

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution à l'étude de la cytotoxicité de la Glycyl-D-Phénylalanine-2-Naphtylamide

Biélande, Véronique

Award date:
1989

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.

1989



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

Contribution à l'étude de la cytotoxicité
de la
Glycyl-D-Phénylalanine-2-Naphtylamide

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

Véronique Biélande

Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix
Facultés des sciences
Rue de Bruxelles, 61, B-5000 Namur
Tel : 081/22.90.61 Telex : 59222 facnam-b Telefax :
081/23.03.91

Contribution à l'étude de la
cytotoxicité de la Glycyl-D-
Phénylalanine-2-Naphtylamide

Véronique Biélande

Résumé

Dans ce travail visant à recueillir des informations sur le pouvoir cytotoxique de la Gly-D-Phe-2-NNap, nous avons testé l'effet de cette molécule sur des structures subcellulaires allant des lysosomes au reticulum endoplasmique en passant par les endosomes, les mitochondries et les peroxysomes. Nous avons également tenté d'observer l'action de la Gly-D-Phe-2-NNap sur la membrane plasmique en utilisant la membrane des erythrocytes comme modèle expérimental. Ces expériences furent basées sur deux approches: soit la mesure de la latence d'une enzyme "marqueur" de l'organite soumis à l'action de la Gly-D-Phe-2-NNap, soit la mesure du pourcentage de matériel préalablement contenu dans l'organite, rendu "non-sédimentable" par la molécule. Elles nous ont permis de constater que les lysosomes sont, de loin, les organites les plus sensibles à cette dipeptidyl-naphtylamide. Nous avons dès lors tenté d'obtenir plus d'informations sur cette rupture des lysosomes provoquée par la Gly-D-Phe-2-NNap et sur son mécanisme, ce qui nous a notamment permis de montrer que la lyse de l'organite est le résultat d'une action intralysosomale de la naphtylamide.

Abstract

In this work aimed at collecting informations about the cytotoxicity of the Gly-D-Phe-2-NNap, we tested the effect of the molecule on different subcellular structures such as lysosomes, endoplasmic reticulum, endosomes, mitochondria and peroxisomes. We also made an attempt to observe the action of Gly-D-Phe-2-NNap on the plasma membrane by using the red cell membrane as an experimental model. Two approaches have been used: the first was a measure of the latency of a marker enzyme of the organelle submitted to Gly-D-Phe-2-NNap, the second, was the measure of the pourcentage of the material inside the organelle before the action of the molecule, becoming unsedimentable through these action. Those experiments gave us the possibility to notice that lysosomes are, so far, the organelles wich are most sensitive to the dipeptidyl-naphthylamide. From there, we tried to obtain more informations about the rupture of lysosomes due to Gly-D-Phe-2-NNap and also about the mechanism of these action. Those informations allowed us to show that the lysis of the organelle is the result of an intralysosomal action of the naphthylamide.

Mémoire de licence en sciences biologiques
Septembre 1989
Laboratoire de Chimie-Physiologique
Promoteur : Professeur R. Wattiaux

Au terme de ce mémoire, je remercie Monsieur le Professeur R. Wattiaux de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir conseillée tout au long de ce travail.

De même, ma reconnaissance s'adresse à Madame S. Wattiaux-de Coninck pour ses conseils et la disponibilité dont elle a fait preuve à mon égard.

Mes plus vifs remerciements s'adresse à Monsieur M. Jadot pour la rigueur avec laquelle il a guidé mes expériences, la gentillesse et la patience dont il a toujours fait preuve à mon égard.

Il m'est agréable de remercier Monsieur F. Dubois pour ses conseils judicieux, son aide amicale et sa bonne humeur inébranlable tout au long de cette année.

Je tiens sincèrement à remercier mon frère Pierre pour le temps qu'il m'a consacré et la patience dont il fit preuve lors de la rédaction de ce mémoire ainsi que pour ses encouragements répétés et son optimisme.

Un tout grand merci à Anne qui trouva toujours le temps de se pencher sur mes problèmes et me permit de les résoudre promptement.

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

C'est enfin mes parents que je remercie de tout coeur pour m'avoir permis de réaliser ces études universitaires et m'avoir constamment entourée et encouragée durant ces quatre années.

Plan

I. Introduction

<u>1 Cytotoxicité cellulaire</u>	p.1
<u>2 Mécanismes de passage membranaire</u>	p.3
<u>2.1 Mécanismes non spécifiques</u>	p.3
2.1.1 via des domaines hydrophobes	p.3
2.1.2 via des canaux polaires	p.3
<u>2.2 Mécanismes spécifiques</u>	p.3
2.2.1 Diffusion facilitée	p.3
2.2.2 Le transport actif	p.4
<u>2.3 Transport de macro-molécules et de particules</u>	p.5
<u>3 Les lysosomes</u>	p.9
<u>3.1 Caractéristiques générales</u>	p.9
<u>3.2 La biosynthèse des lysosomes</u>	p.11
<u>3.3 Le pH intralysosomal</u>	p.12
<u>3.4 Composition de la membrane lysosomale</u>	p.13
<u>4 Effets de molécules sur les lysosomes</u>	p.14
<u>4.1 Les détergents lysosomotropes</u>	p.14
<u>4.2 Effets des esters d'acides aminés et de peptides</u>	p.15
<u>4.3. les effets des dipeptidylnaphtylamides</u>	p.16
<u>5 But du travail</u>	p.17

Chap. II Techniques expérimentales

<u>1 Techniques de fractionnement</u>	p.19
<u>1.1. Préparation de l'homogénat</u>	p.19
<u>1.2. Centrifugation différentielle</u>	p.19
<u>1.3. Enzymes de références</u>	p.20
<u>2 Dosages enzymatiques</u>	p.20
<u>2.1. Méthodes générales</u>	p.20
<u>2.1 Activité libre-activité totale</u>	p.20
<u>2.3. Activité non sédimentable</u>	p.21
<u>2.4 Préparation de vésicules prélysosomales intervenant dans l'endocytose</u>	p.21
<u>2.5. Préparation des globules rouges</u>	p.22
<u>2.6. Dosage de l'hémoglobine</u>	p.22
<u>2.7. Dosage des protéines</u>	p.23

CHap. III Résultats expérimentaux

<u>1. Effets de la Gly-L-Phe-2-NNap et de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les lysosomes</u>	p.24
<u>1.1 Introduction</u>	p.24
<u>1.2. La Gly-L-Phe-2-NNap</u>	p.24
1.2.1 Effets sur les lysosomes	p.24
1.2.2. Discussion	p.25
<u>1.3. La Gly-D-Phe-2-NNap</u>	p.27
1.3.1 Effet additif de la Gly-L-Phe-2-NNap et de la Gly-D-Phe-2-NNap	p.27

1.3.2 Discussion	p.29
<u>1.4. Effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les lysosomes</u>	p.30
1.4.1. Influence du temps d'incubation sur la latence de la phosphatase acide	p.30
1.4.2. Influence de la concentration	p.31
1.4.3. Influence du pH	P.31
1.4.4. Effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur l'activité libre de différentes enzymes du lysosome	P.31
1.4.5. Effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur l'activité non sédimentable de la cathepsine C	p.33
1.4.6. Influence de la température	p.33
1.4.7. Importance du milieu d'incubation	p.37
1.4.8. Influence de la quantité de granules	p.40
1.4.9 Effet comparatif de la Gly-D-Phe-2-NNap et de molécules apparentées	p.43
1.4.10. Effet du zinc sur l'activation des lysosomes provoquée par la Gly-D-Phe-2-NNap	p.44
1.4.11 Influence du pH intralysosomal	p.44
<u>1.5. discussion</u>	p.46
<u>2. Effet de la GLY-D-Phe-2-NNap sur différents organites</u>	p.49
<u>2.1 Les mitochondries</u>	p.49
2.1.1. Caractère général	p.49
2.1.2. Effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les mitochondries	p.49
<u>2.2. Les endosomes</u>	p.50
2.2.1 Caractère général	p.50
2.2.2. Effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les endosomes	p.51

<u>2.3. Les peroxysomes</u>	p.52
2.3.1. Caractère général	p.52
2.3.2. Effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les peroxysomes	p.52
<u>2.4. Le réticulum endoplasmique</u>	p.53
2.4.1. Caractère général	p.53
2.4.2. Effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur le réticulum endoplasmique	p.53
<u>2.5. La membrane plasmique</u>	p.54
2.5.1. Généralité sur les globules rouges	p.54
2.5.2. Effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur la membrane plasmique	p.54
<u>2.6. Discussion</u>	p.56

IV Conclusion

p.59

V Bibliographie

I : Introduction

1 Cytotoxicité

L'intérêt d'étudier la cytotoxicité cellulaire réside dans l'impact qu'elle peut avoir en chimiothérapie. La chimiothérapie cancéreuse se base essentiellement sur l'utilisation de molécules qui se rangent dans 4 catégories quant à leurs cibles pharmacologiques . Elles pourront

- a. réagir avec l'ADN.
- b. se comporter comme agoniste ou antagoniste d'hormones.
- c. jouer le rôle d'antimétabolite.
- d. altérer les microtubules.

L'efficacité de la chimiothérapie est encore limitée à un nombre restreint d'affections néoplasiques et les effets secondaires ne sont pas inexistantes. C'est pourquoi la recherche de composés cytotoxiques ayant d'autres cibles subcellulaires que celles qui concernent les molécules anticancéreuses actuelles est importante. Dans cette optique, l'étude de composés dont l'effet cytotoxique pourrait être médié par un système membranaire de la cellule risque d'aboutir à la découverte de nouveaux types de médicaments antinéoplasiques.

Ainsi on a découvert que des esters et des amides d'acides aminés et de dipeptides sont doués d'une cytotoxicité apparemment sélective pour certaines cellules. Il est possible que cette cytotoxicité passe par l'effet de ces molécules sur les lysosomes. En effet, comme nous aurons l'occasion d'en parler plus loin, les esters et amides d'acides aminés peuvent s'accumuler *in vitro* dans les lysosomes et conduire éventuellement à la rupture de la membrane de ces organites. Cette rupture peut provenir du déséquilibre osmotique résultant de l'accumulation de ces substances dans les lysosomes ou (et) d'un effet toxique éventuel sur la membrane de ces organites des molécules : acides aminés, alcools, résultant de l'hydrolyse intralysosomale. Plusieurs observations illustrent que ces substances peuvent exercer un effet cytotoxique. Rabinovitch *et al* (1987) ont montré que certains leishmani étaient tués par des esters méthylés d'acides aminés et de dipeptides, que les

parasites soient isolés ou localisés à l'intérieur de macrophages les ayant phagocytés.

Thiele *et al* (1987), Thiele et Lipsky (1985-86) ont mis en évidence qu'il était possible d'éliminer sélectivement les monocytes de préparations de lymphocytes périphériques en traitant ces préparations avec certains esters méthylés d'acides aminés. Ces auteurs établissent une relation de cause à effet entre les propriétés lysosomotropes de ces molécules et leur cytotoxicité.

Récemment encore, Thiele et Lipsky (1985-86) ont découvert un phénomène cytotoxique particulier résultant de l'addition du méthylester de la leucine (leu - met) à des préparations de lymphocytes périphériques. Leurs expériences montrent que dans ces conditions les monocytes sont capables de synthétiser du leu-leu-met apparemment suite à la pénétration de leu-met dans les lysosomes et que ce dérivé libéré dans le milieu tue sélectivement les cellules "natural killer" et les lymphocytes T cytotoxiques sans affecter d'autres cellules de la préparation tels les lymphocytes B, et les lymphocytes T suppresseurs. Le mécanisme d'action du leu-leu-met n'est pas connu ni les raisons pour lesquelles certaines cellules y sont plus sensibles que d'autres.

Au cours de ces dernières années on a également pu mettre en évidence les propriétés lysosomotropes de naphtylamides de dipeptides et montrer que *in vitro* la membrane des lysosomes pouvait être rompue suite à la pénétration de ces substances dans ces organites (voir point 4.3) (Jadot *et al*, 1984). Des travaux réalisés au laboratoire ont montré que certaines de ces molécules étaient douées de propriétés cytotoxiques. Des études préliminaires suggèrent que des différences de sensibilité existent entre différents types de cellules et que le pouvoir cytotoxique dépend des résidus d'acides aminés. On ne peut jusqu'à présent préciser si ce sont uniquement les propriétés lysosomotropes de ces substances qui sont responsables de la cytotoxicité.

2 Mécanismes de passage membranaire

2.1 Mécanismes non spécifiques

2.1.1 via des domaines hydrophobes

Le pouvoir de pénétration est étroitement lié au degré de liposolubilité de la substance étudiée. Ainsi, certaines substances telles que les éthers, cétones, ou autres pénètrent extrêmement rapidement dans la cellule alors que d'autres, plus solubles dans l'eau, pénètrent beaucoup plus lentement. D'une manière générale ce sont les substances qui s'avèrent être de bons solvants des lipides ou qui sont elles-mêmes bien solubles dans les lipides, qui diffusent le plus facilement dans la cellule (Berkaloff *et al*, 1977)

2.1.2 via des canaux polaires

Il apparaît cependant certaines exceptions dues au fait que la nature "lipoïdique" de la membrane n'est pas rigoureusement homogène sur toute sa surface. En effet, on a constaté que nombre de substances (eau, méthanol, acétamide, éthylène glycol) pénètrent de manière anormalement rapide, si l'on considère leur liposolubilité. Le fait que ces substances soient solubles dans l'eau, et de poids moléculaire faible, donc de dimensions réduites, a conduit Höber à suggérer que la membrane plasmique pouvait être considérée comme une mosaïque de région "lipoïdiques" et de régions poreuses, ces dernières étant probablement constituées de protéines fibreuses dans les mailles desquelles serait assurée la continuité de la phase aqueuse entre le milieu intra et extracellulaire (Berkaloff *et al*, 1977).

2.2 Mécanismes spécifiques

2.2.1 Diffusion facilitée

La pénétration de certaines substances dans la cellule semble relever de processus plus complexes que la simple diffusion dans la phase aqueuse ou dans la phase lipidique de la membrane.

Si l'on examine par exemple, le cas de la pénétration du glucose, on s'aperçoit qu'il pénètre très rapidement dans la cellule alors qu'il est peu liposoluble. Pour expliquer cette "anomalie", on admet que le glucose traverse la membrane plasmique, combiné à un constituant de cette membrane qui jouerait ainsi le rôle de transporteur spécifique (Wheeler et Hinckle, 1985). Dans ce cas le coefficient de perméabilité de la membrane ne peut plus être indépendant de la concentration du produit transporté : pour les concentrations élevées de glucose, c'est la quantité de transporteurs disponibles qui devient le facteur limitant de pénétration. Une telle pénétration est connue sous le nom de "diffusion facilitée". Cette diffusion s'exerce toujours dans une direction compatible avec le gradient de potentiel chimique et présente un phénomène de saturation pour les concentrations élevées de substrat. Cette pénétration par transporteur se caractérise encore par une haute spécificité de substrat.

On admet généralement que la diffusion facilitée implique 3 étapes:

1. Formation d'un complexe avec le transporteur
2. Translocation du complexe à travers la phase lipidique de la membrane.
3. Dissociation du complexe au niveau de la face opposée de la membrane.

La nature du complexe formé est mal connue. Il pourrait s'agir d'une liaison covalente entre le substrat et son transporteur, ce qui impliquerait une activité de type enzymatique pour réaliser cette liaison d'où le nom de "perméase" donné au transporteur. Au contraire, le substrat pourrait être simplement adsorbé sur le transporteur pour lequel le nom d'"amphore" serait alors plus adapté. La diffusion facilitée existe aussi pour d'autres molécules et notamment d'autres sucres.

2.2.2 Le transport actif

Nous pouvons prendre comme exemple le transport actif des ions à travers la membrane plasmique. Ce transport

nécessite l'hydrolyse de molécules d'ATP. Lorsqu'il y a inhibition expérimentale de la production d'ATP, la concentration des ions à l'intérieur de la cellule rejoint graduellement celle du milieu environnant. Cette tendance vers un équilibre résulte du mouvement des ions qui traversent lentement la membrane vers la région de gradients électriques et de concentrations moindres. Finalement la cellule meurt notamment parce que plusieurs enzymes intracellulaires n'agissent que dans une solution à concentration faible en ion Na^+ et élevé en ions K^+ (Darnell *et al*, 1988).

Dans chaque cellule, une portion importante de l'énergie disponible est consacrée au maintien des gradients de concentrations des ions disponibles de part et d'autre de la membrane plasmique et des membranes des organites intracellulaires. Une des principales questions qui se pose est de savoir comment le système assurant le transport de substances utilise l'énergie. Dans au moins trois systèmes enzymatiques, l'hydrolyse de l'ATP est directement couplée au transport des ions. L'un de ces systèmes, la $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase, transporte le Na^+ hors de la cellule et le K^+ à l'intérieur de la cellule. Un deuxième système "pompe" les ions Ca^{2+} hors de la cellule ou, dans les cellules musculaires, depuis le cytosol jusque dans le réticulum sarcoplasmique. Un troisième système transporte des protons. Le couplage de l'énergie de la liaison phosphate-phosphate au système de transport est direct; un système enzymatique qui peut cliver l'ATP en ADP et en phosphate fait partie des systèmes de transport de ces ions. En fait, cette enzyme, l'ATPase, est un système qui recueille l'énergie libre libérée lors de l'hydrolyse de l'ATP et l'utilise pour le mouvement des ions contre des gradients électriques ou de concentrations. (Darnell *et al*, 1988) Le transport actif existe aussi pour des substances telles que les acides aminés.

2.3 Transport de macromolécules et de particules

A côté de ces systèmes de transport membranaire, il existe un système différent permettant aux macromolécules et aux

particules même de taille relativement importante d'avoir accès au milieu intracellulaire : l'endocytose.

Dans ce processus, la cellule inclut le matériel étranger dans une vésicule intracellulaire via l'invagination d'une portion de la membrane plasmique autour de ce matériel. Il s'ensuit un trafic intracellulaire mettant en jeu diverses formes d'organites dont l'ensemble constitue l'appareil vacuolaire (de Duve et Wattiaux, 1966).

L'endocytose se subdivise en deux phénomènes distincts: la phagocytose et la pinocytose. La phagocytose consiste en la préhension de particules de taille supérieure à quelques dixièmes de microns. Ce phénomène se retrouve chez certaines cellules spécialisées comme par exemple les macrophages et les polymorphonucléaires neutrophiles. La pinocytose pour sa part permet aux cellules d'isoler une "goutte" du milieu cellulaire et tout son contenu dans leur cytoplasme.

La pinocytose est elle-même subdivisée: on parlera de pinocytose fluide lorsque les solutés étrangers sont inclus dans la cellule du fait de leur présence aléatoire dans la vésicule en formation. Par contre, certaines substances sont capturées après une étape d'adsorption sur des sites particuliers de la membrane plasmique. On parlera dans ce cas de pinocytose adsorptive. Celle-ci prendra le nom de pinocytose par récepteurs lorsque la substance capturée est spécifiquement reconnue par une protéine membranaire (Steinman *et al*, 1983; Pastan et Willingham, 1985).

Dans le cas de l'endocytose par récepteur la pénétration du ligand dans la cellule a lieu au niveau de sites particuliers de la membrane plasmique appelés "puits recouverts" (coated pits). On peut y observer au microscope électronique un épaissement fibreux sur le côté cytoplasmique de la membrane. Cet épaissement est principalement constitué d'une protéine : la clathrine (Alstiel et Branton, 1983). 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 resteraient confinés grâce à leur haute affinité pour la clathrine (Wileman *et al*, 1985). 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 probablement un changement de conformation du récepteur favorable à son association avec les "coated pits" induisant ainsi une migration des complexes récepteurs-ligands vers ces sites particuliers. Ce mouvement latéral s'effectue par simple diffusion des protéines dans la phase lipidique (Pastan et Willingham, 1985).

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.

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 structures plus ou moins tubulaires, d'un diamètre moyen de 0,3 micron, allant parfois jusque 1 micron. Cette diversité de formes et de distributions nécessite une nomenclature précise: on distingue généralement deux populations d'endosomes (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. Ils apparaissent plus sphériques et plus volumineux que les autres. Les endosomes donneraient naissance à une autre catégorie de granules: les corps multivésiculaires.

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 les ligands et les récepteurs. Les endosomes concernés sont alors plus grands et possèdent des extensions tubulaires; on parle alors de CURL, c'est-à-dire de compartiment de dissociation du

complexe récepteur-ligand. 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 2 composés; alors que les récepteurs sont recyclés vers la membrane plasmique, les ligands apparaissent dans les corps multivésiculaires 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, peut-être dérivée de la membrane plasmique au cours de l'endocytose (Héliénus *et al*, 1983). Vu la fréquente sensibilité de la liaison récepteur-ligand à de faibles pH, cette acidité favorise, la plupart du temps, la dissociation prélysosomale du ligand de son récepteur, pour permettre ainsi 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 à la membrane.

Le recyclage est maintenant un fait certain, qui permet d'assurer la capture continue de ligands 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 endocytose des complexes récepteurs-ligands grâce à ce recyclage (Dautry-Varsat et Lodish, 1984).

Les observations immunocytochimiques de Geuze *et al* (1984) soutiennent l'hypothèse de l'implication éventuelle 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, 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.

3 Les lysosomes

3.1 Caractéristiques générales

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 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 du 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 structure en sac contenant une variété d'hydrolases acides et entourés 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 ont leur activité maximale au environ de pH5, ce qui doit être proche du pH intralysosomal (Reijngoud et 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 (Mégo, 1979).

Parmi les différents types de lysosomes habituellement décrits, on distingue tout d'abord, les lysosomes primaires. Cette catégorie d'organites renferme des hydrolases n'ayant pas encore pris part

à un phénomène de digestion. Par contre, le lysosome secondaire est un site d'activité digestive présente ou passée.

Si les lysosomes ont un rôle de toute première importance qui est la digestion, 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 dans la cellule par endocytose. Il est clair qu'ils interviennent, pour une grande partie, dans la dégradation de composés, protéiques notamment, du fait de 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 et des petits peptides (le plus souvent des dipeptides) qui pourraient traverser la membrane lysosomale grâce à des systèmes de transporteurs (Pisoni *et al*, 1987) pour se retrouver ainsi dans le cytoplasme. A ce niveau, les dipeptides ayant résisté à l'hydrolyse totale dans les lysosomes, pourraient être pris en charge par des peptidases cytosoliques (de Duve et 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 pourrait être comparé 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 (de Duve et Wattiaux, 1966). Il persiste quelques fois des résidus indigestes à l'intérieur des lysosomes. Un lysosome ayant déjà fonctionné, peut participer à d'autres événements digestifs dans la cellule, et peut ainsi se charger de 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 (de Duve et Wattiaux, 1966).

Les lysosomes jouent également un rôle dans la défense des cellules contre des organismes étrangers (cas des macrophages par exemple), ainsi que dans la détoxification et participent à la digestion de cellules mortes, de débris cellulaires et de 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 par la suite du fait de sa fusion avec des lysosomes. Les vacuoles autophagiques peuvent contenir des organites de la cellule comme du réticulum endoplasmique, des mitochondries dans un état de dégradation variable.

Si 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 d'un jeûne prolongé.

On peut mieux se rendre compte de l'importance des lysosomes lorsque l'on s'intéresse, aux pathologies dues à un mauvais fonctionnement de ces derniers. Ainsi, les maladies congénitales de surcharge lysosomale s'expliquent par l'absence d'origine génétique d'une hydrolase spécifique ou par le mauvais fonctionnement d'un système conçu pour permettre la sortie de produits d'hydrolyse vers le cytosol.

3.2 La biosynthèse des lysosomes

Dans beaucoup de types cellulaires les larges granules lysosomiaux sont clairement de type "secondaire" et les lysosomes primaires sont souvent trop petits ou trop rares pour que la détection cytochimique soit facile (de Duve et Wattiaux, 1966).

On sait depuis longtemps que les enzymes lysosomiales sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique rugueux. Ces nouvelles enzymes entrent dans le réticulum endoplasmique lisse qui fait suite au réticulum endoplasmique rugueux. De petites vésicules contenant les hydrolases "bourgeonnent" alors de ce réticulum. Les hydrolases sont ensuite empaquetées dans des vésicules de Golgi et forment ainsi des lysosomes primaires (de Duve, Wattiaux, 1966). Un problème de la biogénèse des lysosomes est de savoir comment les hydrolases acides se

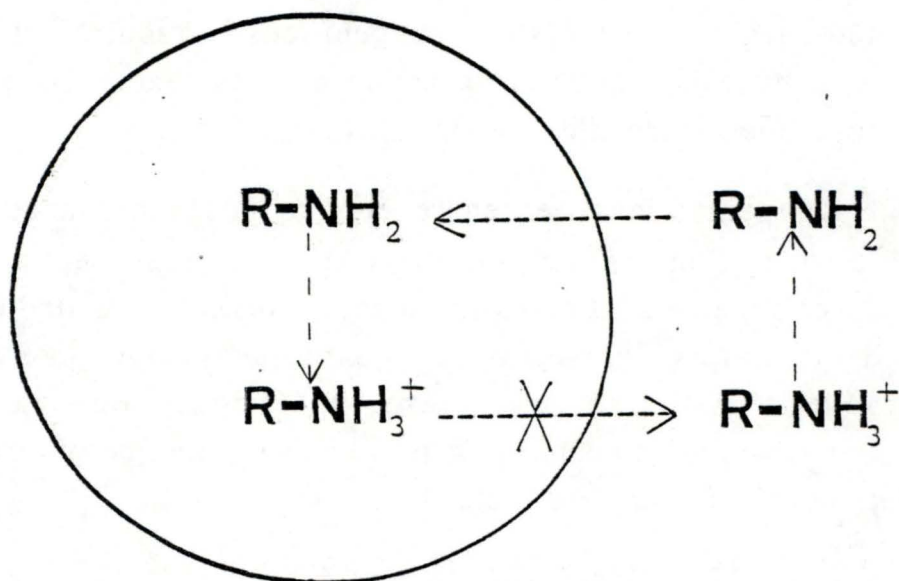


Fig.1

retrouvent spécifiquement enfermées et rassemblées dans ce qui donnera les lysosomes.

On a pu mettre en évidence que toutes les hydrolases lysosomales sont des glycoprotéines. Il semble que de manière assez générale, des récepteurs situés sur la membrane de l'appareil de Golgi reconnaissent des motifs de la portion oligosaccharidique et sont responsables de l'emballage spécifique des hydrolases à l'intérieur des lysosomes primaires présentant d'abord l'aspect de "coated vesicles". Ce motif de première importance se situant sur la partie glucidique de l'hydrolase est fréquemment le mannose-6-phosphate. Une fois que les hydrolases ont atteint le lysosome, elles perdent ce marqueur mannose-6-phosphate (Sly et Fisher, 1982; Sahagian, 1984).

3.3 Le pH intralysosomal

Plusieurs travaux ont démontré la présence, dans les membranes lysosomales, d'un système de transport de protons, dépendant de l'ATP, responsable de la forte acidité mesurable à l'intérieur des lysosomes (Darnell *et al*, 1988). Le pH des lysosomes doit être aux environs de 4,5 à 5,0. Le pH du cytosol est aux environs de 7,0. Le maintien de ce gradient de protons de plus de 100 pour 1 entre le milieu lysosomal et le cytosol dépend de la production d'ATP par la cellule. Afin de montrer l'existence dans des lysosomes isolés de cette pompe à protons dépendant de l'ATP, les chercheurs ont d'abord déterminé le pH de ces lysosomes isolés. Ce pH peut être déterminé par addition d'une base faible radioactive (par exemple la méthylamine) à la suspension de lysosomes; cette base faible peut traverser une membrane biologique à l'état non protoné ($\text{CH}_3\text{-NH}_2$), mais non à l'état protoné ($\text{CH}_3\text{-NH}_3^+$) (de Duve *et al*, 1974).

Ces bases faibles se trouvant dans les vésicules à pH interne faible sous forme chargée donc peu diffusible, s'y concentrent par rapport au milieu environnant. Il s'agit en fait du mécanisme de perméation illustré par la Fig. 1 et dont nous aurons l'occasion de reparler plus loin. Le rapport de concentration de la base faible dans le milieu intralysosomal et dans le milieu extralysosomal fournit ainsi une indication précise du rapport des concentrations en H^+ dans ces deux compartiments et permet donc de

déterminer le pH intralysosomal. Des expériences réalisées *in vitro* ont permis de montrer que l'addition de Mg^{2+} et d'ATP au milieu entraîne une chute immédiate du pH intralysosomal à moins de 5,0, c'est-à-dire à l'accumulation d'une concentration de méthylamine 100 fois supérieure à celle du milieu. Ces expériences fournissaient la preuve que les lysosomes isolés contiennent une pompe à protons dépendant de l'ATP (Schneider, 1981; Moriyama *et al*, 1984).

3.4 Composition de la membrane lysosomale

La membrane lysosomale est, comme toute membrane biologique, constituée d'une bicouche lipidique associée à des protéines. Néanmoins elle se caractérise par différents points importants.

- a) Une proportion relativement importante des protéines lysosomales sont des lipoprotéines acides.
- b) 25% des protéines des lysosomes sont membranaires.
- c) Le côté interne de la membrane des lysosomes est riche en acides sialiques.
- d) On remarque une contribution importante des phospholipides acides. Dans les lysosomes, le contenu en cardiolipides et acides phosphatidiques est 3 fois supérieur au contenu de la membrane plasmique.
- e) On pense parfois que l'effet combiné dans la membrane lysosomale de la sphingomyéline, du cholestérol et des acides gras saturés permet de stabiliser les propriétés physicochimiques des membranes lysosomales.

Si l'on doit comparer la membrane lysosomale à la membrane plasmique, on constate qu'elles se caractérisent toutes deux par leur richesse en acides N-acétylneuraminique, en acides aminés acides, en sphingomyéline et en cholestérol.

4 Effets de molécules sur les lysosomes

Lorsque l'on s'intéresse à l'action spécifique de certaines molécules sur les lysosomes, on rencontre souvent le terme "lysosomotropisme" qui décrit la tendance qu'ont certaines molécules à s'accumuler dans ces organites particuliers. Si pour une molécule, un comportement lysosomotrope peut dans certains cas résulter simplement d'une capture par endocytose, il peut parfois s'expliquer par un passage direct de la molécule à travers la membrane du lysosome. L'exemple classique de ce type est celui de bases faibles s'accumulant dans les lysosomes par le mécanisme de perméation rappelé brièvement dans le point 3.3. Notons que les bases faibles lysosomotropes, comme par exemple la chloroquine, la méthylamine ou autres, pourront dans certaines conditions s'accumuler dans des proportions telles qu'elles provoquent l'éclatement des lysosomes.

4.1 Les détergents lysosomotropes

Comme nous venons de le voir, les amines dont le pK est compris entre 5 et 9 sont lysosomotropes parce que les lysosomes sont des compartiments acides. Si de telles amines comportent de longues chaînes hydrophobes, elles pourront, après protonation à l'intérieur des lysosomes, agir comme détergent et provoquer la rupture de ces organites. Le groupe de Firestone *et al* (1982) d'une part ainsi que Firestone et Pisano (1979) ont décrit cet effet des "détergents lysosomotropes" qui conduisent à la mort cellulaire. A un pH neutre dans le cytosol lorsqu'ils agissent *in vivo*, l'amine non ionisée sera simplement une substance sans aucune propriété d'activation de surface. Vu l'ionisation à l'intérieur du lysosome, elle deviendra un détergent, s'accumulant avec sa queue hydrophobe associée à la zone des hydrocarbures de la bicouche lipidique et sa partie hydrophyle protonée, faisant face au milieu aqueux intérieur du lysosome. Ceci va fragiliser la membrane qui, se rompant, va permettre la libération des enzymes lysosomiaux dans le cytosol et provoquer la mort de la cellule. Ces molécules sont cytotoxiques pour toutes les cellules existantes sauf pour les globules rouges qui ne contiennent pas de lysosomes (Firestone *et al*, 1982).

4.2 Effets des esters d'acides aminés et de peptides.

Goldman et ses collègues ont remarqué que l'incubation d'une suspension de lysosomes en présence d'esters méthyliques d'acides aminés ou de peptides provoque une perte de latence et de sédimentabilité des enzymes lysosomales (Goldman et Kaplan, 1973; Goldman et Naider, 1974; Goldman, 1976). Divers mécanismes ont été proposés pour expliquer ce phénomène.

Les esters sont, en fait, une catégorie de molécules susceptibles d'avoir un comportement lysosomotrope. Du fait du "masquage" de la fonction carboxyle, ces molécules peuvent être considérées comme des bases faibles et pourront comme elles rejoindre les lysosomes par perméation. Elles sont en effet capables de diffuser dans les lysosomes sous leur forme non chargée et se retrouvent piégées par protonation dans le milieu intralysosomal acide.

Si le mécanisme de la perméation peut conduire à une réelle accumulation des bases faibles dans les lysosomes, leur concentration intralysosomale ne peut toutefois pas s'accroître indéfiniment. La concentration intralysosomale maximale dépend du gradient de protons de part et d'autre de la membrane des lysosomes. D'après de Duve *et al* (1974), l'accumulation tendra vers un équilibre tel que:

$$\frac{C_e}{C_i} = \frac{H_e^+}{H_i^+}$$

où C_e et C_i sont respectivement les concentrations extra et intra-lysosomales de la base faible, et H_e^+ et H_i^+ sont respectivement les concentrations extra et intralysosomales des protons.

Par contre, il est certain que si la molécule rejoignant les lysosomes par perméation est hydrolysée dans ces granules, elle pourra conduire à une accumulation nettement plus importante pour autant que les produits d'hydrolyse soient incapables de s'échapper. C'est ce mécanisme comportant une étape d'hydrolyse intralysosomale qui explique l'effet lytique des esters d'acides aminés et de peptides sur les lysosomes, un

effet observable à des concentrations relativement faibles. Ces molécules sont en effet de bons substrats pour les estérases lysosomales (Goldman et Kaplan, 1973). L'hydrolyse intralysosomale conduira à une accumulation intralysosomale d'acides aminés libres et de dipeptides qui étant "zwitterions" sont moins perméables que les esters respectifs et ne peuvent donc ressortir du lysosome. L'accumulation intralysosomale des produits d'hydrolyse sera telle qu'elle provoquera un déséquilibre osmotique et donc un flux d'eau amenant éventuellement l'éclatement des lysosomes.

Notons que Goldman et Kaplan (1973) ont montré qu'il existe une remarquable corrélation entre la capacité de ces molécules de labiliser un lysosome et leur hydrolyse par les composés enzymatiques lysosomiaux. Enfin, ces auteurs suggèrent que l'hydrolyse intralysosomale d'esters d'acides aminés peut affecter l'intégrité lysosomale par un autre mécanisme. Des H^+ étant libérés durant l'hydrolyse de l'ester, le pH interne du lysosome pourrait diminuer amenant la rupture de celui-ci (Goldman et Kaplan, 1973).

4.3 Effets des dipeptidylnaphtylamides.

Les dipeptidylnaphtylamides sont des dérivés couramment utilisés pour mesurer l'activité de la cathepsine C (Mc Donald *et al.*, 1969). La cathepsine C est une exopeptidase lysosomale libérant séquentiellement des dipeptides à partir de l'extrémité N-terminale de substrats peptidiques (Mc Donald *et al.*, 1971). Son action sur les dipeptidylnaphtylamides donnera donc d'une part un dipeptide et d'autre part la naphtylamine libre.

Les dipeptidylnaphtylamides ont plusieurs points communs avec les esters d'acides aminés et de peptides dont il était question dans le point précédent. Ces molécules peuvent également être considérées comme des bases faibles du fait de leur fonction amine libre. D'autre part, comme nous venons de le voir, ces molécules servent de substrats à une hydrolase lysosomale, en l'occurrence la cathepsine C.

Il n'est donc pas surprenant de constater que certaines dipeptidylnaphtylamides comme par exemple la Gly-L-Phe-2-

NNap sont capables de conduire à une lyse osmotique des lysosomes par un mécanisme homologue à celui décrit pour les esters d'acides aminés et de peptides. C'est la conclusion de certains travaux récents du laboratoire (Jadot *et al*, 1984) qui ont permis de montrer:

- a) que pour agir sur les lysosomes, une dipeptidylnaphtylamide doit d'abord diffuser sous forme non protonée à travers la membrane du granule;
- b) que cette molécule doit ensuite subir une hydrolyse intralysosomale;
- c) qu'il en résulte une accumulation des produits d'hydrolyse provoquant un déséquilibre osmotique, un appel d'eau et finalement la rupture de l'organite.

5. But du travail

Plusieurs travaux ont démontré que les esters et amides d'acides aminés pouvaient s'accumuler *in vitro* dans les lysosomes et conduire éventuellement à la rupture de la membrane de ces organites. De plus de nombreuses observations illustrent que ces mêmes substances peuvent exercer un effet cytotoxique. Rabinovitch *et al* (1987) ont par exemple montré que certains parasites étaient tués par ces substances. De même Thiele et Lipski (1985) ont mis en évidence un phénomène cytotoxique particulier résultant de l'addition du méthylester de la leucine à des préparations de lymphocytes périphériques. D'autre part, ces travaux mettent en évidence le fait que certains des esters sont beaucoup plus cytotoxiques que d'autres et surtout qu'une sélectivité cellulaire est manifeste.

Au cours de ces dernières années, des travaux réalisés au laboratoire ont conduit à la mise en évidence des propriétés lysosomotropes de certaines dipeptidylnaphtylamides comme par exemple la Gly-L-Phe-2-NNap. La lyse des lysosomes qui est observable lors de l'incubation d'une préparation de ces granules en présence de Gly-L-Phe-2-NNap est attribuée principalement à un mécanisme comportant une étape d'hydrolyse de la molécule (voir 4.3). Tout récemment, on a observé que certaines de ces molécules étaient douées de propriétés cytotoxiques. Jusqu'à présent, on ne peut toutefois pas préciser si ce sont uniquement les propriétés lysosomotropes de ces substances qui sont responsables de la

cytotoxicité; il est possible par exemple que la membrane plasmique soit aussi impliquée. Parmi les dipeptidyl-naphtylamides cytotoxiques, on trouve notamment la Gly-D-Phe-2-NNap, une molécule non hydrolysable par les lysosomes.

Nous allons dès lors essayer:

- 1) de voir plus en détail si la Gly-D-Phe-2-NNap peut avoir un effet sur une préparation de lysosomes.
- 2) de caractériser l'action de cette dipeptidylnaphtylamide sur les lysosomes.
- 3) d'étudier l'effet que peut avoir la Gly-D-Phe-2-NNap sur d'autres types membranaires en prenant comme modèles les peroxysomes, les mitochondries, les endosomes, le réticulum endoplasmique et la membrane des globules rouges.

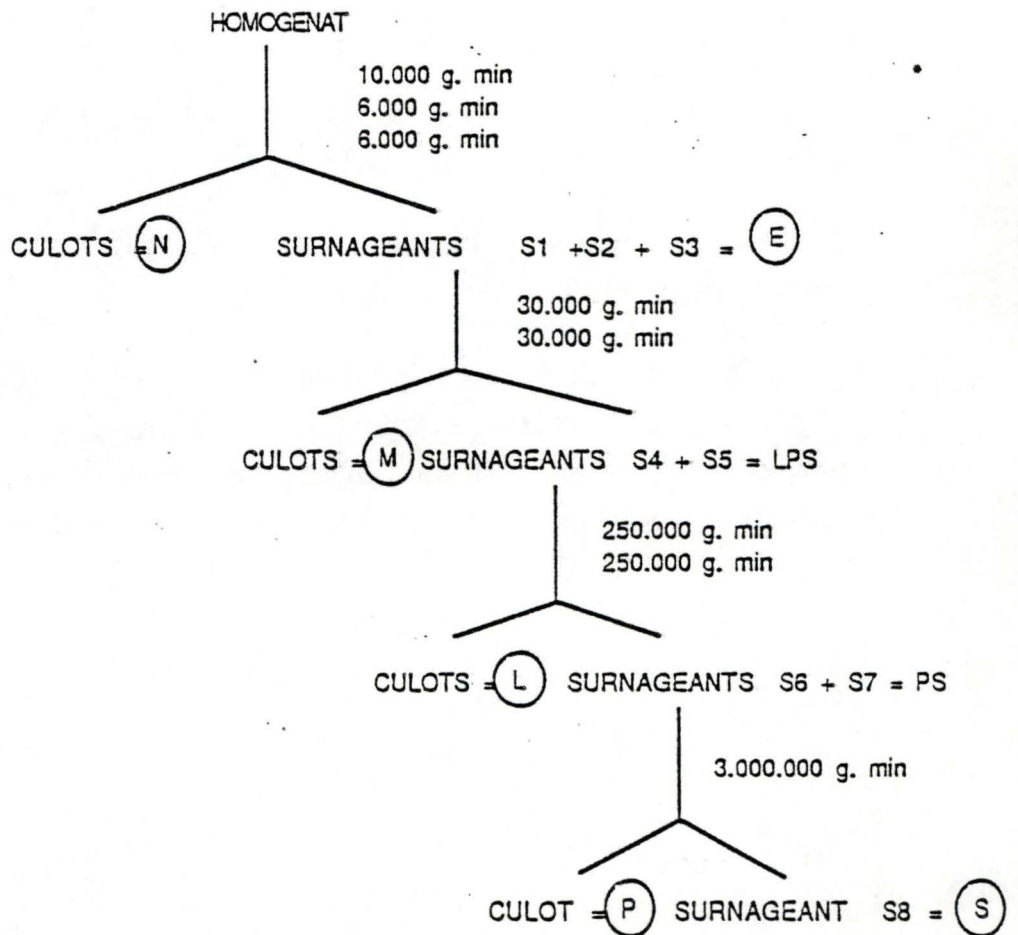


FIG. 2. Schéma de fractionnement subcellulaire du foie en centrifugation différentielle de Duve *et al.* [1955].

Chap. II Techniques expérimentales

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 des figures.

1 Techniques de fractionnement.

1.1. Préparation de l'homogénat

Toutes les expériences ont été réalisées avec des rats mâles Wistar, à jeûn, d'un poids corporel compris entre 200 et 300 g. Après sacrifice de l'animal par décapitation, on prélève le foie le plus rapidement possible. Celui-ci est pesé et découpé en fines lamelles dans un volume connu d'une solution de saccharose 0,25 M glacé. Le tout est finalement broyé dans un homogénéiseur de Potter.

1.2. Centrifugation différentielle

L'homogénat contenu est soumis au schéma de fractionnement en centrifugation différentielle décrit par de Duve *et al* (1955) et représenté à la Fig. 2.

Les granules sont séparés, principalement d'après leur taille, dans une solution isotonique de saccharose glacé. L'homogénat est soumis par étapes à des champs centrifuges croissants. Chaque étape permet la séparation d'un culot et d'un surnageant soumis à des centrifugations ultérieures. Le schéma complet de centrifugation permet l'obtention successive de 5 fractions hétérogènes, mais cependant enrichies en certains types d'organites.

a) Une fraction N contenant la plupart des noyaux et des débris de cellules.

b) Une fraction M, appelée fraction mitochondriale lourde enrichie en mitochondries mais contenant également des lysosomes et des peroxysomes.

c) Une fraction L, ou fraction mitochondriale légère enrichie en lysosomes et en peroxysomes.

Tableau 1 : Résumé des conditions expérimentales des dosages enzymatiques

Organites Subcellulaires	Enzymes	Substrats	Concentration	pH	Mesure	Référence
lysosomes	Cathepsine C	Glycyl-L-arginine B-naphtylamide	0,25 mM	5	Colorimétrique de la naphtylamide	Jadot <i>et al</i> ; 1984
	Phosphatase acide	B-Glycerophosphate	50 mM	5	Colorimétrique du phosphatase	Appelmans <i>et al</i> ; 1955
	N-acétylglucosaminidase	P-nitrophényl-N-acétyl β D glucosaminide	4 mM	5	Colorimétrique du p-nitrophénol	Vaes; 1966
peroxysomes	Catalase	Peroxyde d'hydrogène	1,5 mM	7	Colorimétrique du peroxyde d'hydrogène	Baudhuin <i>et al</i> ; 1964
Mitochondries	Sulfite cytochrome C réductase	Cytochrome C	0,017 mM	7,4	Spectrophotométrique du cytochrome réduit	Wattiaux- de Coninck, S. & Wattiaux, R. ; 1971
	Malate deshydrogénase	Oxalacétate	2,5 mM	7,4	Spectrophotométrique du NADH ⁺	Ochoa, S.; 1955
Réticulum endoplasmique	Mannose-6 phosphatase	Mannose-6-phosphate	20 mM	6,5	Dosage du phosphate	Godelaide <i>et al</i> ; 1983

d) Une fraction P, microsomale, contenant la plus grande partie des éléments du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi; ainsi que quelques fragments de la membrane plasmique.

e) Une fraction S, encore appelée "fraction soluble" contenant tous les éléments non sédimentables dans les conditions de centrifugation utilisées pour préparer la fraction P.

La majeure partie de nos expériences se font avec 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.

1.3. Enzymes de références

La composition des fractions isolées par centrifugation, en différents types de granules, est évaluée en mesurant l'activité d'enzymes de référence, c'est-à-dire d'enzymes spécifiquement associées à un type de granules (de Duve *et al*, 1955). Nous avons par exemple mesuré l'activité de la sulfite cytochrome C réductase et de la malate déshydrogénase pour repérer les mitochondries, de différentes hydrolases acides (cathepsine C, N-acétylglucosaminidase, phosphatase acide) pour repérer les lysosomes, la catalase pour repérer les peroxysomes et la mannose-6-phosphatase pour le réticulum endoplasmique.

2 Dosages enzymatiques

2.1. Méthodes générales

Le tableau 1 résume les conditions expérimentales utilisées pour la mesure des différentes activités enzymatiques, ainsi que les références bibliographiques décrivant plus en détail ces modes opératoires.

2.2. Activité libre-activité totale.

L'activité libre d'une enzyme se mesure dans un milieu isotonique (saccharose 0,25 M) et sur une préparation de granules aussi fraîche que possible. Lorsque le substrat de l'enzyme est incapable de pénétrer à travers la membrane intacte des granules, ce qui est généralement le cas, l'activité libre indique le taux d'enzymes libres, c'est-à-dire extérieures aux

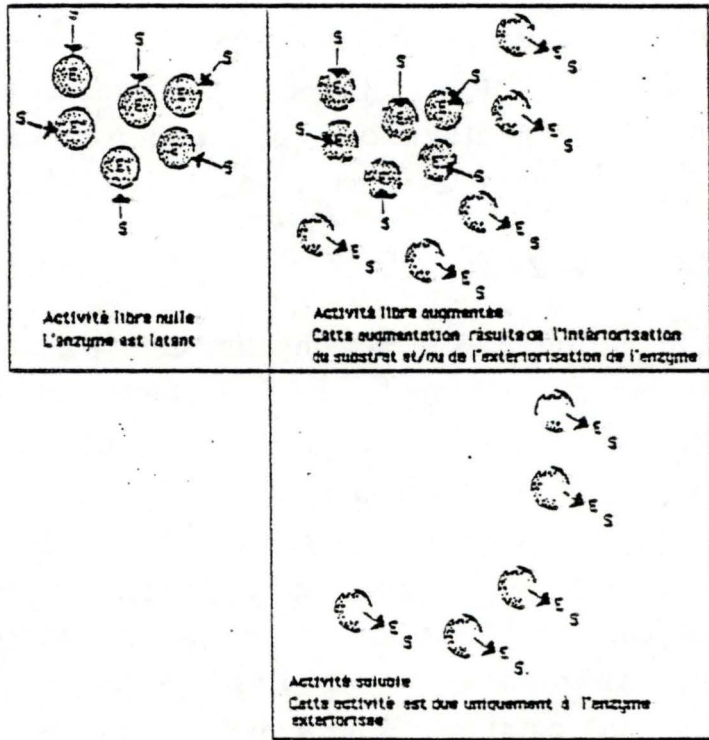


Fig. 3

granules et donne donc une indication de leur état de préservation (Fig.3). Nous mesurons l'activité totale en ajoutant au milieu d'incubation permettant la mesure de l'activité libre, un détergent (triton X-100 0,1%) de manière à détruire la membrane des granules. Dans ces conditions les enzymes sont donc totalement accessibles à leurs substrats (Wattiaux et de Duve, 1956).

2.3. Activité non sédimentable

L'activité non sédimentable correspond à une mesure d'activité due à de l'enzyme retrouvée à l'extérieur du granule et donc impossible à sédimenter (Fig.3). Pour mesurer l'activité non sédimentable de la cathepsine C sur une préparation de granules, ceux-ci sont sédimentés à 25000 tours/min pendant 20 minutes dans un rotor Spinco 40.3. L'activité enzymatique de la cathepsine C est alors mesurée dans le surnageant. Pour cette mesure, le milieu d'incubation utilisé contient de la Glycyl-Arginyl-2- naphthylamide 0,25 mM, du tampon acétate 0,05 M à pH 5 et du triton x-100 0,1%. L'activité non sédimentable est généralement exprimée en pour-cent de l'activité totalement solubilisée. Celle-ci correspond à l'activité non sédimentable mesurée sur une préparation de granules dont la membrane est détruite par incubation en présence de triton X-100.

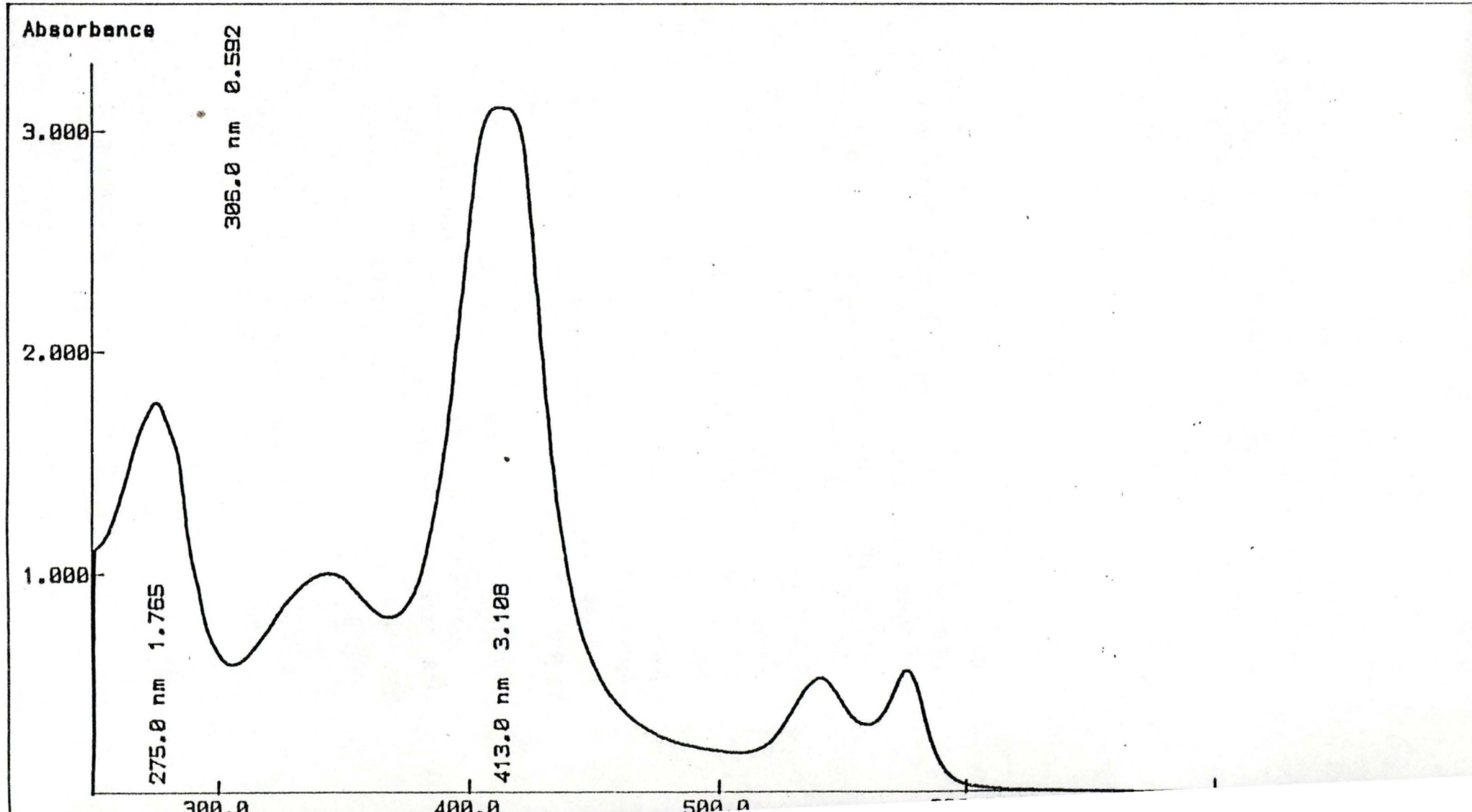
Lors des expériences destinées à tester l'effet d'une dipeptidyl-naphthylamide sur l'activité non sédimentable de la cathepsine C les granules sont incubés de la même manière que dans les expériences habituelles si ce n'est que l'étape de fixation est remplacée par un refroidissement rapide en ajoutant au milieu d'incubation 2 ml de saccharose 0,25 M glacé et en maintenant les tubes dans la glace fondante. Les tubes sont alors centrifugés de manière à mesurer l'activité non sédimentable comme décrit ci-dessus.

Le même principe est appliqué pour la mesure de la quantité de FITC dextran ou d'hémoglobine non sédimentables.

2.4. Préparation de vésicules prélysosomales intervenant dans l'endocytose.

ABSORBANCE GLOBULES ROUGES

Fig. 4



Afin de mettre en évidence les endosomes (Ohkuma et Morigama, 1982) on injecte 20 mg de FITC dextran par 100 g de foie corporel dans la veine fémorale d'un rat sous légère anesthésie à l'éther. Le sacrifice de l'animal a lieu 10 minutes après l'injection, de manière à ne pas laisser le temps aux endosomes de fusionner avec les lysosomes. Une perfusion du foie est aussitôt mise en route par injection dans l'aorte d'une solution de NaCl 9‰ glacé. Le temps de perfusion est déterminé par une appréciation visuelle de la couleur du foie, et ne dépasse jamais quelques minutes. Le foie est alors homogénéisé et soumis au schéma de centrifugation différentielle décrit précédemment de façon à préparer une fraction P, contenant la plus grosse partie de la fluorescence après ce temps d'injection court.

2.5. Préparation des globules rouges.

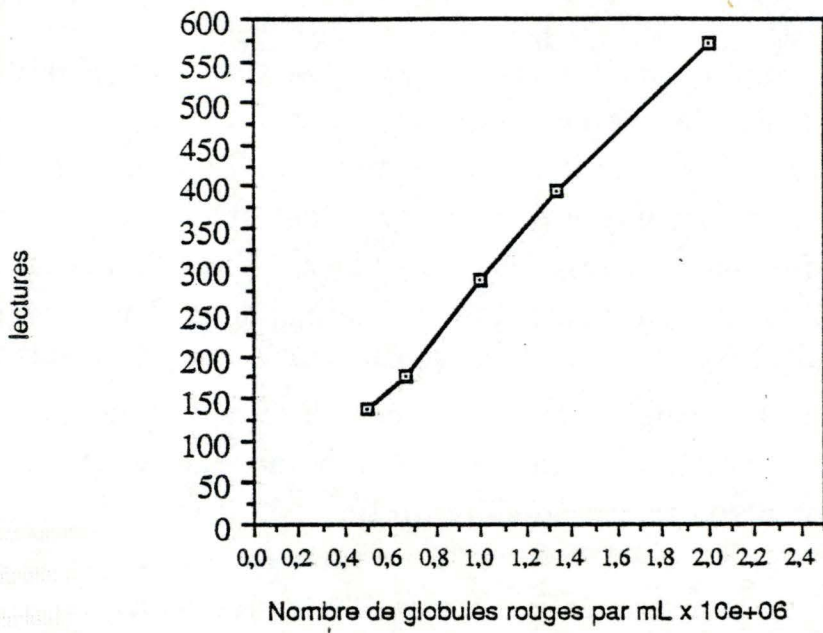
Dès le sacrifice du rat, du sang est prélevé dans la veine hépatique et dilué dans de l'HBS (Hepes Buffered Saline) qui contient du NaCl 150 mM, du KCl 5 mM, de l'Hepes 5 mM et du Mg SO₄ 1 mM dont on ajuste le pH à 7,4 avec du NaOH; l'HBS contient également quelques grains d'héparine. Le sang est centrifugé 4 fois à 2000 tours/min durant 5 min. (centrifugeuse Sorval à 2000 tours/min). Le culot est enfin resuspendu dans de l'HBS à la dilution voulue.

2.6. Dosage de l'hémoglobine

La méthode d'abord utilisée pour le dosage de l'hémoglobine est celle de l'hématine alcaline. Son principe est simple. En présence d'acides, l'hémoglobine se scinde en globine et en hème; la globine est dénaturée, le Fe⁺⁺ de l'hème est oxydé en Fe⁺⁺⁺, c'est l'hématine. En milieu alcalin, le Fe⁺⁺⁺ se retrouve sous forme de FeOH. Sous cette forme, l'hémoglobine est dosable par colorimétrie. A 1 ml de solution à doser, nous ajoutons 1 ml d'acide chlorhydrique 0,2 N et 0,2 ml de NaOH 10%. La lecture se fait à 540 nm.

Pour sensibiliser notre test, nous avons déterminé le pic d'absorbance de l'hémoglobine en spectrophotométrie. Comme le montre la figure 4, un pic majeur est observable à 413 nm. Nous

Fig 5: Détection de l'hémoglobine à 413 nm



avons dès lors fait nos dosages à cette longueur d'onde et nous avons vérifié que les lectures nous donnaient bien une relation linéaire (Fig. 5).

2.7. Dosage des protéines.

Le dosage des protéines se fait suivant la méthode de Folin (Lowry *et al*, 1951).

Fig 6 : Effet de la Gly-L-Phe-2-NNap sur la latence de la cathepsine C en fonction du Temps

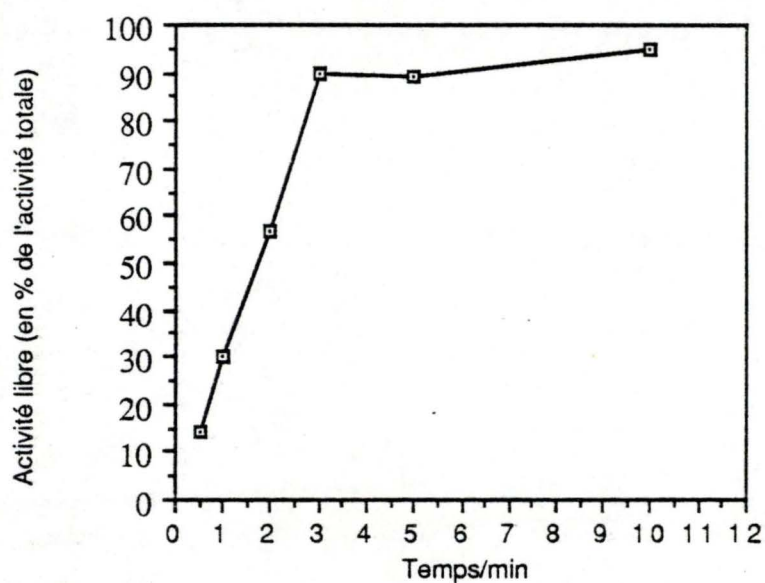


Fig. 6

Une fraction ML est incubée à 37°C en présence de Gly-L-Phe-2-NNap 0,25 mM, de tampon acétate 50 mM pH 6, de saccharose 0,25 M, de mercaptoéthylamine 5mM et de Triton X-100 0,1% pour la mesure des activités totales. L'activité libre est exprimée en % de l'activité totale correspondante.

1. Effets de la Gly-L-Phe-2-NNap et de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les lysosomes

1.1. Introduction

Notre but étant de mettre en évidence un éventuel effet de la Gly-D-Phe-2-NNap, nous avons décidé dans un premier temps de nous attarder sur les effets de la Gly-L-Phe-2-NNap. Comme nous l'avons déjà mentionné, les dipeptidylnaphtylamides sont des dérivés couramment utilisés pour mesurer l'activité de la cathepsine C. La première partie rappelle que la Gly-L-Phe-2-NNap, dans certaines conditions, diffuse à travers la membrane des lysosomes, est hydrolysée dans ces granules et provoque leur éclatement (Jadot *et al*, 1984). Nous avons ensuite essayé de voir quels étaient les effets de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les lysosomes, malgré son incapacité d'être hydrolysée par la cathepsine C. Pour cette approche expérimentale nous avons utilisé des fractions mitochondriales totales (M+L), qui contiennent environ 70% des lysosomes hépatiques. Ces fractions furent obtenues en suivant le protocole classique de centrifugation différentielle décrit par de Duve *et al* (1955).

1.2. La Gly-L-Phe-2-NNap

1.2.1. Effets sur les lysosomes

Lorsqu'une fraction mitochondriale totale (M+L) est incubée en présence de Gly-L-Phe-2-NNap 0,25 mM à pH 6 et à 37°C, on observe que la cathepsine C perd rapidement sa latence comme l'illustre la Fig 6. L'activité libre de la cathepsine C y est exprimée en pour-cent de l'activité totale. Les granules sont incubés pendant des temps croissants en présence d'une concentration fixe de Gly-L-Phe-2-NNap: 0,25 mM. Ces résultats montrent que la perte de latence de la cathepsine C est un phénomène dépendant du temps d'incubation en présence de la Gly-L-Phe-2-NNap. L'élévation de l'activité libre est progressive pour atteindre rapidement 100 % de l'activité totale. Cette perte de latence de la cathepsine C traduit une altération de la membrane lysosomale telle, qu'il y a libre accès du substrat à l'enzyme.

Fig 7: Effet de la concentration de la Gly-L-Phe-2-NNap sur la latence de la cathepsine C

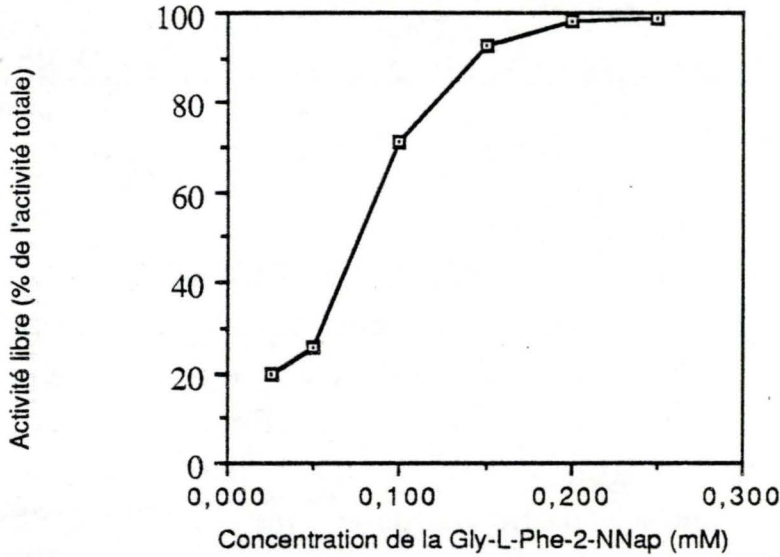


Fig. 7

Une fraction ML est incubée 10 Min à 37°C en présence de différentes concentrations de Gly-L-Phe-2-NNap, de tampon acétate 50 mM pH 6, de saccharose 0,25 M, de mercaptoéthylamine 5mM et de Triton X-100 0,1% pour la mesure des activités totales. L'activité libre est exprimée en % de l'activité totale correspondante.

Fig 8: Effet de la Gly-L-Phe-2-NNap sur l'activité non sédimentable de la cathepsine C

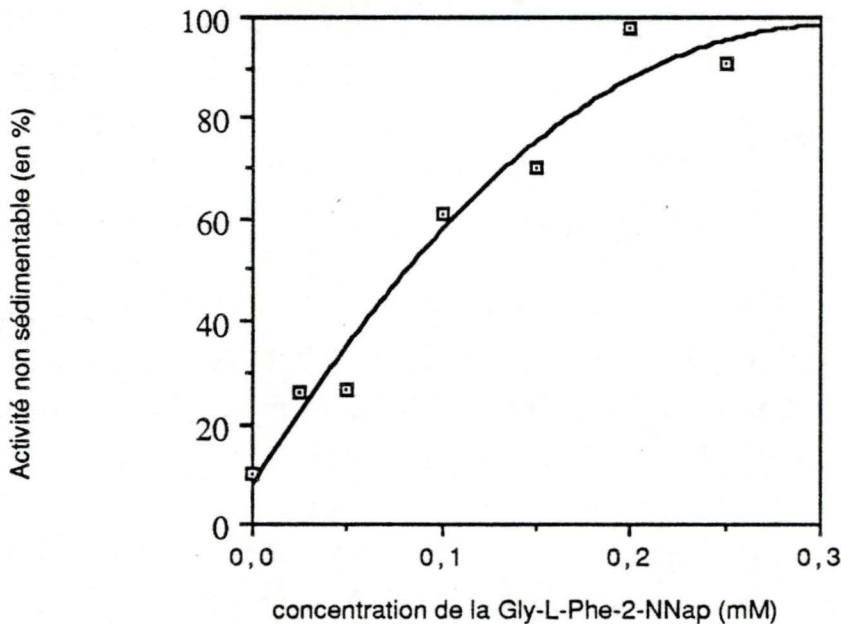


Fig. 8

Une fraction ML est incubée 10 Min à 37°C en présence de différentes concentrations de Gly-L-Phe-2-NNap, de tampon acétate 50 mM pH 6, de saccharose 0,25 M, et de mercaptoéthylamine 5 mM. L'activité non sédimentable de la cathepsine C est alors mesurée comme décrit dans la section matériel et méthodes (point 2.3). Elle est exprimée en % de l'activité totalement solubilisée (par incubation en présence de triton X-100 0,1%)

La Fig.7 montre les résultats d'une expérience visant à étudier l'effet d'une concentration croissante de Gly-L-Phe-2-NNap. Les granules sont incubés 10 minutes en présence de concentrations variables de Gly-L-Phe-2-NNap (de 0 à 0,25 mM) à 37°C. Nous observons que la perte de latence de la cathepsine C est fortement dépendante de la concentration de la naphtylamide.

Comme l'a montré Jadot (1987), la perte de latence de la cathepsine C, occasionnée par la Gly-L-Phe-2-NNap, se fait de la même façon que la libération de la cathepsine C provoquée par une diminution de la tonicité du milieu de suspension des granules. Ceci suggère que la Gly-L-Phe-2-NNap provoque le "démasquage" de la cathepsine C en créant un déséquilibre osmotique entre l'intérieur des lysosomes et le milieu extérieur. L'allure sigmoïdale de la courbe de démasquage de la cathepsine C provoquée par la Gly-L-Phe-2-NNap (Fig.7) traduit vraisemblablement l'hétérogénéité de la population lysosomale vis à vis du déséquilibre osmotique provoqué par cette molécule.

Dans l'expérience rapportée à la Fig.8, nous avons pu montrer que la perte de latence de la cathepsine C provoquée par la Gly-L-Phe-2-NNap, correspond à une véritable rupture de la membrane lysosomale, entraînant la libération des hydrolases lysosomales dans le milieu d'incubation. En effet, l'activité non sédimentable de la cathepsine C augmente de la même façon que son activité libre lorsque les granules sont incubés en présence d'une concentration croissante de Gly-L-Phe-2-NNap à pH6.

1.2.2. Discussion

Nos résultats montrent que la Gly-L-Phe-2-NNap à pH 6 et dans certaines conditions de concentration, est capable de provoquer une perte de latence de la cathepsine C allant de pair avec la libération de l'enzyme dans le milieu. Ceci indique qu'une réelle rupture de la membrane lysosomale doit avoir lieu. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec ceux obtenus par Goldman et Kaplan (1973) avec des esters méthyliques d'acides aminés et de peptides. Rappelons que comme ces

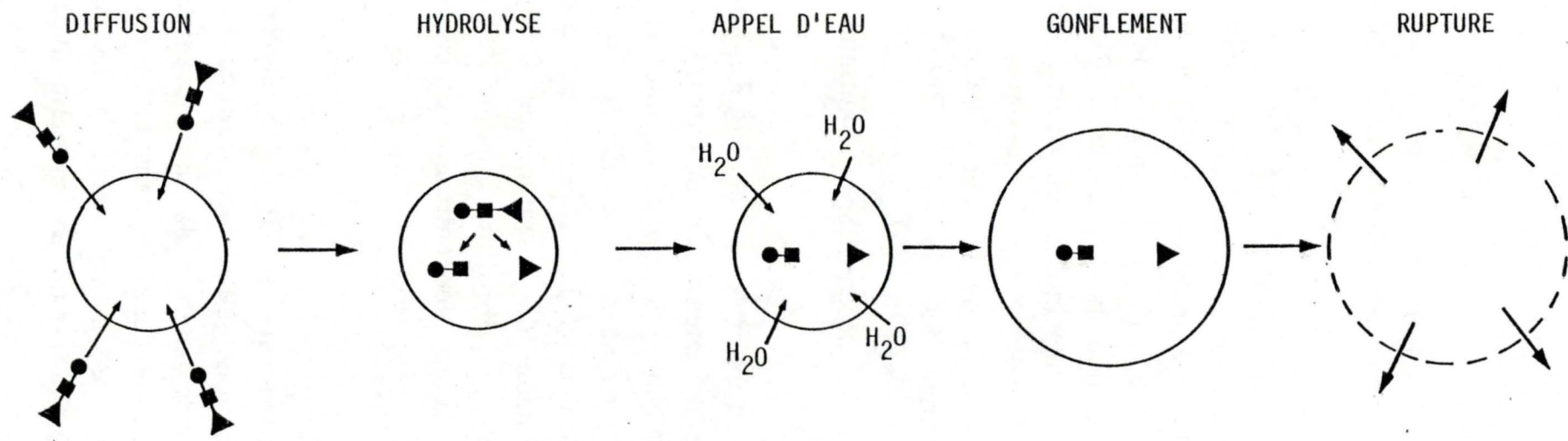


Fig.9

substances, la Gly-L-Phe-2-NNap sert de substrat à une hydrolase lysosomale et peut être considérée comme une base faible du fait de sa fonction amine libre. Il est vraisemblable que tout comme ces esters méthyliques d'acides aminés, la Gly-L-Phe-2-NNap pénètre par diffusion dans les lysosomes où elle est hydrolysée par la cathepsine C en naphtylamine et dipeptide qui, ne diffusant pas rapidement à l'extérieur des granules, s'accumulent. (Fig.9). Il en résulte un déséquilibre osmotique produisant un appel d'eau et une rupture des organites. Les résultats expérimentaux obtenus au laboratoire supportent cette interprétation. La rupture des lysosomes par la Gly-L-Phe-2-NNap est fortement influencée par la concentration de cette molécule, le pH et la température (Jadot, 1987). L'effet de ces 3 facteurs sur la libération de la cathepsine C est dû principalement à l'influence qu'ils exercent sur la vitesse de diffusion de la Gly-L-Phe-2-NNap à travers la membrane des lysosomes. Ceci explique que l'effet de la Gly-L-Phe-2-NNap est d'autant plus marqué que la concentration extralysosomale de la molécule est élevée et que le pH est élevé, (donc que la proportion de molécule déchargée, c'est-à-dire plus diffusible augmente), deux facteurs qui influencent directement la vitesse de diffusion. Appelmans et de Duve (1955) ainsi que Lloyd (1969) ont en effet montré qu'une molécule chargée traverse plus difficilement la membrane lysosomale qu'une molécule neutre de même poids moléculaire. D'autre part les expériences du laboratoire ont également permis de mettre en évidence qu'une dipeptidyl-naphtylamide moins lipophile (pH bas, présence d'une ou plusieurs fonctions hydroxyles, présence d'un acide aminé constamment chargé) est moins efficace pour démasquer la cathepsine C.

L'étude réalisée au laboratoire de l'effet de la température sur la vitesse de démasquage de la cathepsine C provoquée par la Gly-L-Phe-2-NNap permet d'autre part, la mise en évidence d'une énergie d'activation très élevée pour ce phénomène (Jadot *et al*, 1984). Cette forte dépendance vis-à-vis de la température est à mettre en parallèle avec l'énergie d'activation fort élevée que nécessite la diffusion d'un non électrolyte à travers une membrane biologique (Mc Elhaney *et al*, 1973).

On a pu démontrer en plus de la diffusion de la Gly-D-Phe-2-NNap qu'une hydrolyse intralysosomale de cette molécule avait réellement lieu et ce en mesurant l'activité libre de la cathepsine C en présence de ZnSO_4 1 mM. Dans ces conditions, l'activité extralysosomale est inhibée par le Zn^{2+} . La seule hydrolyse de la dipeptidylnaphtylamide mesurable est celle se déroulant dans le milieu intralysosomal où le Zn^{++} ne pénètre pas, ou ne pénètre que lentement, du fait de la présence de la membrane lysosomale intacte dans les conditions de mesure de l'activité libre (Jadot *et al*, 1984). Il n'en va pas de même pour une mesure d'activité totale où du fait de la destruction de la membrane lysosomale par le triton, le Zn^{++} a accès au milieu intralysosomal. Dans ce cas, toute l'activité enzymatique est inhibée.

Ceci confirme que l'activité libre de la cathepsine C, mesurée en présence de Zn^{++} , résulte d'une hydrolyse intralysosomale de la dipeptidylnaphtylamide. La rupture du lysosome semble donc bien provoquée par une accumulation de produits d'hydrolyse incapables de traverser la membrane lysosomale. Ceci provoque dès lors un déséquilibre osmotique important. Ce déséquilibre va déclencher un appel d'eau conduisant à un gonflement osmotique des lysosomes amenant leur rupture.

Par le mécanisme décrit ci-dessus, la Gly-L-Phe-2-NNap provoque une destruction spécifique des lysosomes. Elle ne détruira en effet que les granules capables de l'hydrolyser, c'est-à-dire ceux possédant de la cathepsine C active, autrement dit les lysosomes.

1.3. La Gly-D-Phe-2-NNap

1.3.1. Effet additif de la Gly-L-Phe-2-NNap et de la Gly-D-phe-2-NNap

Comme l'effet de la Gly-L-Phe-2-NNap passe principalement par son hydrolyse intralysosomale, on pourrait s'attendre à ce que la Gly-D-Phe-2-NNap, molécule non hydrolysable par la cathepsine C du fait de la phénylalanine sous sa forme D, soit sans effet sur l'intégrité de ces granules. Dans une première série d'expériences, nous avons utilisé conjointement de la Gly-L-Phe-2-NNap et de la Gly-D-Phe-2-NNap. Ces résultats

Fig 10: Effet additif de la Gly-L-Phe-2-NNap et de la Gly-D-Phe-2-NNap sur la latence de la cathepsine C

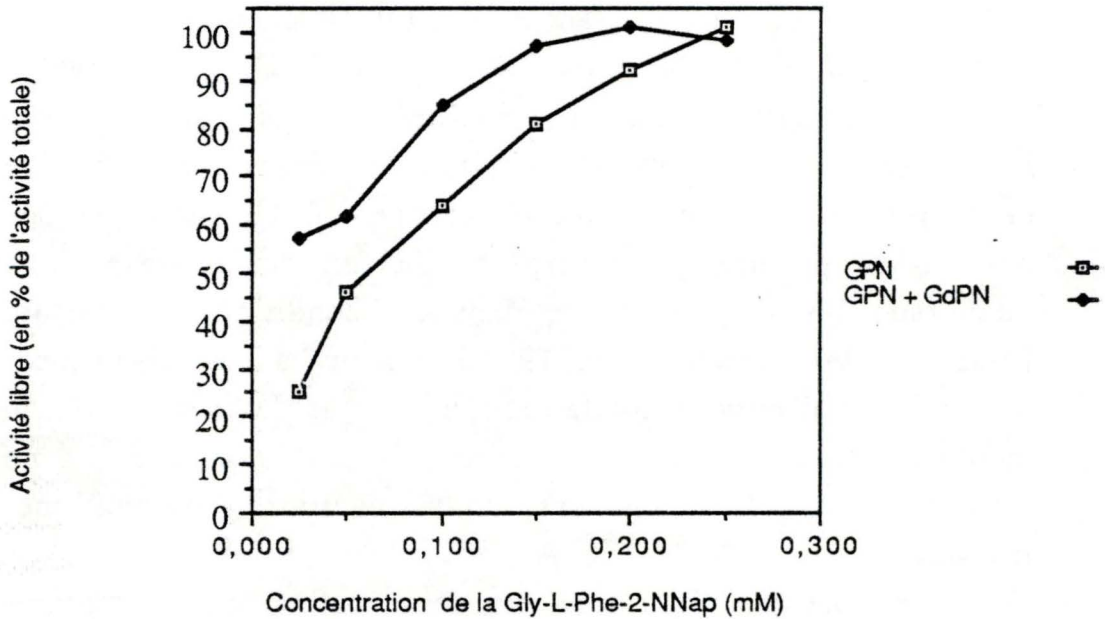


Fig. 10

Une fraction ML est incubée 10 Min à 37°C en présence de différentes concentrations de Gly-L-Phe-2-NNap, de tampon acétate 50 mM pH 6, de saccharose 0,25 M, de mercaptoéthylamine 5 mM et de Triton X-100 0,1% pour la mesure des activités totales. L'activité libre est exprimée en % de l'activité totale correspondante. □

Une fraction ML est incubée 10 Min à 37°C en présence de différentes concentrations de Gly-L-Phe-2-NNap et de Gly-D-Phe-2-NNap 0,125 mM, de tampon acétate 50 mM pH 6, de saccharose 0,25 M, de mercaptoéthylamine 5 mM et de Triton X-100 0,1% pour la mesure des activités totales. L'activité libre est exprimée en % de l'activité totale correspondante. ●

Fig 11: Effet additif de la Gly-L-Phe-2-NNap et de la Gly-D-Phe-2-NNap sur l'activité non sédimentable de la cathepsine C

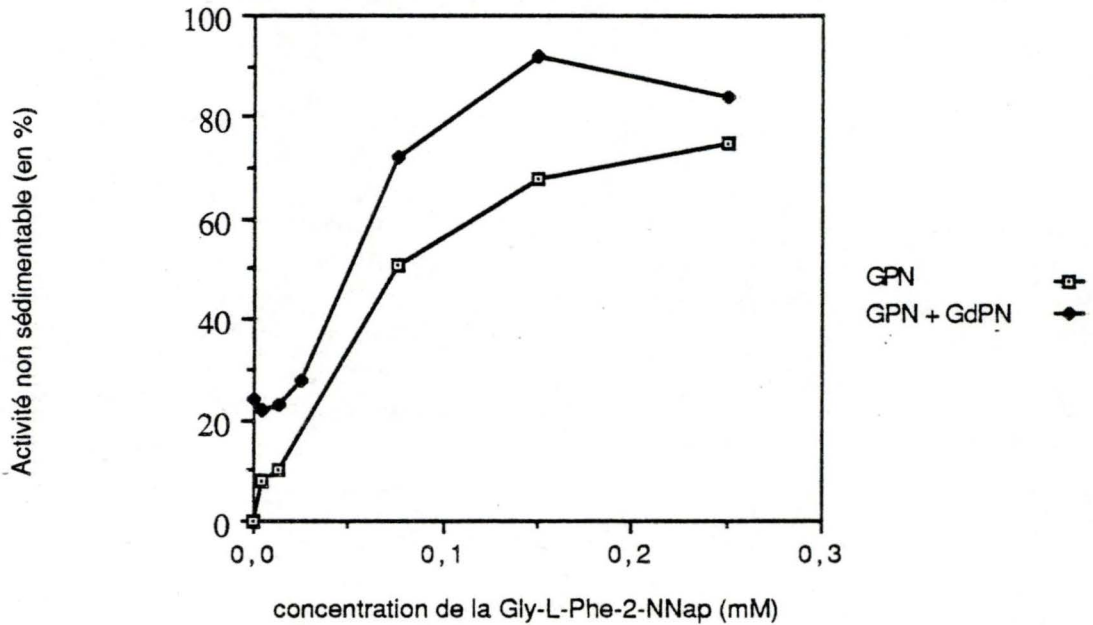


Fig. 11

Une fraction ML est incubée 10 Min à 37°C en présence de différentes concentrations de Gly-L-Phe-2-NNap, de tampon acétate 50 mM pH 6, de saccharose 0,25 M et de mercaptoéthylamine 5 mM. L'activité non sédimentable de la cathepsine C est alors mesurée comme décrit dans la section matériel et méthode (point 2.3). Elle est exprimée en % de l'activité totalement solubilisée (par incubation en présence de triton X-100 0,1%). □

Une fraction ML est incubée 10 Min à 37°C en présence de différentes concentrations de Gly-L-Phe-2-NNap et de Gly-D-Phe-2-NNap 0,125 mM de tampon acétate 50 mM pH 6, de saccharose 0,25 M et de mercaptoéthylamine 5 mM. L'activité non sédimentable de la cathepsine C est alors mesurée comme décrit dans la section matériel et méthode (point 2.3). Elle est exprimée en % de l'activité totalement solubilisée (par incubation en présence de triton X-100 0,1%). ●

semblent indiquer que la molécule non hydrolysable n'est pas sans effet.

Dans la Fig.10, nous avons suivi l'effet de la Gly-L-Phe-2-NNap sur la latence de la cathepsine C en incubant une fraction mitochondriale en présence d'une concentration croissante de cette molécule pendant 10 minutes à pH 6 et à 37 °C. Par ailleurs, nous avons incubé cette fraction ML dans les mêmes conditions mais cette fois en présence de concentrations croissantes de Gly-L-Phe-2-NNap, et de Gly-D-Phe-2-NNap à une concentration de 0,125 mM. Nos résultats nous permettent de reproduire la courbe obtenue habituellement avec la Gly-L-Phe-2-NNap, montrant l'influence de la concentration de cette dernière sur la rupture des lysosomes. Mais, cette expérience nous permet également de constater qu'une concentration fixe de Gly-D-Phe-2-NNap augmente l'effet de la Gly-L-Phe-2-NNap.

A première vue, cette observation est surprenante puisque certains résultats préliminaires obtenus au laboratoire montraient que la Gly-D-Phe-2-NNap contrairement à la Gly-L-Phe-2-NNap n'avait aucun effet sur les lysosomes lorsque l'incubation avait lieu à un pH égal à 6 et une température de 37 °C pendant 10 minutes.

Cette expérience qui nous montre clairement que la Gly-D-Phe-2-NNap provoque une perte de latence supplémentaire par rapport à la Gly-L-Phe-2-NNap seule, est confirmée par l'expérience décrite dans la Fig.11. Ici nous pouvons observer que la perte de latence de la cathepsine C mesurable dans les deux conditions d'incubation correspond à une réelle rupture des lysosomes. L'activité non sédimentable de la cathepsine C augmente en effet de la même façon que son activité libre.

1.3.2. Discussion

L'effet additif de la Gly-D-Phe-2-NNap et de la Gly-L-Phe-2-NNap décrit ci-dessus est relativement surprenant si l'on considère les travaux de Jadot *et al* (1984) montrant que bien qu'étant aussi liposoluble que la Gly-L-Phe-2-NNap, la Gly-D-Phe-2-NNap n'avait aucun pouvoir pour rompre les lysosomes. Cette observation était expliquée par le fait que la Gly-D-Phe-

Fig 12 : Influence du temps d'incubation en présence de Gly-D-Phe-2-NNap sur la latence de la phosphatase acide

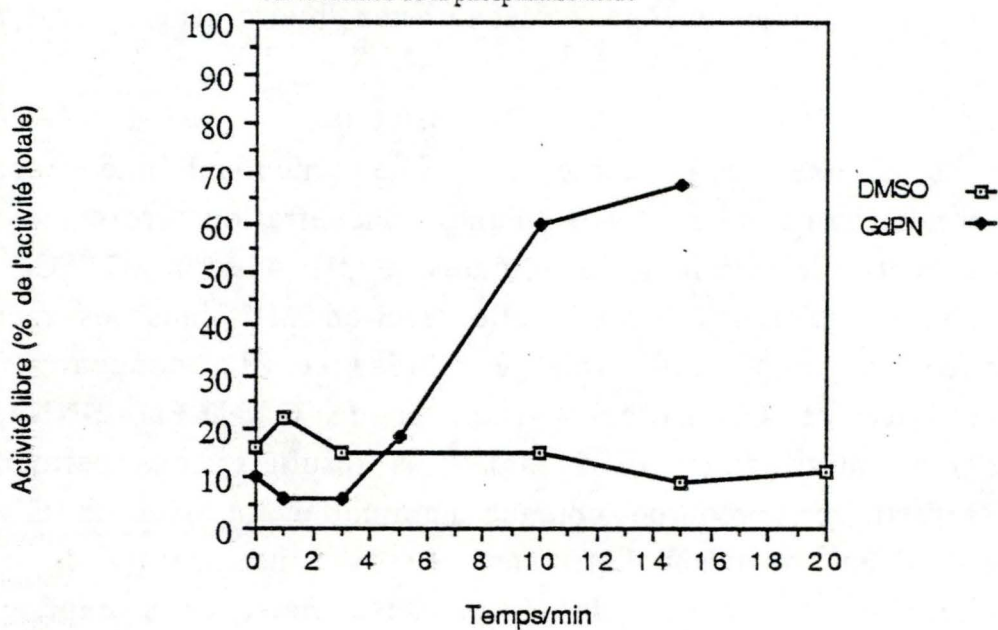


Fig. 12

Une fraction ML est incubée à 37°C durant des temps croissants, en présence ● ou en absence □ d'une concentration de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM, de tampon Tris 1 mM pH 7,5, de saccharose 0,25 M. Après les temps d'incubation décrit, un échantillon est prélevé sur lequel nous réalisons une mesure des activités libre et totale de la phosphatase acide.

2-NNap est une molécule non hydrolysable par la cathepsine C du fait de son acide aminé "D".

Pour expliquer l'effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur la courbe d'activation des lysosomes provoquée par la Gly-L-Phe-2-NNap, nous ne pouvons plus appliquer l'hypothèse de l'hydrolyse intralysosomale de la naphtylamide qui provoquerait une accumulation de molécules peu diffusibles dans le lysosome créant un déséquilibre osmotique, un appel d'eau et la rupture de la membrane lysosomale. De manière à obtenir plus de renseignements sur l'effet réel de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les lysosomes, nous avons décidé de poursuivre en variant les conditions expérimentales de manière à voir si la Gly-D-Phe-2-NNap peut, à elle seule, avoir un effet sur la membrane lysosomale.

1.4. Effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les lysosomes

1.4.1. Influence du temps d'incubation sur la latence de la phosphatase acide

Dans l'expérience rapportée à la Fig.12, nous avons incubé une fraction mitochondriale totale à 37°C pendant des temps croissants en présence de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM et à pH 7,5. Nous avons testé l'effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les lysosomes en mesurant au terme de cette incubation l'activité libre de la phosphatase acide, qui est exprimée dans cette figure en pour-cent de l'activité totale correspondante. Comme cette figure nous le montre, l'effet de la Gly-D-Phe-2-NNap caractérisé par la perte de latence de l'enzyme qu'elle provoque, est d'autant plus marqué que les granules sont en contact plus longtemps avec la molécule. Après une incubation d'une quinzaine de minutes dans ces conditions, l'activité libre se rapproche de l'activité totale indiquant la profonde altération de la membrane lysosomale.

Notons que la Gly-D-Phe-2-NNap étant dissoute dans du DMSO, nous avons pris soin de faire lors de chaque expérience une courbe contrôle montrant que le DMSO à cette concentration (1 %) n'a aucun effet sur les granules.

Fig 13 : Effet de la concentration en Gly-D-Phe-2-NNap sur la latence de la phosphatase acide

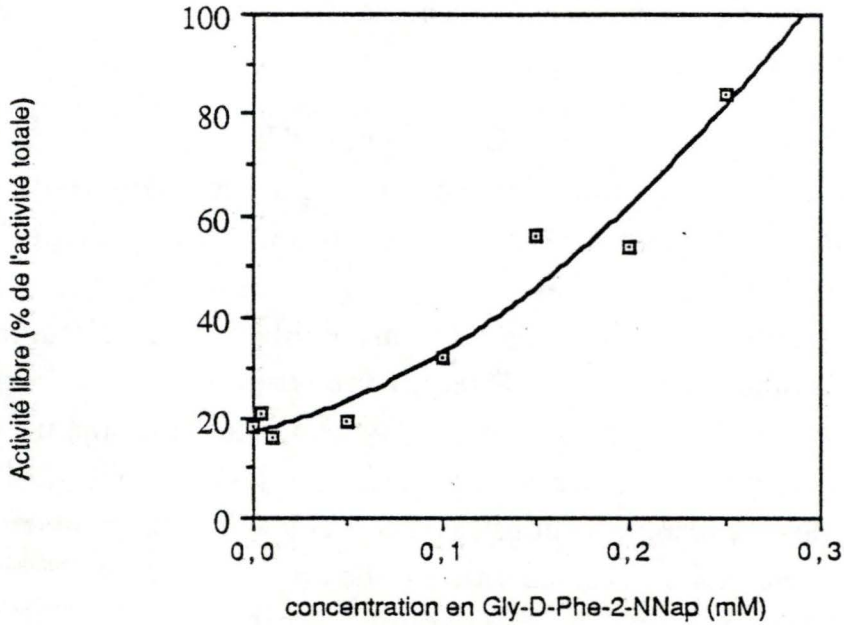


Fig. 13

Une fraction ML est incubée 20 Min à 37°C en présence de différentes concentrations de Gly-D-Phe-2-NNap, de tampon Tris 1 mM pH 7,5 et de saccharose 0,25 M. Après incubation, un échantillon est alors prélevé sur lequel nous réalisons une mesure des activités libre et totale de la phosphatase acide.

Fig 14 : Effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur la latence de la Phosphatase acide en fonction du pH

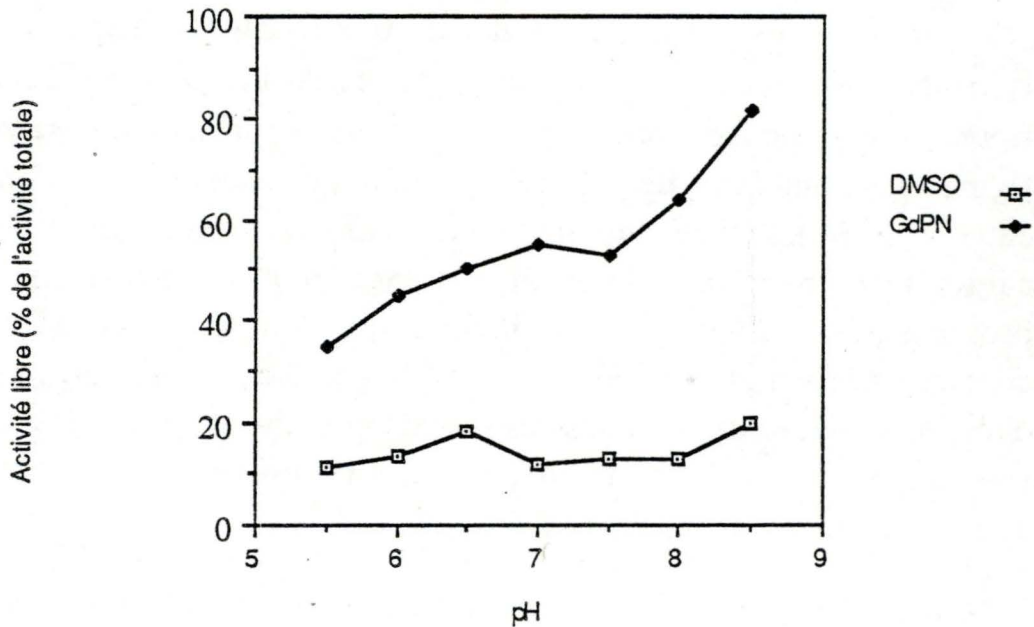


Fig. 14

Une fraction ML est incubée 20 Min à 37°C en présence ● ou en absence □ de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM, de tampon Tris/acétate 2 mM aux différents pH choisis et de saccharose 0,25 M. Après incubation, un échantillon est prélevé sur lequel nous réalisons une mesure des activités libre et totale de la phosphatase acide.

1.4.2. Influence de la concentration

Nous avons testé dans l'expérience décrite à la Fig.13, l'effet que peuvent avoir des concentrations croissantes de Gly-D-Phe-2-NNap sur les lysosomes. Nous avons travaillé avec une fraction ML incubée 20 minutes à 37°C et à pH 7,5. L'activité libre de la phosphatase acide est exprimée dans cette figure en pour-cent de l'activité totale.

Nous constatons que la perte de latence de la phosphatase acide provoquée par la Gly-D-Phe-2-NNap est d'autant plus forte que la concentration de cette molécule est élevée.

1.4.3. Influence du pH

Nous avons incubé une fraction mitochondriale pendant 20 minutes à 37°C en présence de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM et de tampon acétate/ tris permettant de couvrir une gamme de pH allant de 5,5 à 8,5.

Dans la Fig.14, nous avons utilisé la phosphatase acide pour évaluer l'intégrité des lysosomes et l'activité libre de cette enzyme y est exprimée en pour-cent de l'activité totale correspondante. Ces résultats montrent que la perte de latence de la phosphatase acide provoquée par la Gly-D-Phe-2-NNap est un phénomène fortement dépendant du pH. Cette expérience nous montre d'autre part que les lysosomes incubés en absence de Gly-D-Phe-2-NNap restent intacts lors d'une incubation de 20 minutes dans cette gamme de pH.

Il est vraisemblable que l'effet observé du pH passe par une accélération de la vitesse de diffusion de la Gly-D-Phe-2-NNap en augmentant le gradient de concentration de la forme non protonée donc plus diffusible de la molécule (voir point 3.3 de l'introduction).

1.4.4. Effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur l'activité libre de différentes enzymes du lysosome

Il était intéressant de savoir si la perte de latence provoquée par la Gly-D-Phe-2-NNap concernait plusieurs hydrolases lysosomales.

Fig 15 : Effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur la latence de la cathepsine C en fonction du temps

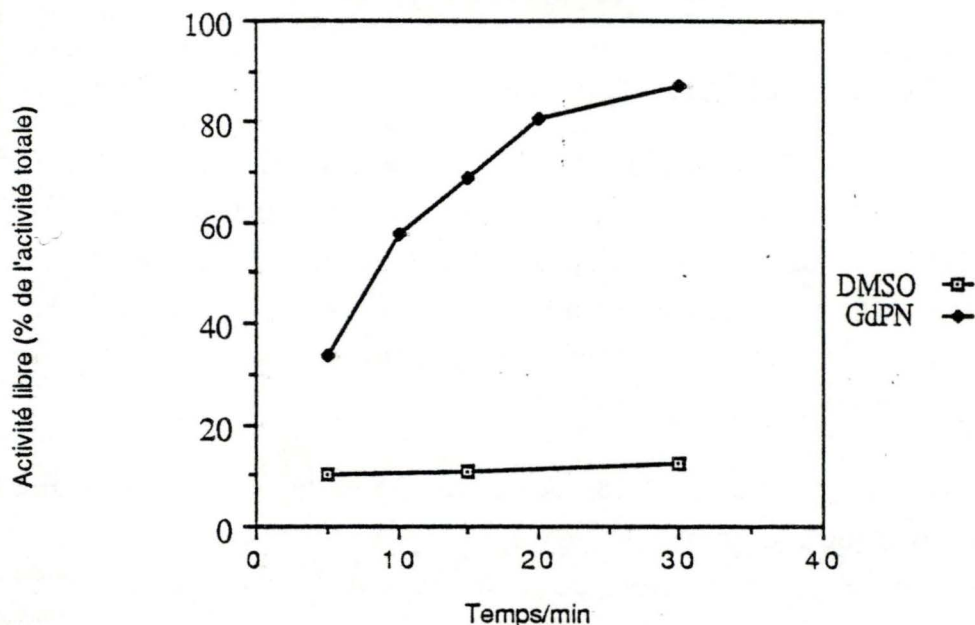


Fig. 15

Une fraction ML est incubée pendant des temps croissants à 37°C en présence ● ou en absence □ de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM, de tampon Tris 1 mM pH 7,5 et de saccharose 0,25 M. Après incubation, un échantillon est prélevé sur lequel nous réalisons une mesure des activités libre et totale de la cathepsine C.

Fig 16 : Effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur la latence de la N-acétylglucosaminidase

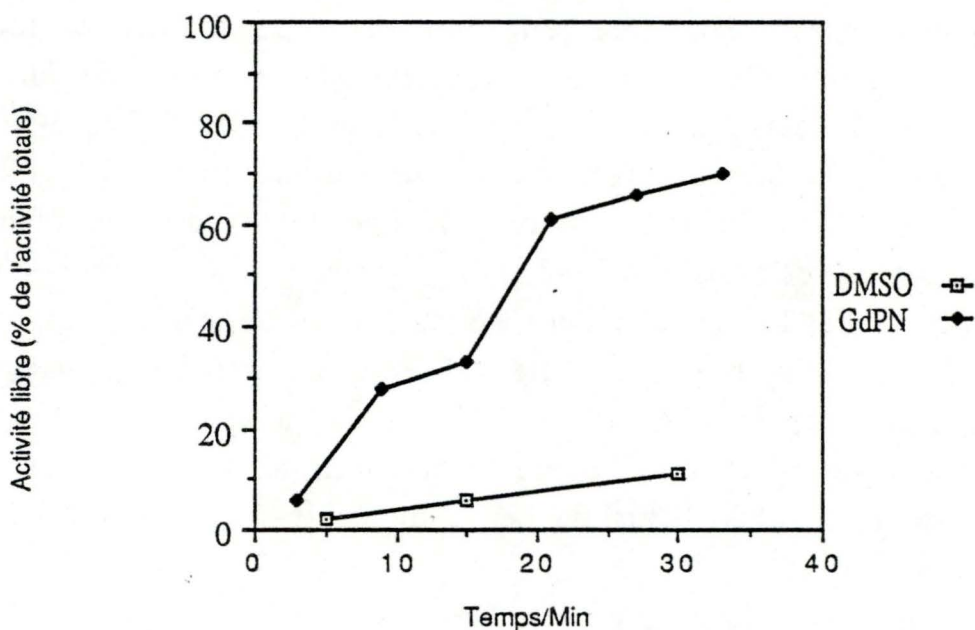


Fig. 16

Une fraction ML est incubée pendant des temps croissants à 37°C en présence ● ou en absence □ de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM, de tampon Tris 1 mM pH 7,5, de saccharose 0,25 M. Après incubation, un échantillon est prélevé sur lequel nous réalisons la mesure des activités libre et totale de la N-acétylglucosaminidase.

Fig 17 : Effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur l'activité non sédimentale de la cathepsine C

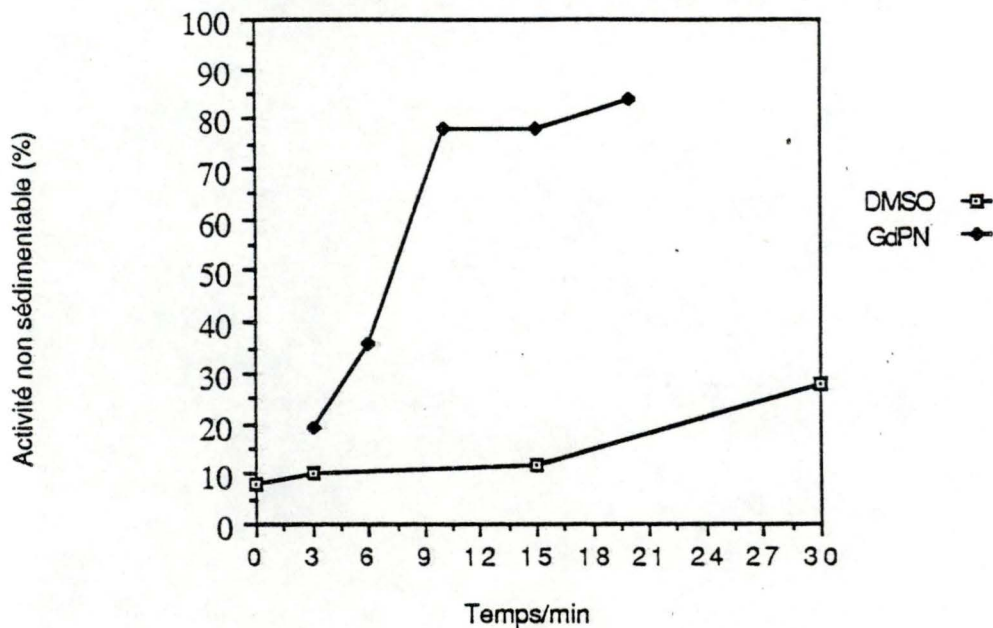


Fig. 17

Une fraction ML est incubée durant des temps croissants à 37°C en présence ● ou en absence □ de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM, de tampon Tris 1 mM pH 7,5 et de saccharose 0,25 M. L'activité non sédimentable de la cathepsine C est alors mesurée comme décrit dans la section matériel et méthodes (point 2.3). Elle est exprimée en % de l'activité totalement solubilisée (par incubation en présence de triton X-100 0,1%).

Dans l'expérience rapportée à la Fig.12 nous avons noté l'élévation de l'activité libre de la phosphatase acide sous l'effet de la Gly-D-Phe-2-NNap. Nous avons appliqué le même schéma expérimental en suivant cette fois la latence de la cathepsine C et de la N-acétylglucosaminidase (Fig.15 et 16). Manifestement, l'activité libre de ces deux hydrolases augmente de la même façon que celle de la phosphatase acide (Fig.12).

D'autres enzymes que la phosphatase acide sont donc concernées et perdent leur latence suite à l'action de la Gly-D-Phe-2-NNap.

1.4.5. Effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur l'activité non sédimentable de la cathepsine C

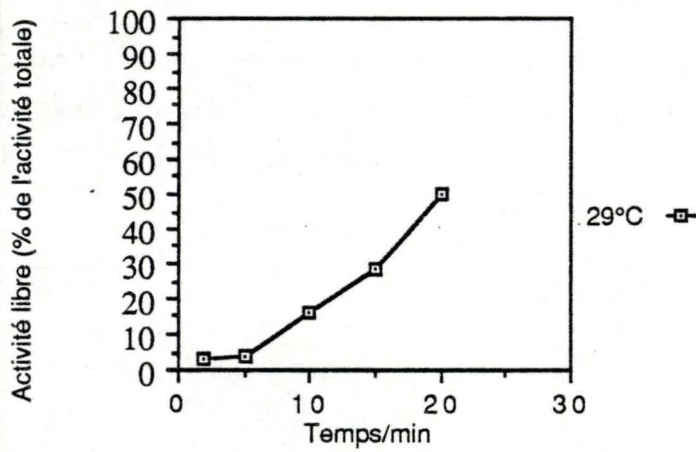
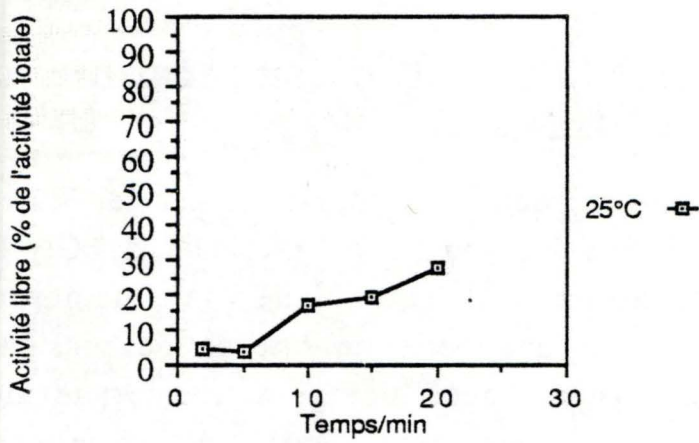
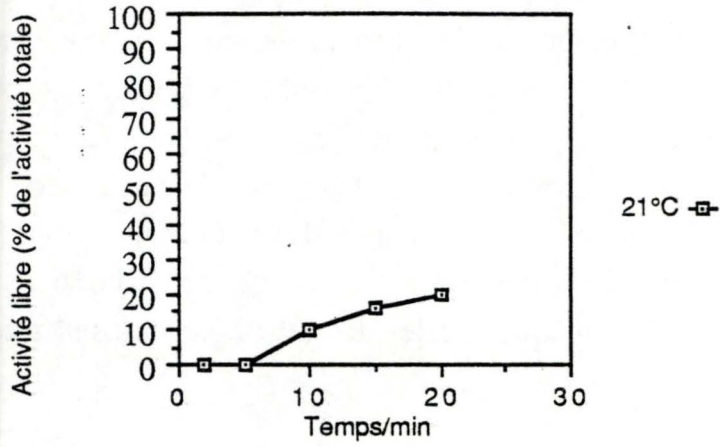
Comme nous l'avons vu dans les points 1.4.1 et 1.4.4, l'incubation d'une population lysosomale en présence de Gly-D-Phe-2-NNap conduit à une altération de la membrane lysosomale se traduisant par une perte de latence de plusieurs hydrolases. Pour voir jusqu'à quel point la membrane des lysosomes était "touchée", nous avons fait une expérience visant à montrer l'effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur l'activité non sédimentable de la cathepsine C .

Nous remarquons que cette activité augmente de la même façon que l'activité libre (Fig.17). Ceci nous montre que l'action de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les lysosomes se révèle être une véritable rupture de leur membrane.

1.4.6. Influence de la température

Comme nous l'avons déjà souligné, la perte de latence de la cathepsine C provoquée par la Gly-L-Phe-2-NNap est un phénomène nécessitant une énergie d'activation importante, attribuée à l'étape de diffusion de la naphtylamide à travers la membrane lysosomale. En supposant cette interprétation correcte, nous nous sommes dit que l'activation des lysosomes par la Gly-D-Phe-2-NNap pourrait être aussi un phénomène fortement dépendant de la température s'il nécessite la diffusion de cette molécule dans la membrane du lysosome. Nous avons donc testé l'influence de la température sur le

Figures 18: Influence de la température (21 à 37 °C)



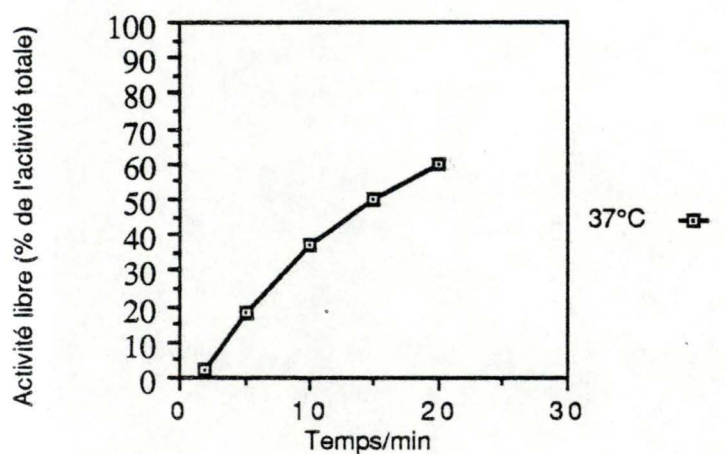
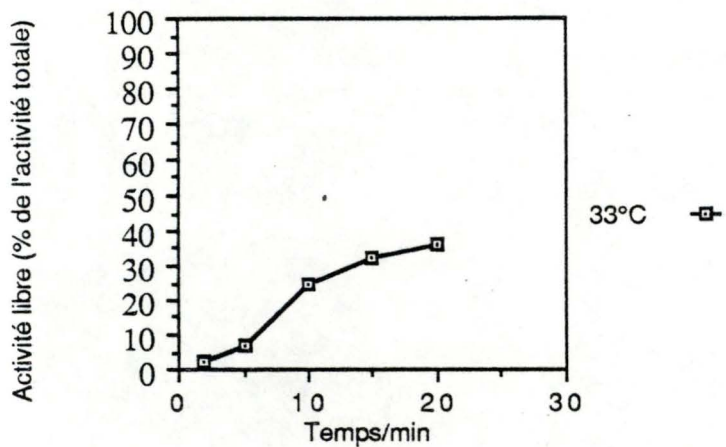


Fig. 18

Une fraction ML est incubée à différentes températures: 21°C, 25°C, 29°C, 33°C et 37°C pendant des temps croissants, en présence de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM, de tampon Tris 1 mM pH 7,5 et de saccharose 0,25 M. Après les temps d'incubation décrits, un échantillon est prélevé sur lequel une mesure des activités libre et totale de la cathepsine C est effectuée.

Fig 19 : Influence de la température

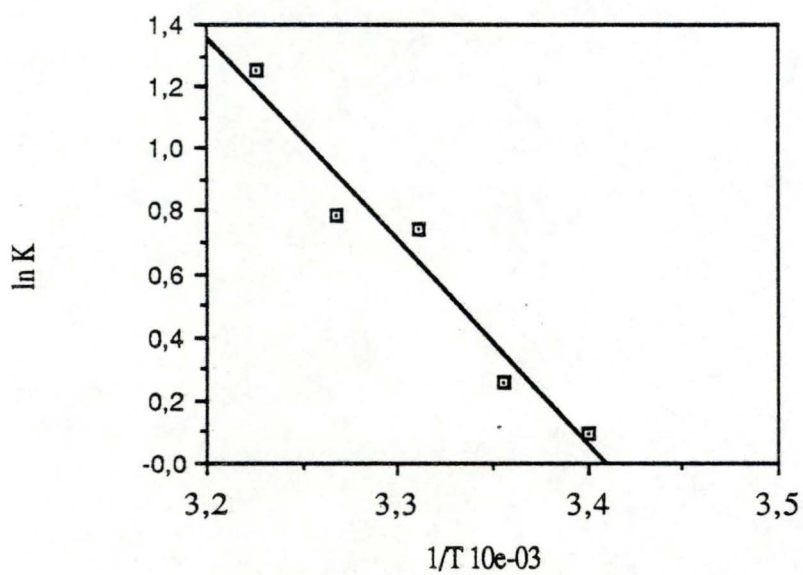


Fig. 19

Cette expérience est celle rapportée dans la figure 18. Nous avons porté le logarithme des pentes observées dans cette figure en fonction de l'inverse des températures absolues.

Fig 20 : Influence du milieu d'incubation sur l'activation de la phosphatase acide provoquée par la Gly-D-Phe-2-NNap

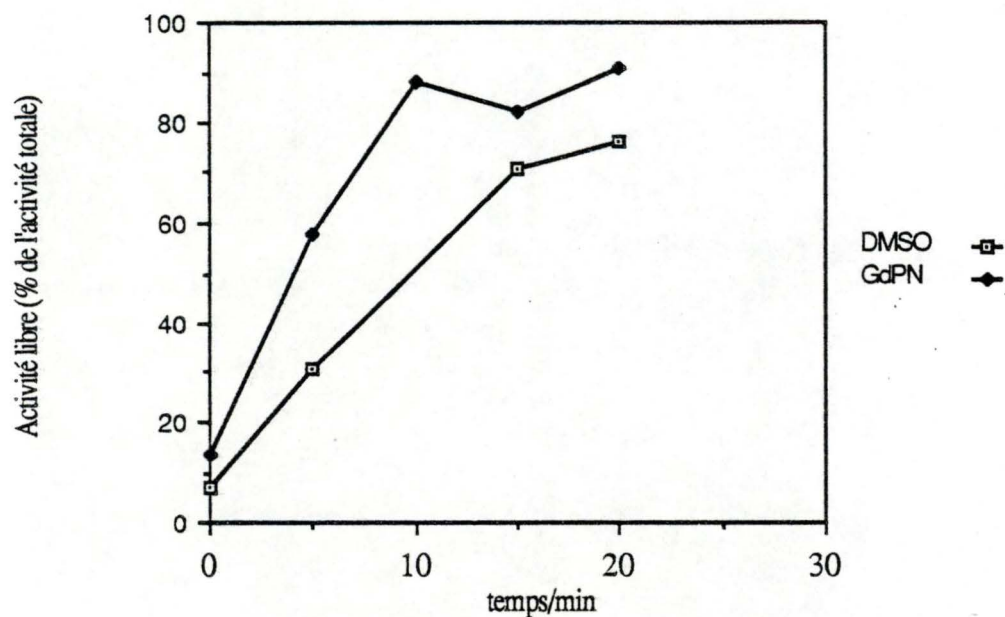


Fig. 20

Une fraction ML est incubée durant des temps croissants à 37°C en présence ● ou en absence □ de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM, de tampon Tris 5 mM pH 7,5 et de glucose 0,25 M. Un échantillon est ensuite prélevé sur lequel une mesure des activités libre et totale de la phosphatase acide est effectuée.

démasquage d'une hydrolase lysosomale provoqué par l'incubation de ces granules en présence de Gly-D-Phe-2-NNap. Dans la Fig.18, une fraction ML est incubée à différentes températures: 21°C, 25°C, 29°C, 33°C, 37°C pendant des temps croissants et en présence de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM à pH 7,5. A chaque température, l'activité libre de la cathepsine C est exprimée en pour-cent de l'activité totale correspondante. Les pentes des droites ainsi obtenues (représentant les constantes de vitesses du phénomène de démasquage de la phosphatase acide) sont mesurées.

Les logarithmes de ces constantes de vitesses sont représentés dans la Fig.19 en fonction de l'inverse des températures absolues. Les logarithmes des vitesses de démasquage varient linéairement en fonction de l'inverse des températures absolues. Le Q₁₀ du phénomène de démasquage est de 1,99, ce qui correspond à une énergie d'activation de 12,89 Kcal. Notons que cette expérience répétée en mesurant la latence de la phosphatase acide (résultats non montrés) nous a fourni une énergie d'activation fort semblable (15,88 Kcal).

1.4.7. Importance du milieu d'incubation

Nous avons voulu mettre en évidence l'importance de la nature du soluté assurant l'isotonicité sur l'activation des lysosomes provoquée par la Gly-D-Phe-2-NNap.

Lorsqu'une préparation de lysosomes est incubée à 25°C dans un milieu contenant du glucose 0,25 M, on peut observer un démasquage des enzymes des lysosomes dû à la pénétration progressive du glucose dans ces organites. Dans un premier temps (Fig.20), nous avons incubé une fraction ML pendant des temps croissants dans un milieu contenant du glucose 0,25 M, du tampon acétate pH 7,5 à 25°C et nous avons comparé les courbes obtenues en absence et en présence de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM.

La courbe témoin nous montre l'activation progressive des lysosomes provoquée par la pénétration du glucose. La présence de Gly-D-Phe-2-NNap conduit à une accélération de ce phénomène.

Fig 21 : Influence du milieu d'incubation sur l'activation de la phosphatase acide provoquée par la Gly-D-Phe-2-NNap

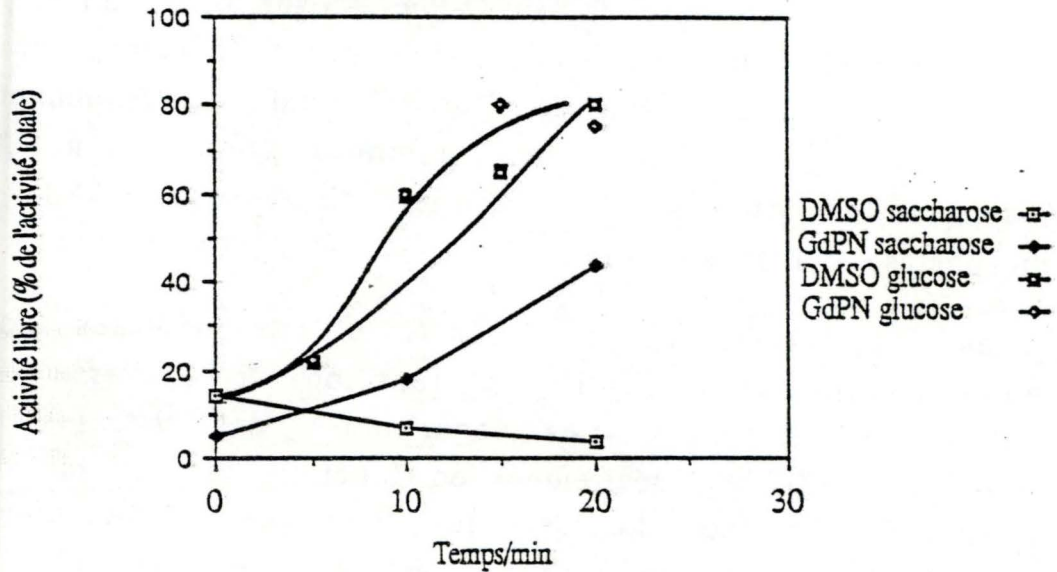


Fig. 21

Une fraction ML est incubée durant des temps croissants à 37°C en présence ● ou en absence □ de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM, de tampon Tris 5 mM pH 7,5 et de saccharose ou de glucose 0,25 M. Un échantillon est ensuite prélevé sur lequel une mesure des activités libre et totale de la phosphatase acide est effectuée.

Fig 22A : Influence de la quantité de granules sur l'activation de la phosphatase acide provoquée par la Gly-D-Phe-2-NNap

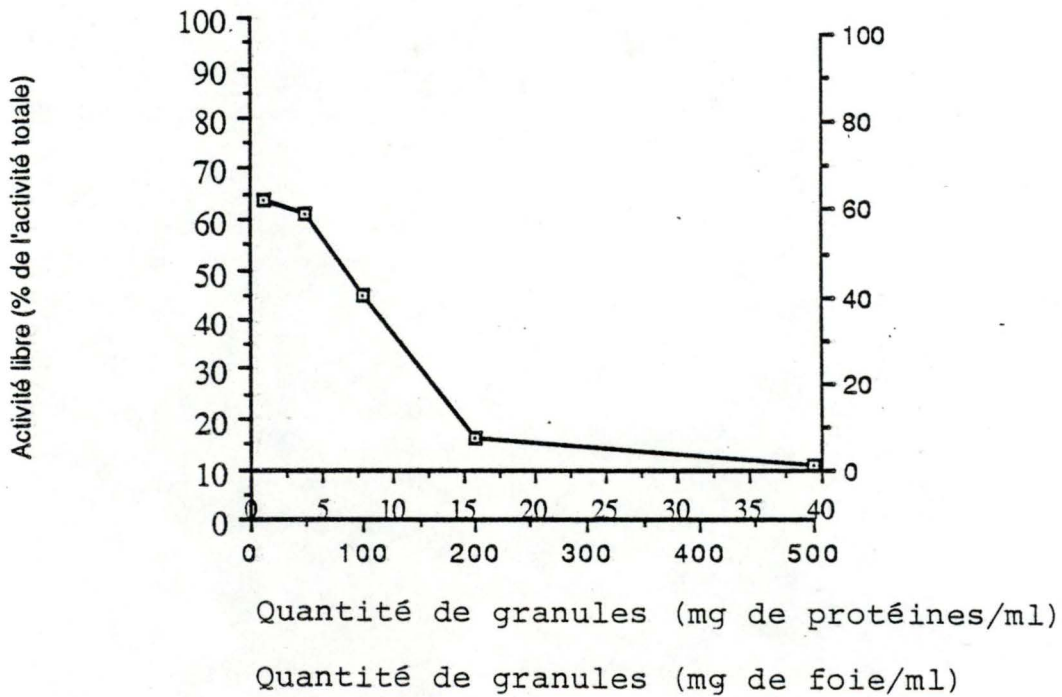


Fig. 22A

Des quantités croissantes de granules sont incubées 20 Min à 37°C en présence de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM, de tampon Tris 1 mM pH 7,5 et de saccharose 0,25 M. Après les 20 minutes d'incubation un échantillon est prélevé sur lequel une mesure des activités libre et totale de la phosphatase acide est effectuée.

Fig 22B

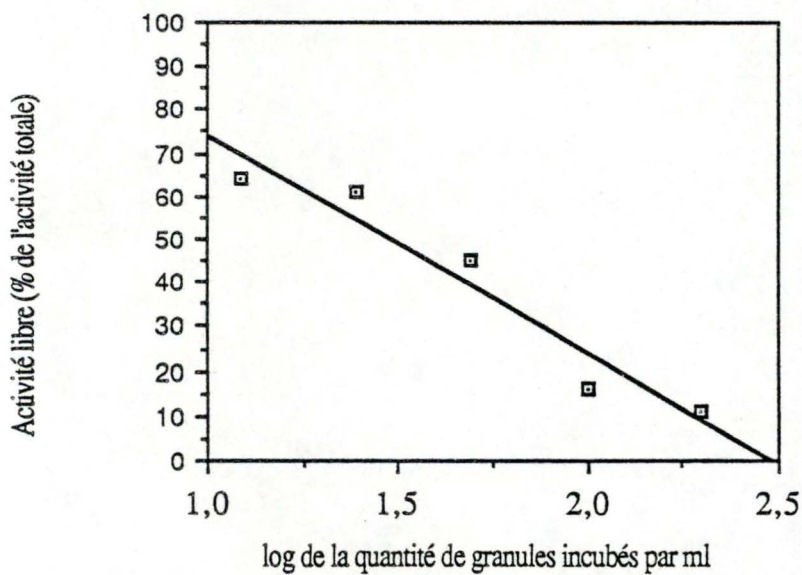


Fig 23A : Influence de la quantité de granules sur l'activation de la N-acétylglucosaminidase provoquée par la Gly-D-Phe-2-NNap

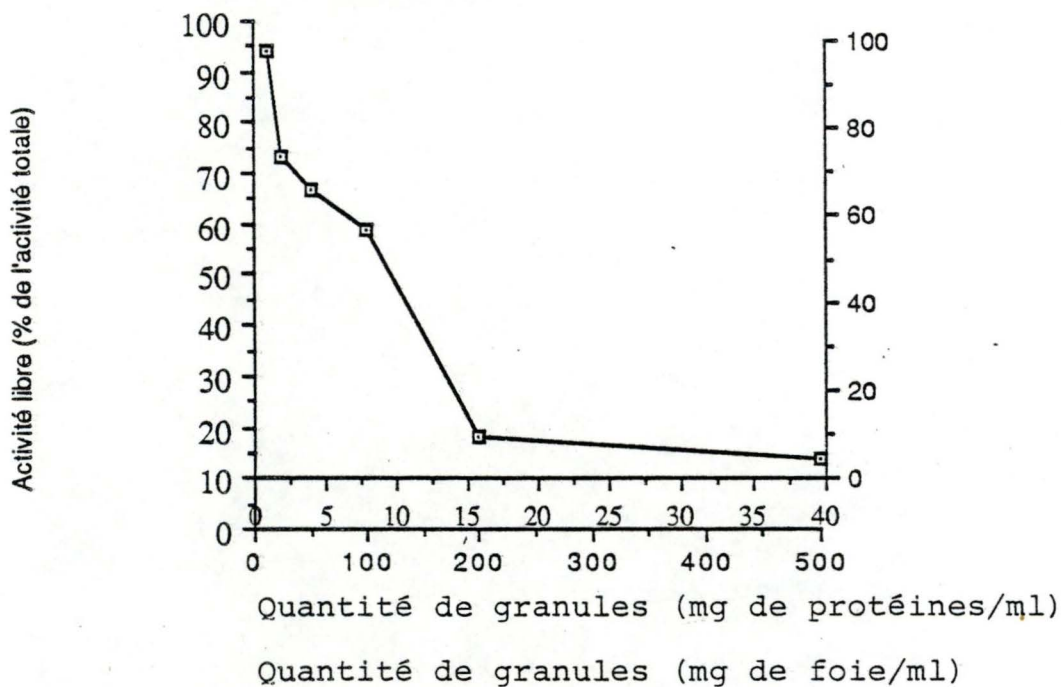
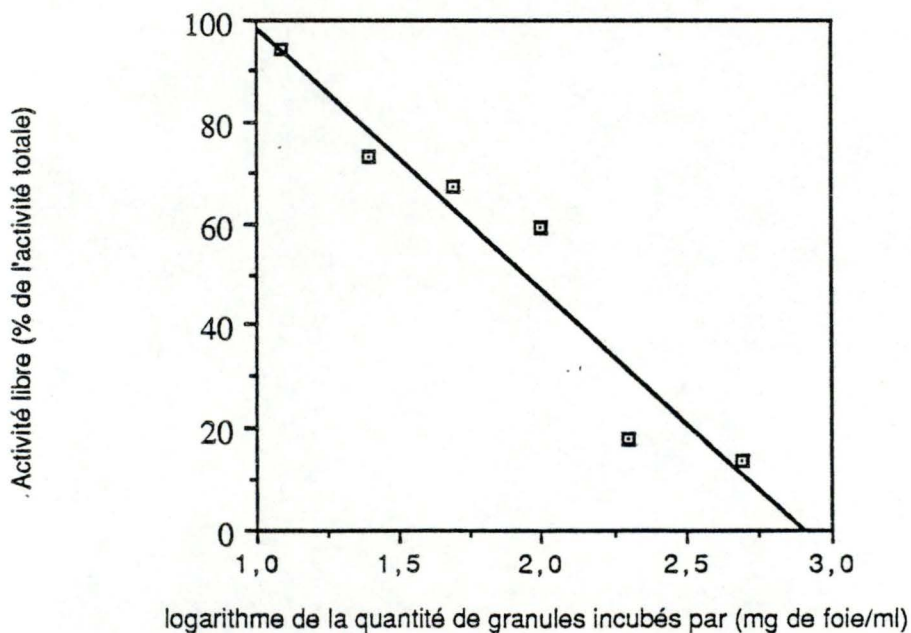


Fig. 23A

Des quantités croissantes de granules sont incubées 20 Min à 37°C en présence de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM, de tampon Tris 1 mM pH 7,5 et de saccharose 0,25 M. Après les 20 min d'incubation, un échantillon est prélevé sur lequel nous réalisons la mesure des activités libre et totale de la N-acétylglucosaminidase.

Fig 23B



Nous avons ensuite comparé dans une même expérience, l'effet de la Gly-D-Phe-2-NNap dans un milieu constitué de glucose 0,25 M ou de saccharose 0,25 M. Ces résultats sont rassemblés dans la Fig.21 où nous avons également repris les courbes témoins obtenues dans ces deux milieux.

Nous observons à nouveau que l'activation progressive des lysosomes due à la pénétration du glucose est accélérée en présence de Gly-D-Phe-2-NNap. De même, nous constatons la "non activation" des lysosomes en présence du saccharose seul. En ce qui concerne la courbe Gly-D-Phe-2-NNap dans le saccharose, nous retrouvons l'effet attendu, quoi qu'il peut être moins prononcé que dans la Fig.12 du fait de la température plus faible à laquelle nous avons travaillé.

1.4.8. Influence de la quantité de granules

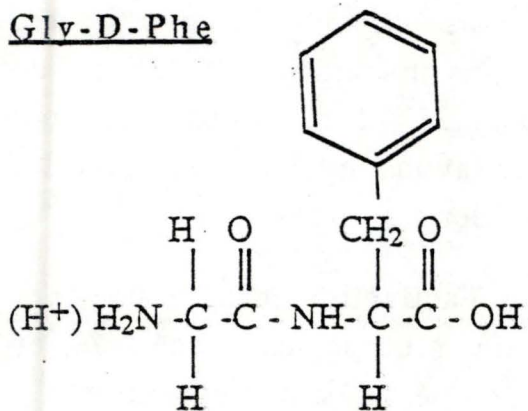
En vue de caractériser plus en détail l'effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les lysosomes, il était intéressant d'étudier l'influence de la quantité de granules présents dans le milieu d'incubation sur l'efficacité de la rupture provoquée par cette molécule.

L'expérience consiste à incuber des quantités croissantes de fraction ML avec de la Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM pendant 20 minutes à 37°C et à pH 7,5. L'activité libre de la phosphatase acide est mesurée et exprimée en pour-cent de l'activité totale dans la Fig.22A. cette figure fait apparaître clairement que plus la quantité de granules est importante moins la Gly-D-Phe-2-NNap a d'effets.

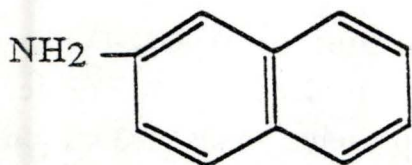
Cette expérience a été répétée en mesurant cette fois la latence de la N- acétylglucosaminidase, ce qui nous a fourni un résultat du même type (Fig.23A).

Si nous exprimons différemment l'abscisse de ces deux graphiques, en y mettant cette fois le logarithme de la quantité de granules incubés par ml (Fig.22B et 23B), nous pouvons noter que la décroissance de l'effet de la Gly-D-Phe-2-NNap est apparemment linéaire. Il semble d'ailleurs que l'on pourrait annuler cet effet en atteignant environ 600 mg de foie /ml.

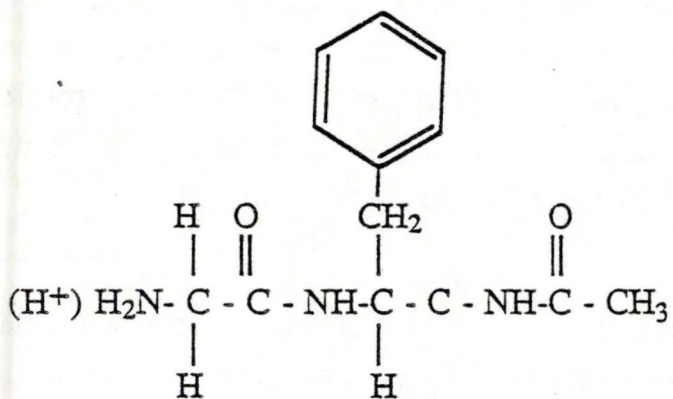
Gly-D-Phe



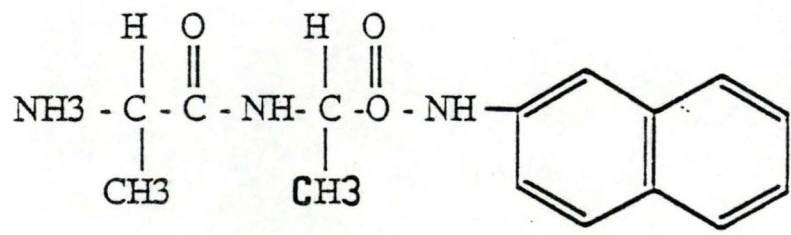
Naphtylamine



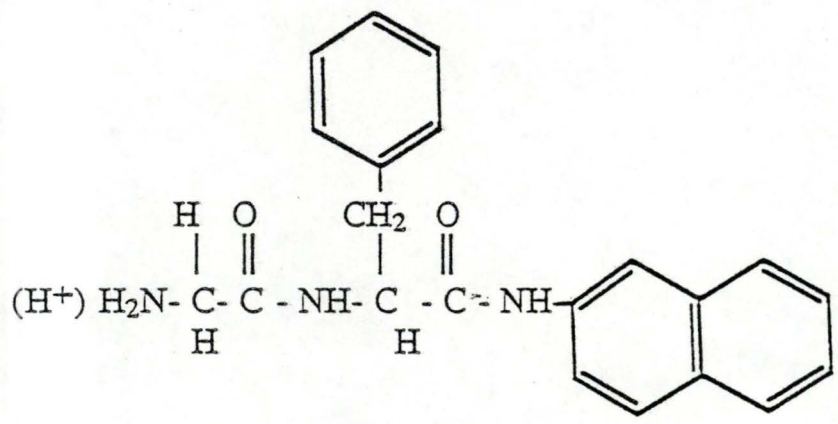
Gly-Phe-amide acetate



D-Ala-D-Ala-NNap



Gly-D-Phe-2-NNap



Gly-L-Pro-2-NNap

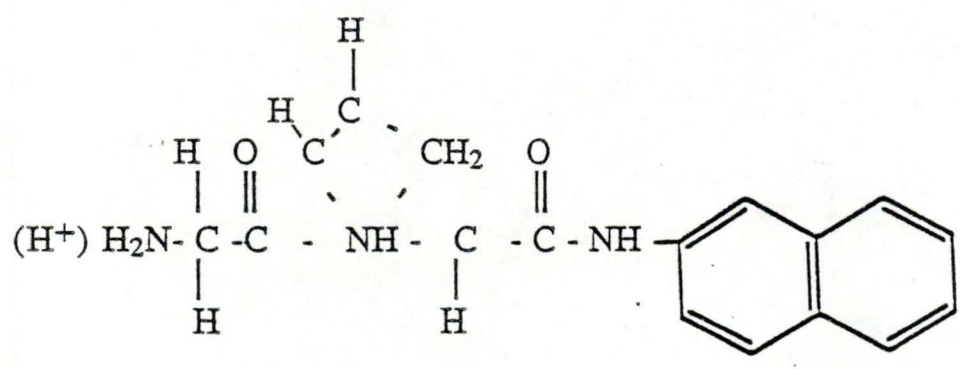


Fig 25: Effet comparatif de la Gly-D-Phe-2-NNap et d'autres dérivés sur la latence de la N-acétylglucosaminidase

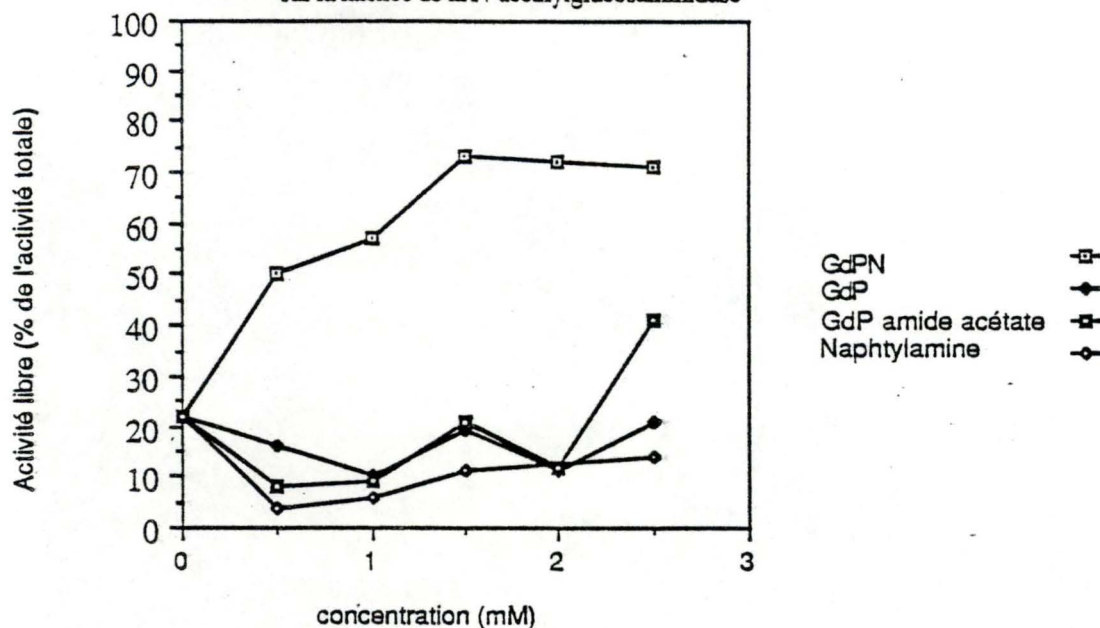


Fig. 25

Une fraction ML est incubée 30 Min à 37°C en présence de concentrations croissantes allant de 0 à 0,25 mM de Gly-D-Phe-2-NNap □, de Gly-D-Phe ◆, de Gly-D-Phe amide acétate ■ et de naphtylamine ◇, de tampon Tris 5 mM pH 7,5 et de saccharose 0,25 M. Après 30 min d'incubation un échantillon est alors prélevé sur lequel nous réalisons la mesure des activités libres et totales de la N-acétylglucosaminidase.

Fig 26 : Effet comparatif de la Gly-D-Phe-2-NNap et d'autres dérivés sur la latence de la N-acétylglucosaminidase

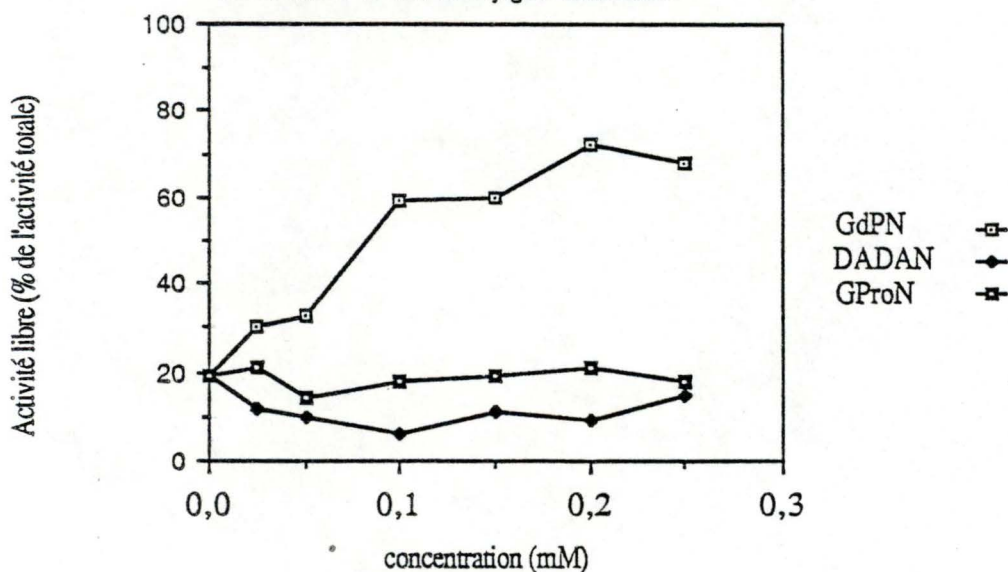


Fig. 26

Une fraction ML est incubée 30 Min à 37°C en présence de concentrations croissantes de Gly-D-Phe-2-NNap □, de Gly-L-Pro-2-NNap ■, de D-Ala-D-Ala-2-NNap ◆, de tampon Tris 5 mM pH 7,5 et de saccharose 0,25 M. Un échantillon est ensuite prélevé sur lequel une mesure des activités libre et totale de la N-acétylglucosaminidase est effectuée.

Ce résultat intéressant montre l'extrême importance de la concentration des granules dans le milieu d'incubation. Il est probable que cet effet soit dû à la fixation voire la "dissolution" de la Gly-D-Phe-2-NNap au hasard, dans la phase lipidique des organites de la ML. En effet, si l'on tient compte du fait que la ML est constituée principalement de mitochondries et que l'on suppose que l'effet de la Gly-D-Phe-2-NNap est permis par l'incorporation non spécifique de cette molécule dans la membrane lysosomale, il est un fait qu'en augmentant la quantité de ML dans le test, on "déplacera" une partie importante de la Gly-D-Phe-2-NNap vers les mitochondries et protégera ainsi les lysosomes de l'effet de cette molécule.

1.4.9. Effet comparatif de la Gly-D-Phe-2-NNap et de molécules apparentées

Cette partie de notre travail avait pour but de comparer l'effet sur les lysosomes, de divers composés ayant certaines caractéristiques en commun avec la Gly-D-Phe-2-NNap, en espérant mettre en évidence une certaine exigence de structure pour qu'une molécule puisse rompre les lysosomes. A cette fin, nous avons utilisé en plus de la Gly-D-Phe-2-NNap, de la Gly-D-Phe, la naphtylamine seule et la Gly-D-Phe amide acétate ainsi que de la Gly-L-Pro-2-NNap et de la D-Ala-D-Ala-2-NNap, deux dérivés naphtylamides résistant comme la Gly-D-Phe-2-NNap à l'action de la cathepsine C. (Fig.24)

Les granules ont été incubés 30 minutes à 37°C avec des concentrations croissantes des différents composés précités à pH 7,5, ces concentrations allant de 0 à 0,25 mM. L'activité libre de la N-acétylglucosaminidase est alors mesurée et exprimée en pour-cent de l'activité totale (Fig.25 et 26)

La mesure de la latence de la N-acétylglucosaminidase nous permet de constater que parmi les molécules testées seule la Gly-D-Phe-2-NNap a la capacité de rompre les lysosomes.

L'absence d'effet de la Gly-D-Phe et de la Gly-D-Phe amide acétate montre que la présence du résidu naphtylamine est primordiale pour permettre l'effet lytique de la Gly-D-Phe-2-NNap. Toutefois, la naphtylamine seule est inefficace. Il

Fig 27 : Effet du Zn^{++} sur l'activation des lysosomes provoquée par la Gly-D-Phe-2-NNap

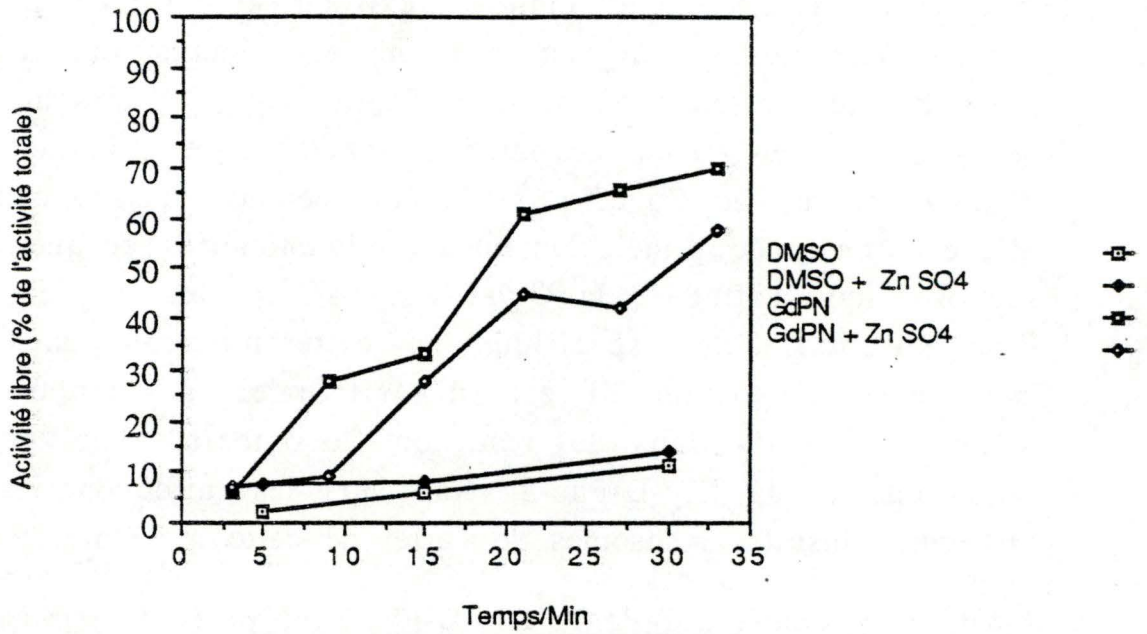


Fig. 27

Une fraction ML est incubée en présence (■,◇) ou en absence (□,◆) de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM, avec ◇ et ◆ ou sans □ et ■ $ZnSO_4$ 0,1mM, de tampon Tris 5 mM pH 7,5 et de saccharose 0,25 M. Un échantillon est alors prélevé sur lequel une mesure des activités libres et totales de la N-acétylglucosaminidase est effectuée.

apparaît donc que la structure d'un dérivé actif doit être du type dipeptidyl-naphtylamide. Néanmoins, la Gly-L-Pro-2-NNap et de la D-Ala-D-Ala-NNap, deux dérivés dipeptidyl-naphtylamides ayant en commun avec la Gly-D-Phe-2-NNap de ne pas être hydrolysable par les lysosomes sont sans effet sur la latence de la N-acétylglucosaminidase.

1.4.10. Effet du zinc sur l'activation des lysosomes provoquée par la Gly-D-Phe-2-NNap

Plusieurs études ont montrés que le zinc est capable de stabiliser les membranes biologiques. (Chvapil, 1973). Cette stabilisation concerne notamment la membrane lysosomale et peut être induite *in vivo* (Ludwig et Chvapil, 1980) en fournissant à des rats une diète riche en zinc.

Il a été démontré d'autre part que le zinc peut agir *in vitro* sur une préparation lysosomale et protéger ces granules, notamment contre l'action d'agents tensioactifs. (Pfeiffer et Cho, 1980) et contre l'effet d'une incubation à pH 5 et 37°C. (Chvapil *et al.*, 1972). Nous avons décidé de tester l'effet éventuel du zinc sur l'activation des lysosomes provoquée par la Gly-D-Phe-2-NNap.

Une expérience a donc été réalisée où nous avons incubé la fraction ML à 37°C pendant 30 minutes en présence de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM avec ou sans ZnSO₄ 0,1 mM à pH 7,5 (Fig 27). Elle nous permet de constater que la présence de ZnSO₄ 0,1 mM dans le milieu d'incubation de la fraction ML réduit l'action de la Gly-D-Phe-2-NNap. L'activité libre de la N-acétylglucosaminidase exprimée en pour-cent de l'activité totale, nous montre en effet que la perte de latence de cette enzyme due à la présence de la Gly-D-Phe-2-NNap est retardée lorsque le milieu contient du zinc.

1.4.11. Influence du pH intralysosomal.

On peut imaginer parmi les mécanismes hypothétiques d'action de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les lysosomes, que cette molécule n'exerce pas son effet directement sur la membrane (par l'extérieur) mais qu'elle doit au contraire d'abord se retrouver dans le milieu intralysosomal. Il était dès lors

Fig. 28 Influence de la chloroquine sur l'activation de la cathepsine C due à la Gly-D-Phe-2-NNap

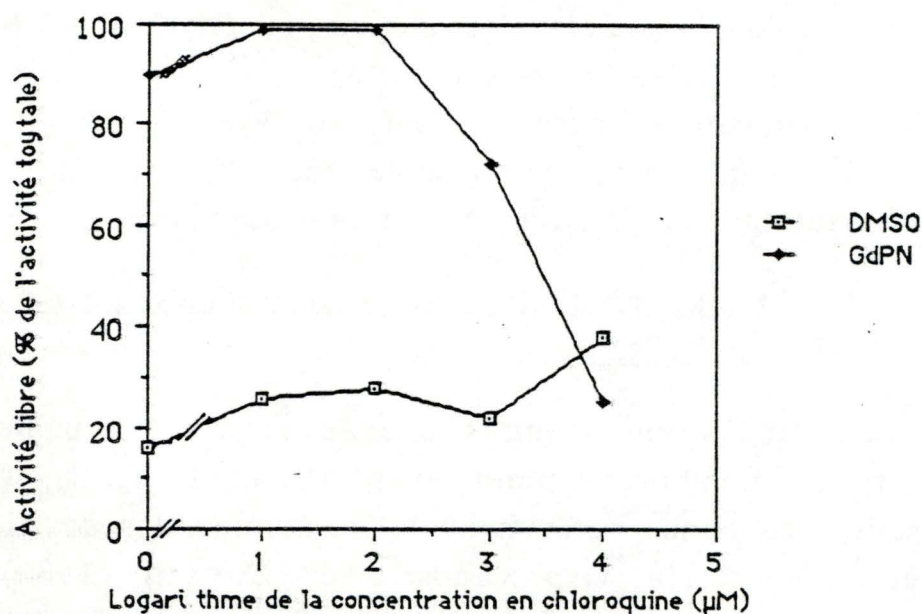


Fig. 29 Influence de la chloroquine sur l'activation de la N-acétylglucosaminidase due à la Gly-D-Phe-2-NNap

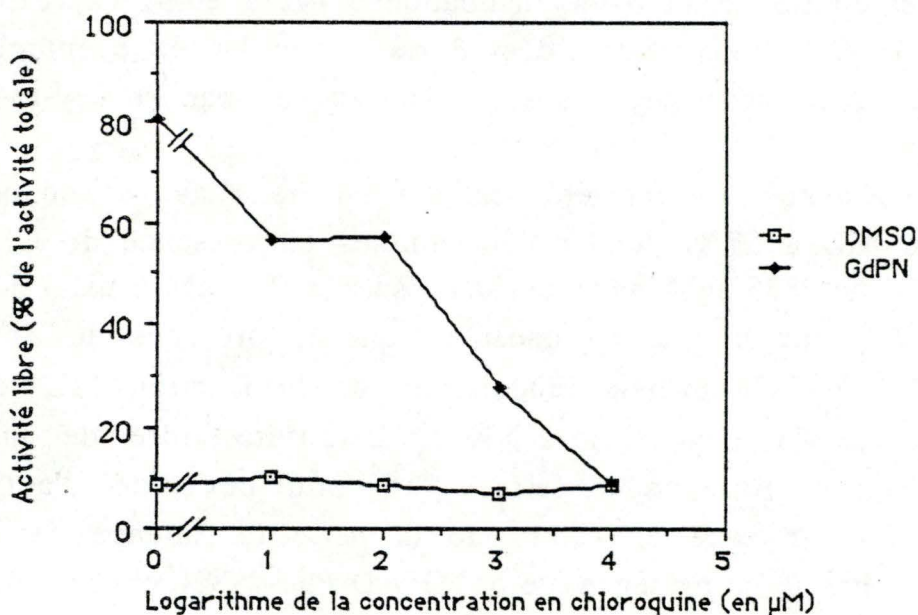


Fig. 28 et 29

Une fraction ML est préincubée 10 Min à 37°C en présence de concentrations croissantes de chloroquine allant de 0 mM à 10 mM. Cette même fraction est alors incubée en présence de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM, de tampon Tris 5 mM pH 7,5 et de saccharose 0,25 M pendant 20 min. à 37°C. Un échantillon est alors prélevé sur lequel nous réalisons une mesure des activités libre et totale de la cathepsine C (Fig. 28) et de la N-acétylglucosaminidase (Fig 29).

intéressant de tester l'effet éventuel d'une modification d'un paramètre intralysosomal comme le pH sur la rupture des lysosomes due à la Gly-D-Phe-2-NNap.

Une façon de modifier le pH intralysosomal consiste à incuber les granules en présence d'une base faible. Ce type de molécule est capable de s'accumuler dans les lysosomes par le mécanisme de perméation (de Duve *et al*; 1974) que nous avons décrit dans le point 3.3 de l'introduction. L'accumulation de la base faible dans les lysosomes est capable de provoquer une forte élévation du pH intralysosomal.

La chloroquine est une base faible lysosomotrope couramment utilisée pour perturber le pH intralysosomal (de Duve, *et al*, 1974; Goldman, 1976). Nous avons donc préincubé une fraction ML pendant 10 minutes à 37°C en présence de concentrations croissantes de chloroquine (0 à 10 mM). Au terme de cette préincubation, les granules ont été incubé 20 minutes à 37°C en présence ou en absence de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM à pH 7,5. Nous avons alors mesuré les activités libre et totale de la cathepsine C . Les résultats de cette expérience sont décrit dans la figure 28 et nous permettent de voir d'abord que la chloroquine par elle même n'a pas d'effet sur l'intégrité des lysosomes. Par contre, il est très intéressant de constater qu'il est possible de réduire nettement l'effet de la Gly-D-Phe-2-NNap en préincubant les granules en présence d'une concentration suffisante de chloroquine.

Nous avons répété cette expérience en utilisant le même protocole mais en mesurant cette fois la latence d'une autre hydrolase lysosomale: la N-acétylglucosaminidase. Ces résultats décrits dans la Fig.29 nous permettent de tirer les mêmes conclusions.

Nous avons voulu essayer de réaliser le même genre d'expérience en modifiant le pH intralysosomal d'une façon différente. Il est décrit dans la littérature (Goldman, 1976) que la perméabilité de la membrane lysosomale aux cations est loin d'être nulle à basse température et qu'il est possible de provoquer un échange $K^+ \rightleftharpoons H^+$ en incubant une préparation de lysosomes à 4°C en présence de KCl. Nous avons utilisé cette

Fig. 30 Influence du KCl sur l'activation de la N-acétylglucosaminidase due à la Gly-D-Phe-2-NNap

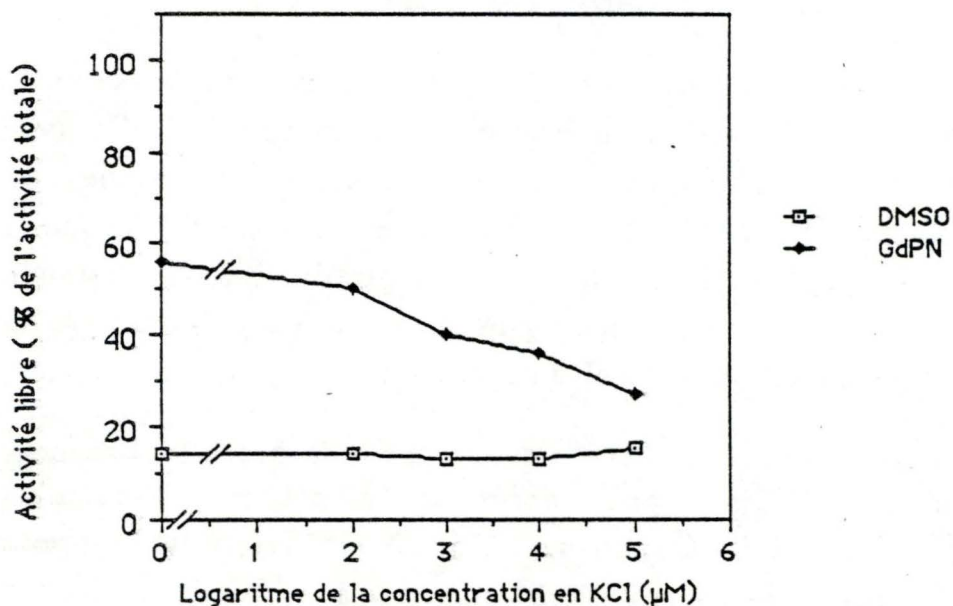


Fig. 30

Une fraction ML est préincubée 10 Min à 4°C en présence de concentrations croissantes de KCl (de 0 mM à 100 mM). Cette fraction est alors incubée 20 min en présence de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM, de tampon Tris 5 mM pH 7,5 et de saccharose 0,25 M. Un échantillon est alors prélevé sur lequel nous réalisons une mesure des activités libre et totale de la N-acétylglucosaminidase.

méthode dans l'expérience décrite à la Fig.30 où nous avons préincubé une fraction ML pendant 10 minutes à 4°C en présence de KCl de 0 à 100 mM. Nous avons ensuite testé l'effet de la Gly-D-Phe-2-NNap en mesurant la latence de la N-acétylglucosaminidase. Il est clair que la préincubation des granules provoque une diminution de la sensibilité des lysosomes à la Gly-D-Phe-2-NNap.

Les résultats des expériences visant à tester l'effet d'une modification du pH intralysosomal sur la sensibilité des lysosomes à la Gly-D-Phe-2-NNap vont donc dans le même sens en semblant indiquer que la naphtylamide n'aura d'effet sur les lysosomes que pour autant que leur intérieur soit suffisamment acide.

1.5. Discussion

L'ensemble de ces expériences visait à caractériser l'effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les lysosomes. Elles montrent que cette molécule est apte dans certaines conditions de pH, de températures et de concentration à provoquer une réelle rupture de la membrane des lysosomes. La réponse du phénomène aux variations de pH extralysosomal indique clairement que la molécule est plus active aux pH plus élevés. Cette observation s'accorde bien avec l'hypothèse d'un mécanisme d'action de la Gly-D-Phe-2-NNap par lequel cette molécule doit d'abord pénétrer dans le lysosome avant d'agir sur la membrane de celui-ci. En élevant le pH, on favorise en effet l'apparition de la forme non chargée de la molécule plus apte à diffuser dans la membrane des lysosomes.

Si l'effet du pH et de la concentration sont en faveur de ce genre de mécanisme comportant une étape de diffusion de la molécule à travers la membrane de l'organite, par contre, les résultats des expériences températures ne vont pas dans le sens prédit par cette hypothèse. L'énergie d'activation du démasquage des hydrolases lysosomales par la Gly-D-Phe-2-NNap est relativement réduite et contraste ainsi avec les valeurs habituellement élevées décrites pour la diffusion d'un non électrolyte à travers une membrane biologique.

Les résultats que nous avons obtenus en faisant varier le pH des lysosomes soutiennent également l'hypothèse d'une action intralysosomale de la naphtylamide. Toute alcalinisation des granules réduit nettement l'effet de la Gly-D-Phe-2-NNap.

Si cette molécule doit d'abord pénétrer dans les lysosomes avant d'induire la rupture de leur membrane, on peut toutefois encore envisager plusieurs modes d'action de la naphtylamide.

L'hypothèse la plus immédiate supposerait que le simple déséquilibre osmotique provoqué par l'accumulation de la Gly-D-Phe-2-NNap par perméation suffise à faire éclater les lysosomes. Cette hypothèse est toutefois peu probable, d'abord vu les concentrations de Gly-D-phe-2-NNap suffisantes pour induire l'éclatement ensuite parce que l'incubation d'une fraction ML en présence de chloroquine 0,25 mM, (une base faible s'accumulant fortement par perméation (de Duve et al, 1974)) dans les conditions utilisées avec la Gly-D-Phe-2-NNap (pH 7,5, 37°C, 30 min.) ne modifie pas la latence des hydrolases lysosomales (résultat non montré).

Une deuxième hypothèse suppose qu'une fois dans les lysosomes, la Gly-D-Phe-2-NNap induit dans la membrane de ces organites l'apparition de "pores" suffisants pour permettre l'entrée du saccharose, le soluté assurant l'équilibre osmotique dans le milieu d'incubation. Ce mécanisme aurait évidemment comme rapide conséquence de provoquer l'éclatement des lysosomes et la libération de tout leur contenu.

Enfin, une troisième hypothèse supposerait que la Gly-D-Phe-2-NNap après s'être accumulée dans les lysosomes par perméation agirait sur ces organites par une espèce "d'effet détergent" provoquant une réelle destruction de la structure membranaire. Dans cette hypothèse, l'alcalinisation du pH intralysosomal due à la préincubation de la ML en présence de chloroquine ou de KCl (Fig. 28, 29 et 30) agirait négativement sur la rupture de la membrane provoquée par la Gly-D-Phe-2-NNap de deux façons:

1. en réduisant l'accumulation par perméation de la Gly-D-Phe-2-NNap et,

2. en réduisant, dans les lysosomes, la proportion de molécules de Gly-D-Phe-2-NNap chargées, autrement dit plus amphiphiles donc vraisemblablement plus aptes à avoir un effet détergent.

Le zinc s'est avéré capable d'exercer une certaine protection contre l'action de la Gly-D-Phe-2-NNap. Le mécanisme par lequel le zinc exerce cette protection assez générale sur les membranes biologiques étant encore mal connu, cette observation ne nous éclaire malheureusement pas sur la façon dont la dipeptidylnaphtylamide exerce son effet lytique sur les lysosomes. Enfin, nos expériences visant à tester l'effet de divers composés, montrent que le dipeptide Gly-D-Phe et la naphtylamine seuls sont sans effet. La fixation du résidu naphtylamine fort hydrophobe sur le dipeptide doit fournir une molécule relativement lipophile et donc vraisemblablement capable de s'insérer dans la phase lipidique d'une membrane. Notons que cette hypothèse d'une "dissolution" de la Gly-D-Phe-2-NNap "au hasard" dans la membrane s'accorde bien avec les résultats montrant qu'en augmentant la quantité de ML dans le test, on réduit fortement l'effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les lysosomes.

2. Effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur différents organites

Le travail décrit jusqu'à présent concernait l'effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les lysosomes. Comme nous l'avons signalé dans le point 1.5, deux hypothèses concernant le mécanisme d'action de la Gly-D-Phe-2-NNap supposent un effet "direct" de la molécule sur la structure membranaire. Principalement dans le cadre de cette hypothèse, nous avons jugé intéressant d'étudier l'effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur d'autres types de membranes en testant la sensibilité à cette molécule des mitochondries, des peroxyosomes, des endosomes, du réticulum endoplasmique et de la membrane plasmique.

2.1. Les mitochondries

2.1.1. Caractère général

Le rôle principal de la mitochondrie est la production de l'énergie cellulaire. L'oxydation des acides gras y a lieu et la production de la plus grande partie de l'ATP. La plupart des cellules renferment plusieurs mitochondries. Celles-ci sont entourées de deux membranes distinctes, la membrane externe et la membrane interne. La membrane externe renferme des porines, protéines qui rendent la membrane perméable aux molécules ayant un poids moléculaire aussi élevé que 10000 (Darnell *et al*, 1988). La membrane interne est beaucoup moins perméable. Le rapport protéines-lipides y est plus élevé que celui des autres membranes cellulaires. La membrane interne présente un grand nombre d'invaginations ou crêtes qui s'avancent dans la matrice remplie d'enzymes catalysant de nombreuses réactions.

2.1.2. Effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les mitochondries

Une fraction ML a été incubée en présence de Gly-D-Phe-2-NNap pendant des temps croissants à 37°C à pH 7,5. Nous avons testé l'effet éventuel de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les mitochondries en mesurant l'activité libre d'une enzyme mitochondriale ainsi que son activité totale obtenue par ajout de triton X-100. Nous avons d'abord pris comme référence la

Fig 31 : Influence de la Gly-D-Phe-2-NNap sur la latence de la sulfite cytochrome C réductase en fonction du temps

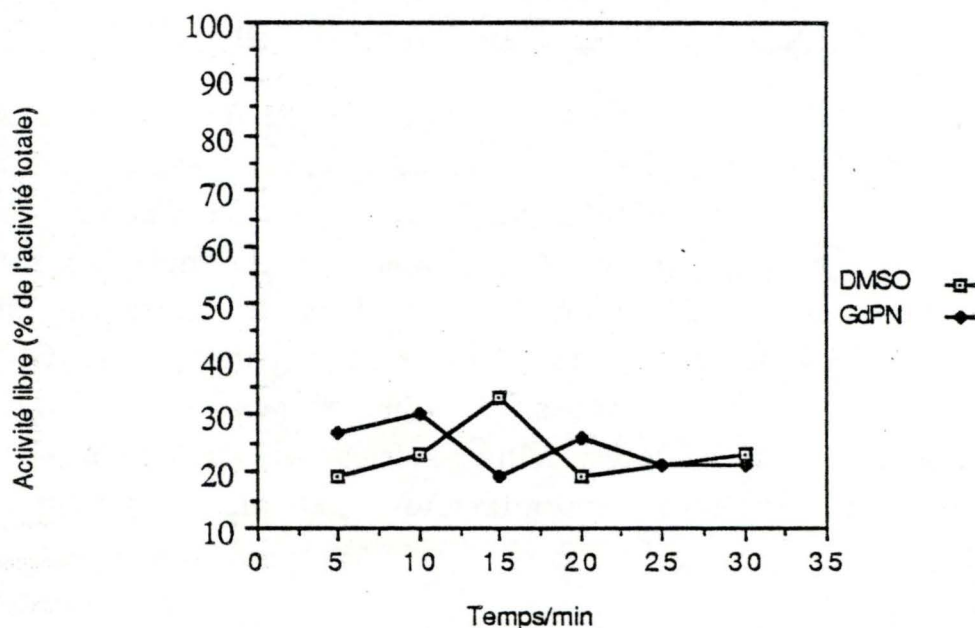


Fig. 31

Une fraction ML est incubée à 37°C pendant des temps croissants, en présence ● ou en absence □ de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM, de tampon Tris 5 mM pH 7,5 et de saccharose 0,25 M. Un échantillon est alors prélevé sur lequel nous effectuons une mesure des activités libre et totale de la sulfite cytochrome c réductase.

Fig 32: Influence de la Gly-D-Phe-2-NNap sur la latence de la malate déshydrogénase en fonction du temps

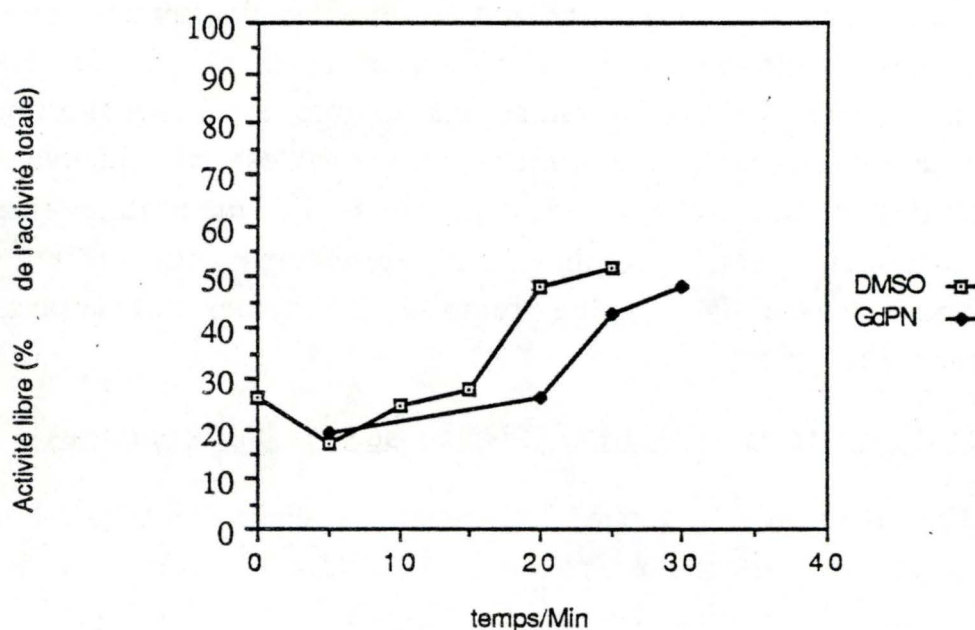


Fig. 32

Une fraction ML est incubée à 37°C durant des temps croissants en présence ● ou en absence □ de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM, de tampon Tris 5 mM pH 7,5 et de saccharose 0,25 M. Un échantillon est alors prélevé sur lequel nous réalisons une mesure des activités libre et totale de la malate déshydrogénase.

sulfite cytochrome c réductase, une enzyme qui se situe dans l'espace intermembranaire.

Comme la Fig.31 nous le montre, la Gly-D-Phe-2-NNap n'a apparemment aucun effet sur les mitochondries puisque la sulfite cytochrome c réductase ne subit aucune perte de latence. Les courbes obtenues en présence et en absence de Gly-D-Phe-2-NNap restent en effet similaires jusque la trentième minute d'incubation.

La même expérience a été réalisée en mesurant cette fois la malate déshydrogénase, une enzyme de la matrice mitochondriale. La Fig.32 montre à nouveau que la courbe témoin et la courbe Gly-D-Phe-2-NNap évoluent de la même manière. Ne modifiant pas la latence de cette enzyme plus que le DMSO, la Gly-D-Phe-2-NNap paraît donc incapable de provoquer une altération majeure de la structure de la membrane interne des mitochondries.

2.2. Les endosomes

2.2.1. Caractère général

Comme nous l'avons rappelé dans le point 2.3 de l'introduction, les endosomes sont des vésicules prélysosomales ayant pour rôle de transporter une molécule prélevée par la cellule par endocytose. Rappelons que l'endocytose peut prendre des formes différentes suivant la nature du matériel prélevé dans le milieu extérieur. Le FITC dextran que nous utiliserons dans cette partie du travail est par exemple décrit comme pénétrant la cellule par endocytose fluide (Tyčko *et al*, 1983).

On distingue parfois deux populations d'endosomes (selon Hélenius *et al*, 1983). Les endosomes périphériques ou primaires qui sont proches de la membrane plasmique et ingèrent rapidement le matériel endocyté; et les endosomes secondaires qui se situent près de l'appareil de Golgi, proches des lysosomes. Ils apparaissent plus sphériques et plus volumineux que les autres.

Fig 33 : Influence de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les endosomes

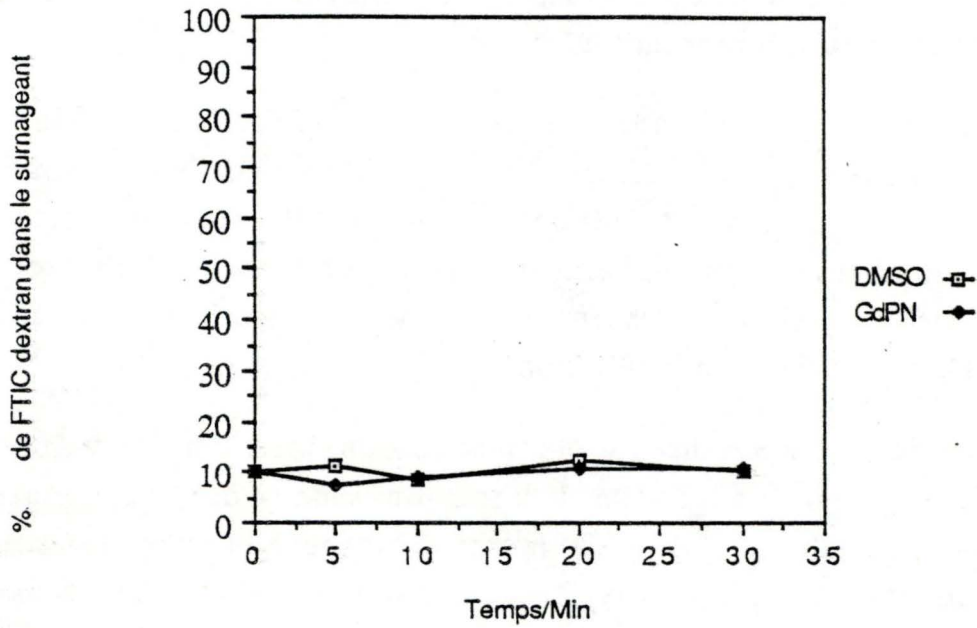


Fig. 33

La fraction P (voir texte) est incubée à 37°C durant des temps croissants en présence ● ou en absence □ de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM, de tampon Tris 5 mM pH 7,5 et de saccharose 0,25 M. Après les temps indiqués, les granules sont sédimentés (30 min à 40000 rpm). La fluorescence du FITC dextran est mesurée dans les surnageants et exprimée en % de la fluorescence mesurée dans un tube incubé en présence de triton X-100 0,1%

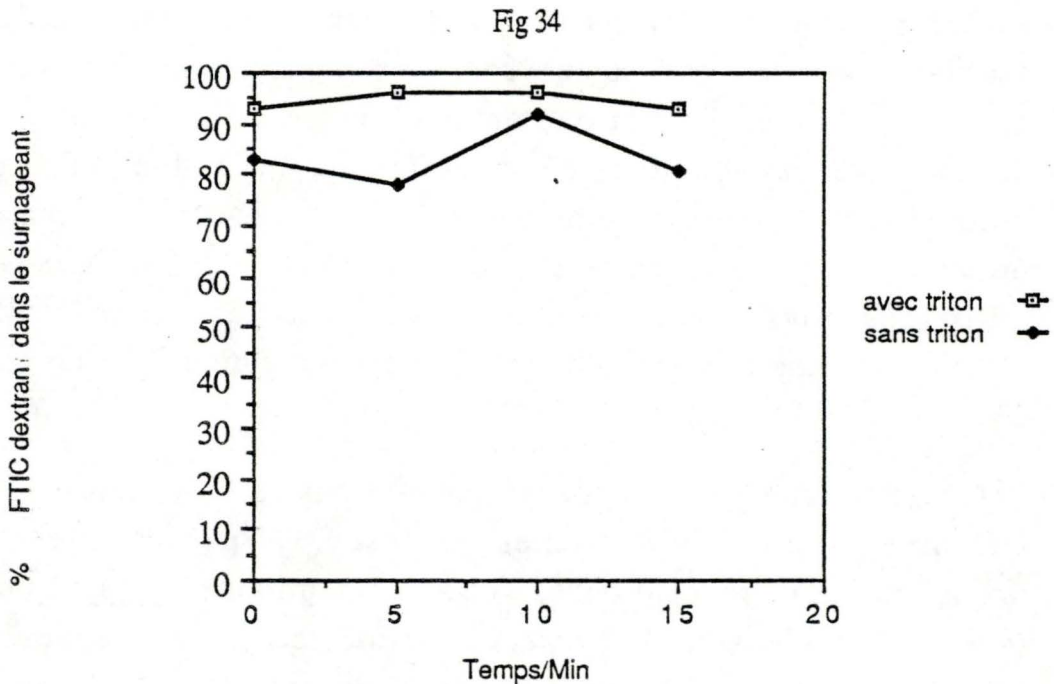


Fig. 34

Une fraction P "normale" est incubée pendant des temps croissants à 37°C en présence de de FITC dextran, de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM, de tampon Tris 5 mM pH 7,5 et de saccharose 0,25 M. Le pourcentage de FITC dextran non sédimentable est alors mesuré comme décrit à la figure 33.

2.2.2. Effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les endosomes

Pour mettre en évidence les endosomes ou plus exactement une population de vésicules prélysosomales intervenant dans le trajet intracellulaire d'une molécule endocytée, nous avons réalisé une injection intraveineuse de FITC dextran. Cette molécule est notamment captée par les cellules hépatiques et permet, si l'on sacrifie l'animal à un temps suffisamment court après l'injection, de repérer aisément, par une mesure en fluorescence, une population de vésicules prélysosomales impliquées dans le transport de ce marqueur endocyté (Tycño *et al.*, 1983). Ces vésicules prélysosomales se trouvant principalement parmi les microsomes, nous avons préparé une fraction P, 10 minutes après injection intraveineuse de 20 mg de FITC dextran par 100 g de poids corporel, en ayant pris soin de perfuser le foie de l'animal. Ayant soumis cette fraction P à l'action de la Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM à pH 7,5 pendant des temps croissants, nous avons estimé l'état des endosomes en mesurant la proportion de molécules fluorescentes rendues non sédimentables par ce traitement. Comme l'indique dans la Fig.33 l'aspect identique des courbes témoins et Gly-D-Phe-2-NNap, cette molécule paraît incapable de perturber l'intégrité des endosomes.

Il convenait toutefois d'être prudent et de considérer une deuxième interprétation. En effet, au vu de nos résultats, on ne peut pas exclure directement une autre possibilité, c'est-à-dire que la Gly-D-Phe-2-NNap provoquerait la rupture des endosomes mais que leur contenu en FITC dextran serait adsorbé secondairement sur les structures membranaires et donc rendu artificiellement sédimentable.

Nous avons testé cette hypothèse grâce à l'expérience décrite dans la Fig.34. En bref, nous avons mis en contact une fraction P préparée à partir d'un rat non injecté, avec du FITC dextran dans les conditions décrites dans la Fig.33.

Après centrifugation, nous pouvons observer en mesurant le pourcentage de fluorescence retrouvée dans le surnageant que

Fig 35 : Influence de la Gly-D-Phe-2-NNap sur la latence de la Catalase en fonction du temps

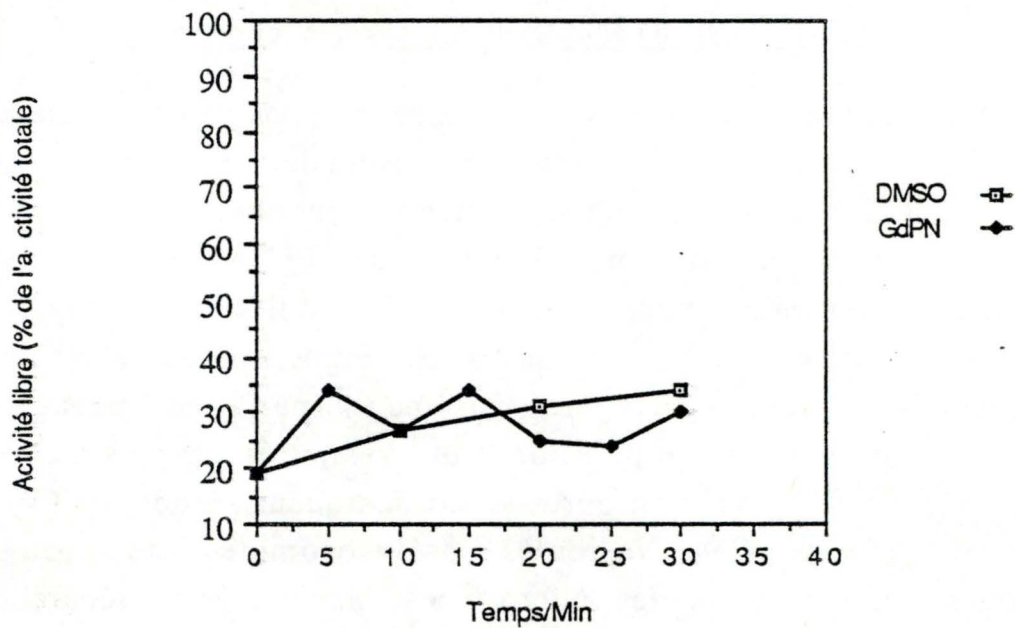


Fig. 35

Une fraction ML est incubée durant des temps croissants à 37°C en présence ● ou en absence □ de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM, de tampon Tris 5 mM pH 7,5 et de saccharose 0,25 M. Un échantillon est alors prélevé sur lequel nous réalisons une mesure des activités libre et totale de la catalase.

le FITC dextran ajouté aux granules est incapable de se fixer aux structures sédimentables.

2.3. Les peroxysomes

2.3.1. Caractère général

Les peroxysomes sont une classe de petits organites retrouvés dans le cytoplasme de toutes les cellules. Ces organites ont longtemps été confondus avec les lysosomes en raison de leurs morphologies voisines. Cependant, des études de fractionnement cellulaire ont établi que les enzymes des peroxysomes sont très différentes de celles des lysosomes (Darnell *et al*, 1988). Le rôle exact des peroxysomes dans le métabolisme cellulaire est quelque peu mystérieux; en effet des réactions de dégradations catalysées par des enzymes se produisent également dans d'autres organites, sans synthèse ni dégradation de H₂O₂. On a suggéré qu'une des fonctions des peroxysomes soit la production de chaleur plutôt que celle d'ATP, dans le catabolisme des molécules riches en énergie, comme les acides gras.

2.3.2. Effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les peroxysomes

De manière à tester l'effet éventuel de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les peroxysomes, nous avons eu recours à une mesure de latence de la catalase. Une fraction ML a donc été incubée durant des temps croissants à 37°C en présence de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM à pH 7,5. (Fig.35). Après les temps indiqués en abscisse, nous avons mesuré l'activité libre de la catalase ici exprimée en pour-cent de l'activité totale.

Nous constatons, tout comme nous l'avons remarqué pour les mitochondries et les endosomes que la Gly-D-Phe-2-NNap, à une concentration suffisante pour détruire tous les lysosomes (Fig.17) n'a apparemment pas d'influence sur les peroxysomes. Les courbes Gly-D-Phe-2-NNap et DMSO sont en effet similaires.

Fig 36 : Influence de la Gly-D-Phe-2-NNap sur la latence de la mannose-6-phosphatase en fonction du temps

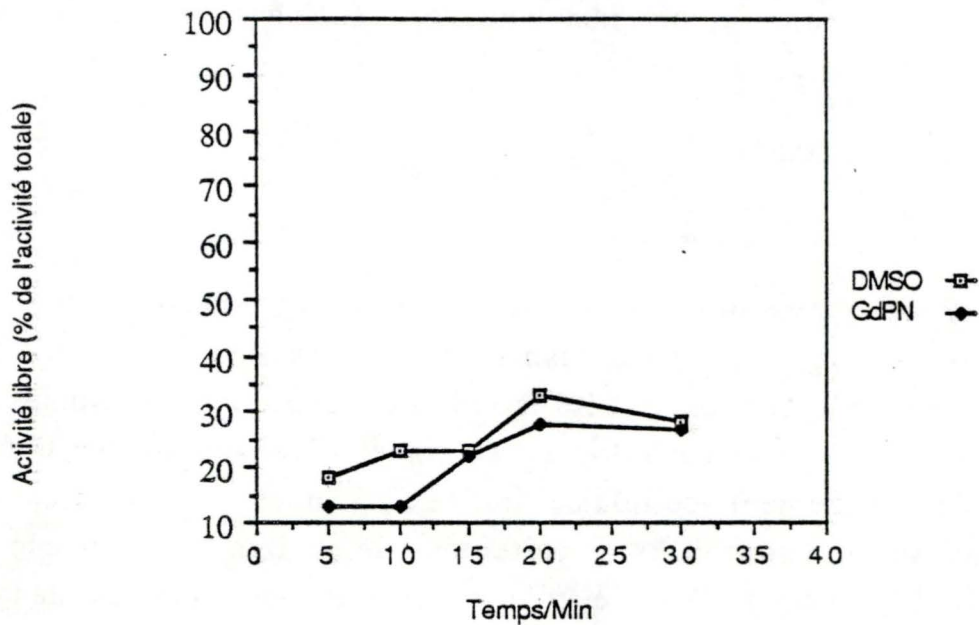


Fig. 36

Une fraction ML est incubée durant des temps croissants à 37°C en présence ● ou en absence □ de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM, de tampon Tris 5 mM pH 7,5 et de saccharose 0,25 M. Un échantillon est alors prélevé sur lequel nous réalisons une mesure des activités libre et totale de la mannose-6-phosphatase.

2.4. Le réticulum endoplasmique

2.4.1. Caractère général

Généralement la plus grande surface membranaire d'une cellule eucaryote est le réticulum endoplasmique (Darnell *et al*, 1988). Dans la cellule, le réticulum endoplasmique exerce un grand nombre de fonctions; les plus remarquables sont liées à la synthèse des lipides et des protéines membranaires. Le réticulum endoplasmique rugueux est garni de ribosomes alors que le réticulum endoplasmique lisse n'en porte pas. Le réticulum endoplasmique lisse est le site de synthèse et du métabolisme des acides gras et des phospholipides. La quantité de réticulum endoplasmique lisse varie selon les cellules. Il contient des enzymes qui modifient des substances toxiques, en les transformant en produits conjugués plus hydrosolubles qui peuvent être éliminés de l'organisme. Le réticulum endoplasmique rugueux porte des ribosomes qui participent à la synthèse de certaines protéines des membranes et des organites ainsi qu'à la synthèse de protéines éventuellement secrétées par la cellule.

2.4.2. Effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur le réticulum endoplasmique

Nous avons appliqué la même démarche que précédemment pour tester l'effet éventuel de la Gly-D-Phe-2-NNap sur le réticulum endoplasmique. La mesure de la latence de la mannose-6-phosphatase (Godelaine *et al*, 1983) nous permet de réaliser ce genre d'expérience. Nous avons donc incubé une fraction P à 37°C d'une part en présence de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25mM, d'autre part de DMSO 1%. Nous travaillons toujours à pH 7,5. Après des temps d'incubation croissants, l'activité libre de la mannose-6-phosphatase est déterminée et reprise dans la Fig.36 en pour-cent de l'activité totale. Nous constatons d'après cette figure que la Gly-D-Phe-2-NNap est incapable d'altérer la latence de ce marqueur du réticulum endoplasmique et semble donc à nouveau sans effet sur cette catégorie d'organite.

2.5. La membrane plasmique

Pour compléter ce rapide survol des types membranaires dont la structure pourrait être altérée par la Gly-D-Phe-2-NNap, nous nous sommes penchés sur le cas de la membrane plasmique. Pour aborder cet aspect de notre travail, nous avons choisi comme modèle de membrane plasmique la membrane des globules rouges. Nous nous sommes dit en effet qu'une action éventuelle de la Gly-D-Phe-2-NNap sur la membrane plasmique devrait se traduire par la rupture des globules rouges, autrement dit par une hémolyse.

2.5.1. Généralité sur les globules rouges

La membrane qui entoure le globule rouge des mammifères est la membrane plasmique la mieux caractérisée. L'érythrocyte n'a pas de noyau et ne contient aucune membrane intracellulaire. C'est essentiellement un sac d'hémoglobine ne renfermant que quelques autres espèces protéiques. Sa fonction est de transporter l'oxygène des poumons vers les tissus et le dioxyde de carbone vers les poumons. Les protéines de la membrane des érythrocytes semblent être distribuées plus ou moins uniformément dans le plan de la membrane, sans regroupement spécialisé important (Darnell *et al*, 1988).

L'analyse des protéines de la membrane de l'érythrocyte se fait de façon relativement directe. Les cellules sont placées dans l'eau distillée. Par osmose, elles gonflent et finalement les membranes plasmiques se rompent et libèrent l'hémoglobine et les autres protéines internes. La membrane de la cellule altérée conserve les dimensions et la forme globale de la cellule intacte. C'est pourquoi on l'appelle fantôme ou stroma.

2.5.2. Effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur la membrane plasmique

De manière à mettre en évidence un éventuel effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur la membrane plasmique des globules rouges, nous avons incubé ces cellules en nombre croissant en présence de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM à pH 7,5. Après 20

Fig 37 : Effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur la membrane des globules rouges

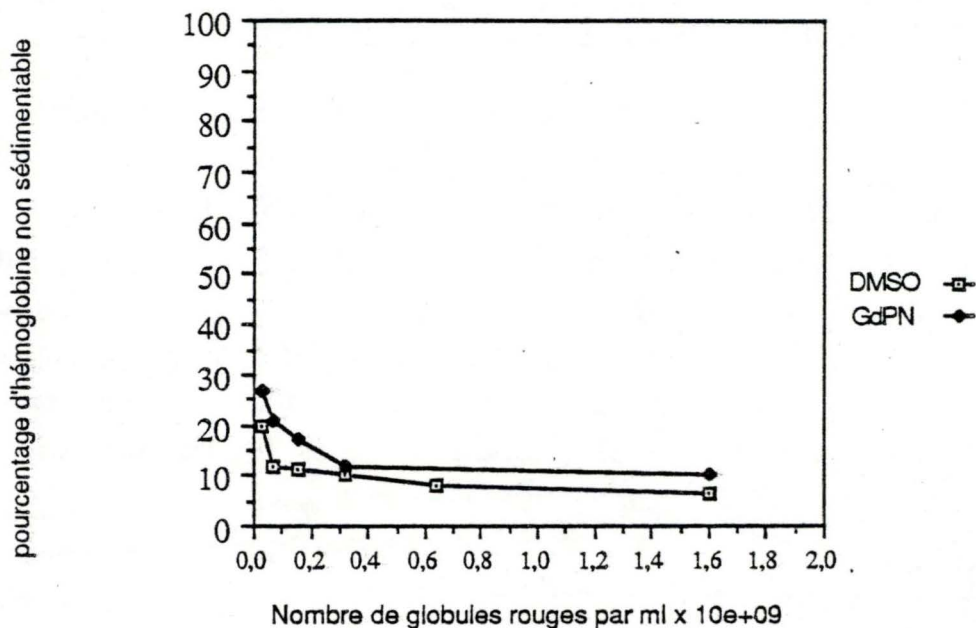


Fig. 37

Des quantités croissantes de globules rouges sont incubées dans l'HBS 20 Min à 37°C en présence ● ou en absence □ de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM. Après cette incubation les tubes sont centrifugés 10 min à 2000 rpm, l'hémoglobine non sédimentable est mesurée et exprimée en % de l'hémoglobine retrouvée dans le surnageant d'un tube incubé en présence de triton X-100 0,1 %. (Hémolyse totale).

Fig 38: Effet de concentration croissante de Gly-D-Phe-2-NNap sur la membrane des globules rouges

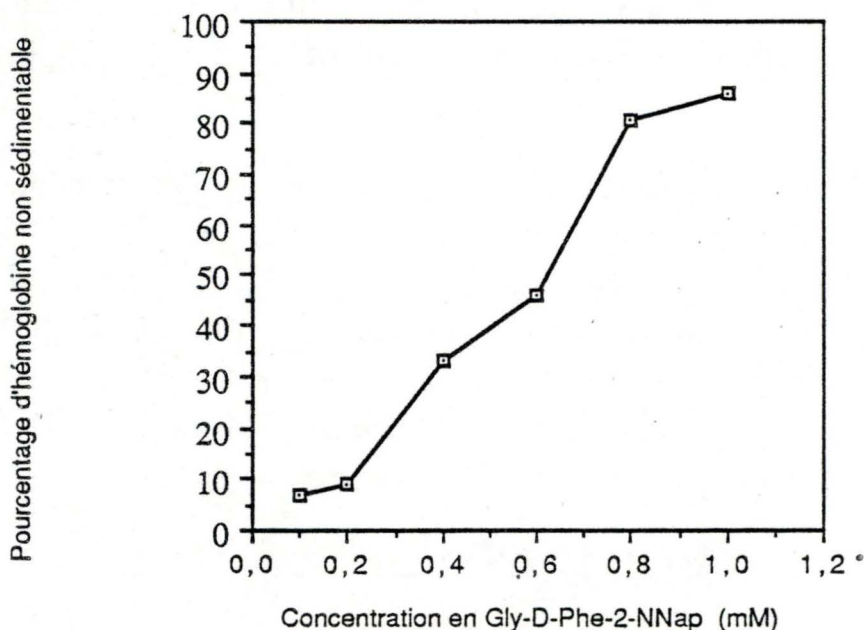


Fig. 38

Les globules rouges (10⁹/ml) sont incubés dans l'HBS 20 Min à 37°C en présence de concentrations croissantes de Gly-D-Phe-2-NNap. Après cette incubation, les tubes sont centrifugés 10 min à 2000 rpm, l'hémoglobine non sédimentable est mesurée et exprimée en % de l'hémoglobine retrouvée dans le surnageant d'un tube incubé en présence de triton X-100 0,1 %. (Hémolyse totale).

minutes d'incubation, les tests ont été centrifugés 10 minutes à 2000 tours par minutes et nous avons utilisé la méthode de l'hématine alcaline pour mesurer le pourcentage d'hémoglobine rendue non sédimentable.

Comme nous pouvons le constater à la Fig.37, s'il y a une altération des globules rouges lors d'une incubation en présence de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM, celle-ci est faible et pourrait diminuer plus le nombre d'érythrocytes augmente. Vu ce faible effet, il nous semblait intéressant d'essayer de voir si des concentrations plus importantes de Gly-D-Phe-2-NNap n'auraient pas un effet plus marqué. C'est ce à quoi nous nous sommes attachés dans l'expérience décrite à la Fig.38 en incubant les globules rouges 20 minutes en présence de concentrations de Gly-D-Phe-2-NNap allant de 0,1 à 1 mM, toujours à 37°C et pH 7,5. Nous avons alors mesuré le pourcentage d'hémoglobine non sédimentable comme décrit dans la Fig. 37.

Il est clair qu'à une concentration plus élevée que celle utilisée habituellement pour provoquer la rupture des lysosomes, la Gly-D-Phe-2-NNap devient apte à détruire les globules rouges et à en libérer l'hémoglobine dans le milieu.

Enfin, pour terminer cette série d'expériences concernant les globules rouges, nous avons voulu voir s'il était possible de mettre en évidence un effet de la quantité de matériel dans le test, sur l'efficacité de la rupture due à la Gly-D-Phe-2-NNap, comme nous l'observions dans le cas des lysosomes (Fig.22A). Nous avons donc décidé d'incuber des quantités décroissantes de globules rouges 30 minutes à pH 7,5 en présence de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM, une concentration qui a le double avantage premièrement d'être celle utilisée dans les expériences "lysosomes" et deuxièmement de nous mettre à l'abri des problèmes de solubilité de la naphtylamide, fréquents lorsqu'on dépasse cette concentration. Pour espérer observer un effet de la Gly-D-Phe-2-NNap, il était toutefois indispensable, vu les résultats obtenus dans la Fig.37 d'utiliser des quantités de globules rouges plus faibles et donc de sensibiliser la détection de l'hémoglobine non sédimentable. Nous avons donc eu recours lors de cette expérience décrite à

Fig 39 : Influence de la quantité de globules rouges sur la libération d'hémoglobine provoquée par la Gly-D-Phe-2-NNap

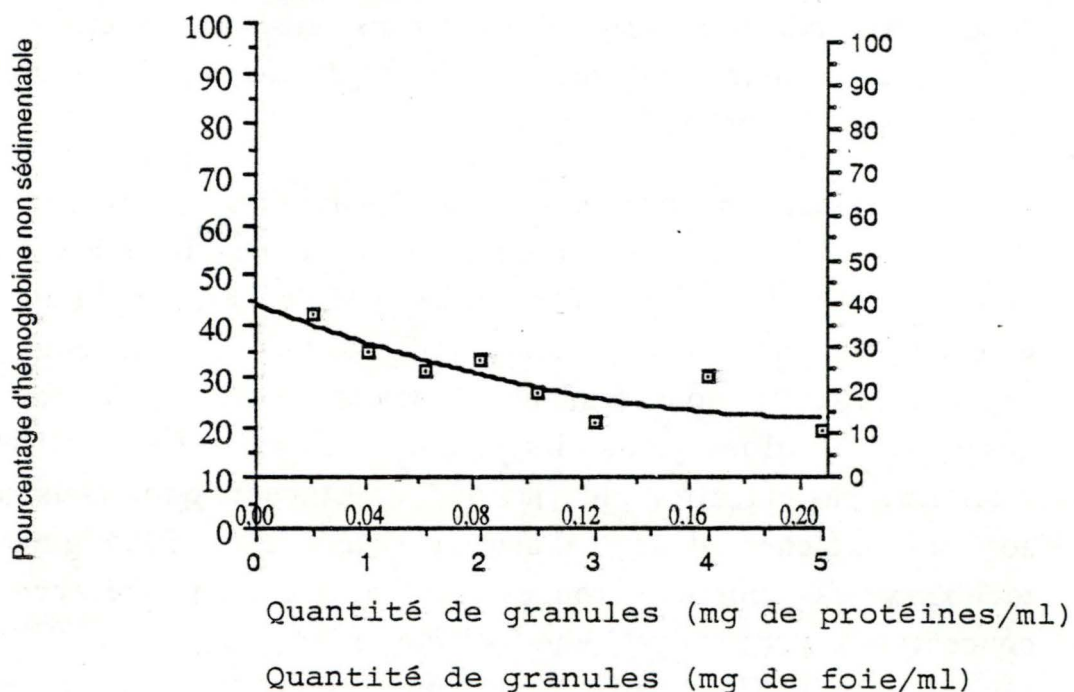


Fig. 39

Une quantité croissante de globules rouges est incubée 10 min à 37°C dans l'HBS en présence de Gly-D-Phe-2-NNap 0,25 mM. Après cette incubation, les tubes sont centrifugés 10 min à 2000 rpm, l'hémoglobine non sédimentable est mesurée et exprimée en % de l'hémoglobine retrouvée dans le surnageant d'un tube incubé en présence de triton X-100 0,1%. (Hémolyse totale).

la Fig.39 à une mesure spectrophotométrique (voir point 2.7 dans matériels et méthodes) de l'hémoglobine dans les surnageants.

Cette expérience (Fig.39) certes moins convaincante que celle décrite pour les lysosomes (Fig.22A), semble néanmoins indiquer que l'effet de la Gly-D-Phe-2-NNap est à nouveau plus prononcé lorsque le milieu d'incubation contient moins de matériel. On notera toutefois qu'il est important, pour comparer ces deux figures de se rendre compte de la différence d'abscisses. Lorsque les quantités de matériel sont cette fois exprimées en mg de protéines/mL, on peut se rendre compte qu'un pourcentage de rupture comparable est observable pour une quantité de protéines plus ou moins 100 fois moindre dans le cas des globules rouges.

2.6 Discussion

L'intérêt de laisser agir la Gly-D-Phe-2-NNap sur les différents types membranaires était double puisqu'en plus d'obtenir des renseignements intéressants sur la sensibilité de ces membranes, on pouvait espérer recueillir certaines informations concernant la procédure utilisée par la molécule pour exercer son effet lytique. Pour discuter ces résultats, nous pouvons nous baser sur les hypothèses auxquelles nous avons eu recours pour tenter d'expliquer l'effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les lysosomes (voir 1.5). Il faut toutefois noter une différence majeure: les particules testées ici ne sont plus des compartiments acides à l'exception peut être des endosomes. La nâphtylamide ne pourra donc plus s'accumuler par perméation et atteindre des concentrations plus élevées dans les particules que dans le milieu d'incubation.

Un de ces mécanismes évoquait une espèce d' "effet détergent" de la Gly-D-Phe-2-NNap. Si l'on veut expliquer nos résultats de cette façon nous sommes amenés à supposer qu'à l'exception peut être des globules rouges, les membranes testées ont une composition telle qu'elles sont relativement résistantes, en tout cas beaucoup plus que la membrane des lysosomes, à ce qui serait un agent tensioactif. Deux éléments supplémentaires pourraient toutefois intervenir dans cette résistance relative: 1)

le fait rappelé plus haut que la concentration de la naphtylamide au contact de la membrane ne sera jamais aussi élevé que dans le cas des lysosomes et 2) le fait que contrairement au cas des lysosomes, la molécule ne se retrouvera pas dans un milieu acide qui vraisemblablement lui conférerait par protonation des propriétés détergentes nettement plus marquées. Le seul problème dans ce raisonnement concerne les vésicules prélysosomales que nous avons testées. Elles ont en effet en commun avec les lysosomes leur pH acide (Galloway *et al*, 1983; Yamashiro *et al*, 1983) et devraient dès lors accumuler la dipeptidyl-naphtylamide et ce, sous sa forme principalement protonée. La résistance de cette catégorie de vésicules dans cette hypothèse, devrait donc s'expliquer par la composition différente de leur membrane par rapport aux lysosomes et/ou par leur pH qui tout en étant acide pourrait avoir une valeur sensiblement plus élevée que celle décrite dans les lysosomes.

En tentant de comprendre l'effet de la Gly-D-Phe-2-NNap sur les lysosomes, nous évoquons un autre mécanisme imaginable c'est-à-dire l'apparition de pores dans la membrane de l'organite, de taille telle que les solutés assurant l'équilibre osmotique pénètrent, ce qui mettrait en route le schéma classique de la lyse osmotique passant par une entrée massive d'eau et le gonflement de la particule. Si ce mécanisme est correct, il ne serait pas surprenant de constater que les particules n'étant pas "osmotiquement actives", comme les peroxyosomes, les vésicules de réticulum endoplasmique, les endosomes supportent l'incubation en présence de Gly-D-Phe-2-NNap. Par contre dans cette hypothèse, les résultats obtenus en testant la sensibilité des mitochondries sont à première vue plus surprenants. Ces organites sont en effet fortement affectés par un déséquilibre osmotique. Il faudrait dès lors comme nous l'avons fait précédemment, supposer que ce type de membrane est plus résistant à la "perforation" envisagée ci-dessus, ou que l'existence d'un pH acide dans la particule est une condition stricte pour que cette "perforation" puisse se mettre en place.

Les résultats obtenus dans le cas des globules rouges, modèle choisi pour explorer l'effet éventuel de la Gly-D-Phe-2-NNap sur la membrane plasmique nous ont fourni un exemple de

sensibilité qui n'est observable que lorsqu'on élève la concentration de la molécule au-delà de la limite que nous nous étions fixé (0,25 mM), ou que l'on diminue nettement la quantité de matériel soumise au test. Notons qu'au vu de ces résultats, on pourrait suspecter les granules non affectés par la Gly-D-Phe-2-NNap dans nos expériences, par exemple les peroxyosomes, d'y devenir sensibles si nous modifions l'un de ces deux paramètres. Ce genre d'expérience qui a été réalisée sur les peroxyosomes a montré que ces granules restent insensibles à la dipeptidyl-naphtylamide. La sensibilité de la membrane des globules rouges à la Gly-D-Phe-2-NNap n'est toutefois pas comparable à celle des lysosomes puisque nous devons placer dans le test une quantité plus ou moins 100 fois moindre (en mg de protéines) de globules rouges que de fraction mitochondriale pour obtenir un effet comparable. Il est raisonnable de penser que c'est à nouveau dans la différence d'acidité dans le "milieu interne" de ces deux types de particules ou éventuellement dans la différence de composition de la membrane, que se trouve l'explication de leur sensibilité variable.

IV Conclusion.

Comme nous l'avons rappelé dans l'introduction, on ne peut pas négliger l'intérêt d'une étude détaillée de divers mécanismes de cytotoxicité membranaire. Si ces mécanismes, du moins en théorie, peuvent être extrêmement variés, leurs applications concrètes restent relativement restreintes.

Des travaux récemment menés au laboratoire ont permis de montrer l'effet cytotoxique de la Gly-D-Phe-2-NNap sur des types cellulaires aussi différents que des fibroblastes, des cellules leucémiques humaines, des hépatocytes en survie, des polymorphonucléaires, des cellules d'hépatomes, des fibroblastes transformés, des trypanosomes, des cellules de rein (Véro) et autres. Ces expériences ont montré la sensibilité parfois fort variable des différents types cellulaires. D'autre part des tests plus détaillés, effectués sur les cellules "Véro", ont révélé l'importance de la dose de Gly-D-Phe-2-NNap présente dans le milieu de culture. Si à la concentration la plus élevée testée, cette molécule provoque la mort cellulaire d'une façon réellement explosive, il fut observé en ayant recours à des concentrations suffisamment faibles pour maintenir les cellules vivantes, au contact avec la molécule pendant plus de 20 heures, que la naphtylamide provoque alors l'apparition d'une vacuolisation intense. La morphologie des cellules ainsi traitées présente un aspect très semblable à ce qui est observable lorsqu'on provoque artificiellement le gonflement des lysosomes des cellules. Nous n'avons toutefois aucunes preuves que l'effet cytotoxique décrit ci-dessus est réellement lié à la vacuolisation que nous avons pu mettre en évidence.

En entamant ce travail, nous voulions obtenir des renseignements sur le mode d'action de la Gly-D-Phe-2-NNap. Nous avons d'abord concentré nos efforts sur une caractérisation de l'effet de la naphtylamide sur les lysosomes et ce pour plusieurs raisons: d'abord vu les résultats préliminaires obtenus en culture de cellules (voir ci-dessus) ensuite parce que divers travaux récents concernant plusieurs molécules apparentées à la Gly-D-Phe-2-NNap ont décrit un effet cytotoxique dépendant de leur pouvoir lysosomotrope (voir introduction).

Les travaux que nous avons présentés à ce sujet montrent qu'effectivement les lysosomes sont très sensibles à l'action de la Gly-D-Phe-2-NNap. Si le mécanisme conduisant à la rupture membranaire n'est pas certain, nous avons toutefois établis plusieurs points importants dans la caractérisation de ce phénomène. Parmi ces points dont nous avons discuté, nous retiendrons tout spécialement l'importance de la nature des dérivés non hydrolysables fixés à la naphtylamine et l'importance du pH intra et extra lysosomal, apportant la démonstration la plus claire que la molécule doit pénétrer dans le lysosome pour pouvoir endommager la membrane de cet organite.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu comparer l'action de la Gly-D-Phe-2-NNap sur toute une série d'organites subcellulaires. En effet, supposant que la dipeptidylnaphtylamide agit au niveau membranaire, nous avons trouvé intéressant de pouvoir faire le point sur la sensibilité à cette molécule de divers types de membranes. Parmi les membranes testées autres que celles des lysosomes, seule la membrane plasmique semble être relativement affectée par la Gly-D-Phe-2-NNap. Cette sensibilité est toutefois fortement réduite par rapport à celle observée dans le cas des lysosomes.

Nous pensons que dans leur ensemble nos résultats nous fournissent des informations intéressantes sur le mode d'action de la Gly-D-Phe-2-NNap en nous convaincant du fait que les lysosomes doivent être une cible majeure de la molécule lorsqu'elle agit sur une cellule entière.

Bibliographie

1. 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.
2. Alstiel, L. & Branton, D. (1983). "*Fusion of coated vesicles with lysosomes: measurement with a fluorescence assay*". Cell. **32**, 921-929.
3. Baudhuin, P. , Beaufay, H. , Rahmanpli, Y. , Sellinger, O. Z. , Wattiaux, R. , Jacques, P. , de Duve, C. (1964). "*Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate amino-transférase, alanine amino-transférase, D. amino acid oxidase and catalase in rat liver tissue*". Biochem. J. , **92**, 179-184.
4. Berkaloff, A. , Bourguet, J. , Favard, P. & Lacroix, J. C. (1977) dans "*Biologie et physiologie cellulaires. I. Membrane plasmique, etc.*" pp 40-50. Herman. Paris eds.
5. Chvapil, M. (1973). "*New aspects in the biological role of zinc: a stabilizer of macromolécules and biological membranes*". Life Sciences., **13**, 1041-1049.
6. Darnell, J. , Lodish, H. , Baltimore, D. (1988) dans "*La cellule, biologie moléculaire*" pp 161, 166, 171, 592. Vigot. eds.
7. Dautry-Varsat, A. & Lodish, H. F. (1984). "*How receptors bring proteins and particles into cells*". Scientific American, **250**, 48-54.
8. de Duve, C. , de Barsey, T. , Pode, B. , Trouet, A. , Tulkens, P. & Van Hoof, F. (1974). "*Lysosomotropic agents*". Biochem. Pharm., **23**, 2495-2531.
9. 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.

10. de Duve, C. , Wattiaux, R. (1966). "*Function of lysosomes*". Ann. Rev. Physiol., **28**, 435-492.
11. Farqhar, M. G. (1983). "*Multiple pathways of exocytosis, endocytosis, and membrane recycling: validation of a Golgi route*". Fed. Proc. , **42**, 2407-2413.
12. Firestone, R. A. & Pisano, J. M. (1979). "*Lysosomotropic agents. 1. Synthesis and cytotoxic action of lysosomotropic detergents*". J. Med. Chem., **22** (9), 1130-1133.
13. Firestone, R. A. , Pisano, J. M. , Bailey, J. P. , Sturm, A. , Bonney, R. J. , Wightman, P. , Devlin, R. , Leir, S. C. , Keller, D. L. & Tway, P. C. (1982). "*Lysosomotropic agents. 4. Carbobenzoxyglycylphenylalanyl, a new protease sensitive masking group for introduction into cells*". J. Med. Chem., **25**, 539-544.
14. Galloway, C. J. , Dean, G. E. , Marsf, M. , Rudnick, G. & Mellman, I (1983). "*Acidification of macrophages and fibroblast endocytic vesicles in vitro*" Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **80**, 3334-333.
15. Geuze, H. J. , Slot, J. W. , Strous, G. J. A. M. , Peffard, 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.
16. Godelaine, D. , Beaufay, H. , Wibo, M. & Ravoet, A-M. (1983). "*Alteration of membrane barrier in stripped rough microsomes from rat liver on incubation with GTP: its relevance to the stimulation by this nucleotide of the dolichol pathway for protein glycosylation*". J. Cell. Biol. , **97**, 340-350.
17. Goldman, R. & Kaplan, A. (1973). "*Rupture of rat liver lysosomes mediated by L-Amino acid esters*". Biochem; Biophys. Acta, **318**, 205-216.
18. Goldman, R. & Naider, F. (1974). "*Permeation and stéréospecificity of hydrolysis of peptide esters within intact lysosomes in vitro*". Biochem. Biophys. Acta, **338**, 224-233.

19. Goldman, R. (1976). *"Ion distribution and membrane permeability in lysosomal suspensions"* dans: *Lysosomes in biology and pathology*, pp 309-333, Dingle, J. T. , & Dean, R. T. eds, North-Holland publishing company, Amsterdams.
20. Helenius, A. , Mellman, I. , Wall, D. & Hubbard, A. (1983). *"Endosomes"*. *Trends in Biochem. Sci.* , **26**, 245-249.
21. Jadot, M. (1987). Dans: *"Chemin intracellulaire suivi par l'invertase endocytée par le foie : une analyse biochimique"*. Thèse, facultés universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur.
22. Jadot, M. , Colmant, C. , Wattiaux-De coninck, S. & Wattiaux, R. (1984). *"Intralysosomal hydrolysis of Glycyl-L-Phenylalanine-2-Naphtylamide"*. *Biochem. J.* , **219**, 965-970.
23. Lloyd, J. B. (1969). *"Studies on the permeability of rat liver lysosomes to carbohydrates"*. *Biochem. J.*, **115**, 703-707.
24. Lowry , O. H. , Rosebrough, N. J. , Farr, A. L. & Randall R. J. ,(1951). *"Protein measurement with the folin phenol reagent"*. *J. Biol. Chem.* **193** 265-275.
25. Ludwig, J. C. & Chvapil, M. (1980). *"Reversible stabilization of liver lysosomes by zinc ions"*. *J. Nuts.*, **110**, 945-953.
26. McDonald, J. K. , Zeitman, B. B. , Reilly, T. J. & Ellis, S. (1969). *"Observations on the substrate specificity of cathepsine C (dipeptidyl amino-peptidase I)"*. *J. Biol. Chem.* , **40**, 2693-2709.
27. McDonald, J. K. , Callahan, P. X. , Ellis, S. & Smith, R. E. (1971). *"Polypeptide degradation by dipeptidyl aminopeptidase I (cathepsine C) and related peptidase"* ; dans: *tissue proteinases* pp. 69-107, Barret, A. J. & Dingle, J. T. eds, North-holland publishing company, Amsterdam.
28. Mc Elhaney, R. , De Gier, J. & Van Der Neut-Kok, E. C. M. (1973). *"The effect of alterations in fatty acid composition and cholesterol content of nonelectrolyte permeability of Acholeplasma Laidlawii B cells and derived liposomes"*. *Biochem. Biophys. Acta.*, **298**, 500-512.

29. Mego, J. L. (1979). "The ATP-dependant proton pump in lysosome membranes". *Febs letters.*, **107** (1), 113-116.
30. Moriyama, Y. , Takano, T. & Ohkuma, S. (1984). " Proton translocation ATPase in lysosomale membrane ghosts. Evidence that alkaline Mg²⁺ ATPase acts as a proton pump". *J. Biochem*, **95**, 995-1007.
31. Ochoa, S. (1955). "Malic deshydrogénase from pig heart". *Methods enzymol*, **1**, 735-739. (Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. eds). Academic press, New-York.
32. Ohkuma, S. , Moriyama, Y. (1982). "Identification and characterisation of a proton pump on lysosomes by fluorescein isothiocyanate-dextran fluorescence". *Proc. Acad. Sci. USA.* **79**, 2758.
33. Pastan, I. H. & Willingham, M. C. (1985). "The pathway of endocytosis". Dans *Endocytosis* pp. 1-44, Pastan, I. H. & Willingham, M. C. eds. , Plenum press, New York.
34. Pfeiffer, C. J. & Cho, C. H. (1980). "Modulating effect by zinc on hepatic lysosomal fragility incubed by surface-active agents". *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **27**, 587-598.
35. Pisoni, R. L. , Flickinger, K. S. , Thoene, J. G. & Christensen, H. N. (1987). "Characterization of carrier-mediated transport systemes for small neutral amino acids in human fibroblast lysosomes". *J. Biol. Chem.* , **262** (13), 6010-6017.
36. Rabinovitch, M. & Alfieri, S. C. (1987). "From lysosomes to cells, from cells to *Leishmania*: amino acid esters as potential chemotherapeutic agents". *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **20**, 665-674.
37. Reijngoud, D. J. & Tager, J. M. (1973). "Measurement of intralysosomal pH". *Biochem. Biophys. Acta*, **297**, 174-178.
38. Sahagian, G. G. (1984). "The mannose-6-phosphate receptor: function, biosynthesis and translocation". *Biol. Cell.* , **51**, 207-214.
39. Schneider, L. D. (1981). "ATP-dependent acidification of intact and disrupted lysosomes. Evidence for an ATP-driven proton pump". *J. Biol. Chem.* , **256** (8), 3858-3864.

40. Sly, W. S. & Fisher, H. D. (1982). "*The phosphomannosyl recognition system for intracellular and intercellular transport of lysosomal enzymes*". J. Cellular biochem. , 18, 67-85.
41. Steinman, R. M. , Mellman, I. S. , Muller, W. A. & Cohn, Z. A. (1983). "*Endocytosis and the recycling of plasma membrane*". J. Cell. Biol. ,96, 1-27.
42. Thiele, D. L. & Lipsky, P. E. (1985). "*Modulation of human natural killer cell function by L-Leucine methyl ester: monocyte-dependent depletion from human peripheral blood mononuclear cells*". J. Immunol., 134 (2), 786-793.
43. Thiele, D. L. & Lipsky, P. E. (1985). "*Regulation of cellular function by products of lysosomal enzyme activity: elimination of human natural killer cells by a dipeptide methyl ester generated from L-Leucine methyl ester by monocytes or polymorphonuclear leukocytes*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82, 2468-2472.
44. Thiele, D. L. & Lipsky, P. E. (1986). "*The immunosuppressive activity of L-Leucyl-L-Leucine methyl ester: selective ablation of cytotoxic lymphocytes and monocytes*". J. Immunol., 136 (3), 1038-1047.
45. Thiele, D. L. , Charley, M. R. , Calomeni, J. A. & Lipsky, P. E. (1987). "*Lethal graft-vs-host disease across major histocompatibility barriers: requirement for Leucyl-leucine methyl ester sensitive cytotoxic T cells*". J. Immuno., 138, 51_57.
46. Tycko, B. , Keith, C. H. & Maxfield, R. (1983). "*Rapid acidification on endocytic vesicles containing asialoglycoprotein in cells of human hepatoma line*". J. Cell. Biol. 97, 1762-1776.
47. Vaes, G. (1966). "*Subcellular localization of glycosidases in lysosomes*". Methods enzymal. 8, 509-514.
48. 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.
49. Wattiaux-de Coninck, S. & Wattiaux, R. (1971). "*Subcellular distribution of sulfite cytochrome c réductase in rat liver tissue*" . eur. j. Biochem., 19, 552-556.

50. Wheeler, T.J. (1985). "*The glucose transporter of mammalian cells*". *Ann. Rev. Physiol.*, **47**, 503-517.
51. Wileman, T., Harding, C. & Stahl, P. (1985). "*Receptor-mediated endocytosis*". *Biochem. J.*, **232**, 1-14.
52. Yamashiro, D. J. , Fluss, S. R. & Maxfield, F. R. (1983). "*Acidification of endocytic vesicles by an ATP-dependent proton pump*". *J. Cell. Biol.* **97**, 929-934.