéines forment donc une barrière protéique presque continue à la surface interne de la membrane. Il a été proposé que leur degré de glycosylation élevé ait pour fonction de protéger la membrane de l'action des hydrolases acides [Lewis, Green, 1985 ; Hunziker et Geuze, 1996]. Cependant, Kundra *et al.* ont remis cette hypothèse en question. Ils ont en effet montré que l'endocytose d'endoglycosidase H par la cellule n'altère pas la stabilité membranaire, le pH et la densité des lysosomes. Ces auteurs proposent donc que la membrane lysosomale soit constitutivement résistante aux lipases lysosomales [Kundra et Kornfeld, 1999].

Dans certaines circonstances on peut observer une augmentation de la synthèse de LAMP-2, par exemple durant la différenciation des cellules de carcinomes dans des embryons de souris [Amos et Lotan, 1990 ; Sawada, Jardine, 1993]. Si l'on ne connaît pas encore les facteurs de transcription qui régulent l'expression du gène codant pour LAMP-2, des sites de liaison potentiels pour les facteurs AP-1 et Sp1 existent dans le promoteur de ce gène [Sawada, Jardine, 1993].

Les fonctions de LAMP-1 et LAMP-2 sont encore largement inconnues. Cependant, des souris KO (Knock Out) pour les gènes codant ces protéines existent. Les études sur des souris KO pour la protéine LAMP-1 [Andrejewski, Punnonen, 1999] suggèrent que les fonctions de LAMP-1 et LAMP-2 puissent être redondantes. En effet, les souris KO sont viables et fertiles, mais on observe dans ces conditions une surexpression compensatoire de la protéine LAMP-2 dans la majorité des tissus déficients en LAMP-1 (par exemple, on observe une augmentation de l'abondance de la protéine LAMP-2 de 2,7 fois dans des homogénats de reins de souris déficientes en LAMP-1 par rapport aux contrôles). L'augmentation de l'abondance de la protéine LAMP-2 n'est pas corrélée avec une augmentation de l'abondance en ARNm de

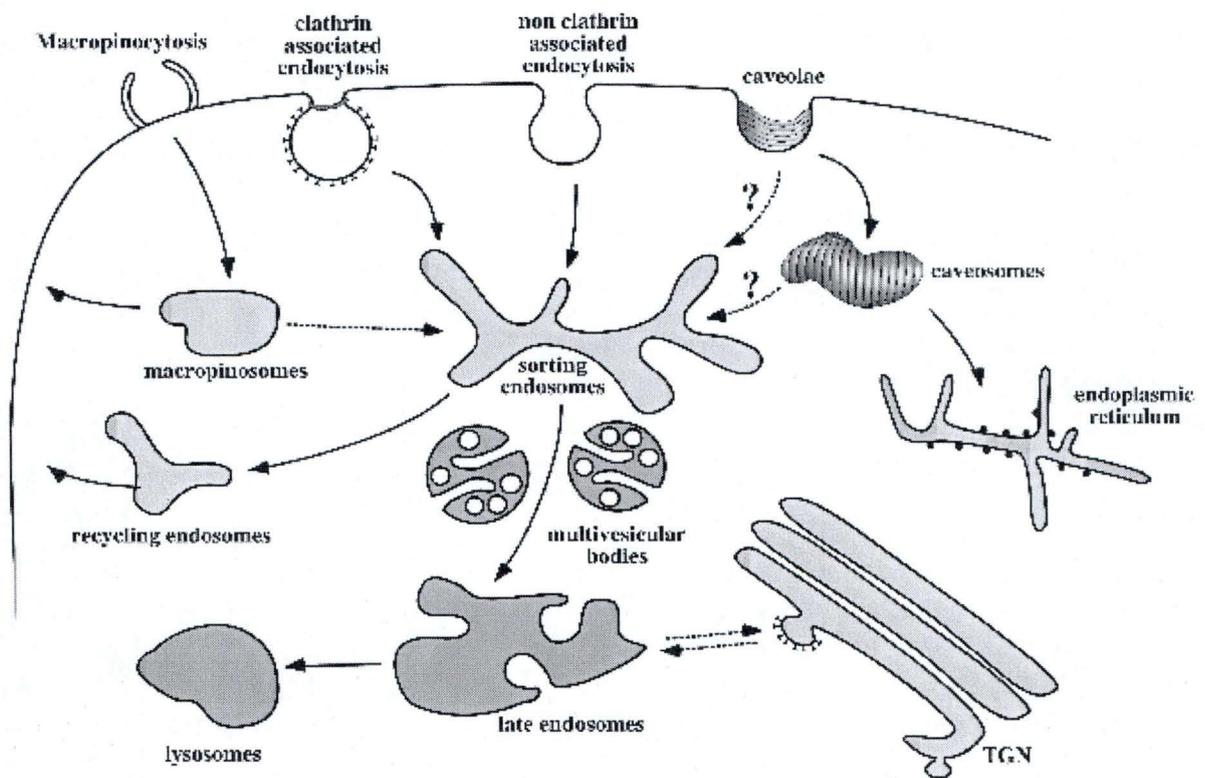


Figure I.19 : Vue des voies endocytaires intracellulaires dépendantes ou non de la clathrine.

Les endosomes tardifs peuvent fusionner avec les lysosomes. Cela permet notamment un transport rétrograde de molécules depuis les lysosomes vers les endosomes tardifs. Deux compartiments distincts ont été identifiés dans les étapes terminales des voies endocytaires dans les cellules de mammifères: les endosomes tardifs et les lysosomes les plus distaux.

Lamp2 ni avec un temps de demi-vie accru de la protéine. Cela suggère une régulation au niveau traductionnel de la protéine LAMP-2 [Andrejewski, Punnonen, 1999].

Contrairement à une déficience en protéine LAMP-1, la déficience en protéine LAMP-2 cause des symptômes sévères chez les souris KO [Tanaka, Guhde, 2000]. La plupart meurent à l'âge de 20 à 40 jours et ces souris sont plus petites que les sauvages. De plus, on constate une accumulation massive de vacuoles autophagiques dans de nombreux tissus, incluant le foie, le muscle et le cœur. Les cellules musculaires cardiaques et squelettiques présentent une accumulation de vacuoles remplies de matériaux polymorphiques, certains d'entre eux ayant pu être identifiés comme des composants cytoplasmiques partiellement dégradés, suggérant une origine autophagique. La fonction contractile du muscle cardiaque est réduite de moitié par rapport aux contrôles. Dans des fibroblastes de souris déficientes en protéines LAMP-2, on détecte également des niveaux d'expression altérés du récepteur au mannose 6-phosphate [Eskelinen, Illert, 2002]. L'importance physiologique de LAMP-2 est supportée par la découverte qu'une déficience en protéine LAMP-2 est à la base de la maladie de Danon [Nishino, Fu, 2000]. Cette maladie est caractérisée par une cardiomyopathie fatale, un retard mental et une myopathie squelettique modérée. L'accumulation de vacuoles contenant des déchets cytoplasmiques à l'intérieur du muscle cardiaque et squelettique est caractéristique de cette maladie [Nishino, Fu, 2000].

La double déficience LAMP-1/LAMP-2 conduit quant à elle à une létalité embryonnaire. De plus, chez ces souris doublement déficientes LAMP-1/LAMP-2, on détecte l'accumulation de vacuoles autophagiques dans la plupart des tissus, incluant les cellules endothéliales et les cellules de Schwann, ainsi qu'un élargissement et une distribution plus périphérique des vésicules lysosomales. On constate aussi dans ces cellules doublement déficientes une accumulation de cholestérol non estérifié dans les compartiments endosomes/lysosomes et des quantités réduites de gouttelettes lipidiques. Cette accumulation de cholestérol est supprimée si on surexprime LAMP-2 dans ces cellules ; au contraire, elle n'est pas supprimée par LAMP-1.

LIMP-1 et LIMP-2/LGP85 (Lysosomal Glycoprotein 85) sont également des protéines de membrane lysosomale majeures, bien que moins abondantes que les LAMPs. LIMP-2/LGP85 a une structure différente de LAMP-1 et LAMP-2. Elle est insérée dans la membrane lysosomale par une séquence signal NH₂-terminale et un court domaine C-terminal. En plus, la séquence responsable de l'acheminement de cette protéine vers les lysosomes est constituée par un motif di-leucine présent dans le domaine cytoplasmique C-terminal [Kuronita, Eskelinen, 2002]. Kuronita *et al.* ont montré que la surexpression de LIMP-2 cause un élargissement des compartiments endosomaux et lysosomaux, et une perturbation du trafic cellulaire à l'extérieur de ces compartiments. Cette perturbation du trafic est corrélée avec l'accumulation de cholestérol dans les vacuoles formées. Ces auteurs proposent que LIMP-2 joue un rôle clé dans la régulation du compartiment endosome/lysosome, peut-être en tant que composant de la machinerie moléculaire nécessaire au trafic membranaire dans la voie endocytaire. LIMP-2 jouerait donc un rôle dans la biogenèse et la maintenance des endosomes/lysosomes [Kuronita, Eskelinen, 2002].

1.2.2.1.2 Compartiment luminal

On connaît une cinquantaine d'hydrolases lysosomales solubles. Celles-ci comprennent des lipases, des phospholipases, des protéases, des glycosidases, des nucléases, des phosphatases et des sulfatases [Pillay, Elliott, 2002]. Ces hydrolases solubles sont acheminées au lysosome dans des vésicules issues du réseau trans-Golgi, comme illustré dans la figure I.19.

Dans le cadre de cette introduction, nous ne détaillons pas toutes les hydrolases lysosomales connues. Nous présentons quelques exemples d'hydrolases dont les promoteurs ont été étudiés dans la littérature ou celles dont le niveau d'expression (expression protéique ou niveau d'activité) a été mesuré dans ce travail.

1.2.2.1.2.1 La Glucocérébrosidase (GCase)

La GCase est l'enzyme lysosomale catalysant la première étape de la transformation du glucocérébroside en glucose et céramide. Le glucocérébroside est un lipide complexe des membranes cellulaires et est normalement éliminé dans les cellules réticulo-endothéliales. Le gène codant la glucocérébrosidase est différentiellement exprimé : des niveaux importants d'ARNm de la GCase sont trouvés dans les cellules épithéliales, des niveaux modérés dans les fibroblastes, des niveaux faibles dans les macrophages et des niveaux très faibles dans les lymphocytes B. Moran *et al.* ont tenté d'identifier les facteurs de transcription qui participent à la régulation de l'expression du gène *gcs*. Ils ont ainsi pu identifier quatre éléments fonctionnels dans le promoteur de ce gène reconnus par des protéines activatrices : un motif OCTA, un motif AP-1, un site de liaison PEA3 (Polyoma Enhancer Activator 3) et une boîte CCAAT pour les facteurs C/EBPs [Moran, Galperin, 1997]. Cette enzyme est déficiente chez les patients atteints de la maladie de Gaucher. Chez ces patients, cependant, on détecte l'élévation de l'activité d'une autre enzyme : la chitotriosidase. Celle-ci est une chitinase massivement exprimée par les tissus chargés en glucocérébrosides chez l'homme. Son activité est fortement augmentée dans le sérum des patients souffrant de désordres de surcharge lipidique, sarcoïdose, thalassémie et Leishmaniose viscérale. Le suivi de l'activité en chitotriosidase sérique chez les patients atteints de la maladie de Gaucher durant la progression et la thérapie de remplacement est utilisé pour obtenir une information sur les changements dans la charge des macrophages pathologiques (les cellules de Gaucher typiques de cette maladie sont des macrophages surchargés de glucocérébrosides non dégradés) [Aguilera, Ghauharali-van der Vlugt, 2003].

1.2.2.1.2.2 L' α -glucosidase

L' α -glucosidase acide lysosomale hydrolyse les liens 1,4- α -glucosidique et 1,6- α -glucosidique dans le glycogène, le maltose et l'isomaltose. Les facteurs de transcription Hes-1 et YY-1 collaborent pour agir comme répresseurs transcriptionnels du gène humain codant cette enzyme. Hes, un facteur de transcription b-HLH se lie à un site E-box (CACGCG) et YY-1 se lie à un site ATAC dans le promoteur de ce gène [Yan, Heus, 2001].

1.2.2.1.2.3 Les cathepsines

La cathepsine K est une cystéine protéase lysosomale responsable de la résorption et du remodelage osseux. La région promotrice proximale du gène codant pour cette enzyme ne contient pas de boîte TATA, mais deux sites de liaison potentiels pour le facteur de transcription AP-1 ont été identifiés dans le promoteur distal [Gelb, Shi, 1997].

La cathepsine L est une cystéine endopeptidase lysosomale. *In vitro*, elle est capable de cliver une large gamme de substrats comme des protéines extracellulaires (la fibronectine, le collagène, l'élastine et la laminine), des protéines sériques et cytoplasmiques. Elle joue également un rôle dans la présentation d'antigènes, la résorption osseuse, la maturation du sperme et l'activation de prohormones. Bakhshi *et al.* ont montré, par des analyses de séquence et des études de délétion de promoteurs, la présence de séquences de liaisons potentielles pour des facteurs de transcription variés, tels que AP-4, GATA-1, NF-Y (Nuclear Factor Y), NF-AT (Nuclear Factor of Activated T cells), STATx (Signal Transducers and Activators of Transcription x) ainsi qu'une boîte CAAT [Bakhshi, Goel, 2001].

La cathepsine D représente le seul membre lysosomal de la famille des aspartic protéases, qui inclut les protéines sécrétées pepsinogène et prorénine [Tang et Wong, 1987]. Les séquences en acides aminés de cette cathepsine montrent une similarité importante entre de nombreuses espèces, notamment la conservation d'un site de N- glycosylation au niveau du résidu 70. Un autre site de glycosylation, le N199 est conservé dans toutes les séquences, sauf chez les invertébrés [Fortenberry, Schorey, 1995]. Avec la cathepsine E, la cathepsine D semble impliquée dans les voies de mort neuronale induite par le vieillissement. L'implication de la cathepsine D est également suggérée dans le déclenchement de l'apoptose [Tsukuba, Okamoto, 2000]. Des souris KO pour le gène de la cathepsine D présentent une atrophie progressive de la muqueuse intestinale et une destruction massive des organes lymphoïdes. La cathepsine D sécrétée des cellules de carcinome de prostate humaines est responsable de la sécrétion d'angiostatine, un inhibiteur endogène puissant de l'angiogenèse, suggérant sa contribution à la prévention de la croissance tumorale et à la protection des métastases dépendant de l'angiogenèse [Tsukuba, Okamoto, 2000]. Le rôle de la cathepsine D dans la protection ou, au contraire, dans l'induction des processus tumoraux reste cependant mystérieux et ambigu. En effet, les lignées cellulaires métastatiques du cancer du sein sécrètent aussi des niveaux élevés de pro-cathepsine D [Garcia, Platet, 1996]. Cette sécrétion anormale est due à la surexpression du gène codant pour la cathepsine D et à une maturation altérée du précurseur protéique. Garcia *et al.* ont montré qu'une surexpression modérée de la cathepsine D est suffisante pour augmenter le potentiel métastatique de cellules tumorales embryonnaires de rats 3Y1-Ad12, par un mécanisme qui semble nécessiter la maturation de la proenzyme [Garcia, Platet, 1996]. Précédemment, Rochefort *et al.* avaient déjà souligné le pouvoir métastatique de la cathepsine D, suggérant que la surexpression de cette protéase pouvait être un des facteurs responsables des métastases dans les cancers du sein humains. Les mécanismes par lesquels cette protéase peut faciliter les métastases *in vivo* sont encore inconnus, bien que l'on sache que la cathepsine D peut initier une cascade protéolytique, dégrader la matrice extracellulaire et ainsi libérer des facteurs de croissance depuis la matrice [Rochefort, 1992]. Notons enfin qu'il a été montré que la procathepsine D présente dans le milieu extracellulaire stimule fortement la prolifération de cellules issues de lignées de cancer du sein [Vetvicka, Vektvickova, 1994].

1.2.2.1.2.4 Sialidases

Les sialidases forment une famille d'enzymes hydrolytiques clivant l'acide sialique de glycoprotéines, de glycolipides et d'oligosaccharides. Cette activité influence un grand nombre de processus biologiques [Corfield, 1992 ; Reuter et Gabius, 1996].

Des mutations dans le gène de la sialidase lysosomale donnent la sialidose, maladie autosomale récessive conduisant à l'accumulation de glycoconjugués tel que le ganglioside G_{M3} à l'intérieur des lysosomes des tissus périphériques et des neurones [Sasagasako, Miyahara, 1993].

L'hexosaminidase A clive la N-acétylgalactosamine du G_{M2} pour former du G_{M3} . L'acide sialique est retiré de G_{M3} par la sialidase lysosomale pour donner le lactosylcéramide, qui est alors clivé par la β -galactosidase et la glucosylcéramidase pour donner le céramide.

Champigny *et al.* ont identifié dans le promoteur du gène de la sialidase des sites de liaison potentiels pour les facteurs de transcription Sp1, AP-1, NF-kB, ainsi qu'une séquence CCAAT reconnue par les CCAAT-binding proteins C/EBP- α , C/EBP- β , C/EBP- δ . De plus, la présence d'E-Box dans la région régulatrice de la sialidase lysosomale soulève l'hypothèse que ce gène pourrait être sujet à une régulation par les « muscle regulatory factors » comme Myo D et Myf-5 [Champigny, Johnson, 2003].

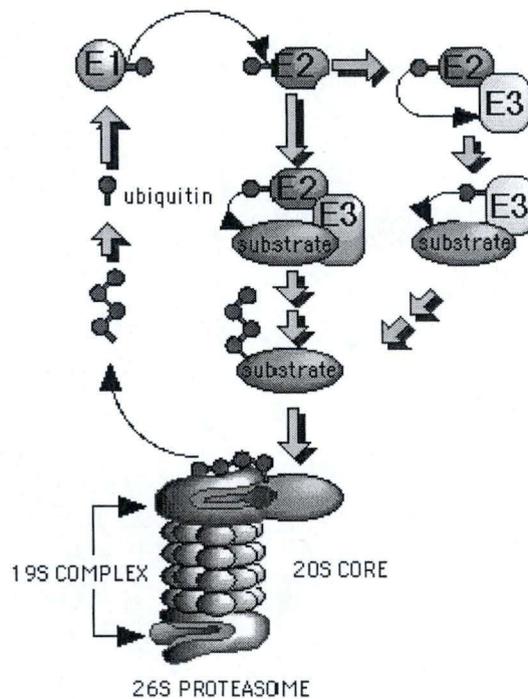


Figure I.20 : Le protéasome 26 S est une structure cylindrique creuse composée de quatre anneaux superposés. Chaque anneau est constitué de 7 sous-unités protéiques. Le canal traversant le centre du protéasome 20 S est divisé en 3 cavités. Les deux cavités extérieures sont situées à la jonction des anneaux α et β . La cavité centrale est composée des anneaux α et β et contient les sites protéolytiques actifs. La plupart des protéines dégradées par le protéasome 26S sont marquées pour être dégradées par l'addition de chaînes polyubiquitines. L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés. La polyubiquitination des protéines substrat du protéasome s'effectue par un système comportant les enzymes E1 (permettant activation de l'ubiquitine), E2 (assurant la conjugaison de l'ubiquitine) et E3 (protéine permettant le transfert de l'ubiquitine sur le substrat).

Les protéines modifiées par une ou plusieurs chaînes polyubiquitines sont ensuite reconnues spécifiquement par le complexe régulateur 19 S. Les protéines sont dépliées et transportées aux sites de protéolyse actifs au centre (ou CORE) du complexe 20 S, où elles seront dégradées.

(D'après Hilt, 2004)

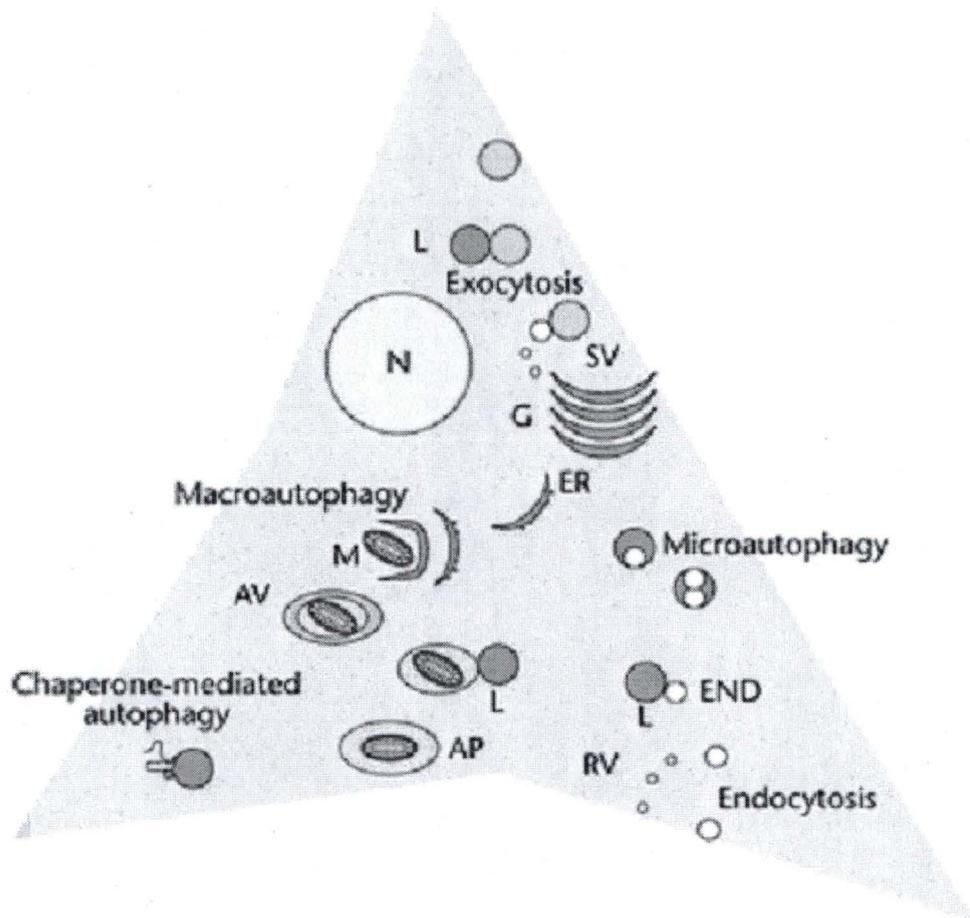


Figure I.21 : Représentation schématique des différentes voies par lesquelles les lysosomes peuvent internaliser et dégrader des protéines substrats. Les différentes voies représentées ici sont l'endocytose, l'exocytose, la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par des chaperonnes et font l'objet d'une description détaillée dans le texte.

- END endosome
- RV vésicules de recyclage
- L lysosome
- AV vacuoles autophagiques
- AP autophagosomes
- M mitochondrie
- ER réticulum endoplasmique
- N noyau
- G golgi

(D'après J. Fred Dice *et al.*, 2001)

I.2.2.2 Fonctions

Les lysosomes sont des compartiments subcellulaires impliqués dans la dégradation de macromolécules issues de l'endocytose et de l'autophagie [De Duve et Wattiaux, 1966]. Les produits de dégradation sont ensuite réutilisés par la cellule. Cependant, les lysosomes ne sont pas réduits au rôle de compartiments cellulaires terminaux de dégradation. En effet, les hydrolases lysosomales individuelles sont impliquées dans plusieurs tâches cellulaires spécifiques, telles que le remodelage des os [Saftig, Hunziker, 2000], le processing et la présentation d'antigènes [Watts, 2001] et la maturation de prohormones [Tepel, Bromme, 2000]. Les lysosomes participent au développement et à la morphogenèse en permettant la création de gradients stables de morphogènes [Entchev et Gonzalez-Gaitan, 2002]. Ils sont également essentiels dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol cellulaire [Goldstein, Dana, 1975] et semblent jouer un rôle dans les processus de mort cellulaire par apoptose [Guicciardi, Deussing, 2000 ; Ferri et Kroemer, 2001 ; Foghsgaard, Wissing, 2001].

I.2.2.2.1 Rôle des lysosomes dans la dégradation protéique

La cellule est munie de deux systèmes principaux de dégradation protéique : la dégradation protéique intralysosomale et le système ubiquitine/protéasome 26S.

Le protéasome est un complexe 26S responsable de la plupart des dégradations protéiques non lysosomales [Hershko et Ciechanover, 1998]. Il s'agit d'un complexe multiprotéique contenant une protéase dépendante de l'ATP, qui constitue presque 1% des protéines cellulaires totales. La structure est décrite comme un cylindre creux formé par quatre anneaux heptamériques de sept sous-unités différentes avec une configuration $\alpha 7\beta 7\alpha 7$. Les anneaux extérieurs appartiennent à la sous-unité de type α alors que les anneaux intérieurs, qui portent les sites actifs de ces sous-unités, sont orientés vers le corridor intérieur de la macromolécule et sont composées des sous-unité de type β [Feist, Dorner, 2000]. Aux extrémités du cylindre se trouve un complexe d'environ vingt protéines servant de gardien pour l'entrée dans le protéasome et qui lient les protéines cibles. Pour la plupart, les protéines ciblées pour la destruction dans le protéasome sont liées de façon covalente à de multiples copies d'une petite protéine de 76 acides aminés appelée ubiquitine [Stinton, Eystathioy, 2004]. La structure du protéasome est présentée à la figure I.20.

Le second système consiste en la dégradation des protéines à l'intérieur des lysosomes, système qui peut emprunter cinq voies distinctes.

L'ensemble de ces voies est illustré à la figure I.21.

I.2.2.2.1.1 L'endocytose

Les protéines extracellulaires (hormones, facteurs de croissance, protéines sériques) sont internalisées par endocytose médiée par récepteur ou absorptive et sont habituellement dégradées à l'intérieur des lysosomes. La dégradation peut commencer dans les endosomes précoces ou tardifs, mais une digestion complète nécessite l'entrée du substrat dans le lysosome [Schmid, 1997]. La voie endocytaire permet aussi l'acheminement de protéines de membrane comme le récepteur à l'insuline vers le lysosome pour y être dégradées [Carpentier, Fehlmann, 1985].

I.2.2.2.1.2 La crinophagie

Dans certains cas, une partie des protéines destinées à la sécrétion sera délivrée au lysosome pour être dégradée. Ce processus – nommé crinophagie – implique la fusion de la vésicule de sécrétion avec la membrane lysosomale au lieu de la membrane plasmique. Ce processus est régulé. Par exemple, lorsque le glucose sanguin est élevé, la quantité d'insuline dégradée par crinophagie diminue, et inversement. Un processus de régulation similaire existe

pour la régulation de la quantité d'hormone parathyroïdienne devant être dégradée en fonction des teneurs en calcium sanguin [Glaumann, 1989].

1.2.2.2.1.3 La macroautophagie

Ce processus implique dans un premier temps la séquestration d'une région cytoplasmique au sein de vacuoles autophagiques délimitées par une double membrane. Ces vacuoles autophagiques peuvent contenir des organites entiers comme par exemple des mitochondries. Dans un second temps, la membrane externe disparaît, la vésicule s'acidifie et fusionne avec un lysosome pour former des autophagosomes dans lesquels le contenu de la vacuole autophagique est digéré [Seglen, Berg, 1996].

Par exemple, ce processus est activé dans le foie en réponse au jeûne ; le signal est donné par une diminution de la concentration des acides aminés circulants combinée à des taux réduits d'insuline et élevés de glucagon [Mortimore, Poso, 1989].

1.2.2.2.1.4 La microautophagie

La microautophagie reste un mécanisme peu décrit. Des constituants cytoplasmiques pourraient être « internalisés » dans les lysosomes par invagination de la membrane lysosomale. Ce processus a lieu dans des lysosomes isolés, et ne nécessite pas l'ATP [Sakai, Koller, 1998].

1.2.2.2.1.5 L'autophagie médiée par des chaperonnes

Ce processus serait comparable à la translocation de protéines résidentes dans les organites, telles que les protéines des mitochondries, des chloroplastes ou des peroxysomes. Les protéines substrats contiennent des séquences pentapeptidiques KFERQ (lysine-phénylalanine-glutamate-arginine-glutamine) qui seraient responsables de leur « ciblage » pour ce processus protéolytique. Des chaperonnes moléculaires à l'intérieur (hsc73 lysosomale) ou à l'extérieur (hsc73 cytosolique) du lysosome seraient requises pour l'importation des protéines. LAMP-2 dans la membrane du lysosome (LAMP-2/lgp96) se lierait aux chaperonnes elles-mêmes liées aux protéines substrats [Agarraberes et Dice, 2001]. Cette dégradation lysosomale sélective semble par exemple activée en conditions de déprivation en sérum dans des cellules en culture ou lors d'un jeûne de longue durée chez les animaux.

Ce processus permet également la dégradation d'Ik β . Les études menées par Cuervo *et al.* ont montré que l'oxydation de Ik β joue un rôle important dans son ciblage vers une dégradation lysosomale en conditions de déprivation de sérum. Ce processus ne requiert pas l'ubiquitination ni la phosphorylation d'Ik β pour son ciblage vers les lysosomes [Cuervo, Hu, 1998].

1.2.2.2.2 Rôle des lysosomes dans l'homéostasie du cholestérol intracellulaire

Les fibroblastes humains en culture possèdent un mécanisme spécifique pour la prise nette du cholestérol dérivé des LDL plasmatiques. Ce mécanisme implique la séquence d'évènements suivante : a) le LDL se lie sur son récepteur à la surface cellulaire ; b) le LDL lié à la surface est internalisé par endocytose ; c) les vésicules d'endocytose contenant les LDL fusionnent avec les lysosomes ; d) les esters de cholestérol et les protéines du LDL sont hydrolysés en cholestérol et acides aminés ; e) le cholestérol libre est transféré depuis les lysosomes vers les membranes cellulaires, y compris le RE. L'accumulation intracellulaire de cholestérol régule deux évènements dans le métabolisme du cholestérol cellulaire : la formation d'esters de cholestérol est stimulée par l'activation d'une acyl-CoA : cholestérol acyltransférase liée aux membranes et la synthèse de cholestérol est réduite par la suppression de l'activité de l'HMG-CoA. La compréhension de ce modèle a été facilitée par l'étude de fibroblastes de patients atteints d'hypercholestérolémie familiale. Ces patients n'ont pas le

récepteur de surface cellulaire aux LDL fonctionnel [Goldstein, Dana, 1975]. Des fibroblastes traités à la chloroquine sont incapables d'hydrolyser les LDL internalisés. La conséquence est double : la formation d'esters de cholestérol n'est pas activée et l'activité de l'HMG-CoA réductase n'est pas supprimée.

La lipase acide lysosomale joue donc un rôle majeur dans la régulation de la synthèse du cholestérol [Goldstein, Dana, 1975].

Les protéines LAMP-1 et LAMP-2 semblent également jouer un rôle dans l'homéostasie du cholestérol cellulaire. En effet, on remarque dans des fibroblastes de souris doublement déficientes LAMP-1/LAMP-2 une accumulation de cholestérol non estérifié dans les endo-lysosomes, semblable au profil observé chez les patients atteints de la maladie de Niemann-Pick (voir point 1.2.2.5.1.2.) [Garver et Heidenreich, 2002]. Cependant, la déficience en LAMP-2 semble être la cause majeure de ce stockage endo-lysosomal, car la transfection dans ces cellules de la protéine LAMP-2 sauvage corrige cette accumulation. Cela suggère un rôle important pour LAMP-2 dans le métabolisme du cholestérol [Eskelinen, Schmidt, 2004].

1.2.2.3 Rôle des lysosomes dans la mort cellulaire

Des études récentes ont montré que les lysosomes, et plus particulièrement la cathepsine B, en plus des mitochondries, jouent un rôle dans la mort cellulaire en tant qu'inducteurs de l'apoptose [Guicciardi, Deussing, 2000 ; Ferri et Kroemer, 2001 ; Foghsgaard, Wissing, 2001]. La ligation du TNF1 (récepteur de type 1 du Tumor Necrosis Factor) active les enzymes lysosomales sphingomyélinase et céramidase, et produit la sphingosine, un détergent lysosomotrope qui induit la rupture du lysosome [Werneburg, Guicciardi, 2002]. La cathepsine B est alors larguée dans le cytoplasme où elle active des voies caspases-dépendantes et caspases-indépendantes de mort cellulaire. Bien que les processus par lesquels les cathepsines peuvent induire l'apoptose ne soient entièrement élucidés, le clivage du membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, Bid, est un mécanisme possible par lequel la cathepsine B active l'apoptose [Stoka, Turk, 2001]. Les relations entre les voies lysosomales et caspases de l'apoptose ne sont toutefois pas encore pleinement élucidées et semblent dépendre du signal apoptotique et du type cellulaire en question [Ferri et Kroemer, 2001 ; Foghsgaard, Wissing, 2001].

1.2.2.3 Trafic intracellulaire

Les lysosomes se trouvent à l'intersection de plusieurs voies du trafic intracellulaire (figure I.20). L'internalisation de certaines molécules dans les endosomes précoces peut conduire à leur recyclage. Alternativement, certaines molécules transitent par les endosomes tardifs et le corps multivésiculaire où l'hydrolyse est entamée dans une lumière légèrement acide (pH : ~6). Les lysosomes matures sont formés lorsque le pH luminal diminue encore et permet l'hydrolyse complète des substrats [Stinton, Eystathioy, 2004].

Une autre voie est responsable de l'internalisation et de la dégradation de matériaux étrangers tels que bactéries, virus, des résidus de nécrose et d'apoptose cellulaires. Ces matériaux sont retirés du milieu extracellulaire par un processus de phagocytose. Le « phagosome » ainsi formé fusionne avec un lysosome, où le matériel étranger sera dégradé. Cette voie est particulièrement importante dans les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques [Stinton, Eystathioy, 2004].

Les protéines GTPasiques de la famille Rab et apparentées aux protéines ras ont été identifiées comme des régulateurs clés du transport membranaire [Novick et Garrett, 1994 ; Pfeffer, 1994]. Rab-7 et Rab-9 sont toutes deux associées aux compartiments endocytaires tardifs. Le rôle de Rab-9 dans le recyclage du récepteur au mannose 6-phosphate depuis les endosomes tardifs vers le réseau du trans-Golgi a été clairement établi [Riederer, Soldati,

1994]. La fonction de Rab-7 demeure quant à elle encore hypothétique. Les protéines Rab passent de la conformation liées au GDP à la conformation liées au GTP et ce cycle GDP/GTP est crucial pour leur fonction. Un modèle du cycle de Rab prédit qu'une GDI (GDP Dissociation Inhibitor) délivre la protéine Rab cytosolique au compartiment donneur approprié lors d'une réaction couplée à l'échange du GDP contre un GTP. La protéine liée au GTP est recrutée au niveau de la vésicule native et l'hydrolyse du GTP se produit après la fusion de la vésicule avec la membrane accepteuse [Zerial et Stenmark, 1993]. La protéine résultante liée au GDP est alors recyclée par une molécule GDI au compartiment donneur à travers le cytosol. Méresse *et al.* ont montré que Rab-7 est présent dans un compartiment connecté aux lysosomes et plus précisément que Rab-7 est localisé au niveau d'intermédiaires putatifs de la voie endocytaire vers les lysosomes. Leurs observations suggèrent que ces intermédiaires sont transportés sur les microtubules vers les lysosomes et éventuellement fusionnent avec eux. Cette hypothèse semble confirmée par la localisation lysosomale de Rab-7 dans la conformation liée au GTP et par la redistribution lysosomale de cette protéine dans les cellules traitées au nocodazole [Merresse, Gorvel, 1995].

Il a été rapporté que Rab-7 se localise au niveau des endo-lysosomes chargés de cholestérol dans des fibroblastes de souris doublement déficientes LAMP-1/LAMP-2 [Eskelinen, Schmidt, 2004]. Il a également été montré précédemment que l'accumulation de cholestérol dans le compartiment lysosomal augmente la quantité de Rab-7 associée aux membranes [Lebrand, Corti, 2002] et il a été suggéré que cela interférerait avec la fonction de Rab-7. Il est donc possible qu'au moins certaines des altérations observées dans des fibroblastes de souris doublement déficientes soient dues à une fonction altérée de Rab-7 [Eskelinen, Schmidt, 2004].

1.2.2.4 La biogenèse lysosomale

Il existe deux voies de transport aux lysosomes différentes pour les protéines de membrane nouvellement synthétisées [Hunziker et Geuze, 1996]. La première implique un transport direct délivrant ces protéines à partir du trans-golgi aux lysosomes par l'intermédiaire des endosomes. La seconde est la voie indirecte, dans laquelle la protéine de membrane nouvellement synthétisée est transportée depuis le trans-golgi à la membrane plasmique puis est ensuite acheminée aux lysosomes par la voie endocytaire. Le ciblage des protéines transmembranaires vers les endosomes et lysosomes est médié par des signaux présents dans le domaine cytosolique des protéines. La plupart de ces signaux consistent en de courtes séquences linéaires de résidus acides aminés. Ces signaux sont de type tyrosine ou dileucine et médient le ciblage via des interactions avec les complexes hétérotétramériques AP (Adaptator Protein). Cependant, l'identité des sous-unités AP qui reconnaissent ces signaux reste controversée, même si une étude récente de Janvier *et al.* semble avoir révélé une implication des sous-unités γ/δ et σ de AP-1 et AP-3 dans la reconnaissance des signaux de ciblage. De plus, des événements de phosphorylation peuvent réguler la reconnaissance des signaux. Enfin, en plus des motifs peptidiques, l'ubiquitination des résidus leucines peut servir de signal de ciblage à certaines étapes du système endosomal-lysosomal [Janvier, Kato, 2003].

L'enzyme lysosomale luminale nouvellement synthétisée quitte le RE et atteint le cis-Golgi. Dans ce compartiment, elle reçoit un N-acétylglucosamine-1-phosphate par une phosphotransférase au niveau d'un ou plusieurs résidu(s) mannose. Ensuite, une glucosaminidase retire la glucosamine pour générer le mannose 6-phosphate qui constitue le signal de « sorting ». Ce « sorting » se produit dans le trans-Golgi et est médié par l'attachement au récepteur du mannose 6-phosphate. Il se forme alors une vésicule entourée de clathrine qui fusionne avec le lysosome en développement. Le détachement du phosphate

Lysosomal enzyme	Disease
<i>Lipid metabolism</i>	
Cathepsin A	galactosialidosis
β -Galactosidase	GM1-gangliosialidosis (Landing)
Hexosaminidase A and B (β -chain)	GM2-gangliosialidosis (Sandhoff)
Hexosaminidase A and S (α -chain)	GM2-gangliosialidosis (Tay-Sachs)
β -Galactocerebrosidase	galactocerebrosidosis (Krabbe)
Glucocerebrosidase	glucocerebrosidosis (Gaucher)
Sphingomyelinase	sphingomyelin lipidosis (Niemann-Pick A, B)
Acid lipase	cholesteryl ester storage disease (Wolman)
Arylsulfatase A	metachromatic leukodystrophy
α -Galactosidase A	Fabry
<i>Glycoprotein metabolism</i>	
Aspartylglucosaminidase	aspartylglucosaminuria
α -L-Fucosidase	fucosidosis
α -N-acetylneuraminidase	sialidosis/mucopolipidosis I
α -N-acetylgalactosaminidase	Schindler disease
β -Galactosidase	galactosialidosis
α -Neuraminidase	galactosialidosis
α -Mannosidase	α -mannosidosis
β -Mannosidase	β -mannosidosis
<i>Mucopolysaccharide metabolism</i>	
α -L-Iduronidase	MPS I (Hurler/Scheie)
Iduronate-sulfate sulfatase	MPS II (Hunter)
Heparansulfate sulfatase	MPS IIIA (Sanfilippo A)
N-acetyl- α -D-glucosaminidase	MPS IIIB (Sanfilippo B)
Acetyl transferase	MPS IIIC (Sanfilippo C)
α -N-acetylglucosamine 6-sulfatase	MPS IIID (Sanfilippo D)
N-acetylgalactosamidase-6-sulfate sulfatase	MPS IV (Morquio A)
β -Galactosidase	MPS IVB (Morquio B)
Arylsulfatase B	MPS VI (Maroteaux-Lamy)
β -Glucuronidase	MPS VII (Sly)
<i>Various lysosomal functions</i>	
Acid 1-4 α -glucosidase	glycogenosis type II (Pompe)
Cathepsin K	pycnodysostosis
Prosaposin (sphingolipid activator)	complex lipidosis
GM2 activator (sap3)	GM2-gangliosialidosis/AMB variant
Palmitoyl-protein thioesterase	infantile neuronal ceroid lipofuscinosis
Pepstatin-insensitive peptidase	juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis
(Deficient) cholesterol recycling	cholesterol lipidosis (Niemann-Pick C)
<i>Other lysosomal enzymes</i>	
Acid phosphatase (LAP)	no pathology described in humans
Cathepsin B	no pathology described in humans
Cathepsin D	no pathology described in humans
Cathepsin L	no pathology described in humans
Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)	no pathology described in humans

Figure I.22 : Tableau reprenant les maladies de surcharge lysosomale décrites à ce jour et mentionnant la déficience enzymatique responsable.

(D'après Scriver *et al.*, 1989)

de son récepteur se produit à pH acide, ainsi que la dissociation de l'hydrolase du récepteur qui est finalement recyclé [Griffiths, Hoflack, 1988].

I.2.2.5 Dysfonctionnement : surcharge lysosomale

Les nombreuses fonctions des lysosomes et la complexité de la biogenèse lysosomale expliquent le nombre important d'états pathologiques attribués à un dysfonctionnement de ces organites. De plus, la sévérité de ces états pathologiques démontre l'importance des lysosomes dans la physiologie cellulaire. Les maladies de surcharge lysosomale font partie d'un groupe d'une quarantaine de maladies génétiques distinctes. Une caractéristique commune à l'ensemble de ces pathologies liées à une déficience enzymatique est l'accumulation et le stockage des macromolécules qui devraient normalement être dégradées à l'intérieur des lysosomes et être transportés à travers leur membrane. Cette accumulation dans la lumière du lysosome peut être due à la perte d'activité d'une ou de plusieurs hydrolases lysosomales due à une mutation dans le gène codant pour cette enzyme ou à une déficience dans le système de ciblage de l'enzyme vers le lysosome. Elle peut aussi résulter d'un déficit dans le transport des produits de dégradation à travers la membrane lysosomale [Neufeld, 1991 ; Walkley, 1998].

L'objectif ici n'est pas de dresser une liste exhaustive des maladies de surcharge lysosomale, mais de présenter quelques exemples. Une liste plus complète des maladies de surcharges lysosomales est reprise à la figure I.22.

I.2.2.5.1.1 I-cell disease (ICD, mucopolidose II)

L'ICD est une maladie neurodégénérative généralisée, transmise sur le mode autosomal récessif. Cette maladie est caractérisée par les nombreuses inclusions visibles en microscopie à contraste de phase dans des fibroblastes de peau en culture de patients atteints. Ces inclusions furent identifiées (grâce à la microscopie électronique) comme des lysosomes surchargés de fragments membranaires et autres débris. Cette maladie est causée par une déficience en activité UDP-*N*-acetylglucosamine : glycoprotéine *N*-acetylglucosaminyl phosphotransférase. En fait, les hydrolases ne sont pas correctement ciblées vers le système de transfert aux lysosomes. L'ICD est dès lors caractérisée par des activités réduites de la plupart des hydrolases lysosomales acides dans des fibroblastes en culture, avec une augmentation concomitante de ces activités dans le milieu de culture [Kato, Okada, 1982].

I.2.2.5.1.2 Maladie de Niemann-Pick C1 (NP-C)

Cette maladie neuroviscérale fatale de surcharge lipidique est caractérisée par l'accumulation lysosomale de LDL dérivés du cholestérol et est transmise selon le mode autosomal récessif. Deux gènes séparés, *NPC1* et *NPC2* induisent des phénotypes cliniques et biochimiques identiques [Vanier, Duthel, 1996]. Les cellules de ces patients sont défectueuses dans le relarguage cytosolique du cholestérol depuis les lysosomes [Pentchev, Comly, 1987]. Cette séquestration lysosomale de LDL dérivés du cholestérol s'accompagne d'une synthèse *de novo* de stérols, aussi bien que d'une estérification du cholestérol réprimée. Le phénotype NP-C suggère donc que le trafic du cholestérol lysosomal vers les autres membranes cellulaires soit un processus médié par une protéine [Carstea, Morris, 1997].

La séquence d'ADN du gène *NPC1* prédit une protéine de 1278 aa et une masse moléculaire de 142 kDa. Le domaine NH₂-terminal contient 13 acides aminés hydrophobes typiques des peptides signaux ciblant les protéines vers le RE. Les analyses structurales prédisent une protéine intégrale de membrane avec treize à seize régions transmembranaires potentielles. Le domaine C-terminal contient le motif di-leucine critique pour le ciblage des enzymes lysosomales membranaires. Une région située entre les résidus 55-165, ne comportant pas de domaines transmembranaires, est hautement conservée, suggérant une

importance fonctionnelle. Dans cette séquence, on retrouve un motif leucine zipper qui peut médier la multimérisation protéique comme il le fait pour certains facteurs de transcription. Enfin, au niveau des acides aminés 615 à 797, une région contenant cinq domaines transmembranaires prédits, *NPC1* montre une homologie très forte avec SREBP Cleavage-Activating Protein – SCAP – et la HMG-CoA réductase, enzyme régulatrice de la biosynthèse du cholestérol. Chez les patients atteints de NP-C, ce gène est muté. L'introduction de vecteurs d'expression *NPC1* dans des fibroblastes de patients par transfection transitoire permet de restaurer un phénotype normal. Il est donc établi que ce gène est responsable de la forme majeure de la maladie NP-C. Il est probable que NPC1 ait un rôle semblable à SCAP, impliquant peut-être des interactions avec d'autres protéines telles que NPC2. NPC1 peut aussi jouer le rôle de récepteur pour des protéines impliquées dans le transport du cholestérol [Carstea, Morris, 1997]. Eskelinen *et al.* ont montré que dans des fibroblastes issus de souris doublement déficientes pour les protéines LAMPs, NPC1 est localisé au niveau des endo-lysosomes chargés de cholestérol. Cela suggère que dans ces fibroblastes, NPC1 est recruté pour tenter de corriger la surcharge, mais il est incapable d'accomplir cette fonction. La distribution altérée de NPC1 dans ces fibroblastes est corrigée par l'expression parallèle de LAMP-2, ce qui indiquerait que LAMP-2, directement ou indirectement, influence le trafic ou la fonction de NPC1 [Eskelinen, Schmidt, 2004].

Le second génotype NP-C (NPC2) est lui aussi caractérisé par une sortie défectueuse du cholestérol depuis les lysosomes. Naureckiene *et al.* ont montré que cette maladie est causée par une déficience en la protéine lysosomale HE1 (Human Epididymis 1) précédemment identifiée comme protéine liant le cholestérol. Cette protéine est présente chez les patients NPC1 [Naureckiene, Sleat, 2000].

1.2.2.5.1.3 Maladie de Batten ou « *juvenil neuronal ceroid lipofuscinosis* »

Le matériel s'accumulant principalement dans les lysosomes de ces patients est la sous-unité c de l'ATPase mitochondriale. Deux gènes impliqués dans cette maladie ont été récemment identifiés. Il s'agit des gènes *CLN3* et *CLCN5*. Les produits de ces gènes sont des protéines résidentes des lysosomes. La protéine CLN3 se localise au niveau des synapses neuronales. On connaît 31 mutations différentes dans le gène *CLN3*, et 4 dans le gène *CLCN5* chez les patients atteints de la maladie de Batten. Des études fonctionnelles de l'homologue de levure de CLN3, ainsi qu'un pH augmenté dans les lysosomes des patients suggère une implication de cette protéine dans le maintien du pH lysosomal [Vesa et Peltonen, 2002].

1.2.2.5.1.4 *G_{MI}* gangliosidose

Cette pathologie de surcharge lysosomale est due à une déficience en β -galactosidase acide. Au niveau clinique, cette maladie comporte trois sous-types : adulte, juvénile et infantile.

La déficience enzymatique conduit à l'accumulation de gangliosides G_{MI} dans le système nerveux, de galactosyl oligosaccharides et de produits de dégradation de keratane-sulfate dans les cellules somatiques, particulièrement dans le type infantile. Dans ce sous-type, le déclin neurologique est rapide, et les anomalies osseuses sont sévères. La détérioration neurologique est telle qu'elle mène souvent à un décès durant l'enfance. La dysfonction cérébrale est principalement une conséquence de l'accumulation de gangliosides G_{MI} dans les membranes de surface, ce qui donne lieu à une croissance et une morphologie neuronales aberrantes, et interfère avec la physiologie des neurotransmetteurs. Le sous-type juvénile est caractérisé par une faiblesse motrice, des anomalies osseuses modérées, et une détérioration lente et progressive des capacités psychomotrices. Le sous-type adulte se caractérise par des anomalies neuro-musculaires, la présence fréquente d'anomalies osseuses modérées. Les

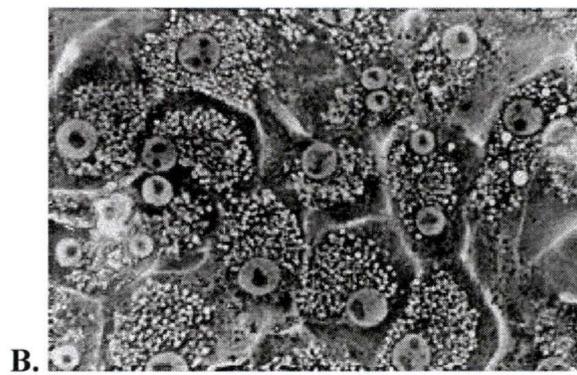
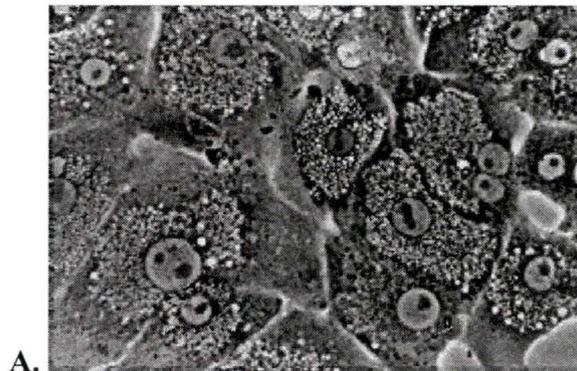


Figure I.23 : Micrographies prises en microscopie photonique illustrant le phénotype d'hépatocytes en culture primaire, incubés en présence de saccharose à une concentration de 200 mM pendant 48 h (a) et 72 h (b) On peut observer de nombreuses vacuoles de stockage envahissant progressivement le cytoplasme.

(D'après URPHYM, J. Thyron)

troubles des capacités intellectuelles sont légers ou inexistantes. Les malades bénéficient d'une bonne espérance de vie.

La β -galactosidase acide existe sous forme monomérique (A1), dimérique (A2) et multimériques (A3). Chacune est composée d'une ou plusieurs sous-unité de 64 kDa.

Le polypeptide A1 (monomère) est codé par un seul locus autosomal situé sur le bras court du chromosome 3. La mutation du locus mène à la perte d'activité de toutes les formes chez les patient atteints de gangliosidose G_{M1} .

La β -galactosidase acide est hétérocatalytique. Elle clive le β -D-galactose des gangliosides contenant du galactose G_{M1} oligosaccharide, et d'autres conjugués de galactose.

Une simple mutation qui produit la déficience en β -galactosidase acide a des effets généralisés, menant à l'accumulation de ses nombreux substrats. La variabilité phénotypique parmi les mutants β -galactosidase acide provient de la plus grande activité résiduelle de l'enzyme mutante pour certains substrats plutôt que pour d'autres.

1.2.2.5.2 Surcharges induites artificiellement

A côté des déficits enzymatiques provoquant l'accumulation de molécules non digérées dans les lysosomes et conduisant aux pathologies décrites ci-dessus, la surcharge lysosomale peut également être induite expérimentalement, en permettant l'accès au lysosome d'une molécule qui n'est le substrat d'aucune des hydrolases présentes dans la lumière lysosomale. Ce substrat s'accumule et l'on voit apparaître le phénotype de surcharge caractéristique illustré à la figure I.23. Le stockage conduit souvent à une augmentation du nombre et de la taille des lysosomes pouvant occuper jusqu'à 50 % du volume cellulaire. Ces surcharges induites artificiellement sont à la base de nombreux modèles cellulaires [Cohn et Ehrenreich, 1969].

1.3. Objectifs et stratégies

Le but de ce travail est d'analyser et de caractériser l'état d'activation de plusieurs facteurs de transcription en réponse au dysfonctionnement du lysosome induit par une surcharge en saccharose. Nous utiliserons à cette fin une approche visant à analyser des modifications protéiques en réponse à une altération des lysosomes. Nous étudierons également l'état d'activité de ces facteurs de transcription susceptibles d'être impliqués dans les systèmes de communication moléculaires entre les lysosomes et le noyau. Ce mémoire a donc deux objectifs principaux.

Premièrement, nous avons dû mettre au point et caractériser un modèle cellulaire de surcharge des lysosomes. En effet, la plupart des études menées sur la problématique de la surcharge connues dans la littérature portent sur des fibroblastes de peau humains. Afin de tester si la surcharge peut également s'observer dans d'autres modèles cellulaires, nous avons incubé des cellules 143B issues d'un ostéosarcome humain en présence de milieu contenant du saccharose 100 mM et recherché les effets de la surcharge lysosomale par l'étude de l'abondance de marqueurs lysosomaux comme LAMP-1, LAMP-2 et la cathepsine D.

Deuxièmement, nous avons entrepris de rechercher et de caractériser l'état d'activation de facteurs de transcription éventuellement activés par la surcharge lysosomale en saccharose. A cette fin, nous avons dû sélectionner quelques facteurs de transcription candidats. Cette sélection s'est faite selon trois critères- étude de la littérature, analyse *in silico* et disponibilité des outils au laboratoire- comme décrit précédemment au point 1.2.1.1., Ces critères ont permis d'établir une liste de candidats: c-Myc, C/EBPs, Sp1, YY-1, NF-kB, GATA, CREB, AP-1 et SREBP-1.

II. Matériel et Méthodes

II. Matériel et Méthodes

II.1. Culture cellulaire

II.1.1 Matériel

Le type cellulaire utilisé au cours de ce travail est une lignée de cellules 143B. Ces cellules sont issues d'un ostéosarcome humain. Cette lignée provient de l'ATCC (American Tissue and Cell Collection, USA) et nous a été généreusement donnée par le professeur G. Attardi (California Institute of Technology, CIT, USA). Les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm² (Costar, USA) en présence de 15 ml de milieu DHG (Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose : 4,5 g/litre) contenant 10 % de sérum de veau foetal (SVF), (Gibco BRL, Grande Bretagne). Les cellules sont maintenues dans une étuve à 37 °C dont l'atmosphère contient 5 % de CO₂ et 95 % d'air humide (Heraus, Allemagne).

II.1.2 Sous-cultures

Après avoir décanté le milieu de culture, on rince les cellules avec 10 ml de PBS (Phosphate Buffer Saline) dont la composition est : 0,9 % NaCl, 10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ ; pH 7,4) préchauffé à 37 °C. Lors de ce rinçage, les résidus de sérum qui pourraient inhiber les protéases comme la trypsine sont éliminés. Les cellules sont alors détachées de leur support avec 2 ml de trypsine (Cambrese, Belgique), qui agit en digérant les composants de la matrice extracellulaire. Le détachement des cellules est suivi au microscope à contraste de phase. On resuspend ensuite les cellules dans 10 ml de milieu DHG contenant 10 % de SVF. A cette étape, un comptage des cellules dans une chambre de Neubauer (Marienfeld, Allemagne) peut être effectué. Pour maintenir la culture cellulaire, les sous-cultures sont réalisées deux fois par semaine et les cellules sont repiquées à une dilution 1:10 et ensemencées dans de nouvelles boîtes de culture de 75 cm². Les cellules peuvent également être ensemencées dans des boîtes multipuits ou sur des lames couvre-objets en fonction du type d'expérience à réaliser.

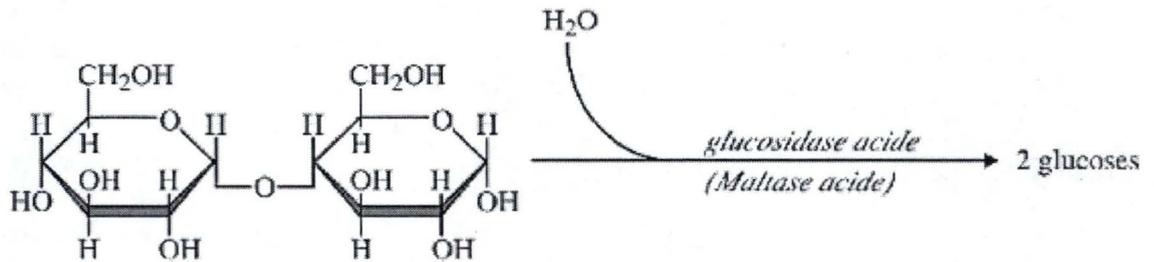
II.2. Modèle expérimental d'induction d'une surcharge lysosomale

Pour induire une surcharge lysosomale par le saccharose au sein des cellules, nous avons cultivé les cellules 143B selon le modèle développé par Karageorgos *et al.* (1997). La différence essentielle réside dans le fait que ces auteurs ont travaillé sur un type cellulaire différent, à savoir des fibroblastes de peau humains issus des lignées SF3921, SF4117, SF4153, SF4204 et SF4227, ne nécessitant pas de repiquage pendant les incubations de plusieurs jours avec le saccharose.

Les cellules 143B sont repiquées dans des boîtes de culture de 75 cm² en présence de milieu DHG contenant 10 % de sérum. Le lendemain, les cellules sont mises en présence de milieu DHG + 10 % de SVF contenant du saccharose à une concentration de 100 mM pour induire la formation des sucrosomes. Les cellules contrôles sont incubées dans du DHG + 10 % de SVF ne contenant pas de saccharose [Karageorgos, Isaac, 1997]. Dans les différentes expériences réalisées, les cellules sont incubées en présence de saccharose pendant des temps variables allant jusqu'à 13 jours.

La prolifération des cellules 143B étant rapide, elles sont repiquées tous les 3 jours en présence ou non de saccharose. Cette contrainte expérimentale n'était pas présente dans le modèle développé par Karageorgos *et al.* (1997).

maltose: 4-O- α -D-glucopyranosyl (1-4) D-glucopyranose.



saccharose: α -D-glucopyranosyl (1-2) β -D-fructofuranoside.

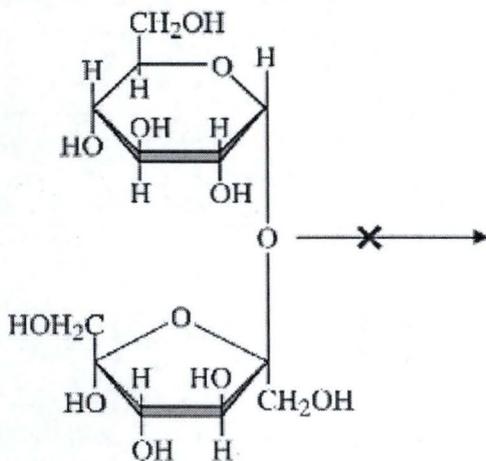


Figure II.1 : Structure des disaccharides maltose et saccharose.

Le maltose est composé de deux molécules de glucose et peut être hydrolysé par la maltase acide présente dans toutes les cellules de mammifères.

Le saccharose est composé d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose. Il ne peut pas être dégradé dans les cellules car l'invertase nécessaire à son hydrolyse n'est présente que dans les entérocytes.

Enfin, afin d'étudier l'éventuelle implication d'un stress hyperosmotique sur les résultats obtenus, les cellules ont été incubées dans les mêmes conditions en présence de maltose à la concentration de 100 mM. Les structures du saccharose et du maltose sont représentées à la figure II.1.

II.3. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

On ajoute 3 µl de l'échantillon, ou 2,5 µl d'un étalon BSA (Bovine Serum Albumin) de concentration connue (2 µg/µl) à 1 ml de colorant de Bradford (Biorad, Allemagne) [Bradford, 1976]. Deux types de blanc sont également réalisés. D'une part, un blanc étalon, constitué de 2,5 µl d'H₂O, et d'autre part un blanc test constitué de 3 µl de tampon de lyse dont la composition est détaillée au point II.4.3.1. On vortexe quelques secondes et on laisse la réaction se dérouler pendant 5 min. L'absorbance du produit de réaction est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 595 nm. La concentration en protéines de l'échantillon est calculée, par rapport à l'étalon, selon la formule suivante :

$$P_{\text{échantillon}} = \left(\frac{Abs_{\text{échantillon}} - Abs_{\text{blanc échantillon}}}{Abs_{\text{étalon}} - Abs_{\text{blanc étalon}}} \right) \times \frac{Vol_{\text{étalon}} * Conc_{\text{étalon}}}{Vol_{\text{échantillon}}}$$

où : P = concentration en protéines dans l'échantillon (µg/µl)
Abs = absorbance
Vol = volume ajouté au colorant (µl).

II.4. Dosages d'activité d'hydrolases lysosomales

II.4.1 Principe

Dans le cadre de ce travail, les activités de trois enzymes lysosomales ont été dosées. Nous avons choisi deux enzymes solubles – la β-galactosidase et l'α-mannosidase – et une enzyme associée aux membranes – la β-glucosidase.

Ces mesures d'activité se basent sur le clivage d'un fluochrome à partir d'une molécule substrat spécifique de l'enzyme d'intérêt, selon le principe développé par Beljaars *et al.* (1972). Les tests permettent de doser l'activité de l'enzyme dans un échantillon biologique. Un aliquot de l'échantillon, dilué ou non, est mis en présence d'un substrat spécifique de l'enzyme d'intérêt. Ce substrat est couplé à une molécule fluorescente, le 4-méthylumbelliferyl. Si l'enzyme d'intérêt est présente et active, elle clive le substrat et libère ainsi le 4-méthylumbelliferyl, qui subit un changement de conformation et peut ainsi fluorescer après excitation. L'intensité de fluorescence associée à la sonde libre, mesurée au spectrofluorimètre, est donc directement proportionnelle à l'activité de l'enzyme d'intérêt. Les valeurs obtenues sont ensuite normalisées par les quantités de protéines présentes dans l'échantillon [Beljaars, Fabry, 1972].

II.4.2 Matériels

- 4-méthylumbelliferyl-β-galactopyranoside 40 mM (Sigma, USA)
- 4-méthylumbelliferyl-α-mannopyranoside 100 mM (Sigma, USA)
- 4-méthylumbelliferyl-β-glucopyranoside 100 mM (Sigma, USA)
- DMSO (Dimethyl Sulfoxyde) (Merck, Allemagne)
- Tampon acétate 0,5 M; pH 5
- Tampon citrate 0,5 M; pH 5

- Triton X-100 : 2 %
- Solution stop : fixateur glycine à 50 mM ; pH 10,5 , EDTA (Ethylène diamine tétra acétate) à 5 mM, Triton X-100 : 0,05 %, NaOH
- Taurocholate de sodium à 5 % (Sigma, USA)

II.4.3 Méthodes

II.4.3.1 Sous-cultures, incubation et préparation des lysats clairs

Les cellules 143B sont repiquées dans des boîtes de 75 cm² à une dilution 1:10. Le lendemain, elles sont incubées dans du milieu DHG + 10 % de SVF contenant du saccharose à 100 mM pour les tests et dans du milieu DHG + 10 % de SVF pour les contrôles.

Après 3 et 8 jours d'incubation, les cellules sont rincées 2 fois avec 10 ml de PBS froid, puis récoltées et lysées par un raclage dans 1 ml de tampon de lyse de composition : Tris 40 mM ; pH 7,5, KCl 300 mM, EDTA 2 mM et Triton X-100 à 1 %. Ce tampon contient un cocktail d'inhibiteurs de protéases en tablette (Roche, Allemagne) et un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases (PIB) dont la composition (stock 25 fois) est : 25 mM Na₃VO₄ (Sigma, USA), 250 mM PNPP (p-NitroPhényl Phosphate) (Sigma, USA), 250 mM β-glycéro-phosphate (Sigma, USA), 125 mM NaF (Merck, Allemagne).

Dans certaines conditions et dans le but de mettre en évidence l'effet éventuel des inhibiteurs de protéases et de phosphatases sur l'activité des hydrolases lysosomales testées, les cellules ont été lysées dans un tampon de lyse préparé sans inhibiteur. Après 10 min d'incubation sur glace, les lysats totaux sont centrifugés 15 min à 13000 rpm (4° C). Un aliquot du lysat clair (surnageant) est utilisé pour réaliser un dosage des protéines selon la méthode de Bradford [Bradford, 1976].

II.4.3.2 Composition des tampons de réaction

Enzyme	Substrat et concentration	Tampon
β-galactosidase	4-méthylumbelliferyl-β-galactopyranoside Stock : 40 mM Final : 1,1 mM	Tampon acétate ; pH 5 Stock : 0,5 M Final: 0,05 M
β-glucosidase	4-méthylumbelliferyl-β-glucopyranoside Stock : 100 mM Final : 1,1 mM	Tampon citrate ; pH 5 Stock : 0,5 M Final : 0,05 M + Taurocholate de sodium à 5 % (Sigma, USA)
α-mannosidase	4-méthylumbelliferyl-α-mannopyranoside Stock : 100 mM Final : 1,1 mM	Tampon acétate ; pH 5 Stock : 0,5 M Final : 0,05 M

II.4.3.3 Dosage enzymatique

Les tampons de réaction doivent être préparés fraîchement et ne peuvent être congelés. Par test, on ajoute 20 µl d'échantillon (dilué 20 fois pour le dosage de l'activité β-galactosidase, non dilué pour le dosage des activités α-mannosidase et β-glucosidase) à 180 µl du tampon de réaction et on incube pendant 60 min. Au terme de l'incubation, la réaction est arrêtée par l'addition de 1 ml de fixateur glycine-EDTA ; pH 10,5. A ce pH, les enzymes lysosomales, dont le pH d'activité optimal est de 5, ne sont plus actives. On mesure alors les

intensités de fluorescence associées au 4-méthylumbelliférone libéré au moyen d'un spectrofluorimètre (Ex : 365 nm ; Em : 450 nm) (SLM AMINCO, USA).

II.5. Western blotting

Dans le cadre de ce travail, le Western blotting a été utilisé pour analyser l'expression de protéines lysosomales comme LAMP-1, LAMP-2 et la cathepsine D, d'une protéine impliquée dans le trafic intracellulaire, Rab-7, et du facteur de transcription SREBP-1 dans des cellules 143B contrôles et des cellules 143B incubées en présence de saccharose ou de maltose à 100 mM.

Un Western blot pour LAMP-2 a également été réalisé sur des homogénats de fibroblastes de patients atteints de gangliosidose, une maladie de surcharge lysosomale (voir point I.2.2.5.1.4). On réalise sur ces cellules un lysat clair selon le protocole décrit au point II.5.2.1.

II.5.1 Principe

Au terme des différentes incubations, après un rinçage et la préparation de lysats clairs, des aliquots correspondant à 25 µg de protéines sont chargés dans un gel de polyacrylamide dans lequel les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire et dans lequel elles migrent grâce à une différence de potentiel. Le poids moléculaire de la protéine d'intérêt est estimé grâce à un étalon composé d'un ensemble de protéines de poids moléculaire connu. Au terme de l'étape de migration, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (PolyVinylDiène fluoride). La membrane est ensuite mise à bloquer dans une solution de lait afin d'éviter les liaisons non spécifiques des anticorps. La protéine d'intérêt est alors détectée à l'aide d'anticorps primaires dirigés contre un ou plusieurs de ses épitopes. Dans un second temps, des anticorps secondaires couplés à une HRP (Horse Radish Peroxidase) reconnaissent les fragments Fc des anticorps primaires. L'étape de révélation est réalisée en présence du substrat de la peroxydase et de luminol. En présence d'H₂O₂, la réaction enzymatique génère des photons qui impriment un film autoradiographique. Dans la zone de linéarité, avant saturation, l'intensité des signaux est directement proportionnelle à la quantité d'anticorps primaires et donc à l'abondance de la protéine d'intérêt.

II.5.2 Méthodes

II.5.2.1 Sous-cultures, incubations et préparation des lysats clairs

Les cellules 143B sont repiquées dans des boîtes de 75 cm² dans 15 ml de milieu DHG + 10 % de SVF. Le lendemain, les cellules sont incubées en présence ou non de saccharose ou de maltose à 100 mM.

Après 1, 2, 3, 6, 7, 8, 10 et 13 jours d'incubation, on prépare un lysat clair à partir des cellules. Les cellules sont d'abord rincées 2 fois avec 10 ml de PBS froid, puis récoltées et lysées par raclage dans 1 ml de tampon de lyse de composition : Tris 40 mM ; pH 7,5, KCl 300 mM, EDTA 2 mM, Triton X-100 à 1 %. Ce tampon contient un cocktail d'inhibiteurs de protéases en tablette (Roche, Allemagne) et un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases (PIB) dont la composition est : 25 mM Na₃VO₄ (Sigma, USA), 250 mM PNPP (Sigma, USA), 250 mM β-glycéro-Phosphate (Sigma, USA), 125 mM NaF (Merck, Allemagne). Les lysats totaux sont ensuite laissés 10 min sur glace puis sont centrifugés 15 min à 13000 rpm (4° C). Un aliquot du lysat clair (surnageant) est utilisé pour le dosage des protéines selon la méthode de Bradford [Bradford, 1976].

II.5.2.2 Préparation des échantillons

Le volume de l'échantillon chargé par puits est de 40 µl et comprend :

- un volume d'échantillon correspondant à 25 µg de protéines
- un volume de tampon de lyse pour porter à 32 µl
- 8 µl de SB (Sample Buffer) concentré 5 X : 0,5 M Tris ; pH 6,8, 20 % SDS (Sodium dodecyl sulfate), 20 % glycérol, 1 % bleu de bromophénol, 20 % β-mercapto-éthanol

Les échantillons sont portés à 100 °C pendant 10 min pour dénaturer les protéines, centrifugés à 13000 rpm pendant 3 min et chargés dans le gel. Un des puits est chargé avec 10 µl d'un étalon de poids moléculaire SeeBlue Plus2 (Invitrogen, USA).

II.5.2.3 Gels et migration

Nous avons utilisé des «mini-gels» précoulés NuPage 4-12 % (Invitrogen, USA). Le tampon de migration stock (Invitrogen, USA) est dilué 20 fois dans de l'H₂O et on ajoute 500 µl d'antioxydants (Invitrogen, USA) aux 200 ml de tampon de migration que l'on place au milieu de la cuve. La migration s'effectue pendant 50 min (400 mA et 200 V).

II.5.2.4 Transfert des protéines sur une membrane de PVDF

Au terme de la migration, le gel est démoulé et placé dans un montage « en sandwich » composé de papiers filtres et d'éponges. Le gel est placé au contact d'une membrane de PVDF préalablement plongée dans le méthanol. Le « sandwich » est placé dans une cuve de transfert entre deux électrodes entre lesquelles est appliquée une différence de potentiel de 30 V permettant le transfert des protéines du gel sur la membrane. Le transfert s'effectue pendant 2 h 30 dans un tampon de transfert stock (Invitrogen, USA) dilué 20 fois dans de l'H₂O auquel on ajoute 20 % de méthanol (Acros Organics, Belgique) et 0,1 % d'antioxydants (Invitrogen, USA).

II.5.2.5 Incubation de la membrane avec les anticorps et révélation

Au terme du transfert, la membrane est mise à bloquer pendant 2 h à température ambiante ou pendant une nuit à 4 °C dans une solution de TBS-T (Tris Buffer Saline : 20 mM Tris-HCl; pH 7,4, 140 mM NaCl, 0,1 % Tween-20) (Sigma Chemical, USA) contenant du lait en poudre Gloria (Nestlé, Belgique) à une concentration de 5 %. La membrane est ensuite incubée pendant 2 h avec l'anticorps primaire :

Anticorps	Type/Origine	Dilution utilisée	Tampon de dilution
Anti-LAMP-1	H4A3 monoclonal de souris (DSHB, Developmental Studies Hybridoma Bank, USA)	2000 ×	TBS-T 0,05 % + Gloria 5 %
Anti-LAMP-2	H4B4 monoclonal de souris (DSHB, USA)	2000 ×	TBS-T 0,05 % + Gloria 5 %
Anti-cathepsine D	Polyclonal de lapin (Dako, USA)	1000 ×	TBS-T 0,05 % + Gloria 5 %
Anti-Rab-7	Polyclonal de lapin (Santa Cruz, USA)	2000 ×	TBS-T 0,05 % + Gloria 5 %
Anti-SREBP	Polyclonal de lapin (Santa Cruz, USA)	200 ×	TBS-T 0,1 % + Gloria 5 %
Anti-α-tubuline	Monoclonal de souris (Neomarkers)	2000 ×	TBS-T 0,1 % + Gloria 5 %

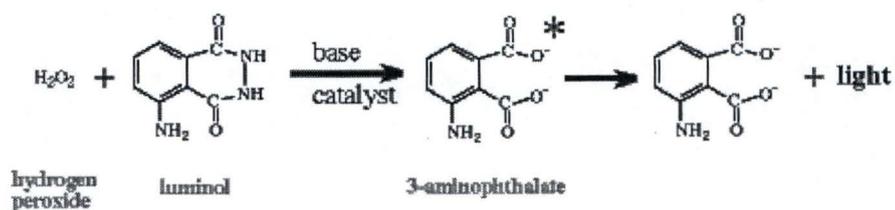


Figure II.2 : Schéma représentant la réaction de chémioluminescence permettant la révélation d'un Western blot. En présence d' H_2O_2 , la peroxydase HRP (Horse Radish Peroxydase) oxyde le luminol. Cette réaction produit, entre autres, des photons qui imprimeront un film autoradiographique.

Au terme des incubations avec les anticorps primaires, la membrane est rincée 3 fois 5 min avec du TBS-T à 0,1 % puis est incubée pendant 50 min avec les anticorps secondaires couplés à la HRP. Nous avons utilisé des anticorps anti-IgG (Immunoglobuline G) de souris (Prosan, Danemark) ou anti Ig-G de lapin (Amersham, Grande-Bretagne) dilués 2000 fois dans la solution de TBS-T de même composition que celle utilisée pour l'anticorps primaire d'intérêt. La membrane est alors rincée 2 fois 7 min dans du TBS-T à 0,3 % puis 3 fois 7 min dans du TBS-T à 0,05 %.

Les anticorps dirigés contre l' α -tubuline sont utilisés pour contrôler la charge protéique des échantillons dans le gel d'électrophorèse. L'immunodétection de l' α -tubuline permet donc de vérifier que tous les puits ont bien été chargés avec une même quantité de protéines.

Les membranes sont alors incubées pendant 5 min avec le substrat de la peroxydase (H_2O_2) en présence de luminol (kit de révélation Pierce, Grande-Bretagne). Le principe de cette réaction est illustré à la figure II.2. Les photons libérés par la réaction impriment un film autoradiographique (Amersham, Belgique) qui est ensuite plongé dans un bain de révélateur (ILFORD imaging, Grande Bretagne) puis dans un bain de fixateur (ILFORD imaging, Grande Bretagne). Le film est alors rincé à l'eau courante, séché et scanné. Dans certains cas, une quantification est réalisée par une mesure de la densité optique des signaux à l'aide du logiciel TotalLab Control Centre (Amersham, Grande-Bretagne). Les valeurs de densités optiques correspondant aux signaux des protéines d'intérêt sont alors normalisées par rapport à l'intensité du signal de la bande correspondant au contrôle de charge du puits considéré. Ces expressions ne sont bien évidemment que semi-quantitatives et d'autant plus fiables que les signaux ne sont pas saturés.

II.6. Marquage en immunofluorescence et microscopie confocale

Dans le cadre de ce travail, cette technique a été utilisée pour visualiser l'abondance de marqueurs lysosomaux comme LAMP-1 et LAMP-2 dans des cellules 143B contrôles et des cellules incubées en présence de saccharose à une concentration de 100 mM. Elle a également permis de visualiser et de localiser les facteurs de transcription Sp1, SREBP-1, C/EBP β , NF-kB, YY-1, c-Myc, phospho-c-Myc, et Max. Pour tous ces marquages en immunofluorescence, un contre-marquage supplémentaire au TOPRO-3 permettant de visualiser le noyau des cellules a été réalisé. Enfin, la microscopie confocale a également été utilisée pour visualiser l'abondance des lysosomes après avoir incubé les cellules en présence de LysoTracker Red (Molecular Probes), une sonde fluorescente lysomotrope s'accumulant dans les compartiments acides de la cellule (voir point II .7).

II.6.1 Principe de la technique

Cette technique permet de visualiser la présence, d'estimer l'abondance et de préciser la localisation de protéines cellulaires d'intérêt après un marquage en immunofluorescence à l'aide d'anticorps primaires spécifiques dirigés contre un ou plusieurs de leurs épitopes. Le fragment Fc de l'anticorps primaire fixé sur la protéine d'intérêt est alors reconnu par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. C'est la fluorescence réémise par ce fluorochrome excité par une source laser à une longueur d'onde propre qui est analysée grâce au microscope confocal et qui donne le signal à interpréter.

II.6.2 Principe du microscope confocal

La microscopie confocale permet de collecter de l'information à partir d'une section optique de haute définition plutôt qu'à partir de toute la profondeur de l'échantillon comme

How It Works

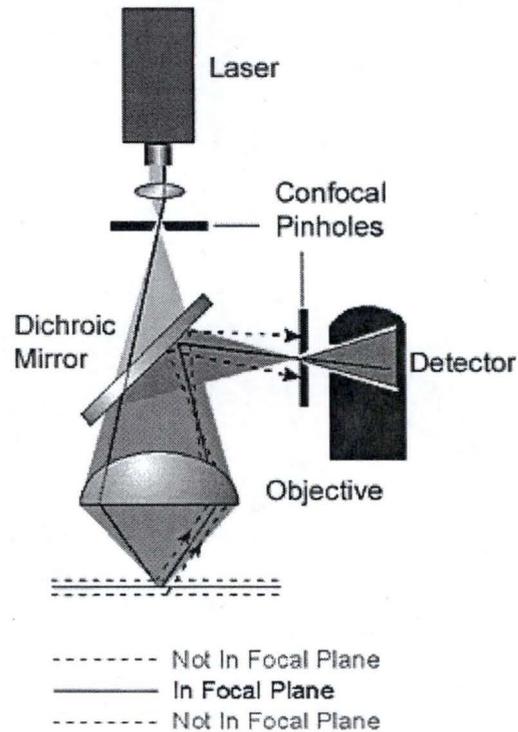


Figure II.3 : Principe et constitution d'un microscope confocal. Un rayon lumineux issu d'un laser est focalisé sur un point de l'échantillon qui est ensuite balayé. La fluorescence réémise par l'objet est récupérée par un « pinhole » à la détection de manière à ce que seule la lumière de fluorescence réémise à partir du plan focal parvienne au détecteur.

dans le cas de la microscopie à épifluorescence. La source lumineuse est un laser Ar/HeNe (Argon Hélium Néon) offrant 3 lignes d'excitation (488 nm, 568 nm, 647 nm). Ceci permet de réaliser des marquages multiples. A l'excitation, un diaphragme d'ouverture permet de focaliser le faisceau incident en un point déterminé. Le balayage de ce faisceau en xy fournit une image dans le plan xy. A la détection, seuls les rayons émis à partir du plan focal choisi arrivent au niveau du détecteur après amplification du signal dans un PMT (PhotoMultiplificateur). L'image est alors digitalisée. De plus, la superposition d'images acquises à partir de canaux différents permet de visualiser la co-localisation éventuelle de plusieurs protéines marquées par des fluorochromes différents. La figure II.3 illustre le principe et la constitution d'un microscope confocal.

II.6.3 Méthodes

II.6.3.1 Sous-cultures

Les cellules sont repiquées sur des couvre-objets stérilisés à la flamme dans des boîtes de 24 puits à une densité de 20000 cellules par puits. Le lendemain, elles sont incubées pendant 6h, 24 h, 48 h ou 72h dans du DHG + 10 % SVF contenant ou non (cellules contrôles) du saccharose ou, dans certaines condition, du maltose à une concentration de 100 mM.

II.6.3.2 Solutions, anticorps et équipements

- PBS : 0,9 % NaCl, 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$; pH 7,4
- PBS-Triton à 1 % (Merck, Allemagne)
- PBS-BSA à 3 % (Sigma, USA)
- PBS - paraformaldéhyde à 4 % (Merck, Allemagne)
- Mowiol (Calbiochem, USA) : 0,1 g de mowiol par ml d'un tampon Tris 1,5 M ; pH 8,8, contenant 22 % de glycérol. La préparation est chauffée à 56 °C jusqu'à dissolution.
- Microscope confocal Leica (Leica, Allemagne)
- Anticorps primaires utilisés :

anti-LAMP-1 H4A3 de souris (DSHB, Developmental Studies Hybridoma Bank, USA)

anti-LAMP-2 H4B4 de souris (DSHB, USA)

Anti-C/EBP β de lapin (Santa Cruz, USA)

Anti-SREBP-1 de lapin (Santa Cruz, USA)

Anti-Sp1 de chèvre (Santa Cruz, USA)

Anti-p50 de lapin (Santa Cruz, USA)

Anti-YY-1 de lapin (Santa Cruz, USA)

Anti phospho-c-Myc de lapin dirigé contre les résidus phosphorylés Thr58/Ser62 de c-Myc humain (Cell signaling, Westburg, Pays-Bas)

Anti -c-Myc de souris (Santa Cruz, USA)

Anti-Max de lapin (Santa Cruz, USA)

- Anticorps secondaires utilisés:

Anticorps anti-IgG de lapin, anti-IgG de souris et anti-IgG de chèvre couplés à une sonde fluorescente Alexa (Ex : 495 nm ; Em : 519 nm) (Molecular Probes, USA)

II.6.3.3 Protocole de marquage en immunofluorescence

Au terme des différentes incubations, les cellules sont fixées pendant 10 min avec 1 ml de PBS-paraformaldéhyde à 4 % préchauffé à 37 °C, puis elles sont rincées 3 fois avec 1 ml de PBS. Les cellules sont ensuite perméabilisées pendant 5 min à température ambiante avec 1 ml de PBS contenant 1 % de Triton X-100 (Sigma, USA).

Incubation avec l'anticorps primaire :

On dépose 30 µl de la solution d'anticorps primaire dilué 100 fois dans du PBS-BSA 1 % sur un parafilm placé en chambre humide. La lamelle couvre-objet est retournée sur la goutte et les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire pendant 2 h à température ambiante ou pendant une nuit à 4 °C. Après cette incubation, les lamelles sont replacées dans la boîte de culture et les cellules sont rincées 3 fois avec 1 ml de PBS-BSA 1 %.

Incubation avec l'anticorps secondaire :

Le procédé est le même que celui décrit pour l'incubation avec l'anticorps primaire. L'incubation en présence de l'anticorps secondaire dilué 500 fois dans du PBS-BSA 1 % se déroule pendant 1 h à température ambiante et à l'abri de la lumière afin de protéger le fluorochrome. Après cette incubation, les cellules sont à nouveau rincées 3 fois avec 1 ml de PBS-BSA 1 %.

Incubation avec le TOPRO-3 :

Toujours selon le même procédé, les cellules sont finalement incubées pendant 30 min et à l'abri de la lumière en présence de 30 µl de TOPRO-3 (Molecular Probes, USA) dilué 80 fois dans un tampon contenant 2 mg/ml d'ARNase (ICN, USA).

Montage :

La dernière étape consiste à monter les couvre-objets sur des lames porte-objets dégraissées à l'alcool (Memzel-Gloser, Allemagne) en les retournant sur une goutte de Mowiol préchauffé à 56 °C et en évitant la formation de bulles d'air. Les lames seront alors maintenues à l'obscurité pendant une nuit à 4 °C pour permettre la polymérisation du Mowiol avant d'observer les cellules au microscope confocal.

II.7. Visualisation et estimation de l'abondance de la population lysosomale par un marquage à l'aide de la sonde LysoTracker Red

II.7.1 Principe

Les sondes LysoTracker développées par Molecular Probes sont des sondes fluorescentes utilisées pour le marquage des organites acides dans les cellules vivantes. Ces sondes sont constituées d'un fluorophore couplé à une base faible (amine) qui, à pH neutre, n'est que partiellement protonée. Ces sondes diffusent librement à travers les membranes cellulaires et vont s'accumuler spécifiquement dans les compartiments cellulaires à pH faible. Bien que le mécanisme de leur rétention subcellulaire ne soit pas encore clairement démontré, il semble impliquer une protonation en milieu acide et la capture au sein des membranes de l'organite.

Dans le cadre de ce mémoire, c'est la sonde LysoTracker Red (DND-99) qui a été utilisée dans le but de comparer l'abondance de la population lysosomale dans des cellules 143B traitées au saccharose et des cellules contrôles. Cette sonde absorbe et est excitée à 577 nm et réémet de la fluorescence à 590 nm.

1. Fixation d'une sonde double brin biotynilée contenant la séquence de liaison consensus de GATA-4 dans des puits tapissés à la streptavidine

+ rinçage

2. Incubation des lysats cellulaires

+ rinçage

3. Incubation avec des anticorps de chèvre anti-GATA-4

4. Incubation avec des anticorps anti-chèvre conjugués à la peroxydase

+ rinçage

5. Réaction colorimétrique

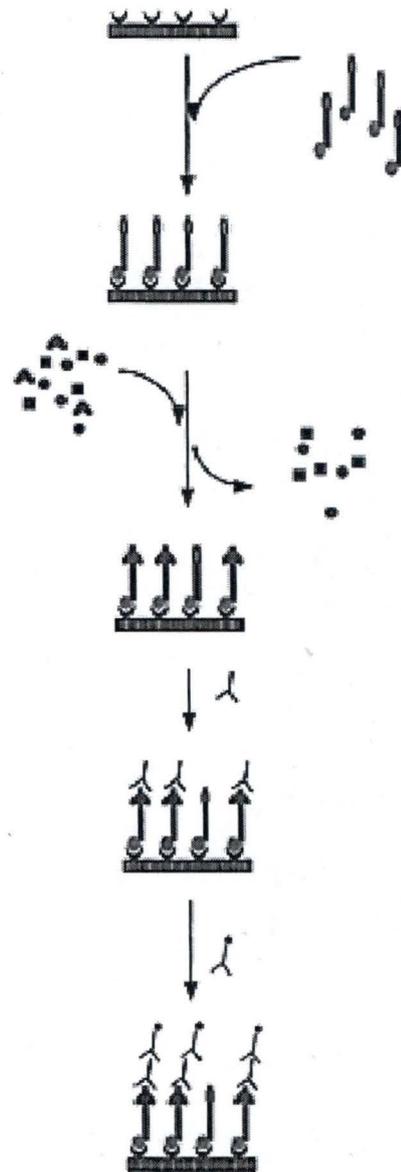


Figure II.4 : Schéma reprenant les étapes principales du dosage en plaques multipuits de la liaison d'un facteur de transcription à une séquence consensus d'ADN. Cet exemple illustre le dosage pour GATA-4.

(D'après Renard *et al.*, 2001)

II.7.2 Méthodes

II.7.2.1 Sous-cultures

Les cellules sont repiquées dans des boîtes de 24 puits sur des couvre-objets stérilisés à la flamme à une densité de 20000 cellules par puits. Le lendemain, elles sont incubées dans du DHG + 10 % SVF contenant ou non (cellules contrôles) du saccharose ou du maltose à une concentration de 100 mM.

II.7.2.2 Marquage

La première étape du marquage, réalisée après 6 h, 48 h ou 72 h d'incubation en présence du saccharose consiste à décanter le milieu avant d'ajouter 500 µl de milieu de culture sans sérum contenant la sonde à une concentration de 200 nM. Les cellules sont ensuite incubées en présence de la sonde pendant 20 min à 37 °C. Elles sont ensuite rincées 3 fois avec 1 ml de milieu sans sérum avant d'être fixées pendant 10 min avec 1 ml de PBS-glutaraldéhyde 4 %. La lame est alors montée au Mowiol en suivant le même protocole que celui décrit au point II.6.3.3 avant l'observation des cellules au microscope confocal.

II.8. *Test de liaison à l'ADN en multipuits des facteurs de transcription : GATA-4 et C/EBP- α*

Ces tests colorimétriques permettent de déterminer l'activité de liaison de facteurs de transcription d'intérêt à leur séquence d'ADN consensus. Ils sont réalisés en plaques multipuits, à partir d'extraits de protéines nucléaires de cellules 143B contrôles et de cellules incubées en présence de saccharose à 100 mM. Ce test développé à l'URBC pour le dosage du facteur NF-kB [Renard, Ernest, 2001] est maintenant commercialisé par Active Motif sous l'appellation de Kits TransAM. Ces tests de quantification de la liaison de facteurs de transcription à l'ADN sont sensibles, spécifiques et reposent sur une détection de type ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ne faisant pas appel à la radioactivité. Dans notre travail, ce test a été utilisé pour mesurer l'état de liaison des facteurs GATA-4 et C/EBP- α .

II.8.1 Principe du test

Le dosage est réalisé dans des plaques de 96 puits. Le fond de chaque puits est tapissé par de la streptavidine qui permet la fixation d'un nucléotide double brin biotinyté. Ce nucléotide comprend deux éléments ligués : la séquence consensus du facteur de transcription d'intérêt et un fragment permettant d'éloigner ce site de fixation du fond du puits (le « spacer »).

L'activité de liaison du facteur de transcription d'intérêt d'un échantillon est mise en évidence par une série d'étapes successives, représentées à la figure II.4. La première étape consiste à incuber les protéines nucléaires pendant 60 min avec la séquence consensus en présence d'un tampon de liaison adapté, puis de rincer le puits pour enlever le matériel non fixé. La liaison éventuelle du facteur à sa séquence est alors mise en évidence par une incubation avec un anticorps primaire dirigé contre un ou plusieurs épitopes du facteur. Après plusieurs rinçages, une incubation en présence d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP) et dirigé contre l'anticorps primaire est réalisée. La révélation se fait en présence du substrat de l'enzyme. L'absorbance du produit de la réaction colorimétrique, une fois arrêtée, est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 450 nm.

II.8.2 Extraction nucléaire

II.8.2.1 Solutions

- Tampon HB 10 X (Hypotonic Buffer 10 X concentré) : pH 7,9
50 mM NaF (Merck, Allemagne)
10 mM Na₂MoO₄ (Sigma, USA)
200 mM Hepes (ACROS Organics)
1 mM EDTA (Merck, Allemagne)
Conserver à -20 °C
- Tampon de lyse NP-40 (0,5 %), pour 100 ml :
10 ml de tampon HB 10X
500 µl de NP-40 (100 %)
89,5 ml H₂O
Conserver à 4°C
- Tampon Re = tampon de resuspension, pour 100 ml :
10 ml de tampon HB 10X
20 ml de glycérol 87 % (Merck, Allemagne)
70 ml H₂O
Conserver à 4°C
- Tampon Sa = tampon salin (0,8 M NaCl), pour 100 ml :
10 ml de tampon HB 10X
20 ml glycérol 87 % (Merck, Allemagne)
20 ml NaCl 4 M
50 ml H₂O
Conserver à 4°C
- PIC (Protease Inhibitor Cocktail) stock :
1 tablette de PIC (Roche, Allemagne) pour 2 ml d'H₂O
Cette solution stock est à diluer 25 fois fraîchement
- PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer) stock:
Na₃VO₄ (Sigma, USA) 25 mM
PNPP (Sigma, USA) 250 mM
β-glycéro-phosphate (Sigma, USA) 250 mM
NaF 125 mM (Merck, Allemagne)
Cette solution stock est à diluer 25 fois fraîchement

II.8.2.2 Méthodes

II.8.2.2.1 Sous-cultures

Les cellules 143B sont repiquées dans des boîtes de culture de 75 cm² dans 15 ml de milieu DHG + 10 % de SVF. Le lendemain, les cellules sont incubées ou non en présence de saccharose à 100 mM.

II.8.2.2.2 Extraction nucléaire

Toutes les étapes de préparation des extraits nucléaires sont réalisées à 4 °C. Après 1, 2, 3, 6, 7, 8, 10 ou 13 jours d'incubation, le milieu de culture est retiré et les cellules sont rincées successivement avec 10 ml de PBS froid, avec 10 ml de PBS contenant 1 mM Na₂MoO₄ et 5 mM NaF, et enfin incubées pendant 5 min avec 10 ml de HB. Ce tampon hypotonique fait gonfler les cellules, ce qui les rend plus sensibles à la lyse. Ces tampons de rinçage sont soigneusement décantés, puis les cellules sont raclées et lysées dans 500 µl de tampon de lyse. Le lysat est transféré dans un microtube et est maintenu 5 min sur glace, puis centrifugé 1 min à 13000 rpm. Le surnageant obtenu est éliminé et le culot contenant les noyaux est resuspendu

dans 100 µl de tampon de resuspension contenant les inhibiteurs de protéases (PIC) et les inhibiteurs de phosphatases (PIB). On ajoute alors un volume équivalent de tampon salin contenant également les inhibiteurs PIC et PIB. L'extraction des protéines nucléaires est réalisée dans un microtube placé sur un agitateur rotatif en chambre froide pendant 30 min. Les extraits sont ensuite centrifugés pendant 10 min à 13000 rpm. Les protéines nucléaires présentes dans le surnageant sont récupérées puis aliquotées et conservées à -70 °C. Un dosage des protéines par la méthode de Bradford est réalisé sur un aliquot afin de déterminer la concentration en protéines dans les échantillons [Bradford, 1976].

II.8.3 Dosage de l'activité de liaison des facteurs de transcription à leur séquence consensus

II.8.3.1 Solutions et matériel

- Plaques de 96 puits tapissés à la streptavidine
- Tampon de liaison concentré : Tris-HCl 100 mM ; pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, EDTA 5 mM, NaCl 500 mM, Glycérol 40 %, H₂O pour mettre à volume.
- Tampon de liaison qui varie selon le facteur d'intérêt :

- Pour GATA-4 : 100 µl de tampon de liaison 10 X concentré, 200 µl gloria 5 %, 2,5 µl DTT 1 M (Dithiothreitol), 1,7 µl DSS 10 µg/µl (DNA Salmon Sperm) (Sigma, USA), 698 µl H₂O

- Pour C/EBP α : 100 µl de tampon de liaison 10 X concentré, 2 µl DTT 1 mM, 2 µl DSS 10 µg/µl (Sigma, USA) et 896 µl d'H₂O

- PBS-50 : 10 mM tampon phosphate ; pH 7,5, 50 mM NaCl
- Tween-20 (Sigma, USA)
- PBS-50 + Tween- 20 à 0,1 %
- BSA (Sigma, USA)
- PBS-50 + BSA 1%
- Anticorps primaires :

- Anti GATA-4 polyclonal de chèvre, 200 µg/µl (Santa Cruz, USA)

- Anti C/EBP-α polyclonal de lapin, 200 µg/µl (Santa Cruz, USA)

- Anticorps secondaires :

Anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase 400 µg/µl (Santa Cruz, USA)

Anti-IgG de chèvre couplé à la peroxydase 400 µg/µl (Santa Cruz, USA)

- Solution Stop : H₂SO₄ (Biosource, Belgique)
- Substrat TMB: Tetra-Methyl Benzidine (BioSource, Belgique)
- Spectrophotomètre lecteur de plaques multipuits (Ultramark, Microplate Imaging System, Bio-Rad, Allemagne).

II.8.3.2 Méthodes

II.8.3.2.1 Fixation du trappeur dans les puits d'une plaque 96 puits tapissés par la streptavidine

Les puits sont tapissés avec 50 µl d'une solution de trappeurs biotinylés (200 nM) dilués dans du PBS. Au terme d'une heure d'incubation à 37 °C, les puits sont rincés 2 fois avec 100

µl de PBS-50 contenant du Tween-20 à 0,1 % puis une fois avec 200 µl d'H₂O. La plaque est séchée pendant 30 min à 37 °C et conservée à 4 °C.

II.8.3.2.2 Liaison du facteur de transcription d'intérêt

Selon le facteur de transcription d'intérêt, on dépose 30 µl (GATA-4) ou 40 µl (C/EBPα) du tampon de liaison par puits et 2,5 µg ou 5 µg de protéines nucléaires diluées dans du tampon de lyse pour le dosage d'activité de liaison de C/EBPα et de GATA-4 respectivement. La réaction de liaison du facteur de transcription à sa séquence consensus se réalise à température ambiante pendant 60 min. Les puits sont ensuite rincés 3 fois avec 200 µl de PBS-50 contenant du Tween-20 à 0,1 %.

II.8.3.2.3 Fixation des anticorps primaires sur le facteur de transcription

Par puits, on ajoute 100 µl de la solution d'anticorps primaire dilué, selon le facteur de transcription d'intérêt, 1000 fois (anti-GATA-4) ou 1500 fois (anti-C/EBPα) dans du PBS-50 contenant de la BSA à 1%. Après une heure d'incubation à température ambiante, les puits sont rincés 3 fois avec 200 µl de PBS-50 contenant du Tween-20 à 0,1%.

II.8.3.2.4 Fixation des anticorps secondaires couplés à la peroxydase

Les anticorps secondaires anti-IgG appropriés couplés à la peroxydase sont dilués 1000 fois dans du PBS-50 contenant de la BSA à 1% pour C/EBPα ou dans du PBS-50 contenant du Gloria à 1% pour GATA-4. On ajoute ensuite 100 µl de cette solution par puits et l'incubation se déroule pendant une heure à température ambiante. Les puits sont alors rincés 4 fois avec 200 µl de PBS-50 contenant du Tween-20 à 0,1%.

II.8.3.2.5 Révélation

On ajoute 100 µl de TMB par puits et la réaction se déroule pendant 10 min à l'abri de la lumière et à température ambiante. Au terme de cette incubation, la réaction enzymatique est arrêtée par l'addition de 100 µl d'une solution diluée d'H₂SO₄. L'absorbance du produit de réaction est alors mesurée au spectrophotomètre à 450 nm (référence 655 nm).

La validité du test est contrôlée grâce à l'incorporation au moment du dosage d'échantillons contenant des protéines nucléaires de cellules servant de références positive et négative. Ces références sont constituées de :

- Pour le dosage de l'activité de liaison du facteur GATA-4 :
 - Référence positive : cellules de la lignée F9 stimulées pendant 2 jours pour activer le facteur avec de l'acide rétinoïque à 1 µM dans 10 ml de DHG + 10 % de sérum.
 - Référence négative : cellules de la lignée F9 cultivées dans du milieu DHG + 10 % de sérum.
- Pour le dosage de l'activité de liaison du facteur C/EBPα :
 - Référence positive : cellules de la lignée TH11
 - Référence négative : cellules de la lignée HeLa

II.9. *Transfection transitoire et gènes rapporteurs luciférase*

II.9.1 Principe

La transfection est une technique qui permet de faire pénétrer de l'ADN d'origine exogène dans une cellule eucaryote. Les ADN plasmidiques utilisés étant des molécules de plusieurs

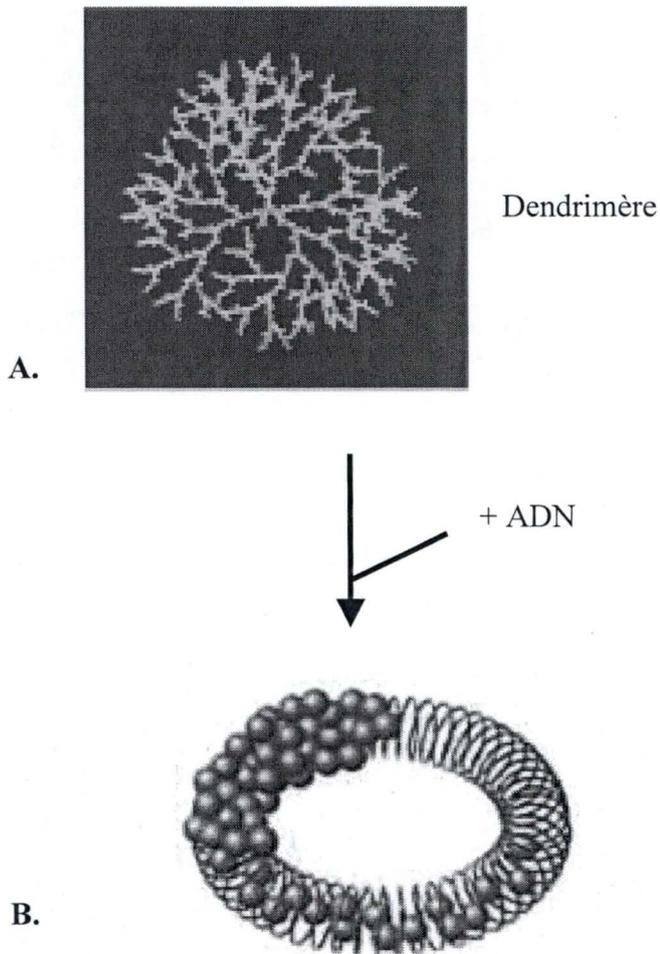


Figure II.5 : Modèle du complexe SuperFect-ADN. L'agent SuperFect, un dendrimère polycationique possédant une architecture sphérique (A), lie les groupements phosphates de l'ADN, lui donnant une structure compacte (B) qui facilite son entrée dans la cellule. Le complexe ADN-SuperFect est chargé positivement, ce qui lui permet d'interagir avec les glycoprotéines de surface de la cellule, chargées négativement.

(D'après Qiagen)

kb chargées négativement, leur entrée n'est pas spontanée et nécessite la formation de complexes avec une molécule servant d'agent ou vecteur de transfection. Dans ce travail, nous avons utilisé le « Superfect » (Qiagen, Allemagne). Ce dendrimère polycationique possédant une architecture sphérique lie les groupements phosphates de l'ADN, lui donnant une structure compacte qui facilite son entrée dans la cellule. Cette structure est illustrée à la figure II.5. De plus, le complexe ADN-Superfect est chargé positivement, ce qui lui permet d'interagir avec les glycoprotéines de surface de la cellule chargées négativement. A l'intérieur de la cellule, l'ADN est partiellement stabilisé grâce à l'agent transfectant qui tamponne l'endosome, ce qui permet de freiner sa fusion avec le lysosome.

Dans le cadre de ce travail visant à identifier des facteurs de transcription capables de participer à la communication moléculaire rétrograde existant entre le lysosome accumulant le saccharose et le noyau, cette technique a été utilisée pour transfecter transitoirement des cellules avec des constructions rapporteurs contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle de promoteurs authentiques ou synthétiques répondant spécifiquement à des facteurs de transcription candidats.

II.9.2 Plasmides utilisés au cours de ce travail

Les plasmides rapporteurs codant le gène de la luciférase placé sous le contrôle de différents promoteurs authentiques ou synthétiques sont:

Un plasmide rapporteur luciférase contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur authentique de l' α -inhibine, contenant plusieurs sites de liaison pour le facteur CREB dont un fonctionnel à - 170 pb en amont du site initial de transcription. Cette construction nous a été donnée par le Prof. K. Mayo (Department of Biochemistry, NorthWestern University, Evanston, IL, USA) et est décrite dans « Mol Endocrinol. 1991, 4:521-34 ».

Un plasmide rapporteur luciférase pour SREBP contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur authentique de S14 généreusement donnée par le Dr. Amemiya-Kudo (Okinaka Memorial Institute for Medical Research 2-2-2- Toranomom, Minato-ko Tokyo, Japan)

Un plasmide rapporteur luciférase pour AP-1 contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur synthétique qui comporte 4 sites de fixation pour AP-1. Cette construction nous a été fournie par le Prof. D. Moore (Department of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital, Boston) et est décrite dans « Mol Endocrinol. 1993,12:1596-602 ».

Un plasmide rapporteur luciférase pour NF-kB contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur synthétique qui comporte 8 sites de fixation pour NF-kB. Cette construction nous a été fournie par le Prof. B. Seed (Department of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital, Boston) et est décrite dans « EMBO J. 1996, 22 : 6189-96 ».

Un plasmide rapporteur luciférase pour c-Myc contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur synthétique qui contient 4 sites de fixation pour le facteur c-Myc. Cette construction nous a été fournie par le Prof. R. Eisenman (Division of Basic Sciences, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, USA) et est décrite dans « Curr Top Microbiol Immunol. 1992, 182:435-43 ».

Un plasmide rapporteur luciférase contenant le promoteur authentique de C/EBP α sous cloné dans le vecteur pGL3-Basic vector (Promega) et reçu du Dr. Patel avec l'autorisation du Prof. M.D. Lane (School of Public Health and School of Medicine, University of North Carolina at Chapel Hill, USA). Des sites potentiels activateurs sont retrouvés pour les facteurs

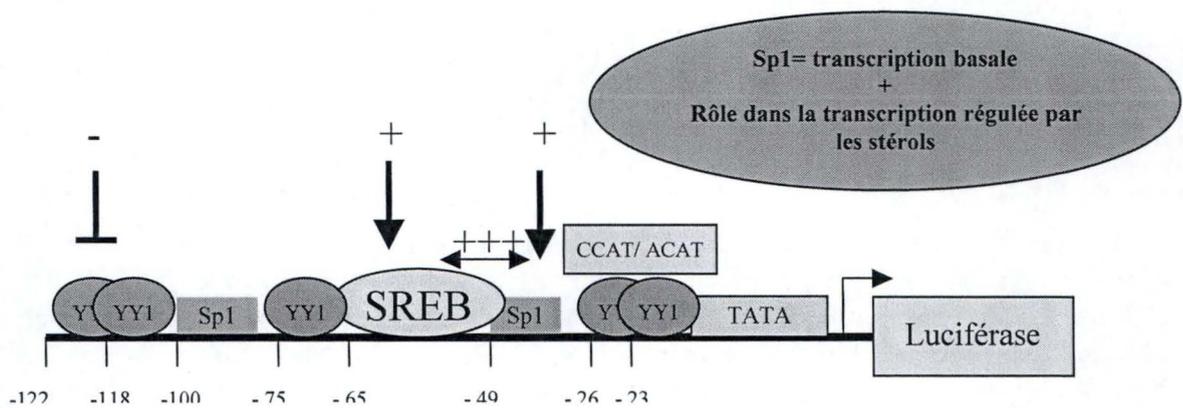


Figure II.6 : Schéma représentant la construction rapporteur luciférase dont l'expression est placée sous le contrôle d'un fragment du promoteur authentique du récepteur aux LDL possédant des sites de fixation pour les éléments de régulation (YY1, SREBP et Sp1) essentiels à la transcription activée par une diminution de la concentration en stérols. Les emplacements de ces éléments de régulation par rapport au site +1 de la transcription et leur effet sur l'expression du gène rapporteur sont représentés.

(D'après Sanchez *et al.*, 1995)

C/EBP β et C/EBP δ . Cette construction est décrite dans « Proc Natl Acad Sci U S A. 1997, 94 :13571-5 ».

Un plasmide rapporteur-luciférase (pGL2) pour Sp1 contenant 3 sites de fixation pour le facteur Sp1 dans un promoteur synthétique généreusement donné par le Dr. H. Nomura (Department of Biochemistry, Mie University Faculty of Medicine, Japan).

Un plasmide rapporteur-luciférase (pGL3) pour YY-1 (Msx2-luciférase) construit par insertion d'un fragment de 550 pb (-369 à + 181) du promoteur du gène Msx2 dans le vecteur rapporteur pGL3 (Promega) et généreusement donné par le Prof. L. Shum (Craniofacial Development Section, National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, NIH, Bethesda, USA). Cette construction est décrite dans « Nucleic Acids Res. 2002 , 30:1213-23 ».

Un plasmide rapporteur-luciférase dont l'expression est sous le contrôle d'un fragment du promoteur authentique du récepteur aux LDL généreusement donné par le Prof. E. Edwards (Departments of Biological Chemistry and Medicine, UCLA, Los Angeles, USA). Cette construction est décrite dans « J Biol Chem. 1999, 274:14508-13 ». Etant donné son intérêt dans ce travail, nous illustrons les éléments de régulation (YY-1, SREBP et Sp1) capables de se fixer sur le promoteur du gène de la luciférase dans cette construction à la figure II.6.

Toutes les constructions synthétiques contiennent des sites de liaison pour le facteur d'intérêt suivis par le promoteur minimal de la thymidine kinase qui contrôle l'expression de la luciférase.

Un plasmide codant pour la β -galactosidase. Ce gène, placé sous le contrôle d'un promoteur viral fort (CMV, cytomégalo virus) est utilisé pour normaliser les valeurs obtenues lors des transfections réalisées avec les gènes rapporteurs luciférase. Il nous a été fourni par le Prof. C. Cepko (Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, USA).

Ces différentes constructions ont été amplifiées dans la souche bactérienne *E. coli SURE* (Stratagene, USA) dont les membranes ont été perméabilisées au CaCl₂ (bactéries « CaCl₂-compétentes ») avant la transformation par choc thermique. La purification des constructions amplifiées par un kit « Maxiprep » (Qiagen) permet de récupérer les plasmides qui, après mesure de la densité optique à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre et détermination de leur concentration (Pharmacia Biotech, Grande-Bretagne), seront utilisés dans les expériences de transfection.

II.9.3 Méthodes

II.9.3.1 Sous-cultures et transfection

Les cellules 143B sont ensemencées dans des plaques de 12 puits à une densité de 100000 cellules par puits. Le lendemain, les cellules sont co-transfectées transitoirement avec, par puits, 0,75 μ g d'une construction rapporteur luciférase et 0,25 μ g d'un plasmide rapporteur β -galactosidase. En effet, pour tenir compte de la variation d'efficacité de transfection, les résultats sont normalisés par rapport à l'activité de la β -galactosidase. A cette fin, les cellules sont donc co-transfectées avec un plasmide codant le gène de la β -galactosidase placé sous le contrôle d'un promoteur viral fort (CMV). La β -galactosidase sera donc exprimée de façon constitutive dans les cellules transfectées.

On commence par resuspendre les ADN plasmidiques (1 μ g total par puits) dans un équivalent de 75 μ l de milieu sans sérum. A ce mélange, on ajoute la solution de Superfect dans un rapport 1 : 5 (5 μ l de superfect par μ g d'ADN). Ce rapport a été optimisé précédemment au laboratoire pour les cellules 143B. Une remarque importante est qu'on n'obtient pas plus de 10 % de cellules transfectées dans ces conditions. Cependant, vu la

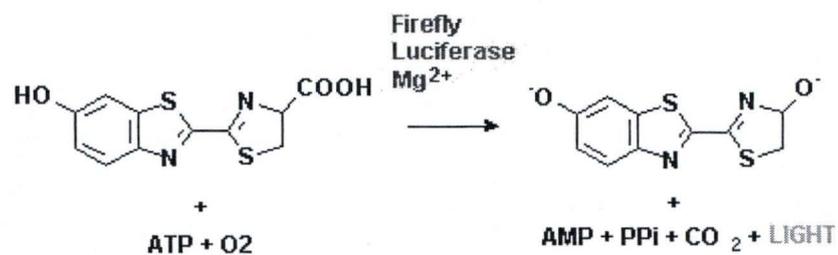


Figure II.7 : Schéma présentant la réaction catalysée par la luciférase. En présence d'ATP et d'O₂, la luciférase oxyde la luciférine. Cette réaction produit l'oxyluciférine et libère des photons. Cette émission de photons est proportionnelle à la quantité d'enzyme (et à son activité) présente dans l'échantillon et peut être mesurée dans un bioluminomètre.

sensibilité des systèmes rapporteurs, ce pourcentage semble suffisant pour ce genre d'études. On vortexe ensuite ce mélange 10 s et on laisse les complexes ADN/Superfect se former pendant 10 min. On ajoute enfin un équivalent de 400 µl de milieu DHG contenant 10 % de SVF au mélange et on dispense les complexes sur les cellules à raison de 450 µl par puits. On laisse les cellules incorporer l'ADN pendant 6 h à l'étuve à 37 °C. Au terme de cette incubation, on remplace le milieu de transfection par 1,5 ml de milieu DHG contenant 10 % de SVF. Le lendemain, les cellules sont incubées en présence ou non de saccharose ou de maltose à la concentration de 100 mM pour une durée de 24 h ou de 48 h. Au terme de ces incubations, on dose les activités luciférase et β -galactosidase.

II.9.3.2 Dosage des activités luciférase et β -galactosidase

II.9.3.2.1 Dosage de l'activité luciférase

II.9.3.2.1.1 Principe

La luciférase, en présence d'ATP, catalyse la formation de luciféryl-adénylate. Ce produit est ensuite oxydé en oxyluciférine en présence d'oxygène. C'est la libération de photons produits au cours de cette réaction que l'on peut mesurer à l'aide d'un luminomètre pourvu d'un photodétecteur (Biocounter M2010, Lumac, Pays-Bas). Cette réaction est schématisée à la figure II.7. L'émission de photons est proportionnelle à l'activité de la luciférase, elle-même proportionnelle à son expression, donc à l'activité transactivatrice du facteur de transcription d'intérêt. Le dosage de l'activité luciférase est réalisé à l'aide du kit *luciferase reporter assay* (Promega, USA).

II.9.3.2.1.2 Lyse cellulaire

Les cellules sont rincées une fois avec 1 ml de PBS et lysées dans 150 µl de tampon de lyse (passive lysis buffer, Promega USA) pendant 15 min à température ambiante sur un agitateur rotatif. Le lysat obtenu est récupéré dans un microtube et centrifugé 3 min à 13000 rpm. Les dosages sont effectués sur les surnageants.

II.9.3.2.1.3 Dosage de l'activité luciférase

On ajoute 20 µl d'échantillon à 100 µl de mixture réactionnelle contenant le substrat de l'enzyme. L'émission de photons est ensuite mesurée pendant 10 s dans un bioluminomètre. Cette production de photons est directement proportionnelle à l'activité de l'enzyme et s'exprime en RLU (Relative Light Unit).

II.9.3.2.1.4 Dosage de l'activité β -galactosidase

Dans une boîte de 96 puits, on ajoute 40 µl d'échantillon à 40 µl de mixture réactionnelle. La composition de cette mixture réactionnelle est pour 50 ml : 200 mM Na_2PO_4 ; pH 7,3 ; 50 µl de MgCl_2 2 M, 350 µl de 2-mercapto-éthanol et 66,5 mg d'ONPG (O-nitrophényl galactopyranoside) (Sigma, USA). Le produit de réaction obtenu après le clivage du substrat (ONPG) par l'enzyme présente un pic d'absorbance à 405 nm. L'absorbance est lue après différents temps d'incubation à 37 °C jusqu'à l'obtention de valeurs d'absorbance comprises entre 0,1 et 0,5.

Les valeurs du dosage de l'activité luciférase sont ensuite normalisées par celles obtenues pour la mesure de l'activité β -galactosidase. Les résultats sont donc calculés en RLU/DO (densité optique) et seront exprimés arbitrairement en pourcentages des contrôles.

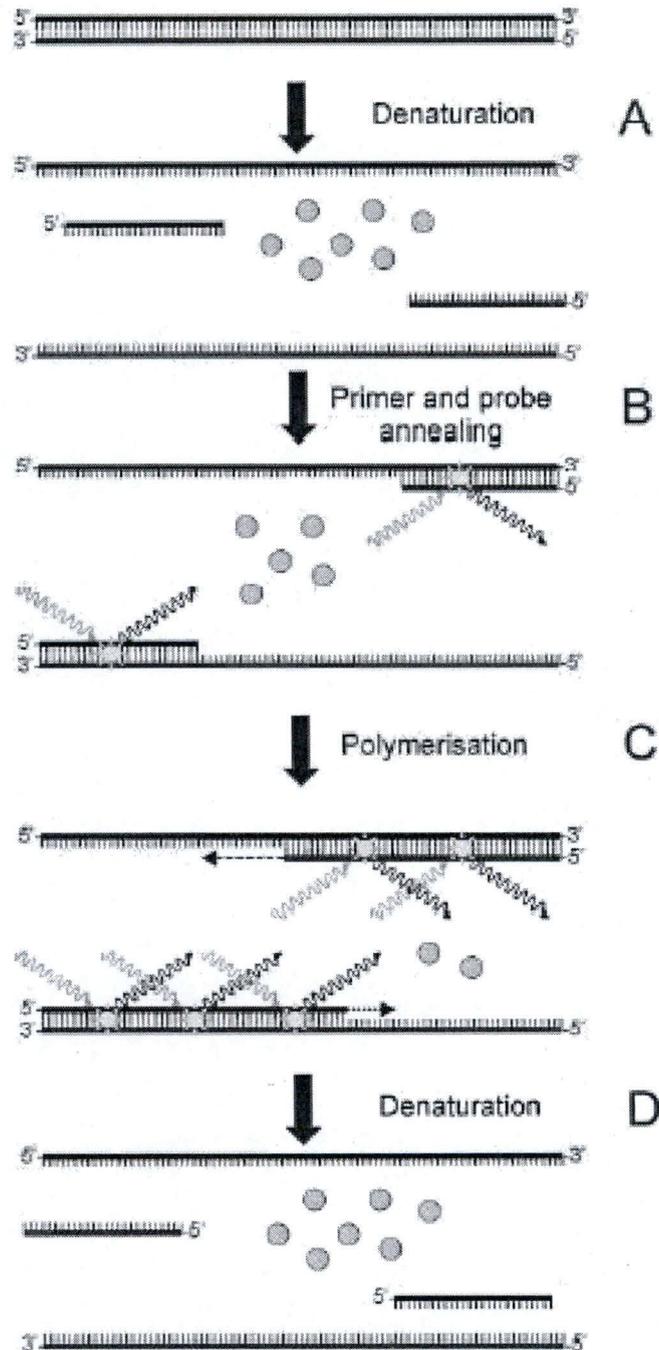


Figure II.8 : Illustration de l'incorporation d'un agent fluorescent dans l'ADN au cours de son amplification par PCR.

(A) Pendant l'étape de dénaturation de l'ADN, la molécule libre émet une fluorescence de très faible intensité.

(B) Lors de l'hybridation (entre les primers et l'ADN cible), quelques fluorochromes se lient à l'ADN double brin, menant à l'émission de photons après excitation.

(C) Pendant l'étape d'élongation (polymérisation), de plus en plus de fluorochromes se lient à l'ADN double brin, ce qui conduit à une augmentation du signal fluorescent.

(D) Lors de l'étape suivante de dénaturation des brins, les fluorochromes sont libérés et la fluorescence retourne à son niveau de base

(D'après Bustin *et al.*, 2000)

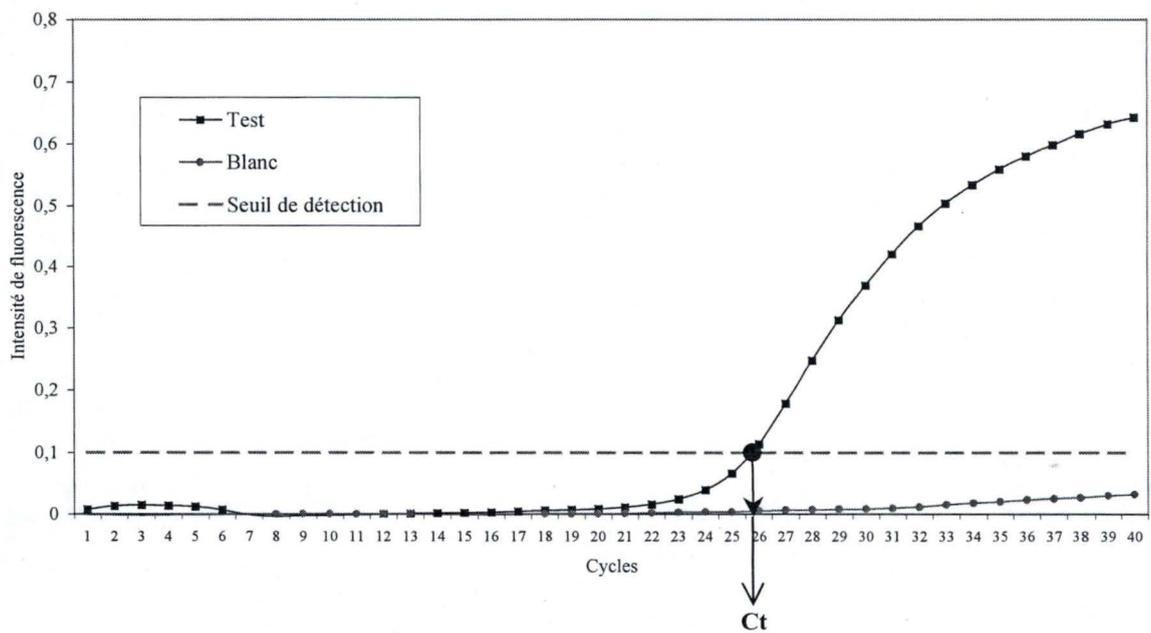


Figure II.9 : Courbe d'amplification théorique obtenue par RT-PCR en temps réel, montrant l'évolution de l'intensité de fluorescence émise par le SYBR Green en fonction du nombre de cycles PCR. Le Ct représente le cycle à partir duquel le signal de fluorescence est significativement supérieur au bruit de fond.

II.10. Réaction d'amplification en chaîne en temps réel (Real-Time PCR)

Dans le cadre de ce travail, nous avons eu recours à cette technique afin de comparer les taux de transcrits des gènes LAMP-1, LAMP-2 et Rab-7 dans des cellules 143B incubées en présence ou non de saccharose 100 mM pendant 24 h et 8 jours.

II.10.1 Principe

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique d'amplification exponentielle et sélective de séquences d'ADN. Elle est réalisée grâce à des primers spécifiques de la séquence à amplifier. Cette amplification peut être suivie par la mesure d'un signal fluorescent émis pendant la synthèse d'ADN suite à l'incorporation d'un fluorophore comme le SYBR Green, une molécule s'intercalant non spécifiquement dans l'ADN double brin. La real-time PCR permet donc de relier de façon proportionnelle la quantité de produits d'amplification (amplicons) à l'intensité de fluorescence générée par le fluorochrome excité mesurée directement dans le tube PCR. Le principe général de la méthode permettant d'analyser quantitativement les taux de transcrits d'un gène d'intérêt suite à l'incorporation d'une molécule fluorescente dans l'ADN double brin est illustré à la figure II.8.

Le cycle auquel la courbe de fluorescence mesurée croise le seuil de détection (défini comme étant l'intensité de fluorescence significativement plus élevée que le niveau de base) correspond au Ct (Cycle Treshold). Ce dernier est inversement proportionnel à la quantité initiale d'ADN cible généré après rétrotranscription et donc à l'abondance de l'ARNm présent dans l'échantillon. La détermination de ce seuil de détection est représentée à la figure II.9.

Cette technique permet d'analyser une abondance de taux de transcrits et est souvent par abus de langage utilisée pour décrire et étudier l'expression différentielle de gènes. Or il faut bien souligner que cette technique ne permet pas de discriminer entre une activation transcriptionnelle et une stabilisation de l'ARNm.

Une analyse en real-time PCR comprend deux étapes principales : la transcription inverse ou « reverse transcription (RT) » permet la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) matrice à partir d'extraits d'ARN total et la PCR proprement dite pour l'amplification.

L'interprétation des résultats de la quantification des transcrits correspondant au gène d'intérêt nécessite une comparaison avec un transcrit d'un « gène de maintenance » ou « house keeping gene » (HKG), un gène dont le taux de transcrits ne varie pas dans la condition expérimentale étudiée. Dans notre étude, nous avons utilisé le gène codant la TBP.

II.10.2 Méthodes

II.10.2.1 Sous-cultures, incubations et extraction de l'ARN total

Les cellules 143B sont cultivées dans des boîtes de 75 cm². Le lendemain du repiquage, elles sont incubées en présence ou non de saccharose 100 mM. L'extraction d'ARN total est réalisée après 24 h et 8 jours d'incubation. Celle-ci commence par une lyse cellulaire suivie d'une extraction au phénol-chloroforme et d'une précipitation à l'isopropanol selon le protocole fourni par le kit RNAGents Total RNA Isolation System (Promega, USA). Après quantification, les échantillons sont stockés à -70 °C jusqu'à l'étape de rétrotranscription en ADNc.

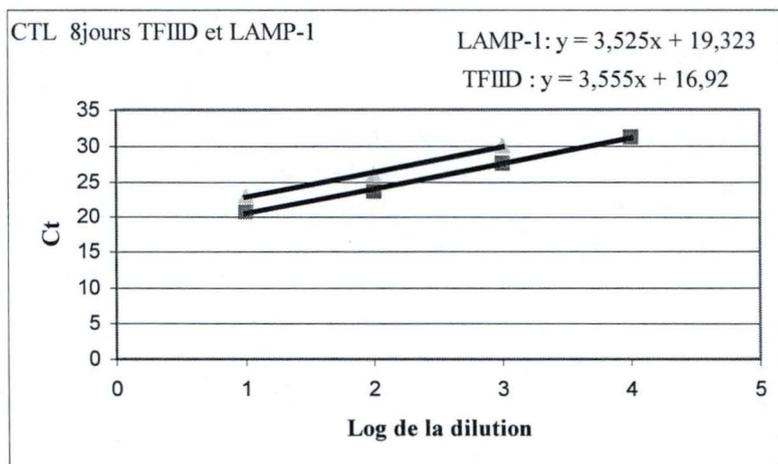


Figure II.10 : Représentation des droites de régression établies à partir des différentes valeurs de Ct obtenues en fonction des dilutions d'ADNc utilisées (exprimées en logarithme). Cet exemple illustre les droites obtenues pour TBP (TFIID) et pour LAMP-1 dans des cellules contrôles (CTL) maintenues 8 jours en culture en présence de DHG + 10 % SVF. Les coefficients de ces droites étant très proches, on peut affirmer que l'efficacité de la PCR est la même pour ces deux gènes, ce qui validera l'interprétation des résultats.

II.10.2.2 Recherche des couples de primers à partir de la séquence d'ARN messenger

Le choix des primers est effectué à l'aide du programme Primers express (Applied Biosystem) qui propose des couples de primers pouvant amplifier une séquence d'intérêt en respectant certaines contraintes. La longueur du fragment à amplifier doit se situer entre 50 et 150 paires de bases, celle des primers entre 15 et 30 bases et leur contenu en G/C doit être compris entre 20 et 70 % de la séquence nucléotidique. Pour minimiser l'hybridation entre primers et donc la formation de dimères de primers, ceux-ci sont choisis avec au maximum deux C et/ou G dans les cinq derniers nucléotides de l'extrémité 3'. Enfin, les T_m (température de « melting ») des primers doivent impérativement se situer entre 58 °C et 60 °C. Les séquences des primers que nous avons sélectionnés d'après ces critères sont :

➤ Pour LAMP-1:

LAMP-1 Forward: 5'-GCACTCAGATTTAAGCCTTACAAAGG-3'

LAMP-1 Reverse: 5'-CTCTGGAGTTCCTCTGTCTTAGGATTT-3'

➤ Pour LAMP-2:

LAMP-2 Forward: 5'-TCAGCATTGCAAATAACAATCTCA-3'

LAMP-2 Reverse: 5'-CAGTCTGCTCTTTGTTGCACATATAA-3'

➤ Pour Rab-7:

Rab-7 Forward: 5'-CCCTGTTTGGATTGCAGAGTGT-3'

Rab-7 Reverse: 5'-AAAGGCGTACATAATTCTTGTGTCTACT-3'

II.10.2.3 La transcription inverse ou RT

L'ARN total est incubé pendant 10 min à 70 °C avec 2 µl d'oligo-dT (12-18) (500 ng/µl) (Invitrogen, USA), puis est immédiatement déposé sur glace pendant 5 min. On ajoute ensuite 9 µl de tampon réactionnel par test (1 X Buffer RT ; DTT, 10 mM final ; RNAsin, 40 U; mix dNTP (Déoxynucléotide triphosphate), 10 mM final) et 1,5 µl d'enzyme « reverse transcriptase Superscript II » (In Vitrogen, USA) aux échantillons. Dans les NAC (Non Amplification Control), qui constituent des tests permettant de contrôler une éventuelle contamination de l'ARN total par de l'ADN génomique, nous n'ajoutons pas cette enzyme, mais 1,5 µl d'H₂O. Les différents mélanges sont incubés pendant 90 min à 42 °C puis pendant 15 min à 70 °C pour inhiber l'enzyme. On ajoute alors 2 U de RNase H (Invitrogen, USA) pendant 20 min à 37 °C pour dégrader l'ARN. Les produits de RT sont congelés à -20 °C.

II.10.2.4 Détermination des courbes de dilutions

Ces courbes permettent de vérifier l'efficacité des PCR pour les transcrits des gènes d'intérêt et les transcrits du «HKG». Les différentes dilutions en ADNc testées pour chaque gène permettent de déterminer une droite de régression correspondante. La pente de ces droites nous renseigne sur l'efficacité de la PCR. Quand cette pente est égale à -3,2, l'efficacité de la réaction équivaut à 100 % ($E = 10^{-1/\text{pente}} - 1$). De plus, pour pouvoir comparer le niveau de transcrits de différents gènes étudiés dans deux conditions expérimentales différentes, il est nécessaire que leur PCR ait la même efficacité. Un exemple de courbe de dilutions est montré à la figure II.10.

II.10.2.5 Quantification de l'expression des gènes LAMP-1, LAMP-2 et Rab-7

Une PCR par produit de RT est réalisée pour chaque gène dans les différentes conditions étudiées (contrôle et saccharose). Le SYBR Green PCR Master Mix et les primers R (reverse) et F (forward) sont ajoutés à 5 µl d'H₂O pour les NTC (No Template Control) ou 5 µl d'ADNc pour les tests dans un volume final de 25 µl. Le mélange est ensuite placé dans le thermocycleur et l'amplification est réalisée pendant 2 h 15. Le programme des cycles PCR est le suivant : 10 min à 95 °C, puis une amplification pendant 40 cycles : chaque cycle comprend une phase de dénaturation (14 s à 95 °C), et une phase d'élongation (1 min à 60 °C).

II.10.2.6 Analyse des résultats

Pendant les premiers cycles de la réaction, la fluorescence reste en-dessous du niveau de base (bruit de fond). Le cycle auquel la courbe de fluorescence croise le seuil de détection (défini comme étant l'intensité de fluorescence significativement plus élevée que le niveau de base) correspond au Ct. Ce dernier est inversement proportionnel à la quantité initiale d'ADN cible généré après rétrotranscription et donc à l'abondance de l'ARNm présent dans l'échantillon. C'est le programme qui détermine ce Ct.

On évalue ensuite le ΔCt ($\Delta Ct = Ct$ du gène d'intérêt - Ct de l'HKG) de chaque gène et pour chaque condition. On calcule alors pour chaque gène d'intérêt un $\Delta\Delta Ct$ ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ du gène d'intérêt dans la condition testée - ΔCt du gène d'intérêt dans la condition contrôle). On détermine enfin la quantité relative du taux de transcrits correspondant au gène étudié dans la condition expérimentale par la formule $Q_r = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Une quantité relative de 1 signifie que le gène cible ne montre aucune variation d'abondance de son transcrit dans la condition expérimentale testée.

II.11. Recherche « in silico » de sites de liaison potentiels pour des facteurs de transcription dans des promoteurs de gènes nucléaires codant pour des protéines lysosomales

II.11.1 Recherche du gène nucléaire codant pour une protéine lysosomale ou de la protéine codée par un gène nucléaire d'intérêt

La base de données GenBank (site du National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) peut être interrogée à partir d'un nom de protéine et fournir des renseignements sur le ou les gènes codant cette protéine. Nous avons limité nos recherches à *Homo sapiens* et obtenu un code d'accèsion pour les gènes codant les protéines d'intérêt : LAMP-1, LAMP-2, cathepsine D, Rab-7, α -mannosidase, β -glucosidase, α -fucosidase, β -hexosaminidase, neuraminidase, arylsulfatase A, phosphatase acide lysosomale, CLN3, CLCN5, Arl7 et NPC1.

II.11.2 Recherche de la séquence promotrice du gène d'intérêt via le numéro d'accèsion

La base de données DBTSS (*Database of Transcriptional Start Sites* sur le site <http://dbtss.hgc.jp/>) nous permet – entre autres – de trouver la séquence promoteur en 5' à partir d'un gène identifié par son code d'accèsion obtenu de GenBank. Dans le cadre de cette

recherche, nous avons recherché la séquence du promoteur des gènes énumérés au point II.11.1 sur 1000 pb en amont et 100 pb en aval du site d'initiation de la transcription. Ceci nous fournit une série de séquences de 1101 pb.

II.11.3 Recherche de sites consensus de liaison potentiels pour des facteurs de transcription au sein de la séquence promotrice

Le programme en ligne *TFSEARCH* (accessible sur le site <http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>) recherche des fragments de séquence hautement corrélés à partir de la base de données allemande *TRANSFAC Matrix Table (GBF-Braunschweig)* pour établir des profils de sites de liaisons de facteurs de transcription [Heinemeyer, Wingender, 1998]. Nous avons introduit les séquences promotrices de 1101 pb. Le résultat de la recherche est la séquence complète annotée pour des sites consensus potentiels indiquant les facteurs de transcription respectifs avec un seuil de certitude de 90 points [Akiyama].

II.11.4 Analyse des données obtenues à partir de la séquence promotrice annotée des sites de liaison potentiels pour des facteurs de transcription

Nous avons ensuite comptabilisé les séquences consensus des différents facteurs de transcription dans chaque séquence promotrice et avons établi la fréquence de ces sites potentiels pour les différents facteurs présents dans le promoteur de chaque gène d'intérêt. Ceci nous a permis d'établir un tableau. Le résultat de cette recherche sera présenté et discuté dans le chapitre consacré aux résultats au point III.2.2.

III. Résultats et discussion

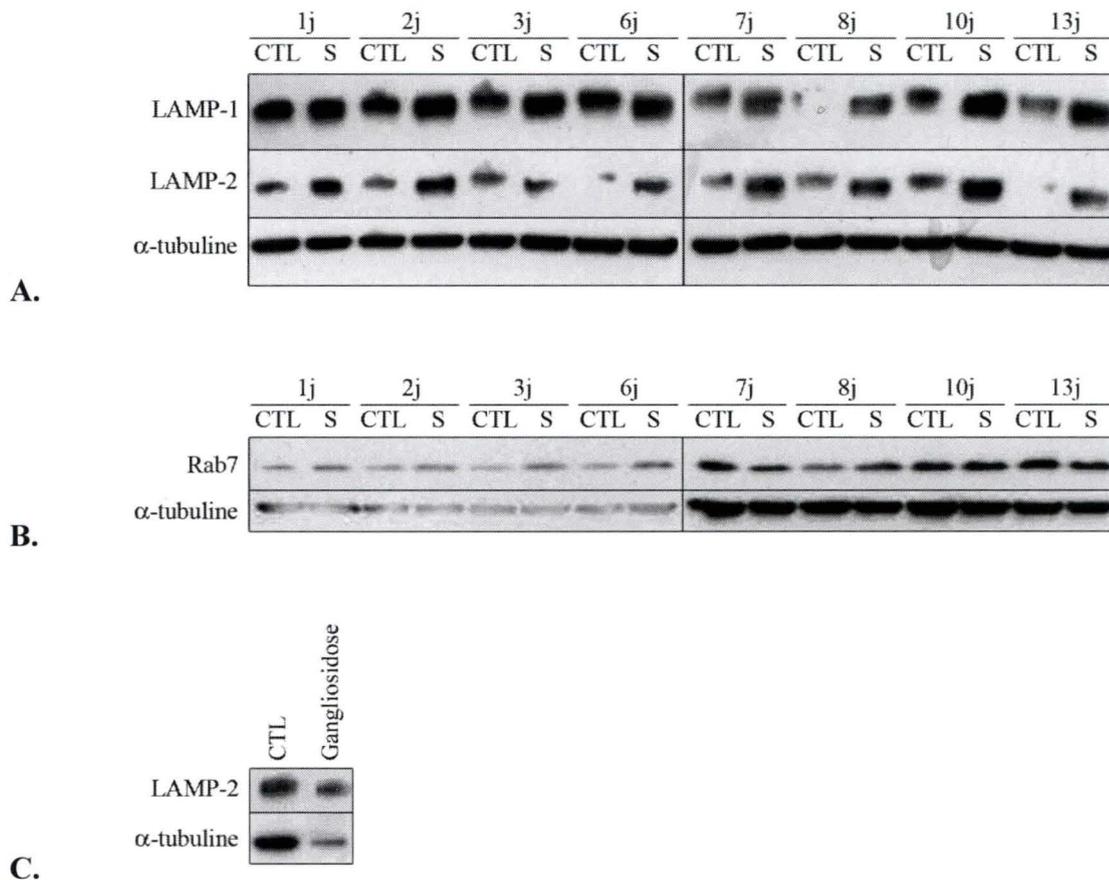


Figure III.1 : Analyse des abondances respectives des protéines LAMP-2 (A), LAMP-1 (A) et Rab-7 (B) en Western blotting sur des extraits préparés à partir de cellules 143B incubées pendant des temps allant de 1 à 13 j en présence ou non (CTL) de saccharose (S) à 100 mM. Abondance de la protéine LAMP-2 (C) dans des fibroblastes normaux (CTL) ou issus de patients atteints de gangliosidose. Au terme des incubations, les cellules sont lysées dans un tampon contenant 1 % de Triton-X100 et 25 µg de protéines sont chargés dans un gel NuPage 4-12 %. Les protéines LAMP-2 (A) et (C), LAMP-1 (A) et Rab-7 (B) sont détectées en présence d'anticorps primaires anti-LAMP-1, anti-LAMP-2 et d'anticorps primaires anti-Rab-7, puis révélées en présence d'anticorps secondaires couplés à la HRP. La révélation est réalisée en présence du substrat de la peroxydase (H₂O₂) et de luminol. Les photons libérés par la réaction impriment un film autoradiographique, qui est ensuite plongé dans un bain de révélateur puis dans un bain de fixateur. Un contrôle de charge est réalisé par l'immunodétection de l'α-tubuline sur la même membrane.

III. Résultats et discussion

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche des acteurs moléculaires potentiellement impliqués dans la réponse rétrograde lysosome-noyau induite par une surcharge lysosomale. Nous avons donc commencé par tenter d'induire une surcharge lysosomale dans des cellules 143B selon le modèle mis au point par Karageorgos *et al.* (1997) en incubant les cellules dans du milieu contenant du saccharose 100 mM. Notre but premier était d'analyser la réponse de ces cellules à la surcharge et l'impact de celle-ci sur le niveau d'expression de quelques protéines lysosomales ou de protéines connues pour avoir un lien direct avec le lysosome. Nous nous sommes posés la question de savoir à quel niveau s'opérerait la régulation de l'expression protéique en réponse à la surcharge.

La seconde partie du travail a dès lors consisté à rechercher les acteurs moléculaires, essentiellement des facteurs de transcription, dont l'état d'activité pourrait être modifié par la surcharge en saccharose. Pour atteindre cet objectif, nous avons sélectionné plusieurs facteurs de transcription candidats puis testé l'état d'activation ainsi que la localisation et l'abondance cellulaires de ceux-ci.

III.1. Caractérisation d'un modèle de surcharge lysosomale induite par du saccharose 100 mM dans des cellules 143B

Notre premier objectif était de mettre au point un modèle de surcharge lysosomale dans des cellules 143B. Le choix de cette lignée cellulaire est justifié par notre volonté de tester l'induction et les effets d'une surcharge lysosomale dans un type cellulaire humain différent de celui généralement rencontré dans la littérature, à savoir des fibroblastes de peau. La surcharge lysosomale est induite en incubant des cellules dans du milieu de culture contenant du saccharose 100 mM. Rappelons que le saccharose est efficacement pinocyté. Sa capture et son transport endocyttaire culminent à son accumulation lysosomale du fait de la résistance de ce disaccharide aux hydrolases lysosomales. Nous avons étudié l'abondance de différents marqueurs lysosomaux et de Rab-7 – une protéine impliquée dans le trafic intracellulaire – dans des cellules incubées en présence ou non (cellules contrôles) de saccharose 100 mM. L'étude de l'expression de ces différents marqueurs fut réalisée par des analyses en Western blotting sur les protéines lysosomales membranaires LAMP-1 et LAMP-2 et sur la protéine Rab-7.

III.1.1.1 Effet d'une surcharge lysosomale en saccharose sur l'expression de LAMP-1, LAMP-2 et Rab-7

Des lysats cellulaires clairs ont été préparés à partir de cellules 143B après 1, 2, 3, 6, 7, 8, 10 et 13 jours d'incubation en présence ou non de saccharose 100 mM et l'abondance de différentes protéines a été recherchée en Western blot. Les résultats de cette expérience sont présentés à la figure III.1. La figure III.1.A montre l'abondance de deux protéines membranaires lysosomales, LAMP-1 et LAMP-2, dans des cellules contrôles et des cellules incubées en présence de saccharose 100 mM pendant des temps allant de 1 à 13 jours. Un contrôle de la charge protéique a été réalisé par la détection de la protéine α -tubuline. On constate une légère augmentation de la protéine LAMP-1 dans les cellules incubées en présence de saccharose par rapport aux contrôles et ce déjà après 24 h d'incubation. La surexpression de la protéine LAMP-2 est plus marquée que celle de la protéine LAMP-1.

Remarquons également qu'il semble y avoir une diminution systématique de 2 à 3 kDa du poids moléculaire de ces deux protéines lysosomales dans les cellules incubées en présence de saccharose 100 mM. Cette observation sera discutée dans le chapitre suivant consacré aux conclusions et perspectives.

La surexpression des marqueurs lysosomaux pourrait être corrélée à une modification du trafic vésiculaire menant aux lysosomes dans le cadre d'une « biogenèse » lysosomale augmentée. Etant donné le rôle de Rab-7 dans la voie menant aux lysosomes, et sa localisation au niveau d'intermédiaires présumés de cette voie (Rab-7 est associée aux compartiments endocytaires tardifs, cf. point 1.2.2.3.) [Meresse, Gorvel, 1995], nous avons voulu tester l'effet de la surcharge en saccharose sur le niveau d'expression de Rab-7. Le résultat obtenu pour l'analyse de l'abondance de cette protéine en Western blotting est montré à la figure III.1.B. Bien que la qualité de ce Western blotting soit discutable, on peut cependant observer une légère augmentation du signal pour Rab-7 dans les cellules incubées en présence de saccharose par rapport aux contrôles aux jours 1 et 2. Une augmentation plus marquée est visible aux jours 3, 6 et 8. A première vue, nous ne constatons pas de surexpression de Rab-7 en condition saccharose aux jours 7, 10 et 13. Cependant, la charge protéique des contrôles est sensiblement plus importante aux jours 7 et 10, ce qui nous permet de ne pas exclure l'hypothèse que Rab-7 soit légèrement surexprimée à ces temps. Il s'agit là d'une première observation qui demanderait à être vérifiée.

Les résultats présentés à la figure III.1. A et B semblent indiquer une réponse des cellules à la surcharge de leurs lysosomes en saccharose. Nous avons voulu rechercher dans un modèle pathologique, celui de la gangliosidose, si la surcharge en gangliosides due à une déficience en β -galactosidase se traduit également par une élévation du niveau d'expression des protéines de membrane lysosomale comme LAMP-2. Nous avons donc préparé des lysats de fibroblastes normaux et de fibroblastes issus de patients atteints de gangliosidose avant de réaliser un Western blotting pour la protéine LAMP-2. A la figure III.1.C, nous pouvons constater que l'abondance de LAMP-2 ne semble pas augmentée dans les fibroblastes de patients atteints de gangliosidose. Ce résultat pose cependant un problème : en effet, la quantité de protéines LAMP-2 semble être inférieure dans les fibroblastes de patients par rapport aux fibroblastes contrôles, mais la tubuline utilisée comme contrôle de charge diminue, elle aussi, dans ces cellules et dans des proportions encore plus importantes. Nous pouvons donc nous demander si la tubuline constitue un contrôle de charge adéquat pour ces cellules surchargées en gangliosides. En effet, il est possible que la morphologie et le cytosquelette de fibroblastes de patients atteints de gangliosidose soient modifiés et que l'expression de la tubuline soit diminuée chez ces patients. Cependant, nous n'avons pas trouvé d'étude dans la littérature mentionnant une éventuelle modification de distribution ou d'abondance des protéines du cytosquelette comme la tubuline dans ces cellules. Nous ne pouvons donc pas exclure que la différence d'abondance de la tubuline ne soit pas le reflet d'une différence de charge. Si c'est le cas, alors LAMP-2 serait surexprimée. A ce stade, nous ne pouvons tirer aucune conclusion à partir de cette expérience.

Dans la suite de ce travail, nous avons voulu utiliser une approche morphologique pour tester l'effet de la surcharge en saccharose sur les protéines de membrane lysosomale. Nous avons donc réalisé des marquages en immunofluorescence suivis d'observations en microscopie confocale.

III.1.1.2 Mise en évidence de l'abondance de la protéine LAMP-2 par immunofluorescence en microscopie confocale

Les cellules 143B ont étéensemencées dans des plaques 24 puits sur des lames couvre-objets à une densité de 20000 cellules par puits, puis incubées pendant 6 h, 24 h ou 72 h en

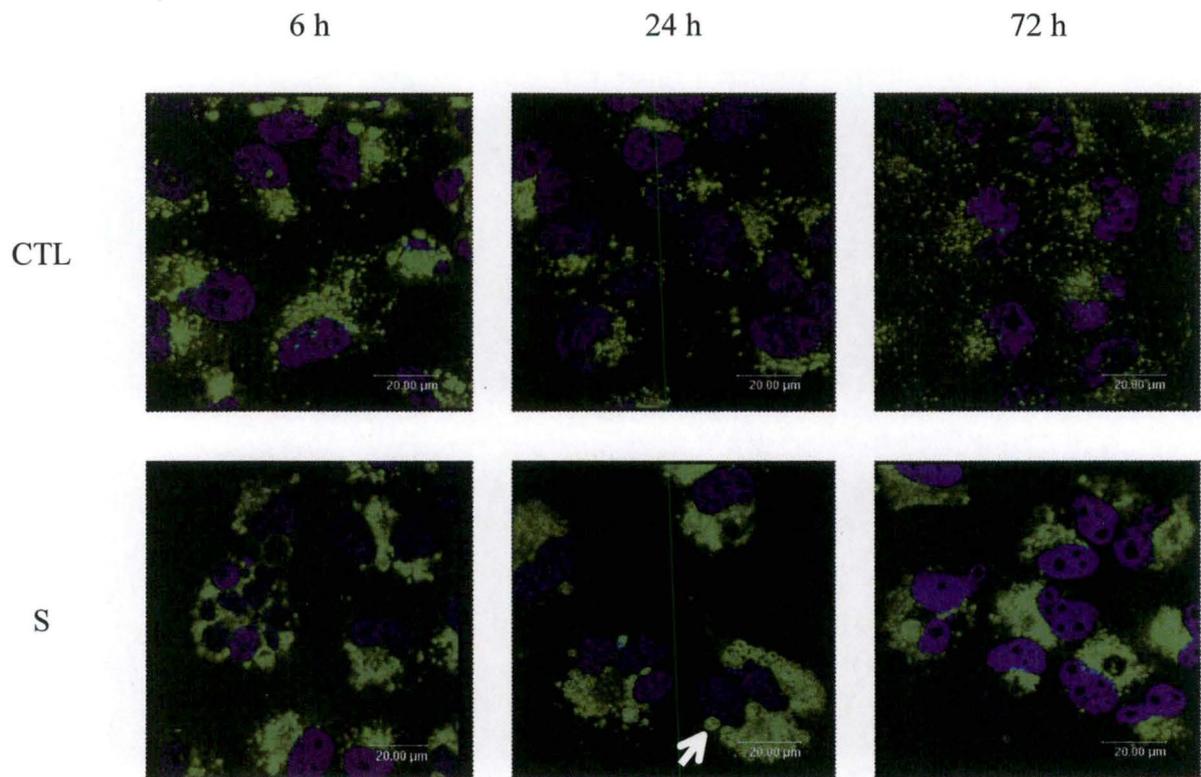


Figure III.2 : Marquages en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale de la protéine LAMP-2 dans des cellules 143B incubées en présence (S) ou non (CTL) de saccharose à 100 mM pendant 6 h, 24 h ou 72 h. Les marquages sont réalisés sur des cellules fixées et perméabilisées en présence d'un anticorps primaire dirigé contre LAMP-2 et d'un anticorps secondaire couplé à une sonde Alexa réémettant de la fluorescence à 519 nm. Un marquage au TOPRO-3 permet de visualiser le noyau des cellules. Les microphotographies sont prises séquentiellement sur deux canaux différents et sont ensuite superposées. Les flèches indiquent l'apparition de vacuoles dans les cellules incubées en présence de saccharose pendant 24 h.

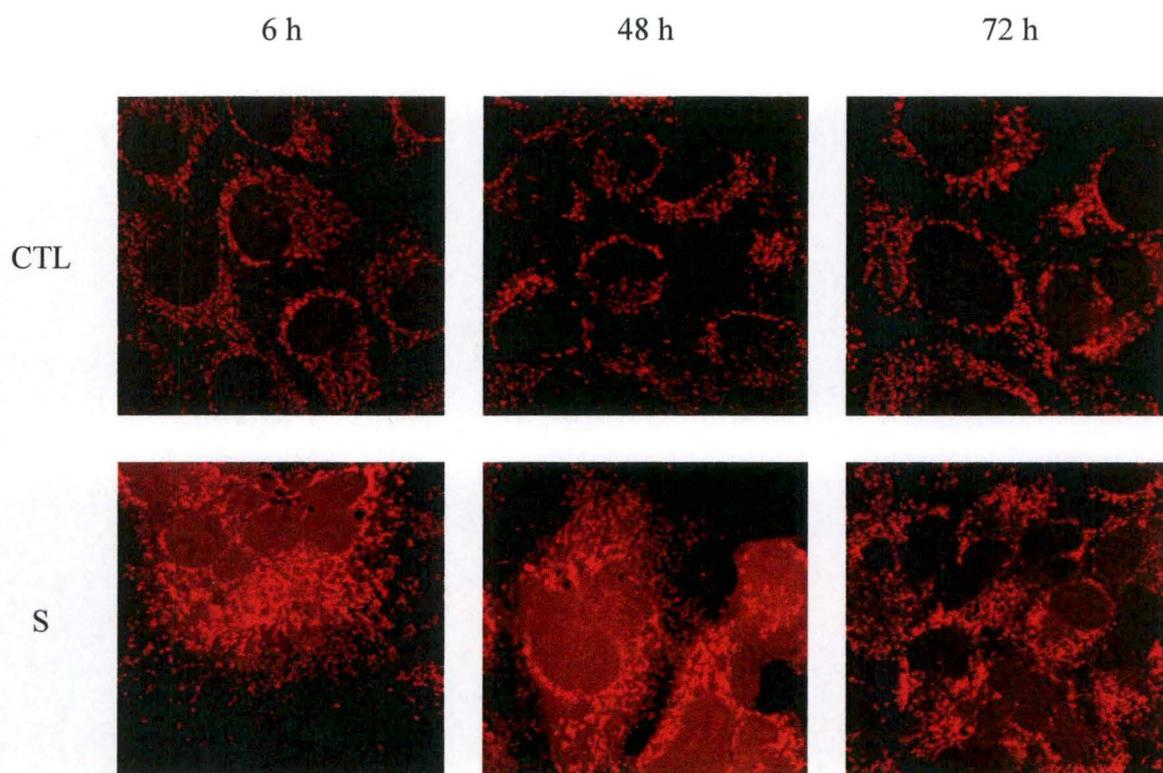


Figure III.3 : Visualisation de l'accumulation du LysoTracker Red dans les lysosomes de cellules 143B incubées en présence (S) ou non (CTL) de saccharose à 100 mM pendant 6 h, 48 h ou 72 h. Les cellules sont repiquées sur des couvre-objets à une densité de 20000 cellules par puits dans des boîtes de 24 puits. Le jour du marquage, elles sont incubées pendant 20 min à 37 °C dans 500 µl de milieu de culture sans sérum contenant la sonde à une concentration de 200 nM. La sonde est couplée à un fluorophore qui réémet de la fluorescence à 599 nm. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois avec 1 ml de milieu sans sérum avant d'être fixées pendant 10 min avec 1 ml de PBS-glutaraldéhyde 4 %. La lame est alors montée au Mowiol avant l'observation des cellules au microscope confocal.

présence ou non de saccharose 100 mM. Le jour du marquage, les cellules ont été fixées à la PFA (paraformaldéhyde), puis perméabilisées au Triton-X100, avant d'être marquées avec un anticorps primaire dirigé contre la protéine LAMP-2. Les anticorps secondaires sont couplés à une sonde Alexa réémettant de la fluorescence à 519 nm. Le noyau des cellules est visualisé grâce à un contre-marquage au TOPRO-3. Le montage sur des lames couvre-objets a été réalisé avant l'observation en microscopie confocale. Les autres marquages en immunofluorescence réalisés dans ce travail ont été effectués selon un protocole similaire.

Les résultats de ces marquages sont présentés à la figure III.2. L'augmentation d'abondance de la protéine LAMP-2 dans des cellules incubées en présence de saccharose 100 mM par rapport aux cellules contrôles est relativement importante pour des temps de 24 h et 72 h d'incubation en présence de saccharose. De plus, et surtout après 24 h d'incubation en présence de saccharose, on observe l'apparition de vacuoles, qui pourraient correspondre aux « sucrosomes » (lysosomes remplis de saccharose) [Karageorgos, Isaac, 1997].

Ces résultats semblent confirmer ceux du Western blotting réalisé sur LAMP-2, à savoir qu'il y a bien une augmentation du niveau de l'abondance de cette protéine dans des cellules incubées en présence de saccharose 100 mM.

III.1.1.3 Effet d'une surcharge en saccharose sur l'abondance de la population lysosomale

Nous avons souhaité visualiser et estimer l'abondance globale de la population lysosomale dans des cellules contrôles et des cellules incubées en présence de saccharose. Pour cela, nous avons réalisé un marquage à l'aide d'une sonde lysosomale – le Lyso Tracker – suivi d'une observation en microscopie confocale.

Cette sonde est constituée d'un fluorophore couplé à une base faible lysomotrope (une amine) qui, à pH neutre, n'est que partiellement protonée. Elle diffuse librement à travers les membranes cellulaires et s'accumule préférentiellement dans les compartiments acides du fait de sa protonation et donc de son incapacité à diffuser hors des lysosomes. Le fluorophore couplé à cette sonde réémet de la fluorescence à 599 nm.

Les observations de ces marquages sont présentés à la figure III.3. On peut constater que le marquage semble plus intense dans les cellules incubées en présence de saccharose 100 mM, surtout pour les temps 6 h et 48 h, ce qui signifierait que l'abondance des lysosomes dans ces cellules est plus importante que dans les cellules contrôles. Si les observations à 6 h et 48 h traduisent une hypertrophie du compartiment lysosomal, il peut paraître surprenant que l'effet soit moindre à 72 h. Notons toutefois que certains auteurs ont proposé une alcalinisation du lysosome suite à la surcharge en saccharose [Montgomery, Webster, 1991]. Si tel est le cas, cet effet pourrait, et de façon plus marquée aux temps longs, interférer avec l'accumulation lysomotrope de la sonde fluorescente.

Les conclusions de ces expériences de Western blotting et de marquages sont que les cellules 143B incubées en présence de saccharose 100 mM semblent répondre à la surcharge lysosomale par une surexpression des marqueurs lysosomaux LAMP-1, LAMP-2 et une augmentation apparente de la population lysosomale globale.

III.1.1.4 Etude de l'abondance de la protéine LAMP-2 dans des cellules 143B contrôles, incubées en présence de saccharose ou de maltose 100 mM

La présence de saccharose 100 mM dans le milieu de culture induit un stress hyperosmotique pour la cellule. Nous avons donc souhaité tester l'implication éventuelle de ce stress sur l'expression de marqueurs lysosomaux comme LAMP-2. Nous savons que le

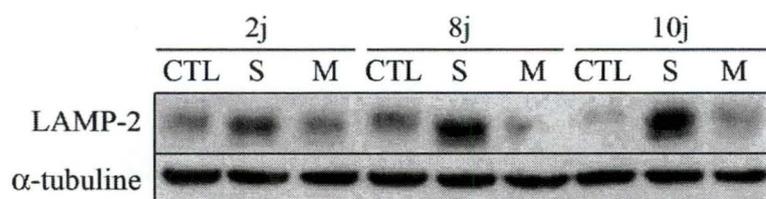


Figure III.4 : Analyse de l'abondance de la protéine LAMP-2 en Western blotting sur des extraits préparés à partir de cellules 143B incubées pendant 2, 8 ou 10 j en présence ou non (CTL) de saccharose (S) ou de maltose (M) à 100 mM. Au terme des incubations, les cellules sont lysées dans un tampon contenant 1 % de Triton-X100 et 25 μ g de protéines sont chargés dans un gel NuPage 4-12 %. La protéine LAMP-2 est détectée en présence d'anticorps primaires anti-LAMP-2 et révélée en présence d'anticorps secondaires couplés à la HRP. La révélation est réalisée en présence du substrat de la peroxydase (H_2O_2) et de luminol. Les photons libérés par la réaction impriment un film autoradiographique, qui est ensuite plongé dans un bain de révélateur puis dans un bain de fixateur. Un contrôle de charge est réalisé par l'immunodétection de l' α -tubuline sur la même membrane.

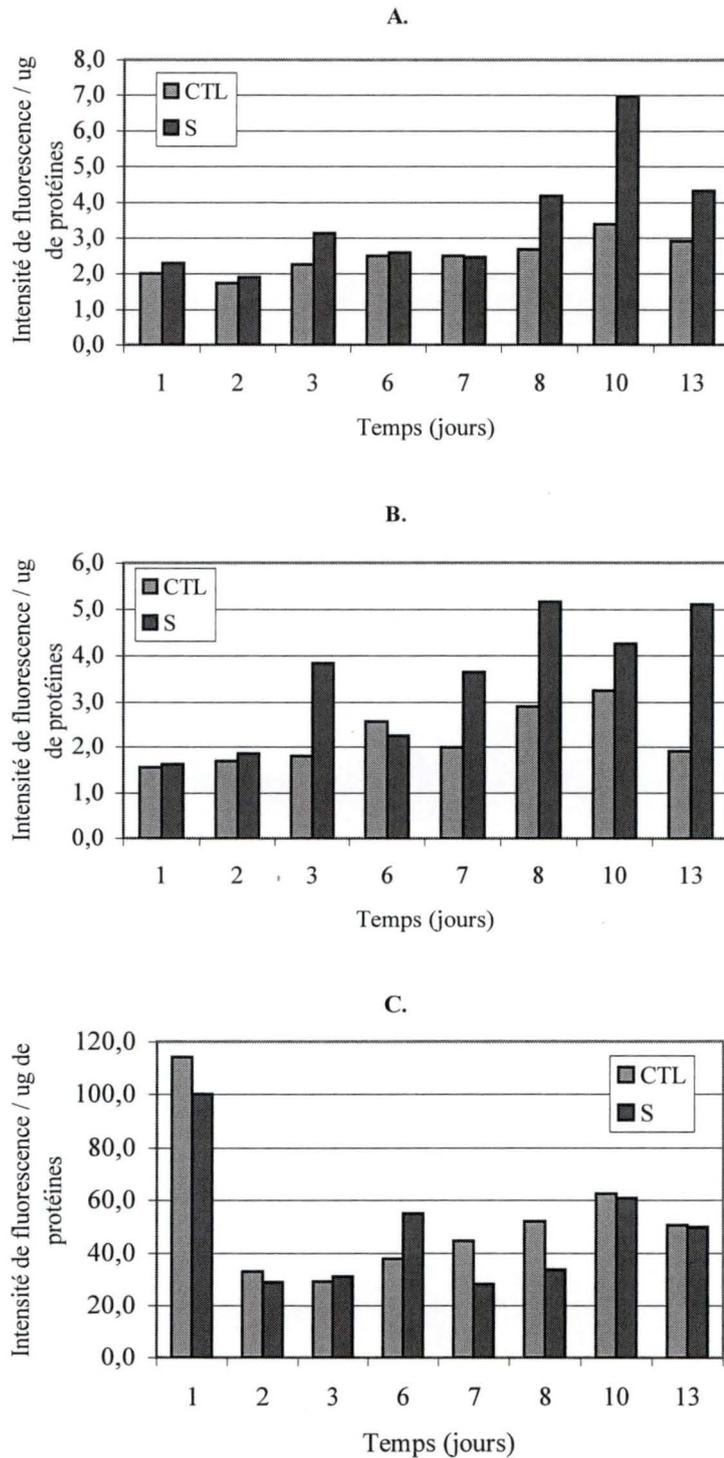


Figure III.5 : Dosage des activités enzymatiques α -mannosidase (A), β -glucosidase (B) et β -galactosidase (C) dans des cellules 143B incubées pendant des temps allant de 1 à 13 jours en présence ou non (CTL) de saccharose (S) à 100 mM. Au terme des incubations, les cellules sont lysées dans un tampon contenant du Triton X-100 1 % ainsi que des inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Un échantillon de 20 μ l du lysat cellulaire est mis en présence du substrat de l'enzyme couplé au 4-méthylumbelliferyl (α -mannopyranoside (A), β -glucopyranoside (B) et β -galactopyranoside (C)). Les tests sont réalisés en simples. Les résultats exprimés comme les valeurs d'intensité de fluorescence associées au 4-méthylumbelliférol libre dans l'échantillon sont mesurés au spectrofluorimètre (Ex : 365 nm ; Em : 450 nm) et sont rapportés à la quantité de protéines.

saccharose s'accumule au niveau des lysosomes qui ne peuvent le dégrader en raison de l'absence d'invertase dans ces organites, ce qui est responsable de la surcharge lysosomale. Mais nous ne pouvons pas exclure que la présence d'une forte concentration de ce disaccharide dans le milieu n'engendre pas, en plus, un stress de nature osmotique responsable (totalement ou en partie) des réponses cellulaires observées. Il serait donc intéressant de comparer la réponse de cellules incubées en présence ou non de saccharose, additionné ou non d'invertase, selon le modèle communément utilisé dans la littérature. L'invertase est internalisée et ciblée vers les lysosomes par endocytose médiée par récepteur, où elle va dégrader le saccharose, corrigeant ainsi la surcharge lysosomale [Jahraus, Storrie, 1994].

Nous avons eu recours à une autre approche pour tester la spécificité de la réponse à la surcharge lysosomale. Nous avons pensé que l'implication éventuelle du stress hyperosmotique pourrait être testée en incubant des cellules, non plus en présence de saccharose, mais en présence d'un autre disaccharide, le maltose, à la même concentration de 100 mM. En effet, le maltose capturé par les cellules est également acheminé aux lysosomes, mais il ne doit guère s'y accumuler car les lysosomes renferment la maltase acide, qui hydrolyse les molécules de maltose en deux molécules de glucose. On peut donc s'attendre à ce que le maltose, contrairement au saccharose, n'entraîne pas de surcharge lysosomale ou entraîne une surcharge modérée si le transport des glucoses hors du lysosome constitue une étape limitante dans le catabolisme du maltose.

Nous avons réalisé un Western blotting pour visualiser l'abondance du marqueur lysosomal LAMP-2 sur des lysats préparés à partir de cellules 143B préalablement incubées en présence de maltose 100 mM.

Les cellules 143B ont été incubées en présence ou non (contrôles) de saccharose ou de maltose 100 mM. Après 2 jours, 8 jours ou 10 jours d'incubation, des lysats cellulaires ont été préparés à partir de ces cellules et l'abondance de la protéine LAMP-2 a été recherchée par une analyse en Western blotting (figure III.4). Ce résultat démontre que l'incubation des cellules en présence de maltose 100 mM n'induit pas la surexpression de la protéine LAMP-2 que nous observons dans des cellules incubées en présence de saccharose 100 mM.

Ces observations suggèrent que l'augmentation d'expression de LAMP-2 observée suite à l'incubation des cellules en présence de saccharose 100 mM ne résulte pas de l'hyperosmolarité du milieu et constitue donc une réponse spécifique à la surcharge lysosomale en saccharose.

III.1.1.5 Mesures d'activités d'enzymes lysosomales

Nous avons ensuite étudié l'effet de la surcharge lysosomale sur l'activité de certaines enzymes lysosomales. Nous avons dosé l'activité enzymatique de deux hydrolases lysosomales solubles et d'une enzyme lysosomale associée aux membranes.

Le principe de ces dosages repose sur l'hydrolyse d'un substrat de l'enzyme d'intérêt couplé à une molécule fluorescente (fluorochrome) qui ne fluoresce pas lorsqu'elle est couplée au substrat. Le clivage du substrat par l'enzyme permet la libération et un changement de conformation du fluorochrome qui rend celui-ci fluorescent après excitation [Beljaars, Fabry, 1972]. On mesure alors, au spectrofluorimètre, l'intensité de fluorescence qui est normalisée par rapport à la quantité de protéines.

Les résultats obtenus lors d'un premier dosage enzymatique sont présentés à la figure I.5. Ces résultats semblent indiquer une très légère augmentation de l'activité de l' α -mannosidase dans les cellules incubées en présence de saccharose 100 mM. Ce résultat confirme ceux obtenus auparavant par Kato *et al.* (1984) et par Karageorgos *et al.* (1997). L'activité de la β -

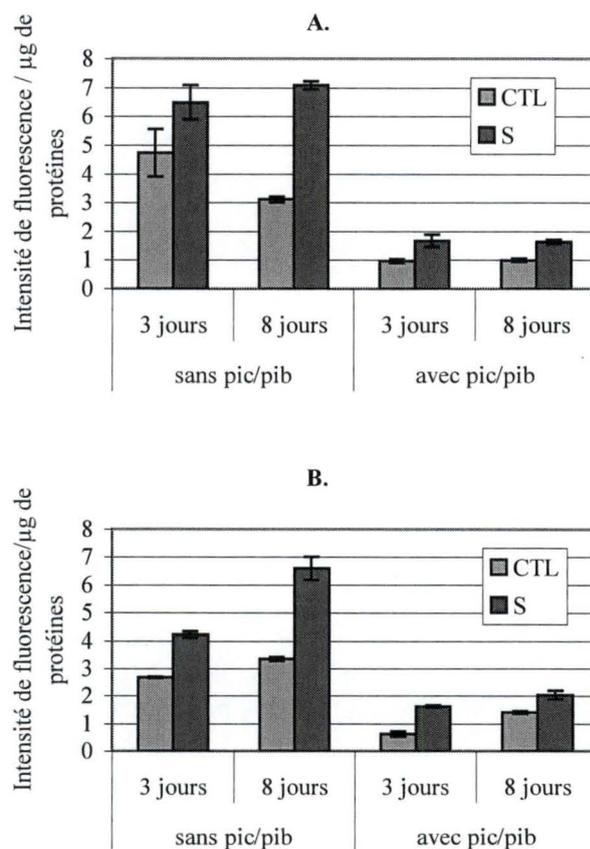


Figure III.6 : Dosage des activités enzymatique α -mannosidase (A) et β -glucosidase (B) dans des cellules 143B incubées pendant 3 ou 8 j en présence ou non (CTL) de saccharose (S) à 100 mM. Au terme des incubations, les cellules sont lysées dans un tampon contenant du Triton X-100 à 1 % et contenant (avec pic/pib) ou non (sans pic/pib) des inhibiteurs de protéases (pic) et de phosphatases (pib). Un échantillon de 20 μ l du lysat cellulaire est mis en présence du substrat de l'enzyme couplé au 4-méthylumbelliferyl (α -mannopyranoside (A) et β -glucopyranoside (B)). Les résultats exprimés comme les valeurs d'intensité de fluorescence associées au 4-méthylumbelliférone libre dans l'échantillon sont mesurés au spectrofluorimètre (Ex : 365 nm ; Em : 450 nm) et sont rapportés à la quantité de protéines. Les résultats représentent la moyenne \pm un écart-type pour n = 3.

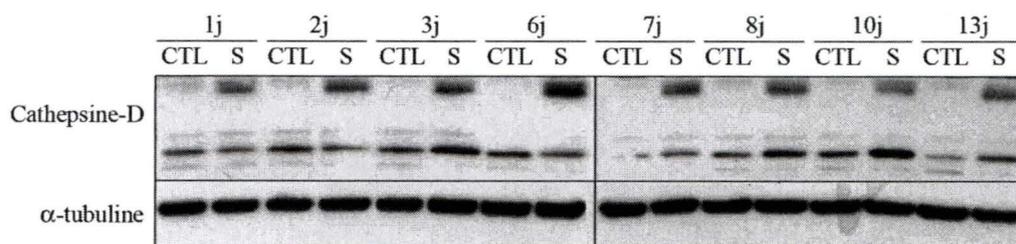


Figure III.7 : Analyse de l'abondance de la protéine cathepsine D en Western blotting sur des extraits préparés à partir de cellules 143B incubées pendant des temps allant de 1 à 13 j en présence ou non (CTL) de saccharose (S) à 100 mM. Au terme des incubations, les cellules sont lysées dans un tampon contenant 1 % de Triton-X100 et 25 μ g de protéines sont chargés dans un gel NuPage 4-12 %. La protéine cathepsine D est détectée en présence d'anticorps primaires anti-cathepsine D et révélée en présence d'anticorps secondaires couplés à la HRP. La révélation est réalisée en présence du substrat de la peroxydase (H_2O_2) et de luminol. Les photons libérés par la réaction impriment un film autoradiographique, qui est ensuite plongé dans un bain de révélateur puis dans un bain de fixateur. Un contrôle de charge est réalisé par l'immunodétection de l' α -tubuline sur la même membrane.

glucosidase semble, elle aussi, être plus importante dans les cellules incubées en présence de saccharose. On n'observe aucune augmentation d'activité de la β -galactosidase dans les cellules incubées en présence de saccharose 100 mM par rapport aux cellules contrôles. Il faut cependant signaler que les résultats de ce premier dosage sont peu fiables. En effet, les conditions expérimentales n'étaient pas optimales et ce, pour deux raisons. Tout d'abord, les lysats cellulaires ont été réalisés en présence de cocktails d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Ces inhibiteurs sont susceptibles d'interférer avec les activités enzymatiques mesurées. Ensuite, les dosages ont été réalisés en simple, ce qui explique l'absence d'écart-types. Pour ces raisons, et comme nous pensions déceler un effet possible du saccharose sur l'augmentation de l'activité des enzymes α -mannosidase et β -glucosidase, nous avons effectué un second dosage pour ces enzymes, pour des temps auxquels l'augmentation d'activité semblait la plus marquée, à savoir après 3 jours et 8 jours d'incubation. Les cellules ont donc été incubées pendant 3 et 8 jours en présence ou non de saccharose 100 mM, puis lysées en absence et en présence d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Les dosages d'activité ont ensuite été réalisés en triple sur des échantillons de ces lysats. Le résultat de ces dosages est présenté à la figure III.6. On constate qu'il y a bien une augmentation de l'activité de ces enzymes dans les cellules incubées en présence de saccharose 100 mM par rapport aux cellules contrôles, et ce après 3 jours et 8 jours d'incubation. On peut également constater que les inhibiteurs de protéases et de phosphatases inhibent fortement l'activité de l' α -mannosidase et de la β -glucosidase.

III.1.1.6 Réponse de la cathepsine D

Pour terminer la caractérisation de notre modèle d'étude, nous nous sommes intéressés au niveau d'expression d'une autre enzyme lysosomale, la cathepsine D. Pour l'étude de la cathepsine D, nous avons choisi la technique du Western blotting. En effet, le précurseur biosynthétique de la cathepsine D étant dépourvu d'activité enzymatique, il nous a semblé opportun d'estimer le niveau d'expression de cette enzyme par une méthode immunologique permettant de révéler tant son précurseur inactif que le produit actif de sa maturation protéolytique.

Dans cette expérience, des cellules 143B ont été incubées en présence ou non (contrôles) de milieu contenant du saccharose à 100 mM. Des lysats cellulaires ont été préparés sur ces cellules après 1, 2, 3, 6, 7, 8, 10 et 13 jours d'incubation et l'abondance de la cathepsine D a été mesurée en Western blotting. Un contrôle de la charge protéique a ensuite été réalisé par la détection de la protéine α -tubuline dans les différentes pistes (figure III.7). Les résultats montrent que la forme mature (de 31 kDa) de la cathepsine D se retrouve aussi bien dans les cellules contrôles que dans les cellules incubées en présence de saccharose 100 mM. L'autre résultat à observer est l'apparition, dès le jour 1 et uniquement dans les cellules incubées en présence de saccharose, de la forme précurseur de 52 kDa. De plus, à partir du jour 6, cette forme précurseur est déjà à elle seule plus abondante que l'unique forme mature rencontrée dans les cellules contrôles. L'addition des deux formes rencontrées dans les cellules incubées en présence de saccharose donne donc une abondance totale de la protéine cathepsine D bien plus importante dans les cellules incubées en présence de saccharose que dans les cellules contrôles.

III.1.1.7 Conclusions

L'ensemble de ces expériences indique que l'incubation des cellules 143B en présence de saccharose 100 mM entraîne une augmentation d'abondance des protéines lysosomales membranaires LAMP-1 et LAMP-2, de la cathepsine D et une augmentation de l'activité de deux hydrolases lysosomales, l' α -mannosidase et la β -glucosidase. Le contrôle, réalisé en

remplaçant le saccharose par une concentration identique en maltose, indique que l'induction d'un stress hyperosmotique pour les cellules incubées en présence de saccharose à 100 mM n'est pas la cause principale de la surexpression de LAMP-2. Nous pouvons donc conclure que les changements observés sont induits spécifiquement par l'accumulation de saccharose dans les lysosomes des cellules.

III.2. Etude de l'état d'activation de différents facteurs de transcription potentiellement impliqués dans la réponse rétrograde lysosome-noyau en réponse à la surcharge lysosomale

Dans la seconde partie de notre travail, nous avons souhaité rechercher les mécanismes et les acteurs moléculaires impliqués dans l'apparition de cette réponse à la surcharge lysosomale. En effet, on ignore encore comment le noyau perçoit le dysfonctionnement lysosomal le conduisant à modifier l'expression de gènes codant pour des protéines lysosomales ou des protéines impliquées dans le trafic intracellulaire.

Nous avons d'abord privilégié l'hypothèse d'une régulation au niveau transcriptionnel. En effet, les travaux de Karageorgos *et al.* (1997), sur lesquels nous nous sommes basés pour l'élaboration de notre modèle d'étude, ont montré une augmentation dans l'abondance des transcrits, tant pour la protéine LAMP-1 que pour la protéine LAMP-2 dans des fibroblastes atteints d'une surcharge lysosomale induite par le saccharose. Ils ont également montré que l'augmentation de l'abondance des transcrits des gènes codant ces protéines n'était pas corrélée à une augmentation de la stabilité des ARNm dans les fibroblastes de peau humains [Karageorgos, Isaac, 1997].

Avant d'entamer une étude approfondie de certains facteurs de transcription susceptibles d'être impliqués dans la régulation de gènes codant pour des protéines lysosomales, nous avons voulu rechercher l'abondance des transcrits de gènes codant certaines des protéines surexprimées dans nos conditions expérimentales (LAMP-1, LAMP-2 et Rab-7). Pour cette approche, nous avons choisi la technique de « real-time PCR ».

III.2.1 Quantification des taux de transcrits de LAMP-1, LAMP-2 et Rab-7 par la technique de « real-time PCR »

Cette technique nous a permis de comparer la quantité des transcrits de LAMP-1, LAMP-2 et Rab-7 dans des cellules 143B incubées en présence de saccharose 100 mM par rapport aux cellules contrôles. Rappelons que ces trois protéines sont surexprimées (au niveau protéique) dans les cellules incubées en présence de saccharose. Signalons cependant que si cette technique permet de mettre en évidence une augmentation globale de l'ARNm d'un gène, elle ne permet toutefois pas de prouver que cette augmentation est due à une transcription augmentée. En effet, une augmentation de l'abondance d'un ARNm peut aussi être due à une augmentation de sa stabilité. De plus, l'abondance d'un transcrit ne reste qu'indicative. En effet, le niveau d'expression transcriptionnelle d'un gène ne reflète pas toujours l'abondance de la protéine.

Des cellules 143B ont été incubées en présence ou non de saccharose 100 mM. L'ARN total de ces cellules a été extrait après 1 ou 8 jours d'incubation. Après l'étape de rétrotranscription permettant de générer de l'ADNc à partir des ARNm, l'amplification des ADNc d'intérêt a été réalisée par la réaction de PCR grâce à des primers spécifiques des gènes d'intérêt. Les résultats sont normalisés par rapport à un gène dont l'expression n'est pas

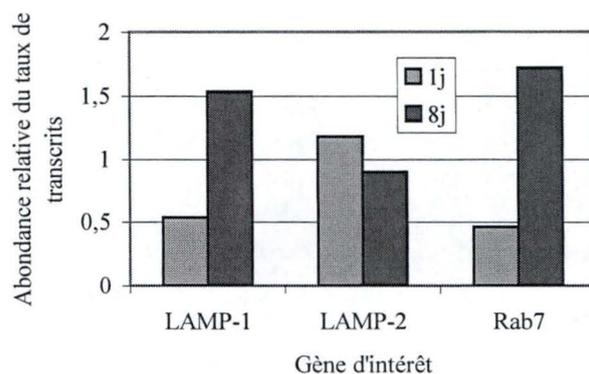


Figure III.8 : Quantification par la technique de « real time PCR » de l'abondance relative des taux de transcrits des gènes codant pour les protéines LAMP-1, LAMP-2 et Rab-7 dans des cellules 143B. Les ARN totaux sont extraits à partir des cellules incubées pendant 1 jour (j) ou 8 jours en présence ou non de saccharose 100 mM. Un volume de 5 μ l d'ADNc obtenu par transcription inverse est placé dans un thermocycleur pour l'étape d'amplification par PCR réalisée en présence de SYBR Green et d'une quantité optimale en primers sens et anti-sens. Après comparaison des efficacités de PCR par rapport au gène de maintenance TFIIID, les résultats sont calculés à partir des Ct par la formule $Q_r = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ et sont exprimés en abondance relative du taux de transcrits par rapport au contrôle.

modifiée dans la condition expérimentale testée (House Keeping Gene). Nous avons utilisé TBP (TATA box Binding Protein).

Les résultats présentés à la figure III.8 montrent qu'après 24 h d'incubation, les abondances de transcrits de LAMP-1, LAMP-2 et Rab-7 dans les cellules incubées en présence de saccharose 100 mM valent 53 %, 118 % et 46 % des quantités correspondantes dans les cellules contrôles. Après 8 jours d'incubation, ces valeurs passent à 153 %, 90 % et 172 %.

Signalons cependant qu'il s'agit de résultats d'une seule expérience, réalisée à partir d'une seule extraction d'ARN. Pour confirmer et préciser ces résultats, il faudrait certainement répéter cette expérience sur des triples biologiques tant pour les cellules contrôles que pour les cellules incubées en présence de saccharose, mais aussi pour des cellules incubées en présence de maltose. Nous pourrions également faire des temps d'incubation correspondant à la cinétique établie pour les conditions analysées en Western blotting. Cependant, au vu de ces résultats préliminaires, il semble n'y avoir une augmentation de l'abondance des transcrits en présence de saccharose que pour les gènes codant les protéines LAMP-1 et Rab-7. La diminution des transcrits pour LAMP-1 et Rab-7 après 24 h, si elle se confirme, est difficilement explicable, étant donnée l'augmentation protéique observée en Western blotting après un même temps d'incubation. Cette diminution est peut-être imputable à un stress subi par la cellule lors du changement de milieu. On pourrait aussi envisager que pour ces protéines, la régulation transcriptionnelle ne se mette pas en place immédiatement, et que pour des temps très courts, ce soit une régulation traductionnelle ou post-traductionnelle qui explique l'augmentation d'abondance de la protéine dans les cellules incubées en présence de saccharose. Cependant, après 8 jours, il y a bien une augmentation de l'abondance des transcrits des gènes codant pour LAMP-1 et Rab-7. Pour LAMP-1, ce résultat est en accord avec les observations de Karageorgos *et al.* (1997).

Pour LAMP-2, la très légère augmentation (118 % du contrôle) observée après 24 h ne se confirme pas après 8 jours, où l'on n'observe plus que 90 % de l'abondance du transcrit par rapport au contrôle. Il est clair que cette expérience dont le résultat contredit les observations de Karageorgos *et al.* devrait être répétée. Cependant si ce résultat se confirme, il pourrait suggérer que la régulation de LAMP-2 s'effectue à un autre niveau que transcriptionnel. Il est envisageable que l'expression de LAMP-2 soit régulée au niveau traductionnel ou post-traductionnel conduisant à une augmentation de la synthèse protéique pour LAMP-2 ou une stabilisation de la protéine allongeant son temps de demi-vie. Les résultats de l'étude menée par Andrejewski *et al.* sur des souris déficientes (KO) pour le gène de la protéine LAMP-1 sont intéressants à cet égard. Ces auteurs ont montré que dans la majorité des tissus de souris dépourvues de protéine LAMP-1, on observait une surexpression compensatoire de la protéine LAMP-2. Ces auteurs ont également montré que cette surexpression de LAMP-2 n'était corrélée ni à une augmentation du taux de transcription de LAMP-2, ni à une augmentation de la stabilité de ses transcrits. En effet, ces deux mécanismes se traduiraient par une augmentation d'ARNm observable en Northern Blot. Ces auteurs suggèrent donc que l'augmentation compensatoire de la protéine LAMP-2 en réponse à une déficience en protéine LAMP-1 serait due à une régulation au niveau traductionnel [Andrejewski, Punnonen, 1999].

Ces résultats de real-time PCR laissent donc un doute quant au mode de régulation de la protéine LAMP-2. Ils indiquent par contre que dans le cas de LAMP-1 et de Rab-7, la surexpression de ces protéines observée dans les cellules incubées en présence de saccharose passe, au moins partiellement, par une régulation transcriptionnelle. La suite du travail a donc consisté à rechercher l'état d'activation d'un certain nombre de facteurs de transcription dans ces cellules atteintes d'une surcharge lysosomale induite par le saccharose.

Protéine d'intérêt	Gène	
	Symbole	RefSeq ID
LAMP-1	LAMP1	NM_005561
LAMP-2	LAMP2	NM_002294
Procathepsine-D	CTSD	NM_001909
Rab7, member RAS oncogene family	RAB7	NM_004637
α -mannosidase classe 1A, membre 1	MAN1A1	NM_005907
classe 1A, membre 2	MAN1A2	NM_006699
classe 1B, membre 1	MAN1B1	NM_016219
		NM_007230
classe 1C, membre 1	MAN1C1	NM_020379
classe 2A, membre 1	MAN2A1	NM_002372
classe 2A, membre 2	MAN2A2	NM_006122
classe 2B, membre 1	MAN2B1	NM_000528
classe 2C, membre 1	MAN2C1	NM_006715
β -glucosidase	GBA	NM_000157
Phosphatase acide lysosomale 2 (forme précurseur)	ACP2	NM_001610
ADP-ribosylation factor-like 7	Arl7	NM_005737
Arylsulfatase A (forme précurseur)	ARSA	NM_000487
Canal chlorure 5	CLCN5	NM_000084
Protéine de la maladie de Batten	CLN3	NM_000086
α -L-fucosidase 1 tissulaire	fucA1	NM_000147
Protéine NPC1 (Maladie de Niemann-Pick, type C1)	NPC1	NM_000271
Prohexosaminidase B	HEXB	NM_000521
Neuraminidase (forme précurseur)	NEU1	NM_000434

Figure III.9 : Résultat de la recherche effectuée dans la base de données GenBank (site du National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Celle-ci peut être interrogée à partir d'un nom de protéine et fournit des renseignements sur le ou les gènes codant cette protéine, à savoir le symbole et le numéro d'accèsion ID du gène d'intérêt. Nous avons limité nos recherches à *Homo sapiens*.

	Gènes d'intérêt															Total
	ACP2	Arl7	ARSA	CLCN5	CLN3	CTSD	fucA1	GBA	HEXB	LAMP-1	LAMP-2	MANxxx	NEU1	NPCI	Rab7	
AhR/Ar	1															1
AML-1a		1	15	3	1				1	2	4	5	3			35
AP-1								2				3	12			17
Arnt					1					4						5
Brn-2									1			1				2
C/EBP	1						1					1			1	4
C/EBPa													3			3
C/EBPb												1	3			4
CDPCR											2					2
CdxA	3			1			4	1	4	1	16	20	6	3	7	66
c-Ets-	4		1		1		1			1		1		1		10
CHOP-C														1		1
c-Myc/					1							1	3			5
COUP-T			2									1				3
CREB	1					3										4
CRE-BP						1										1
c-Rel	1	2					1					3		2		9
deltaE	2		6							4		3	3	1		19
E2F		1					2	2				2				7
E47							1									1
E4BP4													3			3
Egr-1				1												1
Egr-2				1								1				2
Egr-3												1				1
Elk-1	2													1	2	5
GATA-1	2	3	2	3	1		3	5	1	4	9	18	9	2	2	64
GATA-2	2			2			1	2		1		8		1	2	19
GATA-3			2					3				3		1	1	10
GATA-X				1	1						3	1		1	1	8
HFH-1							2	1								3
HFH-2							2	1					9			12
HLF													3			3

Figure III.10 : Tableau reprenant les gènes d'intérêt et les facteurs de transcription susceptibles de se lier à une séquence promotrice. Les valeurs donnent le nombre de sites pour chaque facteur. Ces résultats sont issus des recherches effectuées à l'aide du programme en ligne *TFSEARCH* (accessible sur le site <http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>). Ce programme recherche des fragments de séquence hautement corrélés à partir de la base de données allemande *TRANSFAC Matrix Table (GBF-Braunschweig)* pour établir des profils de sites de liaison potentiels pour des facteurs de transcription au sein des séquences promotrices de 1101 pb que nous avons obtenues pour nos gènes d'intérêt à partir de la base de données *DBTSS (Database of Transcriptional Start Sites)* sur le site <http://dbtss.hgc.jp/>). Le résultat de la recherche est la séquence promotrice de 1101 pb annotée pour des sites consensus potentiels susceptibles d'être liés par les facteurs de transcription.

	Gènes d'intérêt														Total	
	ACP2	Arl7	ARSA	CLCN5	CLN3	CTSD	fucA1	GBA	HEXB	LAMP-1	LAMP-2	MANxxx	NEU1	NPCI		Rab7
HNF-3b					1					1			9		1	12
HSF1					2					1						3
HSF2					2					2						4
Ik-1							1	1								2
Ik-2	3						1	1								5
IRF-1														1		1
IRF-2														1		1
Lyf-1	3							1		4		1		2	1	12
MyoD														2		2
MZF1	6	9	2	3	1	2	1		4	2	2	18		2	2	54
NF-E2												2				2
NFkB		1					2									3
Nkx-2.	2			1	3		1	2	2			7		2		20
N-Myc						4				1		1	3			9
NRF-2	1						1									2
Oct-1											4	2				6
p300		3										1			1	5
S8	1														3	4
Sox-5					1				2		5	2			2	12
Sp1	1	9	5	2		3		2			2	15	9	2	1	51
SREBP-					4					5			3			12
SRY	4		3	6	4		4	1	6	1	26	18	21	3		97
STATx												5				5
TATA				2			1				2	2				7
Tst-1												1				1
USF					12	10			1	40	2	2	30			97
VBP													3			3
v-ErbA					1											1
v-Myb	1											1		2		4
XFD-3													3			3
YY1															1	1
Total	41	29	38	26	37	23	30	25	21	75	77	152	138	31	28	771

Figure III.10 (bis) : Cf. légende figure III.10.

Dans un premier temps, nous avons voulu dresser une liste des facteurs de transcription candidats potentiels. Cette liste s'est basée sur des données de la littérature. D'autre part, nous avons effectué une analyse *in silico* sur le promoteur d'un certain nombre de gènes dont la surexpression a été démontrée en conditions de surcharge lysosomale induite par le saccharose [Kato, Okada, 1984] [Helip-Wooley et Thoene, 2004]. Les modalités et les résultats de cette recherche sont présentés au point suivant. Enfin, nous avons rassemblé l'ensemble de ces données (littérature et recherche *in silico*) pour focaliser notre attention sur quelques facteurs de transcription candidats en tenant compte des différents outils d'étude disponibles au laboratoire, à savoir des constructions rapporteurs, des anticorps ainsi que des tests en TransAM permettant de doser l'activité de liaison à l'ADN de plusieurs facteurs de transcription.

III.2.2 Analyse *in silico* du promoteur de gènes nucléaires codant pour des protéines lysosomales

La première étape de cette recherche fut de constituer une liste de protéines d'intérêt. Les protéines affectées par la surcharge dans notre modèle (LAMP-1, LAMP-2, la cathepsine D, Rab-7, l' α -mannosidase et la β -glucosidase) furent les premiers candidats. Pour compléter cette liste, nous avons sélectionné dans la littérature des candidats supplémentaires : les protéines α -fucosidase, β -hexosaminidase, neuraminidase [Kato, Okada, 1984], phosphatase acide lysosomale 2 [Karageorgos, Isaac, 1997] et arylsulfatase A [Helip-Wooley et Thoene, 2004]. Nous y avons ajouté certains gènes codant des protéines lysosomales ou non pour lesquels une régulation transcriptionnelle a été mise en évidence lors d'une surcharge lysosomale : *CLN3*, *CLCN5*, *Arl7* et *NPCI* [Helip-Wooley et Thoene, 2004].

Nous avons d'abord recherché dans la base de données GenBank (site du National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) les gènes auxquels nous voulions nous intéresser. Les résultats de cette recherche ayant permis d'obtenir le numéro d'accès des gènes candidats sont repris dans la figure III.9.

Ensuite, nous avons recherché la séquence du promoteur de chaque gène sur 1000 pb en amont et 100 pb en aval du site d'initiation de la transcription dans la base de données *DBTSS* (*Database of Transcriptional Start Sites* sur le site <http://dbtss.hgc.jp/>).

Enfin, nous avons fait, sur ces 1101 pb, une recherche de tous les sites de liaison potentiels pour des facteurs de transcription. Cette recherche fut menée dans la base de données *TFSEARCH* (sur le site <http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>) avec un seuil de certitude de 90 points parmi les 1483 facteurs de transcription fournis à *TFSEARCH* par la base de données allemande *TRANSFAC Matrix Table* (*GBF-Braunschweig*). Le résultat de la recherche est la séquence des promoteurs des gènes d'intérêt, annotée pour l'ensemble des sites consensus potentiels retrouvés (figure III.10).

Mentionnons que ces sites potentiels ne sont que des prédictions indicatives et non des certitudes de la participation d'un facteur dans la régulation de l'expression du gène d'intérêt. De plus, d'autres sites pour des facteurs de transcription non présents dans la banque de données peuvent exister.

A partir de cette liste, nous avons sélectionné les facteurs de transcription pour lesquels des outils d'étude étaient disponibles au laboratoire, c'est à dire: NF-kB, Sp1, SREBP, YY-1, AP-1, C/EBP- α , C/EBP- β , c-Myc, CREB et GATA.

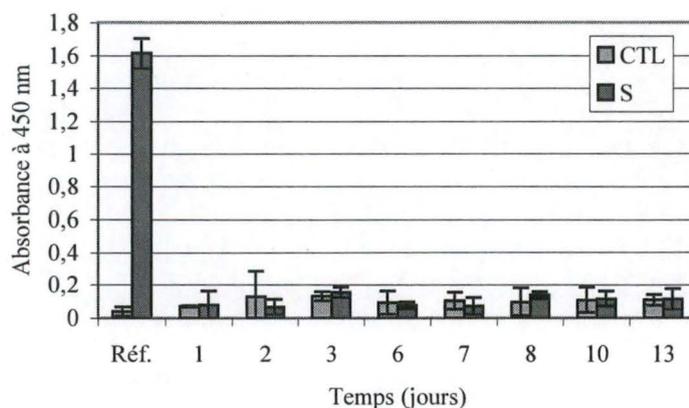


Figure III.11 : Mesure de l'activité de liaison du facteur de transcription C/EBP α à sa séquence consensus, réalisée à partir d'extraits nucléaires issus de cellules 143B stimulées (S) ou non (CTL) pendant des temps allant de 1 à 13 jours. Les extraits nucléaires sont incubés en présence de la séquence consensus de C/EBP α , fixée dans les puits d'une plaque 96 puits. Lorsqu'il est lié à sa séquence consensus, le facteur de transcription C/EBP α est détecté par un anticorps primaire de lapin, puis d'un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la HRP (Horse Radish Peroxydase). La révélation est réalisée en présence du substrat de l'enzyme et l'absorbance du produit de réaction est mesurée. Les résultats sont exprimés en unités d'absorbance à 450 nm et représentent la moyenne \pm un écart-type pour $n = 3$.

Réf. = résultats obtenus pour des extraits nucléaires issus de cellules utilisées comme références positives et négatives au sein du dosage. Réf négative = cellules de la lignée HeLa. Réf positive = cellules de la lignée TH1.

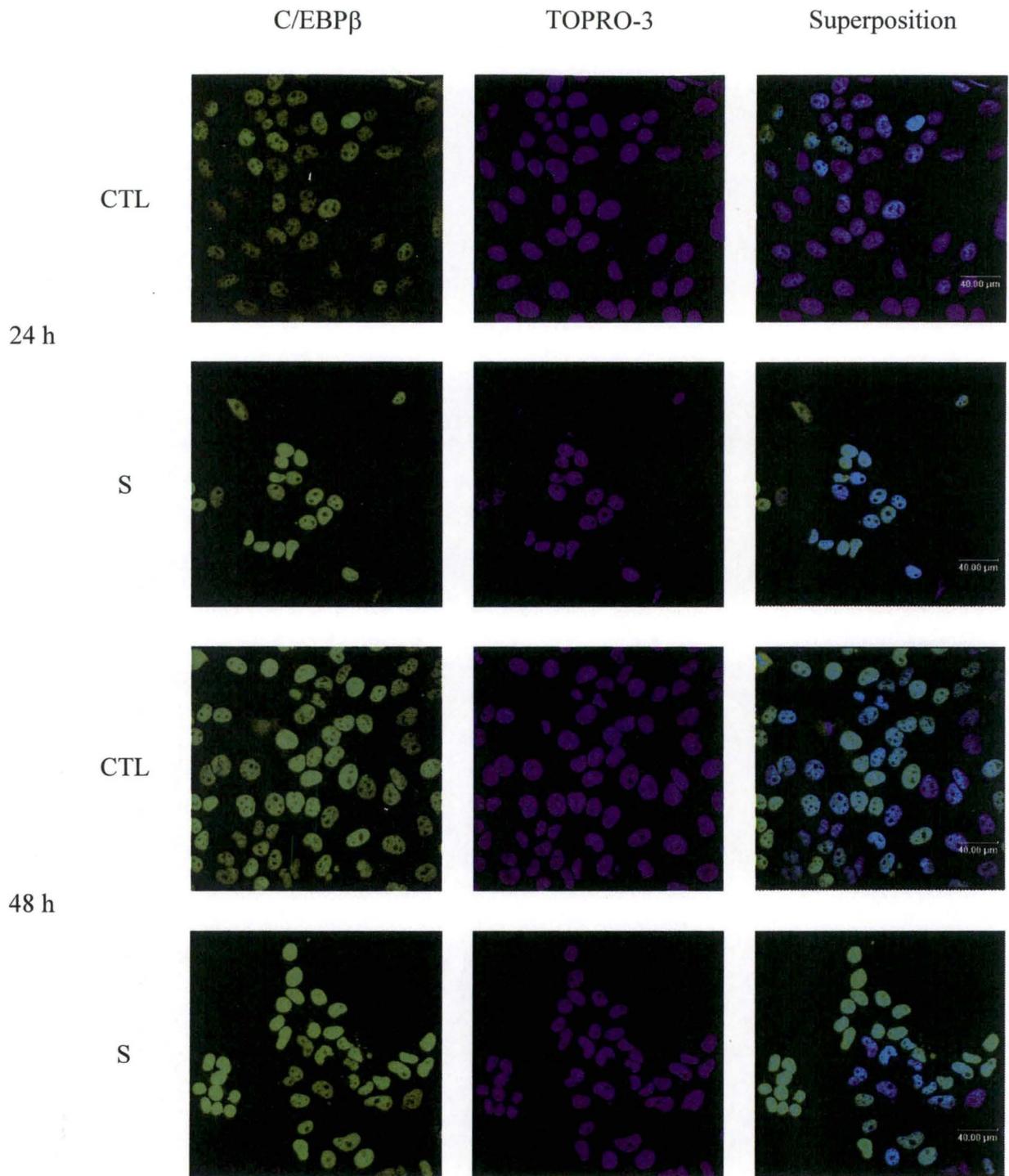


Figure III.12 : Marquage en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale du facteur de transcription C/EBP β dans des cellules 143B incubées en présence (S) ou non (CTL) de saccharose à 100 mM pendant 24 h ou 48 h. Le marquage en immunofluorescence est réalisé sur les cellules fixées à la PFA et perméabilisées au Triton-X100 en présence d'un anticorps primaire dirigé contre C/EBP β et d'un anticorps secondaire couplé à une sonde Alexa réémettant de la fluorescence à 519 nm. Un marquage au TOPRO-3 permet de visualiser le noyau des cellules. Les microphotographies sont prises séquentiellement sur deux canaux différents et sont ensuite superposées.

III.2.3 Etude de l'état d'activation des facteurs de transcription C/EBPs

La première étape de notre investigation a porté sur l'étude de l'état d'activation du facteur de transcription C/EBP. En effet, Helip-Wooley *et al.* ont montré par la technique de retard sur gel (ElectroMobility Shift Assay, EMSA) qu'il y avait une augmentation importante de l'activité de liaison de ce facteur de transcription dans des extraits nucléaires de cellules incubées en présence de saccharose et ce, déjà après 6 h d'incubation [Helip-Wooley et Thoene, 2004].

Cette famille de facteurs de transcription joue, avec SREBP et PPAR γ , un rôle clé dans la régulation de l'adipogenèse [Rosen, Walkey, 2000]. Cette fonction des C/EBPs concorde avec l'augmentation de l'expression de gènes codant pour des enzymes impliquées dans les métabolismes du cholestérol et des acides gras observée dans des cellules incubées en présence de saccharose [Helip-Wooley et Thoene, 2004]. En plus, Liu *et al.* ont montré qu'il y avait un site de liaison potentiel pour le facteur C/EBP dans le promoteur complet du gène codant pour le récepteur aux LDL (RLDL), gène dont l'expression est augmentée dans les cellules incubées en présence de saccharose [Liu, Ahlborn, 2000]. Enfin, mentionnons que nous avons trouvé des sites de liaison potentiels pour ce facteur de transcription dans le promoteur de gènes codant pour les enzymes lysosomales phosphatase acide, fucuronidase, α -mannosidase et neuraminidase (cf. point III.2.2.). Ces éléments nous ont amené à nous intéresser à l'état d'activation de ce facteur de transcription dans les cellules 143B surchargées de saccharose.

III.2.3.1 Dosage de l'activité de liaison du facteur de transcription C/EBP α à sa séquence consensus

Notre première étape dans l'étude de ce facteur a été de réaliser un test de l'activité de liaison du facteur de transcription C/EBP α à sa séquence d'ADN consensus dans des cellules incubées en présence de saccharose 100 mM pendant 1, 2, 3, 6, 7, 8, 10 ou 13 jours par rapport à cette activité dans les cellules contrôles.

Les résultats de cette expérience sont présentés à la figure III.11. On ne constate aucune modification de l'activité de liaison de ce facteur à sa séquence consensus dans les cellules incubées en présence de saccharose à 100 mM. Nous avons alors porté notre intérêt sur un autre membre de la même famille de facteurs de transcription : C/EBP β . L'étude de ce facteur a été envisagée par deux autres techniques. D'une part par des marquages en immunofluorescence suivis d'observations en microscopie confocale afin de comparer la localisation et l'abondance de ce facteur dans des cellules contrôles et des cellules incubées en présence de saccharose 100 mM. D'autre part, nous avons utilisé la technique de transfection d'un système rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur authentique de C/EBP α . En effet, ce promoteur est régulé par la liaison de C/EBP β et par la liaison de C/EBP δ [Tang, Jiang, 1997].

III.2.3.2 Mise en évidence de l'abondance et de la localisation du facteur de transcription C/EBP β en immunofluorescence

Les cellules 143B incubées pendant 24 h et 48 h en présence ou non de saccharose 100 mM ont été marquées avec les anticorps dirigés contre C/EBP β . Un marquage des noyaux au TOPRO-3 a ensuite été réalisé avant l'observation en microscopie confocale. Le résultat de ce marquage est montré à la figure III.12. On ne constate pas de différence marquée entre les cellules contrôles et les cellules incubées en présence de saccharose. En effet, la distribution de C/EBP β est nucléaire dans les deux conditions. Le nombre de cellules dont le noyau est

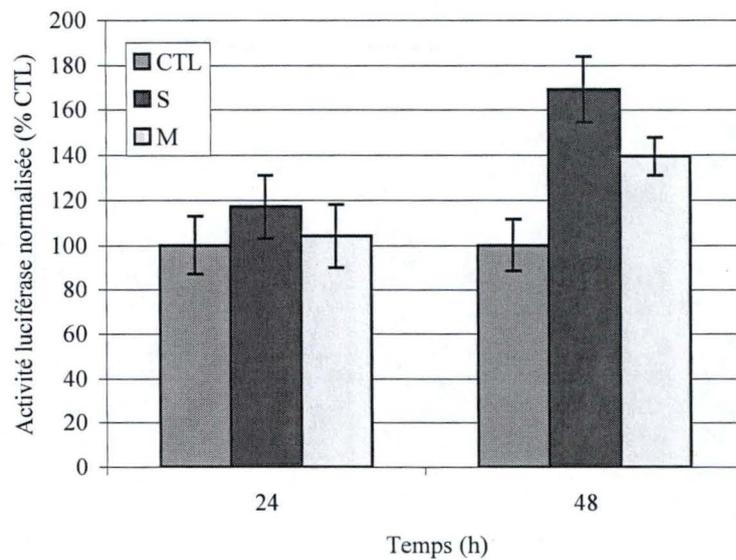


Figure III.13 : Dosage de l'activité luciférase dans des cellules 143B préalablement co-transfectées pendant 6 h au Superfect avec un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur de C/EBP α et le plasmide codant pour la β -galactosidase. Le lendemain, les cellules sont incubées en présence ou non (contrôles = CTL) de saccharose (S) ou de maltose (M) à 100 mM. Les activités luciférase et β -galactosidase sont mesurées au terme d'incubations de 24 h et 48 h. Les résultats d'activité luciférase sont normalisés par l'activité β -galactosidase et sont exprimés en pourcentages des cellules contrôles correspondantes. Ces résultats représentent la moyenne \pm un écart-type pour n = 3.

marqué pour C/EBP β augmente à 48 h, mais cette augmentation semble comparable dans les deux conditions. Un comptage du nombre de cellules dont le noyau est saturé pour le signal de C/EBP β par rapport au nombre de cellules total a été réalisé pour chaque temps (24 h et 48 h) et pour chaque condition. Ce comptage a été effectué sur 3 champs différents non superposés, et le nombre de cellules positives a été exprimé en pourcentages du nombre de cellules totales présentes sur les 3 champs. Pour les cellules contrôles, nous trouvons après 24 h 32,6 % de cellules « positives », contre 72,5 % en présence de saccharose. Après 48 h d'incubation, nous trouvons pour les cellules contrôles 74,5 % de cellules « positives » et 93,6 % pour les cellules incubées en présence de saccharose. Nous avons alors souhaité tester l'activité de C/EBP β dans des cellules incubées en présence de saccharose 100 mM mais aussi en présence de maltose 100 mM et la comparer à l'activité dans les cellules contrôles.

III.2.3.3 Transfection de cellules 143B avec un système rapporteur luciférase sous le contrôle du promoteur du gène C/EBP α

Les cellules ont été co-transfectées transitoirement avec le Superfect en présence d'un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur authentique du gène C/EBP α contenant des sites potentiels activateurs pour les facteurs C/EBP β et C/EBP δ et d'une construction codant pour la β -galactosidase (Figure III.13). On constate que l'activité du gène rapporteur augmente après 48 h, tant dans la condition saccharose (la valeur de l'activité luciférase normalisée atteint 169 % du contrôle) que dans la condition maltose (139,4 %). Cette activation en condition «maltose» rend peu probable l'implication de C/EBP β en tant que facteur de transcription principal impliqué dans la communication rétrograde lysosome-noyau en réponse à une surcharge lysosomale en saccharose.

III.2.4 Etude de l'état d'activation du facteur NF-kB

Notre recherche d'un ou plusieurs facteur(s) de transcription impliqué(s) dans la réponse rétrograde lysosome- noyau induite par une surcharge lysosomale s'est poursuivie par l'étude de l'état d'activation du facteur de transcription NF-kB dans ces cellules. Notre intérêt pour ce facteur de transcription est justifié principalement par son implication connue dans les réponses cellulaires aux stimuli inflammatoires. En effet, il existe de nombreuses pathologies induites par une surcharge lysosomale dans lesquelles on constate l'apparition de cytokines pro-inflammatoires. A titre d'exemple, dans la maladie de Niemann-Pick, on retrouve, dans le fluide broncho-alvéolaire des souris servant de modèle à l'étude de cette pathologie, des chémokines inflammatoires libérées par les macrophages [Dhami, He, 2001]. Chez les patients atteints de la mucopolysaccharidose (MPS) de type VI (maladie de surcharge lysosomale caractérisée par la déficience en arylsulfatase B, qui conduit à l'accumulation de dermatane sulfate), on détecte, dans les chondrocytes articulaires, la présence de cytokines inflammatoires, telles que le TNF- α [Simonaro, Haskins, 2001]. Citons enfin la maladie de Gaucher, causée par une déficience en glucocérébrosidase, conduisant à l'accumulation de cérébrosides dans les macrophages, principalement du foie, de la moelle osseuse, de la rate et du poumon. Chez ces patients, il y a déclenchement d'une réponse inflammatoire importante, et les facteurs libérés par les cellules de Gaucher comprennent des cytokines pro-inflammatoires et peut-être des cathepsines [Cox, 2001].

Notre étude de ce facteur a été menée selon deux approches. D'une part, par l'analyse de sa localisation et de son abondance dans les cellules incubées en présence de saccharose 100 mM par rapport aux cellules contrôles par des marquages en immunofluorescence suivis d'observations en microscopie confocale et d'autre part par la transfection d'un système

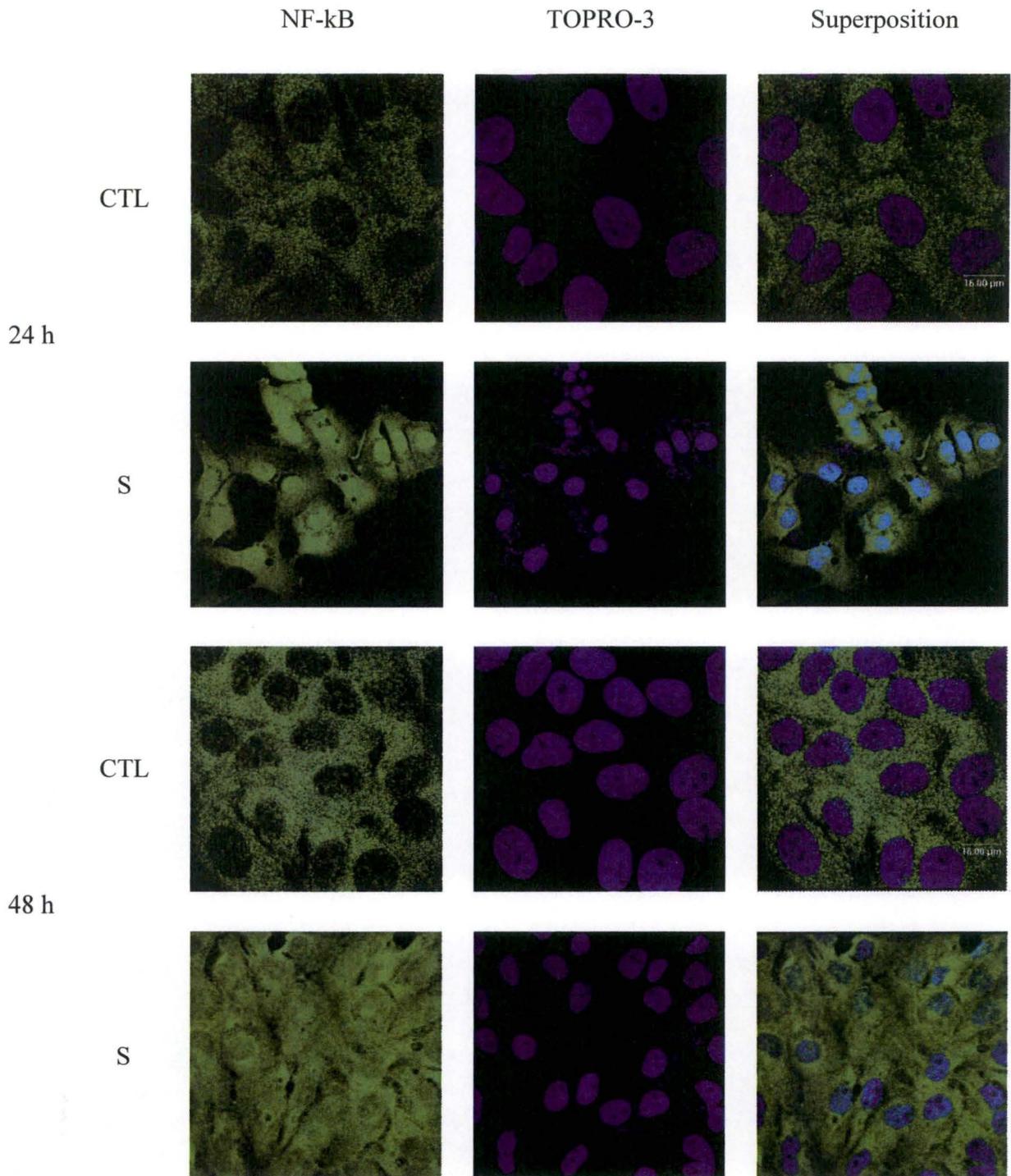


Figure III.14 : Marquage en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale du facteur de transcription NF-kB dans des cellules 143B incubées en présence (S) ou non (CTL) de saccharose à 100 mM pendant 24 h ou 48 h. Le marquage en immunofluorescence est réalisé sur les cellules fixées à la PFA et perméabilisées au Triton-X100 en présence d'un anticorps primaire dirigé contre NF-kB et d'un anticorps secondaire couplé à une sonde Alexa réémettant de la fluorescence à 519 nm. Un marquage au TOPRO-3 permet de visualiser le noyau des cellules. Les microphotographies sont prises séquentiellement sur deux canaux différents et sont ensuite superposées.

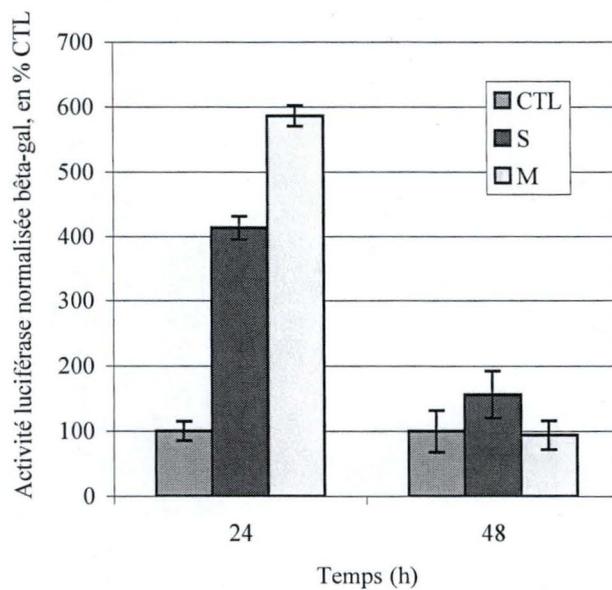


Figure III.15 : Dosage de l'activité luciférase dans des cellules 143B préalablement co-transfectées pendant 6 h au Superfect avec un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur synthétique qui comporte 8 sites de fixation pour NF- κ B et le plasmide codant pour la β -galactosidase. Le lendemain, les cellules sont incubées en présence ou non (contrôles = CTL) de saccharose (S) ou de maltose (M) à 100 mM. Les activités luciférase et β -galactosidase sont mesurées au terme des incubations de 24 h et 48 h. Les résultats d'activité luciférase sont normalisés par l'activité β -galactosidase et sont exprimés en pourcentages des cellules contrôles correspondantes. Ces résultats représentent la moyenne \pm un écart-type pour n = 3.

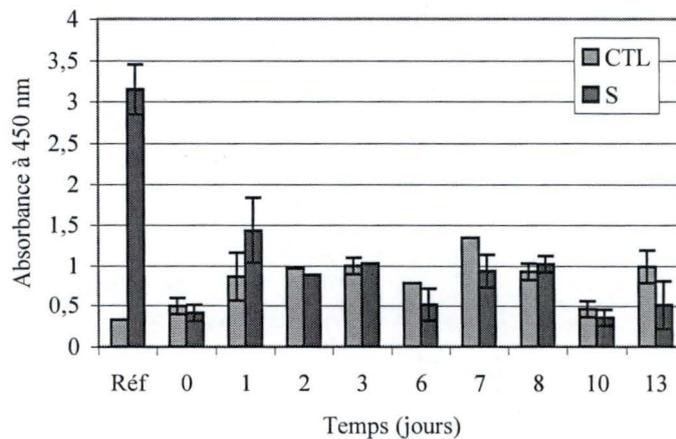


Figure III.16 : Mesure de l'activité de liaison du facteur de transcription GATA-4 à sa séquence consensus, réalisée à partir d'extraits nucléaires issus de cellules 143B stimulées (S) ou non (CTL) pendant des temps allant de 1 à 13 jours. Les extraits nucléaires sont incubés en présence de la séquence consensus de GATA-4, fixée dans les puits d'une plaque 96 puits. Lorsqu'il est lié à sa séquence consensus, le facteur de transcription GATA-4 est détecté par un anticorps primaire de lapin, puis d'un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la HRP (Horse Radish Peroxydase). La révélation est réalisée en présence du substrat de l'enzyme et l'absorbance du produit de réaction est mesurée. Les résultats sont exprimés en unités d'absorbance à 450 nm et représentent la moyenne \pm un écart-type pour $n = 3$.

Réf. = résultats obtenus pour des extraits nucléaires issus de cellules utilisées comme références positives et négatives au sein du test. Réf négative = cellules de la lignée F9 non stimulées. Réf positive = cellules F9 stimulées à l'acide rétinoïque ($1 \mu\text{M}$) pendant 2 jours.

rapporteur luciférase répondant au facteur de transcription NF-kB dans des cellules contrôles et des cellules incubées en présence de saccharose ou de maltose 100 mM.

III.2.4.1 Mise en évidence de l'abondance et de la localisation du facteur de transcription NF-kB en immunofluorescence

Les cellules 143B ont été incubées pendant 24 h et 48 h en présence ou non de saccharose 100 mM. Le jour du marquage, elles ont été marquées avec les anticorps primaires dirigés contre la sous-unité p50 du facteur NF-kB. Un marquage des noyaux au TOPRO-3 a enfin été réalisé avant l'observation en microscopie confocale. Le résultat de ce marquage est montré à la figure III.14. On peut immédiatement remarquer que la localisation de NF-kB est presque exclusivement cytoplasmique dans les cellules contrôles, tant après 24 h qu'après 48 h d'incubation, avec cependant une légère augmentation du signal après 48 h. Ce qui est fort intéressant, c'est que nous constatons dans les cellules incubées en présence de saccharose 100 mM une translocation évidente de ce facteur dans le noyau. Il semble donc que dans les cellules présentant une surcharge en saccharose, NF-kB soit activé dans le cytosol (où il est maintenu par I κ B lorsqu'il n'est pas activé) et transloque dans le noyau.

III.2.4.2 Etude de l'activité transactivatrice de NF-kB par transfection d'un système rapporteur luciférase

Les cellules 143B ont été co-transfectées transitoirement avec un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur synthétique qui comporte 8 sites de fixation pour NF-kB et une construction codant pour la β -galactosidase. Les résultats présentés à la figure III.15 démontrent l'activation de NF-kB dans les cellules incubées en présence de saccharose 100 mM. Néanmoins, cette activation n'est pas spécifique, puisque NF-kB est encore plus activé dans les cellules incubées pendant 24 h en présence de maltose. Il est donc vraisemblable que l'activation de NF-kB soit induite par le stress hyperosmotique lié à la présence massive de disaccharides dans le milieu de culture plutôt qu'au phénomène de surcharge. Rappelons que Rao *et al.* ont montré l'implication de ce facteur dans l'augmentation de l'expression de la COX2 en réponse à un stress osmotique [Rao, Hao, 2004]. Il a aussi été montré qu'un stress hyperosmotique stimule la liaison à l'ADN de NF-kB et l'activité transcriptionnelle dépendante de ce facteur. En effet, un choc hyperosmotique peut conduire à l'activation des MAP kinases p38 et p 42/44, ce qui conduit à l'activation des IKKs, et à l'activation de NF-kB [Nemeth, Deitch, 2002].

III.2.4.3 Dosage de l'activité de liaison du facteur de transcription GATA-4 à sa séquence consensus

Nous nous sommes ensuite penchés sur le facteur de transcription GATA. En effet, notre analyse de promoteurs *in silico* a révélé que l'on retrouvait un très grand nombre de sites de liaison potentiels pour ce facteur dans tous les promoteurs analysés, excepté dans le promoteur du gène codant pour la cathepsine D.

Nous avons testé l'activité de liaison du facteur de transcription GATA-4 à sa séquence d'ADN consensus sur des extraits de cellules incubées en présence de saccharose à 100 mM pendant 1, 2, 3, 6, 7, 8, 10 ou 13 jours et comparé cette activité à celle de cellules contrôles. Le résultat de ce dosage est présenté à la figure III.16. On constate que l'on n'observe pas de différence de l'activité de liaison à l'ADN de ce facteur de transcription entre des extraits de cellules contrôles et de cellules incubées en présence de saccharose.

Etant donné ce résultat peu concluant, nous n'avons pas mené plus loin l'étude de ce facteur de transcription d'autant que nous ne disposons pas au laboratoire de construction rapporteur luciférase répondant à ce facteur de transcription.

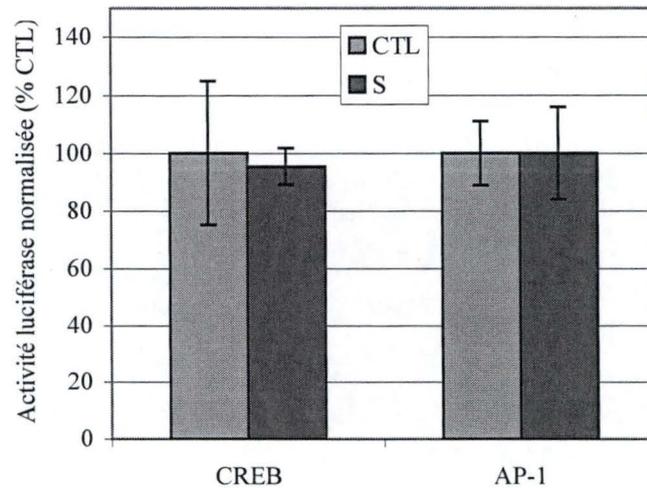


Figure III.17 : Dosage de l'activité luciférase dans des cellules 143B préalablement co-transfectées pendant 6 h au Superfect avec deux types de plasmides rapporteurs.

Pour CREB, nous avons utilisé un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur authentique de l' α -inhibine, qui contient plusieurs sites de liaison pour le facteur CREB, et un plasmide codant pour la β -galactosidase.

Pour AP-1, nous avons utilisé un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur synthétique qui comporte 4 sites de fixation pour AP-1 et un plasmide codant pour la β -galactosidase.

Le lendemain, les cellules sont incubées en présence ou non (contrôles = CTL) de saccharose (S) à 100 mM. Les activités luciférase et β -galactosidase sont mesurées après 24 h d'incubation. Les résultats d'activité luciférase sont normalisés par l'activité β -galactosidase et sont exprimés en pourcentages des cellules contrôles correspondantes. Ces résultats représentent la moyenne \pm un écart-type pour $n = 3$.

III.2.5 Etude de l'activité transactivatrice des facteurs de transcription CREB et AP-1 par transfection de systèmes rapporteurs luciférase

Notre étude des facteurs de transcription s'est poursuivie par l'étude de l'état d'activation des facteurs de transcription CREB et AP-1. En effet, notre recherche *in silico* a révélé, pour CREB, la présence d'un site de liaison potentiel dans le promoteur du gène codant pour la phosphatase acide lysosomale et de trois sites de liaison potentiels dans le promoteur du gène codant pour la cathepsine D, cette dernière étant surexprimée dans les cellules incubées en présence de saccharose 100 mM (figure III.1). Pour le facteur de transcription AP-1, cette même analyse a révélé la présence de deux sites de liaison potentiels dans le promoteur du gène codant pour la β -glucosidase et de 3 sites de liaison potentiels dans le promoteur du gène codant pour l' α -mannosidase (l'activité de ces deux enzymes étant augmentée dans les cellules incubées en présence de saccharose 100 mM, figure III.6) et de douze sites de liaison potentiels dans le promoteur du gène codant pour la neuraminidase. L'analyse de l'activité transcriptionnelle de ces deux facteurs a été réalisée par la transfection transitoire des cellules avec des constructions rapporteurs luciférase dans des cellules incubées en présence ou non de saccharose à 100 mM.

Les constructions utilisées dans le cadre de cette expérience sont un plasmide rapporteur pour AP-1 contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur synthétique qui comporte 4 sites de fixation pour AP-1 et un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur authentique de l' α -inhibine, contenant plusieurs sites de liaison pour le facteur CREB.

Les cellules 143B ont été co-transfectées avec le plasmide rapporteur luciférase et une construction codant pour la β -galactosidase. Les cellules ont ensuite été incubées en présence ou non de saccharose 100 mM. Les dosages des activités luciférase et β -galactosidase ont été réalisés après 24 h d'incubation. Les résultats de cette expérience sont présentés à la figure III.17. On constate que ni AP-1, ni CREB ne sont activés dans les cellules incubées en présence de saccharose à 100 mM, ce qui nous conduit à éliminer ces facteurs de transcription de notre liste de candidats potentiels.

Nous avons ensuite porté notre attention sur la famille de facteurs de transcription Myc. Notre analyse *in silico* a en effet révélé la présence de nombreux sites de liaison potentiels pour les facteurs de cette famille au sein des promoteurs analysés. Pour c-Myc, on trouve un site de liaison potentiel dans le promoteur du gène codant CLN3 et dans le promoteur du gène codant pour l' α -mannosidase, et 3 sites dans le promoteur du gène codant pour la neuraminidase. Pour N-Myc, on retrouve quatre sites de liaison potentiels dans le promoteur du gène codant pour la cathepsine D, un site dans le promoteur du gène codant pour la protéine LAMP-1, un site dans le promoteur du gène codant pour l' α -mannosidase et trois dans le promoteur du gène codant pour la neuraminidase. Etant donné les outils disponibles au laboratoire, notre étude a porté sur le membre c-Myc de cette famille, par deux techniques différentes : la transfection transitoire d'un système rapporteur luciférase répondant au facteur de transcription c-Myc, et des marquages en immunofluorescence.

III.2.6 Etude de l'activité transactivatrice du facteur de transcription c-Myc par transfection transitoire d'un système rapporteur luciférase

Les cellules ont été co-transfectées avec un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur synthétique contenant 4 sites de fixation pour le facteur c-Myc et une construction codant pour la β -galactosidase. Le résultat de cette

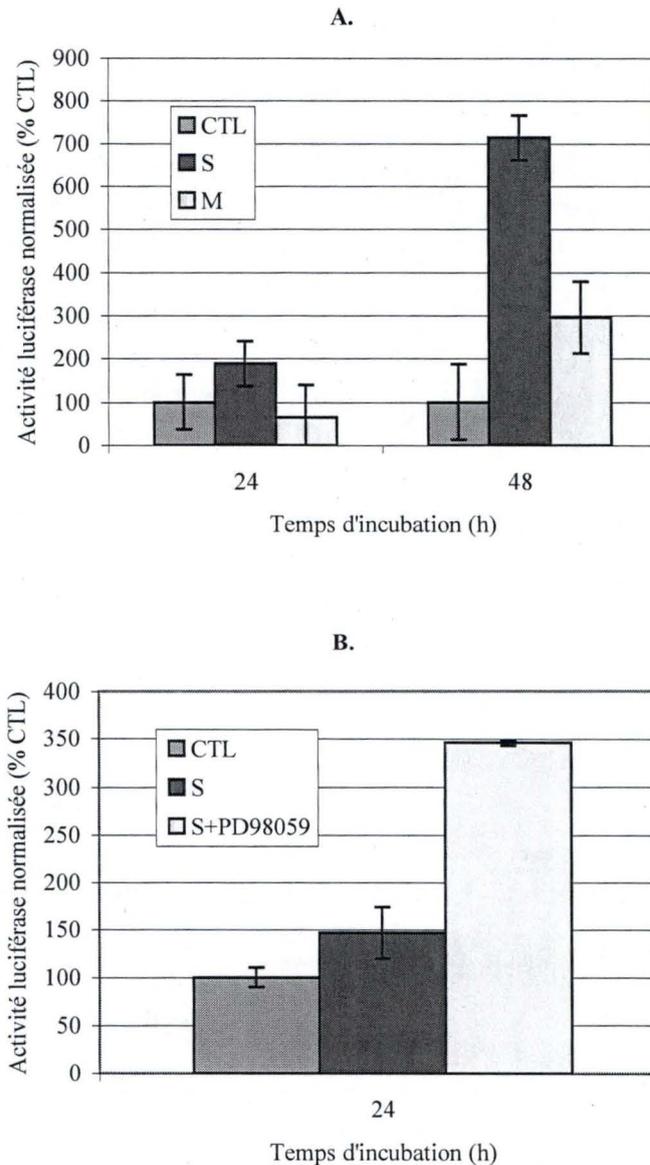


Figure III.18 : Dosage de l'activité luciférase dans des cellules 143B préalablement co-transfectées pendant 6 h au Superfect avec un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur synthétique qui contient 4 sites de fixation pour le facteur c-Myc et le plasmide codant pour la β -galactosidase. Le lendemain, les cellules sont incubées (A) en présence ou non (contrôles = CTL) de saccharose (S) ou de maltose (M) à 100 mM ou (B) en présence ou non (CTL) de saccharose à 100 mM (S) et de saccharose en présence de l'inhibiteur PD98059 à une concentration de 10 μ M (S + PD98059). Les activités luciférase et β -galactosidase sont mesurées au terme d'incubations de 24 h ou 48 h. Les résultats d'activité luciférase sont normalisés par l'activité β -galactosidase. Ces résultats sont exprimés en pourcentages des cellules contrôles correspondantes et représentent la moyenne \pm un écart-type pour $n = 3$.

première expérience de transfection est présentée à la figure III.18.A. Comme on peut le constater, ces résultats sont intéressants. En effet, l'activité luciférase induite par la liaison de c-Myc est fortement augmentée dans les cellules incubées en présence de saccharose 100 mM, après 24 h d'incubation et après 48 h d'incubation par rapport aux cellules contrôles. Mais ce qui semble encore plus intéressant, c'est l'activité de c-Myc dans les cellules incubées en présence de maltose 100 mM. En effet, après 24 h d'incubation, l'activité luciférase induite par c-Myc est inférieure dans ces cellules par rapport aux contrôles. Après 48 h, cette activité augmente dans les cellules incubées en présence de maltose 100 mM, mais nettement moins que dans les cellules incubées en présence de saccharose 100 mM. Ce résultat nous a amené à tenter une autre expérience de transfection transitoire, avec la même construction. En effet, nous avons vu dans l'introduction (point I.2.1.2) que le facteur de transcription c-Myc pouvait être phosphorylé par la voie des MAPK (Erk1/Erk2) et que la phosphorylation initiait le processus de dégradation du facteur. Une inhibition des MAPK devrait donc permettre l'accumulation de c-Myc et activer le rapporteur. Les cellules 143B ont été incubées pendant 24 h dans du milieu contenant ou non du saccharose à 100 mM ou dans du milieu contenant du saccharose à 100 mM et de l'inhibiteur PD98059 à la concentration de 10 μ M. Cette molécule inhibe la kinase MEK et donc les kinases en aval Erk1/Erk2, qui lorsqu'elles sont activées conduisent à la phosphorylation de la protéine c-Myc sur la sérine 62. Cette phosphorylation est nécessaire à la phosphorylation subséquente sur la thréonine 58 par la GSK-3 β , cette phosphorylation constituant le signal clé pour la dégradation de c-Myc [Nesbit, Tersak, 1999]. Le résultat de cette expérience est montré à la figure III.18.B. Cette expérience confirme l'augmentation de l'activité luciférase induite par la liaison de c-Myc dans les cellules incubées en présence de saccharose 100 mM après 24 h. Dans les cellules incubées en présence de saccharose 100 mM et de l'inhibiteur PD98059, l'activité luciférase induite par c-Myc atteint 349 % du contrôle. Ceci suggère que c-Myc est activé dans les cellules incubées en présence de saccharose à 100 mM. Il aurait été intéressant de vérifier ce résultat pour un temps d'incubation de 48 h en présence de maltose à 100 mM et de l'inhibiteur PD98059.

Ces résultats nous permettent de proposer une hypothèse selon laquelle l'incubation de cellules en présence de saccharose (et dans une moindre mesure en présence de maltose) pourrait conduire à une diminution de l'activité Erk1/Erk2 qui serait responsable de la stabilisation de c-Myc dans ces conditions. Des dosages des activités kinases de Erk1/Erk2 *in vitro* après immunoprécipitation ou la recherche de motifs de phosphorylation marqueurs de l'activité de ces kinases pourrait être effectuée en Western blotting sur des lysats de cellules incubées en présence de saccharose. Ceci devrait nous permettre d'infirmer ou de confirmer notre hypothèse.

Nous avons poursuivi notre étude de c-Myc dans des cellules incubées en présence ou non de saccharose ou de maltose 100 mM, en y visualisant l'abondance et la localisation de ce facteur par des marquages en immunofluorescence suivis d'observations en microscopie confocale.

III.2.6.1 Mise en évidence de l'abondance et de la localisation des facteurs c-Myc, phospho-c-Myc et Max en immunofluorescence

C-Myc se lie à des séquences d'ADN spécifiques de certains promoteurs en formant des hétérodimères avec Max. Ce complexe recrute plusieurs co-facteurs sur l'ADN et contribue ainsi à l'activation de la transcription du gène cible [Wanzel, Herold, 2003]. C'est pourquoi nous avons choisi de visualiser non seulement le facteur c-Myc, mais également Max, son partenaire, dans des cellules incubées en présence de saccharose 100 mM et dans des cellules incubées en présence de maltose 100 mM. Comme c-Myc est phosphorylé avant sa

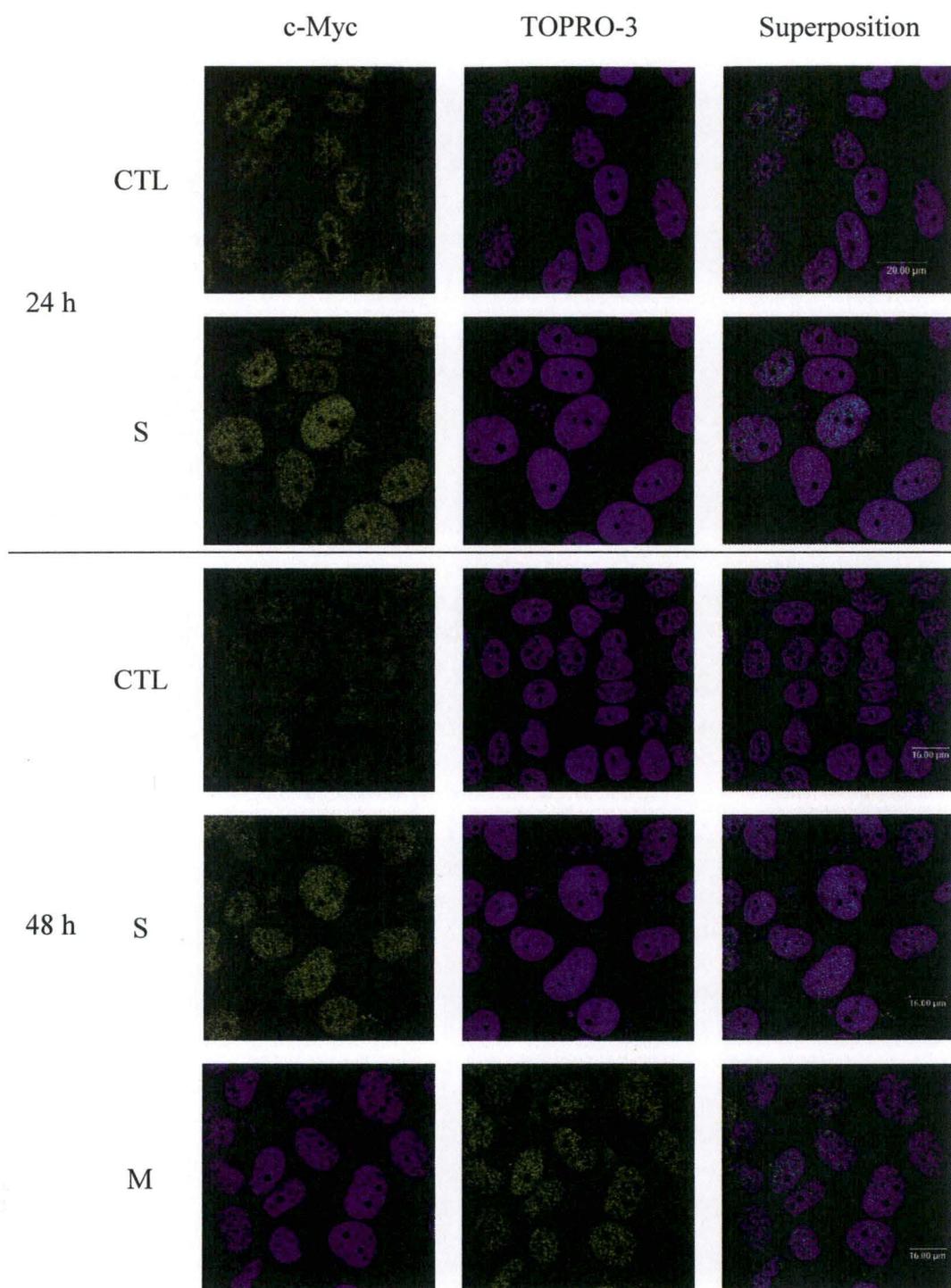


Figure III.19 : Marquage en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale du facteur de transcription c-Myc dans des cellules 143B incubées pendant 24 h ou 48 h en présence ou non (CTL) de saccharose (S) ou de maltose (M) 100 mM. Les cellules fixées et perméabilisées sont marquées avec un anticorps primaire dirigé contre c-Myc, puis un anticorps secondaire couplé à une sonde Alexa émettant à 519 nm. Un marquage au TOPRO-3 permet de visualiser les noyaux. Les microphotographies sont prises séquentiellement sur deux canaux différents et sont ensuite superposées.

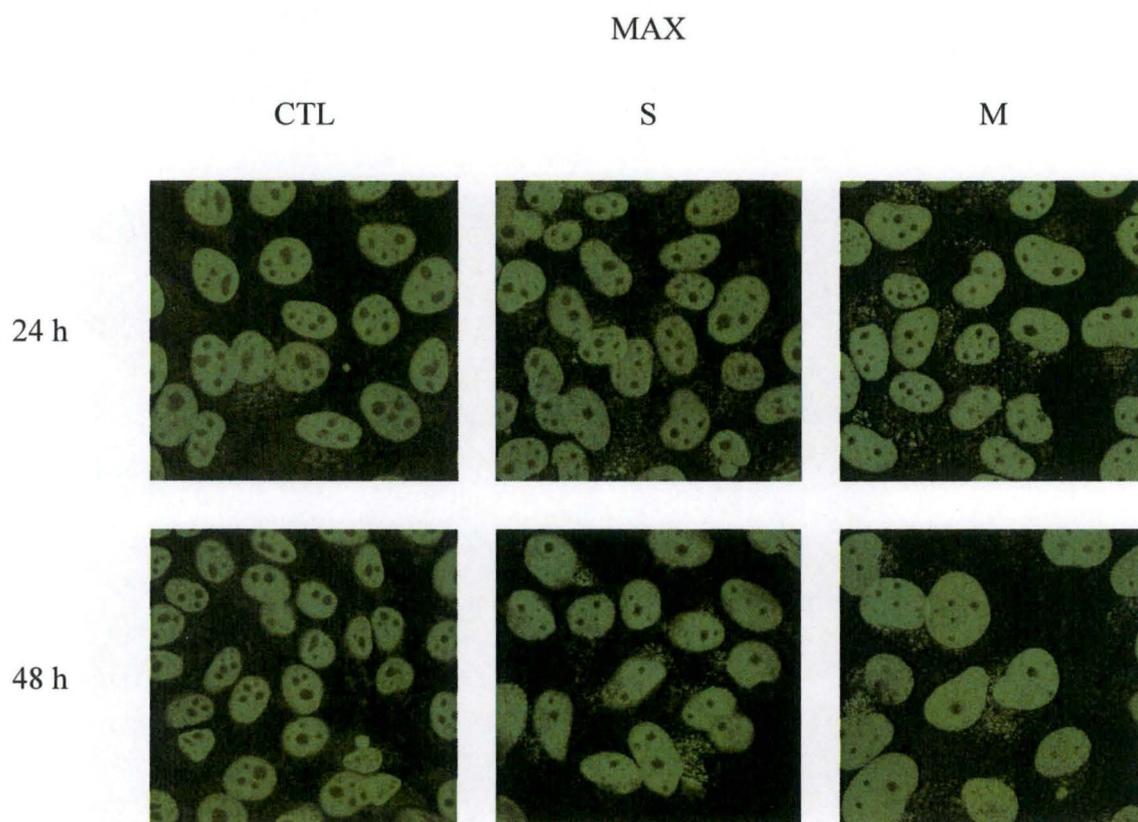


Figure III.20 : Marquage en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale du facteur de transcription Max dans des cellules incubées pendant 24 h ou 48 h en présence ou non (CTL) de saccharose (S) ou de maltose (M) 100 mM. Les cellules fixées et perméabilisées sont marquées avec un anticorps primaire dirigé contre Max, puis un anticorps secondaire couplé à une sonde Alexa réémettant de la fluorescence à 519 nm. Les microphotographies sont prises séquentiellement sur deux canaux de fluorescence différents qui sont ensuite superposés.

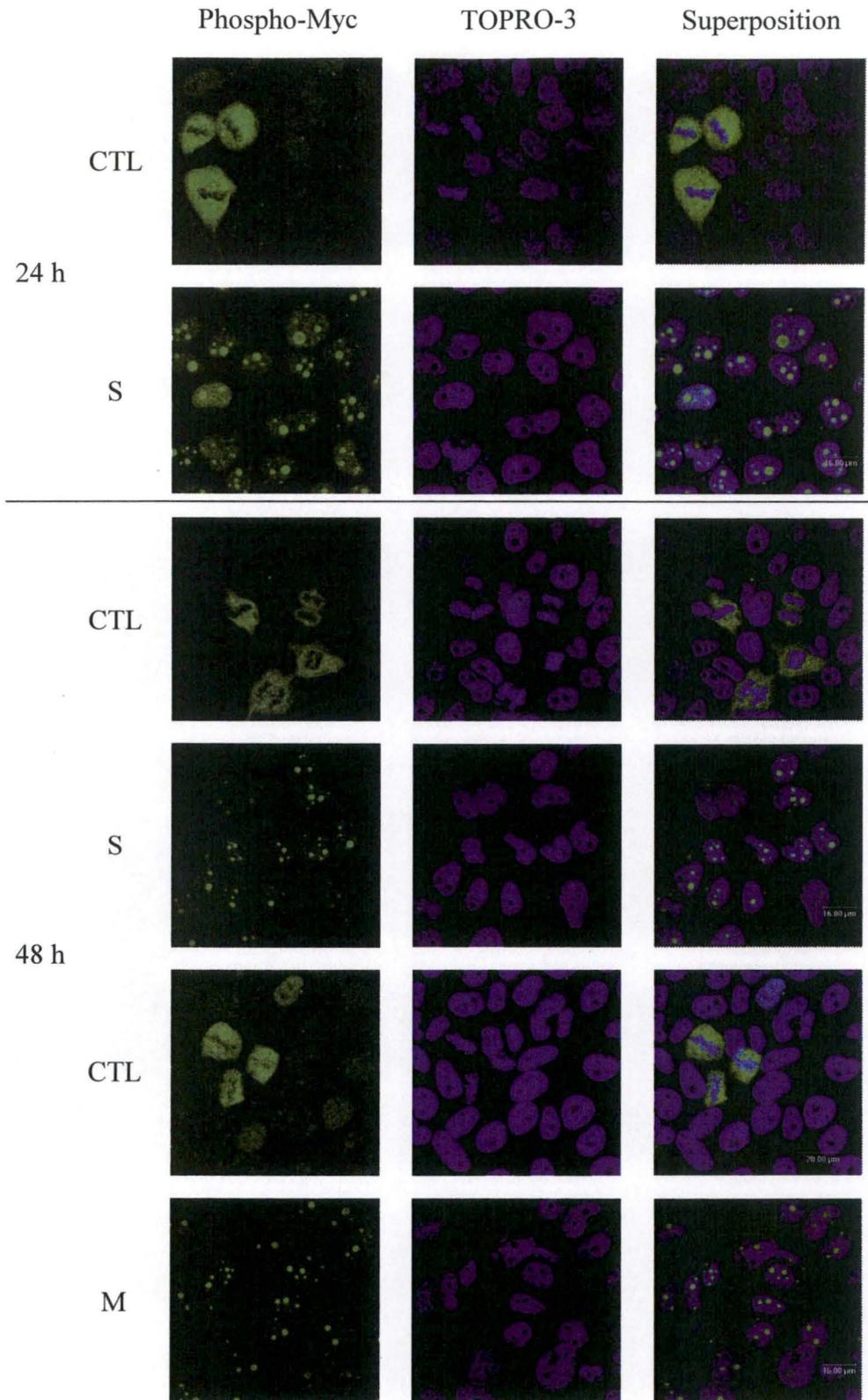


Figure III.21 : Marquages en immunofluorescence de la forme phosphorylée du facteur de transcription c-Myc dans des cellules incubées pendant 24 h ou 48 h en présence ou non (CTL) de saccharose (S) ou de maltose (M) 100 mM. Les cellules fixées et perméabilisées sont marquées avec un anticorps primaire dirigé contre les thréonine 58 et sérine 62 phosphorylées de c-Myc, puis un anticorps secondaire couplé à une sonde Alexa réémettant de la fluorescence à 519 nm. Un marquage au TOPRO-3 permet de visualiser les noyaux. Les microphotographies sont prises séquentiellement sur deux canaux différents et sont ensuite superposées.

dégradation par le protéasome 26S, nous avons également voulu visualiser l'abondance de la forme phosphorylée de c-Myc (Ser62/Thr58) dans ces cellules.

Les cellules ont été incubées pendant 24 h et 48 h en présence ou non de saccharose 100 mM ou pendant 48 h en présence de maltose à 100 mM.

La figure III.19 illustre les marquages obtenus pour c-Myc après 24 h et 48 h d'incubation des cellules en présence ou non de saccharose et également après 48 h d'incubation en présence de maltose. On constate que dans toutes les cellules, la localisation de c-Myc est nucléaire. On voit également que l'abondance de cette protéine augmente dans les cellules incubées en présence de saccharose à 100 mM et ce, quel que soit le temps d'incubation. L'abondance de c-Myc est également légèrement augmentée dans les cellules incubées en présence de maltose pendant 48 h.

La figure III.20 présente les marquages obtenus pour Max après 24 h et 48 h d'incubation des cellules en présence ou non de saccharose et également après 24 h et 48 h d'incubation en présence de maltose. On remarque pour ce facteur qu'il est également localisé dans les noyaux et qu'il n'y a aucune différence d'abondance entre les cellules contrôles et les cellules incubées en présence de saccharose 100 mM pendant 24 h ou 48 h ou pendant 48 h en présence de maltose 100 mM.

Pour marquer les formes phosphorylées de c-Myc après 24 h et 48 h d'incubation des cellules en présence ou non de saccharose et également après 48 h d'incubation en présence de maltose, des anticorps primaires ont été utilisés contre les thréonine 58 et sérine 62 phosphorylées de c-Myc. La figure III.21 présente les marquages obtenus pour les formes phosphorylées de c-Myc. Ces marquages sont intéressants. En effet, on remarque tout d'abord que parmi les cellules contrôles, seules les cellules en mitose ont été marquées. Or on sait que c-Myc est hyperphosphorylé pendant la mitose [Luscher et Eisenman, 1992]. De plus, la localisation de c-Myc dans les cellules en division est cytosolique. Ensuite, on peut observer que dans les cellules incubées en présence de saccharose à 100 mM ou de maltose à 100 mM, le marquage devient exclusivement nucléolaire, ce qui reflète une augmentation de la phosphorylation de c-Myc dans ces cellules. Un marquage nucléolaire pour la forme phosphorylée de c-Myc atteste également une augmentation de son expression. En effet, lors d'une dégradation altérée de la protéine c-Myc par le système ubiquitine-protéasome 26S, l'élévation subséquente du niveau de cette protéine résulte en l'accumulation de la protéine phosphorylée dans le nucléole des cellules [Arabi, Rustum, 2003]. En d'autres termes, c-Myc peut transloquer dans le nucléole des cellules lorsqu'il est surexprimé ou en cas d'inhibition du protéasome [Andersen, Lyon, 2002]. Nous constatons d'après ces résultats que notre hypothèse selon laquelle le saccharose inhibe la voie Erk1/Erk2, ce qui résulterait en une diminution de la phosphorylation de c-Myc et donc en sa stabilisation dans les cellules incubées en présence de saccharose, n'est pas confirmée.

Ces marquages, bien qu'intéressants dans le sens où ils confirment des informations connues et récentes de la littérature, nous amènent à penser que c-Myc n'est pas spécifiquement activé en réponse à la surcharge dans des cellules incubées en présence de saccharose. En effet, même si l'activation du gène rapporteur luciférase est plus faible en présence de maltose, nous avons pu observer qu'il n'y a pas de différence dans l'abondance et la localisation de ce facteur entre des cellules incubées en présence de saccharose ou de maltose à 100 mM.

Helip-Wooley *et al.* ont montré, en utilisant la technologie des microdamiers à ADN, que dans des cellules incubées en présence de saccharose 100 mM, il y a une augmentation de l'expression de nombreux gènes codant non seulement pour des protéines lysosomales mais également de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol et

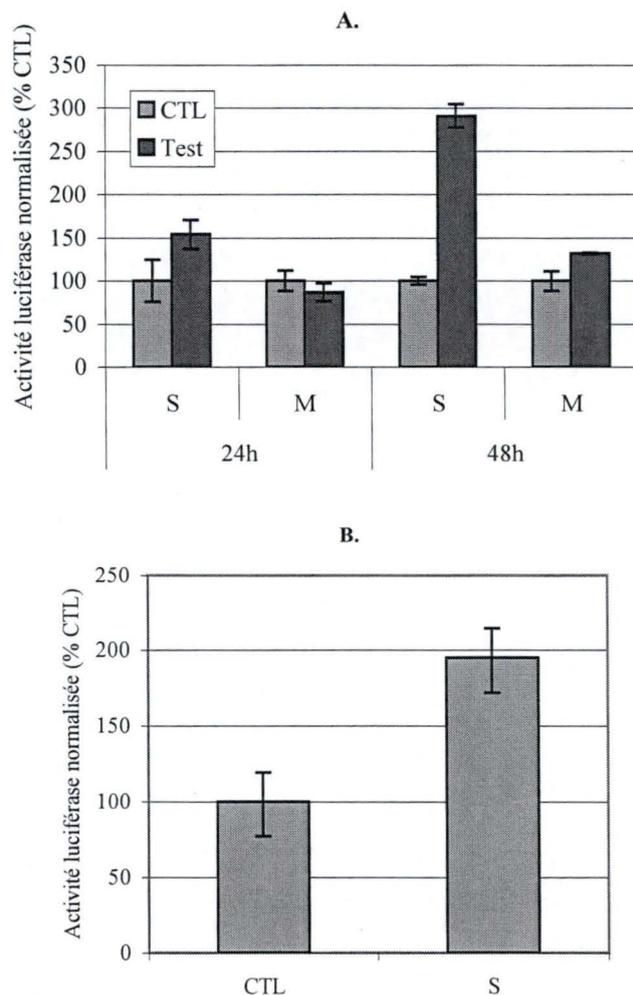


Figure III.22 : Dosage de l'activité luciférase dans des cellules 143B préalablement co-transfectées pendant 6 h au Superfect avec (A) un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle d'un fragment du promoteur authentique du récepteur aux LDL et le plasmide codant pour la β -galactosidase ou (B) avec un plasmide rapporteur luciférase dont l'expression est sous le contrôle du promoteur de S14 répondant au facteur de transcription SREBP et le plasmide codant pour la β -galactosidase. Le lendemain, les cellules sont incubées en présence ou non (contrôles = CTL) de saccharose (S) à 100 mM (A) et (B) ou en présence de maltose (M) à 100 mM (A). Les activités luciférase et β -galactosidase sont mesurées au terme d'incubations de 24 h et 48 h (A) ou 48 h (B). Les résultats d'activité luciférase sont normalisés par l'activité β -galactosidase et sont exprimés en pourcentages des cellules contrôles correspondantes. Ces résultats représentent la moyenne \pm un écart-type pour $n = 3$.

des acides gras. Or ces gènes sont connus pour être régulés, entre autres, par le facteur de transcription SREBP. De plus, on retrouve ce facteur dans la liste de candidats potentiels élaborée par l'analyse *in silico* visant à rechercher des sites de liaison potentiels pour des facteurs de transcription dans le promoteur de nos gènes cibles, comme CLN3, LAMP-1 et la neuraminidase (Figure III.10). On dispose au laboratoire d'un plasmide rapporteur codant pour le gène de la luciférase placé sous le contrôle d'un fragment du promoteur authentique du récepteur aux LDL contenant les éléments de régulation SREBP, YY-1 et Sp1. Ce promoteur répond positivement à SREBP et Sp1 mais peut aussi être réprimé par la liaison de YY-1 [Sanchez, Yieh, 1995]. Nous avons donc poursuivi notre étude par la transfection transitoire des cellules avec ce plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur authentique du gène du RLDL avant de les incuber en présence ou non de saccharose ou de maltose 100 mM

III.2.7 Transfection transitoire de cellules 143B avec un système rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle d'un fragment du promoteur du gène codant pour le RLDL

On constate dans la figure III.22.A. une augmentation de l'activité de la luciférase dans les cellules incubées en présence de saccharose 100 mM par rapport aux cellules contrôles après 24 h (154 %) et 48 h (291 %) d'incubation. Ensuite, on peut constater que le maltose n'active pas ou peu la construction rapporteur, puisqu'on obtient respectivement des valeurs de 84 % et 132 % pour des temps d'incubation de 24 h et 48 h. Il n'est pas exclu que cette légère augmentation ne soit due à une surcharge modérée des lysosomes due à une vitesse d'hydrolyse du maltose inférieure à sa vitesse de capture par les lysosomes ou supérieure à la vitesse d'efflux des produits d'hydrolyse.

Rappelons que les gènes cibles connus de SREBP comprennent les gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol, tels que les gènes codant pour l'HMG-CoA réductase, la farnésyl diphosphate synthase ou la squalène synthase mais qu'ils comprennent également les gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme des acides gras, tels que l'acétyl-CoA carboxylase, la synthase des acides gras ou encore la protéine spot 14 (S14), une enzyme hépatique lipogénique, pour lesquels des analyses des promoteurs des gènes ont montré la présence de séquences constituant des cibles pour le facteur SREBP [Amemiya-Kudo, Shimano, 2002].

Nous avons donc transfecté transitoirement les cellules 143B avec une construction rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur du gène de la protéine S14 avant de les incuber en présence ou non de saccharose 100 mM pendant 24 h. La figure III.22.B montre que l'activité luciférase dépendante de l'activation du promoteur du gène codant la protéine S14 est elle aussi augmentée (195 %) dans les cellules incubées en présence de saccharose par rapport aux cellules contrôles.

De ces expériences, nous pouvons donc conclure que :

1. le gène rapporteur luciférase contrôlé par un fragment du promoteur du RLDL est activé dans des cellules incubées en présence de saccharose
2. l'activation de ce promoteur semble être une conséquence réelle de la surcharge lysosomale au sein de ces cellules, puisque l'incubation en présence de maltose n'induit pas ou très peu l'activation du rapporteur

L'activation du promoteur du RLDL dans la construction utilisée est régulée par YY-1, Sp1 et SREBP [Sanchez, Yieh, 1995]. Ceci nous permet de proposer une implication potentielle de ces trois facteurs de transcription pour tenter d'expliquer l'activation du

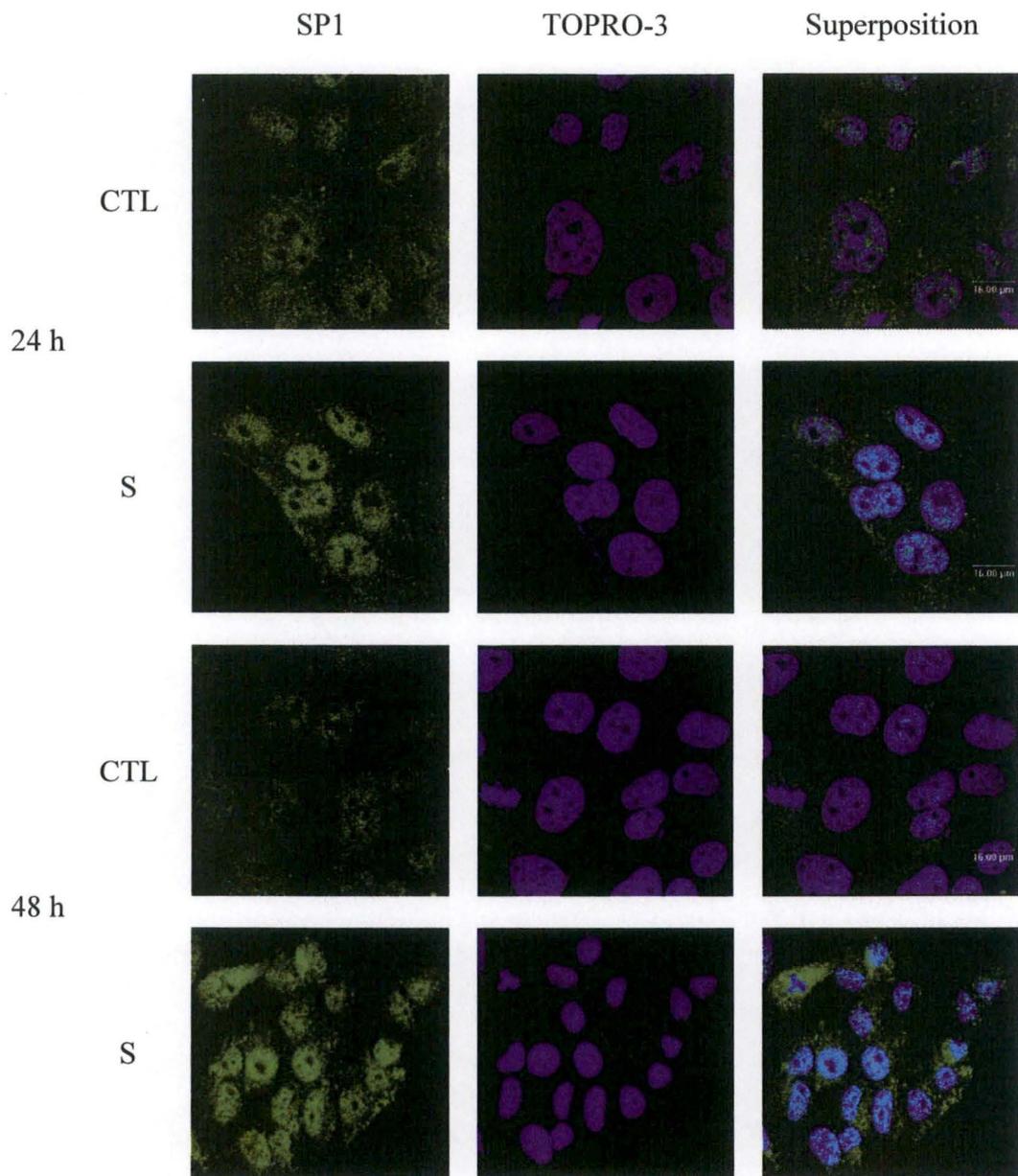


Figure III.23 : Marquages en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale du facteur de transcription Sp1 dans des cellules 143B incubées en présence (S) ou non (CTL) de saccharose à 100 mM pendant 24 h ou 48 h. Les marquages sont réalisés sur les cellules fixées à la PFA et perméabilisées au Triton-X100 en présence d'anticorps primaires dirigés contre Sp1 et d'anticorps secondaires couplés à une sonde Alexa réémettant de la fluorescence à 519 nm. Un marquage au TOPRO-3 permet de visualiser le noyau des cellules. Les microphotographies sont prises séquentiellement sur deux canaux différents et sont ensuite superposées.

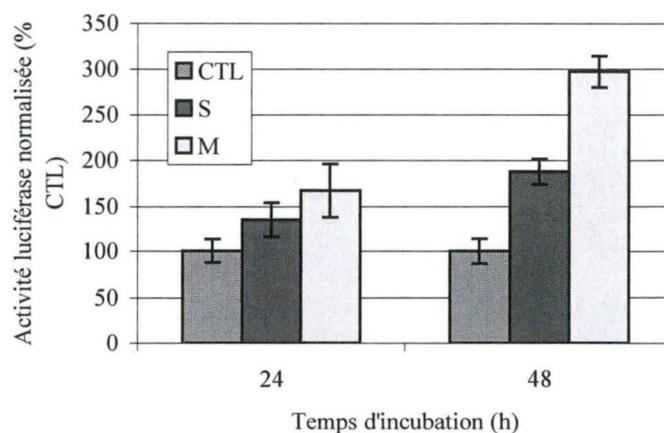


Figure III.24 : Dosage de l'activité luciférase dans des cellules 143B préalablement co-transfectées pendant 6 h au Superfect avec un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur synthétique contenant 3 sites de fixation pour le facteur Sp1 et le plasmide codant pour la β -galactosidase. Le lendemain, les cellules sont incubées en présence ou non (contrôles = CTL) de saccharose (S) ou de maltose (M) à 100 mM. Les activités luciférase et β -galactosidase sont mesurées au terme d'incubations de 24 h et 48 h. Les résultats d'activité luciférase sont normalisés par l'activité β -galactosidase et sont exprimés en pourcentages des cellules contrôles correspondantes. Ces résultats représentent la moyenne \pm un écart-type pour $n = 3$.

rapporteur lors d'une surcharge lysosomale. L'étape suivante de notre recherche a donc consisté à étudier l'état d'activation de chacun de ces facteurs séparément.

III.2.8 Etude de l'état d'activation du facteur de transcription Sp1

Nous avons commencé par caractériser l'état d'activité du facteur de transcription Sp1 dans des cellules incubées en présence ou non de saccharose ou de maltose 100 mM. L'étude de ce facteur est en effet justifiée par son implication connue dans l'activation du promoteur du gène codant le RLDL, mais également par le fait que l'on trouve des sites de liaison potentiels pour ce facteur dans la plupart des promoteurs analysés *in silico*, notamment dans les promoteurs de LAMP-2, de l' α -mannosidase et de Rab-7. Nous avons, pour l'étude du facteur Sp1, eu recours aux techniques de transfection transitoire d'un gène rapporteur luciférase répondant à ce facteur et à des marquages en immunofluorescence suivis d'observations en microscopie confocale.

III.2.8.1 Mise en évidence de l'abondance et de la localisation du facteur de transcription Sp1 en immunofluorescence

Les résultats de ces marquages sont présentés à la figure III.23. On peut observer que l'abondance du facteur de transcription Sp1 augmente dans le noyau des cellules incubées en présence de saccharose 100 mM par rapport aux cellules contrôles, et ce, après 24 h et 48 h d'incubation. Pour tenter de confirmer ce résultat et rechercher une augmentation éventuelle de l'activité de ce facteur dans des cellules incubées en présence de saccharose, nous avons transfecté transitoirement des cellules 143B avec une construction rapporteur luciférase activable par ce facteur.

III.2.8.2 Etude de l'activité transactivatrice de Sp1 par transfection transitoire de cellules avec un système rapporteur luciférase

Les cellules 143B ont été co-transfectées transitoirement avec un plasmide contenant le gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur synthétique contenant 3 sites de fixation pour le facteur Sp1 et une construction codant pour la β -galactosidase. Les résultats obtenus sont présentés à la figure III.24. On constate que le facteur Sp1 est activé dans les cellules incubées en présence de saccharose 100 mM, très légèrement à 24 h (135 %) et de façon plus importante à 48 h (188 %). Cependant, on constate également que le maltose a un effet encore bien plus important sur l'activation de ce facteur. En effet, en présence de maltose 100 mM, on obtient respectivement 167 % et 297 % après 24 h et 48 h d'incubation.

Ces résultats nous ont donc amené à exclure le facteur de transcription Sp1 en tant que responsable de la réponse spécifique à la surcharge lysosomale puisqu'il est également activé par le maltose. Rappelons que le rapporteur luciférase sous contrôle du fragment du promoteur du RLDL n'est que très faiblement activé dans les cellules incubées en présence de maltose pendant 48 h (figure III.22). Le facteur Sp1 ne semble donc pas être le meilleur candidat pour expliquer l'activité de ce rapporteur.

Nous nous sommes alors intéressés à YY-1, un autre facteur capable de réguler l'expression du promoteur du RLDL. Au niveau du promoteur de ce gène, YY-1 a une action de répresseur, en inhibant l'interaction activatrice et synergique entre Sp1 et SREBP. L'activation de ce promoteur, montrée par une augmentation de l'activité du gène luciférase en système rapporteur dans les cellules incubées en présence de saccharose, nous a fait émettre l'hypothèse que ce facteur était peut-être sous-exprimé dans ces cellules. L'activation du promoteur du RLDL, dans ce cas, s'expliquerait par une levée de l'inhibition due à YY-1 en réponse à la surcharge lysosomale.

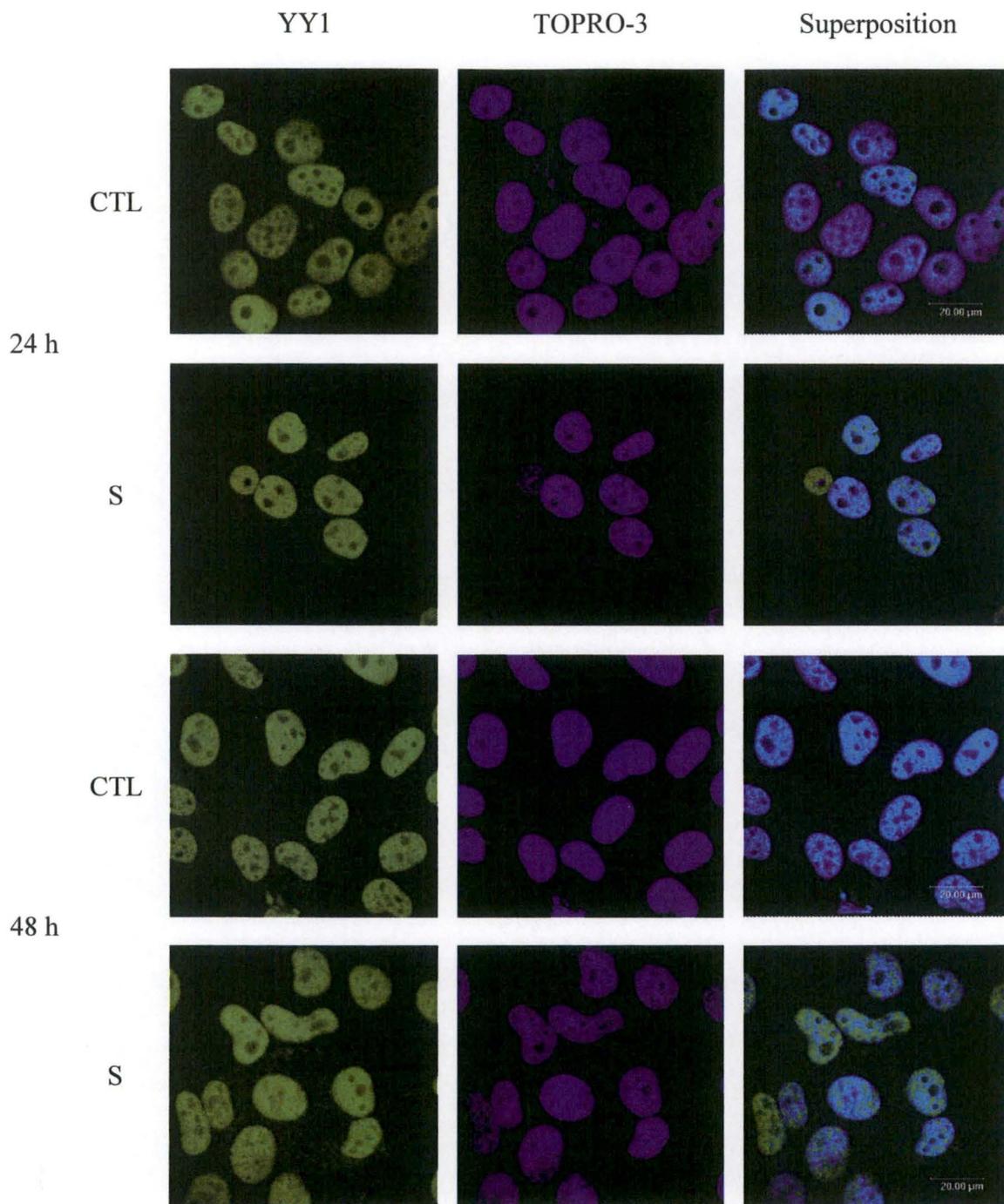


Figure III.25 : Marquages en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale du facteur de transcription YY1 dans des cellules 143B incubées en présence (S) ou non (CTL) de saccharose à 100 mM pendant 24 h ou 48 h. Le marquage en immunofluorescence est réalisé sur des cellules fixées à la PFA et perméabilisées au Triton-X100 en présence d'anticorps primaires dirigés contre YY1 et d'anticorps secondaires couplés à une sonde Alexa réémettant de la fluorescence à 519 nm. Un marquage au TOPRO-3 permet de visualiser le noyau des cellules. Les microphotographies sont prises séquentiellement sur deux canaux différents et sont ensuite superposées.

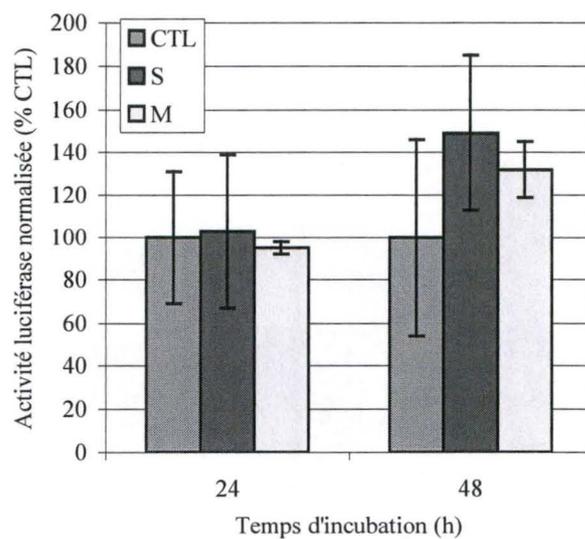


Figure III.26 : Dosage de l'activité luciférase dans des cellules 143B préalablement co-transfectées pendant 6 h au Superfect avec un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur synthétique pour YY1 constitué d'un fragment du promoteur du gène Msx2 et le plasmide codant pour la β -galactosidase. Le lendemain, les cellules sont incubées en présence ou non (contrôles = CTL) de saccharose (S) ou de maltose (M) à 100 mM. Les activités luciférase et β -galactosidase sont mesurées au terme d'incubations de 24 h et 48 h. Les résultats d'activité luciférase sont normalisés par l'activité β -galactosidase et sont exprimés en pourcentages des cellules contrôles correspondantes. Ces résultats représentent la moyenne \pm un écart-type pour $n = 3$.

III.2.9 Etude de l'état d'activation du facteur de transcription YY-1

Pour l'étude comparative de l'abondance et de l'état d'activité du facteur de transcription YY-1 dans des cellules contrôles et des cellules incubées en présence de saccharose ou de maltose, nous avons dans un premier temps réalisé des marquages en immunofluorescence suivis d'observations en microscopie confocale, afin de visualiser l'abondance et la localisation subcellulaire de ce facteur. Dans un deuxième temps, nous avons déterminé l'état d'activité de YY-1 dans des cellules contrôles et des cellules incubées en présence de saccharose ou de maltose à 100 mM en transfectant préalablement ces cellules de manière transitoire avec une construction rapporteur luciférase répondant à YY-1.

III.2.9.1 Mise en évidence de l'abondance et de la localisation du facteur de transcription YY-1 en immunofluorescence

Les résultats obtenus pour ces marquages sont présentés à la figure III.25. On observe que le facteur YY-1 est relativement abondant dans les noyaux, tant des cellules contrôles que des cellules incubées dans un milieu contenant du saccharose à 100 mM et qu'il n'y a pas de marquage du cytosol. Cela semble infirmer notre hypothèse d'une sous-expression du facteur YY-1 dans les cellules accumulant du saccharose. Cependant, l'abondance nucléaire d'un facteur de transcription n'étant pas nécessairement le reflet de son activité au niveau du promoteur d'un gène cible, cette expérience ne permet pas de tirer de conclusion définitive. Nous avons alors entrepris d'étudier l'activité de YY-1 par la transfection transitoire des cellules avec un système rapporteur luciférase répondant à ce facteur.

III.2.9.2 Etude de l'activité transactivatrice du facteur YY-1 par transfection transitoire des cellules avec un système rapporteur luciférase

Les cellules 143B ont été co-transfectées transitoirement avec un plasmide contenant un gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle du promoteur du gène *Msx2* répondant à YY-1 et une construction codant pour la β -galactosidase (figure III.26). Comme on peut le constater, après 24 h d'incubation, l'activité luciférase normalisée est inchangée dans les cellules incubées en présence de saccharose ou de maltose à 100 mM. Cela semble suggérer que l'activité de YY-1 n'est pas modifiée dans ces conditions. Après 48 h d'incubation, cette activité est légèrement augmentée dans les cellules incubées en présence de saccharose mais également dans les cellules incubées en présence de maltose. Ces résultats, en accord avec les observations obtenues en immunofluorescence, semblent indiquer que l'activation observée du promoteur tronqué du gène codant pour le RLDL (figure III.22) ne résulte pas d'une levée de la répression induite par YY-1.

III.2.10 Etude de l'état d'activation du facteur de transcription SREBP

Nous nous sommes alors intéressés à SREBP, connu pour participer à l'activation du promoteur du gène codant pour le RLDL. Un argument supplémentaire justifiant notre intérêt pour ce facteur de transcription est que l'on retrouve des sites de liaison potentiels pour ce facteur de transcription dans les promoteurs des gènes codant pour les protéines lysosomales CLN3, LAMP-1 et la neuraminidase. De plus, souvenons-nous du résultat obtenu sur l'activation du système rapporteur luciférase sous le contrôle du promoteur du gène codant la protéine S14 répondant à SREBP (figure III.22).

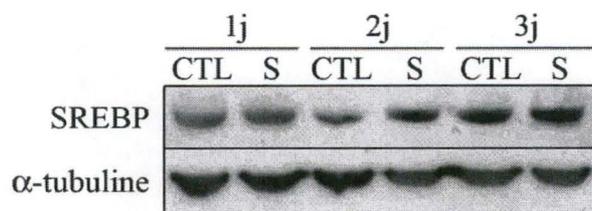


Figure III.27 : Analyse en Western blotting de l'abondance cellulaire du facteur de transcription SREBP-1 dans des cellules incubées pendant 1, 2 ou 3 j en présence ou non (CTL) de saccharose (S) à 100 mM. Au terme des incubations, les cellules sont lysées dans un tampon contenant 1 % de Triton-X100 et 25 μ g de protéines sont chargés dans un gel NuPage 4-12 %. Le facteur de transcription SREBP-1 est détecté en présence d'anticorps primaires anti-SREBP-1 et révélé en présence d'anticorps secondaires couplés à la HRP. La révélation est réalisée en présence du substrat de la peroxydase (H_2O_2) et de luminol. Les photons libérés par la réaction impriment un film autoradiographique, qui est ensuite plongé dans un bain de révélateur puis dans un bain de fixateur.

Un contrôle de charge est réalisé par l'immunodétection de l' α -tubuline sur la même membrane.

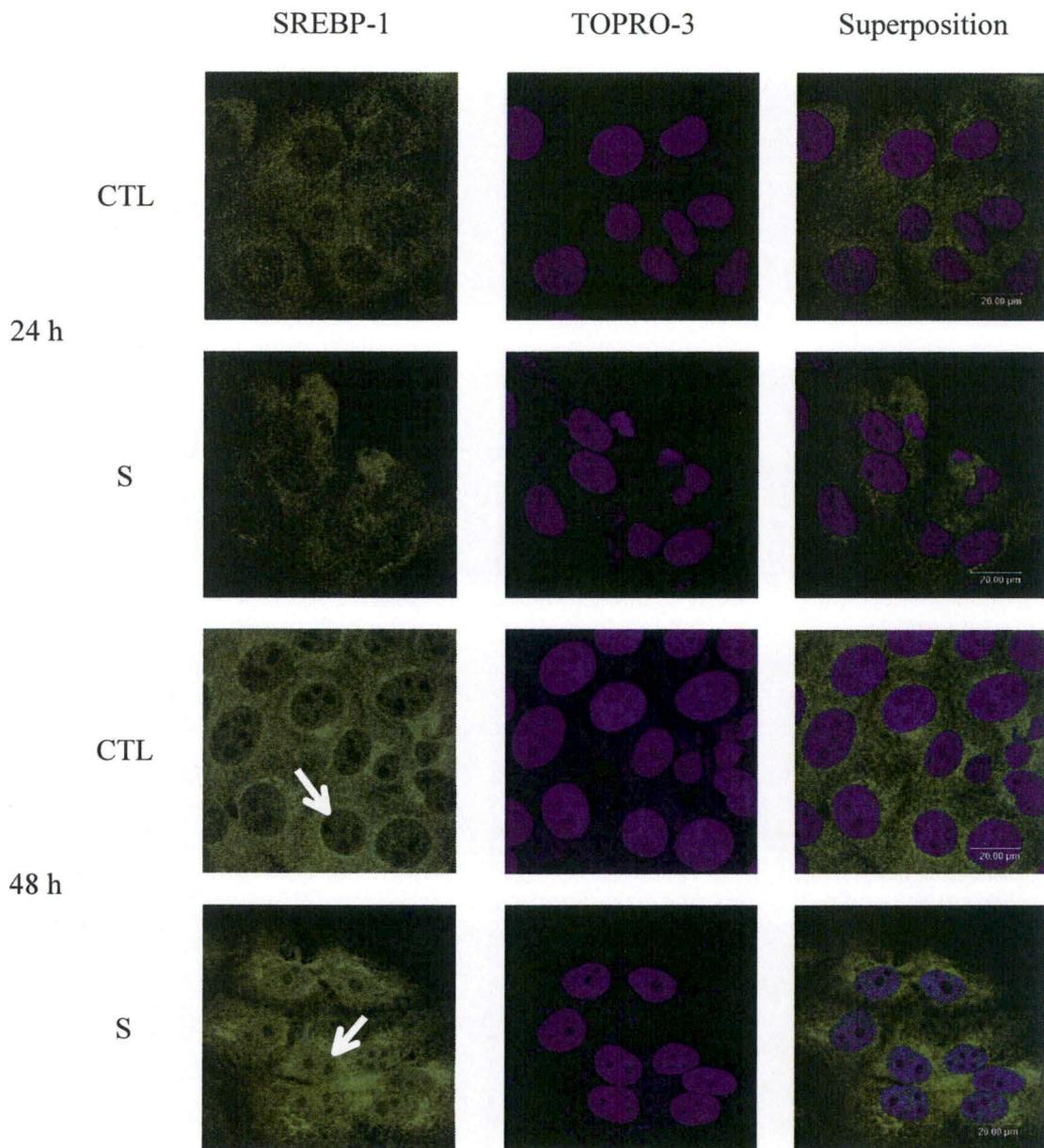


Figure III.28 : Marquages en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale du facteur de transcription SREBP-1 dans des cellules 143B incubées en présence (S) ou non (CTL) de saccharose à 100 mM pendant 24 h ou 48 h. Le marquage en immunofluorescence est réalisé sur des cellules fixées à la PFA et perméabilisées au Triton-X100 en présence d'anticorps primaires dirigés contre SREBP-1 puis d'anticorps secondaires couplés à une sonde Alexa réémettant de la fluorescence à 519 nm. Un marquage au TOPRO-3 permet de visualiser le noyau des cellules. Les microphotographies sont prises séquentiellement sur deux canaux différents et sont ensuite superposées.

III.2.10.1 Analyse en Western blotting de l'abondance du facteur de transcription SREBP-1

Dans cette expérience, les cellules 143B ont été incubées pendant 1, 2 et 3 jours en présence ou non de saccharose 100 mM. Au terme des incubations, des lysats cellulaires ont été préparés et l'abondance de SREBP-1 a été analysée en Western blotting (figure III.27). Cette expérience ne révèle pas de modification de l'abondance globale du facteur SREBP-1 dans les cellules incubées en présence de saccharose 100 mM par rapport aux cellules contrôles. Cependant, rappelons brièvement le mode d'activation de ce facteur de transcription. Lorsqu'il n'est pas activé, ce facteur est séquestré dans la membrane du RE. C'est seulement lorsqu'il est activé par une déplétion cellulaire en stérols que son domaine amino-terminal de 68 kDa est libéré de la membrane du RE par protéolyse partielle (point I.1.2.1) et peut migrer dans le noyau, où il se fixe aux séquences SRE (Sterol Regulatory Element) dans les promoteurs des gènes cibles et active ainsi leur transcription [Brown et Goldstein, 1999]. Nous avons donc voulu visualiser la localisation (cytosolique ou nucléaire) de ce facteur par des marquages en immunofluorescence suivis d'observations en microscopie confocale.

III.2.10.2 Mise en évidence de l'abondance et de la localisation du facteur de transcription SREBP en immunofluorescence

Les résultats obtenus lors de ces marquages sont illustrés à la figure III.28. Il est intéressant de constater que, surtout après 48 h d'incubation, la distribution cellulaire de ce facteur est très différente entre les cellules contrôles et les cellules incubées en présence de saccharose à 100 mM. Dans ces dernières, on observe une nette translocation du facteur de transcription SREBP-1 dans le noyau, même si l'abondance cellulaire totale de ce facteur ne semble pas modifiée, ce que nous observions précédemment dans l'analyse en Western blotting. L'augmentation d'abondance du facteur SREBP-1 dans les noyaux des cellules incubées en présence de saccharose à 100 mM est fort intéressante. En effet, elle suggère que ce facteur est activé et transloque dans le noyau de cellules présentant une surcharge lysosomale en saccharose.

Nous n'avons pas répété les expériences de marquages en immunofluorescence et de transfection de la construction rapporteur luciférase placé sous le contrôle du promoteur de la protéine S14 dans des cellules incubées en présence de maltose. Cependant, nous pouvons supposer que l'activation de SREBP-1 dans les cellules incubées en présence de saccharose est spécifique de la surcharge lysosomale. En effet, rappelons que la construction contenant un fragment du promoteur du gène codant le RLDL n'était que très peu activée dans les cellules incubées en présence de maltose (figure III.22).

Les effets d'une surcharge lysosomale induite par le saccharose sur la biosynthèse du cholestérol n'ont pas encore été décrits dans la littérature. Cependant, il est démontré depuis longtemps que les lysosomes jouent un rôle important dans l'homéostasie du cholestérol. En effet, les hydrolases lysosomales hydrolysent le LDL endocyté. Le cholestérol libre est alors transféré depuis les lysosomes vers les membranes cellulaires [Goldstein, Dana, 1975].

Des travaux récents de Eskelinen *et al.* portant sur des fibroblastes issus de souris déficientes pour les gènes des protéines LAMP-1 et LAMP-2 ont montré une accumulation de cholestérol non estérifié dans les endosomes/lysosomes de ces fibroblastes, présentant un phénotype semblable à celui observé dans les fibroblastes des patients souffrant de la maladie de Niemann-Pick. Ces auteurs ont aussi constaté dans ces fibroblastes une délocalisation des protéines Rab-7 et NPC1 au niveau de ces endosomes/lysosomes chargés de cholestérol. Ces auteurs n'expliquent cependant pas les raisons mécanistiques de cette accumulation de

cholestérol due à la déficience en protéines LAMPs [Eskelinen, Schmidt, 2004]. Il est donc possible qu'un trafic lysosomal altéré (ici, du fait d'une absence des protéines LAMPs) soit responsable d'un profond déficit de distribution du cholestérol endocyté.

L'accumulation de saccharose dans les lysosomes interfère peut-être avec le métabolisme des LDL, soit au niveau de l'internalisation, soit de leur hydrolyse ou de la libération du cholestérol libre, ce qui pourrait provoquer une diminution de la quantité de cholestérol cellulaire et entraînerait l'augmentation de la translocation de SREBP-1 observée dans nos conditions. Montgomery *et al.* ont montré que l'accumulation d'un substrat non digestible au sein des lysosomes, tel que le saccharose, inhibe fortement la capacité de fusion des lysosomes avec les vésicules endosomales. Ceci permet de soulever l'hypothèse que les LDL endocytés dans la cellule ne sont pas acheminés aux lysosomes pour y être processés. Ceci résulterait également en un appauvrissement en cholestérol dans la cellule, ce qui justifierait à nouveau l'activation de SREBP.

La surcharge lysosomale induite par le saccharose induit une vacuolisation importante du compartiment lysosomal au sein de la cellule [Cohn et Ehrenreich, 1969]. Cette vacuolisation pourrait compromettre aussi le recyclage du RLDL des endosomes vers la membrane plasmique, ce qui pourrait affecter la quantité de LDL endocytés par la cellule. Enfin, le trafic intracellulaire vers le RE du cholestérol libéré des LDL par les lysosomes pourrait aussi être compromis par la surcharge. Quelle qu'en soit la cause, l'appauvrissement de la membrane du RE en cholestérol pourrait être responsable de l'activation de SREBP-1. Il serait intéressant de réaliser des études en real-time PCR pour comparer l'abondance des transcrits du gène codant pour le RLDL dans des cellules contrôles et des cellules incubées en présence de saccharose ou de maltose à 100 mM.

Tout ceci pourrait expliquer pourquoi la surexpression des marqueurs lysosomaux en réponse à la surcharge lysosomale dans les cellules est corrélée à une activation du promoteur du RLDL et une activation du facteur de transcription SREBP-1. Mais cela ne permet pas encore de conclure que SREBP contribue à la surexpression de certains marqueurs lysosomaux conduisant au phénotype de surcharge lysosomale.

Néanmoins, au vu des résultats des expériences de transfection transitoire et de marquages en immunofluorescence et microscopie confocale menées pour étudier l'activité et l'abondance de ce facteur de transcription dans des cellules incubées en présence ou non de saccharose ou de maltose 100 mM, il semble que ce facteur puisse jouer un rôle dans la réponse spécifique de la cellule à une surcharge lysosomale induite par le saccharose. Ce résultat est encourageant et devrait donc nous amener à poursuivre l'étude de la communication moléculaire rétrograde lysosome-noyau induite par une surcharge en saccharose en commençant par ce facteur de transcription.

IV. Conclusions et perspectives

IV. Conclusions et perspectives

Les organites subcellulaires tels que les mitochondries, le réticulum endoplasmique ou les lysosomes ne sont pas des entités isolées au sein des cellules. Il est à présent bien établi que ces organites communiquent avec le noyau, particulièrement en cas de dysfonctionnement. Si l'on commence à comprendre les voies de communication moléculaires rétrogrades initiées entre les mitochondries ou le RE et le noyau, ces processus sont encore mal compris en ce qui concerne les lysosomes, malgré les nombreuses études décrivant les pathologies associées aux dysfonctionnements du lysosome. Nous avons entrepris cette étude dans le but de mieux comprendre la nature des acteurs moléculaires intervenant dans les voies de signalisation rétrogrades lysosomes-noyau. Le concept de communication rétrograde implique que le lysosome renseigne le noyau sur son état d'activité à travers l'activation de facteurs de transcription capables de modifier l'expression de gènes codant en particulier pour des protéines lysosomales.

Nous avons basé notre travail sur un modèle de surcharge lysosomale induite dans des cellules 143B par la présence de saccharose 100 mM dans le milieu de culture. Ce type cellulaire est différent de celui fréquemment utilisé (fibroblastes de peau humains) dans la littérature [Karageorgos, Isaac, 1997]. Le saccharose est pinocyté par la cellule et acheminé par la voie endocytaire jusqu'aux lysosomes, où il s'accumule en raison de l'absence d'invertase dans les cellules. Cette accumulation conduit à l'apparition de « sucrosomes » dans la cellule, à savoir les lysosomes gonflés et chargés de saccharose [Cohn et Ehrenreich, 1969]. Nous avons testé la réponse cellulaire à la surcharge par l'analyse du niveau d'expression de plusieurs marqueurs lysosomaux comme LAMP-1, LAMP-2 et la cathepsine D, mais également par le dosage d'activités et enzymatiques de l' α -mannosidase et de la β -glucosidase. La surcharge étant susceptible d'affecter le trafic intracellulaire au niveau de la voie endocytaire conduisant aux lysosomes, nous nous sommes également intéressés au niveau d'expression d'une protéine connue pour participer à la régulation de ce trafic : Rab-7. La surexpression de ces marqueurs nous a permis de valider notre modèle de surcharge lysosomale induite par le saccharose dans les cellules 143B.

Afin d'écartier l'implication éventuelle d'un choc hyperosmotique dû à la présence d'un disaccharide à forte concentration dans le milieu extracellulaire sur le phénotype observé, nous avons réalisé le même type d'expériences en remplaçant le saccharose par du maltose 100 mM. Le maltose est également pinocyté par les cellules et acheminé aux lysosomes, où il ne s'accumule pas ou peu en raison de son hydrolyse par la maltase acide (α -1,4-glucosidase) présente dans ce compartiment. Nous avons examiné l'expression de la protéine LAMP-2 dans ces conditions et avons pu constater qu'elle n'était pas surexprimée, alors qu'elle s'accumule dans les cellules incubées en présence de saccharose. Nous avons conclu de cette expérience que si les cellules subissent un stress hyperosmotique en présence de saccharose, celui-ci n'est probablement pas le principal responsable de la réponse observée.

Après avoir validé le modèle de surcharge lysosomale, nous nous sommes intéressés à l'étude des acteurs moléculaires potentiellement impliqués dans la réponse rétrograde. Nous avons posé l'hypothèse d'une régulation de l'expression des marqueurs au niveau transcriptionnel. En effet, rappelons ici que Karageorgos *et al.* ont montré une augmentation de l'abondance des transcrits des gènes codant pour les protéines LAMP-1 et LAMP-2 dans des fibroblastes incubés en présence de saccharose 100 mM [Karageorgos, Isaac, 1997].

Pour tester cette hypothèse, nous avons commencé par étudier, en real-time PCR, l'abondance des transcrits des gènes codant les protéines LAMP-1, LAMP-2 et Rab-7, trois protéines qui semblent surexprimées dans les cellules atteintes d'une surcharge lysosomale.

Cette étude a permis de confirmer une augmentation de l'abondance des transcrits des protéines LAMP-1 et Rab-7. Cependant, elle semble indiquer que la protéine LAMP-2 est régulée à un autre niveau, puisque l'abondance de son transcrit n'est pas modifiée dans les cellules incubées en présence de saccharose. Il faut cependant considérer les résultats de cette expérience avec prudence. D'une part parce qu'ils sont en contradiction avec les observations de Karageorgos *et al.* pour la protéine LAMP-2. D'autre part parce que ces résultats sont issus d'une expérience unique en real-time PCR réalisée à partir d'une seule extraction d'ARN par condition. Il est donc essentiel de répéter cette expérience sur un plus grand nombre d'échantillons. Si ce résultat se confirmait, nous pourrions exclure que l'augmentation observée d'abondance de LAMP-2 dans les cellules incubées en présence de saccharose résulte d'une augmentation de la stabilité de l'ARNm ou d'une régulation transcriptionnelle de ce gène. La régulation de la protéine LAMP-2 pourrait dès lors s'effectuer au niveau traductionnel ou post-traductionnel.

La surexpression de la protéine LAMP-2 pourrait être due à une augmentation de sa stabilité. Kundra *et al.* ont montré que l'endocytose d'endoglycosidase H par des cellules conduisait à une dégradation rapide des protéines LAMP-1 et LAMP-2, suggérant que le haut degré de glycosylation de celles-ci les protégeait de l'hydrolyse [Kundra et Kornfeld, 1999]. La surexpression apparente de LAMP-2 est donc peut-être imputable à une modification de son taux de dégradation, passant par une modification de la structure de ses chaînes oligosaccharidiques.

Rappelons par ailleurs que nous avons constaté une légère diminution du poids moléculaire de la protéine LAMP-2 en fonction du temps d'incubation des cellules en présence de saccharose. Ceci nous permet de poser une autre hypothèse pour tenter d'expliquer la surexpression de la protéine LAMP-2. En effet, la différence de poids moléculaire entre les signaux observés pour la protéine LAMP-2 dans les cellules incubées en présence de saccharose et ceux des cellules contrôles est estimée à 2 ou 3 kDa. Cette diminution pourrait être due à la perte du fragment cytosolique et du domaine transmembranaire de la protéine LAMP-2 dans les cellules surchargées en saccharose. Le mécanisme protéolytique assurant le renouvellement de LAMP-2 n'est pas connu. Il peut se produire une microinvagination de la membrane lysosomale conduisant à l'isolement de vésicules dans la lumière de l'organite [Wilkening, Linke, 1998]. Ce phénomène pourrait conditionner le catabolisme de certains constituants membranaires dont LAMP-2. Il semble intéressant de proposer que l'augmentation de stabilité de LAMP-2 résulte de la perte de son ancrage membranaire suite à la surcharge, ce qui retarderait sa protéolyse. Il s'agit là d'une hypothèse qui mériterait d'être testée. Nous pourrions d'abord mesurer l'ancrage membranaire de LAMP-2 pour des temps croissants de contact des cellules avec le saccharose.

Andrejewski *et al.* ont montré que dans des fibroblastes de souris déficientes en protéines LAMP-1, la protéine LAMP-2 est surexprimée. Ils ont aussi montré que cette surexpression compensatoire n'était due ni à une transcription augmentée du gène de LAMP-2, ni à une augmentation de la stabilité de l'ARNm, ni à un temps de demi-vie augmenté de la protéine. Ces auteurs suggèrent donc une régulation de LAMP-2 au niveau traductionnel [Andrejewski, Punnonen, 1999], ce qui est en accord avec notre résultat obtenu pour la quantification de l'abondance relative des transcrits de LAMP-2 en real-time PCR.

L'analyse en real-time PCR semble avoir confirmé une augmentation de l'abondance des transcrits des gènes codant les protéines LAMP-1 et Rab-7 suggérant que certains marqueurs pourraient être surexprimés suite à une activation de leur transcription. Nous avons donc poursuivi notre travail en recherchant et en caractérisant l'état d'activation de plusieurs facteurs de transcription.

Nous avons constitué une liste de facteurs de transcription sur lesquels il nous paraissait intéressant de travailler. Pour cela, nous avons dressé une liste de protéines lysosomales connues pour être surexprimées dans des fibroblastes incubés en présence de saccharose à partir de la littérature. Nous avons ensuite effectué une recherche *in silico* afin de trouver des sites de liaison potentiels pour des facteurs de transcription au sein des promoteurs de ces gènes. Enfin, nous avons dû tenir compte des outils disponibles au laboratoire pour l'étude de ces facteurs, à savoir des constructions rapporteurs, des anticorps et des tests d'activité de liaison des facteurs à leur séquence consensus. Sur base de ces critères, nous avons étudié les facteurs de transcription suivants : C/EBP α et β , NF-kB, AP-1, CREB, c-Myc, GATA-4, Sp1, YY-1 et SREBP-1. L'étude de ces différents facteurs a été abordée par des analyses complémentaires apportant de l'information sur l'abondance, la localisation et l'activité des facteurs de transcription, utilisant les techniques des marquages en immunofluorescence suivis d'observations en microscopie confocale, des tests d'activité de liaison des facteurs à leur séquence d'ADN consensus, la transfection transitoire de cellules avec des constructions rapporteurs contenant le gène de la luciférase placé sous contrôle d'un promoteur répondant spécifiquement à un ou plusieurs facteurs d'intérêt et le Western blotting. Dans la plupart de ces expériences, nous avons utilisé comme contrôles des cellules non traitées, mais aussi des cellules incubées en présence de maltose à 100 mM pour rechercher l'effet éventuel d'un stress hyperosmotique sur l'activité de ces facteurs de transcription. L'ensemble de ces expériences nous a permis d'écarter la plupart de nos candidats comme acteurs spécifiques dans la réponse à la surcharge. En premier lieu, les facteurs CREB, AP-1 et GATA-4 qui ne sont pas activés dans les cellules incubées en présence de saccharose. Ensuite, les facteurs C/EBP α et β , NF-kB, et c-Myc, qui sont activés dans les cellules incubées en présence de saccharose mais également, dans une certaine mesure, dans les cellules incubées en présence de maltose. Dans ces cellules, l'activation de ces facteurs est probablement due à un stress hyperosmotique provoqué par la présence d'un disaccharide à forte concentration dans le milieu extracellulaire.

Helip-Wooley *et al.* ayant montré par la technologie des microdamiers à ADN la surexpression, dans des cellules incubées en présence de saccharose, de gènes codant pour des enzymes impliquées dans le métabolisme du cholestérol et des acides gras, cela nous a amené à nous intéresser au facteur de transcription SREBP-1. En effet, ce facteur de transcription est connu pour sa participation à l'activation des promoteurs de la plupart de ces gènes. Nous disposons au laboratoire d'une construction rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle d'un fragment du promoteur du RLDL. Ce promoteur possède des sites de liaison pour les facteurs SREBP, Sp1 et YY-1.

Les résultats obtenus à partir de la transfection transitoire de cellules 143B avec cette construction rapporteur ont révélé une forte augmentation de l'activité luciférase dans les cellules incubées en présence de saccharose, mais pas dans les cellules incubées en présence de maltose. Cette observation suggère une activation spécifique (due à la surcharge) de ce fragment de promoteur. Ce résultat est doublement intéressant. D'une part, il permet de penser qu'au moins un de ces trois facteurs (SREBP-1, Sp1 ou YY-1) est spécifiquement régulé en condition de surcharge lysosomale, et d'autre part, il semble en accord avec les résultats de Helip-Wooley *et al.* ayant montré une expression différentielle de plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol dans des cellules incubées en présence de saccharose. Nous avons donc analysé l'activité de chacun de ces facteurs séparément dans des cellules incubées en présence de saccharose ou de maltose. Sp1 et YY-1 sont activés tant en présence de saccharose que de maltose. Nous avons donc déduit que le facteur SREBP-1 pourrait être le facteur responsable de l'activation spécifique du gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle du promoteur du RLDL dans les cellules incubées en présence de saccharose. Les résultats obtenus par des marquages en immunofluorescence et observations

en microscopie confocale montrent également une translocation nucléaire évidente de ce facteur dans les cellules surchargées en saccharose. Mentionnons également que l'activation d'un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur authentique de S14 (promoteur qui répond lui aussi à SREBP-1) dans les cellules incubées en présence de saccharose est un résultat qui renforce l'argument de l'activation potentielle de SREBP-1 dans ces conditions. Nous devrions vérifier que ce promoteur n'est pas activé dans les cellules incubées en présence de maltose. Toutefois, étant donné que le promoteur du RLDL n'est pas activé dans des cellules incubées en présence de maltose, et ce malgré l'activation des facteurs Sp1 et YY-1, nous avons de bonnes raisons de penser que SREBP-1 est bien le facteur responsable de l'activation du gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle du promoteur tronqué du RLDL en réponse à la surcharge lysosomale en saccharose.

Il est clair que les lysosomes jouent un rôle important dans l'homéostasie du cholestérol [Goldstein, Dana, 1975 ; Eskelinen, Schmidt, 2004]. Montgomery *et al.* ont montré que l'accumulation d'un substrat non digestible au sein des lysosomes (tel que le saccharose) inhibe fortement la capacité de fusion des lysosomes avec les vésicules endosomales. Ceci permet d'émettre l'hypothèse que les LDL endocytés pourraient ne plus être acheminés aux lysosomes pour y être catabolisés, ce qui résulterait en un appauvrissement en cholestérol cellulaire, et conduirait à l'activation de SREBP-1.

La surcharge lysosomale induite par le saccharose pourrait compromettre le recyclage du RLDL des endosomes vers la membrane plasmique, ce qui affecterait la quantité de LDL endocytés par la cellule. Enfin, le trafic intracellulaire vers le RE du cholestérol libéré des LDL dans les lysosomes pourrait aussi être compromis par la surcharge. Quelle qu'en soit la cause, l'appauvrissement en cholestérol libre dans la cellule pourrait contribuer à l'activation de SREBP-1.

Ces hypothèses permettent d'expliquer l'activation du promoteur du RLDL et une activation du facteur de transcription SREBP-1 dans les cellules incubées en présence de saccharose.

A la lumière de ces informations, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées pour continuer cette étude.

Il nous semble indispensable de répéter certaines de nos expériences sur d'autres types cellulaires, en particulier sur une lignée de fibroblastes de peau humains telle que la lignée BJ1. L'étude comparative sur cette lignée cellulaire, qui a une cinétique de croissance plus lente que les cellules de la lignée 143B, nous permettrait d'éviter la contrainte des « repiquages » hebdomadaires au cours de cinétiques longues de 10 à 20 jours. Ainsi, nous observerions si les effets de la surcharge ne sont pas affectés par ces repiquages. Cette approche aurait également l'avantage de nous placer dans des conditions expérimentales plus proches de celles décrites par Karageorgos *et al.* qui, rappelons-le, ont observé une régulation transcriptionnelle du gène codant la protéine LAMP-2.

Cependant, il reste beaucoup d'éléments à approfondir dans notre étude de la surcharge lysosomale induite par le saccharose dans la lignée de cellules 143B. En premier lieu, il semble essentiel de vérifier le résultat obtenu en real-time PCR pour l'abondance des transcrits du gène codant pour la protéine LAMP-2, afin de s'assurer que celle-ci n'est pas régulée au niveau transcriptionnel. Nous envisageons en même temps de réaliser cette expérience pour la cathepsine D, elle aussi surexprimée en présence de saccharose.

Parmi les priorités, nous pensons qu'il est indispensable d'utiliser un autre contrôle de l'effet de la surcharge, en utilisant l'invertase. En effet, si l'on incube les cellules en présence simultanément de saccharose et d'invertase ou qu'on « précharge » les lysosomes d'invertase

avant la pinocytose du saccharose, cette molécule devrait être incapable de conduire à une surcharge lysosomale, du fait de son hydrolyse intralysosomale [Jahraus, Storrie, 1994].

Si nous confirmons nos observations, il serait intéressant d'investiguer plus en détail l'activation de SREBP-1. Nous pourrions en particulier tester en real-time PCR l'abondance des transcrits du gène endogène du promoteur du RLDL et analyser l'abondance du RLDL par Western blotting.

Plusieurs approches sont envisageables pour tester l'implication éventuelle du facteur SREBP-1 dans la réponse spécifique à la surcharge lysosomale.

Des cellules incubées en présence de milieu contenant du sérum délipidé éventuellement additionné de lovastatine (un inhibiteur de l'enzyme HMG-CoA réductase, enzyme régulatrice de la synthèse du cholestérol) devraient naturellement répondre par la régulation des gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol, en activant le facteur de transcription SREBP-1. Nous pourrions facilement tester l'activation de ce facteur en utilisant notre système rapporteur et en recherchant la translocation du facteur dans le noyau de cellules incubées dans ces conditions. S'il s'avère que ce facteur est bien activé dans ces conditions, nous pourrions tester l'abondance des protéines marqueurs. Cela nous permettrait de voir si une activation du facteur de transcription SREBP-1 en conditions autres que la surcharge lysosomale régule ou non l'expression de protéines lysosomales codées par des gènes qui possèdent des sites potentiels pour ce facteur dans leur promoteur.

Une autre approche qui serait également très intéressante serait d'inhiber l'expression de SREBP-1 dans des cellules incubées en présence de saccharose, par exemple par la technologie des siRNAs (short interfering ARN), et de voir si on observe une modification dans l'expression du marqueur lysosomal LAMP-1 (qui possède 5 sites de liaison potentiels pour ce facteur dans son promoteur) dans ces conditions.

D'autres facteurs de transcription sont potentiellement impliqués dans la réponse rétrograde lysosome-noyau induite par une surcharge lysosomale et nous pourrions commencer par nous intéresser aux facteurs découverts dans notre recherche *in silico* pour lesquels nous ne possédons pas encore d'outils d'étude au laboratoire. Plusieurs de ces facteurs sont des candidats intéressants. Le facteur MZF1 (Myeloid Zinc Finger-1) est un régulateur transcriptionnel intervenant dans le contrôle de l'hématopoïèse, essentiel dans la granulopoïèse. On retrouve deux sites de liaison potentiels pour ce facteur dans les promoteurs des gènes codant pour la cathepsine D, LAMP-1 et LAMP-2 et 18 sites de liaison potentiels dans le promoteur du gène codant pour l' α -mannosidase. Nous pourrions aussi nous intéresser à SRY (Sex determining Region Y), pour lequel on retrouve 18 sites de liaison potentiels dans le promoteur du gène codant l' α -mannosidase. Ce facteur est connu essentiellement pour son rôle dans la détermination et la différenciation sexuelles. Cependant, les facteurs coopérant avec celui-ci, ainsi que ses gènes cibles demeurent largement inconnus [Koopman, 2001]. Citons enfin le facteur de transcription USF, pour lequel on retrouve 10 sites de liaison potentiels dans le promoteur du gène codant pour la cathepsine D, 40 sites dans le promoteur de LAMP-1 et 2 sites dans les promoteurs de LAMP-2 et de l' α -mannosidase. USF est un facteur de transcription de la famille des b-HLH spécifique de la réponse aux stress, tels que l'irradiation UV, les infections virales et les cytokines pro-inflammatoires [Galibert, Carreira, 2001]. Cette implication dans les réponses aux stress, notamment les cytokines pro-inflammatoires pourrait également être intéressante dans le contexte de la réponse à la surcharge lysosomale. Souvenons-nous en effet que nous trouvons de nombreux exemples de pathologies de surcharge lysosomale associées à l'apparition de réponses pro-inflammatoires, notamment des cytokines.

Au-delà de cette recherche ciblée sur quelques facteurs de transcription d'intérêt, il serait intéressant de mener une étude sur les voies de signalisation importantes et leur éventuelle implication dans la réponse à la surcharge lysosomale. Nous pourrions pour cela envisager d'incuber les cellules en présence à la fois de saccharose et d'inhibiteurs spécifiques de ces voies, et d'observer ensuite le niveau d'expression des marqueurs lysosomaux dans ces cellules. Nous pourrions utiliser le BAPTA, un chélateur du calcium. En effet, le calcium est un messager important dans les voies de signalisation cellulaires, par exemple dans la réponse rétrograde induite par un dysfonctionnement mitochondrial (cf. Point I.1.1.2.2). Le SP600125 est un inhibiteur de la JNK, une protéine kinase qui phosphoryle c-Jun, activée en conditions de stress, pouvant être induite par des cytokines pro-inflammatoires, des endotoxines bactériennes, un choc osmotique, des radiations ou l'hypoxie [Bennett, Sasaki, 2001]. Il pourrait dès lors être fort intéressant d'observer la réponse à la surcharge dans des cellules où cette voie serait inhibée. Le SB203580 est un inhibiteur spécifique de la voie p38 MAPK. Nous avons déjà mentionné l'importance de cette voie dans la réponse cellulaire au stress. Le DRB (5,6-Dichloro-1-b-D-ribofuranosylbenzimidazole) est un inhibiteur de la caséine kinase II. La liste des cibles de cette protéine kinase est longue et variée ; elle inclut des enzymes impliquées dans la synthèse des acides nucléiques, telle que l'ARN polymérase II, de nombreux facteurs de transcription incluant c-Myc, N-myc, C-jun, p53, CREB, des protéines telles que la PKC, la PKA [Allende et Allende, 1995]. Nous pourrions enfin envisager d'utiliser le H89 (un inhibiteur de la PKA), le PD98059 (un inhibiteur de MEK 1/2) ou encore le LY294002 (un inhibiteur de la PI-3 kinase).

En conclusion, nous pensons avoir contribué à mieux comprendre l'effet d'une surcharge lysosomale sur l'état d'activité de plusieurs facteurs de transcription susceptibles de jouer un rôle dans l'expression différentielle de gènes dans ces conditions. En effet, notre étude nous a permis d'exclure un certain nombre de facteurs de transcription (AP-1, CREB, NF-kB, c-Myc, YY-1, Sp1, C/EBP α et β , GATA-4) dans la réponse spécifique à la surcharge lysosomale. Elle nous a surtout permis de mettre en évidence un rôle spécifique potentiel pour SREBP-1 dans la réponse à la surcharge lysosomale.

Cette étude de l'effet d'une surcharge lysosomale sur l'activité transcriptionnelle de la cellule est loin d'être achevée et mérite d'être poursuivie, tant pour son intérêt fondamental que pour les applications éventuelles que permettrait, à long terme, la compréhension des mécanismes de la réponse à la surcharge des lysosomes.

V. Bibliographie

V. Bibliographie

- Agarraberes, F. A. & Dice, J. F. A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci* **114**, 2491-9 (2001).
- Aguilera, B. et al. Transglycosidase activity of chitotriosidase: improved enzymatic assay for the human macrophage chitinase. *J Biol Chem* **278**, 40911-6 (2003).
- Akiyama, Y.
- Allende, J. E. & Allende, C. C. Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *Faseb J* **9**, 313-23 (1995).
- Amemiya-Kudo, M. et al. Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J Lipid Res* **43**, 1220-35 (2002).
- Amos, B. & Lotan, R. Modulation of lysosomal-associated membrane glycoproteins during retinoic acid-induced embryonal carcinoma cell differentiation. *J Biol Chem* **265**, 19192-8 (1990).
- Andersen, J. S. et al. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol* **12**, 1-11 (2002).
- Andrejewski, N. et al. Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. *J Biol Chem* **274**, 12692-701 (1999).
- Arabi, A., Rustum, C., Hallberg, E. & Wright, A. P. Accumulation of c-Myc and proteasomes at the nucleoli of cells containing elevated c-Myc protein levels. *J Cell Sci* **116**, 1707-17 (2003).
- Arnould, T. et al. CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation. *Embo J* **21**, 53-63 (2002).
- Austen, M., Luscher, B. & Luscher-Firzlaff, J. M. Characterization of the transcriptional regulator YY-1. The bipartite transactivation domain is independent of interaction with the TATA box-binding protein, transcription factor IIB, TAFII55, or cAMP-responsive element-binding protein (CPB)-binding protein. *J Biol Chem* **272**, 1709-17 (1997).
- Ayer, D. E., Lawrence, Q. A. & Eisenman, R. N. Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. *Cell* **80**, 767-76 (1995).
- Bakhshi, R., Goel, A., Seth, P., Chhikara, P. & Chauhan, S. S. Cloning and characterization of human cathepsin L promoter. *Gene* **275**, 93-101 (2001).
- Bauer, M. F., Hofmann, S., Neupert, W. & Brunner, M. Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends Cell Biol* **10**, 25-31 (2000).
- Beljaars, P. R., Fabry, F. H., Pickott, M. M. & Peeters, M. J. Quantitative fluorodensitometric measurement of aflatoxin B1 with a flying-spot densitometer. II. Comparative study of B1 measurements in spiked and naturally contaminated peanut products. *J Assoc Off Anal Chem* **55**, 1310-5 (1972).
- Bennett, B. L. et al. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13681-6 (2001).
- Biswas, G. et al. Retrograde Ca²⁺ signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organellar crosstalk. *Embo J* **18**, 522-33 (1999).
- Bowie, A. & O'Neill, L. A. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol* **59**, 13-23 (2000).
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54 (1976).
- Brambilla, L. et al. Mitochondrial respiratory chain deficiency leads to overexpression of antioxidant enzymes. *FEBS Lett* **418**, 247-50 (1997).
- Breen, G. A. & Jordan, E. M. Upstream stimulatory factor 2 activates the mammalian F1F0 ATP synthase alpha-subunit gene through an initiator element. *Gene Expr* **7**, 163-70 (1998).
- Brindle, P., Linke, S. & Montminy, M. Protein-kinase-A-dependent activator in transcription factor CREB reveals new role for CREM repressors. *Nature* **364**, 821-4 (1993).
- Brown, M. S. & Goldstein, J. L. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11041-8 (1999).

- Bushmeyer, S. M. & Atchison, M. L. Identification of YY-1 sequences necessary for association with the nuclear matrix and for transcriptional repression functions. *J Cell Biochem* **68**, 484-99 (1998).
- Butow, R. A. & Avadhani, N. G. Mitochondrial signaling; the retrograde response. *Mol Cell* **14**, 1-15 (2004).
- Carpentier, J. L., Fehlmann, M., Van Obberghen, E., Gorden, P. & Orci, L. Insulin receptor internalization and recycling: mechanism and significance. *Biochimie* **67**, 1143-5 (1985).
- Carstea, E. D. et al. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* **277**, 228-31 (1997).
- Champigny, M. J., Johnson, M. & Igdoura, S. A. Characterization of the mouse lysosomal sialidase promoter. *Gene* **319**, 177-87 (2003).
- Chapman, R., Sidrauski, C. & Walter, P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 459-85 (1998).
- Cohn, Z. A. & Ehrenreich, B. A. The uptake, storage, and intracellular hydrolysis of carbohydrates by macrophages. *J Exp Med* **129**, 201-25 (1969).
- Corfield, T. Bacterial sialidases--roles in pathogenicity and nutrition. *Glycobiology* **2**, 509-21 (1992).
- Cox, T. M. Gaucher disease: understanding the molecular pathogenesis of sphingolipidoses. *J Inherit Metab Dis* **24 Suppl 2**, 106-21; discussion 87-8 (2001).
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785-9 (1995).
- Cuervo, A. M., Hu, W., Lim, B. & Dice, J. F. IkappaB is a substrate for a selective pathway of lysosomal proteolysis. *Mol Biol Cell* **9**, 1995-2010 (1998).
- De Duve, C. & Wattiaux, R. Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* **28**, 435-92 (1966).
- Dhami, R., He, X., Gordon, R. E. & Schuchman, E. H. Analysis of the lung pathology and alveolar macrophage function in the acid sphingomyelinase--deficient mouse model of Niemann-Pick disease. *Lab Invest* **81**, 987-99 (2001).
- Eferl, R. & Wagner, E. F. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **3**, 859-68 (2003).
- Entchev, E. V. & Gonzalez-Gaitan, M. A. Morphogen gradient formation and vesicular trafficking. *Traffic* **3**, 98-109 (2002).
- Eskelinen, E. L. et al. Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Biol Cell* **13**, 3355-68 (2002).
- Eskelinen, E. L. et al. Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double deficient fibroblasts. *Mol Biol Cell* (2004).
- Eskelinen, E. L., Tanaka, Y. & Saftig, P. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol* **13**, 137-45 (2003).
- Feist, E. et al. Diagnostic importance of anti-proteasome antibodies. *Int Arch Allergy Immunol* **123**, 92-7 (2000).
- Ferri, K. F. & Kroemer, G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* **3**, E255-63 (2001).
- Foghsgaard, L. et al. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol* **153**, 999-1010 (2001).
- Forgac, M. Structure and properties of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *J Biol Chem* **274**, 12951-4 (1999).
- Fortenberry, S. C., Schorey, J. S. & Chirgwin, J. M. Role of glycosylation in the expression of human procathepsin D. *J Cell Sci* **108 (Pt 5)**, 2001-6 (1995).
- Fukuda, M. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J Biol Chem* **266**, 21327-30 (1991).
- Galibert, M. D., Carreira, S. & Goding, C. R. The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression. *Embo J* **20**, 5022-31 (2001).
- Ganitkevich, V. Y. The role of mitochondria in cytoplasmic Ca²⁺ cycling. *Exp Physiol* **88**, 91-7 (2003).
- Garcia, M. et al. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis. *Stem Cells* **14**, 642-50 (1996).

- Garver, W. S. & Heidenreich, R. A. The Niemann-Pick C proteins and trafficking of cholesterol through the late endosomal/lysosomal system. *Curr Mol Med* **2**, 485-505 (2002).
- Gelb, B. D. et al. Structure and chromosomal assignment of the human cathepsin K gene. *Genomics* **41**, 258-62 (1997).
- Ghosh, S., May, M. J. & Kopp, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**, 225-60 (1998).
- Glaumann, H. Crinophagy as a means for degrading excess secretory proteins in rat liver. *Revis Biol Celular* **20**, 97-110 (1989).
- Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., Evan, G. I. & Green, D. R. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* **2**, 156-62 (2000).
- Goldstein, J. L., Dana, S. E., Faust, J. R., Beaudet, A. L. & Brown, M. S. Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. Observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease. *J Biol Chem* **250**, 8487-95 (1975).
- Griffiths, G., Hoflack, B., Simons, K., Mellman, I. & Kornfeld, S. The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* **52**, 329-41 (1988).
- Guicciardi, M. E. et al. Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest* **106**, 1127-37 (2000).
- Heinemeyer, T. et al. Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res* **26**, 362-7 (1998).
- Helip-Wooley, A. & Thoene, J. G. Sucrose-induced vacuolation results in increased expression of cholesterol biosynthesis and lysosomal genes. *Exp Cell Res* **292**, 89-100 (2004).
- Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-79 (1998).
- Herzig, R. P., Scacco, S. & Scarpulla, R. C. Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome c. *J Biol Chem* **275**, 13134-41 (2000).
- Holmes, M. et al. hFOG-2, a novel zinc finger protein, binds the co-repressor mCtBP2 and modulates GATA-mediated activation. *J Biol Chem* **274**, 23491-8 (1999).
- Horst, M., Azem, A., Schatz, G. & Glick, B. S. What is the driving force for protein import into mitochondria? *Biochim Biophys Acta* **1318**, 71-8 (1997).
- Hunziker, W. & Geuze, H. J. Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays* **18**, 379-89 (1996).
- Jahraus, A., Storrie, B., Griffiths, G. & Desjardins, M. Evidence for retrograde traffic between terminal lysosomes and the prelysosomal/late endosome compartment. *J Cell Sci* **107** (Pt 1), 145-57 (1994).
- Janvier, K. et al. Recognition of dileucine-based sorting signals from HIV-1 Nef and LIMP-II by the AP-1 gamma-sigma and AP-3 delta-sigma3 hemicomplexes. *J Cell Biol* **163**, 1281-90 (2003).
- Kadonaga, J. T., Carner, K. R., Masiarz, F. R. & Tjian, R. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* **51**, 1079-90 (1987).
- Kagedal, K., Zhao, M., Svensson, I. & Brunk, U. T. Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem J* **359**, 335-43 (2001).
- Karageorgos, L. E. et al. Lysosomal biogenesis in lysosomal storage disorders. *Exp Cell Res* **234**, 85-97 (1997).
- Kato, T. et al. Normalization of intracellular lysosomal hydrolases in I-cell disease fibroblasts with sucrose loading. *J Biol Chem* **257**, 7814-9 (1982).
- Kato, T., Okada, S., Yutaka, T. & Yabuuchi, H. The effects of sucrose loading on lysosomal hydrolases. *Mol Cell Biochem* **60**, 83-98 (1984).
- Kim, S. & Iwao, H. Stress and vascular responses: mitogen-activated protein kinases and activator protein-1 as promising therapeutic targets of vascular remodeling. *J Pharmacol Sci* **91**, 177-81 (2003).
- Kohler, J. J., Metallo, S. J., Schneider, T. L. & Schepartz, A. DNA specificity enhanced by sequential binding of protein monomers. *Proc Natl Acad Sci US A* **96**, 11735-9 (1999).
- Koopman, P. Sry, Sox9 and mammalian sex determination. *Exs*, 25-56 (2001).
- Kopito, R. R. ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell* **88**, 427-30 (1997).

- Kundra, R. & Kornfeld, S. Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *J Biol Chem* **274**, 31039-46 (1999).
- Kuronita, T. et al. A role for the lysosomal membrane protein LGP85 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology. *J Cell Sci* **115**, 4117-31 (2002).
- Leary, S. C. et al. Fiber-type differences in muscle mitochondrial profiles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**, R817-26 (2003).
- Lebrand, C. et al. Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase Rab7. *Embo J* **21**, 1289-300 (2002).
- Lekstrom-Himes, J. & Xanthopoulos, K. G. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem* **273**, 28545-8 (1998).
- Lewis, V. et al. Glycoproteins of the lysosomal membrane. *J Cell Biol* **100**, 1839-47 (1985).
- Liao, X. & Butow, R. A. RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell* **72**, 61-71 (1993).
- Liu, J., Ahlborn, T. E., Briggs, M. R. & Kraemer, F. B. Identification of a novel sterol-independent regulatory element in the human low density lipoprotein receptor promoter. *J Biol Chem* **275**, 5214-21 (2000).
- Luscher, B. & Eisenman, R. N. Mitosis-specific phosphorylation of the nuclear oncoproteins Myc and Myb. *J Cell Biol* **118**, 775-84 (1992).
- Malynn, B. A. et al. N-myc can functionally replace c-myc in murine development, cellular growth, and differentiation. *Genes Dev* **14**, 1390-9 (2000).
- Marsh, M. et al. Rapid analytical and preparative isolation of functional endosomes by free flow electrophoresis. *J Cell Biol* **104**, 875-86 (1987).
- Marusich, M. F. et al. Expression of mtDNA and nDNA encoded respiratory chain proteins in chemically and genetically-derived Rho0 human fibroblasts: a comparison of subunit proteins in normal fibroblasts treated with ethidium bromide and fibroblasts from a patient with mtDNA depletion syndrome. *Biochim Biophys Acta* **1362**, 145-59 (1997).
- Mayr, B. & Montminy, M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 599-609 (2001).
- Meresse, S., Gorvel, J. P. & Chavrier, P. The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes. *J Cell Sci* **108** (Pt 11), 3349-58 (1995).
- Molkentin, J. D. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* **275**, 38949-52 (2000).
- Montgomery, R. R., Webster, P. & Mellman, I. Accumulation of indigestible substances reduces fusion competence of macrophage lysosomes. *J Immunol* **147**, 3087-95 (1991).
- Moran, D., Galperin, E. & Horowitz, M. Identification of factors regulating the expression of the human glucocerebrosidase gene. *Gene* **194**, 201-13 (1997).
- Mortimore, G. E., Poso, A. R. & Lardeux, B. R. Mechanism and regulation of protein degradation in liver. *Diabetes Metab Rev* **5**, 49-70 (1989).
- Moyes, C. D. & Hood, D. A. Origins and consequences of mitochondrial variation in vertebrate muscle. *Annu Rev Physiol* **65**, 177-201 (2003).
- Natesan, S. & Gilman, M. Z. DNA bending and orientation-dependent function of YY-1 in the c-fos promoter. *Genes Dev* **7**, 2497-509 (1993).
- Naureckiene, S. et al. Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science* **290**, 2298-301 (2000).
- Nemeth, Z. H., Deitch, E. A., Szabo, C. & Hasko, G. Hyperosmotic stress induces nuclear factor-kappaB activation and interleukin-8 production in human intestinal epithelial cells. *Am J Pathol* **161**, 987-96 (2002).
- Nesbit, C. E., Tersak, J. M. & Prochownik, E. V. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* **18**, 3004-16 (1999).
- Neufeld, E. F. Lysosomal storage diseases. *Annu Rev Biochem* **60**, 257-80 (1991).
- Nishino, I. et al. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* **406**, 906-10 (2000).
- Nohturfft, A., DeBose-Boyd, R. A., Scheek, S., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. Sterols regulate cycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP) between endoplasmic reticulum and Golgi. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11235-40 (1999).

- Novick, P. & Garrett, M. D. Vesicular transport. No exchange without receipt. *Nature* **369**, 18-9 (1994).
- Omichinski, J. G. et al. A small single-"finger" peptide from the erythroid transcription factor GATA-1 binds specifically to DNA as a zinc or iron complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 1676-80 (1993).
- Orkin, S. H. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* **80**, 575-81 (1992).
- Orkin, S. H. Embryonic stem cells and transgenic mice in the study of hematopoiesis. *Int J Dev Biol* **42**, 927-34 (1998).
- Pentchev, P. G. et al. Group C Niemann-Pick disease: faulty regulation of low-density lipoprotein uptake and cholesterol storage in cultured fibroblasts. *Faseb J* **1**, 40-5 (1987).
- Pfanner, N. & Wiedemann, N. Mitochondrial protein import: two membranes, three translocases. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 400-11 (2002).
- Pfeffer, S. R. Rab GTPases: master regulators of membrane trafficking. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 522-6 (1994).
- Pillay, C. S., Elliott, E. & Dennison, C. Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem J* **363**, 417-29 (2002).
- Pugh, B. F. & Tjian, R. Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev* **5**, 1935-45 (1991).
- Quinn, P. G. Distinct activation domains within cAMP response element-binding protein (CREB) mediate basal and cAMP-stimulated transcription. *J Biol Chem* **268**, 16999-7009 (1993).
- Quinn, P. G. & Granner, D. K. Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene but not binding of nuclear factors to the cyclic AMP regulatory element. *Mol Cell Biol* **10**, 3357-64 (1990).
- Rao, R., Hao, C. M. & Breyer, M. D. Hypertonic stress activates glycogen synthase kinase 3 β -mediated apoptosis of renal medullary interstitial cells, suppressing an NF κ B-driven cyclooxygenase-2-dependent survival pathway. *J Biol Chem* **279**, 3949-55 (2004).
- Reddy, S. P. & Mossman, B. T. Role and regulation of activator protein-1 in toxicant-induced responses of the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **283**, L1161-78 (2002).
- Reitman, M. L., Varki, A. & Kornfeld, S. Fibroblasts from patients with I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy are deficient in uridine 5'-diphosphate-N-acetylglucosamine: glycoprotein N-acetylglucosaminylphosphotransferase activity. *J Clin Invest* **67**, 1574-9 (1981).
- Renard, P. et al. Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NF κ B. *Nucleic Acids Res* **29**, E21 (2001).
- Reuter, G. & Gabius, H. J. Sialic acids structure-analysis-metabolism-occurrence-recognition. *Biol Chem Hoppe Seyler* **377**, 325-42 (1996).
- Riederer, M. A., Soldati, T., Shapiro, A. D., Lin, J. & Pfeffer, S. R. Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network. *J Cell Biol* **125**, 573-82 (1994).
- Ries, S. et al. Transcriptional regulation of lysosomal acid lipase in differentiating monocytes is mediated by transcription factors Sp1 and AP-2. *J Lipid Res* **39**, 2125-34 (1998).
- Rochefort, H. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer. *Acta Oncol* **31**, 125-30 (1992).
- Roos, M. D., Su, K., Baker, J. R. & Kudlow, J. E. O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Mol Cell Biol* **17**, 6472-80 (1997).
- Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P. & Spiegelman, B. M. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* **14**, 1293-307 (2000).
- Saftig, P. et al. Functions of cathepsin K in bone resorption. Lessons from cathepsin K deficient mice. *Adv Exp Med Biol* **477**, 293-303 (2000).
- Sakai, J. & Rawson, R. B. The sterol regulatory element-binding protein pathway: control of lipid homeostasis through regulated intracellular transport. *Curr Opin Lipidol* **12**, 261-6 (2001).
- Sakai, Y., Koller, A., Rangell, L. K., Keller, G. A. & Subramani, S. Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: identification of specific steps and morphological intermediates. *J Cell Biol* **141**, 625-36 (1998).

- Sanchez, H. B., Yieh, L. & Osborne, T. F. Cooperation by sterol regulatory element-binding protein and Sp1 in sterol regulation of low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* **270**, 1161-9 (1995).
- Sasagasaki, N. et al. Prenatal diagnosis of congenital sialidosis. *Clin Genet* **44**, 8-11 (1993).
- Sawada, R., Jardine, K. A. & Fukuda, M. The genes of major lysosomal membrane glycoproteins, lamp-1 and lamp-2. 5'-flanking sequence of lamp-2 gene and comparison of exon organization in two genes. *J Biol Chem* **268**, 9014-22 (1993).
- Schepers, U., Lemm, T., Herzog, V. & Sandhoff, K. Characterization of regulatory elements in the 5'-flanking region of the GM2 activator gene. *Biol Chem* **381**, 531-44 (2000).
- Schlosser, I. et al. A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing. *Nucleic Acids Res* **31**, 6148-56 (2003).
- Schmid, S. L. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* **66**, 511-48 (1997).
- Seglen, P. O. et al. Structural aspects of autophagy. *Adv Exp Med Biol* **389**, 103-11 (1996).
- Sekito, T., Liu, Z., Thornton, J. & Butow, R. A. RTG-dependent mitochondria-to-nucleus signaling is regulated by MKS1 and is linked to formation of yeast prion [URE3]. *Mol Biol Cell* **13**, 795-804 (2002).
- Servillo, G., Della Fazia, M. A. & Sassone-Corsi, P. Coupling cAMP signaling to transcription in the liver: pivotal role of CREB and CREM. *Exp Cell Res* **275**, 143-54 (2002).
- Shi, Y., Lee, J. S. & Galvin, K. M. Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1. *Biochim Biophys Acta* **1332**, F49-66 (1997).
- Simonaro, C. M., Haskins, M. E. & Schuchman, E. H. Articular chondrocytes from animals with a dermatan sulfate storage disease undergo a high rate of apoptosis and release nitric oxide and inflammatory cytokines: a possible mechanism underlying degenerative joint disease in the mucopolysaccharidoses. *Lab Invest* **81**, 1319-28 (2001).
- Smith, J. R., Osborne, T. F., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* **265**, 2306-10 (1990).
- Spear, E. & Ng, D. T. The unfolded protein response: no longer just a special teams player. *Traffic* **2**, 515-23 (2001).
- Stancovski, I. & Baltimore, D. NF-kappaB activation: the I kappaB kinase revealed? *Cell* **91**, 299-302 (1997).
- Stinton, L. M., Eystathioy, T., Selak, S., Chan, E. K. & Fritsler, M. J. Autoantibodies to protein transport and messenger RNA processing pathways: endosomes, lysosomes, Golgi complex, proteasomes, assemblyosomes, exosomes, and GW bodies. *Clin Immunol* **110**, 30-44 (2004).
- Stoka, V. et al. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem* **276**, 3149-57 (2001).
- Suzuki, H., Kumagai, T., Goto, A. & Sugiura, T. Increase in intracellular hydrogen peroxide and upregulation of a nuclear respiratory gene evoked by impairment of mitochondrial electron transfer in human cells. *Biochem Biophys Res Commun* **249**, 542-5 (1998).
- Tanaka, Y. et al. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* **406**, 902-6 (2000).
- Tang, J. & Wong, R. N. Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *J Cell Biochem* **33**, 53-63 (1987).
- Tang, Q. Q., Jiang, M. S. & Lane, M. D. Repression of transcription mediated by dual elements in the CCAAT/enhancer binding protein alpha gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 13571-5 (1997).
- Tepel, C., Bromme, D., Herzog, V. & Brix, K. Cathepsin K in thyroid epithelial cells: sequence, localization and possible function in extracellular proteolysis of thyroglobulin. *J Cell Sci* **113 Pt 24**, 4487-98 (2000).
- Thomas, M. J. & Seto, E. Unlocking the mechanisms of transcription factor YY-1: are chromatin modifying enzymes the key? *Gene* **236**, 197-208 (1999).
- Tinti, C. et al. Structure/function relationship of the cAMP response element in tyrosine hydroxylase gene transcription. *J Biol Chem* **272**, 19158-64 (1997).

- Tremblay, J. J., Hamel, F. & Viger, R. S. Protein kinase A-dependent cooperation between GATA and CCAAT/enhancer-binding protein transcription factors regulates steroidogenic acute regulatory protein promoter activity. *Endocrinology* **143**, 3935-45 (2002).
- Tremblay, J. J. & Viger, R. S. Novel roles for GATA transcription factors in the regulation of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* **85**, 291-8 (2003).
- Tsang, A. P. et al. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* **90**, 109-19 (1997).
- Tsukuba, T. et al. New functional aspects of cathepsin D and cathepsin E. *Mol Cells* **10**, 601-11 (2000).
- Tsuneoka, M. et al. c-myc induces autophagy in rat 3Y1 fibroblast cells. *Cell Struct Funct* **28**, 195-204 (2003).
- Vanier, M. T., Duthel, S., Rodriguez-Lafrasse, C., Pentchev, P. & Carstea, E. D. Genetic heterogeneity in Niemann-Pick C disease: a study using somatic cell hybridization and linkage analysis. *Am J Hum Genet* **58**, 118-25 (1996).
- Vesa, J. & Peltonen, L. Mutated genes in juvenile and variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinoses encode lysosomal proteins. *Curr Mol Med* **2**, 439-44 (2002).
- Vetvicka, V., Vektvickova, J. & Fusek, M. Effect of human procathepsin D on proliferation of human cell lines. *Cancer Lett* **79**, 131-5 (1994).
- Vinson, C. R., Hai, T. & Boyd, S. M. Dimerization specificity of the leucine zipper-containing bZIP motif on DNA binding: prediction and rational design. *Genes Dev* **7**, 1047-58 (1993).
- Walkley, S. U. Cellular pathology of lysosomal storage disorders. *Brain Pathol* **8**, 175-93 (1998).
- Wanzel, M., Herold, S. & Eilers, M. Transcriptional repression by Myc. *Trends Cell Biol* **13**, 146-50 (2003).
- Watts, C. Antigen processing in the endocytic compartment. *Curr Opin Immunol* **13**, 26-31 (2001).
- Werneburg, N. W., Guicciardi, M. E., Bronk, S. F. & Gores, G. J. Tumor necrosis factor- α -associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**, G947-56 (2002).
- Wilkening, G., Linke, T. & Sandhoff, K. Lysosomal degradation on vesicular membrane surfaces. Enhanced glucosylceramide degradation by lysosomal anionic lipids and activators. *J Biol Chem* **273**, 30271-8 (1998).
- Wu, X., Spiro, C., Owen, W. G. & McMurray, C. T. cAMP response element-binding protein monomers cooperatively assemble to form dimers on DNA. *J Biol Chem* **273**, 20820-7 (1998).
- Yan, B. et al. Transcriptional regulation of the human acid alpha-glucosidase gene. Identification of a repressor element and its transcription factors Hes-1 and YY-1. *J Biol Chem* **276**, 1789-93 (2001).
- Yang, W. M., Inouye, C., Zeng, Y., Bearss, D. & Seto, E. Transcriptional repression by YY-1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12845-50 (1996).
- Yao, Y. L., Yang, W. M. & Seto, E. Regulation of transcription factor YY-1 by acetylation and deacetylation. *Mol Cell Biol* **21**, 5979-91 (2001).
- Ye, K., Dinarello, C. A. & Clark, B. D. Identification of the promoter region of human interleukin 1 type I receptor gene: multiple initiation sites, high G+C content, and constitutive expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2295-9 (1993).
- Zaid, A. et al. On the role of the general transcription factor Sp1 in the activation and repression of diverse mammalian oxidative phosphorylation genes. *J Bioenerg Biomembr* **31**, 129-35 (1999).
- Zerial, M. & Stenmark, H. Rab GTPases in vesicular transport. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 613-20 (1993).

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

16 JUIN 2004