



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Influence du mannan sur les lysosomes du foie de rat

Collard, Françoise

Award date:
1988

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

1988



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

INFLUENCE DU MANNAN SUR LES LYSOSOMES
DU FOIE DE RAT

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

Françoise Collard

Mes plus vifs remerciements s'adressent tout d'abord à Monsieur le Professeur R. Wattiaux pour l'assurance avec laquelle il a su guider ce travail. Il m'a permis de bénéficier pleinement de son expérience dans le domaine scientifique, lors des nombreuses discussions entretenues avec lui tout au long de cette année.

De même, ma reconnaissance s'adresse à Madame S. Wattiaux-De Coninck pour sa coopération à la réalisation de cette étude.

Il me faut également remercier Michel Jadot pour son aide précieuse au cours des recherches bibliographiques ainsi que pour ses connaissances sur le sujet.

Je remercie aussi vivement Sandra Misquith pour la disponibilité dont elle a toujours fait preuve à mon égard, tout particulièrement dans les moments les plus critiques.

Il convient également de souligner la compétence de Monsieur F. Dubois, dont les précieux conseils sont toujours les bienvenus devant les imprévus rencontrés à tout moment dans la pratique de la biochimie.

Je tiens aussi à remercier très sincèrement Isabelle Hamer pour la réalisation de la mise en page de ce mémoire.

C'est également à toutes les personnes du laboratoire de Chimie Physiologique que j'exprime ma reconnaissance pour l'accueil qu'elles m'ont réservé au début de cette année académique.

Merci aussi à Laurence et Bertrand pour le soutien moral qu'ils m'ont apporté durant la réalisation de ce travail.

C'est enfin mes parents, ainsi que Jean, que je tiens tout particulièrement à remercier pour m'avoir permis de vivre cette expérience universitaire.

CHAP. 1. INTRODUCTION	1
I. LES LYSOSOMES.....	1
II. HISTOLOGIE DU FOIE	3
III. COMPOSITION ENZYMATIQUE DES DEUX TYPES DE LYSOSOMES	7
IV. L'ENDOCYTOSE: GENERALITES	9
V. L'ENDOCYTOSE PAR RECEPTEURS	11
VI. ENDOCYTOSE DES GLYCOPROTEINES PAR LES CELLULES DU FOIE	15
a) Les cellules parenchymateuses et les récepteurs à galactose.....	16
b) Les cellules non parenchymateuses et les récepteurs à mannose/N acétylglucosamine.....	18
VII. INFLUENCE DE L'INVERTASE SUR LES LYSOSOMES DES CELLULES HEPATIQUES	20
VIII. BUT DU TRAVAIL	23

CHAP. 2. TECHNIQUES EXPERIMENTALES

I. TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT	27
1) Préparation d'un homogénat.....	27
2) Centrifugation différentielle.....	28
3) Centrifugation isopycnique.....	29
4) Enzymes de référence.....	31
II. TECHNIQUES ANALYTIQUES	31
1) Méthodes générales des dosages enzymatiques	31
2) Préparation des "marqueurs" de l'endocytose	32

CHAP. 3. RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. EFFETS DU MANNAN SUR LES LYSOSOMES, ANALYSES PAR CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE	33
1) Introduction	33
2) Résultats	35
3) Discussion	37
II. IDENTIFICATION DES GRANULES AFFECTES PAR LE MANNAN. UTILISATION DE MARQUEURS DE L'ENDOCYTOSE	38
1) Introduction	38
a) <i>L'asialofétuine (ASF)</i>	39
b) <i>La formaldéhyde-sérum albumine bovine (f-BSA)</i>	41

2) Résultats	46
a) Hydrolases lysosomales et ¹²⁵ I-TC-ASF	48
b) Hydrolases lysosomales et ¹²⁵ I-TC-f-BSA	50
3) Discussion	51
III. EFFETS DU MANNAN SUR LES DEUX TYPES DE FRACTIONS MITOCHONDRIALES: ANALYSES EN CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE ET DIFFERENTIELLE	52
1) Introduction	52
2) Résultats	54
A. ANALYSE EN CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE	54
a) La fraction mitochondriale lourde (M).....	54
b) La fraction mitochondriale légère (L)	56
B. ANALYSE EN CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE	57
3) Discussion	59
IV. COMPORTEMENT, EN CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE, DES LYSOSOMES SURCHARGES DE MANNAN PAR RAPPORT AUX AUTRES CONSTITUANTS DE LA FRACTION MITOCHONDRIALE TOTALE	61
1) Introduction	61
2) Résultats	61
3) Discussion	64
V. PURIFICATION DES LYSOSOMES DES CELLULES NON PARENCHYMATEUSES EN GRADIENT DISCONTINU DE SACCHAROSE, APRES ADMINISTRATION DE MANNAN	65
1) Introduction	65
2) Résultats	66
3) Discussion	68
CHAP. 4. CONCLUSION GENERALE	69
BIBLIOGRAPHIE	70

CHAP.1. INTRODUCTION

I. LES LYSOSOMES.

Dans tout le règne animal, depuis les organismes unicellulaires les plus primitifs jusqu'aux cellules spécialisées des vertébrés, la présence des lysosomes est un fait indiscutable. Ils furent cependant découverts de manière tout-à-fait fortuite par de Duve et ses collaborateurs en 1949, lors d'études concernant la localisation intracellulaire de la glucose-6-phosphatase du foie de rat. Le concept de lysosomes est issu de travaux biochimiques, alors que ce type d'organite n'était pas encore identifié morphologiquement. Cette découverte a amené une modification du schéma de fractionnement classique de centrifugation différentielle, pour y ajouter une fraction supplémentaire riche en phosphatase acide. [de Duve *et al.*, 1955].

de Duve et Wattiaux [1966] définissent le lysosome comme une vésicule contenant toute une variété d'hydrolases acides, entourée d'une membrane dotée d'une perméabilité telle, qu'elle empêche les enzymes de s'échapper. Cette membrane représente aussi une véritable barrière vis-à-vis des substrats exogènes des diverses enzymes du granule.

Les lysosomes apparaissent comme une population hétérogène, tant au niveau enzymatique qu'au niveau morphologique. En effet, vu leur diversité de taille et de forme, des méthodes cytochimiques s'avèrent utiles pour repérer ces organites en microscopie électronique. Il existe toute une variété d'enzymes lysosomales comprenant des protéases, des nucléases, des glycosidases, des lipases, des phospholipases et des sulfatases. La plupart de ces hydrolases présentent une activité optimale aux environs de pH 5, ce qui correspond à celui existant dans l'organite. [Reijngoud & Tager, 1973]. Le maintien de cette acidité intralysosomale est le fruit d'une pompe électrogénique, située dans la membrane, qui transfère des protons, libérés par l'hydrolyse de l'ATP, dans la lumière de la vésicule. [Mego, 1979].

Le rôle des lysosomes est de toute première importance. On distingue d'une part, une fonction hétérophagique et, d'autre part, une fonction autophagique.

Leur rôle hétérophagique s'explique par le fait que les lysosomes sont les sites principaux de la digestion intracellulaire de substances exogènes captées par la cellule via l'endocytose.

Il est clair qu'ils interviennent, pour une grande partie, dans la dégradation de composés protéiques, notamment due à l'action concertée d'un système multienzymatique, comprenant à la fois des endo- et exopeptidases de spécificité propre. Il en résulte des composés de faible poids moléculaire, essentiellement des acides aminés libres et des petits peptides (le plus souvent des dipeptides), qui pourraient traverser la membrane lysosomale grâce à un système de transporteur. [Pisoni *et al.*, 1987]. Ils se retrouvent ainsi dans le cytoplasme. A ce niveau, les dipeptides ayant résisté à l'hydrolyse totale dans les lysosomes, peuvent être pris en charge par des peptidases cytoplasmiques. [de Duve & Wattiaux, 1966]. Les acides aminés résultant de ces opérations peuvent enfin être réutilisés par la cellule pour la synthèse de nouvelles protéines. Ceci constitue un rôle de nutrition attribué aux lysosomes. Ce système est comparable au tractus digestif des animaux; il s'en différencie cependant par sa discontinuité, tout en permettant la circulation de matière grâce au phénomène de fusion entre vésicules au sein de la cellule [Wattiaux, 1966].

Il persiste quelquefois des résidus indigestes à l'intérieur des lysosomes. Un lysosome ayant déjà fonctionné, peut participer à d'autres événements digestifs dans la cellule, et donc se charger en résidus supplémentaires. Finalement, un processus d'exocytose peut se mettre en place; il permet aux lysosomes surchargés d'éjecter leurs déchets à l'extérieur de la cellule.

Connaissant cette fonction digestive qui leur est propre, on peut distinguer deux types de lysosomes:

- * Les lysosomes primaires sont ceux dont les enzymes hydrolytiques n'ont pas encore pris part à un phénomène de digestion. Ils sont formés par bourgeonnement de la face TRANS de l'appareil de Golgi, qui aura auparavant reçu les hydrolases néosynthétisées du réticulum endoplasmique.

- * Les lysosomes secondaires quant à eux, ont déjà été le siège de phénomènes hydrolysants. Ils sont responsables de l'hétérogénéité des granules

observée en microscopie électronique, leur morphologie variant en fonction du matériel contenu, et de l'état de digestion de celui-ci.

Les lysosomes jouent aussi un rôle dans la défense des cellules, comme chez les macrophages par exemple, contre des organismes étrangers, ainsi que dans la détoxification, en digérant des cellules mortes, des débris cellulaires ainsi que d'autres substances et particules complexes d'origine exogène ou endogène.

Les lysosomes interviennent également dans des phénomènes d'autophagie. En effet, la cellule peut isoler des particules de son cytoplasme sous la forme d'une vaste vacuole entourée d'une membrane, dont le contenu sera digéré après sa fusion avec des lysosomes. Les vacuoles autophagiques contiennent des organites de la cellule, comme du réticulum endoplasmique, des mitochondries, par exemple, dans un état de dégradation variable.

Ce phénomène peut apparaître dans des conditions tout-à-fait normales, assurant un renouvellement des constituants cellulaires; il intervient aussi dans des processus cataboliques impliqués dans la différenciation cellulaire. Cependant, la fonction autophagique des lysosomes peut aussi traduire un état de stress, de souffrance cellulaire. C'est le cas, par exemple, pour les cellules hépatiques lors du jeûne.

Les pathologies résultant d'un mauvais fonctionnement des lysosomes sont à prendre en considération et démontrent clairement toute l'importance du rôle de ces organites dans le métabolisme cellulaire. Ainsi, les maladies congénitales de surcharge lysosomale s'expliquent par l'absence d'origine génétique d'une hydrolase spécifique.

II. HISTOLOGIE DU FOIE.

Le foie constitue un organe volumineux de l'organisme. Il joue un rôle primordial dans de nombreux métabolismes. On y distingue essentiellement deux grands types de cellules totalement différentes: les cellules parenchymateuses et les cellules non parenchymateuses.

* La majeure partie de l'organe est constituée de cellules parenchymateuses, encore appelées hépatocytes, présentant parfois des noyaux polyplœides. Ces cellules polyédriques disposées en monocouches, forment des lames continues, d'orientation variable et hautement anastomosées, au sein desquelles ces mêmes cellules ménagent entre elles un fin réseau de canalicules biliaires sans parois propres.

Les travées cellulaires délimitent des capillaires sanguins discontinus, ou sinusoides, d'un diamètre supérieur à celui des autres capillaires de l'organisme. Chaque hépatocyte entre en contact avec les capillaires par l'intermédiaire d'un espace restreint, dénommé espace de Disse.

La fonction de ces cellules parenchymateuses est multiple: elles interviennent dans la synthèse et l'excrétion de la bile; elles assurent également la synthèse de la plupart des protéines plasmatiques ainsi que des lipoprotéines.

* Les cellules non parenchymateuses quant à elles, se répartissent en trois groupes principaux:

° Tout d'abord, les cellules endothéliales. Elles sont étroitement apposées aux sinusoides et leur constituent d'ailleurs un revêtement discontinu. Leur mince couche de cytoplasme périnucléaire contient principalement du réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et des vésicules de pinocytose. Leurs longues extensions cytoplasmiques apparaissent très pauvres en organites et sont fréquemment perforées de canaux transcellulaires. Grâce à ceux-ci, des composés véhiculés par le sang parviennent aux hépatocytes.

° Les cellules de Kupffer se situent dans des interstices laissés entre les cellules endothéliales, présentant une portion de leur cytoplasme dans la lumière sinusoidale; l'autre partie est dirigée vers l'espace de Disse permettant ainsi à la cellule de s'accrocher aux fibres de collagène qui s'y trouvent. Ces cellules ne présentent pas ou très peu d'extensions cytoplasmiques, toujours très courtes quand elles sont présentes. Le cytoplasme périnucléaire abondant contient un grand nombre d'organelles, principalement des lysosomes.

Dans un foie normal, ces cellules ont une durée de vie relativement longue, et présentent donc un taux de renouvellement très faible, ce qui défavorise l'hypothèse d'un éventuel recrutement extrahépatique de macrophages [Bouwens *et al.*, 1986]

Les cellules de Kupffer sont douées d'un certain pouvoir de migration. Ainsi, comme le montrent Hardonk et ses collaborateurs [1986], ces cellules, après avoir phagocyté du matériel particulaire, sont capables de migrer depuis leur site sinusoidal vers l'espace portal, pour ensuite se retrouver dans les nodules lymphoïdes les plus proches. On leur attribue également un rôle dans la capture et la destruction des globules rouges sénescents, ainsi que dans la détoxification des produits des déchets métaboliques. Elles agissent aussi en tant que défenseurs en enlevant des particules étrangères de la circulation sanguine. Elles possèdent d'ailleurs à cet effet, des récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines, de même que des récepteurs au composant C₃ du complément, tous deux caractéristiques des macrophages [Munthe-Kaas *et al.*, 1976] Enfin, il semble qu'elles peuvent coopérer avec les hépatocytes pour la production de l'albumine [Morin & Normand, 1986].

° Le troisième type de cellules non parenchymateuses est représenté par les "fat-storing cells" qui sont plutôt associées à l'espace de Disse. Leurs fines extensions cytoplasmiques s'intercalent entre les cellules endothéliales. Elles contiennent un grand nombre de gouttelettes lipidiques d'un contenu homogène.

Parmi les quelques 150 millions de cellules présentes par gramme de foie chez un jeune rat, les cellules parenchymateuses en constituent la majeure partie, - à savoir: 65%-, les autres types de cellules représentant les 35% restants [Knook & Sleyster, 1976]. Toutefois, ce rapport diminue avec l'âge, puisque le volume moyen de cellules parenchymateuses augmente dans les mêmes conditions, impliquant ainsi une baisse de leur nombre par unité de volume, alors que les cellules non parenchymateuses, elles, restent en quantité constante [De Leeuw *et al.*, 1986].

Munthe-Kaas et ses collaborateurs [1976] estiment le volume d'un hépatocyte à 9200 μ^3 , soit environ 10 fois supérieur à celui d'une cellule non parenchymateuse. Sur base de ceci, il a été possible de déterminer la composition

Tableau 1: Distribution des organites entre les différents types de cellules du foie [d'après Blouin *et al.*, 1977].

Pourcentage du volume total des divers types d'organites
 parmi les différentes catégories de cellules hépatiques.

	<u>Hépatocyte</u>	<u>Cellule endothéliale</u>	<u>Cellule de Kupffer</u>	<u>"Fat-storing cell"</u>	<u>Total</u>
Noyau	86.8	5.3	4.6	3.3	100
Cytoplasme	93.2	3.0	2.3	1.5	100
Mitochondries	98.8	0.5	0.4	0.3	100
Lysosomes	57.0	16.9	25.8	0.3	100
Peroxisomes	100.0	-	-	-	100
Gouttelettes lipidiques	45.3	-	-	54.7	100
Vésicules pinocytiques	42.1	45.2	12.0	0.7	100

volumétrique du foie. [Blouin *et al.*, 1977]. Les compartiments extracellulaires représentent 16% du volume hépatique; les hépatocytes en constituent 78%; les cellules non parenchymateuses quant à elles, comptent 6%, répartis approximativement comme suit: 2.8% en cellules endothéliales; 2.1% en cellules de Kupffer; et 1.4% en "fat-storing cells".

Malgré leur faible représentation, les cellules non parenchymateuses ont une grande importance. Il ne faut d'ailleurs pas négliger leur contribution à la constitution des fractions subcellulaires lors de l'interprétation d'études biochimiques.

Toutefois, il est possible de séparer ces deux types de cellules par différentes méthodes. L'ajout de pronase dans une suspension de cellules hépatiques obtenue après perfusion de collagénase, permet d'isoler les cellules non parenchymateuses en détruisant les hépatocytes de manière spécifique. Des méthodes magnétiques sont également utilisées à cet effet [Berg & Boman, 1973].

En ce qui concerne plus précisément les organelles de tous les types cellulaires du foie, le tableau 1 [d'après Blouin *et al.*, 1977] permet de tirer quelques conclusions intéressantes. On constate que les cellules non parenchymateuses ne contiennent pas de peroxyosomes. Les mitochondries sont presque totalement confinées dans les hépatocytes, les cellules non parenchymateuses en contenant à peine 1.2%. Seulement 57% des lysosomes se retrouvent dans les cellules parenchymateuses. Parmi les quelques 40% restants, ce sont les cellules de Kupffer qui en contiennent la majorité. De plus, il est à noter que ces mêmes cellules de Kupffer contiennent une quantité beaucoup plus importante de lysosomes par cellule que les hépatocytes. En effet, selon Blouin et ses collaborateurs [1977], ces organelles représentent 14% du volume cellulaire chez les cellules de Kupffer, alors que cette même valeur ne correspond qu'à 0.8% pour les hépatocytes. Ces données concordent de manière satisfaisante avec d'autres études, morphologiques et histochimiques.

D'après les travaux de Selden et collaborateurs [1978], il semblerait que les lysosomes des cellules de Kupffer soient plus fragiles que ceux des cellules non parenchymateuses. Ils seraient aussi d'une densité légèrement plus faible. Ces constatations reflètent probablement la fonction phagocytaire de ces cellules.

Quoi qu'il en soit, les propriétés physiques de ces deux types de lysosomes ne s'avèrent pas suffisamment différentes que pour pouvoir les séparer efficacement en centrifugation. Dans tous les cas, les lysosomes des cellules non parenchymateuses apparaissent étroitement liés aux lysosomes hépatocytaires, influençant parfois fortement leur profil enzymatique lors d'analyses biochimiques.

De plus, il ne faut pas oublier qu'il est déjà très délicat en centrifugation classique de séparer les lysosomes des autres organites subcellulaires d'une fraction mitochondriale totale. Vu leurs densités d'équilibration relativement proches, la contamination par les mitochondries et les peroxysomes présents dans cette même fraction, représente une difficulté certaine en milieu de saccharose.

Pour parvenir à une purification satisfaisante de lysosomes, il faut recourir à de nombreux artifices, tels que les gradients de métrizamide [Wattiaux *et al.*, 1978], ou bien les injections de Triton WR-1339, de dextran ou d'autres substances provoquant une surcharge lysosomale [Wattiaux, 1966]. Tout ceci amène une modification de la densité d'équilibre des lysosomes, les démarquant ainsi des autres organites en centrifugation isopycnique [Anderson & Glaumann, 1987].

La même idée pourrait s'appliquer dans le but d'isoler des lysosomes des cellules non parenchymateuses. Il suffirait d'injecter une substance particulière qui s'accumulerait spécifiquement dans ces seuls lysosomes, et, de ce fait, en modifierait considérablement les propriétés physiques. On pourrait alors imaginer de les séparer de manière tout-à-fait classique, en centrifugation. Il faudrait cependant disposer d'une technique permettant de distinguer ces deux types de lysosomes. Le repérage biochimique par l'intermédiaire des enzymes marqueurs, s'avère adéquat.

III. COMPOSITION ENZYMATIQUE DES DEUX TYPES DE LYSOSOMES.

Au cours des expériences de centrifugation menées auparavant, les lysosomes faisaient preuve d'une hétérogénéité frappante, sur base des profils enzymatiques. Ce phénomène s'explique par la différence de composition en enzymes

lysosomales, entre les deux types de cellules du foie, mais aussi parmi les cellules non parenchymateuses elles-mêmes.

Les cellules parenchymateuses, vu leur contribution majeure dans le volume hépatique, possèdent des activités enzymatiques semblables à celles mesurées dans un homogénat total [Selden *et al.*, 1978].

La haute activité endocytaire des cellules de Kupffer amène à penser que ces cellules contiennent un nombre très élevé d'hydrolases acides, assurant une digestion intracellulaire intense. On constate, d'après les travaux de Munthe-Kaas *et al.* [1976] que l'activité spécifique des enzymes lysosomales est généralement plus élevée dans les cellules non parenchymateuses que dans les hépatocytes; cependant, les différentes enzymes y sont concentrées de manière variable. Ainsi, dans les cellules sinusoidales, l'arylsulfatase et la cathepsine D possèdent une activité spécifique bien supérieure à celle retrouvée dans les cellules parenchymateuses, tandis que la phosphatase acide y présente une activité spécifique d'une valeur à peine plus élevée que celle observée dans les hépatocytes.

Selon leur composition en enzymes lysosomales, on peut deviner la spécialisation des deux types de lysosomes. En effet, cela reflète bien le genre de substrats qui sont présentés aux cellules respectives, par hétéro- ou autophagie.

La fonction première des lysosomes des cellules de Kupffer serait de participer aux phénomènes hétérophagiques, puisque les composés captés par endocytose sont rapidement acheminés vers ces lysosomes pour y être digérés. Les lysosomes hépatocytaires, en plus, joueraient un rôle beaucoup plus soutenu dans les fonctions d'autophagie [Munthe-Kaas *et al.*, 1976].

Il est intéressant de signaler, un rôle tout-à-fait particulier aux cellules de Kupffer. Celles-ci auraient la capacité d'accumuler des pigments biliaires dans leurs lysosomes et de participer au métabolisme de la bilirubine qui impliquerait une sulfatation de ce composé. Ce type de conjugaison semble réellement spécifique aux cellules de Kupffer, les cellules parenchymateuses réalisant plutôt la fixation d'acide glucuronique sur la bilirubine [Arborgh *et al.*, 1973].

IV. L'ENDOCYTOSE: GENERALITES.

Comme nous l'avons mentionné auparavant, les lysosomes jouent un rôle prépondérant dans la dégradation de composés parvenus dans la cellule par endocytose. De là, on comprend aisément que l'endocytose représente un chemin privilégié pour une substance destinée aux lysosomes. Si celle-ci peut résister quelque peu, de par sa nature, aux enzymes hydrolytiques, elle restera stockée dans les organites, modifiant éventuellement leurs propriétés physiques, telles leur taille et leur densité. C'était l'idée évoquée pour tenter de séparer les lysosomes appartenant aux deux types cellulaires du foie.

Afin de bien comprendre le trajet intracellulaire d'une telle substance, il est intéressant de passer en revue la théorie de l'endocytose.

La membrane plasmique, vu sa constitution en bicouche lipidique, constitue une véritable barrière pour les composés présents à l'extérieur de la cellule. Il est bien évident que l'endocytose ne représente pas la seule voie de pénétration pour les molécules exogènes. En effet, les substances suffisamment lipophiles et suffisamment petites, franchissent les frontières cellulaires sans difficultés, par simple diffusion.

Pour les molécules polaires, tout-à-fait incompatibles avec la nature lipidique de la membrane, il existe des mécanismes de passage spécialisés, par exemple des protéines transporteuses qui agissent de manière spécifique. Certaines ne catalysent que la diffusion facilitée du soluté lié. D'autres en subissant des changements conformationnels, par hydrolyse de l'ATP ou par fixation ionique, agissent comme des pompes pour transporter le soluté de façon active, contre son gradient de concentration.

Un autre type de protéine de transport forme un canal ouvert d'un côté à l'autre de la double couche lipidique, à travers lequel se déplacent de petites molécules, dans le sens de leur gradient électrochimique, par diffusion simple.

En ce qui concerne le transport membranaire de macromolécules et de particules, on parle d'endocytose. Ce fut de Duve qui, en 1963, utilisa ce terme pour la

première fois. L'endocytose se définit comme un procédé d'internalisation de matériel extracellulaire, par invagination de la membrane plasmique. Le matériel se retrouve ainsi inclus dans une vésicule; il participe alors à un trafic intracellulaire qui s'établit entre diverses formes d'organites, dont l'ensemble constitue l'appareil vacuolaire [de Duve & Wattiaux, 1966].

Le phénomène inverse, appelé exocytose, consiste en une évacuation de substances à l'extérieur de la cellule, comme des produits de sécrétion ou des déchets.

Il faut signaler aussi les phénomènes de transcytose, où certaines vésicules spécialisées ne fusionnent pas avec les lysosomes, mais traversent le cytoplasme pour libérer leur contenu par exocytose au niveau d'une autre face cellulaire. Dans les cellules endothéliales qui tapissent les petits vaisseaux sanguins, ce processus permet de transférer des produits, de la circulation sanguine au liquide extracellulaire environnant.

Habituellement, on distingue deux types d'endocytoses: la phagocytose, ou "nourriture" cellulaire au sens figuré, et la pinocytose, que l'on considère plutôt comme la "boisson" de la cellule [Besterman & Low, 1983].

* La phagocytose est un phénomène induit. Elle permet l'ingestion de matières particulaires d'un diamètre pouvant dépasser quelques dixièmes de micron. La plupart des organismes pluricellulaires sont incapables d'ingérer efficacement des particules aussi volumineuses, elles laissent donc cette tâche à des phagocytes "professionnels", comme les macrophages et les leucocytes polymorphonucléaires dont le rôle de défense contre les infections est bien connu. Cette fonction est facilitée par l'opsonisation de la particule étrangère, recouverte d'anticorps produits par l'hôte. Il se produit une association étroite de la proie aux phagocytes, par l'intermédiaire de leurs récepteurs spécifiques aux fragments Fc des immunoglobulines.

La réponse membranaire à un stimulus est un phénomène tout-à-fait local. Elle nécessite une apposition continue des récepteurs avec leurs ligands, à la manière d'une fermeture-éclair, pour favoriser le mouvement des pseudopodes qui englobent la particule comme un tout.

* La pinocytose, par contre, est un phénomène constitutif, et se produit à la surface de la plupart des cellules. Elle permet la pénétration de substrats plus petits, comme de fines particules insolubles, des solutés de faible poids moléculaire, ou même de fluide.

La pinocytose se subdivise en deux grandes classes:

° la *pinocytose fluide*, où les substrats pénètrent dans la cellule de par leur présence aléatoire dans le fluide ingéré.

° la *pinocytose adsorptive*, au cours de laquelle le substrat se lie d'abord à la membrane, soit de manière non spécifique, soit de manière spécifique. Dans le dernier cas, on parle alors de pinocytose par récepteurs.

Cependant, il faut signaler que, dans la littérature, le terme "endocytose" remplace fréquemment le terme "pinocytose". C'est cette terminologie que nous utiliserons ultérieurement dans ce travail.

V. L'ENDOCYTOSE PAR RECEPTEURS.

Vu l'aspect spécifique intervenant dans l'endocytose par récepteurs, c'est par ce biais que l'on peut tenter de faire pénétrer une substance dans les lysosomes d'une catégorie de cellules bien déterminée.

Ce type d'endocytose représente le mode de pénétration de nombreuses macromolécules physiologiquement importantes. Elle permet à toute une diversité de cellules de capturer des ligands fort variables. Pour exemples, citons l'endocytose du facteur de croissance épidermique (EGF) par des fibroblastes [Pastan & Willingham, 1981]; l'endocytose de lipoprotéines de faible densité (LDL) par ce même type de cellules [Brown & Goldstein, 1979], ou par les cellules hépatiques [Harkes & Van Berkel, 1984]; l'endocytose de l'albumine traitée à la formaldéhyde par les cellules non parenchymateuses du foie [Blomhoff *et al.*, 1984].

Tous ces phénomènes impliquent la présence de récepteurs membranaires amphipatiques. En effet, ils possèdent une région hydrophobe liée aux

acides gras centraux de la bicouche lipidique, et deux régions hydrophiles, dont une dans le milieu aqueux extracellulaire, et l'autre dans le cytoplasme.

Vu le nombre limité de récepteurs par cellule, ce type d'endocytose est un phénomène saturable. L'intervention des récepteurs présente cependant un avantage certain: par ce mécanisme, il est possible de concentrer sélectivement les substances à endocyter, présentes à des concentrations parfois très faibles dans le milieu environnant.

L'endocytose par récepteurs comprend deux phases distinctes: d'une part la liaison des ligands à leurs récepteurs spécifiques, ne nécessitant aucun apport d'énergie; d'autre part, l'internalisation des complexes ainsi formés. A l'inverse de la première étape, celle-ci est un phénomène actif, bloqué par de basses températures, ainsi que par des inhibiteurs du métabolisme énergétique de la cellule.

Le déroulement classique de ce type d'endocytose commence d'abord par le rassemblement des récepteurs spécifiques au niveau des puits recouverts (ou "coated pits"), excluant sélectivement les autres protéines de la membrane plasmique. Ces puits, d'un diamètre de 1400 Å occupent environ 2% de la surface cellulaire [Pastan & Willingham, 1983].

Du côté cytoplasmique, ils sont bordés par un réseau polygonal protéique, constituant un manteau de clathrine, dont le polypeptide majeur est d'un poids moléculaire de 180.000. L'unité de base de cette couverture, le triskélion, est composée de trois polypeptides de ce type, associés à trois chaînes légères de clathrine, les orientant de manière adéquate. Une protéine supplémentaire, de 110 kilodaltons, est accrochée à la membrane plasmique et serait le point d'attache des triskélions, favorisant ainsi l'apparition du réseau caractéristique [Wileman *et al.*, 1985].

On rencontre deux situations principales dans la formation des puits recouverts selon le type de récepteurs. Certains récepteurs sont déjà rassemblés à cet endroit avant toute liaison avec leurs ligands; ils y restent confinés grâce à leur haute affinité pour la clathrine. C'est le cas des récepteurs à LDL sur les fibroblastes par exemple.

D'autres sont distribués au hasard sur la surface cellulaire, en absence de ligand. La liaison de celui-ci amène un changement de conformation favorable à l'association de clathrine, induisant ainsi une migration des complexes récepteurs-ligands vers les puits recouverts. Ce mouvement latéral s'effectue par simple diffusion des protéines dans la phase lipidique. Cette situation se présente, entre autres, pour les récepteurs au facteur de croissance épidermique (EGF).

Par après, ces puits recouverts donnent naissance aux vésicules recouvertes (ou "coated vesicles"), selon le modèle habituel. Ces vésicules ont pour fonction de transporter les complexes ligands-récepteurs vers l'intérieur de la cellule. Elles apparaîtraient par invagination et pincement des puits recouverts, et, une fois individualisées, perdraient leur manteau de clathrine dans le cytoplasme pour former les vésicules lisses qui constituent les endosomes.

Il existe cependant d'autres hypothèses contestant l'existence des vésicules recouvertes. Selon Willingham et Pastan [1980], la couche de clathrine reste attachée de manière permanente à la membrane plasmique. Les ligands liés à leurs récepteurs, sont transférés vers des vésicules non recouvertes. Celles-ci sont formées soit par invagination de la membrane adjacente aux puits, soit par une ouverture dans la couche de clathrine elle-même. Ce modèle repose sur le fait que la localisation immunologique de clathrine par des anticorps spécifiques, ne détecte aucune trace de clathrine soluble dans le cytosol, ou en association avec d'autres organelles, ce qui exclut toute possibilité de recyclage de cette protéine. Les puits recouverts, vides, restent donc associés continuellement à la surface cellulaire avec laquelle ils établissent des connexions, difficiles à mettre en évidence, vu la rapidité du phénomène.

D'une manière ou d'une autre, l'endocytose par récepteurs aboutit à la formation d'endosomes contenant les ligands. Ceux-ci forment un arrangement complexe de grandes vésicules lisses et de structure plus ou moins tubulaire, d'un diamètre moyen de 0,3 micron, allant parfois jusque 1 micron. Cette diversité de forme et de distribution nécessite une nomenclature précise: on distingue généralement deux populations d'endosomes [selon Helenius *et al.*, 1983]

- les endosomes périphériques, ou primaires, sont proches de la membrane plasmique et ingèrent rapidement le matériel endocyté; ils présentent quelquefois des anastomoses entre eux.

- les endosomes secondaires, se trouvent dans la région de l'appareil de Golgi, proche des lysosomes. Ils apparaissent plus sphériques et plus volumineux que les autres. Ils possèdent des invaginations profondes, ainsi que des vésicules internes dérivées de la membrane plasmique; ils forment ainsi les "multivesicular bodies".

La fonction endosomale est primordiale.

Endéans les 2 minutes, après avoir quitté les vésicules recouvertes, les ligands entrent dans les endosomes périphériques et apparaissent étroitement associés à la membrane limitante de la vésicule, de par la fixation à leurs récepteurs.

Dans les 8 à 10 minutes suivantes, vu l'acidification interne des endosomes, il y a dissociation entre ligands et récepteurs. Les endosomes deviennent plus grands et acquièrent des extensions tubulaires; on parle alors de CURL. Les ligands apparaissent plutôt dans la partie sphérique tandis que les récepteurs se concentrent dans la partie tubulaire de cette structure.

Il s'ensuit une orientation différente pour ces deux composés: alors que les récepteurs sont recyclés vers la membrane plasmique, les ligands apparaissent dans les "multivesicular bodies" après 15 minutes environ. Leur contenu est destiné à être dégradé grâce à la fusion ultérieure avec des lysosomes.

L'acidification des endosomes se fait par une pompe à protons, ATP-dépendante, dérivée de la membrane plasmique au cours de l'endocytose [Helenius *et al.*, 1983]. Selon la sensibilité de la liaison à de faibles pH, cette acidité favorise, la plupart du temps, la dissociation pré-lysosomale du ligand de son récepteur, pour permettre ensuite leur ségrégation dans la cellule. De telles conditions entraînent également un nettoyage des endosomes, éliminant tout ce qui s'était lié de manière non spécifique sur la membrane.

Le recyclage des récepteurs est maintenant un fait certain, qui permet d'assurer la capture continue de ligand par la cellule. En effet, la synthèse de nouveaux récepteurs étant bloquée par des inhibiteurs spécifiques de la synthèse protéique, on

constate qu'il y a toujours internalisation des complexes récepteurs-ligands grâce à ce recyclage [Dautry-Varsat & Lodish, 1984].

Les observations immunocytochimiques de Geuze *et al.* [1984] soutiennent l'hypothèse éventuelle de l'implication du Golgi dans le recyclage des récepteurs. Ce passage par le Golgi permettrait une modification et/ou une réparation des récepteurs destinés à être recyclés [Farqhar M-G, 1983].

Le modèle qui vient d'être décrit constitue la voie classique de l'endocytose par récepteurs. Il convient cependant de souligner qu'il existe des variantes autour de ce modèle de base. Pour résumer, on conclura sur l'existence de 4 catégories de transport impliquant l'endocytose par récepteurs [D'après Wileman *et al.*, 1985]

1. Dans le premier mécanisme, les récepteurs sont recyclés, mais dirigent leurs ligands vers les lysosomes. Il s'agit du processus le plus souvent rencontré, comme dans l'endocytose des LDL par exemple.

2. Dans le second cas, les récepteurs sont recyclés et leurs ligands ne sont pas dégradés. Le ligand reste donc attaché à son récepteur durant le transit cellulaire. C'est le cas de la transferrine.

3. En ce qui concerne le troisième cas, les récepteurs, de même que les ligands, sont dégradés dans les lysosomes, puisqu'il n'y a pas eu de dissociation au niveau de l'endosome, la liaison n'étant pas sensible aux pH acides. Le récepteur à l'insuline se comporte de cette manière.

4. Enfin, pour le quatrième et dernier cas, les récepteurs sont dégradés, alors que les ligands sont épargnés. Le mécanisme de transport de l'IgA dans les hépatocytes en constitue un bon exemple.

VI. ENDOCYTOSE DES GLYCOPROTEINES PAR LES CELLULES DU FOIE.

Il est à rappeler, à ce stade du travail, que notre objectif serait de diriger spécifiquement vers les lysosomes des cellules non parenchymateuses, une substance particulière qui en modifierait fortement les propriétés physiques. Nous

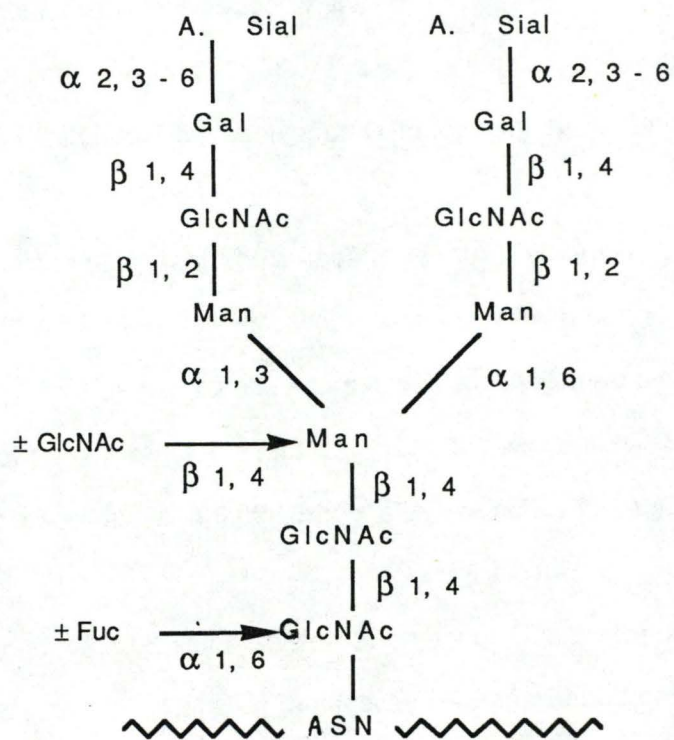


FIG. 1. Chaîne oligosaccharidique typique d'une glycoprotéine, liée à l'asparagine (N-liée).

Abréviations: A.Sial.= Acide Sialique; Gal= Galactose; GlcNAc= N-Acétyleglucosamine; Man.= Mannose; Fuc= Fucose et ASN= Asparagine.

avons vu que la voie de l'endocytose convient parfaitement à cet effet. Il reste à savoir comment les cellules hépatiques réalisent l'endocytose et dans quelles conditions?

Les cellules du foie, en fait, grâce à leurs récepteurs spécifiques, sont le siège d'une endocytose considérable, et interviennent d'ailleurs de manière prépondérante dans la régulation de l'homéostasie des glycoprotéines présentes dans le sérum. On a pu démontrer, depuis longtemps déjà, l'importance des hydrates de carbone pour la reconnaissance cellulaire d'une molécule au sein du foie.

En fait, le ciblage d'une glycoprotéine sur un type de cellule hépatique, ainsi que sa vitesse de capture, dépendent essentiellement de sa composition en oligosaccharides. Selon la nature de ce signal porté par la glycoprotéine, celle-ci interagit préférentiellement avec les récepteurs spécifiques de l'une ou l'autre catégorie de cellules hépatiques, les cellules parenchymateuses ou les cellules non parenchymateuses.

a) Les cellules parenchymateuses et les récepteurs à galactose.

Selon Ashwell et ses collaborateurs [1974 et 1982], les glycoprotéines, ayant perdu leur acide sialique terminal par l'action d'une neuraminidase, qui démasque ainsi le résidu galactose sous-jacent (Fig. 1), ont un temps de vie nettement réduit dans la circulation sanguine, comparé aux formes natives de ces mêmes protéines. Le site de capture hépatique de ces asialoglycoprotéines fut identifié comme étant localisé préférentiellement sur les hépatocytes. Cette démarche expérimentale fut appliquée à toute une série de glycoprotéines du sérum, comme la fétuine, ou la glycophorine, par exemple, qui présentaient alors toutes les mêmes caractéristiques de capture par les hépatocytes, après l'action d'une neuraminidase sur leur portion oligosaccharidique.

Les travaux de Steer et Clarenburg [1979] menés sur des cellules hépatiques isolées, aboutissent aux mêmes résultats, les cellules non parenchymateuses restant insensibles à l'abondance d'asialoglycoprotéines dans le milieu d'incubation.

Le foie apparaît comme le siège principal de capture des asialoglycoprotéines, comme le montrent les travaux de Schlesinger *et al.* [1980], puisque ces glycoprotéines ne sont que très peu éliminées après éviscération chirurgicale d'un animal de laboratoire.

Ce récepteur, spécifique aux résidus galactose, apparaît comme une protéine transmembranaire d'après les études de Chiacchia et Drickamer [1984], qui utilisèrent une technique de marquage vectoriel. Le récepteur contient trois domaines principaux: une partie hydrophobe, insérée dans l'épaisseur de la membrane des hépatocytes, et deux parties hydrophiles, dont une extrémité NH₂-terminale orientée vers le cytoplasme, et une extrémité COOH-terminale présente à la surface cellulaire, qui contient le site de fixation des résidus galactose. Sa structure primaire fut décrite par Drickamer *et al.* [1984]. Le récepteur présente un total de 283 acides aminés dont une série hydrophobe allant des résidus 39 à 65; ceci correspond à la portion insérée dans la double couche lipidique de la membrane hépatocytaire.

Il requiert la présence d'ions calcium lors de la fixation de son ligand, ainsi qu'un pH optimal [Ashwell & Harford, 1982].

Le chemin intracellulaire suivi par le ligand endocyté correspond parfaitement au schéma général décrit précédemment à propos de l'endocytose, à savoir: 1) interaction du ligand avec les récepteurs membranaires; 2) internalisation du complexe récepteur-ligand; 3) dissociation intracellulaire de ce complexe à pH acide; 4) ségrégation des récepteurs et des ligands dissociés; 5) livraison du ligand aux lysosomes, et enfin, 6) protéolyse lysosomale. Les étapes de ce parcours ont pu être bloquées par un inhibiteur spécifique de chacune d'entre elles, démontrant ainsi l'aboutissement des asialoglycoprotéines aux lysosomes des hépatocytes [Harford *et al.*, 1984]. Notons que les travaux de Steer et Ashwell [1980] avaient déjà fortement soutenu l'hypothèse du recyclage de ces récepteurs à galactose.

b) Les cellules non parenchymateuses et les récepteurs à mannose/N-acétylglucosamine.

Cette seconde catégorie de cellules, qui nous intéresse plus particulièrement, est, elle aussi, impliquée dans l'endocytose de glycoprotéines présentes dans le sang. Cependant, cette fonction s'explique par l'intervention d'un tout autre type de récepteur membranaire, spécifiquement localisé sur les cellules sinusoïdales du foie.

Les glycoprotéines, dont on a successivement enlevé l'acide sialique et le galactose par traitement enzymatique, exposent ainsi des résidus N-acétylglucosamine terminaux sur leur chaîne oligosaccharidique (Fig. 1). Ces agalactoglycoprotéines ainsi obtenues, sont alors rapidement ôtées de la circulation sanguine pour être endocytées au niveau du foie, par une voie différente de celle décrite précédemment pour les asialoglycoprotéines [Stockert *et al.*, 1976].

Les expériences d'Achord *et al.* [1977] démontrèrent ensuite que le type de récepteur ici impliqué, est capable de reconnaître deux résidus glycosylés: la N-acétylglucosamine ainsi que le mannose.

Les travaux de Steer et Clarenburg [1979] menés sur des cellules hépatiques isolées après injection du ligand, renforcent l'idée de l'existence de deux voies distinctes pour l'endocytose des glycoprotéines par le foie: tandis que les asialoglycoprotéines se retrouvent préférentiellement dans les hépatocytes, les glycoprotéines terminées par de la N-acétylglucosamine ou du mannose, elles, se concentrent plutôt dans les cellules sinusoïdales.

Mizuno *et al.* [1981] ont réussi à isoler, à partir du foie de rat, ce récepteur particulier, bien différent de celui des hépatocytes pour les asialoglycoprotéines. Il s'agit d'une protéine transmembranaire, composée de six sous-unités identiques de 32.000 daltons chacune, particulièrement riches en glycine. La fixation du ligand dépend du calcium et se montre très instable à pH acide; ce sont d'ailleurs les seules propriétés partagées avec le récepteur à galactose.

Les ligands, une fois fixés aux récepteurs de la surface des cellules sinusoïdales, suivent alors le trajet intracellulaire normal de l'endocytose par récepteurs, pour finalement subir l'action des enzymes hydrolytiques au sein des lysosomes.

Remarquons que le même type de récepteur fut d'abord isolé à partir du foie de lapin [Kawasaki *et al.*, 1978], et présentait des propriétés physico-chimiques semblables à celles décrites ci-dessus. Ces deux récepteurs appartiennent d'ailleurs à la même catégorie, vu leur spécificité de ligands pratiquement identique. Un tel récepteur fut également décrit dans le sérum de lapin par Kozutsumi *et al.* [1980].

Certains auteurs ont déduit de leurs travaux que le récepteur à mannose/N-acétylglucosamine est capable de reconnaître d'autres ligands, comme le glucose qui inhibe la capture d'agalactoglycoprotéines par des cellules sinusoïdales isolées. [Summerfield *et al.* 1982]. D'autre part, selon Haltiwanger *et al.* [1986], la spécificité de ce récepteur, sur les macrophages alvéolaires, doit être élargie au fucose.

Il existe cependant une controverse quant à la localisation précise des récepteurs à mannose/N-acétylglucosamine parmi les cellules non parenchymateuses elles-mêmes. Les travaux de Parise *et al.* [1982] semblent indiquer que ce type de récepteur se retrouve principalement dans des fractions riches en cellules de Kupffer, mais ils ne peuvent fournir une preuve certaine que ces mêmes cellules représentent le site de localisation unique du récepteur. Praaning-Van Dalen et ses collaborateurs [1982] estiment quant à eux, que les récepteurs à mannose/N-acétylglucosamine sont présents à la fois sur les cellules de Kupffer et sur les cellules endothéliales. Néanmoins, il apparaît que ces dernières endocytent les différentes agalactoglycoprotéines testées, de manière beaucoup plus active. De plus, les cellules endothéliales plus nombreuses que les cellules de Kupffer dans le foie, contribueraient de manière plus importante à la capture de ces glycoprotéines particulières. Les travaux de Tolleshaug *et al.* [1984] vont dans le même sens, ainsi que ceux de Hubbard *et al.* [1979], qui montrent par des techniques autoradiographiques que les cellules endothéliales s'avèrent beaucoup plus actives que les cellules de Kupffer, sur base de

leur volume, dans l'endocytose de glycoprotéines exposant des résidus N-acétylglucosamine ou mannose en position terminale.

Il est à signaler que les cellules hépatiques possèdent d'autres types de récepteurs que les récepteurs à galactose et les récepteurs à mannose/N-acétylglucosamine. En effet, on trouve des récepteurs à fucose, localisés sur les cellules de Kupffer, et distincts par leur spécificité, des récepteurs à mannose/N-acétylglucosamine habituellement décrits [Haltiwanger *et al.*, 1986]. Il faut mentionner également les récepteurs à mannose-6P. Ceux-ci sont pour la plupart intracellulaires, et interviennent dans le ciblage des enzymes lysosomales nouvellement synthétisées. Néanmoins, ils existent aussi, en nombre réduit, à la surface des hépatocytes [Ashwell & Harford, 1982].

VII. INFLUENCE DE L'INVERTASE SUR LES LYSOSOMES DES CELLULES HEPATIQUES.

Etant donné la répartition précise des récepteurs responsables de l'endocytose des glycoprotéines parmi les deux catégories de cellules hépatiques, il s'avère possible de diriger une substance particulière vers les lysosomes d'un type cellulaire déterminé. C'est ainsi que l'invertase de levure, de par sa nature, semble tout-à-fait appropriée pour se lier spécifiquement aux récepteurs à mannose/N-acétylglucosamine présents à la surface des cellules non parenchymateuses du foie.

Cette protéine fortement glycosylée, d'un poids moléculaire d'environ 270.000, contient 50% d'hydrates de carbone qui sont, pour la plupart, des résidus "mannose" terminaux. Elle est composée de deux sous-unités identiques de 60 KDaltons, dont chacune fixe de manière covalente 9 chaînes de type "haut-mannose" comprenant 26 à 54 résidus [Trimble & Maley, 1977]. Ce sont plus précisément des liaisons N-acétylglucosamine-asparagine qui sont responsables de la fixation de ces

chaînes glucidiques à la partie protéique de l'invertase; c'est aussi le cas pour beaucoup d'autres glycoprotéines, parmi lesquelles l'ovalbumine et la γ -globuline [Neumann & Lampen, 1969].

Les travaux de Madnick *et al.* [1978] montrent bien, comme nous l'avions déjà supposé, que l'invertase est endocytée presque exclusivement par les cellules non parenchymateuses du foie, que ce soit *in vivo*, après injection intraveineuse de la glycoprotéine, ou *in vitro*, en présence de cellules hépatiques isolées. Les récepteurs spécifiques à mannose/N-acétylglucosamine des cellules sinusoidales, sont bien impliqués dans ce processus d'endocytose, puisqu'il s'agit d'un phénomène saturable. La localisation intralysosomale de l'invertase captée apparaît très clairement, puisque la majeure partie de la glycoprotéine se retrouve dans la fraction mitochondriale totale (M+L).

Tout ceci confirme l'importance des résidus glycosylés de la glycoprotéine pour sa reconnaissance au niveau des récepteurs d'un type particulier de cellule hépatique.

L'utilisation de l'invertase comme "marqueur" spécifiquement endocyté par les cellules sinusoidales *in vivo*, se justifie aisément. Les avantages propres à cette glycoprotéine, ne manquent pas.

L'invertase, une fois captée par les cellules non parenchymateuses, fait preuve d'une stabilité surprenante par rapport aux protéines endogènes du foie, malgré le fait qu'elle rejoigne rapidement les lysosomes. Cette qualité s'explique par la quantité considérable d'oligosaccharides contenus dans la glycoprotéine, qui forment ainsi une sorte de "coque" de protection contre les peptidases lysosomales; ceci favorise donc l'accumulation de la glycoprotéine dans les granules.

De plus, l'invertase se montre très facilement détectable grâce à son activité enzymatique (puisque'elle catalyse l'hydrolyse du saccharose en D-glucose et D-fructose), et, ce, de manière très précise, car il n'existe pas d'activité endogène notable de la glycoprotéine dans le foie [Madnik *et al.*, 1978].

Les travaux de Jadot *et al.* [1985] au sujet de l'endocytose de l'invertase par le foie de rat, présentent des résultats particulièrement intéressants. Quinze heures après injection intraveineuse, ils ont étudié la localisation intracellulaire de l'invertase par centrifugation analytique en gradient de saccharose, à partir d'une fraction mitochondriale totale (M+L). Les analyses en centrifugation isopycnique, indiquent que la glycoprotéine se localise plutôt dans des zones de densité largement supérieures à celles des hydrolases acides, cet écart se creusant davantage avec des doses croissantes d'invertase. La glycoprotéine semble s'accumuler dans une population de lysosomes bien distincte, qui s'individualise très nettement dans un gradient de saccharose suite à l'augmentation de densité causée par l'accumulation de l'invertase dans les organelles. Il est donc fort probable que les lysosomes spécialement affectés par la glycoprotéine proviennent des cellules non parenchymateuses du foie.

VIII. BUT DU TRAVAIL.

Comme nous venons de le constater dans la partie précédente, il est possible, avec une glycoprotéine riche en résidus mannose comme l'invertase, d'atteindre spécifiquement les lysosomes des cellules non parenchymateuses du foie, par l'intermédiaire des récepteurs à mannose/N-acétylglucosamine qui facilitent leur endocytose.

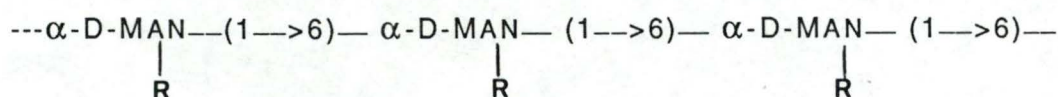
Dans le même ordre d'idée, nous avons pensé qu'une autre glycoprotéine du même type, le mannan, conviendrait très certainement pour nous permettre de modifier les propriétés physiques des lysosomes des cellules sinusoïdales afin de pouvoir les isoler dans un simple gradient de saccharose. D'après plusieurs travaux, le mannan interagit, en effet, avec les récepteurs à mannose/N-acétylglucosamine des cellules non parenchymateuses du foie [Achord *et al.*, 1977; Steer & Clarenburg, 1979] et ce, de la même manière que l'invertase [Madnick *et al.*, 1978; Rodman *et al.*, 1978].

Le mannan fut découvert dans la levure de boulanger, Saccharomyces cerevisiae, par Salkowski en 1894. Il se situe au niveau de la paroi du microorganisme, étroitement entremêlé avec la couche de glucanes, tout l'ensemble conférant ainsi une certaine rigidité à la cellule [Ballou, 1974a]. Il fait preuve d'une très grande stabilité métabolique au cours de la croissance exponentielle de la levure, puisque une fois inséré dans la paroi, il n'est que très rarement renouvelé ou sécrété dans le milieu environnant [Kratky *et al.*, 1975].

Le mannan est en fait une glycoprotéine extrêmement riche en hydrates de carbone, plus précisément en résidus mannose, d'un poids moléculaire total allant de 30.000 à 50.000 [Richter & Eby, 1985]; il ne contient pas plus de 5 à 10 % de matériel protéique. On parle donc couramment de "polysaccharide", étant donné la très

nette majorité de composants glucidiques. La portion de polymannose est composée d'une "chaîne-charnière" linéaire, formée par des liaisons α 1-6 entre les mannoses, à laquelle viennent se greffer des chaînes de résidus mannose réunis par des liaisons α 1-2 et α 1-3 (Fig. 2).

FIG. 2. Représentation schématique de la chaîne glucidique du mannan.



où R = $\alpha\text{-D-MAN---(1}\rightarrow\text{2)--}$,

$\alpha\text{-D-MAN---(1}\rightarrow\text{2)--}\alpha\text{-D-MAN---(1}\rightarrow\text{2)--}$,

$\alpha\text{-D-MAN---(1}\rightarrow\text{3)--}\alpha\text{-D-MAN---(1}\rightarrow\text{2)--}$, ou

$\alpha\text{-D-MAN---(1}\rightarrow\text{3)--}\alpha\text{-D-MAN---(1}\rightarrow\text{2)--}\alpha\text{-D-MAN---(1}\rightarrow\text{2)--}$

Deux procédures relativement simples ont permis de "disséquer" cette chaîne polymannosylée hautement ramifiée, afin de confirmer son agencement particulier (Fig. 3). La première méthode consiste en une réaction d'acétolyse qui clive préférentiellement les liaisons α 1-6 par un processus de catalyse acide. Dans les conditions adéquates, il y a production de nombreux fragments qui correspondent en fait aux chaînes latérales du polysaccharide. Afin de démontrer l'existence d'un squelette linéaire de résidus mannose liés α 1-6, le mannan est soumis à l'action d'une *exo- α -mannanase* d'origine bactérienne: celle-ci hydrolyse plutôt les liaisons α 1-2 et α 1-3, laissant ainsi le core linéaire du polymannose α 1-6 [Ballou & Raschke, 1974b]. Notons que, comme pour l'invertase, la chaîne polysaccharidique se fixe à la portion protéique par l'intermédiaire de liaisons N-acétylglucosamine-asparagine.

D'après Rosenfeld et Ballou [1975], l'ordre des chaînes latérales sur le squelette linéaire ne se fait pas au hasard; ce sont d'ailleurs ces mêmes chaînes qui

sont responsables de la forme symétrique du mannan, ce qui explique ainsi son rôle structural dans la paroi des levures.

Remarquons aussi que le mannan représente le principal élément immunogène de la levure, étant donné qu'il se situe à la surface cellulaire. Ces chaînes glucidiques semblent faire preuve d'une activité antigénique importante, puisque les fragments obtenus par acétolyse (voir fig.3) se montrent très souvent capables d'inhiber les réactions d'agglutination typiques obtenues en présence de l'antisérum homologue [Ballou & Raschke, 1974b].

Etant donné sa composition tout-à-fait particulière en polymannose, le mannan, sur base des éléments recueillis pour l'invertase, devrait se montrer beaucoup plus résistant aux hydrolases lysosomales, ce qui permettrait une accumulation d'autant meilleure au sein de ces organites. De plus, ce polysaccharide apparaît totalement inerte: il est dépourvu de toute activité enzymatique.

Tout semble s'accorder pour faire du mannan une substance adéquate pour modifier les propriétés physiques des lysosomes des cellules non parenchymateuses afin de les isoler spécifiquement. C'est ce que nous allons essayer de mettre en évidence au cours de ce travail, subdivisé en cinq parties, représentant chacune une étape bien définie dans notre étude:

1/ Etude de l'effet du mannan sur les lysosomes des cellules hépatiques en centrifugation isopycnique.

2/ Identification de la population de granules affectés par le mannan grâce à l'utilisation de marqueurs de l'endocytose.

3/ Analyse des effets du mannan sur les deux types de fractions mitochondriales en centrifugation différentielle et isopycnique.

4/ Comparaison du comportement des granules affectés par le mannan par rapport aux autres constituants subcellulaires de la fraction mitochondriale totale.

5/ Essai de purification des lysosomes des cellules non parenchymateuses en gradient discontinu de saccharose, après administration de mannan par voie intraveineuse.

CHAP.2. TECHNIQUES EXPERIMENTALES.

La plupart des techniques expérimentales utilisées au cours de ce travail, sont ici résumées. Les conditions précises de chaque expérience se trouvent mentionnées dans les légendes relatives aux résultats expérimentaux.

I. TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT.

1) PREPARATION D'UN HOMOGENAT.

Toutes les expériences ont été réalisées sur des rats mâles Wistar, à jeûn, d'un poids corporel compris entre 200 et 300 g.

La dose utilisée au cours de ce travail se compose de 10 mg de mannan (Sigma) dilués dans 1 ml de NaCl 0.9 %. Cette solution est injectée dans la veine fémorale de l'animal, sous légère anesthésie à l'éther.

Le sacrifice de l'animal a lieu, pour la plupart des expériences, 15 heures après cette administration. On procède ensuite, le plus rapidement possible, à la perfusion du foie *in situ*, par injection de NaCl 0.9 % glacé dans l'aorte, à un débit de 10 ml par minute, jusqu'à ce que l'on observe le blanchissement de l'organe vidé de son sang.

Le foie est ensuite prélevé, découpé en fines lamelles dans un volume connu d'une solution isotonique de saccharose 0.25 M glacé, et pesé. Le tout est finalement broyé dans un homogénéiseur coaxial de Potter. L'homogénat ainsi préparé, contient tous les composants subcellulaires des cellules hépatiques, en suspension.

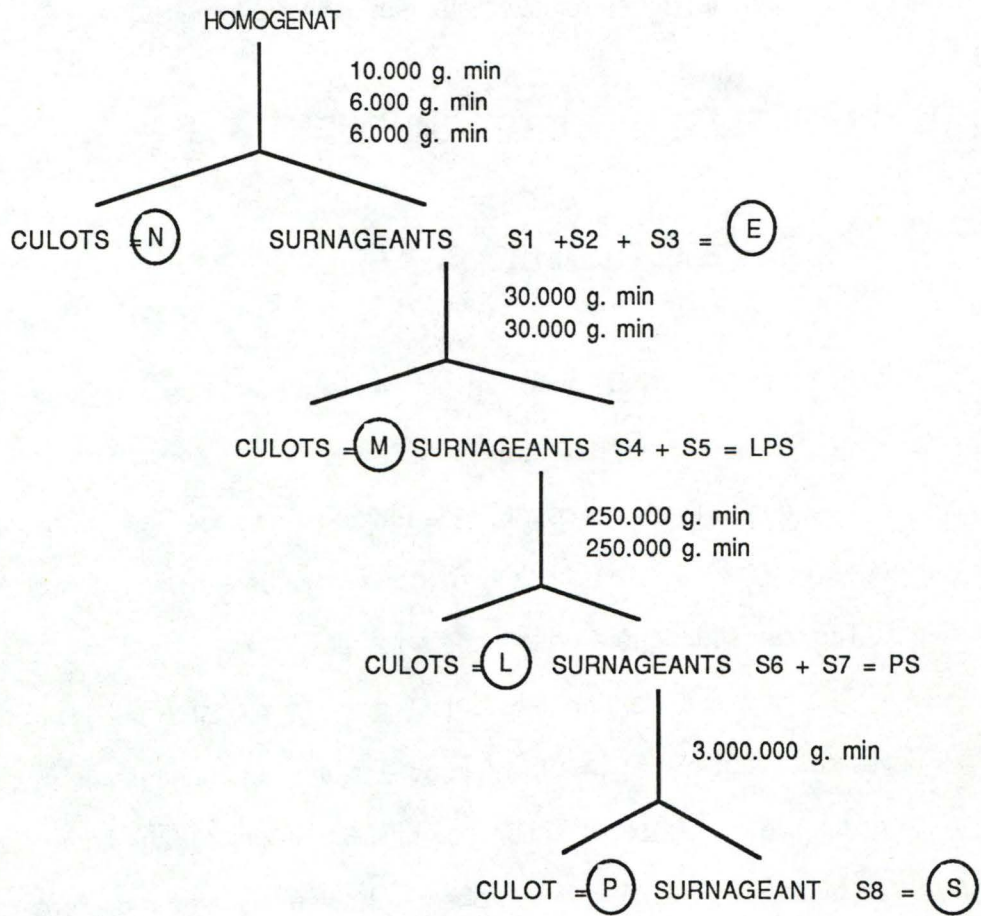


FIG. 4. Schéma de fractionnement subcellulaire du foie en centrifugation différentielle d'après de Duve *et al.* [1955].

2) CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE.

L'homogénat obtenu est soumis au schéma de fractionnement en centrifugation différentielle décrit par de Duve *et al.* [1955] et représenté à la figure 4.

Les granules sont séparés d'après leur taille, dans une solution isotonique de saccharose 0.25 M glacé. Un échantillon de l'homogénat, de volume connu, est d'abord centrifugé à une certaine vitesse, ce qui entraîne la sédimentation des granules les plus volumineux. Le culot est recueilli et le surnageant correspondant subit une nouvelle centrifugation à vitesse plus élevée; un second culot est ensuite isolé, contenant cette fois des particules de taille plus petite, tandis que le surnageant est à nouveau soumis à une centrifugation de vitesse encore plus élevée, et ainsi de suite, jusqu'à l'obtention successive de 5 fractions hétérogènes, mais cependant enrichies en certains types d'organelles:

1/ La **fraction N** contient essentiellement des noyaux, des débris cellulaires et quelques cellules intactes ayant résisté à l'homogénéisation;

2/ La **fraction M**, appelée fraction mitochondriale lourde, se voit particulièrement enrichie en mitochondries, mais renferme également des lysosomes et des peroxysomes en quantité appréciable;

3/ La **fraction L**, ou fraction mitochondriale légère, quant à elle, est enrichie en lysosomes et en peroxysomes;

4/ La **fraction P**, microsomale, contient la plus grande partie des éléments du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, ainsi que quelques fragments de la membrane plasmique;

5/ La **fraction S**, encore appelée "fraction soluble", contient tous les éléments non sédimentables des cellules hépatiques.

Dans la majeure partie des expériences menées dans ce travail, nous avons utilisé des fractions mitochondriales totales (M+L) préparées en utilisant les

conditions de centrifugation qui conduisent à l'obtention des fractions M et L dans le même culot.

Il en est de même pour les fractions P et S qui se retrouvent rassemblées en une seule fraction PS, et ce, pour tous les résultats expérimentaux décrits ultérieurement dans ce travail.

La représentation graphique des résultats, en centrifugation différentielle, est celle préconisée par de Duve *et al.* [1955], sous forme d'histogramme, où chacune des 5 fractions (N, M, L, P, S) est représentée par un rectangle bien défini. La hauteur de chaque rectangle représente l'activité spécifique relative, qui correspond au rapport de l'activité spécifique dans la fraction déterminée, sur l'activité spécifique dans l'homogénat (ceci symbolise en fait la purification); la base correspond à la quantité de protéines présente dans la fraction en question; la surface, quant à elle, représente le pourcentage d'activité retrouvé dans la fraction.

Pour les dosages enzymatiques, comme pour le dosage des protéines, on réalise un calcul de récupération sur le fractionnement, ce qui correspond à la somme des valeurs d'activité enzymatique trouvée dans les fractions N, M, L, P et S, rapportée à l'activité de l'homogénat qui équivaut à E+N.

D'après cette méthode de présentation des résultats, on obtient ainsi des profils de distribution caractéristiques de l'un ou l'autre organite subcellulaire, selon le type d'enzyme marqueur étudié.

3) CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE.

La séparation des particules subcellulaires s'opère cette fois, d'après leur densité. Les organelles sédimentent dans un gradient linéaire de saccharose jusqu'à ce qu'elles atteignent la zone correspondant à leur propre densité, pour s'y équilibrer.

La préparation des granules en suspension est déposée au sommet du tube contenant le gradient. Nous avons utilisé dans ce travail, des fractions ML pour la majeure partie des expériences, et quelquefois des fractions M et L séparées (Voir les légendes détaillées des figures).

Le tube ainsi préparé est alors soumis à une centrifugation dans un rotor à godets basculants. Les conditions précises de centrifugation sont chaque fois mentionnées dans les légendes des figures se rapportant aux résultats expérimentaux. Après centrifugation, les tubes sont découpés en tranches parallèles, afin de séparer des fractions de densité croissante qui seront analysées ultérieurement.

Le même principe s'applique également pour des gradients discontinus de saccharose, contenant des couches bien délimitées, de densité judicieusement choisies en fonction du type d'expériences à réaliser. Les granules subcellulaires, d'après leur propre densité, viendront s'équilibrer aux interfaces des différentes couches de saccharose superposées. Le schéma précis du gradient discontinu utilisé dans la cinquième partie des résultats expérimentaux, est décrit en détails à la figure 23.

La représentation graphique des résultats obtenus sur les fractions d'un gradient linéaire de saccharose, est celle décrite par Beaufay *et al.* [1964]. Il s'agit également d'histogrammes où chaque fraction est à nouveau symbolisée par un rectangle bien défini, avec, en abscisse, les densités limites de chaque fraction et, en ordonnée, la fréquence. Ce dernier paramètre représente en quelque sorte, la répartition de chaque type de particule en fonction de la densité; elle équivaut précisément au rapport du pourcentage d'activité, sur l'incrément de densité dans chacune des fractions.

Un tel histogramme est tracé pour chaque enzyme dosée sur les fractions d'un gradient; les graphiques ainsi obtenus sont donc parfaitement comparables pour un gradient déterminé. Remarquons que la somme des activités est chaque fois comparée à l'activité retrouvée dans la fraction dont on a déposé un échantillon au

Tableau 2. Résumé des conditions expérimentales pour les différents dosages enzymatiques.

<u>ENZYME</u>	<u>SUBSTRAT</u>	<u>CONC.</u>	<u>PH</u>	<u>MESURE</u>	<u>REFERENCES</u>
Phosphatase Acide	β -Glycérophosphate	50 mM	5	Colorimétrique du phosphate	Appelmans <i>et al.</i> [1955]
Cathepsine C	Glycyl-L-Arginine- β -Naphtylamide	0.25 mM	5	Colorimétrique de la naphtylamine	Jadot <i>et al.</i> [1984]
Cathepsine D	Hémoglobine	1.7%	3.6	Colorimétrique des radicaux aromatiques acidosolubles	Gianetto & de Duve [1955]
Arylsulfatase	p-Nitrocatéchol-sulfate	20 mM	5	Colorimétrique du nitrocatéchol	Bowers <i>et al.</i> [1967]
Cytochrome Oxydase	Cytochrome C	0.017 mM	7.4	Spectrophotométrie du cytochrome réduit	de Duve <i>et al.</i> [1955]
Urate Oxydase	Urate sodique	0.375 mM	7.4	Spectrophotométrie de l'urate	de Duve <i>et al.</i> [1955]

sommet du gradient (ML, M ou L selon les cas), ce qui équivaut au calcul de récupération.

La densité médiane correspond à une densité calculée sur les histogrammes. Par convention, 50 % de l'activité enzymatique envisagée sur la totalité des fractions, se retrouvent de part et d'autre de cette densité. Si il s'agit de distributions unimodales, ce paramètre permet des comparaisons intéressantes pour différentes enzymes mesurées sur le même gradient.

4) ENZYMES DE REFERENCE.

Le contenu en différents types de granules des fractions isolées par centrifugation, est estimé en mesurant l'activité des enzymes marqueurs spécifiquement associées à un type de granule déterminé [de Duve *et al.*, 1955]. La théorie des enzymes marqueurs repose en fait sur un postulat selon lequel: une enzyme de référence doit faire preuve d'une localisation intracellulaire unique, et, les mêmes granules d'une classe subcellulaire déterminée, doivent témoigner d'une homogénéité totale au niveau enzymatique.

Au cours de ce travail, nous avons choisi de mesurer l'activité enzymatique de la **cytochrome oxydase** pour repérer les mitochondries, différentes hydrolases, pour repérer les lysosomes: la **phosphatase acide**, la **cathepsine C**, la **cathepsine D** et l'**arylsulfatase**, et enfin, l'**urate oxydase** pour les peroxysomes.

II. TECHNIQUES ANALYTIQUES.

1) METHODES GENERALES DES DOSAGES ENZYMATIQUES.

Le tableau 2 donne un aperçu général des conditions expérimentales utilisées au cours de ce travail pour mesurer les différentes activités enzymatiques, ainsi que les références correspondantes, décrivant ces méthodes plus en détails.

Pour toutes ces enzymes, nous avons chaque fois mesuré l'activité totale, en présence de triton X-100 dans le milieu d'incubation, puisque sous l'effet de ce détergent, elles deviennent alors totalement accessibles à leurs substrats [Wattiaux & de Duve, 1956].

Le dosage des protéines s'effectue selon la méthode de Lowry *et al.* [1951].

2) PREPARATION DES "MARQUEURS" DE L'ENDOCYTOSE.

L'asialofétuine de sérum de veau (ASF) fut fournie par la firme Sigma. L'albumine bovine fut traitée à la formaldéhyde (f-BSA) selon la méthode de Mego & Mc Queen [1965], modifiée par Horiuchi *et al.* [1985a].

Le marquage de ces deux protéines à l'iode radioactif (I^{125}) par l'intermédiaire de la tyramine-cellobiose (TC), s'effectue selon la méthode de Pittman *et al.* [1983], modifiée par Hysing et Tolleshaug [1986], dont voici résumées les grandes étapes: la fixation de la tyramine sur la cellobiose s'effectue par une réaction d'amination en présence de sodium cyanoborohydrique ($NaBH_3CN$); on procède ensuite au couplage d'iode radioactif (I^{125}) sur la tyramine-cellobiose, par une réaction d'oxydation au moyen de tétrachlorodiphénylglycouril, pour finalement y fixer la protéine en question (ASF ou f-BSA) de manière covalente, avec de la trichlorotriazine (TCTA), diluée dans l'acétonitrile, en présence d'hydroxyde de sodium.

Le composé ainsi obtenu (^{125}I -TC-ASF ou ^{125}I -TC-f-BSA) est ensuite élué sur une colonne de chromatographie de type Séphadex G25 au moyen d'un tampon phosphate adéquat.

Le poids moléculaire de la protéine ainsi marquée s'accroît d'environ 750 D, ce qui n'altère aucunement sa reconnaissance par les systèmes biologiques.

Les avantages d'un tel marquage seront ultérieurement développés dans la deuxième partie des résultats expérimentaux.

CHAP.3. RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. EFFETS DU MANNAN SUR LES LYSOSOMES, ANALYSES PAR CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE.

1) Introduction.

Etant donné son contenu en résidus mannosylés, on peut penser que le mannan envahira plutôt les cellules hépatiques dotées de récepteurs spécifiques au mannose. En effet, comme nous l'avons déjà mentionné, la littérature fournit de nombreux arguments en faveur de l'existence de récepteurs à mannose/N-acétylglucosamine, localisés en majorité sur les cellules non parenchymateuses du foie. Par le biais de l'endocytose par récepteurs, cette glycoprotéine, introduite dans la circulation sanguine, serait captée préférentiellement par ce type de cellules, pour s'accumuler ensuite dans leurs lysosomes, peut-être de manière analogue à celle de l'invertase [Jadot, 1987], vu leur constitution glucosidique semblable.

Dans cette première partie, nous avons voulu étudier quels étaient les effets du mannan endocyté par le foie de rat. Pour ce faire, nous avons injecté, par voie intraveineuse à différents animaux, une dose de 10 mg de mannan dilués dans 1 ml de NaCl 0.9%.

Après des temps croissants écoulés entre l'injection et le sacrifice de l'animal, nous avons comparé le comportement des granules contenant le mannan par centrifugation isopycniqne, en milieu de saccharose, en appliquant chaque fois le schéma expérimental de Beaufay et ses collaborateurs [1964].

Immédiatement après le sacrifice, le foie de l'animal est perfusé, homogénéisé et soumis au fractionnement classique par centrifugation différentielle. Dans cette première partie, nous avons mené toutes nos expériences avec des fractions mitochondriales totales (M+L), qui contiennent environ 70 % des lysosomes hépatiques.

En vue de repérer les lysosomes chargés de mannan, nous avons établi la distribution enzymatique de deux hydrolases acides. En effet, selon les travaux de Jadot [1987], la proportion d'activité hydrolytique soumise au changement de densité après

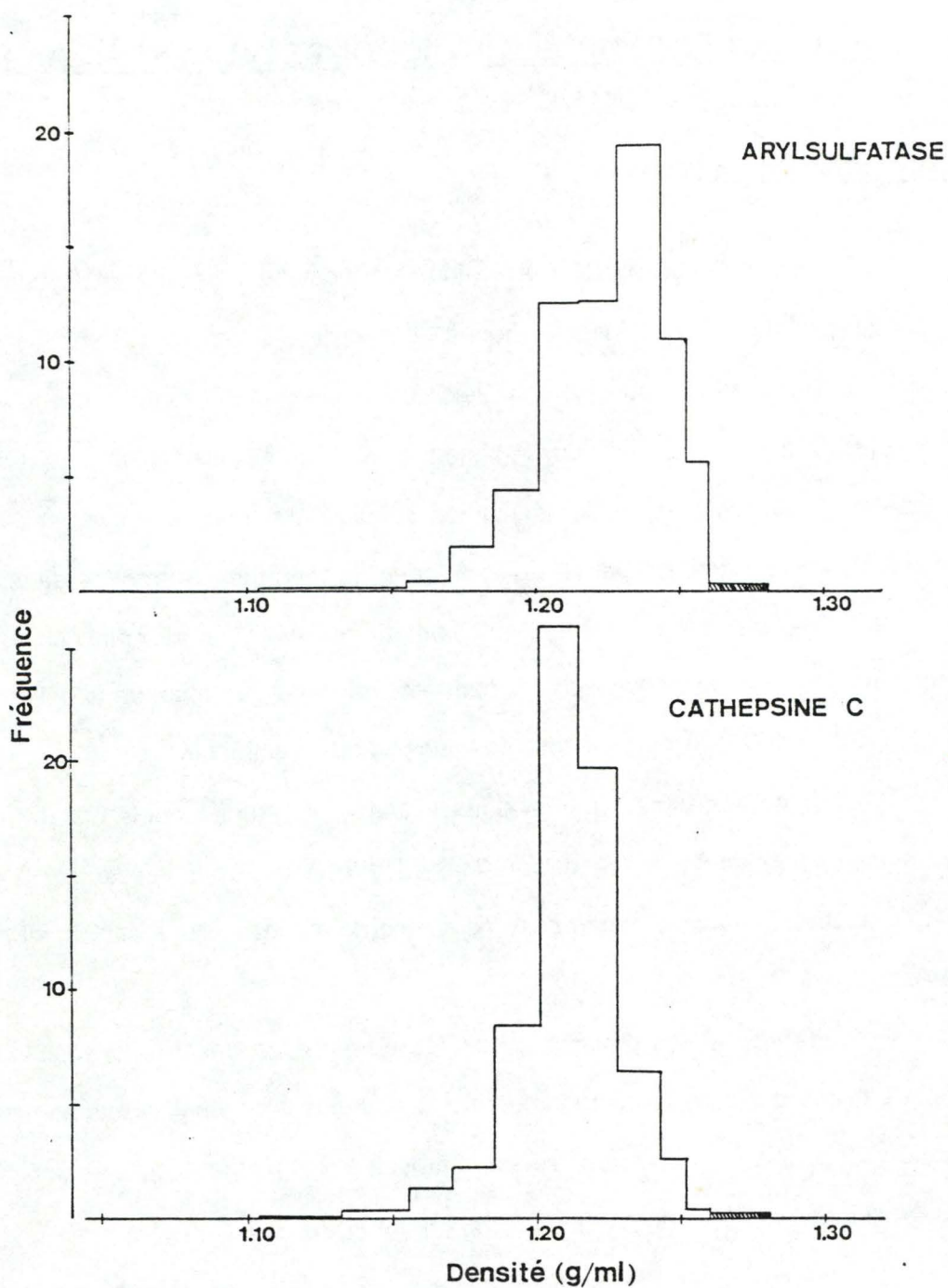


FIG. 5. Profils de distribution de l'*arylsulfatase* et de la *cathepsine C* après centrifugation isopycnique d'une fraction ML dans un gradient de saccharose.

Une fraction ML est isolée à partir d'un rat ayant reçu l'injection de 10 mg de mannan et sacrifié 1 heure après cette injection. Les centrifugations sont réalisées à 39 000 tours/min dans un rotor Spinco SW65. L'intégrale du carré de la vitesse angulaire vaut $144 \text{ rad}^2/\text{ns}$. Le gradient de saccharose s'étend de 1.12 à 1.30 g/ml. Les blocs ombrés (▨) représentent les quantités retrouvées dans la dernière fraction.

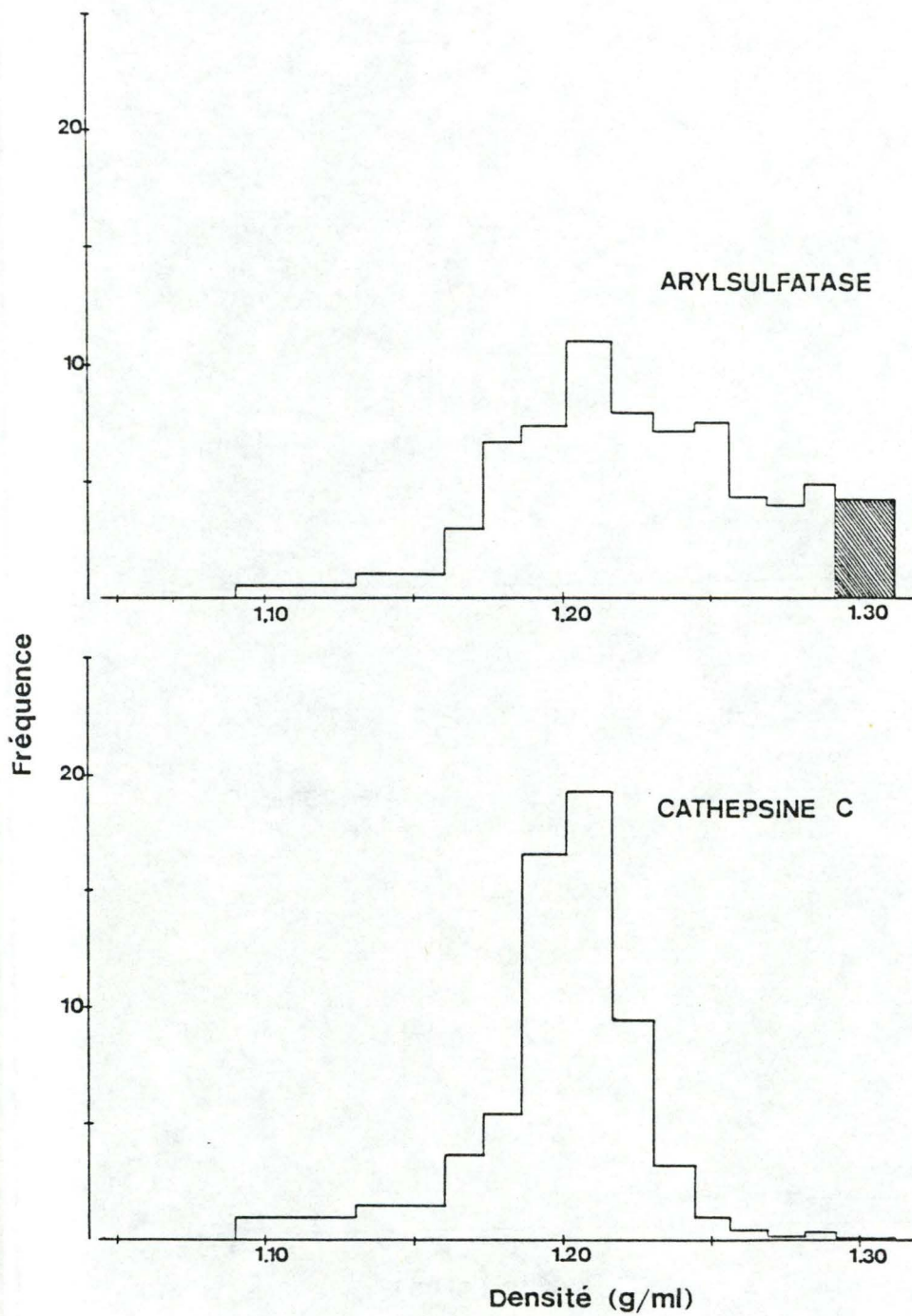



FIG. 6. Profils de distribution de l'*arylsulfatase* et de la *cathepsine C* après centrifugation isopycnique d'une fraction ML dans un gradient de saccharose.

Une fraction ML est isolée à partir d'un rat ayant reçu l'injection de 10 mg de mannan et sacrifié 3 heures après cette injection. Les conditions de centrifugation sont identiques à celles décrites pour la Fig.5. Le gradient de saccharose s'étend de 1.14 à 1.32 g/ml. Les blocs ombrés

() représentent les quantités retrouvées dans la dernière fraction.

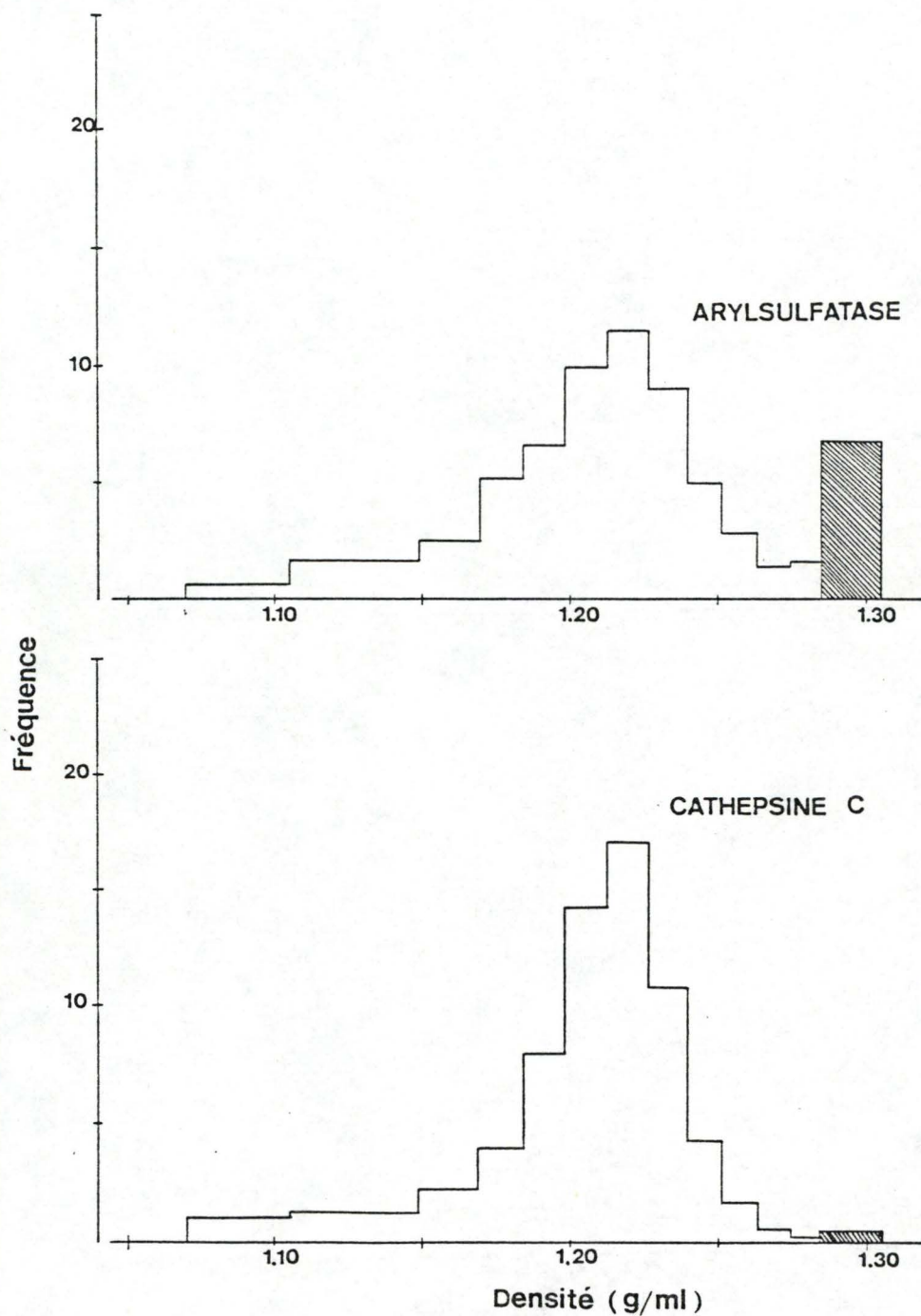



FIG. 7. Profils de distribution de l'*arylsulfatase* et de la *cathepsine C* après centrifugation isopycnique d'une fraction ML dans un gradient de saccharose.

Une fraction ML est isolée à partir d'un rat ayant reçu l'injection de 10 mg de mannan et sacrifié 15 heures après cette injection. Les conditions de centrifugation sont identiques à celles décrites pour la Fig.5. Le gradient de saccharose s'étend de 1.14 à 1.32 g/ml. Les blocs ombrés

() représentent les quantités retrouvées dans la dernière fraction.

injection d'invertase, dépend de l'enzyme considérée. On a constaté que c'était la distribution de l'arylsulfatase qui se voyait la plus perturbée dans de telles conditions; il en fut d'ailleurs déduit que la population de granules affectés était représentée par les lysosomes des cellules non parenchymateuses, en accord avec une forte concentration de l'arylsulfatase dans ce type de lysosomes par rapport à ceux des hépatocytes [Munthe-Kaas *et al.*, 1976]. C'est pourquoi nous avons choisi de mesurer l'activité de cette enzyme pour suivre le comportement des lysosomes affectés par le mannan, en centrifugation isopycnique. Les lysosomes des cellules parenchymateuses, quant à eux, seront caractérisés par l'intermédiaire de la cathepsine C.

Afin de bien évaluer l'effet du mannan sur les lysosomes, nous comparerons les résultats obtenus avec des expériences-témoins, réalisées sur des rats injectés avec 1 ml de NaCl 0.9%.

2) Résultats.

Les figures 5, 6 et 7 rendent compte des profils de distribution enzymatique à des temps croissants après l'injection du mannan. En ce qui concerne l'**arylsulfatase**, on observe un glissement progressif de sa localisation vers les parties les plus denses du gradient; d'abord unimodale, une heure après l'injection, elle devient beaucoup plus étalée avec des traînées importantes vers les hautes densités; elle acquiert finalement après 15 heures, une bimodalité très nette, présentant une proportion d'activité conséquente dans le fond du gradient. Les deux populations de lysosomes hépatiques apparaissent clairement dans ce dernier cas: les lysosomes des cellules non parenchymateuses, fortement alourdis par le mannan, se retrouvent dans le fond, tandis que les autres provenant des cellules parenchymateuses, contenant moins d'arylsulfatase, mais beaucoup plus nombreux, restent localisés aux alentours de leur densité d'équilibre caractéristique (vers 1.210 gr/ml).

La distribution enzymatique de la **cathepsine C** ne semble pratiquement pas affectée par le mannan, les densités médianes restant fort

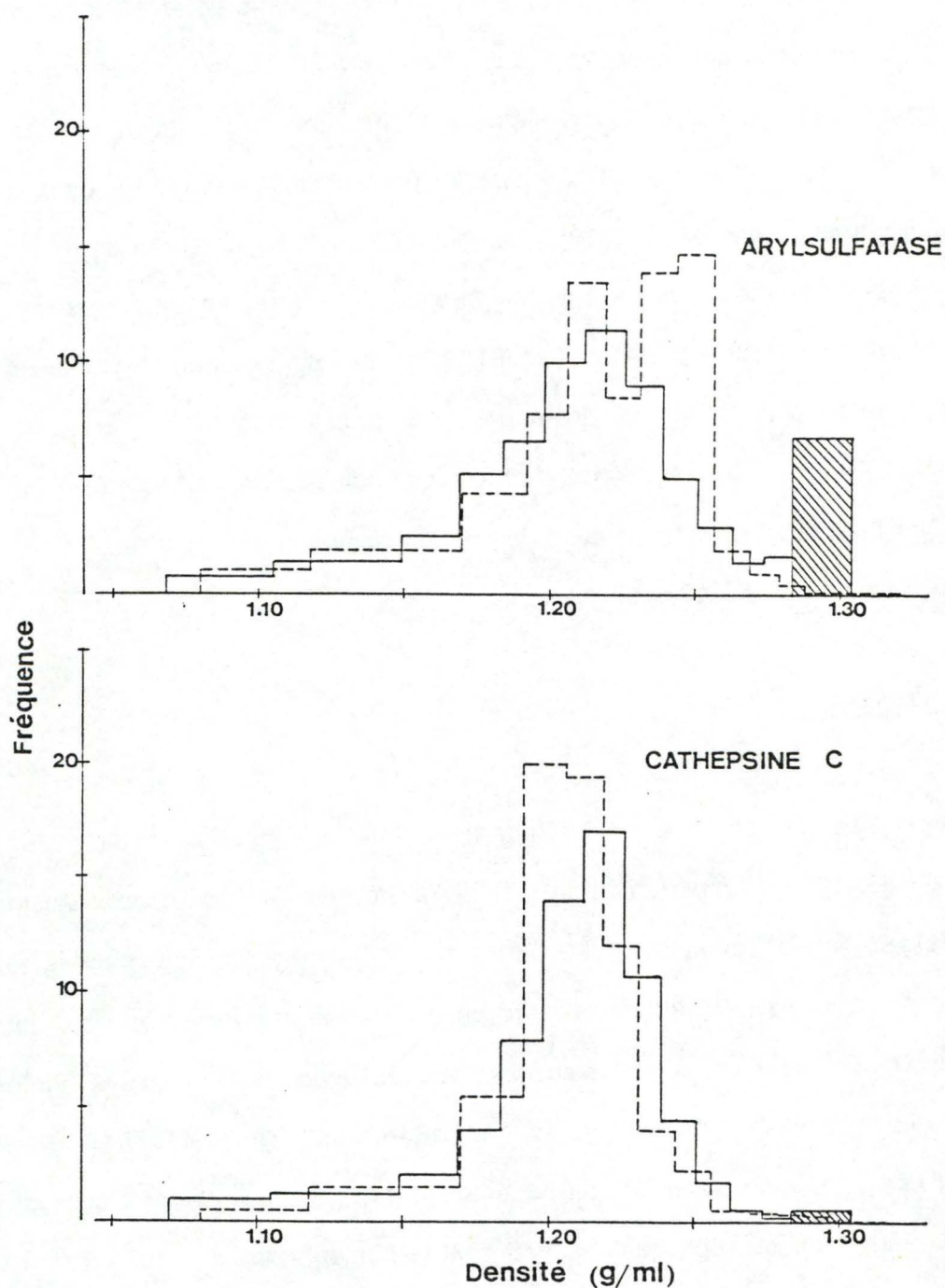


FIG. 8. Profils de distribution de l'arylsulfatase et de la cathepsine C après centrifugation isopycniqne d'une fraction ML dans un gradient de saccharose.

Les centrifugations sont réalisées sur des fractions ML isolées à partir d'un rat ayant reçu l'injection de 10 mg de mannan et sacrifié 15 heures après cette injection (—) ou à partir d'un rat témoin, injecté avec 1 ml de NaCl 0.9% et sacrifié après le même intervalle de temps (---). Les conditions de centrifugation sont identiques à celles décrites pour la Fig.5. Les gradients de saccharose vont de 1.14 à 1.32 g/ml. Les blocs ombrés (▨) représentent les quantités retrouvées dans la dernière fraction.

semblables, à savoir 1.211 gr/ml après 1 heure, et 1.210 gr/ml après 15 heures. Elle apparaît cependant plus localisée dans le premier cas, se répartissant principalement sur 4 fractions, alors qu'après 15 heures, un léger étalement se dessine: en effet, la majeure partie de l'activité se retrouve sur quelques 7 fractions du gradient. Cela s'explique aisément par la contribution mineure des lysosomes des cellules non parenchymateuses qui, vu leur faible contenu en cathepsine C, n'affectent cette distribution que de manière négligeable. Malgré cette légère différence dans les profils d'activité enzymatique, on ne constate pas d'effet notable sur les densités médianes, ce qui semble indiquer que les lysosomes des hépatocytes soient peu concernés dans le stockage du mannan.

Tableau 3. Données complémentaires concernant les expériences décrites dans les figures 5, 6, 7 et 8. Dans chaque cas, la valeur indiquée correspond à l'activité mesurée dans la fraction la plus dense du gradient, exprimée en pourcents de l'activité totale de l'ensemble du gradient.

Temps d'action du <u>MANNAN</u>	<u>ENZYME</u>	
	<u>Arylsulfatase</u>	<u>Cathepsine C</u>
1 heure	1.0	0.5
3 heures	8.3	0.2
15 heures	13.5	1.1
TEMOIN NaCl 0.9%	0.0	0.0

Les conclusions que l'on peut tirer du tableau 3 vont dans le même sens et ne peuvent que renforcer les constatations déjà faites pour ces deux enzymes. Il convient toutefois de souligner la quantité importante d'arylsulfatase retrouvée dans la dernière fraction. Nous pouvons donc en déduire que l'effet du mannan se manifeste bien 15 heures après son injection.

Si l'on compare les profils enzymatiques de cette catégorie avec ceux de l'expérience témoin, comme dans la figure 8, la différence de distribution de l'**arylsulfatase** est frappante. La bimodalité due au stockage du mannan se démarque nettement de la distribution normale.

Quant à la **cathepsine C**, elle présente une répartition d'activité similaire dans les deux cas, avec un maximum dans la zone de densité typique des lysosomes, entre 1.200 et 1.220 gr/ml.

3) Discussion.

Nous avons entrepris cette série d'expériences, pour rechercher l'effet éventuel du mannan endocyté par le foie de rat. Plusieurs constatations intéressantes se dégagent de cette première partie.

Tout d'abord, le mannan ne rejoint pas tous les types de lysosomes hépatiques, mais une population bien définie de ces granules, contenant un faible pourcentage de cathepsine C. Ceux-ci se comportent alors différemment du reste des lysosomes dans un gradient de saccharose. Etant donné que l'arylsulfatase est l'enzyme la plus fortement concentrée dans cette catégorie de lysosomes [Arborgh *et al.*, 1973], son profil de distribution s'avère un outil adéquat pour suivre le comportement de ces granules en particulier.

Elle indique que la densité des lysosomes contenant le mannan augmente progressivement avec le temps. Ceci se traduit, en effet, par un glissement continu de la distribution de l'enzyme vers le fond du gradient. Quinze heures après l'injection, elle apparaît franchement bimodale, avec une proportion élevée dans la fraction la plus dense.

Au cours de ses travaux sur le trajet intracellulaire de l'invertase endocytée par le foie de rat, Jadot [1987] aboutit aux mêmes conclusions. La distribution de l'arylsulfatase, pour un temps identique de 15 heures d'action de la glycoprotéine, présente pratiquement le même profil que celui observé ici. Il en avait également déduit que les lysosomes des cellules non parenchymateuses constituaient les lieux de stockage prépondérants de la glycoprotéine.

Nous constatons ici, que le mannan se comporte de manière similaire, augmentant la densité des lysosomes des cellules non parenchymateuses au cours du

temps, puisque ceux-ci se retrouvent beaucoup plus bas dans un gradient de densité. C'est là le point principal de cette première partie.

Notons également que les effets sont bien plus marqués après 15 heures. C'est pourquoi, nous pouvons supposer que ce temps est suffisamment long pour permettre à la majeure partie de la glycoprotéine injectée de s'accumuler dans les lysosomes. Nous utiliserons d'ailleurs ce même laps de temps dans la suite de nos expériences.

II. IDENTIFICATION DES GRANULES AFFECTES PAR LE MANNAN. UTILISATION DE MARQUEURS DE L'ENDOCYTOSE.

1) Introduction.

Suite aux résultats obtenus précédemment, il est assez probable que ce sont les lysosomes des cellules sinusoidales qui stockent le mannan endocyté. Afin d'identifier avec plus de précision les granules impliqués dans ce phénomène, nous avons utilisé des marqueurs précis de l'endocytose.

Grâce à leur fonction de capture de macromolécules et de particules présentes dans la circulation, les cellules hépatiques, tant les cellules parenchymateuses que les non parenchymateuses, peuvent endocyter ces marqueurs sans aucune difficulté.

Nous avons choisi, pour cette deuxième série d'expériences, d'étudier les distributions de l'asialofétuine (ASF) et de la formyl sérum albumine bovine (f-BSA), dans les cellules hépatiques, et de les comparer à la distribution d'activité enzymatique de quelques hydrolases lysosomales. Cette démarche expérimentale se justifie aisément par les éléments qu'apporte la littérature à ce sujet. En effet, d'après les travaux de Tolleshaug *et al.* [1977a], les lieux d'endocytose hépatique s'avèrent totalement différents en fonction du type de marqueur utilisé. Grâce au couplage de ces deux substances à de l'iode radioactif (I^{125}), ils ont pu démontrer que l' I^{125} -ASF est captée presque exclusivement par les hépatocytes *in vitro*, tandis que la sérum

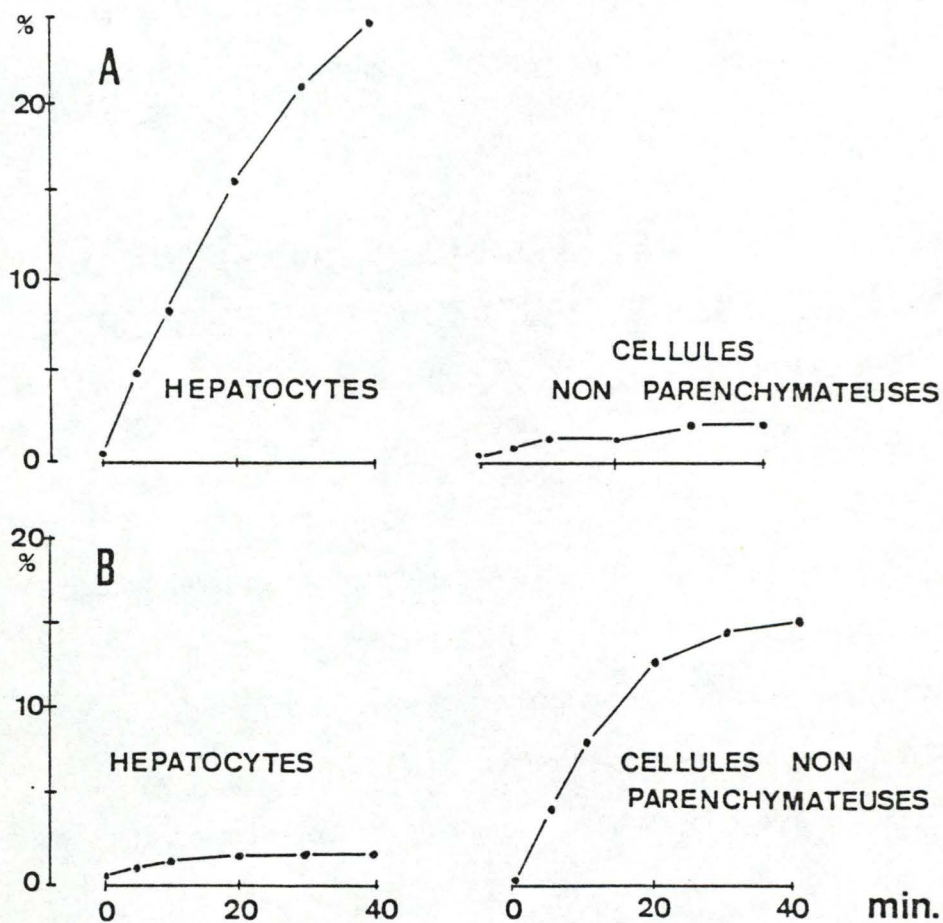


Fig.9, d'après Tolleshaug *et al.* [1977a].

Capture de l' ^{125}I -ASF (A) et de la ^{125}I -f-HSA (B) dans les hépatocytes purifiés (à gauche) et dans les cellules non parenchymateuses de foie de rat (à droite). Le taux d'endocytose est exprimé en pourcents de la radioactivité initiale dans chaque échantillon. La concentration de départ pour les deux marqueurs est d'environ 30 nM.

La concentration finale des cellules est de 5×10^6 cellules/ml, à la fois pour les hépatocytes et les cellules non parenchymateuses.

albumine humaine, traitée à la formaldéhyde, et marquée à l'iode, (^{125}I -f-HSA) est captée seulement par les cellules non parenchymateuses. Ceci apparaît clairement sur la figure 9 d'après les mêmes auteurs.

Notons que nous avons utilisé dans nos expériences de la sérum albumine bovine; ceci ne change rien quant aux éléments tirés de cette étude, puisque les deux protéines ne diffèrent que par quelques acides aminés seulement, et sont endocytées de la même façon par les cellules non parenchymateuses.

Il est important de préciser que Tolleshaug et ses collaborateurs ont travaillé sur des suspensions de cellules purifiées. En ce qui concerne l'ASF, sa très faible capture par les cellules non parenchymateuses s'explique par la présence de quelques hépatocytes contaminants parmi les cellules sinusoidales purifiées. Les mêmes constatations s'appliquent à la f-HSA, captée de manière négligeable par les hépatocytes isolés, qui, eux aussi, seraient contaminés par quelques cellules non parenchymateuses.

Sur base de ces travaux, il apparaît que ces deux marqueurs sont captés par la voie de l'endocytose par récepteurs. Ils subissent ensuite une dégradation lysosomale classique évaluée par la mesure de la radioactivité acidosoluble. Il est à noter également que le taux initial de capture de l'ASF est toujours supérieur à son taux de dégradation, ce qui n'est pas le cas pour la sérum-albumine.

Après ce bref aperçu au sujet des deux marqueurs utilisés dans notre travail, il est intéressant de considérer plus en détails leur mécanisme d'endocytose afin de comprendre l'intérêt qu'ils représentent pour l'identification des granules qui accumulent le mannan.

a) L'asialofétuine (ASF).

Vu la présence de récepteurs à galactose situés en majorité sur les hépatocytes, nous savons que les asialoglycoprotéines sont captées sélectivement par ce type de cellules. Un tel sort sera donc réservé à la fétuine qui aura perdu l'acide sialique terminal de sa partie glucidique; on parle alors couramment d' "asialofétuine".

On a en effet constaté que cette asialofétuine (ASF) s'accumule environ 17 fois plus dans les hépatocytes que dans les cellules non parenchymateuses [Tolleshaug *et al.*, 1977b]. Les travaux étant réalisés *in vivo*, les auteurs expliquent la répartition minime de cette glycoprotéine dans les cellules non parenchymateuses, de deux manières: soit une partie de la protéine marquée serait dénaturée pendant la désialylation, ou pendant la procédure de marquage à l'iode radioactif, ce qui impliquerait sa capture par les cellules du système réticulo-endothélial; soit, l'ASF modifiée, libérée par les hépatocytes morts, se retrouverait dans le milieu environnant, et serait ainsi absorbée par les cellules non parenchymateuses, qui jouent un rôle important dans l'évacuation des déchets de l'organisme.

Quoi qu'il en soit, la localisation de l'ASF est toujours prépondérante dans les hépatocytes.

En comparant la distribution de quelques enzymes marqueurs et celle de l' ^{125}I -ASF dans les fractions subcellulaires, on a pu démontrer que la glycoprotéine pénétrait dans les cellules par le mécanisme d'endocytose par récepteurs. Endéans quelques minutes après l'injection intraveineuse, la radioactivité se retrouve principalement dans la fraction P, microsomale, et migre avec le temps, vers des fractions plus denses; on observe alors une quantité considérable dans la fraction L, ce qui correspond parfaitement avec la distribution enzymatique des hydrolases lysosomales [Tolleshaug *et al.*, 1977a].

Toutes les étapes de ce phénomène hétérophagique apparaissent clairement dans les travaux de Labadie *et al.* [1975], depuis la capture de la protéine dans les phagosomes, jusqu'à la digestion intralysosomale du peptide en acides aminés résiduels.

De plus, vu la nette prédominance de la capture de l'ASF sur la dégradation, quelle que soit la concentration initiale de la protéine, on constate une apparition massive de radioactivité dans la cellule jusqu'à ce que les ressources extracellulaires soient complètement épuisées.

L'étape limitante de l'endocytose serait plutôt le transport de la protéine vers les lysosomes, dépendant de la présence de microfilaments et de microtubules

intacts. En effet, l'ajout de colchicine ou de cytochalasine B s'avère nettement défavorable à l'apparition de radioactivité intralysosomale, après injection de l' ^{125}I -ASF [Tolleshaug *et al.*, 1979].

De plus, lorsque l'on étudie l'effet de la température sur l'endocytose de cette glycoprotéine, on remarque que la fusion entre lysosomes et endosomes est la plus profondément perturbée en-dessous de 20°C. Ce serait l'évènement métabolique le plus lent dans le catabolisme de l'ASF [Dunn *et al.*, 1980].

Grâce à sa localisation pratiquement limitée aux hépatocytes, on peut considérer l'ASF comme un marqueur d'endocytose adéquat pour ce type de cellules.

b) La formaldéhyde-sérum albumine bovine (f-BSA).

Il s'agit ici de sérum albumine bovine dénaturée par l'action de la formaldéhyde, dont le mécanisme d'altération reste encore assez obscur. On a cependant remarqué que le traitement à la formaldéhyde amène une augmentation massive de charges négatives sur la protéine. De plus, lorsque la BSA dénaturée est stockée dans l'organisme pendant des temps très longs et, de ce fait, forme des agrégats, elle serait probablement captée par phagocytose dans les cellules de Kupffer [Blomhoff *et al.*, 1984].

Cependant, selon d'autres auteurs, [Horiuchi *et al.*, 1985a], l'apparition de formes polymériques dues à l'action de la formaldéhyde ne serait pas le facteur responsable de la reconnaissance de la f-BSA sur ces mêmes cellules de Kupffer.

Déjà depuis 1965, Mego et Mac Queen avaient remarqué, qu'après injection intraveineuse à une souris, la sérum albumine traitée à la formaldéhyde disparaissait rapidement de la circulation sanguine grâce sa capture par le foie.

Par après, ceci fut expliqué par l'intervention de récepteurs particuliers des cellules sinusoïdales, les "récepteurs scavengers", reconnus pour fixer toutes les protéines dénaturées ou modifiées chimiquement. On a remarqué que ces récepteurs tout-à-fait spéciaux reconnaissent plutôt des molécules riches en

charges négatives. Dès lors, on comprend aisément la modification apportée à la sérum albumine bovine, par un traitement à la formaldéhyde.

Cependant, on se pose encore beaucoup de questions quant au rôle physiologique précis de tels récepteurs dans l'organisme, puisque la modification de la sérum albumine par la formaldéhyde ne se produit évidemment pas *in vivo*.

Néanmoins, il n'est pas impossible que d'autres ligands naturels puissent être reconnus par les récepteurs responsables de l'endocytose de la f-BSA. Il est à noter à ce propos, que l'ajout de sérum a la propriété d'inhiber de manière significative la capture de f-BSA par les cellules sinusoïdales. Il n'est donc pas exclu que certains ligands naturels, de structure semblable à la f-BSA, soient contenus dans le sérum.

Les cellules sinusoïdales, n'étant pas de nature homogène, il n'est pas toujours facile de déterminer d'un commun accord quel type précis de cellule intervient dans la capture des protéines dénaturées. Certains auteurs estiment que ce sont les cellules de Kupffer qui endocytent la f-BSA [Horiuchi *et al.*, 1986], se basant sur le fait que, dans les milieux de culture de cellules sinusoïdales, les cellules de Kupffer, adhérant à la paroi, présentent une affinité prédominante pour cette protéine dénaturée, par rapport aux autres cellules flottant dans le milieu de suspension. Ceci s'accorde parfaitement avec le rôle des cellules de Kupffer, véritables macrophages hépatiques responsables de l'épuration du liquide sanguin.

Néanmoins, d'autres auteurs attribuent ce rôle à la présence des "récepteurs scavengers" sur les cellules endothéliales, plutôt que sur les cellules de Kupffer [Blomhoff *et al.* 1984; Eskild & Berg, 1982].

Quel que soit le type de cellule non parenchymateuse impliquée, la f-BSA y pénètre via endocytose par récepteurs, au même titre que l'ASF dans les cellules hépatiques. En utilisant la f-BSA marquée à l'iode radioactif (I^{125}), on retrouve toutes les étapes caractéristiques de cette endocytose, et ceci, grâce au même type d'étude que celle menée pour l'ASF, en comparant la distribution d'enzymes marqueurs et de la radioactivité dans les fractions subcellulaires.

Il apparaît néanmoins, que les cellules non parenchymateuses ayant endocyté de la f-BSA fassent preuve d'un transport du ligand et d'une fusion avec les lysosomes, beaucoup plus efficaces que dans le cas de capture d'ASF par les cellules parenchymateuses [Wandel *et al.*, 1982].

Plusieurs publications sont parues ces dernières années, au sujet des "récepteurs scavengers". La fixation de la f-BSA sur ce type de récepteur, n'est inhibée ni par l'albumine native, ni par le mannan, ce qui implique une structure tout-à-fait spéciale des "récepteurs scavengers" [Horiuchi *et al.*, 1985a]. Toutefois, ils font preuve d'une spécificité de ligand relativement étendue, intervenant dans l'endocytose de protéines modifiées par les aldéhydes en général. En effet, d'autres protéines que la sérum albumine ayant subi le même traitement, comme l'ovalbumine ou l'hémoglobine, par exemple, deviennent des ligands actifs pour les "récepteurs scavengers". Des domaines communs entre ces différents types de protéines, contenant un haut pourcentage de résidus lysine, seraient spécifiquement touchés par les aldéhydes, devenant ainsi des sites de reconnaissance spécifiques requis pour la fixation sur ces récepteurs [Horiuchi *et al.*, 1986].

Les études cinétiques de l'endocytose de la f-BSA montrent que la spécificité des "récepteurs scavengers" se situe surtout au niveau de la fixation du ligand; il s'agit de récepteurs de haute affinité, donnant lieu à un phénomène de capture saturable, typique de l'endocytose par récepteurs, et présentant un optimum de liaison aux environs de pH 8.

D'après Horiuchi *et al.* [1985a], le calcium ne serait pas requis pour la fixation de la f-BSA sur les "récepteurs scavengers" ce qui s'oppose totalement aux résultats de Eskild et Berg [1982] selon lesquels la capture de la f-BSA serait nettement dépendante du calcium.

La nature protéique de ce récepteur particulier, présumée depuis longtemps, fut parfaitement démontrée grâce aux travaux de purification du récepteur à f-BSA, menés par Horiuchi *et al.*, [1985b].

Il s'agit d'un récepteur assez volumineux, d'un poids moléculaire de 125.000, constitué par l'association non covalente de deux glycoprotéines principales.

On suggère également la présence d'un oligosaccharide riche en mannose, mais son intervention dans la fixation spécifique des ligands dénaturés est encore incertaine.

Le récepteur apparaît bien situé à la surface des cellules non parenchymateuses et serait recyclé à travers le Golgi après pénétration de la f-BSA dans la cellule [Eskild & Berg., 1982]. Etant donné sa capture spécifique par les cellules non parenchymateuses, l'albumine dénaturée à la formaldéhyde représente un moyen intéressant pour suivre l'endocytose et la digestion intracellulaire dans ces cellules en particulier.

Pour pouvoir tirer profit de ces deux marqueurs d'endocytose des différents types de cellules hépatiques, il est nécessaire de leur adjoindre un élément reconnaissable, afin de les localiser avec précision lorsqu'ils auront pénétré dans les cellules. Différentes techniques sont utilisées à cet effet.

* Marquage à l'iode radioactif (I^{125})

Ce marquage est celui utilisé dans toutes les références mentionnées précédemment, afin d'étudier l'endocytose de l'ASF et de la f-BSA dans leurs cellules respectives. Il s'agit d'une technique très courante et extrêmement simple, la seule mesure de radioactivité dans les fractions subcellulaires permettant une localisation précise. De plus, le couplage d'iode radioactif (I^{125}) ne perturbe en aucun cas les paramètres de fixation de la protéine sur son récepteur spécifique.

Néanmoins, les protéines ainsi marquées subissent toujours la dégradation intralysosomale classique, ce qui représente un désavantage certain. En effet, les produits cataboliques s'échappent des lysosomes de manière incontrôlable. Ainsi, l'iodotyrosine, par exemple, résultant de la dégradation de l'ASF dans les hépatocytes, passe facilement à travers la membrane lysosomale pour être ensuite excrétée dans le milieu extérieur. De plus, il peut se produire une déiodination dans la circulation sanguine, amenant une perte du marquage des produits de dégradation [Labadie *et al.*, 1975]. Cette fuite de la radioactivité hors de la cellule implique que le

taux d'iode radioactif mesuré dans les fractions subcellulaires ne reflète plus exactement la quantité de protéines endocytées au départ.

* Marquage au saccharose-C¹⁴.

Il s'agit ici de coupler de manière covalente du saccharose radioactif sur la protéine. Après avoir été libéré par hydrolyse lysosomale, le saccharose reste enfermé dans les organites. En effet, du fait de sa structure, il ne peut traverser la membrane lysosomale; ceci permet alors une quantification plus précise de l'endocytose des marqueurs. Outre ce précieux avantage, les récepteurs cellulaires ne font pas la distinction entre la protéine native et celle marquée au saccharose-C¹⁴ lors de la fixation. Un problème, néanmoins, est la faible radioactivité spécifique des composés obtenus, ce qui rend difficile leur utilisation *in vivo* [Pittman *et al.*, 1979].

* Marquage à la tyramine-cellobiose, couplée à l'iode I¹²⁵
(¹²⁵I-TC)

Cette technique particulière permet des études quantitatives de l'endocytose *in vivo*. La protéine est marquée à l'iode radioactif (¹²⁵I) par l'intermédiaire de tyramine-cellobiose (TC), selon la technique mentionnée dans le chapitre des "Techniques expérimentales".

Cette tyramine-cellobiose résiste parfaitement à l'hydrolyse lysosomale. Ni les liens β -glucosidiques de la cellobiose, ni les liaisons fixant la cellobiose à la tyramine, ne sont sensibles au clivage par les enzymes intracellulaires des mammifères.

La molécule hautement hydrophile, ne peut traverser les membranes biologiques, y compris celle des lysosomes, ce qui force les produits de dégradation à rester confinés dans les organites. Ceci permet d'établir une relation directe entre la radioactivité intracellulaire et le taux de protéines ainsi marquées, endocytées durant l'expérience. De plus, le marquage à l'iode I¹²⁵ permet d'obtenir des composés très

radioactifs, ce qui facilite l'étude des tissus de faible activité endocytique, ou la localisation de protéines à faible concentration cellulaire. C'est là l'avantage principal par rapport au saccharose-C¹⁴ [Hysing & Tolleshaug, 1986]. Il est important de souligner que la tyramine-cellobiose possède toutes les qualités d'un bon marqueur, puisque sa présence ne perturbe pas la capture des protéines marquées et que les produits de dégradation lysosomale ne peuvent s'échapper des cellules.

2) Résultats.

Après avoir passé en revue les avantages de l'asialofétuine et de la formaldéhyde-sérum albumine bovine, ainsi que les différentes méthodes de marquage permettant de les repérer au niveau subcellulaire, nous avons choisi de les marquer toutes deux à l'iode I¹²⁵ par l'intermédiaire de la tyramine-cellobiose.

Nous avons chaque fois injecté un des deux marqueurs ainsi préparés, à des rats ayant reçu une injection préliminaire de mannan, en procédant comme suit: une première injection intraveineuse de 10 mg de mannan est suivie, 13 heures après, par une seconde injection d'environ 200 μ Ci du marqueur d'endocytose. L'animal est sacrifié 2 heures après cette dernière administration.

Remarquons qu'une très faible quantité de marqueurs radioactifs, préparés à la tyramine-cellobiose, suffit pour une localisation précise dans un gradient de saccharose, vu la résistance du ligand à la digestion intralysosomale, évitant toute fuite de radioactivité hors de la cellule.

Dans les expériences-témoins, nous avons remplacé l'injection de mannan par l'administration de 1 ml de NaCl 0.9%. Le foie de l'animal est ensuite prélevé, pour être soumis au schéma de fractionnement habituel.

Afin de certifier l'identité des lysosomes impliqués spécifiquement dans le stockage du mannan, nous avons étudié la distribution de la radioactivité de l' I¹²⁵I-TC-ASF d'une part, et de la I¹²⁵I-TC-f-BSA d'autre part, pour les comparer aux distributions de quelques enzymes marqueurs des lysosomes, en centrifugation isopycnique, dans un gradient de saccharose.

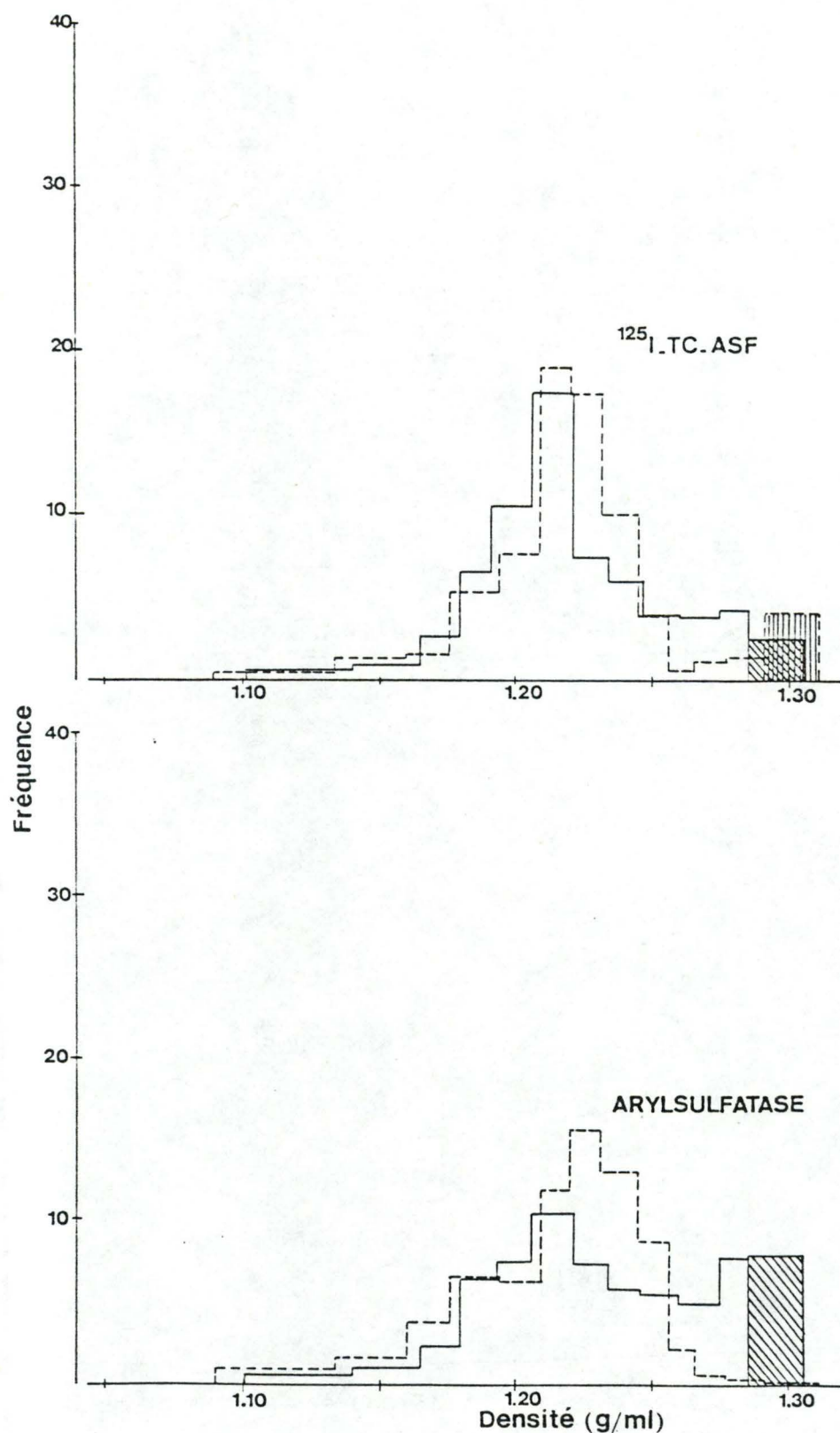


FIG. 10. Profils de distribution de la $^{125}\text{I-TC-ASF}$ et de l'arylsulfatase après centrifugation isopycnique d'une fraction ML dans un gradient de saccharose.

Une fraction ML est isolée à partir d'un rat ayant reçu une injection de 10 mg de mannan suivie 13 heures après, par l'administration d'environ 200 γ de $^{125}\text{I-TC-ASF}$, et sacrifié 2 heures après cette dernière administration (—), ou à partir d'un rat témoin pour lequel l'injection de mannan est remplacée par l'administration de 1 ml de NaCl 0.9%, sacrifié dans les mêmes délais (---). Les centrifugations sont réalisées à 39 000 tours/min dans un rotor Spinco SW65. L'intégrale du carré de la vitesse angulaire vaut $144 \text{ rad}^2/\text{ns}$. Les gradients de saccharose vont de 1.14 à 1.32 g/ml. Les blocs ombrés (▨) représentent les quantités retrouvées dans la dernière fraction.

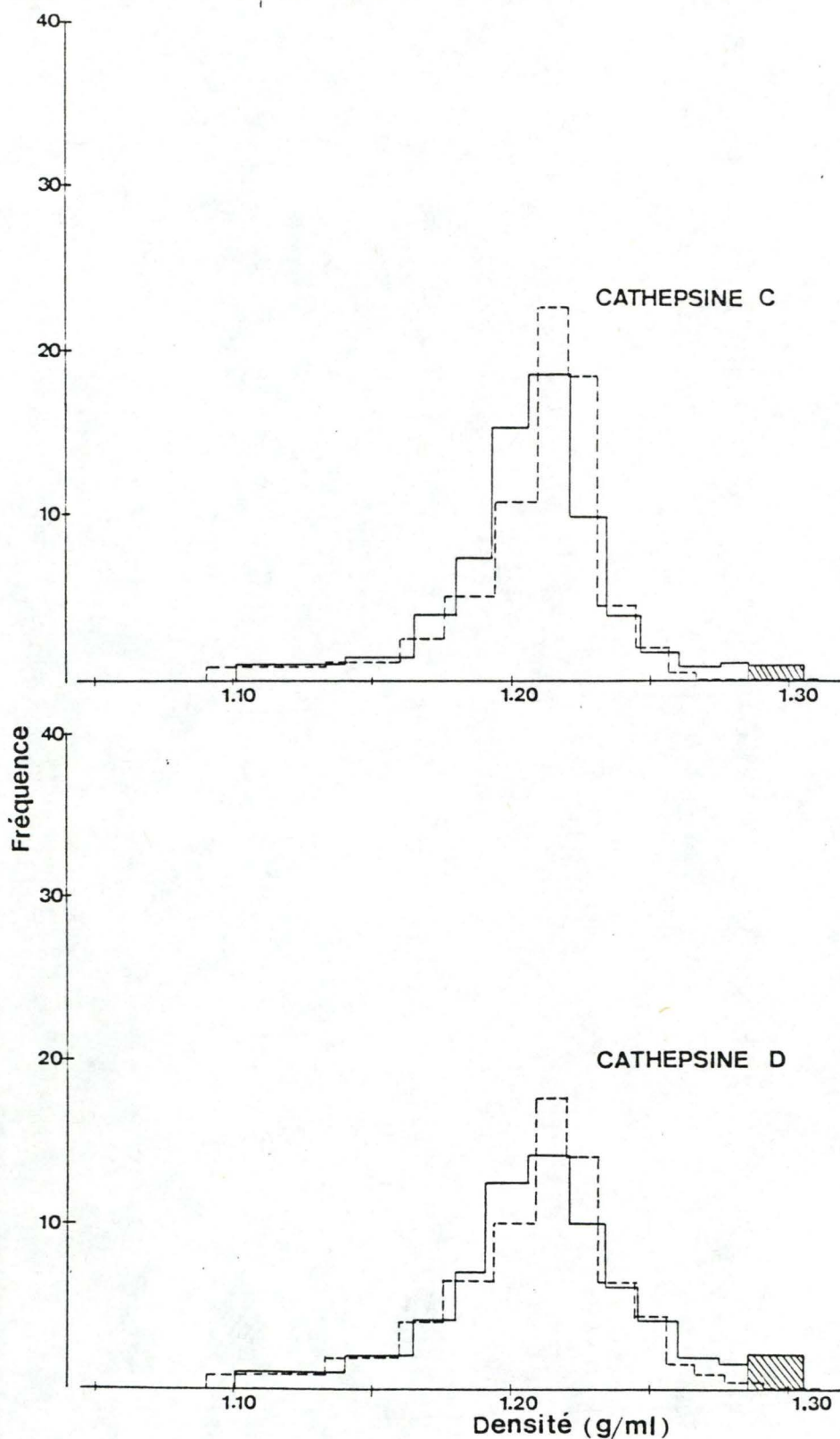


FIG. 11. Profils de distribution de la *cathepsine D* et de la *cathepsine C* après centrifugation isopycnique d'une fraction ML dans un gradient de saccharose.

Les centrifugations sont réalisées sur des fractions ML préparées à partir d'un rat ayant reçu une injection de 10 mg de mannan, suivie 13 heures après, par l'administration d'environ 200 γ de 125 I-TC-ASF, et sacrifié 2 heures après cette dernière administration, (—), ou à partir d'un rat témoin pour lequel l'injection de mannan est remplacée par l'administration de 1 ml de NaCl 0.9%, sacrifié dans les mêmes délais (---). Les conditions de centrifugation sont identiques à celles décrites dans la légende de la Fig. 10. Les gradients de saccharose vont de 1.14 à 1.32 g/ml. Les blocs ombrés (▨) représentent les quantités retrouvées dans la dernière fraction.

a) Hydrolases lysosomales et ^{125}I -TC-ASF.

Les figures 10 et 11 nous permettent de dégager des constatations intéressantes.

La distribution de radioactivité après injection de ^{125}I -TC-ASF en présence de mannan (Fig.10) se superpose étroitement au témoin, avec une densité médiane fort semblable. Nous pouvons en déduire que le mannan n'a pas d'effet sur la répartition de l' ^{125}I -TC-ASF, ce qui implique que les lysosomes des cellules parenchymateuses sont peu concernés par le stockage de la glycoprotéine.

Cependant, la répartition enzymatique de l'**arylsulfatase** (Fig.10) prouve bien l'existence d'une modification apportée par le mannan; en effet, on retrouve une bimodalité semblable à celle observée dans la première partie des résultats expérimentaux, le mannan provoquant ici encore un accroissement de densité de certains lysosomes, puisqu'une proportion notable d'activité de l'arylsulfatase se retrouve dans la dernière fraction du gradient.

Afin de supporter l'hypothèse d'une accumulation massive de mannan au niveau des cellules non parenchymateuses, nous avons mesuré l'activité enzymatique de la **cathepsine D** (Fig.11), qui selon Munthe-Kaas *et al.* [1976] apparaît assez bien concentrée dans les lysosomes des cellules sinusoidales. Cependant, on ne peut noter qu'une faible altération de son profil enzymatique, présentant toutefois un léger accroissement d'activité hydrolasique dans la dernière fraction: étant nulle pour le témoin, elle monte à 3.8% après injection de mannan. Cette enzyme apparaît tout de même moins appropriée pour suivre le comportement de ces lysosomes particuliers, comparée à l'arylsulfatase.

La distribution de la **cathepsine C** (Fig.11), quant à elle, n'est aucunement affectée par le mannan, comme on l'avait déjà constaté auparavant, confirmant l'indifférence des lysosomes hépatocytaires vis-à-vis de la glycoprotéine. On la retrouve d'ailleurs localisée à proximité de l' ^{125}I -TC-ASF dans un gradient de

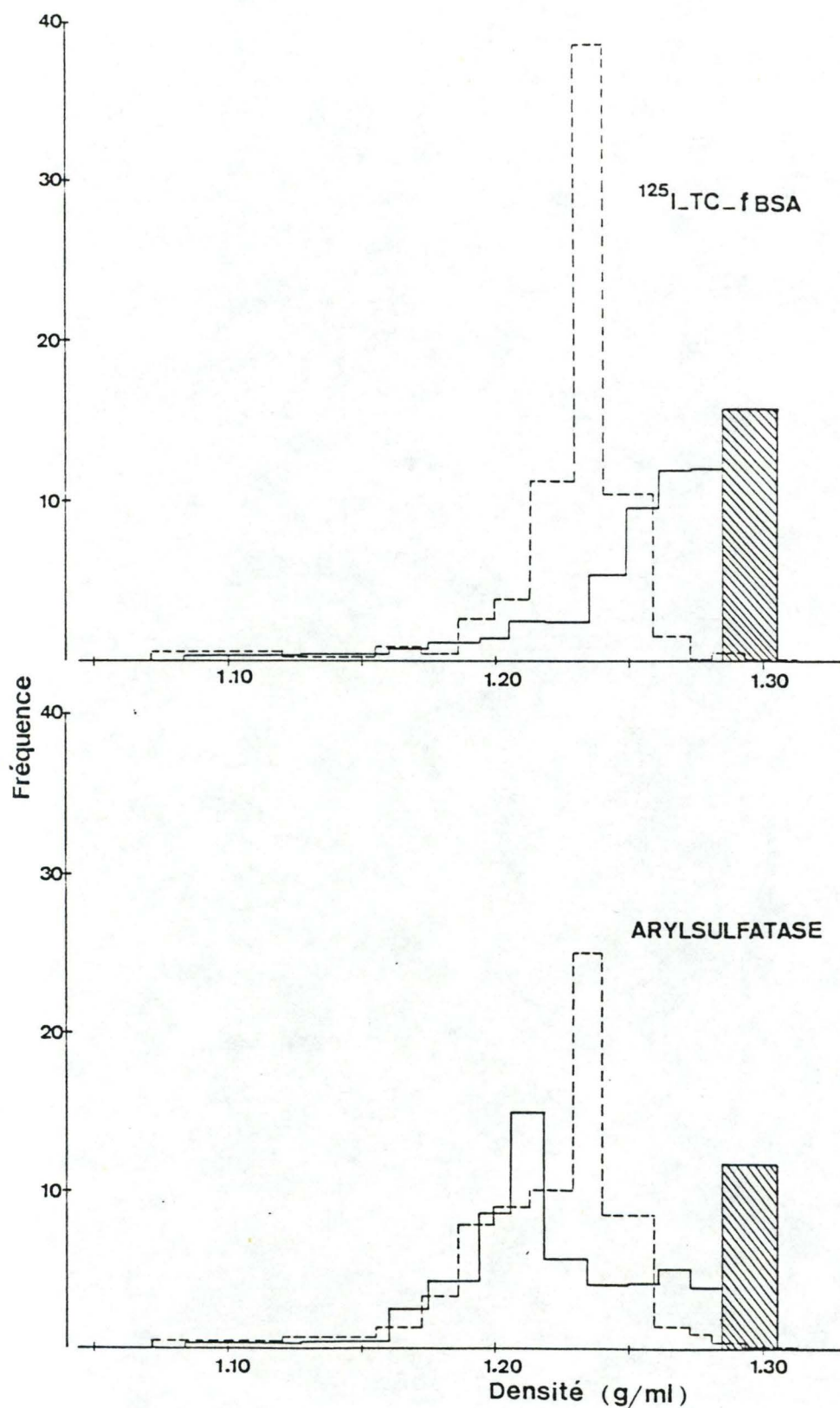


Fig. 12. Profils de distribution de la $^{125}\text{I-TC-f-BSA}$ et de l'arylsulfatase après centrifugation isopycnique d'une fraction ML dans un gradient de saccharose.

Les centrifugations sont réalisées sur des fractions ML préparées à partir d'un rat ayant reçu une injection de 10 mg de mannan, suivie 13 heures après, par l'administration d'environ 200 γ de $^{125}\text{I-TC-f-BSA}$, et sacrifié 2 heures après cette dernière administration, (—), ou à partir d'un rat témoin pour lequel l'injection de mannan est remplacée par l'administration de 1 ml de NaCl 0.9%, sacrifié dans les mêmes délais (---). Les conditions de centrifugation sont identiques à celles décrites dans la légende de la Fig. 10. Les gradients de saccharose vont de 1.14 à 1.32 g/ml. Les blocs ombrés (▨) représentent les quantités retrouvées dans la dernière fraction.

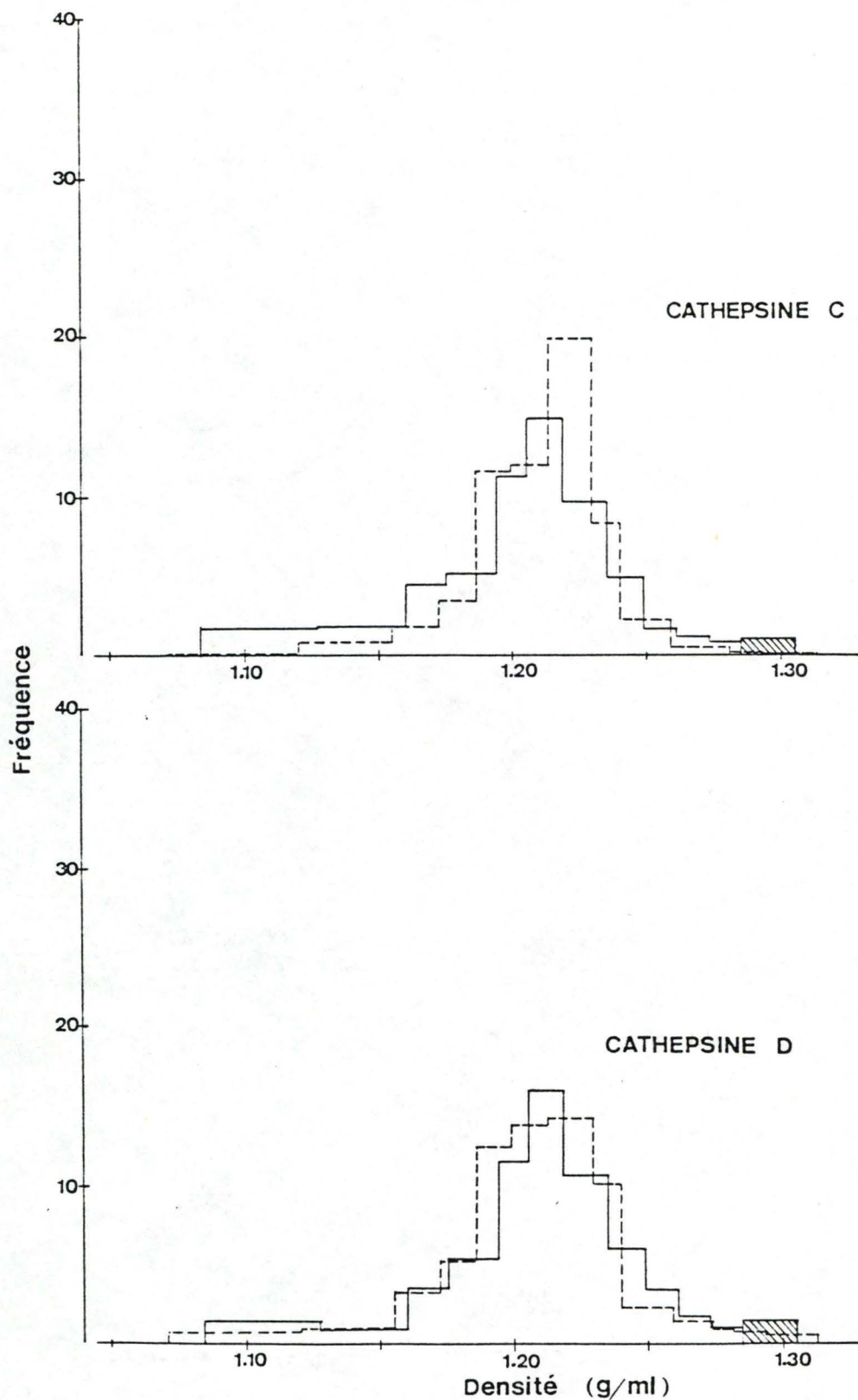


FIG. 13. Profils de distribution de la *cathepsine D* et de la *cathepsine C* après centrifugation isopycniqne d'une fraction ML dans un gradient de saccharose.

Les centrifugations sont réalisées sur des fractions ML préparées à partir d'un rat ayant reçu une injection de 10 mg de mannan, suivie 13 heures après, par l'administration d'environ 200 γ de 125 I-TC-f-BSA, et sacrifié 2 heures après cette dernière administration, (—), ou à partir d'un rat témoin pour lequel l'injection de mannan est remplacée par l'administration de 1 ml de NaCl 0.9%, sacrifié dans les mêmes délais (---). Les conditions de centrifugation sont identiques à celles décrites dans la légende de la Fig. 10. Les gradients de saccharose vont de 1.14 à 1.32 g/ml. Les blocs ombrés (▨) représentent les quantités retrouvées dans la dernière fraction.

saccharose, les densités médianes valant 1.207 g/ml pour la cathepsine C et 1.215 g/ml pour l' ^{125}I -TC-ASF, après action du mannan.

b) Hydrolases lysosomales et ^{125}I -TC-f-BSA.

Les résultats représentés aux figures 12 et 13 pour les hydrolases lysosomales sont semblables à ceux obtenus dans le paragraphe précédent; seule la répartition de la ^{125}I -TC-f-BSA présente d'importants changements, constituant ainsi tout l'intérêt de cette nouvelle série d'expériences.

Dans l'expérience témoin, la distribution de la ^{125}I -TC-f-BSA (Fig.12) semble tout-à-fait normale, avec toutefois une densité médiane d'une valeur de 1.233 g/ml (à peine plus élevée que celle de l' ^{125}I -TC-ASF, proche de 1.220 g/ml), qui serait celle des lysosomes des cellules non parenchymateuses, présentant des propriétés physiques légèrement différentes des autres types de lysosomes.

Cependant, la présence de mannan dans l'organisme amène la ^{125}I -TC-f-BSA à se concentrer dans le fond du gradient, la densité médiane de cette distribution étant de 1.270 g/ml largement supérieure à celle du témoin.

Graphiquement, on observe un décalage total de la répartition de la radioactivité sous l'effet du mannan; celle-ci se démarque alors entièrement du profil symétrique de l'expérience-témoin, les deux distributions n'étant absolument plus comparables. Sachant que la ^{125}I -TC-f-BSA est un marqueur d'endocytose propre aux cellules non parenchymateuses, le mannan a donc bien pour effet de modifier considérablement la densité des lysosomes de ces mêmes cellules non parenchymateuses, les amenant à se concentrer massivement dans l'extrême fraction d'un gradient de saccharose.

En ce qui concerne l'**arylsulfatase** (Fig.12), l'effet typique du mannan se retrouve encore une fois caractérisé par une bimodalité bien marquée, tandis que la distribution de la **cathepsine D** (Fig.13), elle, ne se voit que très faiblement modifiée, de manière similaire aux expériences menées avec l' ^{125}I -TC-ASF, avec seulement 3.1% dans la dernière fraction, contre 1.1% pour le témoin.

Enfin, la **cathepsine C** (Fig.13) signalant la localisation des lysosomes hépatocytaires, n'est toujours pas, ou peu, affectée par la présence de la glycoprotéine.

3) Discussion.

Les conclusions résultant de cette deuxième partie d'expériences sont claires. Les caractéristiques les plus intéressantes se dégagent de la distribution des deux marqueurs d'endocytose.

Le mannan ne produit aucune modification de la distribution de l' ^{125}I -TC-ASF dans le gradient de saccharose; sachant que cette asialoglycoprotéine, comme toutes les autres, est captée en majorité par les hépatocytes, on peut donc en conclure que les lysosomes des cellules non parenchymateuses n'interviennent pratiquement pas dans le stockage du mannan.

Par contre, la distribution de la ^{125}I -TC-f-BSA est modifiée par l'administration du mannan; en effet, presque la totalité de la radioactivité se retrouve dans le fond du gradient.

En ce qui concerne les autres enzymes, que ce soit après injection de ^{125}I -TC-ASF ou de ^{125}I -TC-f-BSA, leurs distributions apparaissent fort semblables à celles observées dans la première partie des résultats. Elles ne sont donc pas perturbées par la présence des marqueurs de l'endocytose.

Cette seconde partie renforce l'idée que le mannan modifie la densité d'équilibre uniquement des lysosomes des cellules non parenchymateuses.

III. EFFETS DU MANNAN SUR LES DEUX TYPES DE FRACTIONS MITOCHONDRIALES: ANALYSES EN CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE ET DIFFERENTIELLE.

1) Introduction.

Grâce aux expériences précédentes, nous avons pu constater une augmentation de la densité des lysosomes des cellules non parenchymateuses sous l'effet du mannan. Connaissant la forte hétérogénéité dont fait preuve la population lysosomale en centrifugation [Beaufay *et al.*, 1964], nous nous sommes demandés si le mannan agissait de manière identique sur les deux types de fractions mitochondriales résultant d'un fractionnement classique, ce en vue d'une purification préparative des lysosomes des cellules non parenchymateuses.

Notre intérêt s'est porté essentiellement sur ces deux fractions, puisqu'elles contiennent la majorité des lysosomes hépatiques. En effet, d'après les travaux de de Duve *et al.* [1955], on retrouve en moyenne 65 à 70% des hydrolases lysosomales dans une fraction mitochondriale totale (M+L), répartis de manière pratiquement équivalente dans les deux sous-fractions qui la constituent (environ 35% dans la fraction mitochondriale lourde-M-, et 30% dans la fraction mitochondriale légère-L-). Néanmoins, ces valeurs ne sont pas du tout exclusives, et varient plus ou moins fortement d'après l'hydrolase mesurée.

Afin de mettre en évidence les effets de la glycoprotéine sur ces deux catégories de fractions, nous avons injecté 10 mg de mannan à un rat, par intraveineuse. Quinze heures après cette administration, le foie de l'animal sacrifié est prélevé rapidement après perfusion au NaCl 0.9%. On applique ensuite le schéma de fractionnement décrit dans le chapitre des "Techniques expérimentales", en ayant soin, cette fois, de séparer les fractions M et L.

Nous avons suivi la distribution de quelques hydrolases lysosomales, d'abord en centrifugation isopycniue, pour chacune des deux fractions, afin de déceler une éventuelle différence d'action du mannan en fonction du type de fraction mitochondriale; ensuite, l'étude des mêmes enzymes a été réalisée en centrifugation

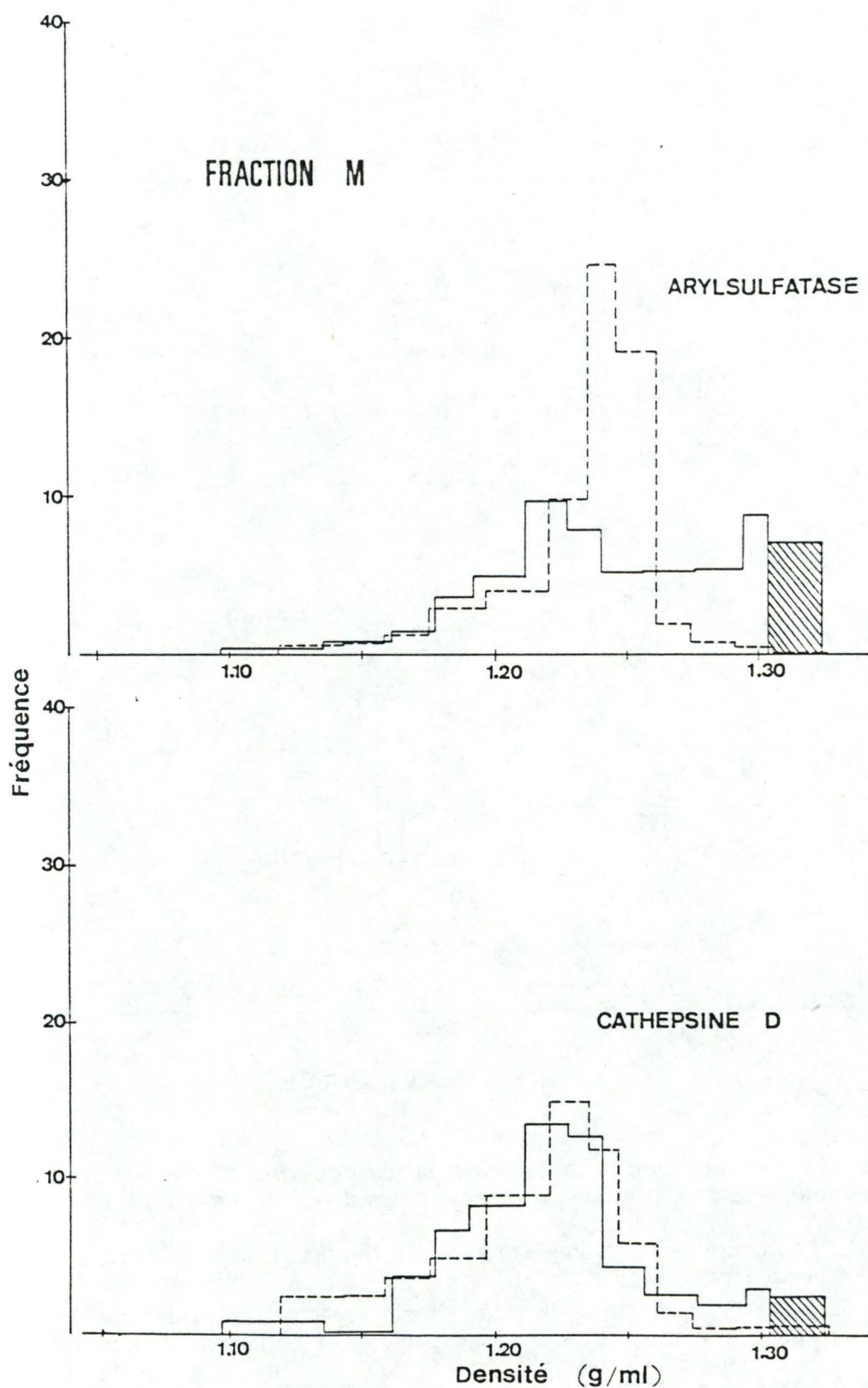


FIG. 14. Profils de distribution de l'*arylsulfatase* et de la *cathepsine D* après centrifugation isopycnique d'une fraction M dans un gradient de saccharose.

Une fraction M est isolée à partir d'un rat ayant reçu une injection de 10 mg de mannan et sacrifié 15 heures après cette injection (—), ou à partir d'un rat témoin, injecté avec 1 ml de NaCl 0.9% et sacrifié après le même intervalle de temps (---). Les centrifugations sont réalisées à 39.000 tours/min dans le rotor Spinco SW65. L'intégrale du carré de la vitesse angulaire vaut $144 \text{ rad}^2/\text{ns}$. Les gradients de saccharose vont de 1.14 à 1.32 g/ml. Les blocs ombrés (▨) représentent les quantités retrouvées dans la dernière fraction.

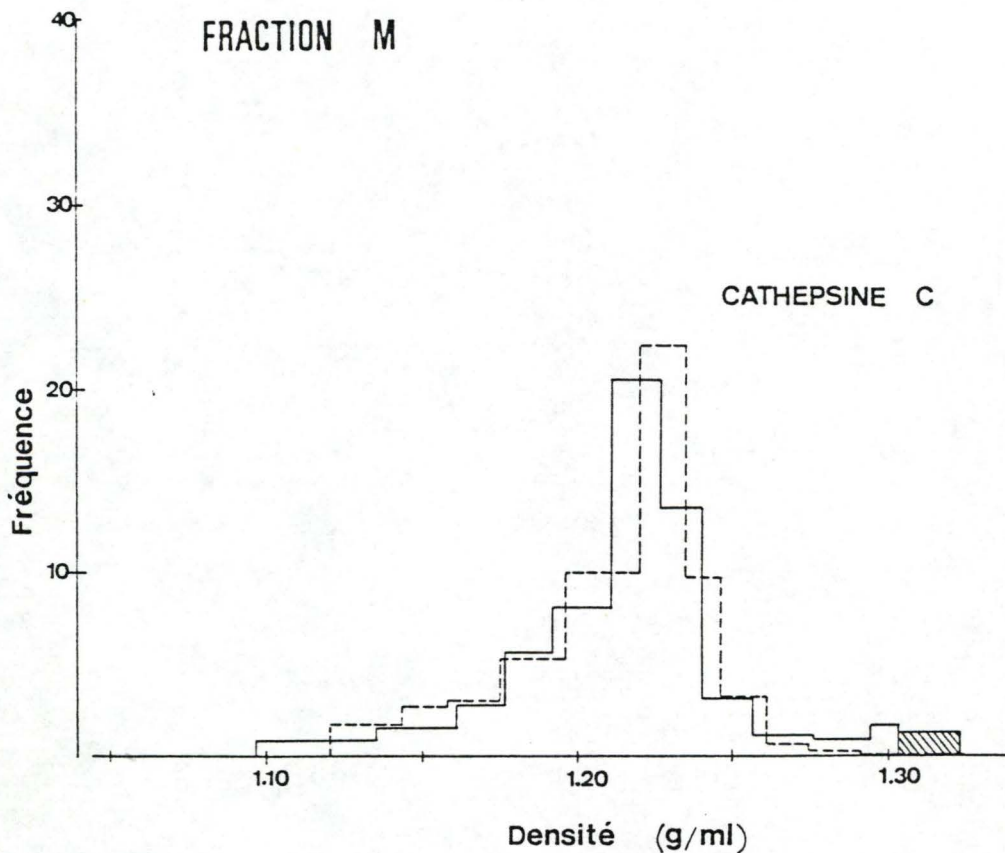


FIG. 15. Profils de distribution de la *cathepsine C* après centrifugation isopycniqne d'une fraction M dans un gradient de saccharose.

Les centrifugations sont réalisées sur des fractions M préparées à partir d'un rat ayant reçu une injection de 10 mg de mannan et sacrifié 15 heures après cette injection (—), ou à partir d'un rat témoin, injecté avec 1 ml de NaCl 0.9% et sacrifié après le même intervalle de temps (--). Les conditions de centrifugation sont identiques à celles décrites dans la légende de la Fig. 14. Les gradients de saccharose vont de 1.14 à 1.32 g/ml. Les blocs ombrés (▨) représentent les quantités retrouvées dans la dernière fraction.

différentielle, permettant ainsi une analyse complémentaire de l'altération des propriétés physiques des lysosomes des cellules non parenchymateuses.

2) Résultats .

A. Analyse en centrifugation isopycnique.

a) La fraction mitochondriale lourde (M).

Sur la figure 14, la distribution de l'**arylsulfatase** présente à nouveau la bimodalité caractéristique que nous observons depuis le début des expériences avec le mannan. Remarquons néanmoins, qu'ici, la dernière fraction du gradient de saccharose contient presque autant d'activité enzymatique que la fraction recouvrant la zone de densité propre aux lysosomes hépatocytaires. En effet, la fraction médiane du gradient, d'une densité moyenne de 1.221 g/ml, renferme 14.6% d'arylsulfatase, valeur à peine supérieure à celle de l'extrême fraction où 14.2% d'activité hydrolytique sont présents. Les lysosomes des cellules sinusoidales chargés de mannan, apparaissent donc bien isolés des autres, en centrifugation isopycnique.

La distribution enzymatique de la **cathepsine D**, (Fig.14), par contre, ne présente qu'une légère variation sous l'effet du mannan: 5.1% seulement d'activité hydrolytique sont retrouvés dans la dernière fraction, par rapport à 1.1% pour l'expérience-témoin. Cette enzyme apparaît encore une fois très peu appropriée pour la localisation des lysosomes des cellules non parenchymateuses en gradient de saccharose.

La **cathepsine C**, dont la répartition se trouve à la figure 15, ne change pratiquement pas après injection de mannan; on constate d'ailleurs une assez bonne correspondance avec le tracé témoin. Malgré leur très faible contenu en cathepsine C, les lysosomes des cellules non parenchymateuses pourraient être responsables de l'écart minime qui apparaît cependant entre les deux distributions. Dans l'expérience-témoin, ils contribueraient à une légère augmentation de la densité médiane, restant localisés à un niveau très proche de la valeur de densité normale. En présence de

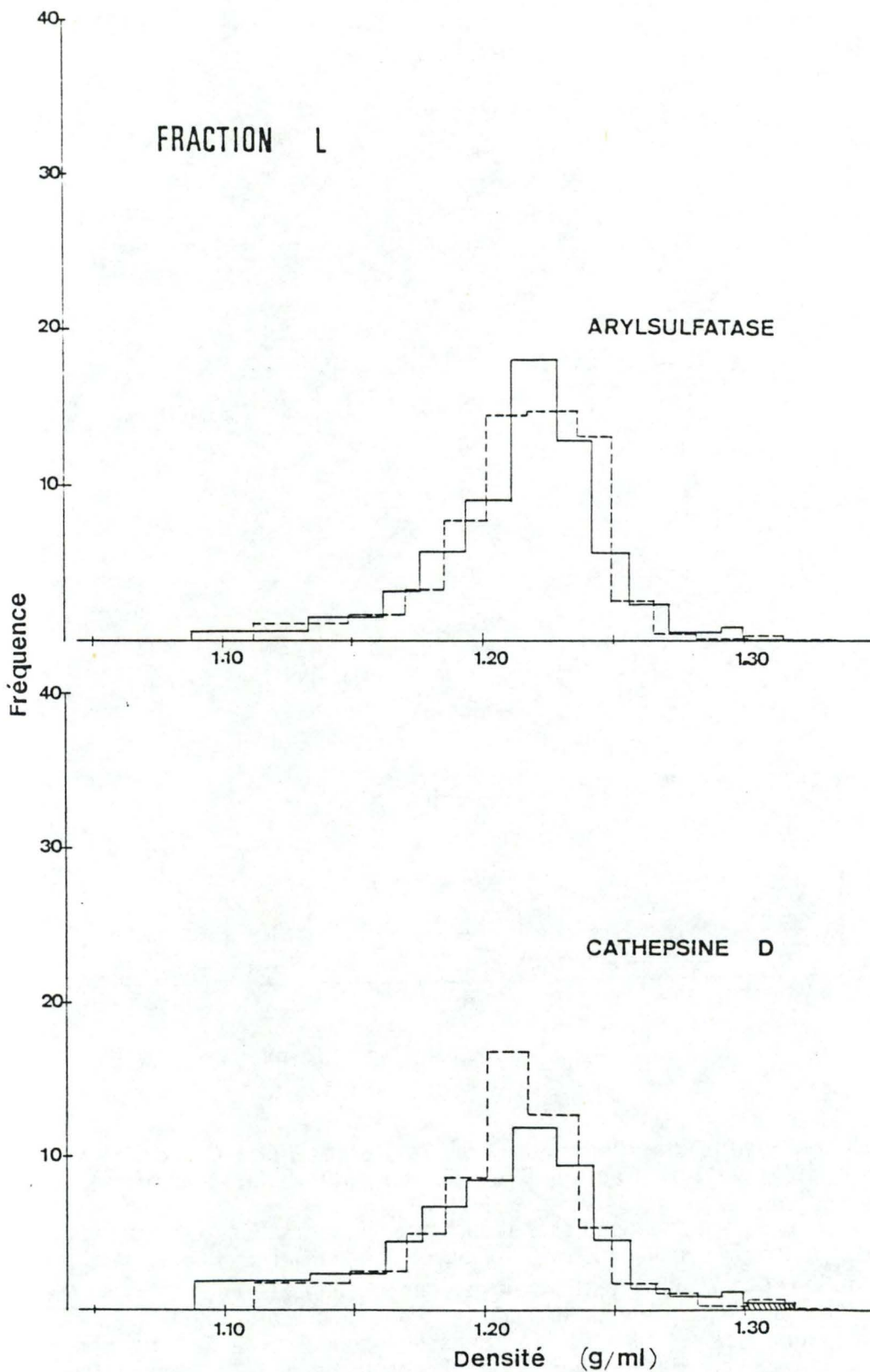


FIG. 16. Profils de distribution de l'arylsulfatase et de la cathepsine D après centrifugation isopycnique d'une fraction L dans un gradient de saccharose.

Les centrifugations sont réalisées sur des fractions L préparées à partir d'un rat ayant reçu une injection de 10 mg de mannan et sacrifié 15 heures après cette injection (—), ou à partir d'un rat témoin, injecté avec 1 ml de NaCl 0.9% et sacrifié après le même intervalle de temps (---). Les conditions de centrifugation sont identiques à celles décrites dans la légende de la Fig. 14. Les gradients de saccharose vont de 1.14 à 1.32 g/ml. Les blocs ombrés (▨) représentent les quantités retrouvées dans la dernière fraction.

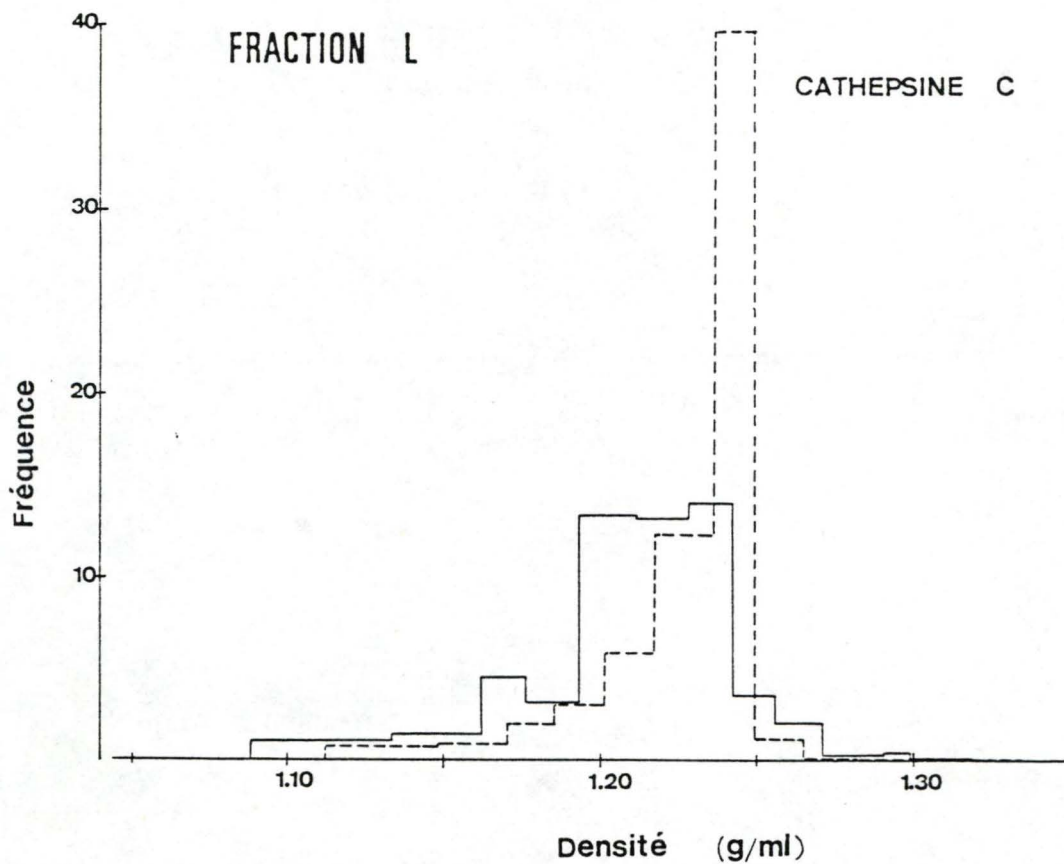


FIG. 17. Profils de distribution de la *cathepsine C* après centrifugation isopycniqne d'une fraction L dans un gradient de saccharose.

Les centrifugations sont réalisées sur des fractions L préparées à partir d'un rat ayant reçu une injection de 10 mg de mannan et sacrifié 15 heures après cette injection (—), ou à partir d'un rat témoin, injecté avec 1 ml de NaCl 0.9% et sacrifié après le même intervalle de temps (---). Les conditions de centrifugation sont identiques à celles décrites dans la légende de la Fig. 14. Les gradients de saccharose vont de 1.14 à 1.32 g/ml. Les blocs ombrés (▨) représentent les quantités retrouvées dans la dernière fraction.

mannan, par contre, les lysosomes hépatocytaires, beaucoup plus nombreux, se retrouveraient seuls, dans la zone de densité habituelle, alors que les lysosomes des cellules sinusoidales se rassemblent dans le fond du gradient, n'influençant absolument plus la valeur de la densité médiane.

b) La fraction mitochondriale légère (L).

En examinant la figure 16, on remarque que la distribution de l'**arylsulfatase** reste unimodale en présence de mannan, avec une densité médiane de 1.218 g/ml identique à celle de la cathepsine C observée dans le paragraphe précédent pour la fraction M en présence de mannan. En ce qui concerne le témoin, la répartition enzymatique est pratiquement similaire, d'une densité médiane fort semblable à la précédente (1.217 g/ml). Cette étroite superposition des deux profils enzymatiques de l'arylsulfatase ne traduit donc aucun effet visible du mannan sur la fraction mitochondriale légère, alors qu'un même temps d'action de la glycoprotéine engendrait une très nette bimodalité pour la fraction M en centrifugation isopycniqne.

Ceci nous amène à penser que, pratiquement tous les lysosomes des cellules non parenchymateuses surchargés de mannan ont rejoint la fraction M, certainement à cause d'une modification de leur taille amenée par le stockage de la glycoprotéine.

Les profils de la **cathepsine D** (Fig.16), également insensibles à l'effet du mannan, se superposent étroitement. Ceci semble confirmer l'hypothèse selon laquelle la glycoprotéine modifie non seulement la densité d'équilibre des lysosomes des cellules non parenchymateuses, mais encore leur taille, ce qui les amène à se rassembler plutôt dans la fraction M en centrifugation différentielle.

Enfin, pour la **cathepsine C** (Fig.17), aucune activité enzymatique n'est retrouvée dans le fond du gradient, que ce soit avec ou sans administration de mannan. Comme on l'avait déjà remarqué lors de l'analyse de cette même hydrolase

dans la fraction M, on observe un certain décalage entre les deux distributions, légèrement plus marqué dans ce cas.

Lorsque le mannan est présent, l'enzyme se localise plutôt à des densités typiques des lysosomes hépatocytaires, ce qui concorde parfaitement avec le fait que les lysosomes des cellules non parenchymateuses, gonflés de mannan, se retrouvent dans la fraction mitochondriale lourde (M). Dans le cas de l'expérience-témoin cependant, la densité médiane se démarque légèrement des valeurs caractéristiques des lysosomes en gradient de saccharose, de par la présence de granules plus petits et plus denses, ce qui s'explique parfaitement par l'hétérogénéité caractéristique des lysosomes hépatiques.

Pour conclure sur cette analyse de la fraction mitochondriale légère (L), remarquons que, pour les trois hydrolases prises en compte, il n'existe jamais de proportion d'activité enzymatique significative dans la dernière fraction du gradient, après administration de mannan. Les lysosomes des cellules non parenchymateuses semblent dès lors avoir gagné la fraction M.

B. Analyse en centrifugation différentielle.

Etant donné la forte similitude au niveau de la quantité de protéines présentes dans chacune des fractions (tableau 4), avec et sans mannan, les valeurs de purification, pour les trois enzymes lysosomales, symbolisées par l'activité spécifique relative, sont directement comparables sur histogrammes.

Tableau 4. Quantités de protéines, en pourcents des protéines totales de l'homogénat, contenues dans les fractions N, M, L et PS, après fractionnement en centrifugation différentielle, avec et sans injection de mannan.

	<u>% de protéines.</u>				
	<u>N</u>	<u>M</u>	<u>L</u>	<u>PS</u>	<u>Homogénat (E+N)</u>
Mannan	12.1	30.2	3.1	54.6	100.0
Témoin	14.6	31.2	3.2	51.0	100.0

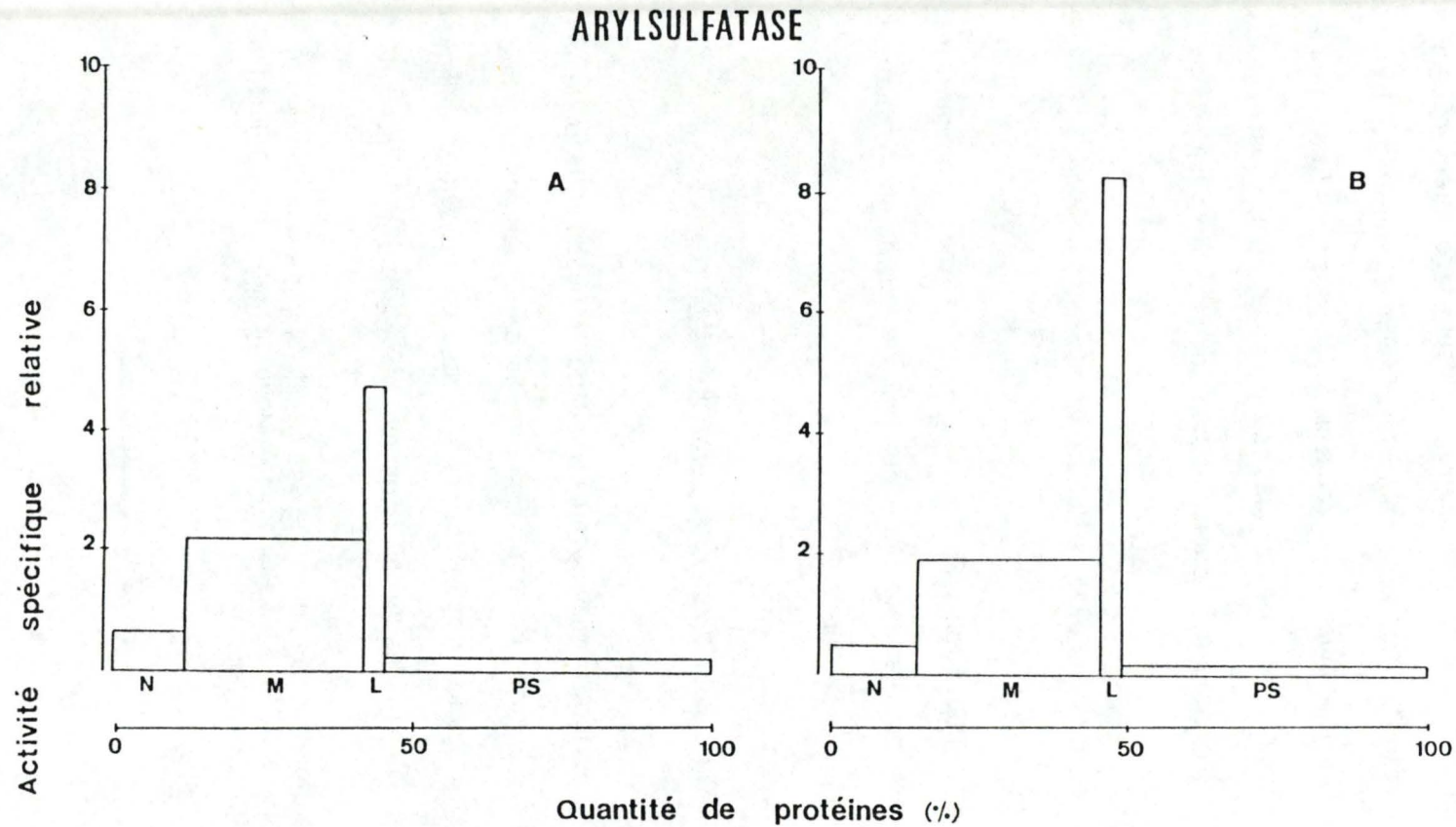


FIG. 18. Profil de distribution de l'arylsulfatase après centrifugation différentielle.

Les résultats sont obtenus après fractionnement du foie d'un rat ayant reçu une injection de 10 mg de mannin, et sacrifié 15 heures après cette injection (en A); en B, le même schéma expérimental est appliqué sur le foie d'un rat témoin, injecté avec 1 ml de NaCl 0.9%, et sacrifié après le même intervalle de temps.

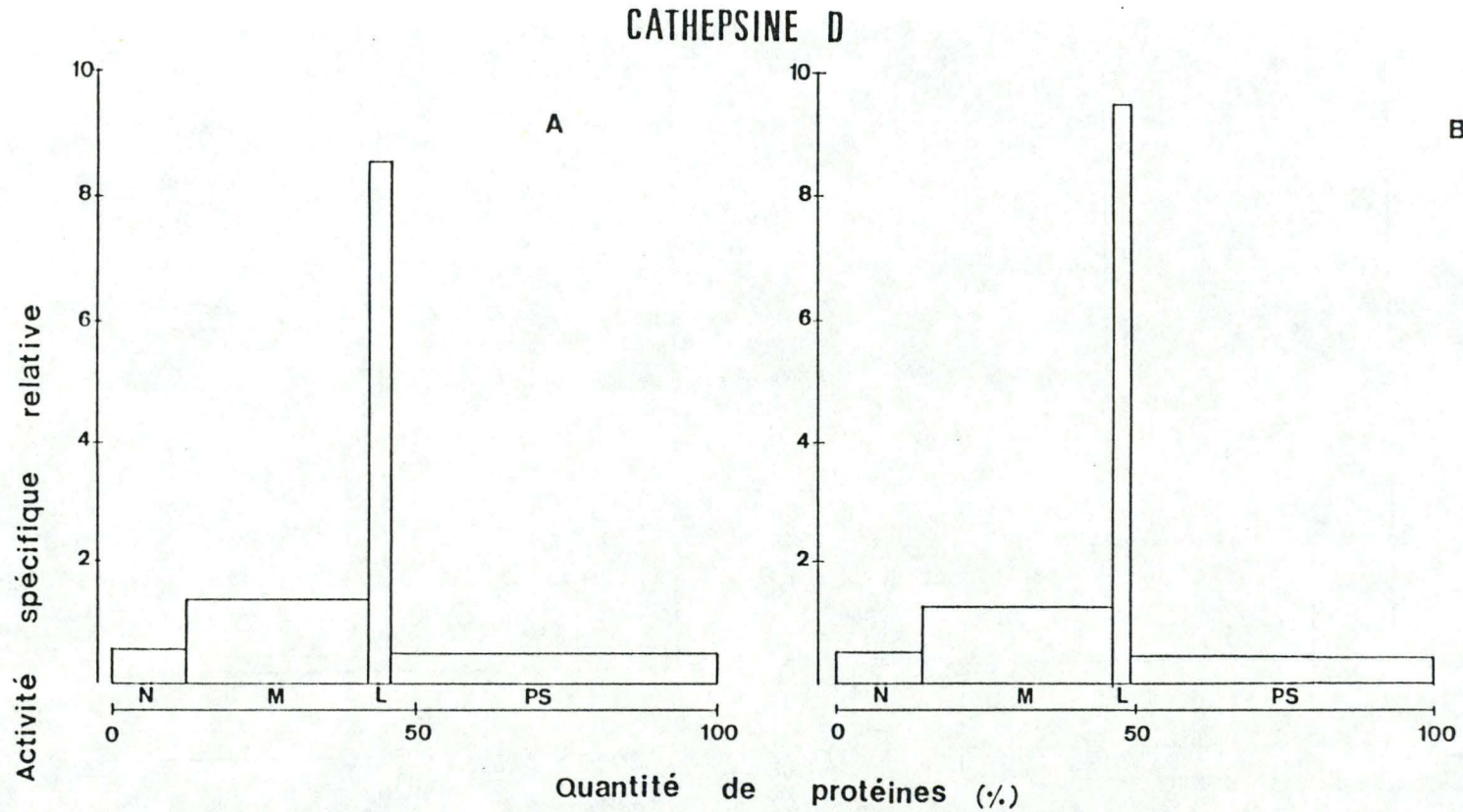


FIG. 19. Profils de distribution de la *cathepsine D* après centrifugation différentielle.

Les résultats sont obtenus après fractionnement du foie d'un rat ayant reçu une injection de 10 mg de mannan, et sacrifié 15 heures après cette injection (en A); en B, le même schéma expérimental est appliqué sur le foie d'un rat témoin, injecté avec 1 ml de NaCl 0.9%, et sacrifié après le même intervalle de temps.

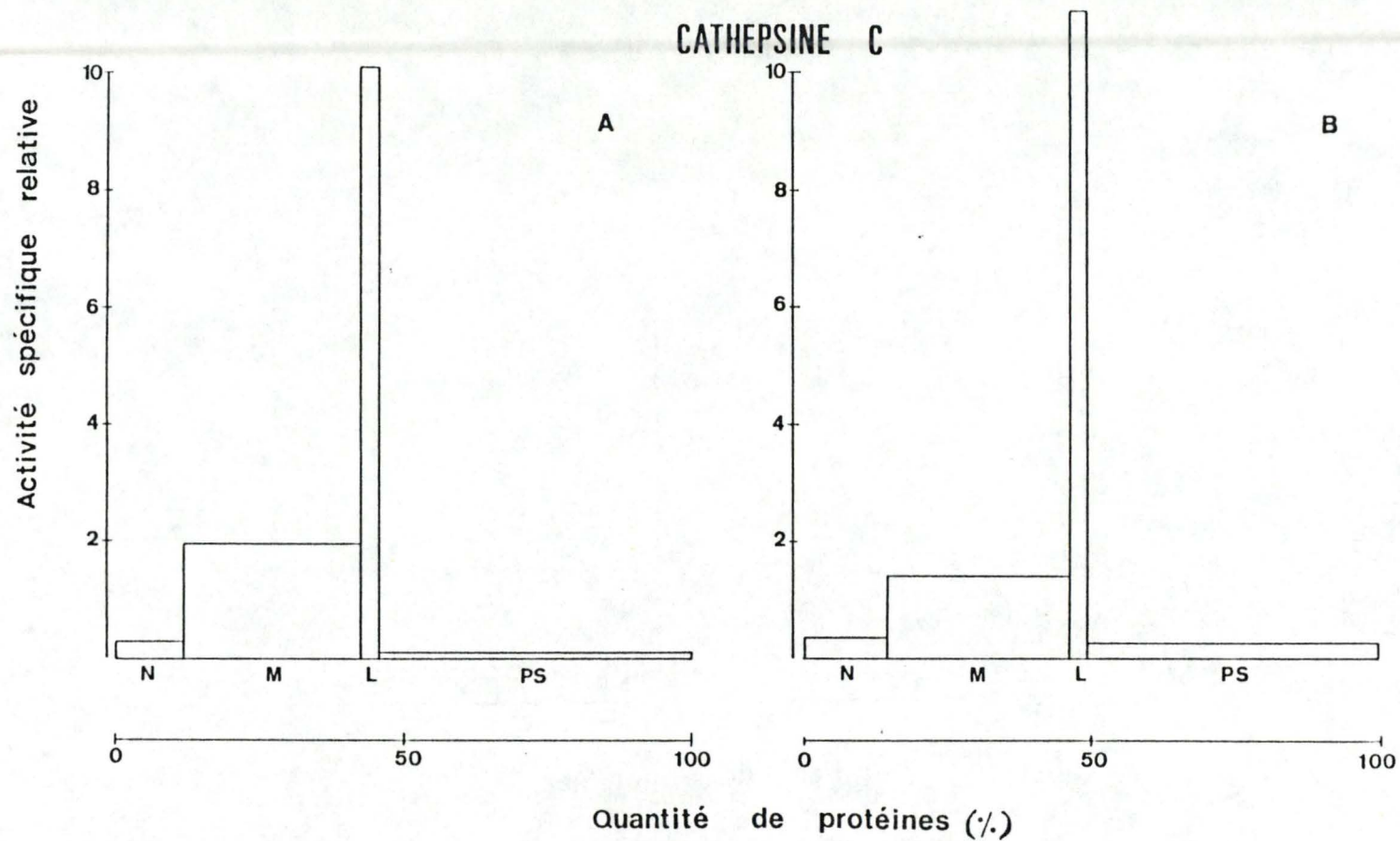


FIG. 20. Profil de distribution de la *cathepsine C* après centrifugation différentielle.

Les résultats sont obtenus après fractionnement du foie d'un rat ayant reçu une injection de 10 mg de mannan, et sacrifié 15 heures après cette injection (en A); en B, le même schéma expérimental est appliqué sur le foie d'un rat témoin, injecté avec 1 ml de NaCl 0.9%, et sacrifié après le même intervalle de temps.

Les résultats de purification pour l'**arylsulfatase** (Fig.18) confirment l'hypothèse que nous avons déjà émise lors de l'analyse en centrifugation isopycniqne, selon laquelle le mannan provoque aussi une augmentation de taille des lysosomes des cellules non parenchymateuses, les amenant à se concentrer davantage dans la fraction mitochondriale lourde. En effet, nous avons constaté une diminution notable de l'activité spécifique relative de l'arylsulfatase dans la fraction L au profit de la fraction M, traduisant ainsi la présence massive de lysosomes des cellules non parenchymateuses, surchargés de mannan, dans cette même fraction.

Par ailleurs, pour la **cathepsine D** (Fig.19), aucune modification significative n'apparaît au niveau de la fraction L, cette enzyme ne convenant pas du tout pour visualiser assez nettement une modification de taille des lysosomes des cellules non parenchymateuses en centrifugation différentielle.

Enfin, en ce qui concerne la **cathepsine C** (Fig.20), on remarque néanmoins, quelques petites variations, totalement négligeables cependant, par rapport aux modifications apparues avec l'arylsulfatase, ce qui apporte une preuve supplémentaire en faveur de la non contribution des lysosomes hépatocytaires dans l'accumulation du mannan.

3) Discussion.

Nous avons pu montrer, dans cette troisième partie des résultats, que l'effet du mannan apparaissait totalement différent sur les deux types de fractions mitochondriales.

En effet, alors qu'il se manifeste de manière intense dans la fraction M par le biais d'une bimodalité marquée dans la distribution de l'arylsulfatase, il s'avère quasiment imperceptible dans la fraction L. Nous pouvons en déduire, qu'après administration de la glycoprotéine, pratiquement tous les lysosomes des cellules non parenchymateuses ont quitté la fraction mitochondriale légère pour aller se concentrer principalement dans la fraction mitochondriale lourde. La raison en est simple: en

effet, le mannan, en s'accumulant spécifiquement dans ce type de lysosomes, en modifie non seulement la densité d'équilibre dans un gradient de saccharose (comme nous l'avions déjà constaté plusieurs fois, et comme il apparaît à nouveau dans la répartition de l'arylsulfatase dans la fraction M), mais aussi, la taille. Ces granules littéralement gonflés par l'accumulation de la glycoprotéine, sédimentent alors plus vite en centrifugation différentielle.

Cette double modification des propriétés physiques des lysosomes des cellules sinusoïdales pourrait bien représenter un moyen précieux pour tenter d'isoler ces lysosomes particuliers des autres organites subcellulaires du foie de rat.

IV. COMPORTEMENT, EN CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE, DES LYSOSOMES SURCHARGES DE MANNAN, PAR RAPPORT AUX AUTRES CONSTITUANTS DE LA FRACTION MITOCHONDRIALE TOTALE (M+L).

1) Introduction.

Comme nous l'avons déjà rappelé auparavant, la fraction mitochondriale totale (M+L) contient la plus grande partie des lysosomes hépatiques. Néanmoins, ceux-ci ne sont pas les seuls représentants de cette fraction; d'autres organelles s'y trouvent aussi en nombre important. En effet, selon Beaufay *et al.* [1964], la fraction mitochondriale totale contient trois populations distinctes d'organites cytoplasmiques: les mitochondries, les lysosomes et les peroxysomes.

C'est pourquoi, dans cette partie du travail, nous avons voulu savoir si les propriétés physiques des lysosomes des cellules non parenchymateuses étaient suffisamment modifiées par le mannan, que pour leur permettre de s'éloigner significativement des autres constituants de la fraction mitochondriale totale dans un gradient de saccharose. Pour cela, nous avons étudié la répartition d'enzymes marqueurs spécifiques, en centrifugation isopycnique, 15 heures après administration du mannan. Nous avons choisi l'arylsulfatase pour localiser les lysosomes des cellules non parenchymateuses, la cathepsine C pour les lysosomes hépatocytaires, la cytochrome oxydase pour les mitochondries, et enfin, l'urate oxydase pour les peroxysomes.

2) Résultats.

Les figures 21 et 22 reproduisent les profils de distribution de ces différentes enzymes de référence en gradient de saccharose; les tableaux 5 et 6

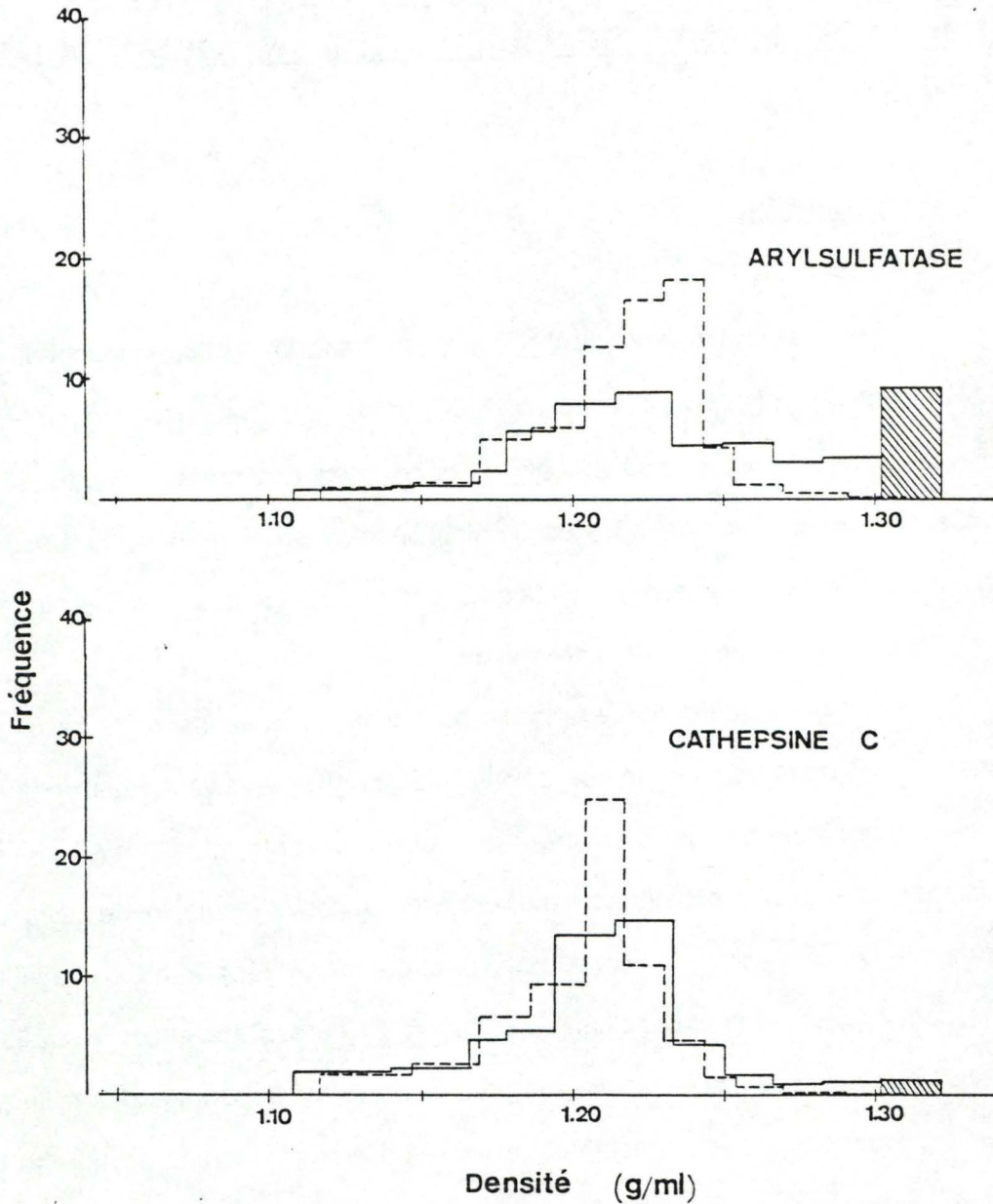


FIG. 21. Profils de distribution de l'*arylsulfatase* et de la *cathepsine C* après centrifugation d'une fraction ML dans un gradient de saccharose.

Une fraction ML est isolée à partir d'un rat ayant reçu une injection de 10 mg de mannan et sacrifié 15 heures après cette injection (—), ou à partir d'un rat témoin, injecté avec 1 ml de NaCl 0.9% et sacrifié après le même intervalle de temps (---). Les centrifugations sont réalisées à 39.000 tours/min dans le rotor Spinco SW65. L'intégrale du carré de la vitesse angulaire vaut $144 \text{ rad}^2/\text{ns}$. Les gradients de saccharose vont de 1.14 à 1.32 g/ml. Les blocs ombrés (▨) représentent les quantités retrouvées dans la dernière fraction.

fournissent des observations complémentaires à ces figures, nous permettant de tirer quelques conclusions intéressantes.

Tableau 5: Valeurs des densités médianes en g/ml pour les différentes enzymes de référence étudiées avec et sans administration de mannan.

	Densité médiane (g/ml)	
	<u>MANNAN</u>	<u>TEMOIN</u>
Arylsulfatase	[1.228]	1.219
Cathepsine C	1.208	1.206
Cytochrome oxydase	1.204	1.194
Urate oxydase	1.255	1.237

Tableau 6: Pourcentage d'activité enzymatique retrouvé dans la dernière fraction du gradient de saccharose, en centrifugation isopycnique, avec et sans administration de mannan.

	Activité enzymatique (%)	
	<u>MANNAN</u>	<u>TEMOIN</u>
Arylsulfatase	18.3	0.2
Cathepsine C	1.8	0.1
Cytochrome Oxydase	0.0	0.0
Urate oxydase	5.8	0.5

A nouveau, l'**arylsulfatase** (Fig.21) se répartit de manière franchement bimodale en centrifugation isopycnique, avec 18.3% dans la dernière fraction du gradient. Nous retrouvons aussi une augmentation significative de la densité des lysosomes des cellules non parenchymateuses sous l'effet du mannan, en total contraste avec le témoin. Remarquons que dans ce cas, le calcul de la densité médiane n'a aucune signification après administration de la glycoprotéine, vu la répartition bimodale qui en résulte.

Pour la **cathepsine C** (Fig.21), aucune modification ne se manifeste dans ses profils de distribution, traduisant encore une fois l'indifférence des lysosomes des cellules parenchymateuses vis-à-vis du mannan. Nous retrouvons en effet, deux

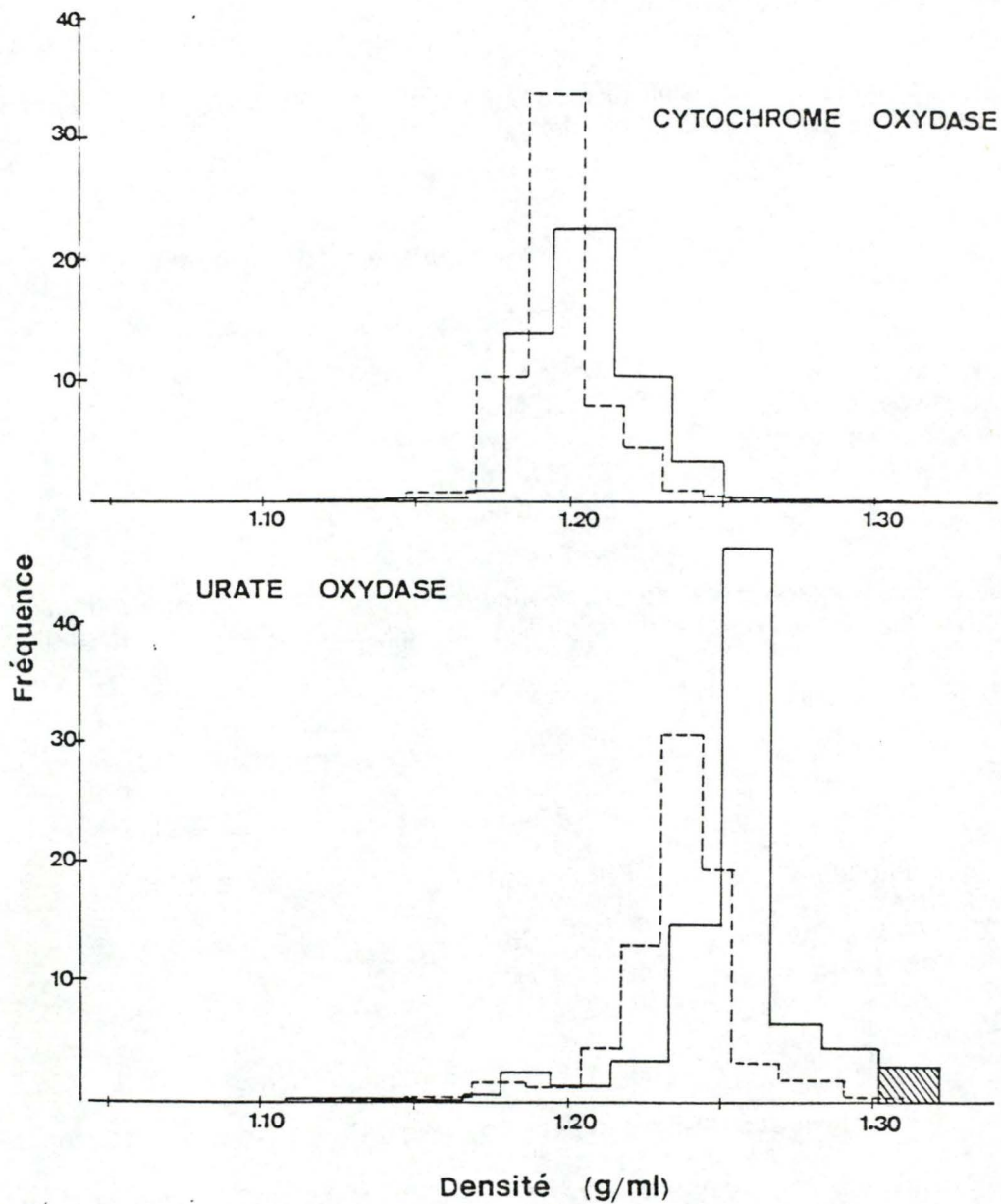


FIG. 22. Profils de distribution de la *cytochrome oxydase* et de l'*urate oxydase* après centrifugation isopycnique d'une fraction ML dans un gradient de saccharose.

Les centrifugations sont réalisées sur des fractions ML préparées à partir d'un rat ayant reçu une injection de 10 mg de mannan et sacrifié 15 heures après cette injection (—), ou à partir d'un rat témoin, injecté avec 1 ml de NaCl 0.9% et sacrifié après le même intervalle de temps (---). Les conditions de centrifugation sont identiques à celles décrites dans la légende de la Fig. 21. Les gradients de saccharose vont de 1.14 à 1.32 g/ml. Les blocs ombrés (▨) représentent les quantités retrouvées dans la dernière fraction.

densités médianes caractéristiques des lysosomes, avec et sans injection de mannan, de même qu'une très faible proportion d'activité enzymatique dans la dernière fraction du gradient.

Les mitochondries symbolisées par la distribution de la **cytochrome oxydase** (Fig.22), s'équilibrent à une densité légèrement inférieure à celle des lysosomes en gradient de saccharose (les densités médianes valant 1.204 g/ml après injection de mannan, et 1.194 g/ml dans l'expérience témoin). La répartition de la cytochrome oxydase reste parfaitement unimodale en présence de mannan, centrée sur la densité médiane, et aucune activité enzymatique n'est retrouvée dans la dernière fraction, enrichie en lysosomes des cellules non parenchymateuses, surchargés de mannan.

La répartition de l'**urate oxydase** (Fig.22), aussi, reste bien unimodale dans les deux cas, avec toutefois, en présence de mannan, un certain pourcentage d'activité dans la dernière fraction (5.8%), tout de même négligeable par rapport à l'arylsulfatase (18.3%). Cette enzyme, étant localisée plus spécifiquement dans le core dense des peroxysomes, présente des densités médianes assez élevées, se détachant nettement de celles de la cathepsine C.

On remarque cependant, un léger décalage entre les deux distributions de l'urate oxydase. Il est possible que, lors des manipulations effectuées pendant le fractionnement, pour l'expérience en présence de mannan, les peroxysomes aient été abîmés mécaniquement, le "noyau" se retrouvant séparé du reste de l'organite.

3) Discussion.

A nouveau, nous avons constaté l'effet du mannan sur la densité des lysosomes des cellules non parenchymateuses, qui se rassemblent alors massivement dans la dernière fraction d'un gradient de saccharose.

De plus, il apparaît dans cette série d'expériences, que les mitochondries, de même que les peroxysomes, également présents dans la fraction mitochondriale totale, ne sont pas des contaminants gênants en centrifugation isopycnique pour les lysosomes des cellules sinusoïdales modifiés par le mannan. En effet, on ne retrouve pratiquement aucune activité enzymatique propre à ces organites dans la dernière fraction du gradient.

Les propriétés physiques des lysosomes des cellules non parenchymateuses semblent alors suffisamment modifiées par le mannan, pour permettre à ceux-ci de s'équilibrer à des densités assez différentes de celles des autres constituants subcellulaires présents dans la fraction mitochondriale totale.

L'injection de mannan pourrait donc bien présenter une technique intéressante pour tenter d'isoler spécifiquement les lysosomes des cellules non parenchymateuses des autres organites cytoplasmiques en centrifugation isopycnique.

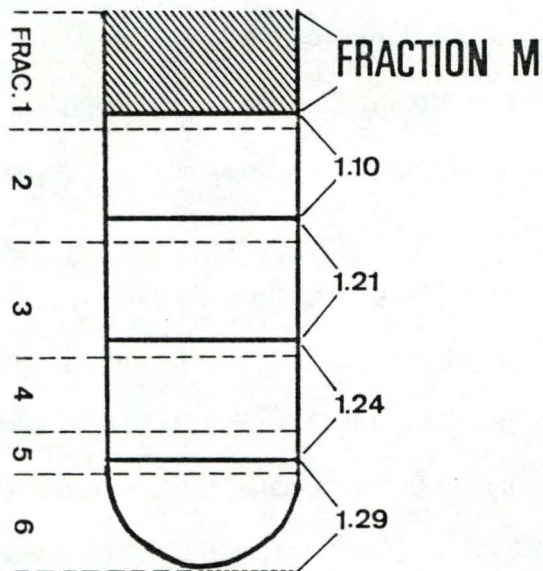


FIG. 23. Schéma expérimental du gradient discontinu de saccharose utilisé pour la purification des lysosomes des cellules non parenchymateuses surchargés de mannan.

La fraction M, (▨), dont 7 ml sont déposés au sommet du gradient, est préparée à partir d'un rat ayant reçu une injection de 10 mg de mannan et sacrifié 15 heures après cette injection.

Les traits continus (—) représentent les différentes couches de saccharose de densité bien définie, à savoir: 7 ml de saccharose de densité de 1.29 g/ml; 8 ml de saccharose de densité de 1.24 g/ml; 8 ml de saccharose de densité de 1.21 g/ml et 7 ml de saccharose de densité de 1.10 g/ml.

Les traits discontinus (---) symbolisent les endroits précis de coupe pour les différentes fractions. La centrifugation se réalise à 27.000 tours/min dans un rotor SW27, pendant 2 heures.

V. PURIFICATION DES LYSOSOMES DES CELLULES NON PARENCHYMATEUSES EN GRADIENT DISCONTINU DE SACCHAROSE, APRES ADMINISTRATION DE MANNAN.

1) Introduction.

Comme nous venons de le constater dans la partie précédente des résultats, les lysosomes des cellules non parenchymateuses, affectés par le mannan, se démarquent fortement des mitochondries, des lysosomes hépatocytaires ainsi que des peroxysomes, en centrifugation isopycnique. Nous avons dès lors tenté de les purifier spécifiquement par centrifugation dans un gradient discontinu de saccharose, 15 heures après administration de mannan.

Sur base des constatations tirées des expériences antérieures, nous avons préféré travailler uniquement avec un échantillon de la fraction mitochondriale lourde, en vue de réduire au maximum le nombre d'organites étrangers aux lysosomes des cellules sinusoïdales; nous savons en effet, que ces mêmes lysosomes se rassemblent en grand nombre dans cette fraction précise, vu l'augmentation de taille en présence de mannan.

Le schéma expérimental utilisé à cet effet est représenté en détails à la figure 23. Les densités des solutions de saccharose intervenant dans la composition de ce gradient discontinu, ont été choisies de manière à ce que les divers types de granules contenus dans la fraction M s'équilibrent principalement aux interfaces séparant les couches de différentes densités. De plus, la découpe du gradient se réalise en des endroits bien définis, afin de regrouper la majorité des granules d'une même catégorie dans une seule fraction.

En connaissant approximativement la densité d'équilibre des granules concernés, on peut prévoir que les mitochondries apparaîtront plutôt dans la deuxième fraction, les lysosomes hépatocytaires dans la troisième. Viendraient ensuite les peroxysomes dans la quatrième fraction, tandis que les lysosomes des cellules non

parenchymateuses surchargés de mannan se retrouveraient dans la fraction 5. Les fractions 1 et 6 quant à elles, ne contiendraient que très peu d'organites subcellulaires.

Afin de pouvoir localiser tous ces organites avec précision, nous avons réalisé la mesure d'activité enzymatique de quelques enzymes marqueurs dans les différentes fractions de ce gradient. Nous pourrions alors comparer les degrés de purification de chacune d'entre elles.

2) Résultats.

Les tableaux 7 et 8 reprennent les principaux résultats obtenus au cours de cette expérience.

Tableau 7: Pourcentage des protéines et de diverses enzymes de référence par rapport à l'homogénat dans les différentes fractions du gradient discontinu, après 15 heures d'action du mannan.

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
Protéines	2.0	20.4	4.6	0.2	0.3	0.1
Cathepsine C	1.9	25.9	19.3	0.9	2.4	0.8
Phosphatase acide	1.6	28.6	13.3	0.6	1.6	0.2
Cathepsine D	3.7	18.7	12.7	2.0	4.1	0.9
Arylsulfatase	2.1	16.8	16.8	3.0	16.0	5.8
Urate oxydase	0.6	35.4	11.8	4.1	3.1	0.1
Cytochrome oxydase	0.0	54.2	9.7	0.1	0.0	0.0

Tableau 8: Degrés de purification de diverses enzymes marqueurs par rapport à l'homogénat, dans les différentes fractions, après 15 heures d'action du mannan.

<u>ENZYME</u>	Purification par rapport à l'homogénat dans les fractions:					
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
Cathepsine C	1.0	1.3	4.2	4.1	7.3	1.3
Phosphatase acide	0.8	1.4	2.9	0.4	4.9	3.7
Cathepsine D	1.8	0.9	2.8	8.6	12.7	14.5
Arylsulfatase	1.1	0.8	3.7	13.0	50.0	96.0
Urate oxydase	0.3	1.7	2.6	17.6	9.6	1.5
Cytochrome oxydase	0.0	2.7	2.1	0.3	0.1	0.1

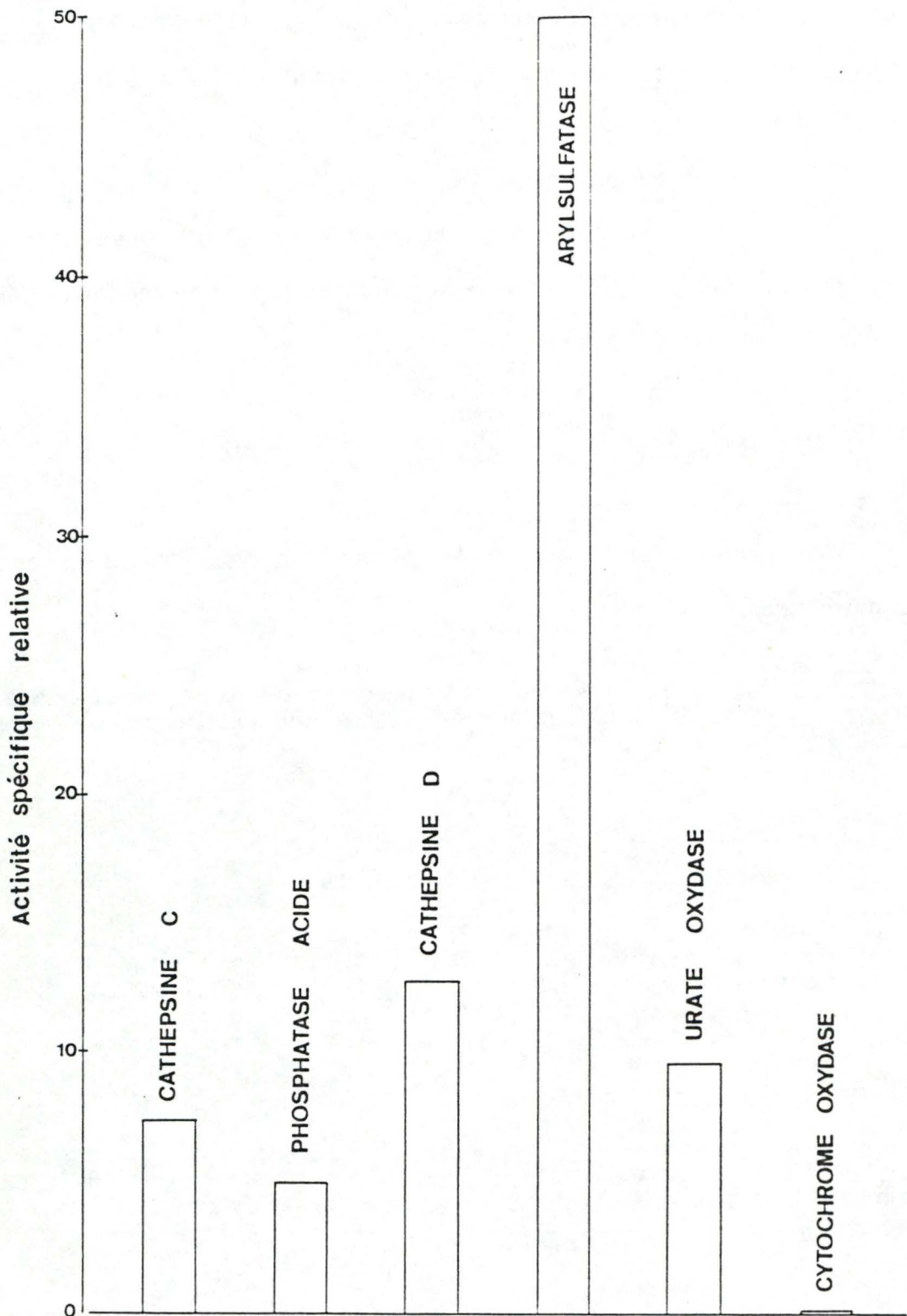


FIG. 24. Cette figure représente les valeurs d'activité spécifique relative de la *cathepsine C*, la *phosphatase acide*, la *cathepsine D*, l'*arylsulfatase*, l'*urate oxydase* et la *cytochrome oxydase* dans la fraction 5 du gradient discontinu représenté à la Fig. 23, après centrifugation d'une fraction M préparée à partir d'un rat ayant reçu une injection de 10 mg de mannan et sacrifié 15 heures après cette même injection. Les conditions de centrifugation sont celles mentionnées dans la légende de la Fig. 23.

Parmi toutes ces valeurs, ce sont celles de la fraction 5 qui nous intéressent plus particulièrement, puisque c'est à cet endroit que devraient se retrouver la majorité des lysosomes des cellules non parenchymateuses en présence de mannan. Les mêmes valeurs de purification sont d'ailleurs reprises dans la figure 24, permettant ainsi une comparaison rapide pour chaque enzyme dosée sur le gradient.

Nous constatons que c'est l'**arylsulfatase** qui présente le plus haut degré de purification dans la fraction 5 (50.0), traduisant ainsi la présence d'une majorité de lysosomes des cellules non parenchymateuses à cet endroit, par rapport aux autres organites subcellulaires.

La **cathepsine D**, elle aussi représentée dans ce type de lysosomes, se retrouve assez bien purifiée dans la fraction 5, avec une valeur de 12.8.

Remarquons que souvent, il existe des valeurs de purification extrêmement élevées pour la fraction 6, qui ne contient qu'un très faible pourcentage de protéines (Tableau 7). Celui-ci intervenant au dénominateur dans les calculs de purification, on comprend alors facilement les valeurs excessives rencontrées dans cette fraction; elles restent cependant sans grande signification dans notre travail, étant donné le peu d'activité enzymatique retrouvée dans le fond du gradient lors des dosages à la base de ces calculs de purification.

Les enzymes caractéristiques des lysosomes hépatocytaires, la **cathepsine C** et la **phosphatase acide**, sont nettement moins purifiées dans la fraction 5 par rapport aux deux enzymes précédentes.

L'**urate oxydase**, représentative des peroxyosomes, fait preuve d'un degré de purification maximal dans la fraction 4 (17.6), se retrouvant moins purifiée dans la fraction suivante à proximité des lysosomes des cellules non parenchymateuses.

Enfin, la **cytochrome oxydase** présente une purification quasiment nulle (0.1) à l'endroit où se rassemblent les lysosomes chargés de mannan.

3) Discussion.

Les taux de purification de l'arylsulfatase et de la cathepsine D dans la fraction 5, représentent l'intérêt principal de cette dernière série d'expériences. Sachant que ces deux d'hydrolases sont bien représentées dans les lysosomes des cellules non parenchymateuses, cela signifie que ces mêmes lysosomes, modifiés par le mannan, se concentrent spécifiquement dans une zone de densité largement supérieure à celles de tous les autres organites subcellulaires de la fraction mitochondriale.

Il semble donc que la simple administration de mannan soit une technique relativement appropriée pour isoler les lysosomes des cellules non parenchymateuses des autres organites, en gradient de saccharose.

Cette dernière expérience ne représente qu'un premier essai de purification en gradient de saccharose; étant donné les résultats assez satisfaisants qui en découlent, il serait sans aucun doute intéressant de pouvoir améliorer le schéma expérimental que nous avons utilisé afin d'augmenter le degré de purification des lysosomes ainsi modifiés par le mannan.

CHAP.4. CONCLUSION GENERALE.

Au terme de ce travail, nous sommes en mesure de conclure que le mannan rejoint une population de lysosomes hépatiques: les lysosomes des cellules sinusoïdales. L'accumulation spécifique de cette glycoprotéine au sein de ces organites en modifie les propriétés physiques, et de là, leur comportement en centrifugation. Nous avons en effet observé un accroissement conséquent de la densité des lysosomes des cellules non parenchymateuses du foie, de même qu'une augmentation notable de leur taille.

Des résultats analogues furent déjà obtenus dans les travaux de Jadot [1987] avec l'invertase. Néanmoins, il semble que les modifications physiques apportées aux lysosomes des cellules non parenchymateuses soient plus marquées avec le mannan. Etant donné la contribution prédominante de la chaîne glucidique dans sa constitution, le mannan fait preuve d'une meilleure résistance aux hydrolases lysosomales et s'accumule vraisemblablement de manière plus efficace dans les lysosomes des cellules sinusoïdales. Ceci leur permet d'ailleurs, en centrifugation isopycnique, de se détacher très nettement des autres constituants de la fraction mitochondriale, représentés par les lysosomes hépatocytaires, les mitochondries et les peroxyosomes.

Toutes ces constatations nous amènent à considérer le mannan comme un densifiant spécifique des lysosomes des cellules sinusoïdales, au même titre que l'invertase. L'injection de mannan *in vivo* représente en effet une méthode simple, utile, tant en centrifugation analytique que préparative, pour distinguer les deux types de lysosomes hépatiques habituellement difficiles à différencier en centrifugation.

BIBLIOGRAPHIE.

- ACHORD, D.T., BROTH, F.E. & SLY, W.S. (1977)
Inhibition of the rat clearance system for agalacto-orosomucoid by yeast mannans and by mannose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77, 409-415.
- ANDERSON, G. & GLAUMANN, H. (1987)
Current methods for the isolation of coated vesicles, endocytic vesicles, the Golgi complex, lysosomes, and autophagic vacuoles; in *Lysosomes: Their role in protein breakdown* (Glaumann, H. & Ballard, F.J., ed.), pp. 61-113, Ac. Press.
- APPELMANS, F., WATTIAUX, R. & DE DUVE, C. (1955)
Tissue fractionation studies.5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver. *Biochem. J.*, 59, 438-445.
- ARBORGH, B., BERG, T. & ERICSSON, J.L.E. (1973)
Quantitation of acid phosphatase and arylsulphatase in rat hepatic parenchymal and Kupffer cells. *FEBS Lett.*, 35, 51-53.
- ASHWELL, G. & MORELL, A.G. (1974)
The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Adv. in Enzymol.*, 41, 99-128.
- ASHWELL, G. & HARFORD, J. (1982)
Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Ann. Rev. Biochem.*, 51, 531-554.
- BALLOU, C.E. (1974 a)
Some aspects of the structure, immunochemistry, and genetic control of yeast mannans. *Adv. in Enzymol.*, 40, 239-270.
- BALLOU, C.E. & RASCHKE, W.C. (1974 b)
Polymorphism of the somatic antigen of yeast. Yeast mannans exhibit species specific structures that are analogous to animal and bacterial antigens. *Science*, 184, 127-134.
- BEAUFAY, H., JACQUES, P., BAUDHUIN, P., SELLINGER, O.Z., BERTHET, J. & DE DUVE, C. (1964)
Tissue fractionation studies, 18. Resolution of mitochondrial fractions from rat liver into three distinct populations of cytoplasmic particles by means of density equilibration in various gradients. *Biochem. J.*, 92, 184-205.
- BERG, T. & BOMAN, D. (1973)
Distribution of lysosomal enzymes between parenchymal and Kupffer cells of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 321, 585-596.
- BESTERMAN, J.M. & LOW, R.B. (1983)
Endocytosis: a review of mechanisms and plasma membrane dynamics. *Biochim. J.*, 210, 1-13.
- BLOMHOFF, R., ESKILD, W. & BERG, T. (1984)
Endocytosis of formaldehyde-treated serum albumin via scavenger pathway in liver endothelial cells. *Biochem. J.*, 218, 81-86.
- BLOUIN, A., BOLENDER, R.P. & WEIBEL, E.R. (1977)
Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J. Cell. Biol.*, 72, 441-455.

- BOUWENS, L., BAEKELAND, M. & WISSE, E. (1986)
A balanced view on the origin of Kupffer cells; in *Cells of the Hepatic Sinusoid*, 1, pp. 7-12, Kirn, A., Knook, D.L. & Wisse, E. eds, The Kupffer Cell Foundation, P.O. Box 5815, 2280, HV Rijswijk, The Netherlands.
- BOWERS, W.E., FINKENSTAEDT, J.T. & DE DUVE, C. (1967)
Lysosomes in lymphoid tissue. 1. The measurement of hydrolytic activities in whole homogenates. *J. Cell. Biol.*, 32, 325-337.
- BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. (1979)
Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA*, 76, 3330-3337.
- CHIACCHIA, K.B. & DRICKAMER, K. (1984)
Direct evidence for the transmembrane orientation of the hepatic glycoprotein receptors. *J. Biol. Chem.*, 259, 15440-15446.
- DAUTRY-VARSAT, A. & LODISH, H.F. (1984)
How receptors bring proteins and particles into cells. *Scientific American*, 250, 48-54.
- DE DUVE, C. (1963)
in *Lysosomes: Ciba Found. Symp.* (De Ruck, A.V.S. & Cameron, M.B. eds), p. 126. Churchill. London.
- DE DUVE, C., PRESSMAN, B.C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R. & APPELMANS, F. (1955)
Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem. J.*, 60, 604-617.
- DE DUVE C. & WATTIAUX, R. (1966)
Functions of lysosomes. *Ann. Rev. Physiol.*, 28, 435-492.
- DE LEEUW, A.M., VAN BEZOOIJEN, C.F.A. & KNOOK, D.L. (1986)
Changes in the ratio between sinusoidal and parenchymal cell numbers of the rat liver during development and aging; in *Cells of the Hepatic Sinusoid*, 1, pp. 463-468, Kirn, A., Knook, D.L. & Wisse, E. eds, The Kupffer Cell Foundation, P.O. Box 5815, 2280, HV Rijswijk, The Netherlands
- DRICKAMER, K., MAMON, J.F., BINNS, G. & LEUNG, J.O. (1984)
Primary structure of the rat liver asialoglycoprotein receptor. Structural evidence for multiple polypeptide species. *J. Biol. Chem.*, 259, 770-778.
- DUNN, W.A., HUBBARD, A.L. & ARONSON, N.N. JR (1980)
Low temperature selectively inhibits fusion between pinocytotic vesicles and lysosomes during heterophagy of ¹²⁵I-Asialofetuin by the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.*, 255, 5971-5978.
- ESKILD, W. & BERG, T. (1982)
Scavenger receptors in rat non parenchymal cells; in *Sinusoidal Liver Cells*, pp. 255-262, Knook, D.L. & Wisse, E. eds, Elsevier Biomedical Press.
- FARQUHAR, M.G. (1983)
Multiple pathways of exocytosis, endocytosis, and membrane recycling: validation of a Golgi route. *Fed. Proc.*, 42, 2407-2413.
- GEUZE, H.J., SLOT, J.W., STROUS, G.J.A.M., PEPPARD, J., VON FIGURA, K., HASILIK, A. & SCHWARTZ, A.L. (1984)
Intracellular receptor sorting during endocytosis: comparative immunoelectron microscopy of multiple receptors in rat liver. *Cell*, 37, 195- 204.

- GIANETTO, R. & DE DUVE, C. (1955)
Tissue fractionation studies. 4. Comparative study of the binding of acid phosphatase, β -glucuronidase and cathepsin by rat-liver particules. *Biochem. J.*, 59, 433.
- HALTIWANGER, R.S., LEHRMAN, M.A., ECKHARDT, A.E. & HILL, R.L. (1986)
The distribution and localization of the fucose-binding lectin in rat tissues and the identification of a high affinity form of the mannose/N-Acetylglucosamine-binding lectin in the rat liver. *J. Biol. Chem.*, 261, 7433-7439.
- HARDONK, M.J., DIJKHUIS, F.W.J., GROND, J., KOUDSTAAL, J. & POPPEMA, S. (1986)
Migration of Kupffer cells; in *Cells of the Hepatic Sinusoid*, 1, pp.1-6, Kirn, A., Knook, D.L. & Wisse, E. eds, The Kupffer Cell Foundation, P.O. Box 5815, 2280, HV Rijswijk, The Netherlands.
- HARFORD, J., KLAUSNER, R.D. & ASHWELL, G. (1984)
Inhibition of the endocytic pathway for asialoglycoprotein catabolism. *Biol. Cell.*, 51, 173-180.
- HARKES, L. & VAN BERKEL, T.J.C. (1984)
Quantitative role of parenchymal and nonparenchymal liver cells in the uptake of ^{14}C -sucrose-labelled low-density lipoprotein *in vivo*. *Biochem. J.*, 224, 21-27.
- HELENIUS, A., MELLMAN, I., WALL, D. & HUBBARD, A. (1983)
Endosomes. *Trends in Biochem. Sci.*, 26, 245-249.
- HORIUCHI, S., TAKATA, K. & MORINO, Y. (1985a)
Characterization of a membrane-associated receptor from rat sinusoidal liver cells that binds formaldehyde-treated serum-albumin. *J. Biol. Chem.*, 260, 475-481.
- HORIUCHI, S., TAKATA, K. & MORINO, Y. (1985b)
Purification of a receptor for formaldehyde-treated serum albumin from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 260, 482-488.
- HORIUCHI, S., MURAKAMI, M., TAKATA, K. & MORINO, Y. (1986)
Scavenger receptor for aldehyde-modified proteins. *J. Biol. Chem.*, 261, 4962-4966.
- HUBBARD, A.N., WILSON, G., ASHWELL, G. & STUKENBROK, H. (1979)
An electron microscope autoradiographic study of the carbohydrates recognition systems in rat liver. *J. Cell. Biol.*, 83, 47-64.
- HYSING, J. & TOLLESHAUG, H. (1986)
Quantitative aspects of the uptake and degradation of lysozyme in the rat kidney *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta*, 887, 42-50.
- JADOT, M. (1987)
in: *Chemin intracellulaire suivi par l'invertase endocytée par le foie: une analyse biochimique*. Thèse, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur.
- JADOT, M., COLMANT, C., WATTIAUX-DE CONINCK, S. & WATTIAUX, R. (1984)
Intralysosomal hydrolysis of glycyl-L-phenylalanine 2-Naphtylamide. *Biochem. J.*, 219, 965-970.
- JADOT, M., WATTIAUX-DE CONINCK, S. & WATTIAUX, R. (1985)
Effect on lysosomes of invertase endocytosed by rat liver. *Eur. J. Biochem.*, 151, 485-488.
- KAWASAKI, T., ETOH, R. & YAMASHINA, I. (1978)
Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 81, 1018-1024.

- KOZUTSUMI, Y., KAWASAKI, T. & YAMASHINA, I. (1980)
Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit serum. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 95, 658-664.
- KNOOK, D.L. & SLEYSER, E.C. (1976)
Separation of Kupffer and endothelial cells of the rat liver by centrifugal elutriation. *Exp. Cell. Res.*, 99, 444-449.
- KRATKY, Z., BIELY, P. & BAUER, S. (1975)
Wall mannan of *Saccharomyces cerevisiae*; metabolic stability and release into growth medium. *Biochim. Biophys. Acta*, 404, 1-6.
- LABADIE, J.H., CHAPMAN, K.P. & ARONSON, N.N. JR (1975)
Glycoprotein catabolism in rat liver. Lysosomal digestion of iodinated asialo-fetuin. *Biochem. J.*, 152, 271-279.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951)
Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265.
- MADNICK, H.M., WINKLER, J.R. & SEGAL, H.L. (1978)
Uptake of yeast invertase by rat liver cells *in vivo* and *in vitro*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 191, 385-392.
- MEGO, J.L. (1979)
The ATP-dependent proton pump in lysosome membranes. Still a valid hypothesis. *FEBS Letters*, 107, 113-116.
- MEGO, J.L. & MC QUEEN, J.D.E (1965)
The uptake and degradation of injected label proteins by mouse-liver particles. *Biochim. Biophys. Acta*, 100, 136-143.
- MIZUNO, Y., KOZUTSUMI, Y., KAWASAKI, T. & YAMASHINA, I. (1981)
Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 256, 4247-4252.
- MORIN, O. & NORMAND, C. (1986)
Cellular cooperation between sinusoidal liver cells and hepatocytes; in *Cells of the Hepatic Sinusoid*, 1, pp. 49-50, Kirn, A., Knook, D.L. & Wisse, E. eds, The Kupffer Cell Foundation, P.O. Box 5815, 2280, HV Rijswijk, The Netherlands.
- MUNTHE-KAAS, A.C., BERG, T. & SELJELID, R. (1976)
Distribution of lysosomal enzymes in different types of rat liver cells. *Exptl. Cell. Res.*, 99, 146-154.
- NEUMANN, N.P. & LAMPEN, J.O. (1969)
The glycoprotein structure of yeast invertase. *Biochemistry*, 8, 3552-3556.
- PARISE, E., TAYLOR, M.E. & SUMMERFIELD, J.A. (1982)
Localization of a carbohydrate mediated glycoprotein receptor on hepatic sinusoidal cells; in *Sinusoidal Liver Cells*, pp. 287-296, Knook, D.L. & Wisse, E. eds, Elsevier Biomedical Press.
- PASTAN, I. & WILLINGHAM, M.C. (1981)
Receptors-mediated endocytosis of hormones in cultured cells. *Ann. Rev. Physiol.*, 43, 239-250.
- PASTAN, I. & WILLINGHAM, M.C. (1983)
Receptor-mediated endocytosis: coated pits, receptosomes and the Golgi. *Trends in Biochem. Sci.*, 8, 250-254.

- PISONI, R.L., FLICKINGER, K.S., THOENE, J.G. & CHRISTENSEN, H.N. (1987)
Characterization of carrier-mediated transport systems for small neutral amino acids in human fibroblast lysosomes. *J. Biol. Chem.*, 262, 6010-6017.
- PITTMAN, R.C., GREEN, S.R., ATTIE, A.D. & STEINBERG, D. (1979)
Radiolabeled sucrose covalently linked to protein. A device for quantifying degradation of plasma proteins catabolized by lysosomal mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 254, 6876-6879.
- PITTMAN, R.C., CAREW, T.E., GLASS, C.K., GREEN, S.R., TAYLOR, C.A. JR & ATTIE, A.D. (1983)
A radioiodinated, intracellularly trapped ligand for determining the sites of plasma protein degradation *in vivo*. *Biochem. J.*, 212, 791-800.
- PRAANING-VAN DALEN, D.P., DE LEEUW, A.M., BROUWER, A., DE RUITER, G.C.F. & KNOOK, D.L. (1982)
Ultrastructural and biochemical characterization of endocytic mechanisms in rat liver Kupffer and endothelial cells; in *Sinusoidal Liver Cells*, pp. 271-278, Knook, D.L. & Wisse, E. eds, Elsevier Biomedical Press.
- REIJNGOUD, D.J. & TAGER, J.M. (1973)
Measurement of intralysosomal pH. *Biochim. Biophys. Acta*, 297, 174-178.
- RICHTER, A.N. & EBY, R. (1985)
Studies on artificial oligosaccharides-protein antigens: induction of precipitative antibodies to defined epitopes on natural and synthetic dextrans and mannans. *Molec. Immunol.*, 22, 29-36.
- RODMAN, J.S., SCHLESINGER, P. & STAHL, P. (1978)
Rat plasma clearance of horseradish peroxidase and yeast invertase is mediated by specific recognition. *FEBS Letters*, 85, 345-348.
- ROSENFELD, L. & BALLOU, C.E. (1975)
An approach to the sequencing of yeast mannan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 63, 571-579.
- SCHLESINGER, P.H., RODMAN, J.S., DOEBBER, T.W., STAHL, P.D., LEE, Y.C., STOWELL, C.P. & KUHLENSCHMIDT, T.B. (1980)
The role of extra-hepatic tissues in the receptor-mediated plasma clearance of glycoproteins terminated by mannose or N-Acetylglucosamine. *Biochem. J.*, 192, 597-606.
- SELDEN, C., WOOTTON, A.M., MOSS, D.W. & PETERS, T.J. (1978)
Analytical subcellular fractionation studies on different cell types isolated from normal rat liver. *Clin. Sci. Molec. Med.*, 55, 423-427.
- STEER, C.J. & CLARENBURG, R. (1979)
Unique distribution of glycoprotein receptors on parenchymal and sinusoidal cells of rat liver. *J. Biol. Chem.*, 254, 4457-4461.
- STEER, C.J. & ASHWELL, G. (1980)
Studies on a mammalian hepatic binding protein specific for asialoglycoproteins. Evidence for receptor recycling in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 255, 3008-3013.
- STOCKERT, R.J., MORELL, A.G. & SCHEINBERG, I.H. (1976)
The existence of a second route for the transfer of certain glycoproteins from the circulation into the liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 68, 988-993.

- SUMMERFIERD, J.A., VERGALLA, J. & JONES, E.A. (1982)
Modulation of a glycoprotein recognition system on rat hepatic endothelial cells by glucose and diabete mellitus. *J. Clin. Invest.*, 69, 1337-1347.
- TOLLESHAUG, H., OSE, T., BERG, T., WANDEL, M. & NORUM, K.R. (1977 a)
Endocytosis and intracellular hydrolysis of proteins in isolated rat hepatocytes and non parenchymal liver cells, in Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal cells, pp. 333-341, Wisse, E. & Knook, D.L. eds, Elsevier: North-Holland, Biomedical Press, Amsterdam.
- TOLLESHAUG, H., BERG, T., NILSSON, M. & NORUM, K.R. (1977 b)
Uptake and degradation of 125 I-labelled asialo-fetuin by isolated rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 499, 73-84.
- TOLLESHAUG, H., BERG, T., FRÖLICH, W. & NORUM, K.R. (1979)
Intracellular localization and degradation of asialo-fetuin in isolated rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 585, 71-84.
- TOLLESHAUG, H., BERG, T. & BLOMHOFF, R. (1984)
Uptake of mannose-terminated glycoproteins in isolated rat liver cells. *Biochem. J.*, 223, 151-160.
- TRIMBLE, R.B. & MALEY, F. (1977)
Subunit structure of external invertase from *Saccharomyces Cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 252, 4409-4412.
- WANDEL, M., BERG, T., ESKILD, W. & NORUM, K.R. (1982)
Intracellular transport and degradation of 125 I-labelled denaturated serum albumin in isolated nonparenchymal rat liver cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 721, 469-477.
- WATTIAUX, R. (1966)
in Etude expérimentale de la surcharge des lysosomes. Thèse, Université Catholique de Louvain, Duculot, J.- S.A. ed.; Gembloux.
- WATTIAUX, R. & DE DUVE, C. (1956)
Tissue fractionation studies. 7. Release of bound hydrolases by means of Triton-X-100. *Biochem. J.*, 63, 606-608.
- WATTIAUX, R., WATTIAUX-DE CONINCK, S., RONVEAUX-DUPAL, M-F. & DUBOIS, F. (1978)
Isolation of rat liver lysosomes by isopycnic centrifugation in a metrizamide gradient. *J. Cell. Biol.*, 78, 349-368.
- WILEMAN, T., HARDING, C. & STAHL, P. (1985)
Receptor-mediated endocytosis. *Biochem. J.*, 232, 1-14.