



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude préliminaire de l'expression de l'hyaluronidase Hyal2 dans les organes du rat et après transfection in vitro

DEBACQ, Christophe

Award date:
1999

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.



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

Faculté des Sciences

**ETUDE PRÉLIMINAIRE DE L'EXPRESSION DE L'HYALURONIDASE *HYAL2*
DANS LES ORGANES DU RAT ET APRÈS TRANSFECTION *IN VITRO***

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

Christophe DEBACQ

Juin 1999

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Etude préliminaire de l'expression de l'hyaluronidase *Hyal2* dans les organes du rat et après transfection *in vitro*

DEBACQ Christophe

Résumé

Les hyaluronidases catabolisent l'hyaluronan (HA), un constituant de la matrice extracellulaire, soit en morceaux de PM moyen, soit en tétra- ou disaccharides. Dans le présent travail, nous avons précisé les activités hyaluronidasiques présentes dans les organes de rat, les parties du rein et différentes cultures cellulaires rénales. Nous avons combiné les résultats de deux techniques : une électrophorèse en gel d'agarose et la zymographie. Un polymorphisme enzymatique est révélé dans la majorité des échantillons. Seules les cellules interstitielles de la médullaire interne sécrètent une enzyme dont l'activité est partielle.

Le laboratoire de Physiologie et Pharmacologie a cloné l'ADNc d'une forme particulière d'hyaluronidase, Hyal-2, qui aurait une activité de dégradation partielle. Des cellules S2 ont été transfectées avec l'ADNc d'Hyal-2, mais elles n'expriment pas la protéine de façon suffisante.

Ces conclusions ont été étayées par la technique du Western blot, en utilisant un anticorps anti-peptide dirigé contre Hyal-2.

Finalement, la transfection, dans des cellules COS-7, d'une protéine de fusion entre Hyal-2 et une forme de « green fluorescent protein » a montré une fluorescence concentrée dans l'appareil de Golgi et a suggéré un adressage d'Hyal-2 à la membrane plasmique.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 1999

Promoteur: B. Flamion

Après ces quelques mois de travail au sein du laboratoire de Physiologie et Pharmacologie, il me paraît indispensable d'adresser mes remerciements à plusieurs personnes.

Je veux remercier plus spécialement Monsieur Flamion pour l'accueil qu'il m'a réservé au sein de son équipe et aussi pour la précieuse aide qu'il m'a apportée lors de l'élaboration de ce travail de fin d'étude.

Ensuite, je tiens à remercier toutes les personnes du labo, en commençant par Madame Mertens et Josiane qui m'ont fait part de leurs connaissances et qui ont su me soutenir dans tous les moments difficiles. Je n'oublie pas non plus Pascale, Béatrice, Camille et Guy pour leurs conseils et leur disponibilité omniprésente.

Je remercie également Flore Bellefontaine, Pascale Boël, le Révérend Père Pierre Devos et Thierry Arnould d'avoir accepté de lire ce mémoire.

Un grand merci à Valérie, la " Pacwoman " du labo.

Et pour terminer, j'adresse tous mes remerciements à mes parents et à mes amis pour leurs constants encouragements tout au long de ces années d'étude. Merci aussi à Florence pour sa compréhension et sa patience.

Liste des abréviations

A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Bovin Serum Albumin
C	Cytosine
°C	Degré Celsius
Da	Dalton
dNTP	désoxyribonucléotide triphosphate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medecin
DO	Densité Optique
EDTA	Ethylène diamine-tétraacétate
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FBS	Fetal Bovine Serum
G	Guanine
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HA	Hyaluronan
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'[2-ethanesulfonic acid]
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
LB	Luria-Bertani
M	Molaire
Mops	3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid]
NRK-49F	Normal Rat Kidney Fibroblasts
ORF	Open Reading Frame
PAGE	Polyacrylamide Gel
pb	paire de base
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PM	Poids Moléculaire
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RMIC	Reno-Medullary Interstitial Cells
rpm	rotation par minute
S2	Schneider II
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SP	Peptide signal N-terminal d'Hyal-2
T	Thymine
TAE	Tris Acétate EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tétra-méthyl-éthylendiamine
Tm	Température de melting
Tris	Tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
Tween	Polyoxyéthylène sorbitan monolaurate
UV	Ultra Violet

Tables des matières

I. Introduction	1
I.1 L'hyaluronan	1
I.1.1 Structure.....	1
I.1.2 Localisation.....	2
I.1.3 Biosynthèse.....	2
I.1.4 Turnover	3
I.1.5 Fonctions	4
I.1.6 Acide hyaluronique et cancer.	5
I.2 Vue d'ensemble des hyaluronidases	5
I.2.1 Historique de la découverte des hyaluronidases	5
I.2.2 Classement des hyaluronidases.....	6
I.2.3 Interaction entre l'hyaluronidase et l'hyaluronan	7
I.2.4 Mesure de l'activité hyaluronidasique.....	8
I.3 Description des hyaluronidases connues chez les eucaryotes.....	9
I.3.1 L'hyaluronidase testiculaire ou PH-20	10
I.3.2 L'hyaluronidase hépatique.....	10
I.3.3 L'hyaluronidase rénale.....	11
I.3.4 L'hyaluronidase de poumon	11
I.3.5 L'hyaluronidase de la peau	12
I.3.6 L'hyaluronidase des fibroblastes	12
I.3.7 L'hyaluronidase du plasma et des urines	12
I.3.8 Les hyaluronidases de divers tissus	13
I.3.9 L'hyaluronidase du système lymphatique.....	14
I.3.10 Une nouvelle hyaluronidase : Hyal-2	14
II. Buts du travail	16
III. Matériel et Méthodes	17
III.1 Méthodes se rapportant à l'ADN	17

III.1.1 Culture de bactéries.....	17
III.1.1.a Milieu de culture pour les bactéries.....	17
III.1.1.b Antibiotiques.....	17
III.1.1.c Cultures.....	18
III.1.2 Préparation d'ADN plasmidique.....	18
III.1.2.a Protocole de la mini préparation.....	18
III.1.2.b Protocole de la maxi préparation.....	19
III.1.3 Quantification d'ADN au spectrophotomètre.....	20
III.1.4 Electrophorèse en gel d'agarose.....	20
III.1.5 Restriction d'ADN.....	21
III.1.6 PCR ou Polymerase Chain Reaction.....	22
III.1.7 Purification de fragments d'ADN à partir de gel d'agarose.....	23
III.1.8 Ligation.....	24
III.1.9 Extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique.....	25
III.1.10 Précipitation à l'éthanol.....	25
III.1.11 Transformation.....	26
III.1.11.a Cellules électrocompétentes.....	26
III.1.11.b Transformation par électroporation.....	27
III.1.12 Séquençage automatique (Perkin Elmer).....	27
III.2 Méthodes se rapportant aux protéines.....	28
III.2.1 Préparation tissulaire.....	28
III.2.2 Préparation cellulaire.....	29
III.2.2.a Les cellules S2.....	29
III.2.2.b Les cellules COS-7.....	29
III.2.3 Préparation des extraits cellulaires.....	31
III.2.4 Concentration des milieux de culture cellulaires.....	31
III.2.5 Dosage des protéines.....	31
III.2.6 Mesure de l'activité enzymatique.....	32
III.2.6.a Electrophorèse en gel d'agarose des produits de la digestion enzymatique (Lee and Cowman, 1994).....	32
III.2.6.b Electrophorèse en gel de polyacrylamide : la zymographie (Fischer-Szafarz, 1984).....	34

III.2.7	Détection de l'expression protéique par Western Blot.....	36
III.3	Méthodes de transfection cellulaire	40
III.3.1	Les cellules S2.....	40
III.3.2	Les cellules COS-7.....	41
III.3.3	L'EGFP	42
III.3.4	Microscopie.....	43
IV.	Résultats	44
IV.1	Mesure de l'activité hyaluronidasique chez le rat.....	44
IV.1.1	Introduction.....	44
IV.1.2	Electrophorèse en gel d'agarose des produits de la réaction hyaluronidasique.....	45
IV.1.2.a	Les organes du rat	45
IV.1.2.b	Les parties du rein.....	46
IV.1.2.c	Les cultures cellulaires rénales.....	47
IV.1.3	Zymographie	48
IV.1.3.a	Les organes du rat	48
IV.1.3.b	Les parties du rein.....	49
IV.1.3.c	Les cultures cellulaires rénales.....	49
IV.2	Expression de Hyal-2 en cellules S2.....	50
IV.2.1	Constructions des plasmides.....	51
IV.2.1.a	Construction pMT/V5-His Hyal-2	51
IV.2.1.b	Construction pCDEGFP	52
IV.2.2	Contrôle de la capacité de transfection	53
IV.2.3	Mesure de l'activité d'Hyal-2 transfectée.....	54
IV.3	Western Blot	55
IV.3.1	Introduction.....	55
IV.3.2	Expression d'Hyal-2 chez le rat.....	56
IV.3.3	Expression d'Hyal-2 dans les cellules S2	58
IV.4	Localisation intracellulaire de Hyal-2.....	58
IV.4.1	Construction de pJMEGFP	59
IV.4.2	Microscopie	60

V. Discussion et perspectives	62
V.1 L'activité hyaluronidasique.....	62
V.2 Expression d'Hyal-2 en cellules d'insecte.....	64
V.3 Mesure de l'expression d'Hyal-2 par Western Blot.....	64
V.4 Devenir intracellulaire d'une construction SP-EGFP-Hyal-2.....	65
V.5 Perspectives.....	66
VI. Bibliographie	67

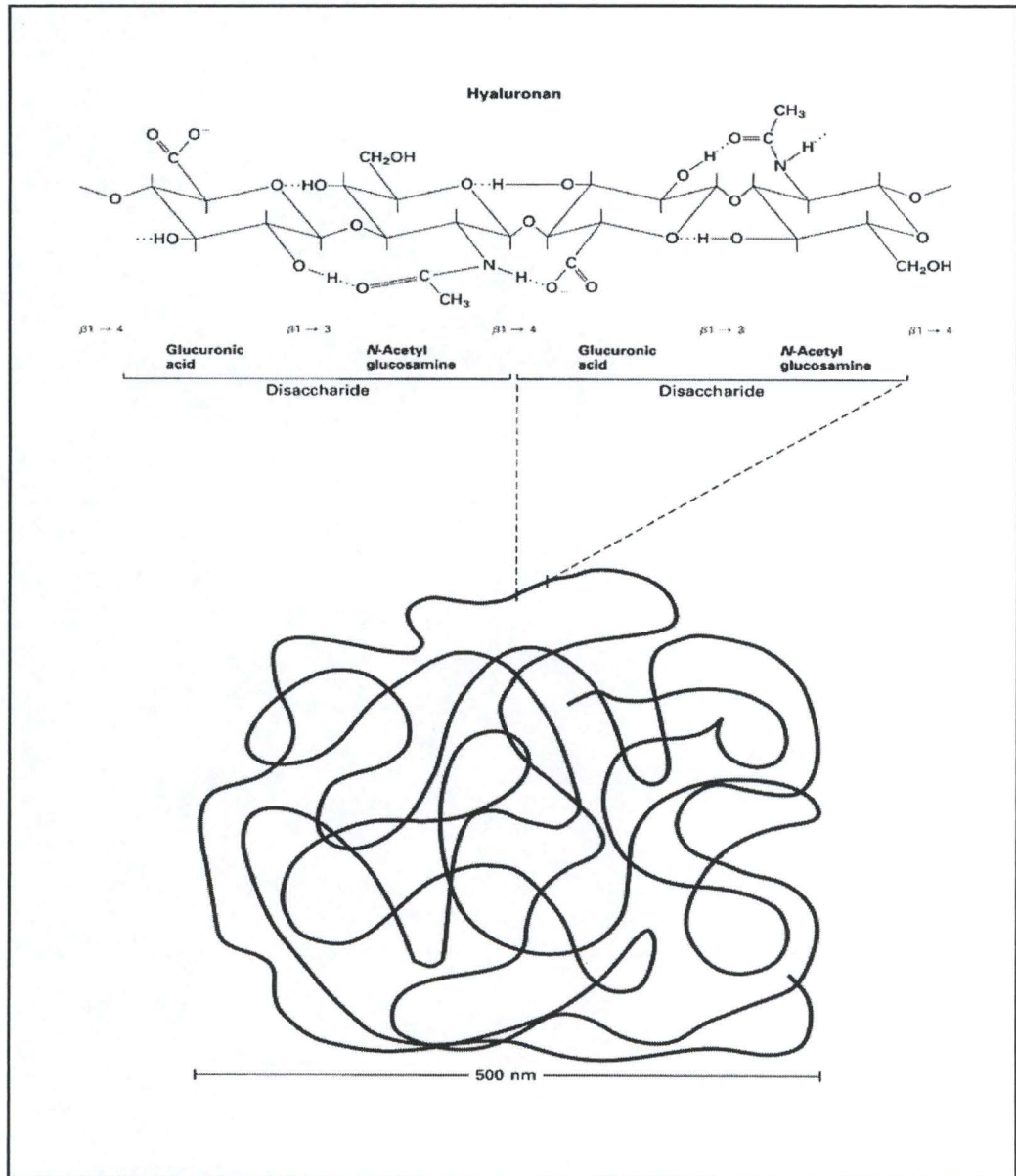


Fig. 1.1 : Structure de l'hyaluronan.

I. Introduction

I.1 L'hyaluronan

I.1.1 Structure

L'hyaluronan ou acide hyaluronique est un polysaccharide chargé négativement. Il fut découvert en 1934 dans l'humeur vitrée de l'œil (Meyer and Palmer, 1934). Ce n'est que dans les années 50 que l'on détermina sa structure (Figure 1.1) comme étant la répétition d'unités disaccharidiques formées de N-acétyl-D-glucosamine et d'acide glucuronique unis alternativement par des liaisons β (1-3) et β (1-4).

L'hyaluronan est un des glycosaminoglycans essentiels de la matrice extracellulaire au même titre que les chondroïtines sulfates, le dermatan sulfate, le kératan sulfate, l'héparan sulfate et l'héparine. Toutefois l'acide hyaluronique se différencie des autres par l'absence de groupement sulfate sur la N-acétylhexosamine et par un poids moléculaire qui peut atteindre plusieurs millions de Daltons, contrairement aux autres glycosaminoglycans de la matrice extracellulaire, dont le PM ne dépasse pas les 50 kDa (Fraser et al., 1997) (Tableau 1.1). De plus, contrairement aux autres glycosaminoglycans, l'hyaluronan n'est pas un composant des protéoglycans. Cependant, il est capable d'interagir avec des protéines présentes à la surface cellulaire comme le récepteur CD44 aussi appelé antigène d'Hermès ou H-CAM ou encore "lymphocyte homing receptor" (Aruffo et al., 1990), RHAMM "Receptor for Hyaluronan-Mediated Mobility" (Hardwick et al., 1992) ou le récepteur LEC "Liver Endothelial Cell" (Forsberg and Gustafson, 1991). Il peut également se lier à plusieurs protéines de la matrice extracellulaire, en particulier l'aggrecan, l'hyaluronectine et le versican (Knudson and Knudson, 1993). Enfin, on peut aussi le trouver sous une forme libre dans la circulation sanguine ou lymphatique (Frost et al., 1996).

Nom du GAG	Sucres constituants	Groupement sulfate	PM approximatif en Da	Association à des protéoglycans
<i>Hyaluronan</i>	Acide glucuronique Glucosamine	-	10 ⁶ -10 ⁷	-
<i>Chondroïtine 4-(6-) sulfates</i>	Acide glucuronique Galactosamine	+	10-50 10 ³	+
<i>Dermatan sulfate</i>	Acide iduronique Galactosamine	+	10-50 10 ³	+
<i>Kératan sulfate</i>	Galactose Glucosamine	+	5-15 10 ³	+
<i>Héparan sulfate</i>	Acide glucuronique ou iduronique Glucosamine	+	10-50 10 ³	+
<i>Héparine</i>	Acide glucuronique ou iduronique Glucosamine	+	5-20 10 ³	+

Tableau 1.1 : Glycosaminoglycans (GAG) de la matrice extracellulaire (D'après Fraser et al., 1997).

Organe ou fluide	Homme	Mouton	Lapin	Rat
<i>Cordon ombilical</i>	4100			
<i>Fluide synovial</i>	1400-3600	540	3890	
<i>Derme</i>	200			
<i>Humeur vitrée</i>	140-338	260	29	
<i>Humeur aqueuse</i>	0,3-2,2	1,6-5,4	0,6-2,5	0,2
<i>Poumon</i>		98-243		34
<i>Reins</i>			93-113	30
<i>Papilles rénales</i>			250	
<i>Cortex rénal</i>			4	
<i>Cerveau</i>	35-115		54-76	74
<i>Muscle</i>			27	
<i>Intestin</i>				44
<i>Foie</i>			1,5	4
<i>Lymph thoracique</i>	8,5-48	1,0-34		5,4
<i>Urine</i>	0,1-0,3			
<i>Liquide céphalo-rachidien</i>	0,02-0,32			
<i>Plasma</i>	0,01-0,1	0,12-0,31	0,019-0,086	0,048-0,26

Tableau 1.2 : Concentration d'hyaluronan en µg/g ou en mg/l dans divers organes de plusieurs espèces (D'après Fraser et al., 1997).

I.1.2 Localisation

L'hyaluronan, qui est déjà présent chez les bactéries, se retrouve dans tous les tissus et fluides corporels des vertébrés (Laurent and Fraser, 1992). Toutefois, sa concentration varie d'une espèce à l'autre et d'un organe à l'autre (Tableau 1.2). C'est ainsi que plus de la moitié du contenu total de ce polymère se trouve dans la peau et plus précisément dans le derme (Reed et al., 1988). Ces résultats peuvent être transposés aux autres mammifères (Fraser et al., 1997). L'hyaluronan est particulièrement abondant dans le cordon ombilical, le liquide synovial et l'humeur vitrée de l'œil. Par contre, on en détecte peu dans le sérum.

Dans le rein, qui est l'organe étudié au laboratoire de Physiologie et Pharmacologie, c'est la zone médullaire interne qui est la plus riche en acide hyaluronique ; le cortex n'en contient presque pas (Flamion et al., 1997).

I.1.3 Biosynthèse

L'acide hyaluronique est synthétisé dans la membrane plasmique (Prehm, 1983). Ceci le différencie des autres glycosaminoglycans qui eux sont synthétisés dans le Golgi (Laurent and Fraser, 1992).

L'enzyme qui synthétise l'hyaluronan est l'hyaluronan-synthase. Elle est localisée sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique (Prehm, 1983) et ajoute des résidus de sucres à l'extrémité réduite de l'hyaluronan. Puis la chaîne d'unités disaccharidiques ainsi formée va passer dans l'espace péricellulaire par son extrémité non réduite.

Certains facteurs de croissance comme EGF (Endothelial Growth Factor), PDGF (Platelet Derived Growth Factor), TGF β (Transforming Growth Factor β), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor), ou certaines cytokines comme IL-1 (Interleukin-1), peuvent activer la synthèse d'acide hyaluronique (Heldin, 1998).

1.1.4 Turnover

On estime que 10 à 100 mg d'acide hyaluronique sont renouvelés dans la circulation sanguine d'un homme normal chaque jour (Fraser and Laurent, 1989). C'est au niveau des cellules sinusoidales hépatiques que la majeure partie de l'hyaluronan est dégradé (Smedsröd et al., 1990 ; Frost et al., 1996). Ces cellules possèdent des récepteurs spécifiques pour l'endocytose de l'acide hyaluronique. Ces récepteurs appelés LEC ont une structure identique à celle de la molécule ICAM-1 (Forsberg and Gustafson, 1991).

Aussitôt après son intégration dans la cellule, la vésicule d'endocytose va probablement être amenée aux lysosomes. Ceux-ci contiennent les enzymes nécessaires à la dégradation de l'hyaluronan: l'hyaluronidase, la β -glucuronidase et la β -N-acétylglucosaminidase (cf ci-après). Les produits de la dégradation sont l'acide glucuronique et le N-acétyl-D-glucosamine (Rodén et al., 1989). Par la suite, chacun des monosaccharides sera transféré dans le cytosol où il suivra sa propre voie de dégradation.

Une petite partie de l'hyaluronan circulant est métabolisé dans les reins et la rate (Bentsen et al., 1986). Cependant, la majeure partie de l'acide hyaluronique tissulaire n'atteint jamais la circulation ; il est capté par les vaisseaux lymphatiques et passe par les ganglions lymphatiques qui vont le détruire à raison de 90%. Les ganglions lymphatiques, qui captent l'hyaluronan grâce à un récepteur spécifique récemment découvert (Banerji et al., 1999), sont probablement de plus grands cataboliseurs d'acide hyaluronique que le foie (Laurent and Fraser, 1992). Cependant, l'équipement enzymatique qui leur permet de réaliser cette action reste inexploré à ce jour.

Au sein des différents tissus, le turnover de l'acide hyaluronique est en général très rapide. Ainsi, dans le derme, 50 à 75% de l'hyaluronan est renouvelé toutes les 24 heures (Frost et al., 1996). Ce turnover rapide laisse supposer que l'acide hyaluronique n'est pas un simple composant structurel de la matrice ; il possède vraisemblablement d'autres fonctions (Laurent and Fraser, 1992).

1.1.5 Fonctions

L'hyaluronan joue un rôle capital dans le développement du zygote puis du foetus (Toole, 1998) :

- le cumulus oophorus est extrêmement riche en hyaluronan, qui devra être clivé par le spermatozoïde ;
- après fécondation, l'hyaluronan se gonfle d'eau et participe à la formation des blastocystes ;
- et le foetus en formation contient un taux élevé d'hyaluronan, qui favorise la mobilité et la prolifération des cellules.

Dans le cartilage, les chaînes d'hyaluronan jouent un rôle structurel. Elles maintiennent les agrégats qui sont les principaux protéoglycans du cartilage (Hardingham and Muir, 1972). Sans cette interaction, les protéoglycans ne seraient pas retenus dans le cartilage et celui-ci perdrait alors ses propriétés gélatineuses et sa résistance aux déformations (Laurent and Fraser, 1992).

L'hyaluronan participe à l'homéostasie des espaces extracellulaires. En effet, il peut retenir jusqu'à 1000 fois son poids en eau, et joue probablement un rôle "d'éponge" en régulant la quantité d'eau présente dans les tissus (Comper and Laurent, 1978).

Dans l'ensemble, l'hyaluronan possède de nombreuses actions cellulaires directes, médiées par les récepteurs signalés plus haut (Laurent and Fraser, 1992). Relevons simplement son implication dans les phénomènes inflammatoires et la réparation des plaies, phénomènes qui exigent entre autres des déplacements cellulaires (Gerdin and Hällgren, 1997).

Enfin, l'acide hyaluronique, s'il est dégradé en fragments de petit poids moléculaire, devient fortement angiogénique, alors que, sous sa forme de haut poids moléculaire, il inhibe l'angiogénèse (West et al., 1985).

I.1.6 Acide hyaluronique et cancer.

L'hyaluronan a des relations privilégiées avec les cancers. Ainsi, le taux d'hyaluronan contenu dans les tumeurs est souvent élevé (Knudson et al., 1989). Cette observation s'accompagne parfois, mais pas toujours, d'une élévation de la concentration en hyaluronidase (enzyme qui dégrade l'hyaluronan) dans la tumeur (Lokeshwar et al., 1996 ; Bertrand et al., 1997 ; Tamakoshi et al., 1997) ou dans le sérum (Delpech et al., 1985 ; Kumar et al., 1989).

Sachant que les fragments d'acide hyaluronique semblent induire l'angiogénèse indispensable à la progression des tumeurs (West et al., 1985 ; West and Shaw, 1998), il est envisageable que des hyaluronidases produites par les cellules cancéreuses génèrent elles-mêmes ces fragments (Victor et al., 1997). Une activité hyaluronidasique élevée pourrait donc favoriser l'apparition de métastases en relation avec la formation de néovaisseaux. Elle pourrait éventuellement être utilisée comme marqueur métastatique (Victor et al., 1997).

Mais, d'autre part, il apparaît que l'acide hyaluronique peut être immunosuppresseur (Knoflack et al., 1999) et qu'il augmente la résistance des cellules cancéreuses aux attaques immunitaires (Gately et al., 1984), ainsi que leur résistance aux médicaments chimiothérapeutiques (Baumgartner et al., 1998). Récemment, plusieurs études ont démontré que l'ajout d'hyaluronidase aux traitements anticancéreux augmentait leur efficacité (Croix et al., 1996 ; Baumgartner et al., 1998). Cette approche sera probablement bientôt exploitée médicalement.

I.2 Vue d'ensemble des hyaluronidases

I.2.1 Historique de la découverte des hyaluronidases

Le terme "hyaluronidase" fut introduit par Meyer dans les années 40 comme étant l'enzyme qui dégrade l'acide hyaluronique (Meyer et al., 1947). Pourtant la découverte de l'enzyme remonte à quelques années auparavant. C'est en 1928 que Duran-Reynals découvrait que les extraits de testicules de mammifères contiennent un facteur favorisant la diffusion des agents viraux et des toxines injectées par voie sous-cutanée (Duran-Reynals, 1928). Ce facteur

Type d'hyaluronidase	Sources	Substrat	Type d'action	Produit final
Testiculaire EC 3.2.1.35	Testicules de mammifères Lysosomes des différents tissus Venins d'invertébrés	Hyaluronan et Chondroïtines 4- et 6-sulfate	endo- β -N- acétyl-D-hexosaminidase	tétrasaccharides (GlcUa-GlcNac-GlcUa-GlcNac)
	Venins de vertébrés	Hyaluronan		
De sangsue EC 3.2.1.36	Sangsues	Hyaluronan	endo- β -glucuronidase	tétrasaccharides (GlcNac-GlcUa-GlcNac-GlcUa)
De bactéries EC 4.2.2.1	<i>Streptococcus</i>	Hyaluronan et Chondroïtines 4- et 6-sulfate	endo- β -N- acétyl-D-hexosaminidase	disaccharides (GlcUa-GlcNac)

Tableau 1.3 : Classification des hyaluronidases d'après leur mécanisme d'action et leur substrat (D'après Meyer, 1971). GlcUa, acide glucuronique ; GlcNac, N-acétyl-glucosamine.

fut dès lors appelé "spreading factor", ce qui signifie facteur de diffusion. Chain et Duthie ont montré que ce facteur de diffusion était en réalité l'enzyme dégradant l'hyaluronan (Chain and Duthie, 1939). Depuis lors, il est devenu clair que l'hyaluronan peut être dégradé par plusieurs types d'enzymes agissant via des mécanismes distincts (Meyer, 1947 ; Meyer, 1971 ; Rodén et al., 1989 ; Kreil, 1995), comme détaillé ci-dessous.

1.2.2 Classement des hyaluronidases

On peut classer les hyaluronidases de différentes façons, d'après leur mécanisme d'action, leur pH ou leur spécificité de substrat :

1. d'après leur mécanisme d'action (Meyer, 1971 et Tableau 1.3) :

- le premier groupe comprend les endo- β -N-acétyl-D-hexosaminidases qui clivent un lien $\beta(1-4)$. Ce type d'enzymes dégrade les substrats de haut poids moléculaire, principalement en tétrasaccharides mais aussi en fragments de 2, 6 ou 8 sucres. A ce groupe appartiennent les hyaluronidases des venins (serpents, abeilles, frelons), des lysosomes et du spermatozoïde. Cette dernière, appelée PH-20, catalyse aussi des réactions de transglycosylation qui expliquent la formation d'hexa-, di-, et octasaccharides à partir des tétrasaccharides.
- le second groupe est celui des endo- β -D-glucuronidases. Ce type d'hyaluronidase est celle des glandes salivaires de sangsue (*Hirudo medicinalis*). L'enzyme coupe les liaisons $\beta(1-3)$ à l'intérieur de la molécule, laissant des résidus tétrasaccharidiques avec un acide glucuronique à l'extrémité non réduite.
- enfin le dernier groupe est celui des hyaluronidases bactériennes, ou hyaluronan lyases, qui, via une β -élimination, produisent majoritairement des disaccharides. Leur représentant typique est l'hyaluronidase des Streptocoques (Pritchard and Lin., 1993). D'autres hyaluronidases procaryotiques ont été caractérisées, notamment chez *Clostridium perfringens* (Canard et al., 1994), ou chez les champignons (*Candida*, *Streptomyces*). Nous ne reviendrons pas sur les formes procaryotiques d'hyaluronidase.

	Substrat	Origine
pH neutre	hyaluronan "non self" (qui n'appartient pas au même individu)	hyaluronidase testiculaire, de venin, ou de bactéries
pH acide	hyaluronan "self" (qui appartient au même individu)	hyaluronidase de sérum ou lysosomale

Tableau 1.4 : Classification des hyaluronidases selon leur pH d'activité (D'après Fiszer-Szafarz et al., 1984).

Il existe aussi des exoglycosidases, soit de type β -D-glucuronidase, soit de type β -N-acétyl-D-hexosaminidase, qui ne peuvent attaquer l'hyaluronan qu'à l'extrémité de sa chaîne du côté non réduit. Ces enzymes sont lysosomales et "complètent" le travail des hyaluronidases.

2. d'après leur pH d'activité (Tableau 1.4) :

- Certaines ont une activité optimale à pH neutre. Ces enzymes semblent attaquer l'hyaluronan qui n'appartient pas au même individu ("non-self"). Outre les hyaluronidases de venins ou de bactéries, l'exemple le plus frappant est celui de l'hyaluronidase testiculaire contenue dans l'acrosome des spermatozoïdes, sans laquelle la fécondation serait impossible.
- D'autres ont une activité optimale à pH acide. Elles agissent sur l'acide hyaluronique de l'individu. A ce groupe appartiennent les hyaluronidases du sérum et des lysosomes (Fischer-Szafarz, 1984), la première n'étant forcément pas active de façon physiologique.

3. d'après la spécificité de leur substrat (cf Tableau 1.3) :

En plus de l'acide hyaluronique, certaines hyaluronidases peuvent hydrolyser la chondroïtine 4-sulfate et la chondroïtine 6-sulfate. Ce type d'enzymes ne se retrouve que chez les vertébrés et un des plus beaux exemples est celui de l'hyaluronidase testiculaire.

1.2.3 Interaction entre l'hyaluronidase et l'hyaluronan

L'interaction entre l'hyaluronidase et l'hyaluronan n'est pas bien connue à l'échelle moléculaire.

En comparant les séquences d'acides aminés des hyaluronidases de venin d'abeille et de frelons à celles de la protéine PH-20 de l'homme, du singe, de la souris et du cobaye, il a été démontré que dans une région commune englobant 340 acides aminés, 57 sont conservés.

Dans cette région se trouve 4 cystéines formant 2 ponts disulfures (Kreil, 1995). L'acide hyaluronique étant un polyanion, il est possible que sa liaison à l'enzyme implique des interactions ioniques avec des acides aminés chargés positivement (acides aminés basiques). L'homologie de séquence a mis en évidence 3 arginines et 1 histidine qui seraient impliquées dans la reconnaissance enzyme-substrat (Arming et al., 1997). La structure tridimensionnelle de ces protéines suggère que 2 résidus d'acide glutamique font partie du site actif. L'un agit comme nucléophile, l'autre comme catalyseur des interactions acides-bases (Kreil, 1995). De plus, il a été montré que la région où le polysaccharide s'attache est riche en chaînes de résidus aromatiques comprenant des tryptophanes et des tyrosines (Kreil, 1995).

De toute évidence, la relation entre l'hyaluronidase et son substrat n'est pas simple, ce qui s'explique peut-être par le fait que l'hyaluronan est de haut poids moléculaire et est agencé en réseau. De plus, certaines hyaluronidases, comme la PH-20, sont arrimées par un ancrage GPI (glycosylphosphatidylinositol) et forment des grappes sur la surface de la cellule ; ceci pourrait expliquer la faible activité spécifique de l'enzyme mesurée *in vitro* (Kreil, 1995).

1.2.4 Mesure de l'activité hyaluronidasique

De très nombreux tests ont été décrits pour mesurer l'activité des enzymes qui dépolymérisent l'hyaluronan (Hynes and Ferreti, 1994). Cette profusion s'explique par le fait qu'aucun de ces tests n'est entièrement satisfaisant dans toutes les situations, ou avec tous les types d'échantillons.

Les tests les plus anciens, qui comparent la diminution de turbidité ou de viscosité (Meyer, 1947) induites par l'enzyme dans des solutions d'hyaluronan, sont peu sensibles mais restent utiles dans des procédures pharmaceutiques officielles (Bailey and Levine, 1993). La chromatographie (Cramer and Bailey, 1991) détecte de façon beaucoup plus précise la diminution du PM moyen de solutions d'hyaluronan présentées à l'enzyme, mais elle exige un matériel spécialisé et une mise au point longue. L'utilisation d'un substrat marqué d'un radio-isotope (Hotez et al., 1992) ou d'un fluorochrome (Nakamura et al., 1990a) devrait théoriquement augmenter la sensibilité du test, mais la préparation de ces composés est délicate (leur production a été essayée dans le laboratoire de Physiologie et Pharmacologie).

En ce qui concerne les tests basés sur une réaction chimique, celui de Reissig et al. (1955) est la référence, et il s'avère fiable pour autant que l'activité β -glucuronidase soit bloquée et que les échantillons à doser soit suffisamment abondants (Flamion et al., 1997).

Les techniques à la fois les plus précises et les plus sensibles à l'heure actuelle sont probablement celles qui reposent sur une détection du substrat résiduel par "ELISA" (Enzyme-Linked ImmunoSpecific Assay), car l'anticorps est ici représenté par une protéine qui lie l'hyaluronan de façon spécifique. Il s'agit soit de l'hyaluronectine (Delpech et al., 1995), soit de complexes extraits de cartilage (Stern and Stern, 1992). Aucune de ces deux substances n'est disponible commercialement. Dès lors, dans ce travail de mémoire, nous avons choisi deux autres techniques.

La première est une électrophorèse en gel d'agarose des produits de la réaction hyaluronidase (Lee and Cowman, 1994). Cette méthode se base sur une mesure du poids moléculaire moyen de l'hyaluronan après électrophorèse sur gel d'agarose et détection au moyen du colorant Stains-all (3,3'-diethyl-9-methyl-4,5,4',5'-dibenzothiacarbocyanine). Elle permet de révéler des activités de dégradation partielle de l'acide hyaluronique qui laisseraient subsister des fragments de poids moléculaire moyen.

La deuxième technique utilisée est la zymographie, c'est-à-dire une électrophorèse SDS-PAGE des extraits tissulaires ou cellulaires dans un gel contenant de l'acide hyaluronique (Fischer-Szafarz, 1984). Les avantages de cette technique sont sa grande sensibilité et le fait que l'enzyme est séparée de ses inhibiteurs lors de la migration. Cette méthode ne met en évidence que les activités de dégradation complète de l'acide hyaluronique. Elle a permis d'observer un polymorphisme de l'enzyme hyaluronidase dans le sérum de nombreuses espèces (Fischer-Szafarz, 1984).

1.3 Description des hyaluronidases connues chez les eucaryotes

Tout comme l'hyaluronan, les hyaluronidases sont ubiquistes dans le monde vivant. On mesure leur activité dans toutes les espèces où elles ont été étudiées ainsi que dans tous les

Origine de l'hyaluronidase	PM en kDa	pH d'activité optimum	Référence
Invertébrés			
vers nématodes	49 et 87	6.0-8.0	Hotez, 1992
sangsues	28,5	5.3	
crustacés	80	5.3	
venin d'insectes			
abeille	46	7.0	Gmachl and Kreil, 1993
frêlon	43	7.0	Lu et al., 1995
Vertébrés			
venin de vertébrés			
"stonefish"	62	6.0	Poh et al., 1992
lézard	63	5.0	
PH-20			Cherr et al., 1996
forme GPI	64	7.0	
forme soluble	53	4.0	
foie			
homme	76	3.8-4.0	Gold, 1982
rat	89	3.5	Aronson and Davidson, 1967
cochon	70	ND	Joy et al., 1985
rein de porc	ND	3.5	Afify et al., 1993
macrophages alvéolaires	ND	3.9	Goggins et al., 1968
peau de rat	ND	3.7	Cashman et al., 1969
fibroblastes d'embryon de poulet	62	3.7	Orkin and Toole, 1980
plasma humain	57	3.8	Frost et al., 1997
urines	57 et 45	<4.6	Csóka et al., 1997
fluide synovial	60	ND	Stephens et al., 1975
tissu osseux	ND	3.7	Vaes, 1967
humeur vitrée	59	ND	Schwartz et al., 1996
endothélium cornéen	ND	4.0	Schwartz et al., 1997
système lymphatique	ND	ND	
Hyal-2			
homme	62	<4.0	Lepperdinger et al., 1998
rat	62	3.7	Flamion et al., 1997
souris	57	ND	Strobl et al., 1998

Tableau 1.5 : Récapitulatif des PM et des pH d'activité optimale des hyaluronidases connues chez les eucaryotes.

tissus des individus appartenant à ces espèces. On découvre dès lors un nombre impressionnant d'hyaluronidases (Kreil, 1995 ; Frost et al., 1996). Cette très forte distribution s'expliquerait par duplication génique qui aurait eu lieu il y a environ 300 millions d'années.

Le Tableau 1.5 résume le PM et le pH d'activité optimal des principales hyaluronidases eucaryotiques. Nous n'allons détailler que les formes décrites chez les vertébrés.

1.3.1 L'hyaluronidase testiculaire ou PH-20

Il est connu depuis longtemps que les extraits de testicules de mammifères ont une activité hyaluronidasique (Duran-Reynals, 1928). En 1993, on attribua cette activité à la protéine PH-20 qui est présente dans la membrane de l'acrosome des spermatozoïdes (Gmachl and Kreil, 1993).

La PH-20 existe sous 2 formes au sein des spermatozoïdes : soit une forme de 64 kDa active à pH neutre, qui est attachée à la membrane via une attache GPI, soit une forme soluble de 53 kDa, active à pH acide (Cherr et al., 1996). La plus grande reste ancrée dans la membrane interne de l'acrosome et la seconde forme serait formée par protéolyse juste avant la réaction acrosomale. Le rôle de ces 2 formes de PH-20 n'est pas encore tout à fait défini mais il est pratiquement sûr que la PH-20 de 64 kDa facilite le passage du spermatozoïde dans la matrice extracellulaire de l'ovule, en détruisant l'acide hyaluronique du cumulus oophorus (Myles and Primakoff, 1997). On comprend dès lors l'importance capitale des hyaluronidases lors de la fécondation. Ainsi il a été montré que des cobayes immunisés contre leur propre PH-20 deviennent stériles.

1.3.2 L'hyaluronidase hépatique

Le foie et les reins sont des sites majeurs de la dégradation de l'hyaluronan (Frost et al., 1996). Dans le foie, l'activité hyaluronidasique se trouve concentrée dans les lysosomes (Hutterer, 1966 ; Aronson and Davidson, 1967). Le fait que cette hyaluronidase soit présente dans la fraction lysosomale exige qu'elle soit active à pH acide.

L'hyaluronidase hépatique a été purifiée et étudiée chez plusieurs espèces : chez le rat (Hutterer, 1966 ; Aronson and Davidson, 1967), chez l'homme (Gold, 1982) et chez le cochon (Joy et al., 1985).

1.3.3 L'hyaluronidase rénale

On trouve aussi une hyaluronidase qui agit à pH acide dans le rein (Bollet et al., 1963). Son activité a été détectée dans toutes les parties du rein (cortex, médullaire externe et médullaire interne) (Flamion et al., 1997) et dans les urines (Dicker and Elliott, 1963).

Le pH optimum de l'hyaluronidase rénale est de 3.5 (Afify et al., 1993). La concentration de l'enzyme varie en période d'hydratation et de déshydratation. C'est ainsi que l'activité hyaluronidasique de la médullaire interne augmente lors de déshydratation chez le rat, parallèlement à une diminution du contenu en hyaluronan de la médullaire rénale (Flamion et al., 1997).

Le fait que le rein et le foie soient les sites d'un catabolisme important de l'hyaluronan a été prouvé : d'abord, on a constaté que le blocage de vaisseaux hépatiques ou rénaux amène à une augmentation rapide d'acide hyaluronique dans le plasma (Engström-Laurent and Hellström, 1990). Il a également été montré que les personnes souffrant de problèmes rénaux ou hépatiques, comme par exemple une cirrhose, ont un taux élevé d'hyaluronan circulant qui est en relation avec la pathologie (Körner et al., 1996).

1.3.4 L'hyaluronidase de poumon

Dans les poumons, c'est dans les macrophages alvéolaires que l'enzyme semble la plus présente (Goggins et al., 1968). La fonction principale de l'hyaluronidase des macrophages alvéolaires pourrait être la régulation de la concentration de mucus dans les voies respiratoires (Fischer-Szafarz et al., 1988). En effet le mucus est constitué essentiellement de glycoprotéines et de glycosaminoglycans dont fait partie l'acide hyaluronique. Lors d'inflammations des

bronches, par exemple, les conséquences néfastes d'une augmentation de la sécrétion de mucus pourraient être limitées par l'activation des macrophages et donc de leurs enzymes de destruction de l'hyaluronan.

1.3.5 L'hyaluronidase de la peau

Sachant que la peau contient plus de la moitié de l'acide hyaluronique du corps (Reed et al., 1988) et que le turnover de celui-ci est très important (Frost et al., 1996), on peut s'attendre à découvrir un hyaluronidase dans la peau (Cashman et al., 1969). Celle-ci pourrait provenir des fibroblastes cutanés ou des vaisseaux lymphatiques irriguant le derme.

1.3.6 L'hyaluronidase des fibroblastes

La présence d'une hyaluronidase dans les fibroblastes reste controversée. En 1975, Arbogast et al. montraient que les fibroblastes cutanés humains en culture ne possédaient pas d'activité hyaluronidasique (Arbogast et al., 1975). Dans les années qui suivirent, on détecta cette activité dans les fibroblastes de la peau de lapin et dans ceux de tendons d'embryons de poulet (Orkin and Toole, 1980). Dans ce dernier cas, l'hyaluronidase fut isolée. Elle a un PM et un pH d'activité optimale semblables à ceux des autres hyaluronidasés isolés dans les tissus (cf Tableau 1.5). Il se pourrait que le fait de détecter une activité hyaluronidasique ou pas soit dû à la méthode d'extraction des fibroblastes.

1.3.7 L'hyaluronidase du plasma et des urines

La forme d'hyaluronidase responsable de l'activité hyaluronidasique dans le plasma humain a été isolée (Afify et al., 1993) puis clonée. Elle fut appelée Hyal-1 (Frost et al., 1997). Le gène de l'Hyal-1 humaine code pour une protéine de 435 acides aminés, soit 57 kDa, qui possède une activité optimale à pH 3.8. Les concentrations plasmatiques de l'enzyme sont très basses, de l'ordre de 10^{-9} M. L'alignement de séquences d'Hyal-1 avec PH-20 montre 40% d'identité et 60% d'homologie, mais Hyal-1 ne possède vraisemblablement pas de queue GPI, contrairement à la PH-20.

Des transcrits d'Hyal-1 ont été trouvés dans le cœur, le foie, les poumons, le placenta, les reins et les muscles squelettiques, mais pas dans le cerveau (Frost et al., 1997). De plus, la détection en Northern Blot de l'ARNm d'Hyal-1 chez la souris montre une forte expression dans le foie et dans le rein (Csóka et al., 1998), ce qui conforte l'idée que ce sont bien des sites majeurs de la dégradation de l'acide hyaluronique. Chez la souris, l'ARNm d'Hyal-1 est détecté dans le cerveau (Csóka et al., 1998).

L'origine cellulaire de Hyal-1 plasmatique reste inconnue, mais on vient de décrire le phénotype humain d'une mutation du gène *HYAL-1* (Triggs-Raine et al., 1999). La maladie qui en découle est une forme légère de mucopolysaccharidose.

Hyal-1 ne serait pas seulement présente dans le plasma mais se retrouverait aussi dans les urines, qui contiennent 2 isozymes d'hyaluronidases: l'une de 57 kDa qui est vraisemblablement l'Hyal-1 plasmatique et l'autre de 45 kDa, résultat de la protéolyse de la première. Cette dualité rappelle la situation de la PH-20 (Cherr et al., 1996); toutes deux subissent peut-être le même processus protéolytique (Csóka et al., 1997).

En résumé, vu son PM, son pH d'activité et son caractère ubiquiste, Hyal-1 est peut-être une des formes majeures d'hyaluronidase de l'organisme, mais son étude au niveau tissulaire ne fait que débiter.

1.3.8 Les hyaluronidases de divers tissus

On a signalé la présence d'hyaluronidases d'origine lysosomale dans le tissu osseux (Vaes, 1967) ainsi que dans le fluide synovial. Cette dernière voit son activité décuplée lors de rhumatismes articulaires (Stephens et al., 1975).

On trouve aussi une hyaluronidase dans l'humeur vitrée, dont elle régule la structure gélifiée (Schwartz et al., 1996), et dans la cornée de l'œil (Schwartz et al., 1997).

1.3.9 L'hyaluronidase du système lymphatique

La majeure partie de l'acide hyaluronique circulant se trouve dans le système lymphatique. C'est au niveau des ganglions lymphatiques qu'est dégradé l'hyaluronan. On sait que jusqu'à 90% de l'acide hyaluronique est catabolisé lors de son passage dans les ganglions avant de rejoindre la circulation sanguine (Fraser and Laurent, 1989).

Fraser et al. ont démontré que les polymères d'acide hyaluronique d'un PM supérieur à 10^6 sont dégradés plus rapidement que les petits fragments de celui-ci lors de la traversée des ganglions. De plus, la comparaison du PM de l'hyaluronan dans les vaisseaux lymphatiques afférents et efférents montre distinctement que l'hyaluronan est plus grand dans les vaisseaux afférents (Fraser and Laurent, 1989). Pour expliquer ces observations, il fut proposé à l'époque que les petits morceaux d'acide hyaluronique trouvés dans les vaisseaux efférents étaient synthétisés par les ganglions lymphatiques. Ceci supposait dès lors une dégradation totale de l'hyaluronan. Mais une autre hypothèse est possible : la dégradation de l'hyaluronan dans les ganglions lymphatiques pourrait n'être que partielle et correspondre à une forme d'hyaluronidase particulière.

1.3.10 Une nouvelle hyaluronidase : Hyal-2

En 1998, Lepperdinger et al. ont publié leurs travaux sur la découverte d'une autre forme d'hyaluronidase humaine qu'ils ont appelés Hyal-2 (Lepperdinger et al., 1998). Quelques mois plus tard, la même équipe clonait l'Hyal-2 murine (Strobl et al., 1998). Le taux de similarité des Hyal-2 de ces 2 espèces est très élevé (82% d'identité). De plus, la région du chromosome 9 de la souris et celle du chromosome 2 de l'homme, au niveau desquelles se trouve le gène d'Hyal-2, sont synthéniques (Strobl et al., 1998).

Selon Lepperdinger et al. (1998), Hyal-2 est une enzyme lysosomale soluble qui a un pH d'activité optimale inférieur à 4.0. On trouve le transcrite d'Hyal-2 dans le cœur, le placenta, les poumons, le foie, les muscles squelettiques, les reins et le pancréas à des niveaux d'expression différents. Par contre, il n'a été détecté aucune présence d'ARNm dans le cerveau (Lepperdinger et al., 1998).

CGGGCGGGCT	TAGCTGGTAC	CAGGATGGCG	GCGGCCCTGG	CGTGGGTCTCT	50
GGCGGGCGCCT	GGTGCAGATT	CCTGAGCTGC	TACCAGGCAG	GTGACACTTC	100
CTGTAGCCCC	CAGC <u>ATG</u> CGG	GCAGGACTGG	GTCCCATCAT	CACACTGGCC	150
CTAGTGCTGG	AGGTAGCATG	GGCCTCGGAG	CTTAAGCCCA	CAGCGCCGCC	200
CATCTTACC	GGCCGACCCT	TTGTGGTAGC	ATGGAATGTA	CCCACACAAG	250
AATGTGCTCC	GCGCCACAAA	GTGCCCCTGG	ACCTTAGGGC	CTTCGATGTG	300
GAGGCTACAC	CTAACGAGGG	TTTTTTCAAC	CAGAATATCA	CCACCTTCTA	350
CTATGACCGT	CTAGGCCTGT	ATCCACGTTT	TGATGCAGCT	GGGATGTCTG	400
TGCATGGTGG	CGTGCCTCAG	AACGGTAGCC	TCTGTGCACA	CCTGCCCATG	450
CTGAAGGAAG	CTGTGGAACG	CTACATTCAG	ACCCAAGAGC	CTGCGGGGCT	500
GGCGGTCAAT	GACTGGGAGG	AATGGCGACC	AGTGTGGGTT	CGAAACTGGC	550
AGGAGAAAGA	TGTGTACCGG	CAGTCTTCAC	GCCAGCTGGT	GGCCAGTCGA	600
CACCCTGACT	GGCCATCAGA	CCGAATAGTG	AAGCAGGCGC	AGTACGAATT	650
CGAGTTTCGT	GCTCGGCAGT	TCATGTTGAA	CACACTCCGT	TACGTCAAGG	700
CAGTCAGACC	TCAGCACCTG	TGGGGCTTCT	ACCTCTTTCC	TGACTGCTAT	750
AATCATGATT	ACGTACAGAA	CTGGGATAGC	TACACAGGCC	GCTGTCTCTGA	800
CGTGGAGGTG	GCACAAAATG	ACCAGTTGGC	CTGGCTCTGG	GCTGAAAATA	850
CAGCTCTCTT	TCCCTCCGTG	TACCTGGACA	AGACGCTGGC	ATCCTCCAAA	900
CACAGCCGCA	ACTTTGTGAG	CTTCCGTGTT	CAGGAAGCCC	TTCGTGTGGC	950
TCACACCCAC	CATGCAAACC	ATGCACTCCC	CGTGTATGTC	TTCACGCGTC	1000
CCACATATAC	CCGAAGGCTC	ACAGAACTTA	ACCAGATGGA	CCTCATCTCT	1050
ACCATCGGTG	AAAGCGCCGC	CCTGGGCTCA	GCTGGTGTTA	TCTTCTGGGG	1100
CGACTCAGTG	TACGCTTCAA	GTATGGAAAA	CTGCCAGAAC	CTCAAGAAGT	1150
ACCTAACGCA	GACGCTGGTC	CCCTACATAG	TCAATGTGTC	CTGGGCCACC	1200
CAGTACTGCA	GTTGGACCCA	GTGCCATGGC	CATGGGCGCT	GTGTGCGCCG	1250
CAATCCCAGC	GCCAGTACCT	TCTTGACCT	CAGTCCCAGC	AGCTTCCGCC	1300
TGGTGCCTGG	CCGCACGCC	AGTGAACCCC	AGCTTCGACC	TGAGGGGGAG	1350
CTCAGCGAAG	ATGACCTCAG	CTACCTGCAG	ATGCACTTTC	GCTGCCACTG	1400
CTATCTGGGC	TGGGGTGGTG	AGCAGTGCCA	GTGGAACCAT	AAACGGGCAG	1450
CTGGGGATGC	CAGTAGAGCC	TGGGCTGGAG	CCCACCTCGC	CAGTCTCCTG	1500
GGTTTGGTAG	CTATGACTCT	CACCTGGACC	TTAT <u>TA</u> AGGGA	TCTCTCCCCG	1550
CAGATAGCAG	TCCAGCTGGC	CTCTGGCACA	AGGATCTCCT	TGGCACAAGG	1600
AGCCTGTTAG	GGGGTAGGCA	AATGAGTCTG	GAGTTGGAGT	GGGCAGTACC	1650
CCCAGGATGC	CTAGAAGAGC	ATCCATACCA	CCTGTCACCC	CCCTGTTCTA	1700
AGGGGGAGAG	AAACATCCCC	TGAGATGCC	TCATCTTGCC	AGAGAAGACG	1750
AGGATACAGT	TAGGCCGGGG	AAGGCCTACC	TCTACTCTCT	GTTCTCTGGAT	1800
AGTTTATAAT	CTTGGGGTCT	CTTTTGTAAA	TTAAATACAA	AACAACCTGCA	1850
AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AA	1892

Fig. 1.2. Séquence du clone d'ADNc d'Hyal-2 de rat.

D'un point de vue fonctionnel, Hyal-2 se différencie de toutes les hyaluronidases connues à ce jour. En effet, Hyal-2 hydrolyse seulement l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire. Le produit de la réaction est un polysaccharide de 20 kDa correspondant à 50-60 disaccharides (Lepperdinger et al., 1998). Ceci laisse supposer qu'il existe plusieurs domaines dans l'hyaluronan et que plusieurs d'entre eux ne sont pas la cible d'Hyal-2.

Une forme rénale de l'hyaluronidase du rat a été clonée dans le laboratoire de Physiologie et Pharmacologie des FUNDP (Flamion et al., 1997). Le clone d'ADNc code pour un protéine de 473 acides aminés (Figure 1.2), dont nous aimerions préciser la fonction biochimique et le niveau d'expression dans l'organisme.

II. Buts du travail

Ce travail s'inscrit au sein de plusieurs projets qui consistent à explorer les caractéristiques moléculaires et fonctionnelles d'enzymes encore mal connues, les hyaluronidases, qui dégradent l'hyaluronan, un composant actif de la matrice extracellulaire. Une forme d'hyaluronidase nous intéresse en particulier, celle appelée "Hyal-2". Cette forme a été clonée dans le laboratoire de Physiologie et Pharmacologie. Son ARN messager est présent dans la plupart des organes, dont le rein, étudié au laboratoire. Mais l'activité de dégradation de l'hyaluronan d'Hyal-2 n'est pas encore bien définie.

Le première partie de ce travail repose donc sur une détection de l'activité hyaluronidasique au sein des tissus du rat et dans des types cellulaires rénaux de ce même organisme mammifère. Nous tenterons en particulier de déterminer si certains tissus ou types cellulaires contiennent une activité de dégradation partielle de l'hyaluronan. Pour cela, nous combinerons les résultats des deux techniques de détection d'activité hyaluronidasique : l'électrophorèse en gel d'agarose des produits de digestion de l'hyaluronan et la zymographie.

Le deuxième partie du travail concerne la détection de l'expression d'Hyal-2. En effet, le laboratoire a récemment reçu un anticorps anti-peptide dressé contre une séquence spécifique d'Hyal-2. Nous allons tenter de détecter la présence de la protéine Hyal-2 par Western blot sur des extraits tissulaires et cellulaires du rat. De plus, l'ADNc de Hyal-2 sera transfecté dans des cellules d'insectes S2, et nous tenterons aussi d'y mesurer une activité hyaluronidasique et une expression d'Hyal-2 au niveau protéique.

Finalement, nous allons nous tourner brièvement vers une autre technique d'étude de l'expression d'une protéine dans des cellules eucaryotiques : l'observation du devenir intracellulaire de Hyal-2 après sa transfection dans les cellules COS-7 sous forme d'une protéine de fusion avec une forme de "green fluorescent protein" (GFP), protéine naturellement fluorescente servant de rapporteur à l'échelle microscopique.

III. Matériel et Méthodes

III.1 Méthodes se rapportant à l'ADN

III.1.1 Culture de bactéries

III.1.1.a Milieu de culture pour les bactéries

Milieu liquide : milieu LB (Luria-Bertani)

Bacto-Tryptone	1%
Extrait de levure	0.5%
NaCl	0.17 M

Ajuster à pH 7.4

Milieu semi-solide, sur boîte de pétri

On utilise du milieu LB auquel on ajoute 15 gr/L de Bacto-agar.

Stérilisation par autoclavage de 20 minutes à 120°C.

III.1.1.b Antibiotiques

Kanamycine (Sigma) solution à 50mg/ml dans de l'eau distillée, puis stériliser par filtration sur un Milllex GV[®] 0,22 µm. Stocker à -20°C. S'utilise à raison de 100 µl de la solution stock pour 100 ml de solution.

Ampicilline (Sigma) solution à 60 mg/ml dans de l'eau distillée, puis filtrer sur un Millipore[®] 0,22 µm. Stocker à -20°C. S'utilise à raison de 100 µl de la solution stock pour 100 ml de solution.

Ces antibiotiques étant thermolabiles, ils sont ajoutés au milieu autoclavé lorsque celui-ci atteint une température suffisamment basse (50°C).

III.1.1.c Cultures

Les cultures liquides de bactéries sont réalisées dans des types de récipients différents selon qu'il s'agisse d'une culture de 5 ml (dans un tube Falcon[®] de 50 ml) pour une " mini préparation " ou d'une culture de 100 ml (dans un erlenmeyer de 1000 ml) pour une " maxi culture " .

III.1.2 Préparation d'ADN plasmidique

III.1.2.a Protocole de la mini préparation

Inoculer une colonie dans 5 ml de milieu LB contenant l'antibiotique sélectif.

Faire pousser la mini-culture pendant une nuit à 37°C sous agitation (saturation).

Centrifuger 1.5 ml de culture pendant 5 minutes dans une centrifugeuse ALC (micro-centrifugeuse 4204) à 13000 rpm.

Enlever le surnageant et ajouter 1.5 ml de culture sur le culot de bactéries.

Centrifuger 5 minutes dans les mêmes conditions.

Enlever le surnageant.

Resuspendre le culot dans 300 µl de tampon : Tris-HCl 50 mM ; EDTA 10 mM ; RNase 100 µg/ml ; pH 8.0.

Ajouter 300 µl de solution : NaOH 200 mM ; SDS 1%.

Mélanger quelques fois et incubé 5 minutes à température ambiante.

Ajouter 300 µl de tampon : acétate de potassium 2.55 mM, amené à pH 5.5 avec de l'acide acétique.

Centrifuger 15 minutes à 4°C.

Récupérer le surnageant dans un autre eppendorf et ajouter 700 µl d'isopropanol.

Centrifuger 15 minutes à froid.

Décanté prudemment et ajouter 100 µl d'éthanol 70%.

Centrifuger 10 minutes à froid.

Enlever le surnageant et faire sécher le culot.

Resuspendre dans 20 µl d'H₂O.

III.1.2.b Protocole de la maxi préparation

Nous avons utilisé le " Kit Qiagen-tip 500 " de Qiagen.

Diluer 1 ml de culture, ayant servi à la mini-préparation dans 100 ml de LB contenant l'antibiotique approprié dans un erlenmeyer.

Incuber toute la nuit à 37°C sous une agitation de 200 rpm.

Récupérer la culture dans une bouteille Nalgène®.

Centrifuger 20 minutes à 4°C et à 6200 rpm dans une centrifugeuse Beckman (J-21B) équipée d'un rotor JA 14.

Enlever le surnageant et resuspendre le culot dans 10 ml de tampon P1 (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 ; EDTA 10 mM ; 100 µg/ml RNase).

Ajouter 10 ml de tampon P2 (NaOH 200 mM ; SDS 1%). Mélanger doucement et laisser reposer à température ambiante pendant 5 minutes.

Ajouter 10 ml de tampon P3 glacé (acétate de potassium 3.0 M pH 5.5). Mélanger 4 à 6 fois et incuber 20 minutes dans la glace.

Centrifuger une première fois 30 minutes à 4°C et à 12500 rpm dans la centrifugeuse Beckman (J-21B) munie d'un rotor JA 20.

Récupérer le surnageant dans un autre tube Nalgène® et recentrifuger 20 minutes.

Equilibrer la colonne Qiagen-tip 500 avec 10 ml de tampon QBT (NaCl 750 mM ; MOPS 50 mM pH 7.0 ; isopropanol 15% ; Triton X-100 0.15%).

Déposer le surnageant sur la colonne.

Laver la colonne avec 2×30 ml de tampon QC (NaCl 1.0 M ; MOPS 50 mM pH 7.0 ; isopropanol 15%).

Eluer avec 15 ml de tampon QF (NaCl 1.25 M ; Tris-HCl 50 mM pH 8.5 ; isopropanol 15%).

Récupérer l'éluat dans un tube Nalgène® et y ajouter 0.7 volume d'isopropanol.

Centrifuger 45 minutes à 4°C et à 10000 rpm (JA 20).

Enlever le surnageant et resuspendre le culot dans 5 ml d'éthanol 70%.

Centrifuger 45 minutes à 4°C et à 10000 rpm (JA 20).

Enlever tout le surnageant et laisser sécher le culot.

Resuspendre le culot dans 50 µl d'H₂O stérile et transférer le tout dans un eppendorf de 1.5 ml.

Stocker à -20°C.

III.1.3 Quantification d'ADN au spectrophotomètre

La densité optique (DO) de l'échantillon dont on veut connaître la concentration est lue au spectrophotomètre Perkin-Elmer. La longueur d'onde à laquelle absorbe l'ADN est de 260 nm. Sachant qu'une unité de DO correspond à 50 µg d'ADN par ml et tenant compte de la dilution réalisée au préalable, il est possible de connaître la concentration en ADN de l'échantillon.

Il est également intéressant de connaître la pureté de l'échantillon en ADN. Pour se faire, on calcule le rapport des DO de l'échantillon à 260 nm et à 280 nm (longueur d'onde des protéines). Ce rapport doit idéalement se trouver entre 1.6 et 2.0.

III.1.4 Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN suivant leur taille respective.

A préparer :

Gel d'agarose 1% : 1% d'agarose dans du TAE 1X

Tampon TAE 50X (c'est-à-dire 50 fois plus concentré que nécessaire):

Tris 2 M

CH₃COONa glacial 1 M

EDTA 50 mM

Bromure d'éthidium 10 mg/ml

Solution alourdissante (6X) :

Bleu de bromophénol 0.25%

Xylène cyanol FF 0.25%

Ficoll (type 400) 15%

Enzyme de restriction	Profil de restriction	Tampon optimal
<i>Afl</i>	5'-C/TTAAG-3' 3'-GAATT/C-5'	1
<i>Bam</i> HI	5'-G/GATCC-3' 3'-CCTAG/G-5'	3
<i>Kpn</i> I	5'-GGTAC/C-3' 3'-C/CATGG-5'	4
<i>Not</i> I	5'-GC/GGCCGC-3' 3'-CGCCGG/CG-5'	3
<i>Xho</i> I	5'-C/TCGAG-3' 3'-GAGCT/C-5'	2

Tableau 3.1 : Enzymes de restriction utilisées durant ce travail.
La composition des tampons est décrite dans le texte

Protocole :

Préparer un gel avec 100 ml d'une solution TAE 1X, agarose 1% et y ajouter 0.01 mg de bromure d'éthidium. Celui-ci permettra la visualisation des fragments d'ADN aux UV.

Charger les puits du gel après avoir ajouté aux échantillons 1/6 de solution alourdisante.

Faire migrer les échantillons à 80 Volts dans le tampon d'électrophorèse (0.01 mg de bromure d'éthidium dans du TAE 1X). Le courant électrique imposé dans la cuve (HORIZON[®] 11-14 de Gibco BRL) va faire migrer l'ADN qui est chargé négativement vers l'anode.

III.1.5 Restriction d'ADN

La réaction de restriction est réalisée par des enzymes de restriction. Ce sont des endonucléases bactériennes qui reconnaissent des séquences de 4 à 8 paires de base sur l'ADN. Ces courtes séquences sont appelées " sites de restriction " L'enzyme agit de telle façon qu'elle se fixe en son site qui lui est spécifique et scinde les 2 brins d'ADN.

Certaines enzymes cliveront l'ADN double brin de manière symétrique : on parle de bouts francs, tandis que d'autres couperont de manière asymétrique : on parle alors de bouts collants.

Les enzymes (Tableau 3.1) et les tampons sont achetés chez Gibco BRL. Le tampon utilisé est choisi en fonction d'une table récapitulative indiquant le pourcentage d'activité de chaque enzyme dans les différents tampons.

La composition des tampons est la suivante :

Tampon 1 : Tris-HCl 50 mM, pH 8

MgCl₂ 10 mM

Tampon 2 : Tris-HCl 50 mM, pH 8

MgCl₂ 10 mM

NaCl 50 mM

Nom des amorces	Séquence des amorces	Site introduit	Tm (2 AT + 4 GC)	Localisation des amorces (plasmides ou ADNc)
MT Forward priming site	5'-G-AAT-CAT-CTC-AGT-GCA-ACT-AAA-G-3'		64°C	pMT/V5-His B (814-831)
asPB14	5'-CGG-CGC-TTT-CAC-CGA-TGG-3'		60°C	Hyal-2 (1069-1052)
5'NAfIII-EGFP	5'-AAC- TTA-AGG -TGA-GCA-AGG-GCG-AGG-AG-3'	AfIII	92°C	EGFP (682-699)
3'NAfIII-EGFP	5'-AAC- TTA-AGC -TTG-TAC-AGC-TCG-TCC-TAC-3'	AfIII	78°C	EGFP (1395-1378)
sForward-EGFP	5'-AAA-CGG-CCA-CAA-GTT-CAG-CG-3'		62°C	EGFP (747-766)

Tableau 3.2 : Liste et caractéristiques des amorces utilisées pour les réactions PCR.

Tampon 3 : Tris-HCl 50 mM, pH 8

MgCl₂ 10 mM

NaCl 100 mM

Tampon 4 : Tris-HCl 20 mM, pH 7.4

MgCl₂ 5 mM

KCl 50 mM

La réaction de restriction comprend :

le plasmide ou le fragment d'ADN à restreindre

le tampon de restriction

la ou les enzyme (s) de restriction

H₂O distillée stérile pour porter à volume

On incube à la température optimale d'activité de l'enzyme.

III.1.6 PCR ou Polymerase Chain Reaction

La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR est une méthode utilisée pour amplifier une séquence d'ADN.

Le mélange de réaction contient pour un volume total de 20 µl :

l'ADN cible, 20 ng ou bien, s'il s'agit d'une colonie resuspendue dans 20 µl d'eau, un aliquot de 2 µl

les 2 amorces (5' et 3'), 1 µl d'une solution stock 10 µM pour chacune d'elles (Tableau 3.2)

la Taq DNA polymérase 0.5 µl d'une préparation à 5 U/µl de chez Boehringer-Mannheim

les 4 bases nucléotidiques 1 µl d'une solution stock 10 µM

le tampon Taq (10×), 2 µl

de l'eau stérile nécessaire pour obtenir le volume final de 20 µl

La polymérisation est initiée par des amorces oligonucléotidiques. Ces amorces sont choisies par l'expérimentateur de telle sorte qu'elles iront s'hybrider en 3' et en 5' du fragment à amplifier.

Pour obtenir un grand nombre de copies du fragment désiré, la réaction s'effectue en une série de cycles successifs. Le nombre de cycles varie entre 15 et 40, ils comportent différentes étapes :

- L'étape de dénaturation permet le détachement des deux brins d'ADN cible. Nous avons utilisé une température de 94°C pour réaliser cette étape.
- L'étape d'hybridation permet aux amorces de s'hybrider au brin matrice d'ADN. La température d'hybridation doit être de 4 à 5°C inférieure à la température de fusion (température de melting= T_m) des amorces. Le T_m est lui-même calculé à partir de la formule « $2 AT + 4 GC$ » dans la séquence des amorces. Dès lors, la température d'hybridation doit être d'une part suffisamment basse pour permettre l'hybridation spécifique des amorces à leur séquences complémentaires sur l'ADN et d'autre part assez élevée pour éviter une hybridation non spécifique. Nous avons utilisé dans les PCR de contrôle des températures d'hybridation de 57°C, tenant compte des T_m présentés dans le Tableau 3.2. Pour la PCR d'amplification de l'ORF de l'EGFP avec introduction de sites de restriction *AflIII*, utilisant les amorces 5'-N-AflIII-EGFP et 3'-N-AflIII-EGFP nous avons opté pour une température de 55°C.
- L'étape d'élongation est l'étape de polymérisation du brin anticomplémentaire. L'élongation est réalisée par la Taq polymérase. Cette enzyme est thermostable et a une activité optimale aux environs de 75°C.

Chaque fragment formé lors d'un cycle servira de matrice pour la synthèse suivante. A la fin de la réaction, on aura amplifié le fragment d'origine de 2^n (où n est le nombre de cycles).

La dernière étape de la PCR consiste à incuber le mélange réactionnel pendant une dizaine de minutes à 72°C afin que la Taq polymérase termine l'élongation des brins néosynthétisés. Dans ce travail nous avons toujours utilisé 30 cycles de PCR.

III.1.7 Purification de fragments d'ADN à partir de gel d'agarose

Le but de cette méthode est de purifier un fragment d'ADN ayant préalablement migré sur un gel d'agarose 1%. Nous avons utilisé le kit "Qiaquick Gel Extraction" (Qiagen).

Exciser du gel la bande d'intérêt contenant l'ADN.

Déposer le morceau d'agarose contenant l'ADN dans un eppendorf.

Peser le morceau d'agarose.

Ajouter 3 volumes de tampon QG.

Incuber 20 minutes à 50°C.

Vortexer toutes les 3 minutes pendant l'incubation afin de s'assurer que l'agarose soit bien dissous.

Ajouter 1 volume d'isopropanol à l'échantillon et agiter.

Placer une colonne " QIAquick spin " dans un tube de 2 ml.

Poser l'échantillon sur la colonne, 800 µl au maximum.

Centrifuger à la Biofuge® (Heraeus) à 13000 rpm pendant 1 minute.

Poser 0.5 volume de tampon QG sur la colonne et centrifuger 1 minute à la Biofuge®.

Laver la colonne avec 0.75 volume de tampon PE. Laisser reposer 2 minutes puis centrifuger à la Biofuge® pendant 1 minute.

Centrifuger une seconde fois pour s'assurer qu'il ne reste plus de tampon PE sur la colonne.

Placer la colonne dans un eppendorf de 1.5 ml.

Eluer l'ADN en ajoutant 30 µl de tampon EB (Tris-HCl 10 mM pH 8.5). Laisser reposer 1 minute puis centrifuger pendant 1 minute à la Biofuge®.

Récupérer l'éluat.

Notons que la composition des tampons QG et EB n'est pas fournie dans le kit.

III.1.8 Ligation

La réaction de ligation permet l'insertion d'un fragment restreint d'ADN dans un plasmide ayant subi la même restriction que l'insert. La réaction est catalysée par la T4 DNA ligase qui va former une liaison phosphodiester entre l'extrémité 3' hydroxyle et l'extrémité 5' phosphate de chacun des 2 ADN double brin à liguer.

La réaction de ligation se fait dans un volume aussi faible que possible et comprend:

le vecteur linéarisé
le fragment à insérer
du tampon de ligation
l'enzyme de ligation qui est la " T4 DNA ligase " (Biolabs)
H₂O distillée stérile pour porter au volume désiré

Le tampon de ligation (1×) contient:

Tris-HCl pH 7.5	50 mM
MgCl ₂	10 mM
Dithiothreitol	10 mM
ATP	1 mM
BSA (Bovine Serum Albumin)	25 µg/ml

L'incubation se fait toute la nuit à 14°C.

III.1.9 Extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique

L'extraction d'ADN au phénol/chloroforme/alcool isoamylique permet de purifier l'ADN en se débarrassant des protéines et des sels contenus dans un échantillon.

Le protocole est le suivant :

Porter le volume de la solution dont on veut extraire l'ADN à 200 µl avec de l'H₂O stérile.

Ajouter 1 volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique se trouvant en solution (à 4°C) dans des proportions respectives de 25, 24 et 1 volume.

Vortexer 30 secondes à 1 minute.

Centrifuger 5 minutes à température ambiante.

Récupérer la phase aqueuse dans laquelle se trouve l'ADN purifié.

Précipiter à l'éthanol.

III.1.10 Précipitation à l'éthanol

Le rôle de la précipitation à l'éthanol est de concentrer l'ADN.

Ajouter à l'échantillon de départ 2.5 volumes d'éthanol 100% et 0.1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 7.

Incuber 10 minutes à -80°C.

Centrifuger à froid et à 13000 rpm pendant 20 minutes.

Décantier et resuspendre le culot dans 250 µl d'éthanol 70%.

Centrifuger à froid et à 13000 rpm pendant 15 minutes.

Enlever le surnageant et sécher à la machine Speed Vac[®] pendant 5 minutes.

Resuspendre le culot dans 20 µl d'H₂O stérile.

III.1.11 Transformation

La transformation permet d'introduire de l'ADN exogène à l'intérieur de microorganismes.

III.1.11.a Cellules électrocompétentes

Faire pousser les bactéries à 37°C en culture semi-solide (LB-agar) sur boîte de Pétri.

Faire une pré-culture à partir d'une colonie prélevée sur une boîte de LB agar.

Ensemencer une colonie de ces bactéries dans un Falcon[®] contenant 10 ml de LB.

Placer le Falcon[®] dans l'incubateur à 37°C en agitant à 200 rpm pendant 16 heures.

Dans un erlenmeyer, ensemencer 200 ml de LB avec 10 ml de la pré-culture et replacer dans l'incubateur à 37°C.

Mettre la culture 30 minutes dans la glace lorsque la D.O. se situe entre 0.5 et 0.8.

Récupérer la culture dans une bouteille Nalgène[®].

Centrifuger 15 minutes à 4°C et à 2000 × g dans une centrifugeuse Beckman (J-21B) munie d'un rotor JA 14.

Décantier et resuspendre le culot bactérien dans 200 ml d'H₂O glacé.

Centrifuger (rotor JA 14) 15 minutes à 4°C et à 2000 × g.

Décantier et resuspendre le culot bactérien dans 50 ml d'H₂O glacée.

Centrifuger (rotor JA 14) 15 minutes à 4°C et à 2000 × g.

Décantier et resuspendre le culot bactérien dans 4 ml de glycérol 10% froid.

Nom des amorces	Séquence des amorces	Localisation des amorces (plasmides ou ADNc)
asPB4	5'-ACG-ACA-TTC-TTG-TGT-GGG-3'	Hyal-2 (258-241)
asHyal3SD	5'-CTG-CTT-CAC-TAT-TCG-GTC-TG-3'	Hyal-2 (636-617)
M13 Reverse	5'-TCA-CAC-AGG-AAA-CAG-CTA-TGA-C-3'	pBLUESCRIPT (587-608)

Tableau 3.3 : Liste des amorces utilisées pour les réactions de séquençage.

Centrifuger 15 minutes à 4°C et à 4000 × g dans une centrifugeuse Jouan (CR 312)

Décantier et resuspendre le culot bactérien dans 1 ml de glycérol 10% froid.

Aliquoter et stocker à -80°C.

III.1.11.b Transformation par électroporation

Nous avons utilisé l'électroporateur "Gene Pulser" couplé au "Pulse Controller" de Biorad.

Décongeler un tube contenant 100 µl de bactéries rendues compétentes pour l'électroporation. Ajouter 2 à 3 µl de mélange de ligation.

Placer ce mélange dans une cuvette d'électroporation préalablement refroidie dans la glace.

Réaliser le choc électrique à 2300 Volts.

Ajouter 1 ml de milieu LB.

Incuber 2 heures à 37°C.

Etaler sur milieu sélectif.

Incuber toute la nuit à 37°C.

III.1.12 Séquençage automatique (Perkin Elmer)

Le séquençage automatique repose sur l'utilisation de didésoxynucléotides chacun couplé à une molécule fluorescente différente. Cette réaction, basée sur la méthode de terminaison de chaînes par incorporation de didésoxynucléotides, consiste en une amplification linéaire du produit à partir d'une amorce spécifique, au moyen d'une ADN polymérase et de nucléotides. Elle se termine par l'incorporation d'un des quatre didésoxynucléotides.

Amplification du fragment d'ADN à séquencer

Chaque tube comprend :

l'ADN cible

une amorce en 5' ou en 3' du fragment à amplifier (Tableau 3.3)

du tampon Tris-HCl 2M ; MgCl₂ 5mM ; PH 9

le mélange de didésoxynucléotides (Terminator Ready Reaction Mix)

Cycle d'amplification :	96°C	96°C	50°C	60°C	4°C
Durée :	5'	30''	15''	4'	Over

répété 25×

On procède ensuite à une purification par précipitation à l'éthanol.

III.2 Méthodes se rapportant aux protéines

III.2.1 Préparation tissulaire

Disséquer le rat et prélever différents organes qui sont : cerveau, cœur, foie, muscle squelettique, poumons, rate et reins. Certains reins ont été subdivisés en: cortex, médullaire externe et médullaire interne.

Placer chaque organe dans un béccher contenant la solution physiologique (NaCl 9‰) glacée. Toutes les manipulations qui vont suivre se font dans la glace.

Afin de faciliter l'homogénéisation, couper les organes en fins morceaux à l'aide d'une paire de ciseaux. Placer les morceaux d'organes dans un Falcon[®] et leur ajouter le milieu de solubilisation : soit une solution NaCl 0.15 M ; SDS 1% pour la zymographie, soit du tampon de lyse à pH 7.4 (Tris 50 mM ; NaCl 150 mM ; Nonidet P40 [NP40] 1%) pour le gel d'agarose d'analyse de l'HA et pour le Western Blot. Dans certains cas, un cocktail d'inhibiteurs de protéases " COMPLETE " (Boehringer Mannheim) est ajouté au milieu de lyse ainsi que du PMSF (phénylméthylsulfonylfluoride) à une concentration finale de 100 µg/ml.

L'homogénéisation se fait à l'aide d'un Potter Elvehem.

Pour le cœur et le muscle squelettique, nous avons procédé différemment. Ces organes ont été broyés en fine poudre. Cette opération a été rendue possible par l'ajout au préalable d'azote liquide aux tissus.

Les homogénats sont ensuite soniqués pendant 15 secondes (Microson de Misonix) dans la glace afin d'éviter un réchauffement de l'échantillon.

Le stockage se fait à -20°C.

III.2.2 Préparation cellulaire

III.2.2.a Les cellules S2

La lignée cellulaire S2 (Schneider II) provient de cellules embryonnaires de *Drosophila melanogaster* en culture primaire (Schneider, 1972). Les cellules S2 croissent à température ambiante (22 à 24°C) et en absence de CO₂. La caractéristique principale de ces cellules est qu'elles sont semi-adhérentes sur support en plastique.

Les cellules S2 sont cultivées en milieu Schneider's Drosophila Medium (Gibco BRL n 21720) additionné de Fetal Bovine Serum (FBS 10%) auquel on ajoute de la gentamycine (10 µg/ml). Lorsque les cellules sont en hyper-confluence, on sous-cultive par dilution. Une hyper-confluence se traduit par des amas de cellules S2 dans le milieu.

Les cellules S2 sont facilement détachables. Il suffit de tapoter la boîte de culture pour en récupérer la majeure partie dans le milieu. La trypsinisation n'est donc pas nécessaire dans le cas des cellules S2.

III.2.2.b Les cellules COS-7

Les cellules COS-7 constituent une lignée fibroblastique de rein de singe vert africain (originellement nommée CV-1) immortalisée au moyen de l'antigène T du virus SV-40 (Gluzman, 1981).

Solutions à préparer :

DMEM : pH 7.3

DMEM Gibco BRL n° 31600

NaHCO₃ 25 mM
HEPES 15 mM
PBS : pH 7.2
KH₂PO₄ 1.54 mM
Na₂HPO₄.2H₂O 2.7 mM
NaCl 154 mM

Culture des cellules COS-7

Les cellules COS-7 sont cultivées en milieu DMEM-FBS 10% auquel on ajoute de la streptomycine (100 µg/ml) et de la pénicilline (100 U/ml) ; toutes deux de Sigma. Ce milieu est changé tous les deux jours.

Les cellules COS-7 ont un temps de doublement assez court. Lorsqu'elles sont à confluence, on procède à leur trypsinisation.

Trypsinisation des cellules COS-7

Pour une boîte de 80 cm² :

Aspirer le milieu des cellules et rincer celles-ci deux fois avec 10 ml de PBS à 37°C.

Mettre sur les cellules 5 ml de PBS-Trypsine (0.05%)-EDTA (5 mM pH 8.0).

Laisser agir 5 à 10 minutes dans l'étuve à 37°C.

Dès que les cellules se détachent, ajouter (pour neutraliser la trypsine) un volume important de PBS ou de DMEM avec FBS 10%, directement dans la boîte.

Prélever le milieu et centrifuger dans la Jouan[®] (CR 312) à température ambiante et à 1000 rpm pendant 10 minutes.

Eliminer le surnageant et resuspendre le culot avec 20 ml de DMEM-FCS 10%.

Compter les cellules et repiquer 500,000 cellules par boîte de 80 cm².

Ajouter le milieu DMEM-FBS 10% ainsi que les antibiotiques (streptomycine et pénicilline).

Mettre les boîtes dans l'incubateur à 37°C en présence de 5% de CO₂.

III.2.3 Préparation des extraits cellulaires

Le milieu cellulaire est prélevé, puis les cellules sont trypsinisées et centrifugées 10 minutes à 1200 rpm dans une centrifugeuse Jouan (CR 312).

Resuspendre le culot dans 200 µl de tampon approprié.

Soniquer les échantillons pendant 15 secondes dans la glace.

Le stockage se fait à -20°C.

III.2.4 Concentration des milieux de culture cellulaires

Les milieux cellulaires sont concentrés avec les "Centriprep concentrators YM-10" de Amicon. Le principe est de verser un maximum de 12 ml de milieu dans le "sample container" du Centriprep YM-10 et de centrifuger le Centriprep à 3000 × g (Jouan CR 312) à 4°C. On élimine ainsi les sels et les protéines ayant un poids moléculaire inférieur à 10000. La sélection des PM est réalisée grâce à une membrane de cellulose.

III.2.5 Dosage des protéines

On utilise le kit "Biorad Protein Assay" (Biorad) qui nous permettra de doser colorimétriquement les protéines contenues dans nos extraits tissulaires et cellulaires. La solution de ce kit contient de l'acide phosphorique, du méthanol et du bleu brillant de Coomassie G-250 qui absorbe à une longueur d'onde de 595 nm.

Afin d'obtenir un résultat précis, il faudra auparavant étalonner le spectrophotomètre avec une quantité croissante d'étalon. On utilise comme étalon standard la BSA (Bovine Serum Albumin) 2 mg/ml diluée 20 fois. On mesure des quantités croissantes d'étalon dans un volume total de 100 µl. Chaque cuvette étalon contient alors 100 µl d'étalon dilué et 900 µl d'une solution contenant 200 µl de "Biorad Protein Assay" et 700 µl d'H₂O.

On procède ensuite comme suit :

Préparer des dilutions de nos échantillons.

Prélever 100 µl de chaque dilution.

Ajouter 900 µl de la solution " Biorad Protein Assay " et H₂O.

Bien entendu, pour être valables, les lectures correspondant aux dilutions des différents échantillons doivent se situer dans la même zone de lecture que celles de l'étalon.

Les échantillons étant prêts, on peut alors lire leur absorbance à une longueur d'onde de 595 nm correspondant au maximum d'absorption du bleu brillant de Coomassie G-250.

III.2.6 Mesure de l'activité enzymatique

III.2.6.a Electrophorèse en gel d'agarose des produits de la digestion enzymatique (Lee and Cowman, 1994)

Principe

La méthode a été développée par analogie avec celles utilisées pour l'analyse d'ADN. Le gel d'agarose retarde la mobilité des molécules d'acide hyaluronique (HA) de manière dépendante du poids moléculaire. Il permet non seulement de visualiser l'hyaluronan encore présent après digestion avec un extrait cellulaire ou tissulaire, mais aussi d'examiner sa distribution en poids moléculaire. Cette méthode se déroule comme ceci : d'abord, les échantillons, dont on désire détecter l'activité enzymatique, sont mis en contact d'acide hyaluronique exogène de PM élevé. Le mélange incube au pH optimal d'activité pendant une nuit à 37°C, les hyaluronidases vont agir et dès lors dégrader l'acide hyaluronique. Les échantillons sont déposés et migrent sur un gel d'agarose 0.5%. Des étalons d'acide hyaluronique de PM différents ($2 \cdot 10^5$ et $2 \cdot 10^6$) ont aussi été déposés sur le gel. On applique ensuite un champ électrique. Si les molécules d'acide hyaluronique ont subi une dégradation partielle lors du contact avec les différents extraits, alors le PM apparent de la masse d'acide hyaluronique sera diminué. Par contre, si la dégradation est totale, l'acide hyaluronique ne sera plus détectable. L'acide hyaluronique est détecté par application d'un colorant, le Stains-all au gel d'agarose. Le Stains-all est un colorant cationique et va dès lors se fixer aux molécules anioniques dont fait partie l'acide hyaluronique. C'est la raison pour laquelle l'acide hyaluronique détecté sera de couleur bleue. Les avantages de cette technique sont sa

bonne sensibilité ainsi que sa reproductibilité. L'inconvénient de cette méthode est que le colorant Stains-all est photosensible et donc qu'il faille garder le gel à l'abri de la lumière.

Digestion de l'acide hyaluronique

Préparer les échantillons pour la digestion de l'HA.

Mettre 10 µg de HA de cordon ombilical humain (Sigma), d'un PM moyen de 2.10^6 , au contact d'un aliquot de chacun des extraits tissulaires ou cellulaires.

Ajuster le pH avec du tampon formate 1 M pH 3.7. Ce pH correspond au pH d'activité optimale des hyaluronidases connues.

Mettre les échantillons au bain agitant à 37°C pendant 22 heures.

Déposer les échantillons sur le gel

Prélever 40 µl de nos échantillons après digestion.

Ajouter 1/7 du volume en sucrose 2 M, TAE 1X qui est la solution alourdissante.

Préparer des étalons :

étalon d'HA d'un PM de 2.10^5 (don du Dr O.Wik, Pharmacia, Suède) auquel on ajoute 1/7 du volume de solution alourdissante

étalon d'HA ombilical d'un PM de 2.10^6 (Sigma) auquel on ajoute 1/7 du volume de solution alourdissante.

étalon d'HA ombilical d'un PM de 2.10^6 auquel on ajoute 1/7 du volume en solution alourdissante contenant du bleu de bromophénol 0.02%

Couler un gel 0.5 % d'agarose.

Charger le gel et faire migrer les échantillons à 60 V pendant 10 heures.

Coloration du gel

A la fin de la migration, colorer le gel avec du Stains-all (3,3'-diethyl-9-methyl-4,5,4',5'-dibenzothiacarbocyanine) 0.005%. Le Stains-all se fixe à l'HA et le colore en bleu.

Protéger le gel de la lumière en le conservant dans un endroit sombre.

Le lendemain, enlever le colorant, rincer le gel avec de l'eau et photographier celui-ci.

III.2.6.b Electrophorèse en gel de polyacrylamide : la zymographie (Fischer-Szafarz, 1984)

Principe

La zymographie est une technique qui permet de détecter de façon spécifique la présence d'une enzyme ou d'un groupe d'enzymes dans un mélange de protéines, cela après séparation électrophorétique sur une matrice adéquate. Elle s'adapte bien à la détection des hyaluronidases.

Cette technique implique tout d'abord le principe général de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Les protéines sont séparées suivant leur masse et non suivant leur charge. Le gel de polyacrylamide, par sa structure moléculaire en réseau tridimensionnel, exerce un rôle de tamis moléculaire. La dimension de ses pores est fonction du degré de réticulation du gel dépendant du pourcentage d'acrylamide et de NN'-méthylènebisacrylamide.

Après introduction des échantillons dans les puits du gel, on applique à celui-ci un champ électrique. Les protéines migrent au travers du gel en fonction du rapport de leur charge à leur masse. Puisque ce rapport est identique pour toutes les espèces chargées de SDS, leur vitesse de migration est inversement proportionnelle à la résistance rencontrée : ainsi, les grandes protéines migrent plus lentement et les petites, plus vite.

La migration se fait de la cathode (-) à l'anode (+) puisque le SDS charge les protéines négativement. Les protéines vont d'abord pénétrer dans le gel d'empilement qui possède une moins grande concentration en acrylamide-bisacrylamide (3%) et qui va permettre la condensation des échantillons avant leur passage dans le gel de séparation, plus concentré en acrylamide-bisacrylamide (12%). Le fait qu'il soit plus concentré permet une meilleure séparation des protéines suivant leur PM.

Dans le cas particulier de la zymographie, le gel de séparation en polyacrylamide est copolymérisé avec l'HA. Les protéines ne sont dénaturées que partiellement de façon à conserver une activité enzymatique. Après migration des protéines et différents traitements

permettant à l'enzyme (hyaluronidase) d'agir sur son substrat (HA), le gel est coloré à l'aide d'un colorant, le Stains-all qui va donner à la partie du gel imprégnée d'acide hyaluronique une coloration bleue. Aux endroits où l'enzyme a pu dégrader le substrat complètement des zones rosées apparaissent.

Protocole

Les gels réalisés ont une largeur de 10 cm et une hauteur de 8 cm.

Préparer le gel séparateur d'une hauteur de 6 cm : Tris-HCl 375 mM; SDS 0.1% pH 8.8 ; acrylamide 12%-bisacrylamide 0.32% (Biorad) ; acide hyaluronique de crête de coq 0.17 mg/ml (Sigma) ; Temed 0.1% (Biorad) ; persulfate d'ammonium 0.05% (Biorad).

L'ajout du persulfate d'ammonium (initiateur de la réaction) et du Temed (catalyseur de la réaction) va favoriser la polymérisation du gel.

Laisser polymériser le gel.

Couler le gel d'empilement : Tris-HCl 125 mM; SDS 0.1% pH 6.8 ; acrylamide 3%-bisacrylamide 0.08% (Biorad) ; Temed 0.1% (Biorad) ; persulfate d'ammonium 0.075% (Biorad).

Laisser polymériser le gel.

Diluer les extraits tissulaires ou cellulaires de façon adéquate.

Prélever un volume identique de chacune des dilutions (ex : 10 µl).

Ajouter un volume de solution alourdissante (SDS 0.1% ; bleu de bromophénol 0.06% ; glycérol 14% ; Tris-HCl 300 mM pH 6.8).

Placer le montage d'électrophorèse dans une cuve Mini-PROTEANII (Biorad) et y ajouter le tampon d'électrophorèse (Tris 25 mM ; glycine 192 mM ; SDS 0.1% ; pH 8.6).

Faire migrer dans la glace en maintenant un ampérage de 10 mA.

Lavage des gels au Triton[®] X-100

A la fin de la migration, défaire le montage et placer le gel dans une boîte de Pétri.

Ajouter 40 ml de Triton[®] X-100 3% par gel.

Agiter 2 heures à température ambiante.

Incubation en conditions optimales

Décanner la solution de Triton[®] X-100 et ajouter à chaque gel 40 ml d'une solution de formate 0.1 M, NaCl 0.1 M à pH 3.7.

Agiter 30 minutes à température ambiante.

Remplacer la solution de formate-NaCl par de la solution fraîche.

Agiter environ 18 heures à 38°C.

Arrêt de la réaction enzymatique

Rincer les gels abondamment à l'eau.

Traiter le gel avec 40 ml d'une solution de pronase à une concentration finale de 0.1 mg/ml en présence de Tris 20 mM pH 8.0.

Agiter 2 heures à 38°C.

Coloration des gels

Rincer les gels abondamment à l'eau.

Ajouter 40 ml de formamide 50% à chaque gel.

Agiter 30 minutes à température ambiante.

Enlever la formamide et ajouter aux gels 40 ml de colorant Stains-all 0.005%.

Maintenir les gels à l'abri de la lumière pendant 24 heures puis procéder au lavage à l'eau et photographier le gel.

III.2.7 Détection de l'expression protéique par Western Blot

Le Western Blot ou immunotransfert est une des méthodes les plus sensibles pour détecter spécifiquement une protéine parmi d'autres. Il comporte 3 étapes.

Dans un premier temps, le mélange de protéines est soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE). Puis les composants séparés sont transférés sur une membrane PVDF (polyvinylidène difluoride) (PolyScreen).

Dans un deuxième temps on incube la membrane dans une solution d'anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine recherchée.

Ensuite on incube la membrane avec un second anticorps qui va se fixer à l'anticorps primaire.

Et l'on termine par une étape de détection à l'aide du kit de chimioluminescence "ECL Plus" (NEN).

Electrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Le principe de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide est développé dans la technique de la zymographie. Dans le cas du Western Blot, il faut savoir que les protéines sont dénaturées. Cela est réalisé de plusieurs façons au cours de la manipulation :

- SDS, qui est un détergent anionique. Celui-ci va dérouler les structures protéiques et va se fixer stoéchiométriquement à leur chaînes, leur conférant une charge égale.
- β -mercaptoéthanol, qui rompt les ponts disulfures, à la fois intra- et intermoléculaires, en libérant les chaînes polypeptidiques complètement dépliées.
- chauffage 5 minutes à 100°C. Cette forte température détruit les structures tertiaires en rompant les ponts disulfures.

Protocole

Les gels ont une largeur de 10 cm et une hauteur de 8 cm.

Préparer le gel séparateur : Tris-HCl 375 mM; SDS 0.1% pH 8.8 ; acrylamide 12%-bisacrylamide 0.32% (Biorad) ; Temed 0.1% (Biorad) ; persulfate d'ammonium 0.05% (Biorad).

Laisser polymériser le gel.

Couler le gel d'empilement : Tris-HCl 125 mM; SDS 0.1% pH 6.8 ; acrylamide 3%-bisacrylamide 0.08% (Biorad) ; Temed 0.1% (Biorad) ; persulfate d'ammonium 0.075% (Biorad).

Laisser polymériser le gel.

Diluer les extraits de façon adéquate.

Prélever un volume identique de chacune des dilutions (ex : 10 μ l).

Protéines	Couleur	Marqueur 1	Marqueur 2
		PM en Da	PM en Da
Myosine	Bleu	204000	201000
β -galactosidase	Magenta	121000	122000
Bovine Serum Albumin	Vert	78000	85000
Anhydrase carbonique	Violet	39500	41800
Inhibiteur de trypsine de graine de soja	Orange	30700	31800
Lysozyme	Rouge	19700	18000
Apoprotinine	Bleu	7000	6400

Tableau 3.4 : Marqueur de PM "Kaleidoscope Prestained Standard" (BioRad)

Ajouter un volume de solution alourdissante (83.3%) et de β -mercaptoéthanol (2.4 M).

Mettre les échantillons dans un bain marie à 100°C pendant 5 minutes.

Déposer les échantillons dans les puits du gel et déposer également dans un puits 10 μ l d'un marqueur de poids moléculaire qui dans ce cas est le "Kaleidoscope Prestained Standard" (Biorad). Deux types différents ont été utilisés (Tableau 3.4). Ce marqueur sert de repère pour suivre à la fois la migration des protéines dans le gel et leur transfert sur la membrane.

Placer le montage d'électrophorèse dans une cuve Mini-PROTEANII (Biorad) et y ajouter le tampon d'électrophorèse.

Faire migrer 10 minutes à 80 Volts afin de faciliter la pénétration des échantillons dans le gel. Puis monter à 100 Volts pendant 1 heure 30 minutes.

Transfert de protéines sur membranes

Découper une membrane PVDF par gel de polyacrylamide.

Découper 4 morceaux de papier Whatman 3MM par membrane.

Immerger les membranes pendant 1 minute dans le méthanol 100%. Puis placer celles-ci dans du tampon de transfert (Tris 25 mM ; glycine 192 mM ; méthanol 20%) pendant 15 minutes.

Arrêter la migration quand la bande orange correspondant à un poids moléculaire de 30 kDa atteint les $\frac{3}{4}$ du gel.

Mettre les morceaux de papier Whatman 3MM dans le tampon de transfert pendant 5 minutes.

Faire le montage pour le transfert de façon à ce que la membrane se trouve du côté de l'anode.

Laisser migrer dans la glace à une tension de 60 Volts pendant 2 heures.

Élimination des sites de liaison non spécifiques sur la membrane

S'assurer que le transfert sur membrane a bien eu lieu en vérifiant que les bandes du marqueur de taille se retrouvent sur la membrane.

Mettre la membrane dans une boîte de Pétri et y ajouter un volume suffisant de Blotto 5% (lait écrémé en poudre [Nestlé] 5% ; PBS-Tween 0.1%).

Déposer la boîte de Pétri sur un agitateur et agiter lentement pendant 1 heure.
C'est la phase de préhybridation.

Addition des anticorps primaires

Laver les membranes 2 fois 5 minutes à température ambiante avec du PBS-Tween 0.1%.

Préparer les solutions d'anticorps primaires à la concentration désirée. Après différents essais nous les avons dilués 2000 fois dans une solution PBS-Tween 0.1%, BSA 1%.

Placer chaque membrane dans un sachet plastique et y ajouter la dilution d'anticorps primaires.

Placer les boîtes sur l'agitateur et agiter lentement toute la nuit à 4°C.

Addition des anticorps secondaires

Enlever les membranes des sachets en plastique.

Commencer les lavages :

- 1 fois 15 minutes au PBS-Tween 0.1%, lait écrémé en poudre 0.1%
- 2 fois 5 minutes au PBS-Tween 0.1%, lait écrémé en poudre 0.1%
- 2 fois 5 minutes au PBS-Tween 0.1%

Les lavages se font également sous agitation mais cette fois l'agitation exercée est plus forte.

Préparer la dilution de l'anticorps secondaire qui est un anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Prosan). Dans nos expériences, nous avons toujours utilisé une dilution 1/2000 de notre anticorps secondaire. Celui-ci est aussi dilué dans une solution de PBS-Tween 0.1% BSA 1%.

Placer chaque membrane dans un sachet et y ajouter la dilution d'anticorps secondaires.

Mettre les boîtes sur l'agitateur et agiter lentement 1 heure à température ambiante.

Révélation des anticorps

Enlever les membranes des sachets en plastique.

Commencer les lavages :

1 fois 15 minutes au PBS-Tween 0.1%

4 fois 5 minutes au PBS-Tween 0.1%

Commencer l'étape de révélation.

Les anticorps secondaires utilisés sont couplés par covalence à une peroxydase de raifort (horseradish peroxydase). On dispose d'un kit de chémoluminescence (ECL Plus) de NEN. Les solutions de ce kit contiennent le substrat de l'enzyme qui est l'eau oxygénée (H_2O_2) et du luminol. La peroxydase va alors catalyser l'oxydation du luminol en présence de H_2O_2 . L'oxydation du luminol va s'accompagner de production de lumière qui fera apparaître un spot sur le film de chémoluminescence.

Mélanger des quantités équivalentes de chaque solution du kit (le kit contient 2 solutions).

Verser dans le sachet 0.125 μ l de solution chémoluminescente par cm^2 de membrane.

Laisser les membranes au contact de la solution pendant 1 minute.

Passer en chambre noire avant de poser le film dans la cassette.

Le film utilisé est un film spécial pour la chémoluminescence (Hyperfilm de Amersham).

Développer le film.

III.3 Méthodes de transfection cellulaire

III.3.1 Les cellules S2

Nous avons choisi d'utiliser ces cellules car des expériences préliminaires au laboratoire de Physiologie et Pharmacologie ont montré qu'elles ne semblent pas posséder pas d'activité hyaluronidasique décelable en zymographie ni avec d'autres tests biochimiques. Si la transfection d'Hyal-2 en cellules S2 se montre concluante, nous aurions dès lors un outil de travail permettant de mieux caractériser l'Hyal-2 clonée au laboratoire.

Transfection des cellules S2 au $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

Cette méthode de transfection est basée sur la formation d'un précipité de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -ADN. Le $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ va faciliter la liaison de l'ADN à la surface de la cellule. Ainsi fixé à la membrane plasmique, l'ADN entrerait dans la cellule par endocytose.

Le protocole suivi pour la transfection des S2 est celui proposé par la firme Invitrogen.

Préparer des cultures de cellules pour la transfection dans des boîtes de 80 cm² en y mettant 10⁶ cellules/ml et du " Complete DES™ Expression Medium ".

Incuber 16 heures à 22°C.

Préparer la solution A (CaCl_2 0.24 M, 40 µg de plasmide, H₂O stérile).

Ajouter celle-ci goutte à goutte à 1 volume d'une solution 2 fois plus concentrée de HEPES-Buffered Saline (HEPES 50 mM, NaH_2PO_4 1.5 mM, NaCl 280 mM, pH 7.1) et agiter afin d'assurer une bonne homogénéité de la solution formée.

Incuber 30 à 40 minutes à température ambiante.

Vérifier qu'un fin précipité de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ s'est formé.

Mettre la solution en goutte à goutte dans les boîtes contenant la culture de S2. Prendre soin d'agiter légèrement les boîtes afin de répandre la solution.

Incuber 24 heures à 22°C.

Enlever le $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ des boîtes. Pour se faire, retirer le surnageant et laver 2 fois les cellules avec du " Complete DES™ Expression Medium ".

Ajouter du " Complete DES™ Expression Medium " dans chaque boîte.

Incuber 24 heures à 22°C.

Ajouter à chaque boîte 500 µM de CuSO_4 qui est un inducteur du promoteur du vecteur d'expression.

Incuber 24 heures à 22°C avant l'observation au microscope.

III.3.2 Les cellules COS-7

Ces cellules ont été choisies pour leur capacité reconnue d'accepter et d'exprimer correctement des transfusions transitoires de diverses protéines, y compris des protéines de fusion avec la GFP (Tarasova et al., 1997).

Transfection à la Lipofectamine®

La veille de la transfection, ensemercer 100,000 cellules COS-7 dans chaque puits de 9.6 cm² (NUNC) dans lequel a été déposée d'une lamelle couvre-objet de 4 cm², et y ajouter du DMEM-FBS 10%.

Le jour de la transfection, préparer les solutions suivantes dans des eppendorfs stériles :

-Solution A : 0.5-2 µg d'ADN ; PLUS Reagent ; DMEM sans sérum.

-Solution B : LipofectAMINE Reagent ; DMEM sans sérum.

Mélanger doucement les deux solutions et incuber à température ambiante pendant 15 minutes.

Rincer les cellules avec 2 ml de milieu DMEM sans sérum.

Ajouter le mélange des deux solutions aux cellules.

Ajouter du milieu DMEM sans sérum pour arriver à un volume final de 1.5 ml par puits.

Incuber les cellules pendant 5 heures dans l'incubateur à 37°C et en présence de CO₂.

Après cette étape d'incubation, ajouter 1.5 ml de milieu contenant 20% de FBS, sans enlever le mélange de transfection.

Observer les cellules au microscope 24 à 72 heures après le début de la transfection. Si cette observation est retardée, il faut remplacer le milieu par du milieu frais.

III.3.3 L'EGFP

Le gène de la GFP (Green Fluorescent Protein) provient de la méduse *Aequorea victoria*. Ce gène code pour une protéine monomérique de 27 kDa capable d'émettre une lumière verte lorsqu'elle est exposée aux UV (Prasher et al., 1992). Contrairement aux autres rapporteurs bioluminescents, la GFP ne nécessite aucune protéine accessoire, ni aucun substrat ou cofacteur pour émettre de la lumière. Bien que la protéine entière soit nécessaire pour la fluorescence, le chromophore actif de la GFP sauvage est un tripeptide cyclique.

Nous allons travailler avec une forme mutée de la GFP, qui est l'EGFP ("Enhanced GFP") (Patterson et al., 1997). Cette EGFP encode une protéine dont le pic d'excitation est décalé vers le rouge et qui fluoresce 35 fois plus intensément que la GFP sauvage. L'EGFP

présente un spectre semblable à celui de la fluorescéine. Elle peut donc être utilisée en microscopie avec des filtres usuels.

III.3.4 Microscopie

Les observations se sont faites au microscope inversé Zeiss Axiovert 135 TV équipé pour l'observation en épifluorescence et muni d'une caméra CCD refroidie. L'excitation de la fluorescence s'effectue au moyen d'une lampe 75 W au xénon et d'un cube portant plusieurs jeux de filtres optiques. Pour l'EGFP, il s'agit de la combinaison dite " FITC ", qui comprend un filtre d'excitation de $470 \text{ nm} \pm 40 \text{ nm}$, un miroir dichroïque de 505 nm et un filtre d'émission de $535 \pm 45 \text{ nm}$. L'ensemble des observations a été réalisé avec un objectif à immersion Neofluar (Zeiss) de 63 \times et d'ouverture numérique 1.25. Pour l'estimation de l'efficacité de transfection, nous avons utilisé un objectif de 32 \times , associé à un contraste de phase.

Les images ont été enregistrées au moyen de la caméra CCD refroidie MicroMax 1300-Y (Princeton Instruments) qui envoie directement des images digitalisées vers l'ordinateur. Ces images sont observées sur l'écran par l'intermédiaire du programme Métafluor (Universal Imaging). La plupart des images ont été prises avec un temps d'accumulation de 2 secondes, le principe de la caméra CCD refroidie étant d'accumuler les photons dans des puits grillagés individuels, durant un temps donné, et de numériser chaque signal local pour reconstituer l'image. La résolution de ces images a été réduite à 650 \times 650 pixels. Les images sont imprimées sous format TIFF avec un imprimante laser.

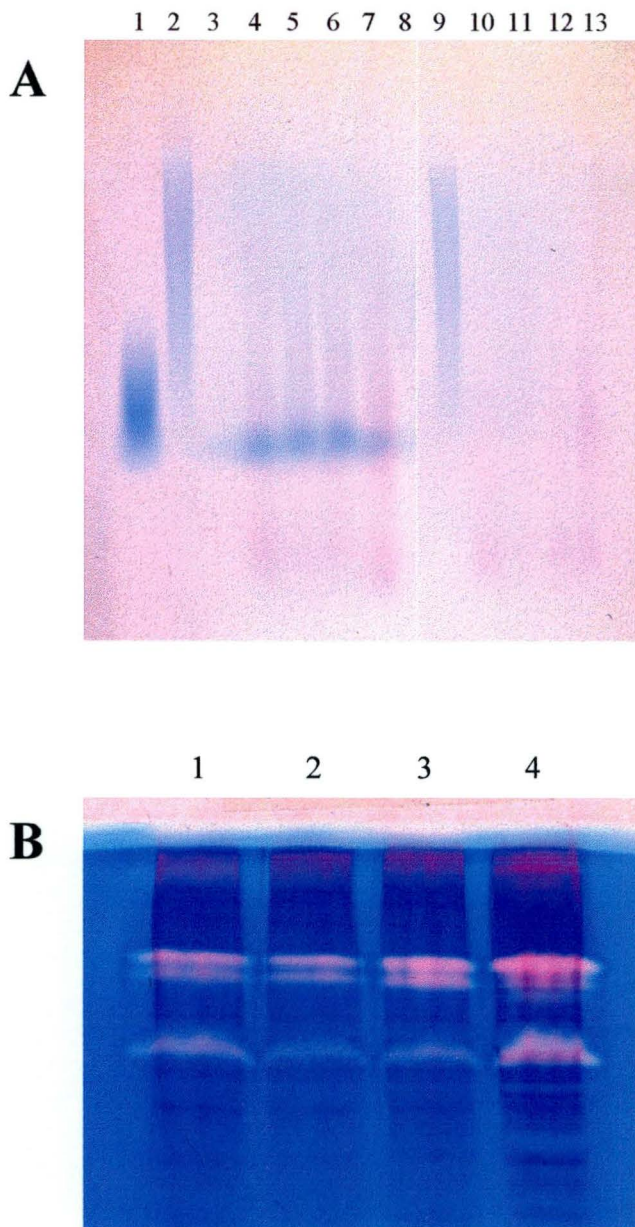


Fig. 4.1. Exemples : **A**, d'électrophorèse en gel d'agarose, et **B**, de zymographie, pour détecter l'activité hyaluronidasique d'extraits de rein de rat.

En **A**, 250 μg de protéines d'extraits de rein ont été incubés durant 20 h avec 10 μg d'hyaluronan (HA) ombilical d'un PM moyen de 2.10^6 Da, le tout étant ensuite déposé sur un gel d'agarose 0.5%, soumis à une électrophorèse et enfin coloré au Stains-all. Les taches bleues représentent l'HA résiduel. Les pistes 1, 2 et 9, qui servent d'étalons, contiennent 10 μg d'HA non digéré d'un PM moyen respectif de 2.10^5 (1) et 2.10^6 Da (2 et 9). Les pistes 3 et 8 sont vides. Les extraits tissulaires des pistes 4 à 7 ont été incubés en présence d'HA, et ceux des pistes 10 à 13, sans HA. Les extraits proviennent du rein total (4 et 10), du cortex (5 et 11), de la médullaire externe (6 et 12) et de la médullaire interne (7 et 13).

En **B**, SDS-PAGE dans un gel contenant de l'HA. Chaque piste contient 100 μg de protéines d'extraits des mêmes parties du rein (1, rein total ; 2, cortex ; 3, médullaire externe ; 4, médullaire interne).

IV. Résultats

IV.1 Mesure de l'activité hyaluronidasique chez le rat

IV.1.1 Introduction

La première approche de ce travail fut de vérifier que l'activité hyaluronidasique est ubiquiste au sein d'un organisme mammifère. Pour ce faire, nous devons mesurer cette activité aussi bien au niveau tissulaire qu'au niveau cellulaire. Nous avons choisi d'utiliser le rat comme modèle expérimental, car c'est l'animal de laboratoire dont les fonctions physiologiques ont été les mieux explorées jusqu'ici.

Deux techniques ont été utilisées pour apprécier l'activité hyaluronidasique (Fig. 4.1) :

- la zymographie, qui visualise l'activité enzymatique après électrophorèse en gel de polyacrylamide-hyaluronan ;
- et la mesure du degré de dépolymérisation d'un échantillon d'hyaluronan de haut poids moléculaire, grâce à une électrophorèse en gel d'agarose.

Les deux techniques apportent des renseignements différents mais complémentaires. L'électrophorèse en gel d'agarose révèle l'ensemble des activités de dégradation de l'hyaluronan, qu'elles soient totales ou partielles. Une dégradation partielle laisse persister des fragments d'hyaluronan, d'un PM allant de 2 kDa à 500 kDa (Sampson et al., 1992 ; Lepperdinger et al., 1998). La zymographie ne peut mesurer qu'une activité de dégradation *totale* de l'hyaluronan, qui ne laisse subsister que des résidus de PM inférieur à 1.5 kDa (Fischer-Szafarz et al., 1984). Dans les deux techniques, la révélation de l'activité hyaluronidasique s'est effectuée à un pH de 3.7, parce que des expériences préliminaires ont montré que ce pH acide est celui où l'activité hyaluronidasique maximale est décelée dans la majorité des tissus de l'organisme. Cela est d'ailleurs compatible avec les résultats présentés dans la littérature jusqu'ici (Frost et al., 1996).

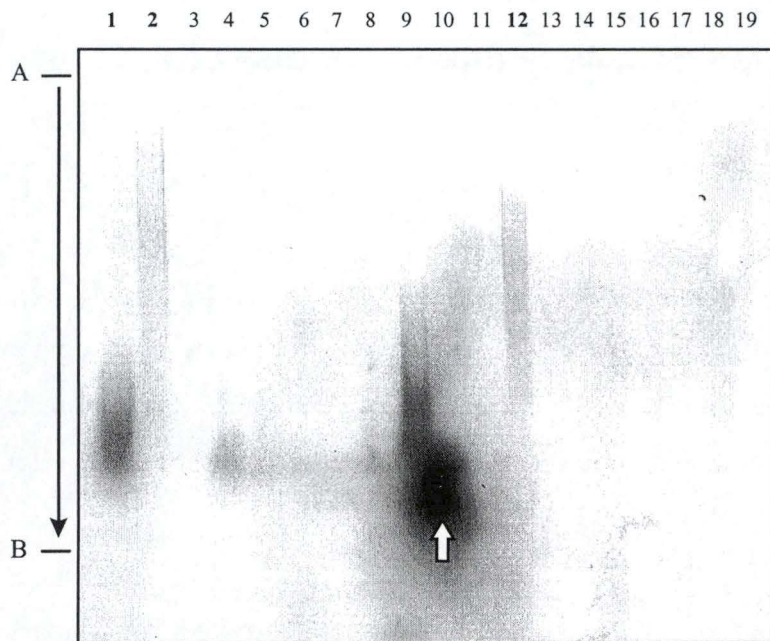


Fig. 4.2. Dégradation de l'acide hyaluronique (HA) par des extraits tissulaires de rat, visualisée en gel d'agarose 0.5% photographié en noir et blanc. Les conditions sont identiques à celles de la Fig. 4.1A. Les pistes 1, 2 et 12, qui servent d'étalons, contiennent 10 μg d'HA non digéré d'un PM moyen de $2 \cdot 10^5$ Da (piste 1) et $2 \cdot 10^6$ Da (pistes 2 et 12). Les pistes 3 et 11 sont vides. Les extraits tissulaires des pistes 4 à 10 ont été incubés en présence d'HA, et ceux des pistes 13 à 19, sans HA. Les extraits proviennent du coeur (4 et 13), du cerveau (5 et 14), de la rate (6 et 15), du poumon (7 et 16), du foie (8 et 17), du muscle squelettique (9 et 18), et du rein (10 et 19). La tache sombre indiquée par la flèche blanche est un artéfact. En ordonnée, les points A et B indiquent le début et la fin de la zone scannée pour les mesures des profils d'intensité de chaque piste (cf. Fig. 4.3).

IV.1.2 Electrophorèse en gel d'agarose des produits de la réaction hyaluronidasique

IV.1.2.a Les organes du rat

La Figure 4.2 présente les résultats obtenus en faisant digérer 10 µg d'acide hyaluronique ombilical, d'un PM moyen de 2.10^6 , par des extraits tissulaires correspondant à 250 µg de protéines. Les extraits tissulaires proviennent d'un panel d'organes du rat comprenant : le cœur, le cerveau, la rate, le poumon, le foie, le muscle squelettique et le rein.

Dans tous les organes, on observe une digestion très importante de l'hyaluronan. Seul le muscle squelettique présente une activité visiblement plus faible. Dans la plupart des cas, on observe une " trace " résiduelle d'hyaluronan dans une zone de $PM < 2.10^5$ Da. Cependant, le PM moyen des fragments d'hyaluronan résiduels ne peut pas toujours être calculé précisément, car, dans ce type de gel, la relation entre la mobilité électrophorétique de l'hyaluronan et le logarithme du PM n'est linéaire que dans une zone de PM allant d'environ 0.2 à 6×10^6 Da (Lee and Cowman, 1994).

La présence d'une " trace " résiduelle d'hyaluronan ne permet pas, non plus, d'affirmer le caractère partiel de l'activité hyaluronidasique des extraits tissulaires. En effet, pour s'assurer de l'absence de dégradation totale, il faudrait faire incuber des quantités croissantes de protéines en présence d'une quantité donnée de substrat.

Dans les pistes témoins, contenant les extraits tissulaires incubés sans acide hyaluronique exogène, on n'observe aucune trace d'hyaluronan. Le contenu endogène en hyaluronan de tous les organes utilisés est trop faible pour être détecté avec la technique appliquée. Par exemple, la médullaire interne, qui est la plus riche en acide hyaluronique de toutes les parties d'organes utilisées dans ce travail (Flamion et al., 1997), contient environ 1 µg d'hyaluronan pour 250 µg de protéines, soit la quantité qui a été déposée sur le gel de la Fig. 4.2. La sensibilité de détection de la technique en gel d'agarose est estimée à > 2 µg d'hyaluronan (Lee and Cowman, 1994).

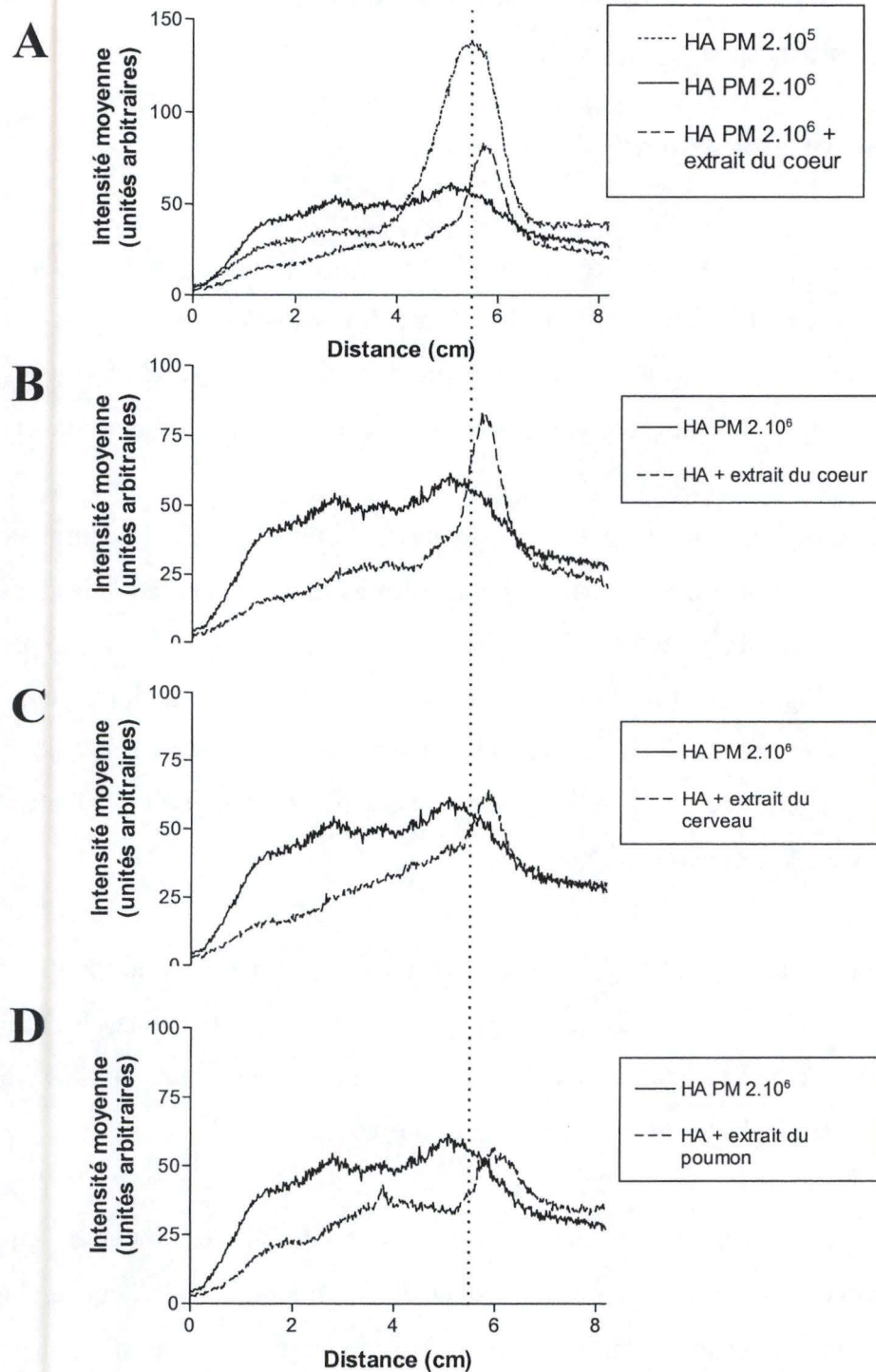


Fig. 4.3. Profils d'intensité de certaines pistes du gel d'agarose de la Fig. 4.2. La distance, en cm, a été mesurée sur le gel d'origine à partir du point A indiqué sur la Fig. 4.2. L'effet de digestion de l'acide hyaluronique (HA) de haut PM par différents extraits d'organes de rat (**B**, cœur ; **C**, cerveau ; **D**, poumon) est visible. L'étalon de $PM=2 \cdot 10^5$ (dont le profil est en **A**, et pour lequel une ligne verticale pointillée a été tracée à partir de son pic) est montré pour comparaison.

Dans certaines pistes, du côté du front de migration, apparaît parfois une traînée mauâtre (cf Figure 4.1), qui correspond vraisemblablement à la coloration par le Stains-all de divers composants cellulaires tels que des glycoprotéines ou d'autres glycosaminoglycans (Green, 1978).

Afin de mieux apprécier l'intensité de digestion de l'hyaluronan, les photographies en noir et blanc ont été scannées et un profil d'intensité a été mesuré dans chaque piste, dans la direction de migration de A à B, indiquée sur la Figure 4.2. Sur ce premier gel d'agarose, seules quelques pistes ont pu être mesurées, à cause d'une tache indésirable. Les résultats, présentés dans la Figure 4.3, permettent de mieux apprécier la diminution du PM moyen de l'hyaluronan incubé avec les extraits tissulaires. Toutefois, il faut remarquer que, dans ce gel-ci, l'acide hyaluronique ombilical présente un profil d'intensité "aplati" qui est anormal ; ceci est peut-être dû à la mauvaise qualité de coloration de ce gel. D'autres gels d'agarose (voir Figures suivantes) permettront de mieux préciser le profil d'intensité de l'étalon de haut PM.

IV.1.2.b Les parties du rein

Le rein étant l'organe le plus étudié au laboratoire, nous l'avons examiné plus en détail. Nous avons dès lors prélevé le cortex, la médullaire externe et la zone rénale regroupant la base de la médullaire interne et la papille, que nous appellerons ci-après "médullaire interne".

Les Figures 4.4 et 4.5 illustrent les résultats obtenus dans des conditions de concentrations en protéines et en substrat similaires à celles utilisées dans le cas des organes du rat. Il est clair que toutes les parties du rein possèdent une activité de dégradation de l'acide hyaluronique très importante. Celle-ci semble légèrement plus marquée dans la médullaire interne : sur la Figure 4.5, on voit que le pic d'hyaluronan résiduel correspondant aux extraits de médullaire interne est d'amplitude plus faible que celui des autres organes. C'est aussi dans la médullaire interne que l'on trouve proportionnellement la plus grande quantité d'hyaluronan du rein (Flamion et al., 1998). Ceci est compatible avec un turnover intense de l'hyaluronan dans la médullaire interne.

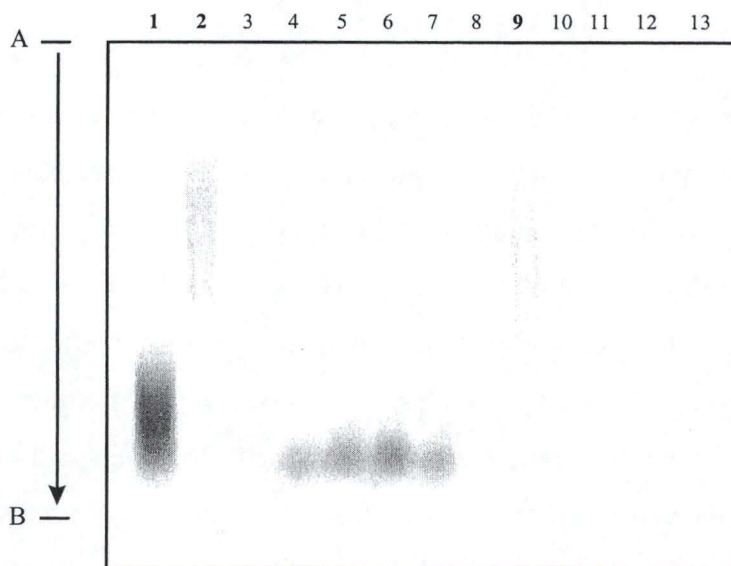


Fig. 4.4. Dégradation de l'acide hyaluronique (HA) par des extraits de différentes parties du rein de rat, visualisée en gel d'agarose 0.5%. Cette image est identique à celle de la Fig. 4.1A (en couleur). Les pistes 1, 2 et 9, qui servent d'étalons, contiennent 10 μg d'HA non digéré d'un PM moyen de $2 \cdot 10^5$ (piste 1) et $2 \cdot 10^6$ Da (pistes 2 et 9). Les pistes 3 et 8 sont vides. Les extraits tissulaires des pistes 4 à 7 ont été incubés en présence d'HA d'un PM de $2 \cdot 10^6$ Da, et ceux des pistes 10 à 13, sans HA. Les extraits proviennent du rein total (4 et 10), du cortex (5 et 11), de la médullaire externe (6 et 12) et de la médullaire interne (7 et 13). En ordonnée, les points A et B indiquent le début et la fin de la zone scannée pour les mesures des profils d'intensité de chaque piste (cf. Fig. 4.5).

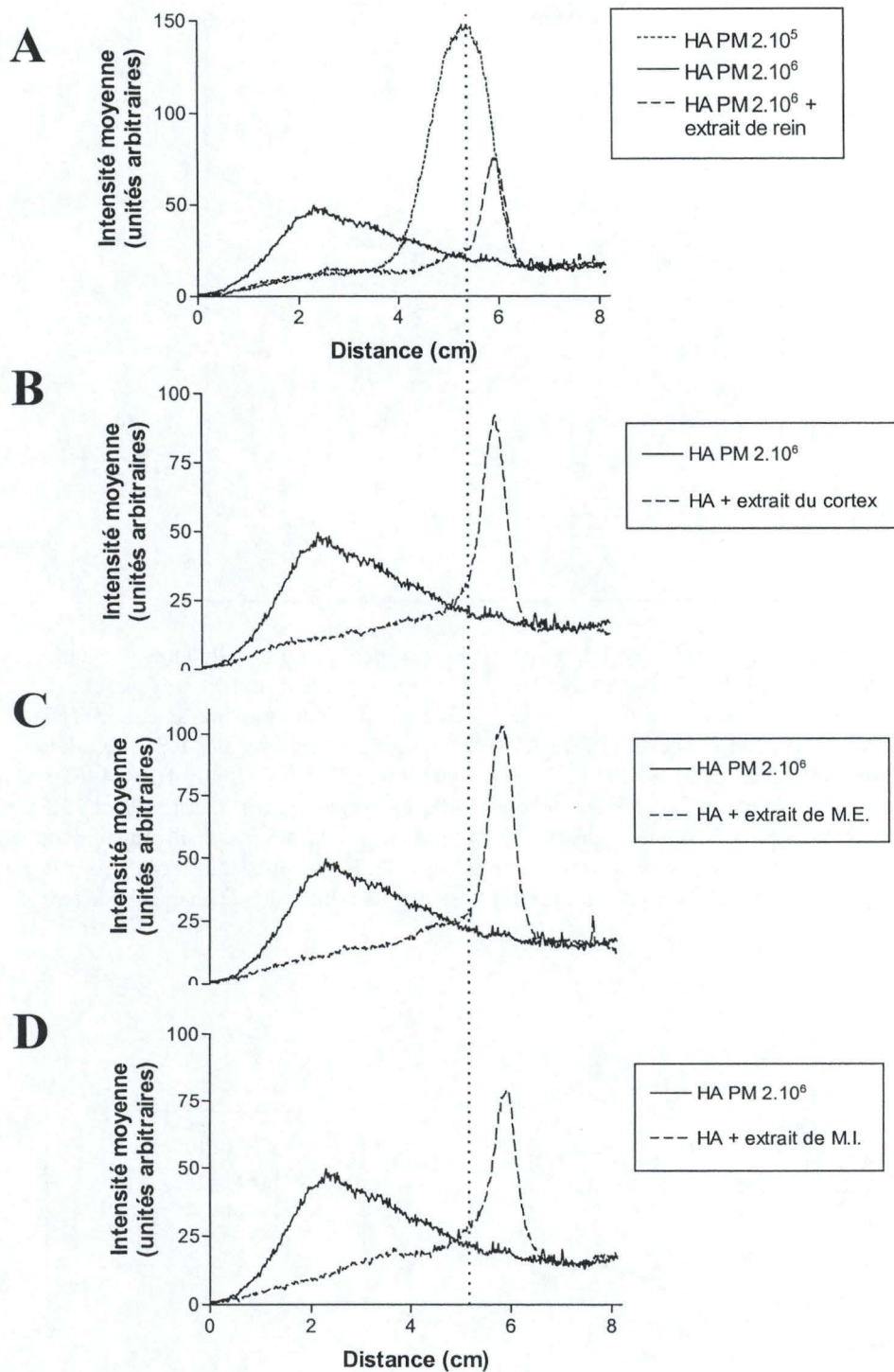


Fig. 4.5. Profils d'intensité des pistes du gel d'agarose de la Fig. 4.4. La distance, en cm, a été mesurée sur le gel d'origine à partir du point A indiqué sur la Fig. 4.4. L'effet de digestion de l'acide hyaluronique (HA) de haut PM par différents extraits de parties du rein de rat (**A**, rein total ; **B**, cortex ; **C**, médullaire externe [ME] ; **D**, médullaire interne [MI]) est manifeste. L'étalon de $PM=2 \cdot 10^5$ (dont le profil est en **A**, et pour lequel une ligne verticale pointillée a été tracée à partir de son pic) est montré pour comparaison.

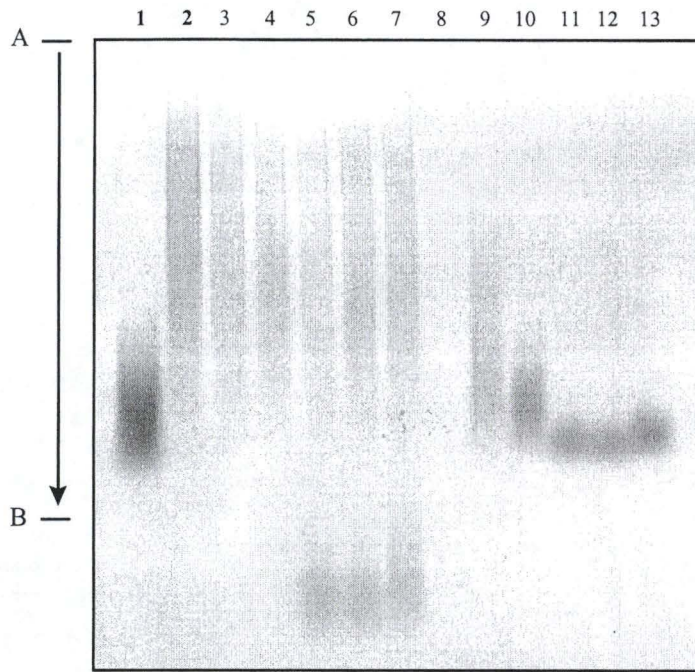


Fig. 4.6. Dégradation de l'acide hyaluronique (HA) par des extraits cellulaires, visualisée en gel d'agarose 0.5%. Les pistes 1 et 2 contiennent 10 µg d'HA non digéré d'un PM moyen de 2.10^5 (piste 1) et 2.10^6 Da (piste 2). Les lysats cellulaires (piste 3 à 7) ainsi que leurs milieux de culture (piste 9 à 13) ont été incubés avec 5 µg d'HA d'un PM de 2.10^6 Da. La piste 8 est vide. Les types cellulaires étudiés sont : les cellules interstitielles de type I (3 et 9) et de type II (4 et 10), les cellules NRK-49F (5 et 11), les cellules RMIC (6 et 12) et les cellules des tubules collecteurs médullaires internes (7 et 13). Certaines incubations avec des lysats cellulaires (pistes 5 à 7) produisent des traînées mauvâtres situées près du front de migration du gel (la couleur est visible sur la Fig. 4.1). En ordonnée, les points A et B indiquent le début et la fin de la zone scannée pour les mesures des profils d'intensité de chaque piste (cf. Fig. 4.7).

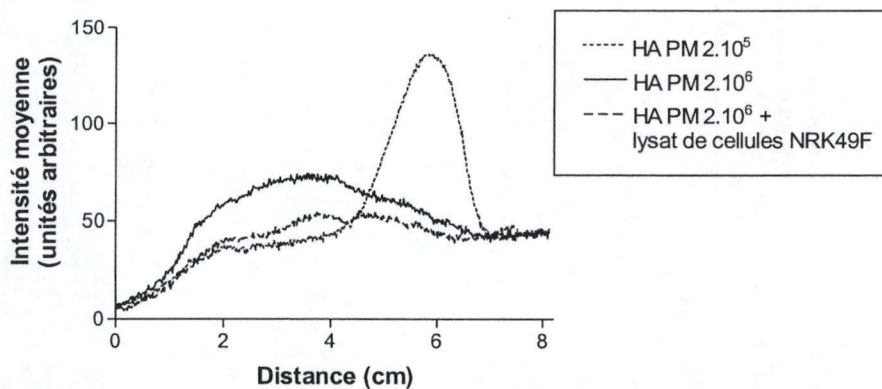


Fig. 4.7. Profils d'intensité des pistes 1, 2 et 5 du gel d'agarose de la Fig. 4.6. La figure montre l'effet d'un lysat de cellules NRK-49F sur l'acide hyaluronique (HA) de haut PM. Ce résultat est représentatif de ceux obtenus avec les autres lysats cellulaires (cellules interstitielles et tubulaires de la médullaire interne, et cellules RMIC). Pour apprécier ces résultats, il faut tenir compte du fait que l'HA-étalon de 2.10^6 Da est présent à raison de 10 µg, alors que les lysats cellulaires sont incubés avec 5 µg d'HA.

IV.1.2.c Les cultures cellulaires rénales

Nous avons examiné à la fois les homogénats cellulaires et les milieux de culture des cellules. Les types cellulaires étudiés sont :

- d'une part, des cellules provenant de la médullaire qui sont mises en culture primaire : soit les cellules interstitielles de type I et de type II (Flamion et al., 1999), soit les cellules des tubules collecteurs ;
- d'autre part, des cellules appartenant aux lignées RMIC et NRK-49F. Ces deux types cellulaires sont des cellules interstitielles de rat provenant respectivement de la médullaire et du cortex rénal.

Le choix de ces différents types cellulaires a été fait dans la mesure où ils étaient disponibles au laboratoire.

La Figure 4.6 présente le résultat de la digestion de 5 μg d'acide hyaluronique ombilical par 45 μg de protéines de cellules NRK-49F, RMIC et tubulaires. En ce qui concerne les cellules interstitielles médullaires en culture primaire, le peu de matériel disponible n'a pas permis d'effectuer un dosage préalable des protéines ; dès lors, un maximum d'extrait a été mis au contact de 5 μg d'acide hyaluronique ombilical.

Les milieux des différentes cultures ont également été testés (cf Figure 4.6) : dans tous les cas, il s'agissait de milieu concentré 10 fois ou 20 fois, dont la quantité mise au contact de l'hyaluronan ne représentait qu'un dixième de la quantité de milieu issu d'un équivalent de 45 μg de protéines provenant des cellules NRK-49F, RMIC et tubulaires. La comparaison des parties droite et gauche de la Figure 4.6 doit tenir compte de ce rapport. En ce qui concerne les milieux des cellules interstitielles, le rapport (milieu/ extrait cellulaire) est de 1/160 environ. Les profils d'intensité de ces types cellulaires et de leur milieu correspondant ont été mesurés (Figure 4.7 et 4.8). Les résultats obtenus montrent qu'on ne détecte pas d'activité hyaluronidasique dans les cellules, mais une activité beaucoup plus importante dans les milieux respectifs. Ceci pourrait laisser penser que les hyaluronidases sont sécrétées dans le milieu.

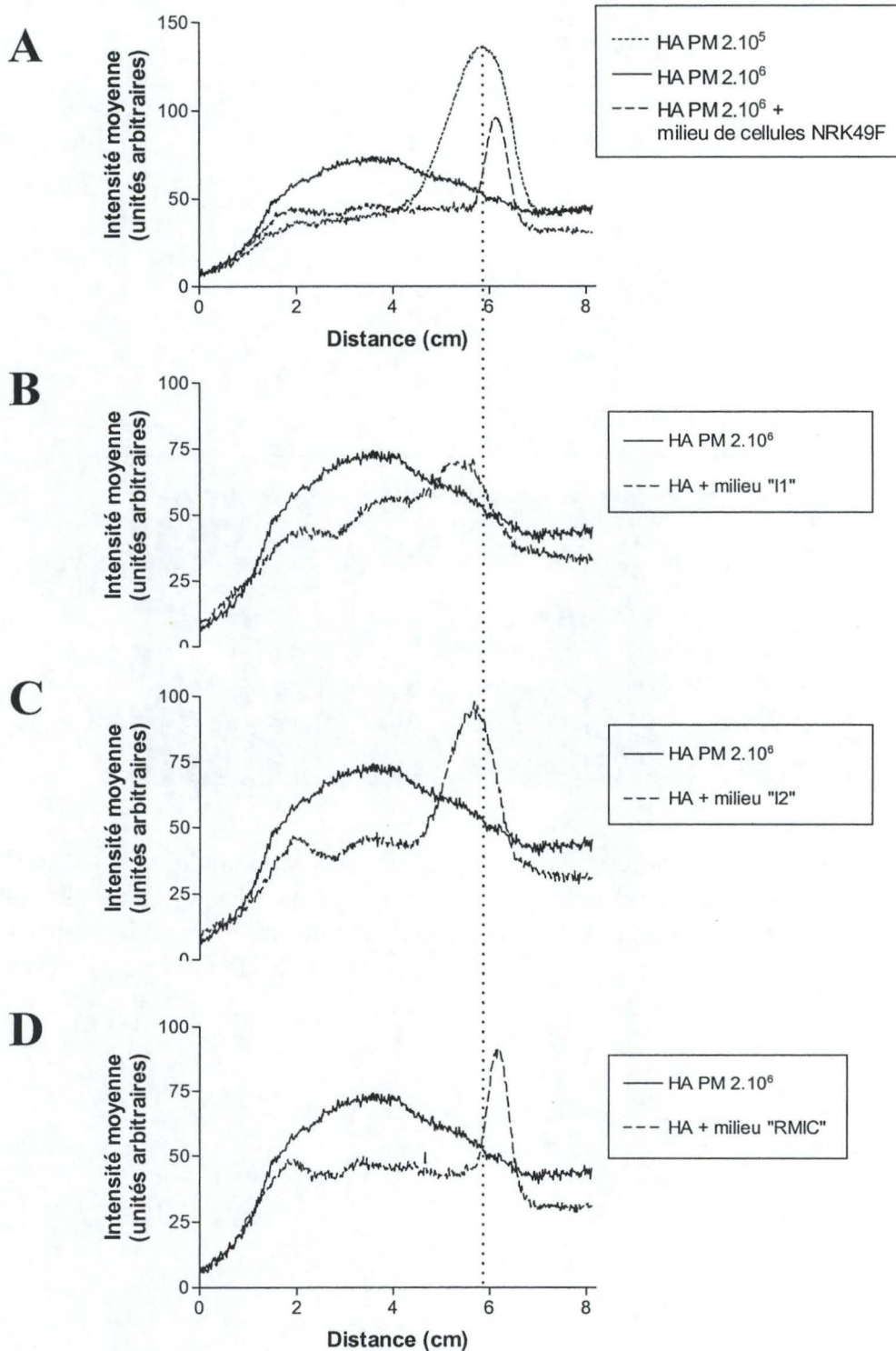


Fig. 4.8. Profils d'intensité des pistes 9 à 12 du gel d'agarose de la Fig. 4.6. La distance, en cm, a été mesurée sur le gel d'origine à partir du point A indiqué sur la Fig. 4.6. On observe un effet de digestion de l'acide hyaluronique (HA) de haut PM par les milieux de différents types cellulaires (**A**, cellules NRK ; **B**, cellules interstitielles de type I ; **C**, cellules interstitielles de type II ; **D**, cellules RMIC). L'étalon de PM= 2.10^5 (dont le profil est en **A**, et pour lequel une ligne verticale pointillée a été tracée à partir de son pic) est montré pour comparaison. Pour apprécier ces résultats, il faut tenir compte du fait que l'HA-étalon de 2.10^6 Da est présent à raison de $10 \mu\text{g}$, alors que les milieux cellulaires sont incubés avec $5 \mu\text{g}$ d'HA.

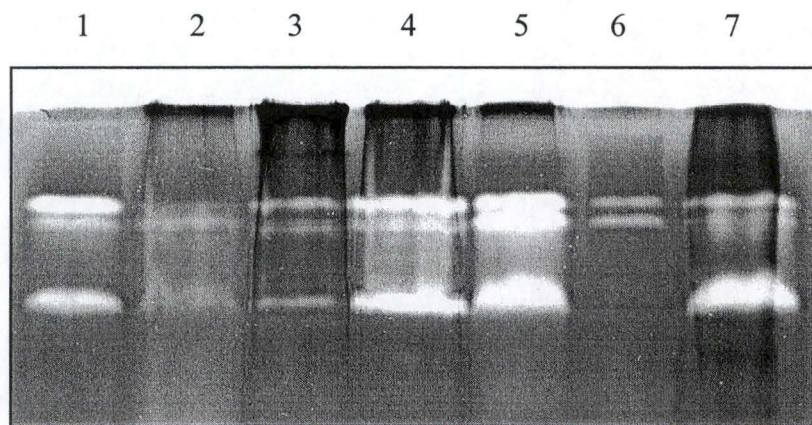


Figure 4.9. Electrophorèse dans un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) contenant de l'acide hyaluronique (=zymographie). Chaque piste du gel contient 100 μ g de protéines d'extraits tissulaires du rat, qui proviennent : 1, du cœur ; 2, du cerveau ; 3, de la rate ; 4, du poumon ; 5, du foie ; 6, du muscle squelettique ; et 7, du rein.

IV.1.3 Zymographie

Comme la plupart des préparations tissulaires et cellulaires étaient positives lors du test par électrophorèse en gel d'agarose, il était intéressant de savoir si l'activité hyaluronidasique qu'elles recèlent est aussi de type totale. Dans ce cas, la zymographie devrait révéler la dépolymérisation complète de l'acide hyaluronique. La technique sera aussi appliquée à un pH d'activité enzymatique de 3.7.

Précisons que la zymographie est généralement une technique semi-quantitative pour mesurer l'activité enzymatique (Peach and Christianson, 1994).

IV.1.3.a Les organes du rat

La Figure 4.9 présente les résultats obtenus avec une quantité d'homogénat correspondant à 100 µg de protéines de chacun des organes du panel. La présentation en noir et blanc sera préférée vu sa meilleure résolution (pour l'image en couleur, cf Figure 4.1).

Dans toutes les pistes du gel, on détecte une activité hyaluronidasique. Chaque bande correspond vraisemblablement à une forme différente d'hyaluronidase, mais les comparaisons d'une expérience à l'autre sont difficiles, car des marqueurs de poids moléculaire n'ont pas été utilisés lors des zymographies. En effet, ces marqueurs protéiques disparaissent après incubation du gel à la pronase (cf. Matériels et Méthodes).

Pour tous les organes, il apparaît trois bandes d'intensités variables, excepté pour le muscle squelettique qui n'en présente que deux. De plus, toutes les bandes se situent aux mêmes niveaux, ce qui laisse penser que se sont les mêmes formes d'hyaluronidase que l'on trouve dans chaque organe. Le fait qu'une des bandes soit plus intense que les autres ne signifie pas nécessairement que la forme d'hyaluronidase présente à cet endroit est plus exprimée au sein du tissu ; il se pourrait aussi que les conditions expérimentales (par exemple le pH de 3.7) soient plus favorables à cette forme d'hyaluronidase qu'aux deux autres formes. Donc, au sein d'un tissu, l'intensité des bandes est fonction des conditions expérimentales. Par contre, l'intensité d'une même bande au sein de plusieurs tissus est fonction de son degré

1 2 3 4

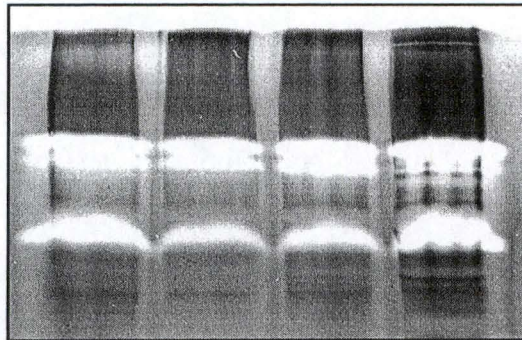


Figure 4.10. Electrophorèse dans un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) contenant de l'acide hyaluronique (=zymographie). Chaque piste du gel contient 100 μg de protéines de différents extraits de rein de rat, qui proviennent : 1, du rein total ; 2, du cortex ; 3, de la médullaire externe ; et 4, de la médullaire interne.

d'expression. Au vu de la Figure 4.9, on peut donc dire que dans la plupart des organes, c'est la forme d'hyaluronidase possédant le plus petit PM qui est dans les meilleures conditions expérimentales. Par contre, son niveau d'expression varie fortement d'un tissu à l'autre. C'est dans le foie et le rein que cette forme d'hyaluronidase semble la plus exprimée, et dans la rate, le moins. Dans le muscle squelettique, elle est absente.

En comparant les résultats de la zymographie avec ceux du gel d'agarose, le fait que le muscle squelettique ne possède pas la bande la plus intense, qui est présente dans la plupart des tissus, est à mettre en rapport avec la constatation qu'en électrophorèse en gel d'agarose, la digestion de l'hyaluronan ne fut pas aussi importante dans le muscle squelettique que dans les autres organes.

IV.1.3.b Les parties du rein

La Figure 4.10 dévoile les résultats obtenus après avoir déposé 100 µg de protéines d'un homogénat de chacune des parties du rein. Le profil des bandes obtenues, notamment la bande la plus forte, est le même que celui obtenu pour le rein entier et pour la plupart des autres organes.

C'est au niveau de la médullaire interne que cette bande semble être la plus importante. Cette constatation rejoint les observations décrites avec le gel d'agarose qui évoquait une dégradation plus forte de l'hyaluronan dans cette zone du rein. Donc, la digestion plus importante de l'hyaluronan dans la médullaire interne que dans les autres parties du rein pourrait être le résultat d'une plus forte expression d'une forme dominante d'hyaluronidase correspondant à la bande plus intense détectée en zymographie.

IV.1.3.c Les cultures cellulaires rénales

La Figure 4.11 présente les résultats obtenus avec 25 µg de protéines de cellules NRK-49F et de cellules RMIC, et avec des milieux correspondants utilisés dans les mêmes proportions que lors de l'électrophorèse en gel d'agarose. D'autre part (Figure 4.12), on a

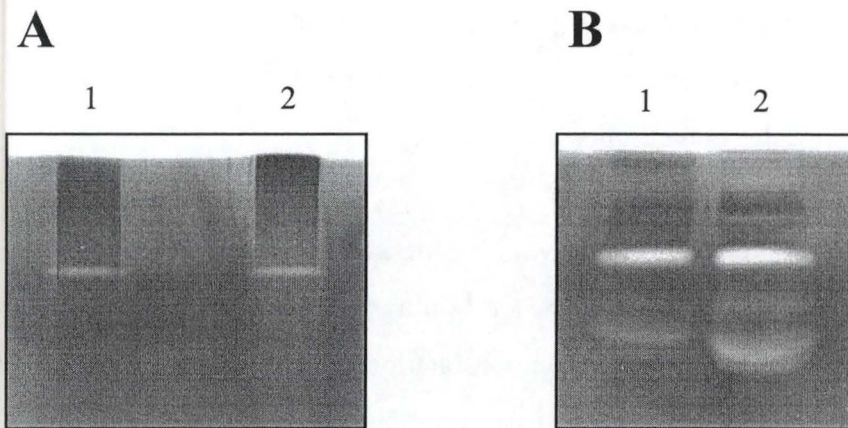


Figure 4.11. Zymographie des extraits cellulaires (A, contenant 25 µg de protéines) et des milieux correspondants (B, contenant 1/10^{ème} du milieu correspondant à ces extraits cellulaires) de cellules NRK (1) et RMIC (2).

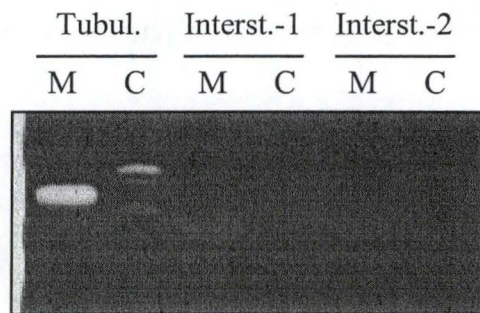


Figure 4.12. Zymographie d'extraits de cellules des tubules collecteurs médullaires internes («Tubul.») et de cellules interstitielles de la médullaire interne («Interst.-1 et -2») en culture. Les extraits cellulaires (C) contiennent 30 µg de protéines [Tubul.] ou 2.5 µg de protéines [Interst.] ; les milieux (M) correspondent à 1/5^{ème} des milieux de ces quantités cellulaires.

déposé 30 μg de protéines de cellules tubulaires et 2.5 μg de protéines de cellules interstitielles de type I et de type II. Les milieux de ces trois types cellulaires ont été testés ; ils sont tout trois concentrés 10 fois. On estime que la quantité de milieu mise au contact de l'hyaluronan est 5 fois plus petite que la quantité totale du milieu d'où proviennent les cellules correspondantes.

Les résultats diffèrent d'une culture à l'autre. On ne détecte pas d'activité hyaluronidasique dans les cellules interstitielles de type I et II, ni dans leur milieu de culture. Par contre, dans le cas des cellules et des milieux cellulaires NRK-49F et RMIC, on obtient une bande. Les cellules tubulaires montrent deux bandes et leur milieu, une bande. Dans tous les cas, on ne peut pas affirmer que la ou les bandes obtenues pour les milieux cellulaires corresponde à la forme d'hyaluronidase détectée dans les lysats cellulaires respectifs.

Les cultures cellulaires tout comme leurs milieux ont des profils différents de ceux des organes. Ces résultats sont plus difficilement comparables à ceux obtenus en gel d'agarose. Dans le cas des cellules NRK-49F, RMIC et tubulaires, ainsi que dans leur milieu, les résultats des deux techniques coïncident. Par contre, pour les cellules et milieux des interstitielles de type I et de type II, les résultats diffèrent. Comment expliquer, dans le cas de ces cellules, que l'on ait un résultat négatif en zymographie et positif en gel d'agarose ? Cela pourrait s'expliquer, par exemple, par l'existence d'une forme d'hyaluronidase qui ne dégrade que partiellement l'acide hyaluronique. Hyal-2 serait un exemple de ce type d'enzyme (Lepperdinger et al., 1998), mais ces résultats restent à confirmer.

IV.2 Expression de Hyal-2 en cellules S2

Après avoir défini le profil d'activité hyaluronidasique dans les différents organes du rat, et constaté son caractère ubiquiste, nous avons tenté de vérifier l'activité enzymatique de la forme d'hyaluronidase "Hyal-2" clonée dans le laboratoire de Physiologie et Pharmacologie. Pour cela, il fallait idéalement l'exprimer dans un système n'ayant pas d'activité hyaluronidasique endogène. Plusieurs lignées de cellules de mammifère transfectables ont été testées au laboratoire, comme par exemple les cellules COS-7, CHO et

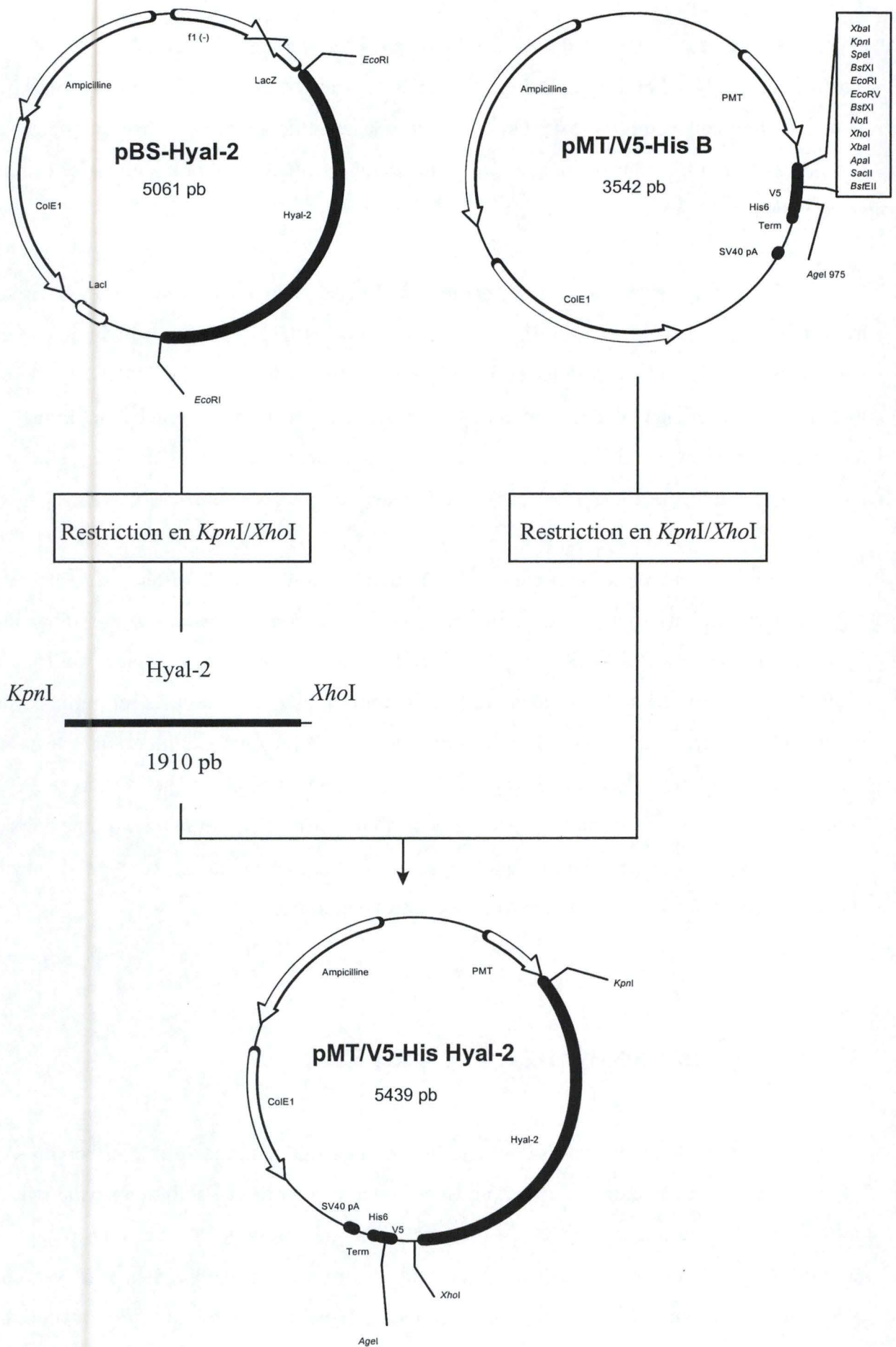


Fig. 4.13. Schéma de la construction pMT/V5-His Hyal-2.

HEK293, mais aucune d'entre elles n'était dépourvue d'activité hyaluronidasique. Ceci n'est guère étonnant vu le caractère ubiquiste de cette activité. Cependant, des cellules d'insectes, dont les Sf9 provenant de *Spodoptera frugiperda* et les S2 originaires de *Drosophila melanogaster*, ne semblaient pas exprimer cette activité (résultats précédents du laboratoire). Elles sont donc un choix intéressant pour la transfection. J'ai ainsi effectué quelques essais d'expression transitoire d'Hyal-2 dans des cellules S2, pour lesquelles existe un kit de transfection commercial proposé par Invitrogen[®]. Pour transférer ces cellules, il fallait préparer un plasmide adéquat contenant l'ADNc d'Hyal-2. J'ai également construit un plasmide qui servirait de contrôle. Ce plasmide est destiné à exprimer une protéine de fusion composée d'Hyal-2 et d'une protéine naturellement fluorescente, l'EGFP.

IV.2.1 Constructions des plasmides

IV.2.1.a Construction pMT/V5-His Hyal-2

Le but de cette construction est d'insérer la séquence codant pour Hyal-2 dans un plasmide transfectable en cellules d'insecte, pMT/V5-His B (Figure 4.13).

Au laboratoire, l'ADNc d'Hyal-2 est disponible dans le plasmide pBS-Hyal-2 (5061 pb). Ce plasmide ainsi que le plasmide pMT/V5-His B (3542 pb) sont restreints par les enzymes *KpnI* et *XhoI*. L'insert contenant Hyal-2 (1910 pb) et son vecteur sont purifiés, puis ligués. Le mélange de ligation est électroporé dans la souche de bactéries électrocompétentes TOP10. On teste par restriction les colonies qui ont poussé sur LB ampicilline (Figure 4.14). Des restrictions supplémentaires, ainsi que des réactions de séquençage, ont confirmé l'insertion attendue.

Ensuite, on réalise une "maxipréparation" d'ADN plasmidique sur une des colonies positives. Ce plasmide est prêt à être transféré.

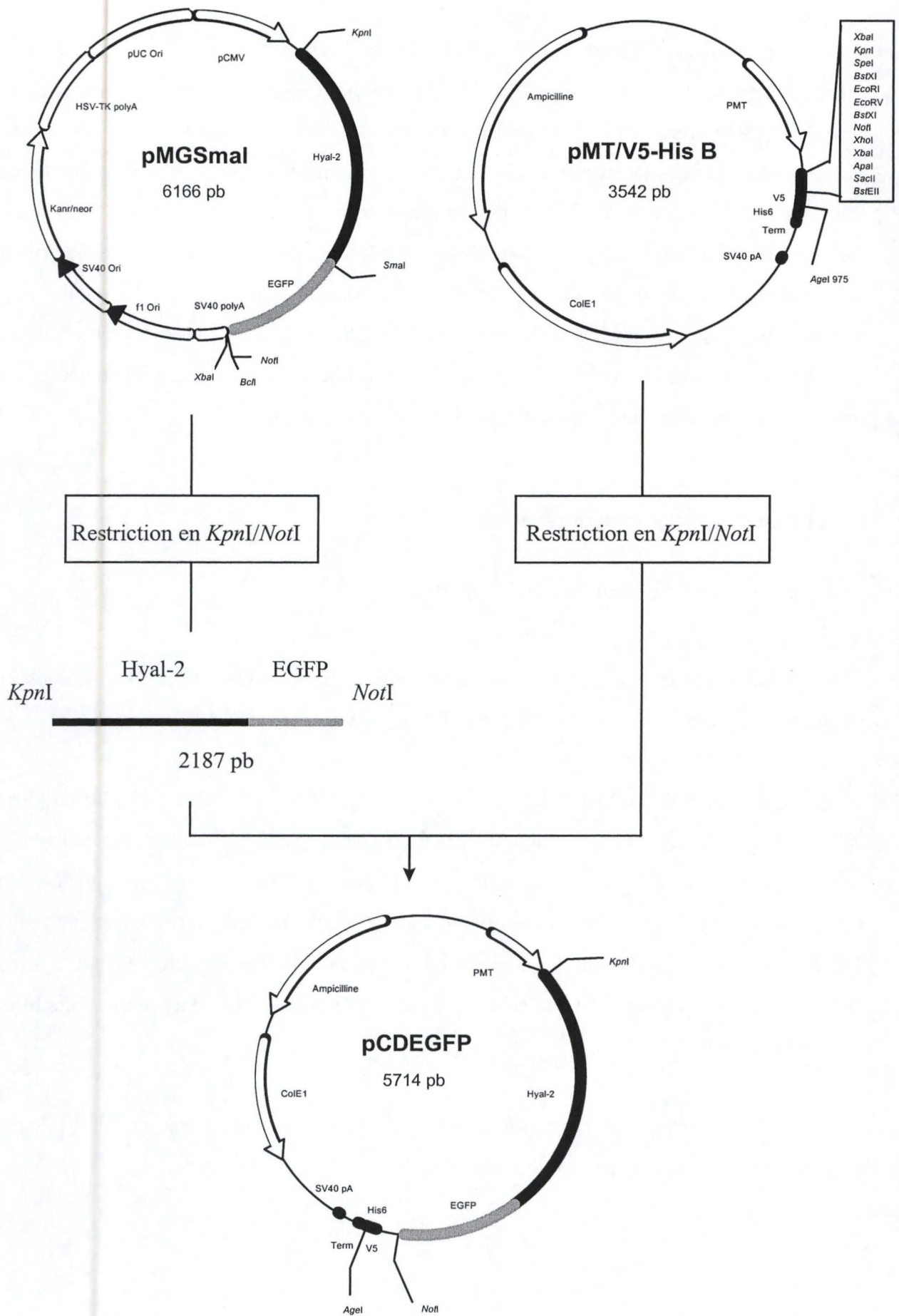


Fig. 4.15. Schéma de la construction pCDEGFP.

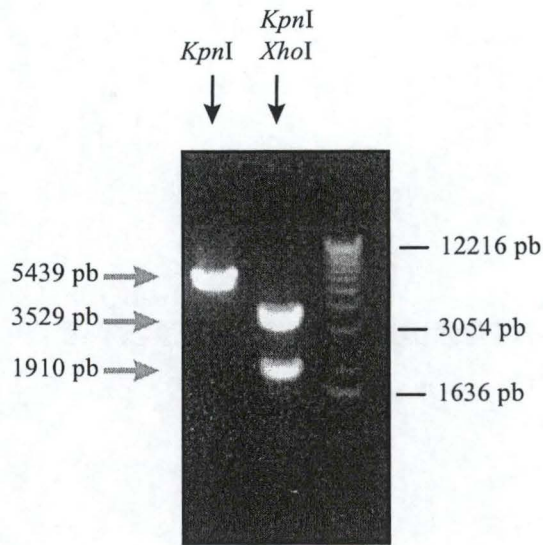


Fig. 4.14. Migration sur gel d'agarose 1% du plasmide pMT/V5-His Hyal-2 restreint par *KpnI* et par *KpnI-XhoI*.

IV.2.1.b Construction pCDEGFP

La construction réalisée consiste à introduire l'ADNc d'Hyal-2, fusionné dans sa partie 3' à l'ADNc de l'EGFP, dans un plasmide spécifique à la transfection en cellules d'insecte (Fig. 4.15).

Le plasmide pMGSmaI (6166 pb), disponible au laboratoire, contient ce produit de fusion (2184 pb) mais n'est pas utilisable en cellules S2. Le plasmide servant de vecteur à la construction est pMT/V5-His B (3542 pb).

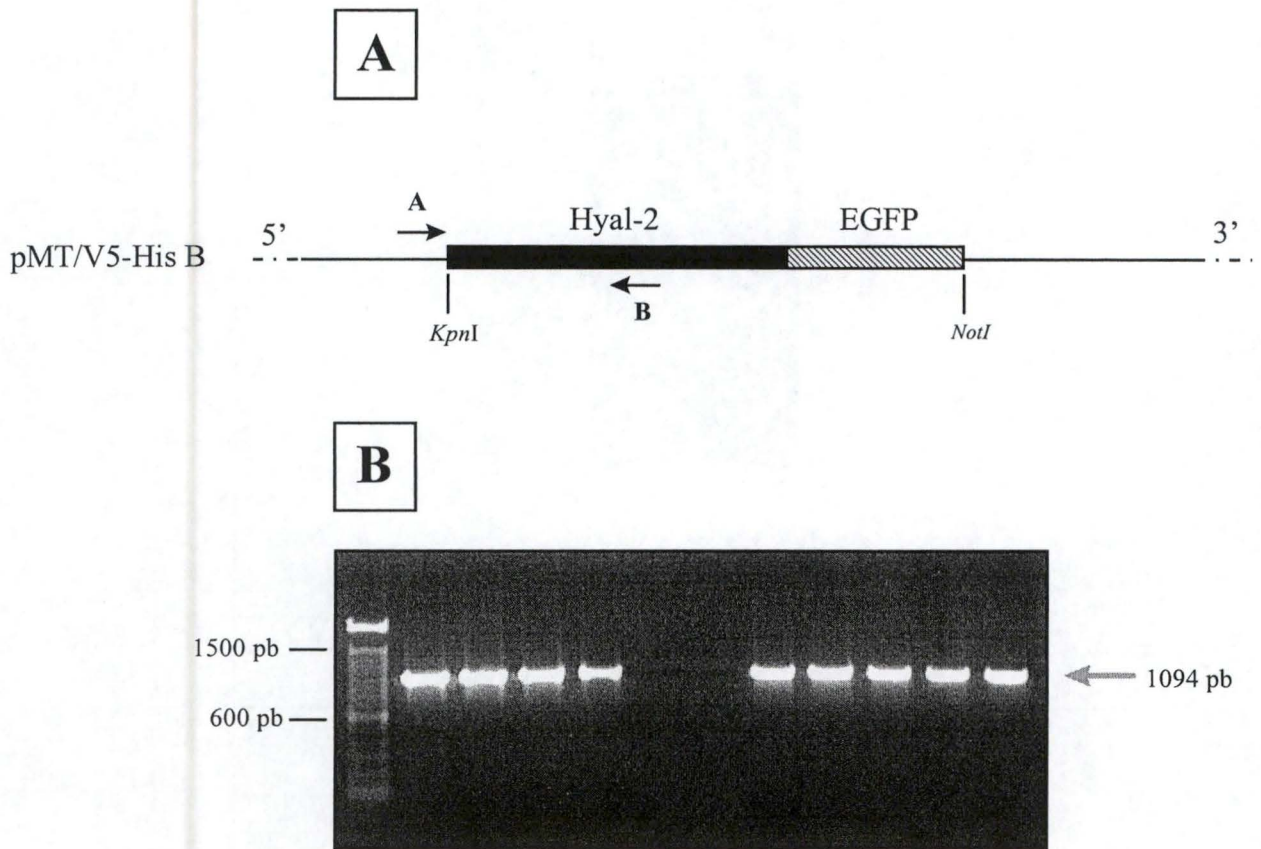


Fig. 4.16. Contrôle de la construction «pCDEGFP».

A, Représentation de la position de l'amorce sens «MT Forward priming site» (A) et de l'amorce antisens «asPB14» (B) utilisées pour le contrôle de l'insertion du fragment «Hyal-2 EGFP», au moyen des enzymes *KpnI* et *NotI*, dans pMT/V5-His B.

B, Migration sur gel d'agarose 1% du fragment de pCDEGFP amplifié par PCR à partir des amorces «MT Forward priming site» et «asPB14». Onze colonies ont été testées ; 9 présentent la bande de taille attendue (1094 pb).

Les plasmides pMGSmaI et pMT/V5-His B sont restreints par les enzymes *KpnI* et *NotI*. L'insert comprenant Hyal-2 fusionné à l'EGFP et son vecteur sont purifiés puis ligués. Après avoir poussé sur LB ampicilline, les colonies sont testées par PCR avec les primers " MT Forward priming site " et " asPB14 " (cf Tableau 3.2 Matériel et méthodes) (Fig. 4.16).

On réalise une "maxipréparation" d'ADN plasmidique sur une des colonies positives. Le plasmide est prêt à l'emploi.

IV.2.2 Contrôle de la capacité de transfection

Pour vérifier que l'expression de Hyal-2 en cellules S2 s'effectue correctement, nous avons choisi de visualiser, au sein des cellules S2, la fluorescence de l'EGFP liée à Hyal-2.

La transfection s'effectue par la technique du $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ qui est la plus fréquemment utilisée pour les cellules S2 (Di Nocera and Dawid, 1983). Le support choisi pour la visualisation au microscope des cellules est la lame "Culture Slides" (Falcon). Ces lames, divisées en 4 puits, sont spécialement étudiées pour donner une bonne qualité optique lors d'observations microscopiques, en particulier en microscopie à fluorescence, tout en permettant la succession de toutes les opérations dans un même puits : mise en culture, transfection et observation. Cependant, pour les cellules S2, l'utilisation de ces lames spéciales n'a été possible que pour la visualisation des cellules. En effet, dans un premier temps, nous avons essayé de transférer des cellules S2 croissant sur ce support, mais cela se solda par un échec. Le taux de croissance de cellules S2 sur le verre était moindre que sur un support en plastique. De plus, après transfection, on pouvait observer un grand nombre de débris cellulaires. Dès lors, les cellules S2 ont été mises en culture et transfectées dans des boîtes NUNC™ de 80 cm² et n'ont été transférées sur lames "Culture Slides" que 4 heures avant d'être observées. Cette période de quelques heures est nécessaire aux cellules S2 pour adhérer à la lame.

Les cellules sont observées sans fixation, protégées simplement par une lamelle en verre, ce qui permet l'observation à fort grossissement (63×, immersion à l'huile). Un

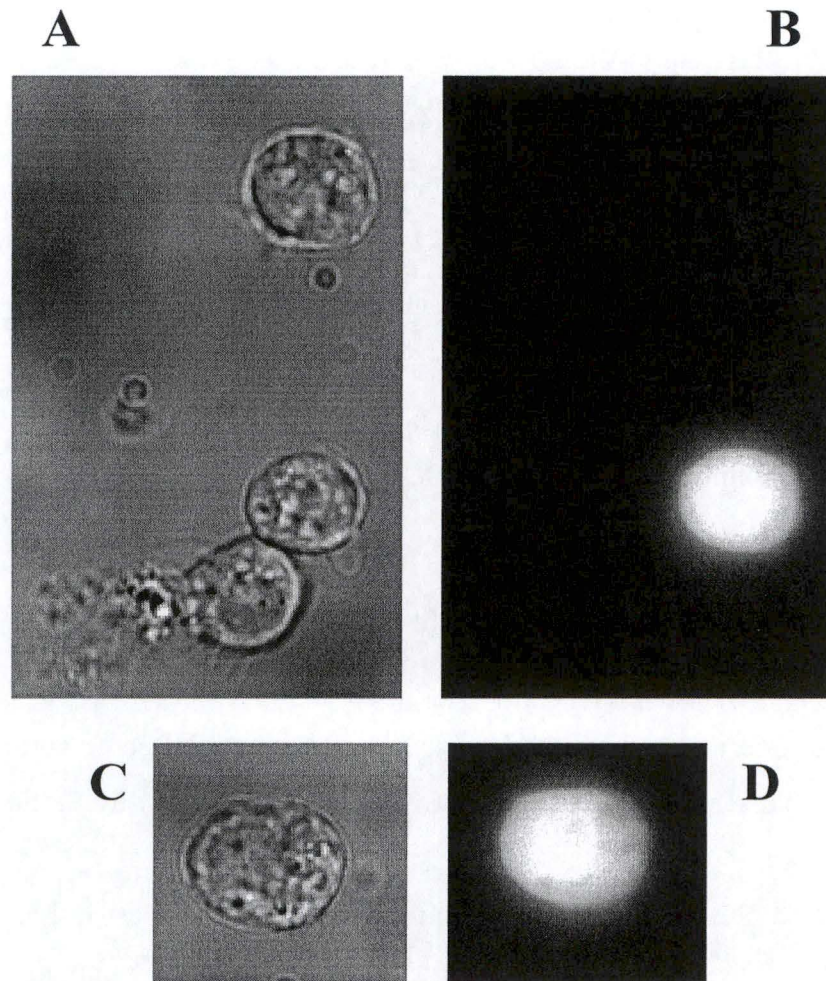


Fig. 4.17. Exemples de cellules S2 transfectées avec pCDEGFP et exprimant la construction Hyal2-EGFP. La fluorescence de l'EGFP (B et D) et les images en lumière transmise correspondantes (A et C) sont observées 48 h après la transfection.

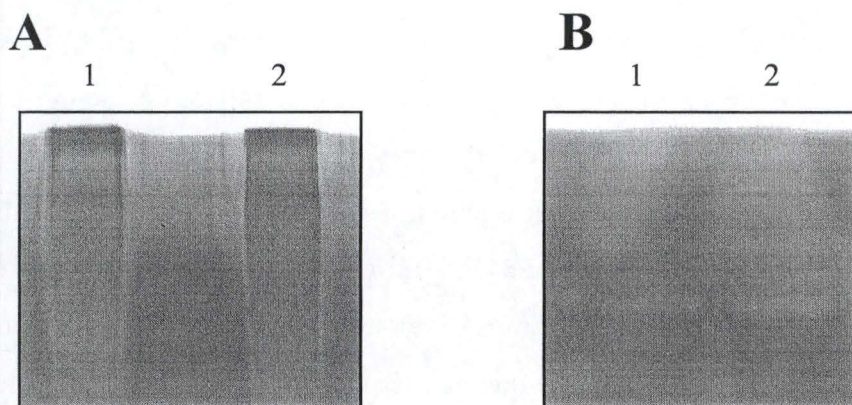


Figure 4.18. Zymographie des extraits cellulaires de cellules S2 (A, contenant 100 μ g de protéines) et des milieux concentrés correspondants (B, contenant l'équivalent de la moitié du milieu correspondant à ces extraits cellulaires). Les cellules S2 ont été transfectées, soit avec l'ADNc de Hyal-2 (pistes 1), soit avec des « fantômes » (pistes 2). Aucune activité hyaluronidasique n'est visible.

exemple de ces observations microscopiques est montré dans la Fig. 4.17. La transfection est manifestement réussie, mais l'observation de l'ensemble des lames montre que le pourcentage de cellules où fluoresce l'EGFP est très faible. Après plusieurs essais de transfusions, nous n'avons jamais pu obtenir plus de quelques % (au maximum 10%) de cellules S2 transfectées par pCDEGFP. Ce chiffre n'est qu'une estimation visuelle, effectuée sans coloration des noyaux, mais il n'est certainement pas sous-évalué et apparaît donc décevant.

IV.2.3 Mesure de l'activité d'Hyal-2 transfectée

Quarante-huit heures après la transfection, un homogénat de cellules S2 (à raison de 100 µg de protéines) et leur milieu de culture dépourvu de sérum ont été prélevés séparément puis déposés sur un gel de polyacrylamide pour pratiquer une zymographie. La quantité de milieu déposé (15 µl de la solution initiale concentrée 20 fois) correspond approximativement à un nombre de cellules deux fois plus faible que celui qui contient 100 µg de protéines. Nous pourrions donc comparer dans chaque cas le résultat du milieu à celui des cellules correspondantes. La zymographie s'est effectuée dans les conditions décrites précédemment.

Comme le montre la Fig. 4.18, aucune bande de lyse n'a été détectée, ni dans les pistes correspondant aux cellules transfectées ou à leurs milieux, ni dans les pistes des cellules non transfectées.

Plusieurs explications sont possibles. La plus plausible est la faible efficacité de transfection, rendant l'activité d'Hyal-2 non détectable. Il se pourrait aussi que les cellules S2 expriment Hyal-2 sous une forme non active. Enfin, Hyal-2 pourrait n'avoir qu'une activité partielle de dégradation de l'hyaluronan, non détectable en zymographie, comme suggéré par Lepperdinger et al. (1998).

L'activité hyaluronidasique de Hyal-2 transfectée a également été recherchée au moyen d'une électrophorèse en gel d'agarose des produits de la réaction enzymatique (Fig. 4.19). Des extraits cellulaires et les milieux de culture ont été testés. La qualité de coloration du gel (visible sur la figure) ne nous a pas permis de mesurer les profils de digestion des extraits cellulaires. On détecte une légère diminution du PM moyen de l'hyaluronan, mais cette

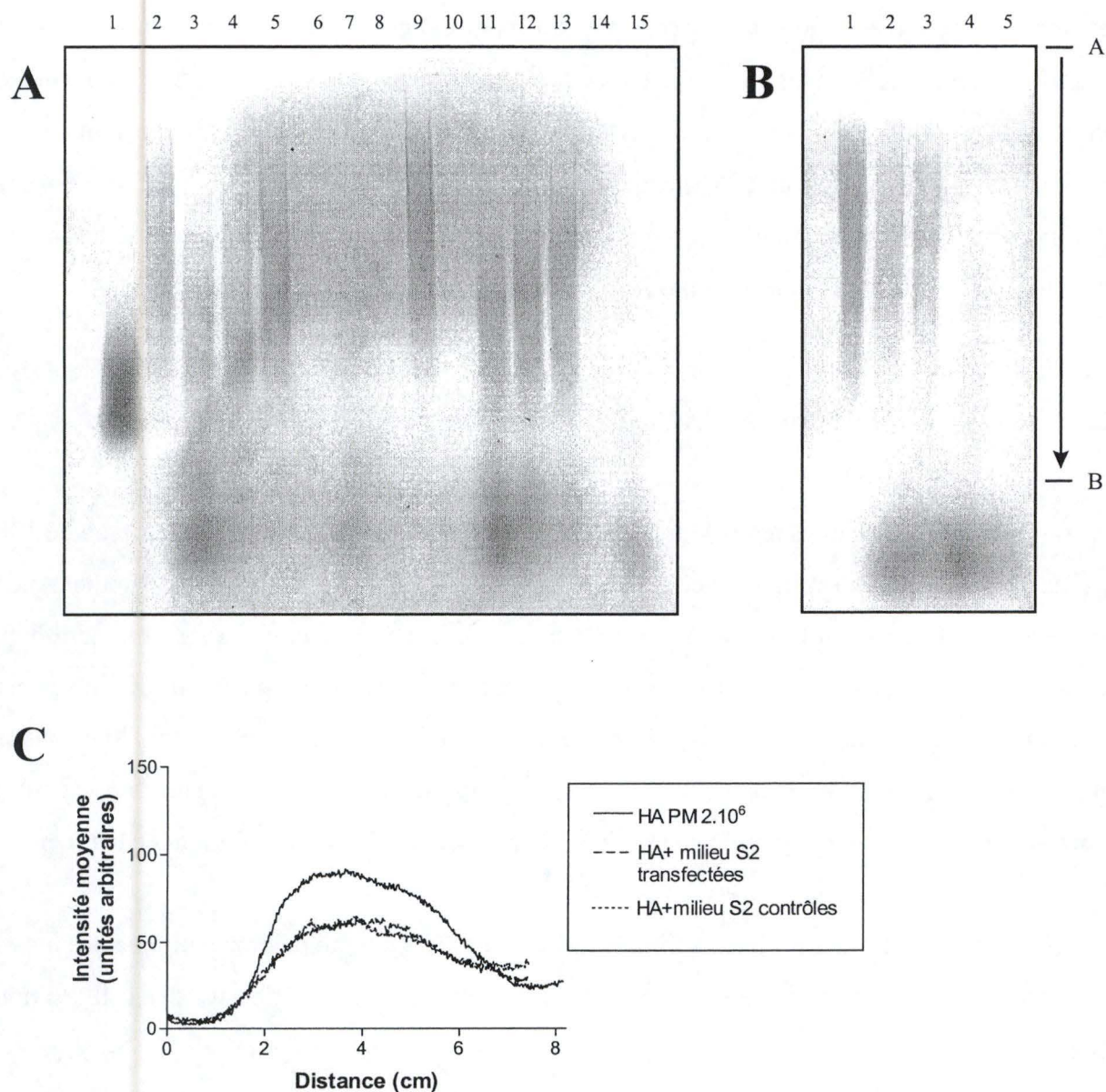


Fig. 4.19. Effets des extraits de cellules S2 et de leurs milieux sur l'acide hyaluronique (HA) visualisé en gel d'agarose 0.5%.

A, Les pistes 1 et 2 contiennent 10 μ g d'HA non digéré d'un PM moyen de $2 \cdot 10^5$ (piste 1) et $2 \cdot 10^6$ Da (piste 2) ; la piste 9 contient 5 μ g d'HA d'un PM moyen de $2 \cdot 10^6$ Da. Des lysats cellulaires de cellules S2 transfectées (pistes 3 à 5, contenant respectivement 300, 150 et 75 μ g de protéines) et de cellules S2 contrôles (pistes 11 à 13 ; mêmes rapports en protéines) ont été incubés avec 5 μ g d'HA d'un PM de $2 \cdot 10^6$ Da. Les pistes 6, 8, 10 et 14 sont vides. Les pistes 7 et 15 contiennent des extraits cellulaires, transfectés (7) ou contrôles (15), incubés sans HA.

B, Effets des milieux des cellules S2 transfectées (piste 2) et contrôles (piste 3) incubés avec 5 μ g d'HA de PM= $2 \cdot 10^6$ Da (10 μ g d'étalon seul, piste 1). Les pistes 4 et 5 sont semblables aux pistes 2 et 3, mais sans HA exogène. Les quantités de milieux déposées dans les pistes 2 et 3 correspondent à 1/50 des lysats cellulaires déposés respectivement dans les pistes 3 et 11 du gel A. En ordonnée, les points A et B indiquent le début et la fin de la zone scannée pour les mesures des profils d'intensité de chaque piste (cf [C]).

C, Profils d'intensité des pistes 1 à 3 de la Fig. [B]. Le PM moyen de l'HA n'est pas modifié par l'incubation avec les milieux des cellules S2 ; la différence d'amplitude des pics doit être interprétée en tenant compte des quantités différentes d'HA utilisées (étalon, 10 μ g ; incubations, 5 μ g).

activité de dégradation est semblable chez les cellules transfectées et chez les cellules contrôles. Il ne semble pas s'agir d'un artefact, car la "digestion" de l'hyaluronan est liée à la quantité de protéines des échantillons (pistes 3 à 5 et 11 à 13 sur la Fig. 4.19A). On peut donc supposer que les cellules S2 non transfectées possèdent une faible activité de dégradation de l'hyaluronan, que la transfection d'Hyal-2 n'a pas permis de surmonter, peut-être en raison du faible taux d'expression que nous avons obtenu lors des transfections transitoires. Ces expériences devraient être répétées afin de confirmer ou non cette impression.

La Fig. 4.19 (B et C) montre également les effets des milieux cellulaires des cellules S2 sur l'acide hyaluronique. Ces milieux correspondent chacun à 1/50^{ème} du milieu de l'extrait de cellules S2 le plus concentré. Le PM moyen de l'hyaluronan n'est pas modifié par l'incubation avec les milieux cellulaires, que les cellules S2 aient été transfectées ou non.

La lignée de cellules S2 n'est donc pas forcément le modèle idéal pour mesurer l'activité de l'enzyme. Comme la zymographie dans les cellules S2, dont nous avons montré qu'elle est une technique de détection sensible, était négative, on peut imaginer que les capacités propres des cellules S2 à dégrader l'hyaluronan proviennent d'une expression endogène d'une hyaluronidase à activité partielle, ou de la production de radicaux oxygénés dont on sait qu'ils diminuent le PM moyen de l'hyaluronan (Philips, 1998).

IV.3 Western Blot

IV.3.1 Introduction

Dans le courant de ce mémoire, le laboratoire a reçu du Dr G. Lepperdinger (Institute of Molecular Biology, Salzburg, Austria) un anticorps polyclonal de lapin spécifique d'Hyal-2, une forme d'hyaluronidase récemment décrite (cf. Introduction). Cet anticorps, appelé S25, a été dressé contre la séquence peptidique "HHANHALPVYVFTRPTY" (Fig. 4.20) liée à l'ovalbumine. Cette séquence est présente dans les trois formes d'Hyal-2 publiées jusqu'ici, celle de l'homme [n° d'accèsion à GenBank : AJ000099], du rat [n°: AF034218] et de la souris [n°: AJ000060], mais dans aucune autre protéine connue, y compris Hyal1, une autre

```

1 mraglgpiit lalvlevawa selkptappi ftgrpfvaw nvptqecapr hkvpldlraf
61 dveatpnegf fnqnittfyy drlglyprfd aagmsvhggv pqngslcahl pmlkeavery
121 iqtqepagla vidweewrpv wvrnwqekdv yrqssrqlva srhpdwpsdr ivkqaqyefe
181 faarqfmlnt lryvkavrpq hlwgfylfpd cynhdyvqnw dsytgrcpdv eva qndqlaw
241 lwaentalfp svyldktlas skhsrnfvsf rvqealrvah thhanhalpv yvfrptytr
301 rltelnqmdl istigesaal gsagvifwgd svyassmenc qnlkkyiltqt lvpvynvsw
361 atqycswtqc hghgrcvrrn psastflhls pssfrlvpgr tpsepqlrpe gelseddlsy
421 lqmhfrchcy lgwggeqcqw nhkraagdas rawagahlas llglvamtlt wtl

```

Fig. 4.20: Séquence peptidique d'Hyal-2 de rat. La partie de séquence reconnue par l'anticorps S25 est représentée en gras et est soulignée.

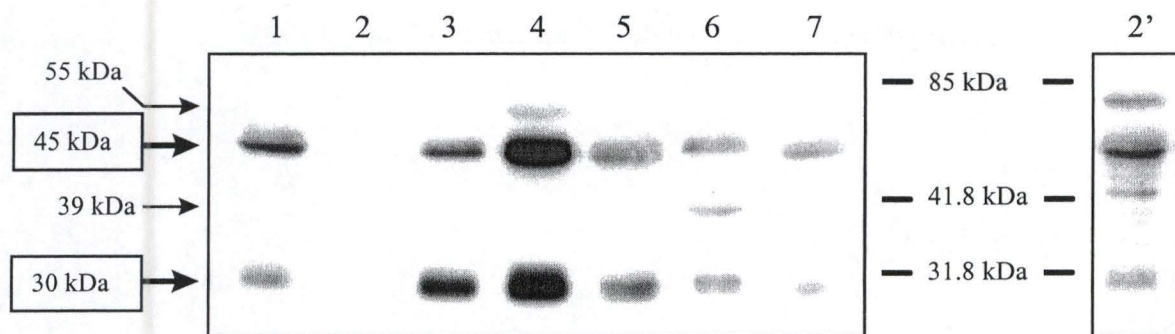


Fig. 4.21. Western blot d'extraits d'organes de rat testés avec l'anticorps anti-peptide «S25» dirigé contre une séquence de Hyal-2. Cinquante µg d'extraits des organes suivants ont été déposés sur le gel : 1, cœur ; 2, cerveau ; 3, rate ; 4, poumon ; 5, foie ; 6, muscle squelettique ; et 7, rein. En 2' est reprise la piste de l'extrait de cerveau, après une exposition radiographique plus longue. Deux bandes principales sont visibles dans la plupart des extraits. Les tailles indiquées de ces bandes sont approximatives et représentent une moyenne calculée sur plusieurs expériences.

forme d'hyaluronidase, et « Hyal-3 », une séquence similaire découverte dans le génome. Nous avons vérifié ces informations grâce au programme BLASTP 2.0.8 qui est disponible sur Internet à l'adresse : " <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast> " .

Selon les tests effectués par le groupe de Lepperdinger, l'anticorps S25 est spécifique d'Hyal-2 en Western Blot et en immunoprécipitation, et il détecte la protéine Hyal-2 dans tous les organes de la souris adulte, excepté dans le cerveau (Lepperdinger et al., 1998).

Cet anticorps est donc un outil utile pour essayer de détecter la présence de la protéine exprimée dans les cellules S2 transfectées. Auparavant, toutefois, nous avons vérifié la spécificité de cet anticorps en recherchant en Western Blot la présence d'Hyal-2 dans les tissus et les cellules de rat qui ont été utilisés dans les analyses enzymologiques précédentes.

IV.3.2 Expression d'Hyal-2 chez le rat

La Fig. 4.21 montre les résultats obtenus avec les extraits des différents organes du rat. Deux bandes principales sont présentes dans tous les organes, l'une à environ 45 kDa et l'autre à 30 kDa. On distingue parfois une troisième bande, plus fine, située à environ 55 kDa, mais sa spécificité n'est pas certaine. Les tailles des bandes sont approximatives et correspondent à une moyenne calculée sur plusieurs membranes.

Pour une même quantité de protéines, qui est ici de 50 µg, l'intensité des bandes obtenues varie d'un organe à l'autre. Dans un ordre d'activité décroissant, on peut placer les organes comme suit : poumon > rate > foie > coeur > muscle squelettique = rein >> cerveau. Dans la piste correspondant au muscle squelettique, il apparaît une quatrième bande, de signification obscure.

Ces résultats confirment, chez le rat, le caractère ubiquiste d'Hyal-2 déjà noté chez la souris. La principale différence est la détection d'un signal dans le cerveau de rat, quoiqu'il soit de signification douteuse vu la nécessité d'un temps d'exposition plus long pour le visualiser clairement. Le cerveau de souris restait négatif selon Lepperdinger et al. (1998).

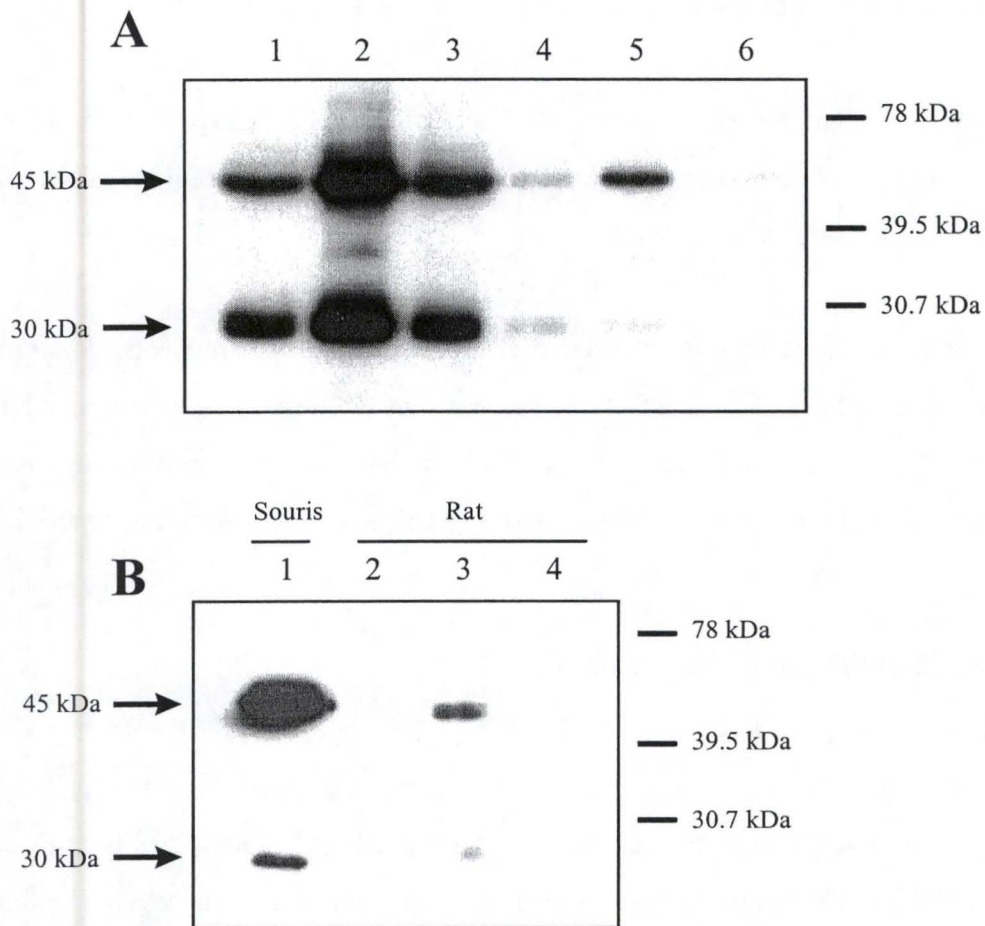


Fig. 4.22. Western blots d'extraits d'organes de souris et de rat testés avec l'anticorps anti-peptide «S25» dirigé contre une séquence de Hyal-2.

En **A** ont été déposés des extraits d'organes de souris : foie (piste 1 : 63 μg de protéines ; piste 4 : 6.3 μg), poumon (piste 2 : 45 μg de protéines ; piste 5 : 4.5 μg) et rein (piste 3 : 51 μg de protéines ; piste 6 : 5.1 μg). Deux bandes principales sont visibles. Les tailles indiquées de ces bandes sont approximatives et représentent une moyenne calculée sur plusieurs expériences.

En **B**, 25 μg de protéines de poumon de souris (piste 1) sont comparés à des extraits d'organes de rat : 65 μg de protéines de foie (piste 2), 50 μg de protéines de poumon (piste 3) et 50 μg de protéines de rein (piste 4).

La présence de deux bandes en Western Blot des divers organes du rat est plus étonnante, car l'équipe autrichienne n'aurait observé qu'une seule bande chez la souris. Dès lors, nous avons voulu répéter cette expérience avec quelques organes de la souris. Le résultat (Fig. 4.22) confirme la présence chez la souris de deux, voire trois, bandes dont les PM apparents sont identiques à ceux du rat. Ces PM diffèrent nettement de celui (± 60 kDa) que rapportaient Lepperdinger et al. (1998), avec un autre anticorps. Nous ne savons pas pourquoi nos résultats sont différents de ceux de Lepperdinger et al., mais nous ne connaissons pas le PM exact observé par ces auteurs avec l'anticorps "S25". Notons que l'immunoréactivité du poumon de souris dépasse nettement celle du rat, compte tenu des quantités déposées (Fig. 4.22).

La Fig. 4.23 illustre les résultats du Western Blot obtenus avec 25 μ g de protéines des différentes parties du rein. On retrouve deux bandes de même taille que celles décrites pour les organes. Ces bandes sont plus intenses dans la médullaire interne que dans les autres parties du rein. Ce résultat est tout à fait parallèle à ceux obtenus avec la détection de l'activité des hyaluronidases.

La Fig. 4.24 montre les résultats en Western Blot des lysats des cellules en culture. Jamais on n'obtient les bandes attendues. Parfois on observe de fines bandes d'un PM différent de celles décrites pour les extraits tissulaires. Ces bandes n'ont vraisemblablement rien de spécifique. Il faut donc conclure que la protéine Hyal-2 n'est pas exprimée dans les types cellulaires que nous avons examinés, ou qu'elle l'est trop faiblement. Ce résultat est étonnant, car dans la médullaire interne en particulier, dont le Western Blot tissulaire est nettement positif, les cellules RMIC ou les cultures primaires des cellules interstitielles et les cellules des tubules collecteurs constituent la grande majorité des cellules présentes. Il est possible que ce soit la mise en culture elle-même ou les conditions techniques (support en plastique, etc...) qui fassent "disparaître" l'expression d'Hyal-2. Nous n'avons pas obtenu de résultats concluants avec les milieux respectifs de ces cellules (résultats non montrés). Il serait préférable de tester les milieux au moyen d'une immunoprécipitation, mais la quantité d'anticorps dont nous disposons est assez faible.

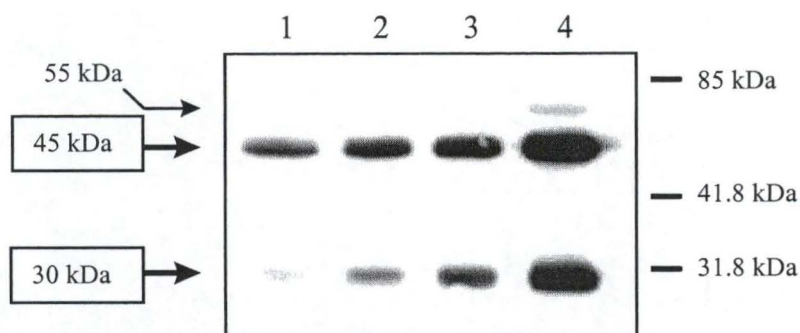


Fig. 4.23. Western blot d'extraits de différentes parties du rein de rat testés avec l'anticorps anti-peptide «S25» dirigé contre une séquence de Hyal-2. Vingt-cinq μg de protéines de chacune des parties suivantes ont été déposés sur le gel : 1, rein total ; 2, cortex ; 3, médullaire externe ; et 4, médullaire interne. Des bandes identiques à celles décrites précédemment (cf Figs. 4.21 et 4.22) sont présentes. Leurs tailles indiquées sont approximatives.

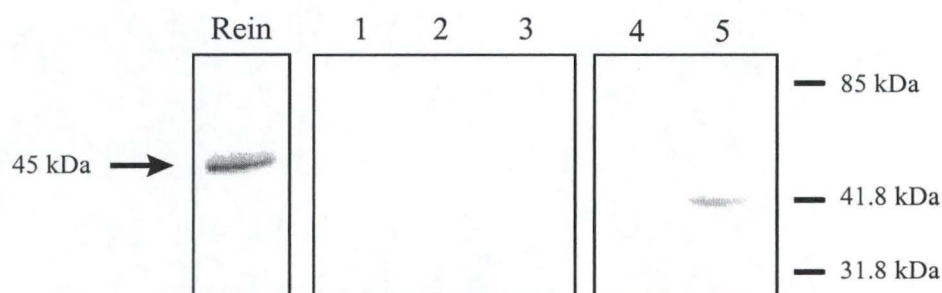


Fig. 4.24. Western blot de lysats cellulaires testés avec l'anticorps anti-peptide «S25» dirigé contre une séquence de Hyal-2. Vingt-cinq μg de protéines de cellules NRK-49F (1), RMIC (2), tubulaires (3) et interstitielles-1 (5), et 3.5 μg de protéines de cellules interstitielles-2 (4) ont été déposés sur le gel. Un Western blot d'extrait de rein (25 μg de protéines), réalisé simultanément, est montré à gauche pour comparaison. Il n'y a pas de bande spécifique manifeste dans les extraits des cellules en culture, excepté dans la piste 5 où une fine bande apparaît à un PM apparent (environ 42 kDa) différent de celui des bandes principales découvertes dans les extraits d'organes de rat et de souris.

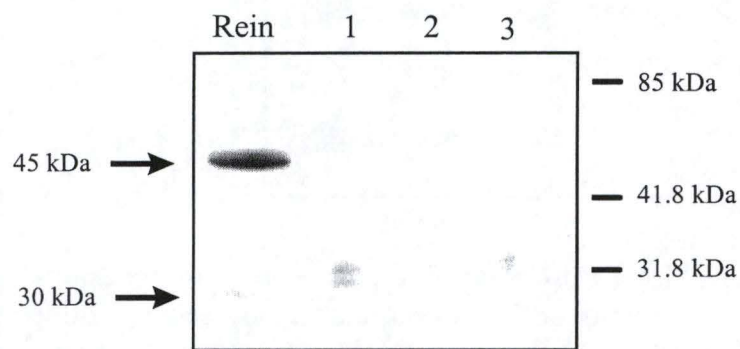


Fig. 4.25. Western blot de lysats cellulaires de cellules S2 transfectées, testés avec l'anticorps anti-peptide «S25» dirigé contre une séquence de Hyal-2. Quarante-vingt μg de protéines de cellules S2 transfectées avec le plasmide pCDEGFP (contenant la protéine de fusion «Hyal-2-EGFP») (1), de cellules S2 transfectées avec l'ADNc de Hyal-2 (2), et de cellules S2 contrôles (3) ont été déposés sur le gel. Un Western blot d'extrait de rein (25 μg de protéines), réalisé simultanément, est montré à gauche pour comparaison. Il n'y a pas de bande spécifique visible dans les extraits des cellules S2.

IV.3.3 Expression d'Hyal-2 dans les cellules S2

L'intérêt principal de l'anticorps anti-Hyal-2 était de détecter la présence de la protéine dans les lysats ou les milieux cellulaires des cellules S2 transfectées avec l'ADNc d'Hyal-2.

Malheureusement, les expériences (Fig. 4.25), effectuées avec des lysats de cellules S2 contenant 80 µg de protéines, sont restées négatives. Les milieux des cellules S2 transfectées ont également été testés, mais sans être concentrés. Le Western blot est resté négatif (résultats non montrés).

Nous ne sommes donc pas parvenu à détecter l'expression d'Hyal-2 dans les cellules S2 transfectées.

IV.4 Localisation intracellulaire de Hyal-2

Dans cette dernière partie du travail, nous allons observer la localisation intracellulaire d'Hyal-2 après son expression sous forme de protéine de fusion avec l'EGFP dans des cellules COS-7. Une tentative similaire avait eu lieu l'année dernière lors d'un travail de mémoire (Gillot, 1998). A ce moment, la construction transfectée reposait sur la fusion de l'ADNc de l'EGFP en position 3' de la séquence d'Hyal-2. Les résultats obtenus montraient une localisation réticulaire de l'EGFP, toujours accrochée à Hyal-2. Les images évoquaient une rétention de la protéine de fusion dans le réticulum endoplasmique. L'hypothèse avait été émise que la fusion C-terminale de Hyal-2 avec l'EGFP empêchait le clivage du signal correspondant à l'attache GPI et forçait la protéine de fusion à séjourner dans le réticulum endoplasmique.

Nous avons donc décidé de réaliser une nouvelle construction, dans laquelle la séquence codant pour l'EGFP serait insérée entre celle qui correspond au peptide signal N-terminal (SP) d'Hyal-2 et celle qui code pour le reste de la protéine. Nous espérons ainsi voir cette construction suivre une voie intracellulaire identique à la protéine sauvage.

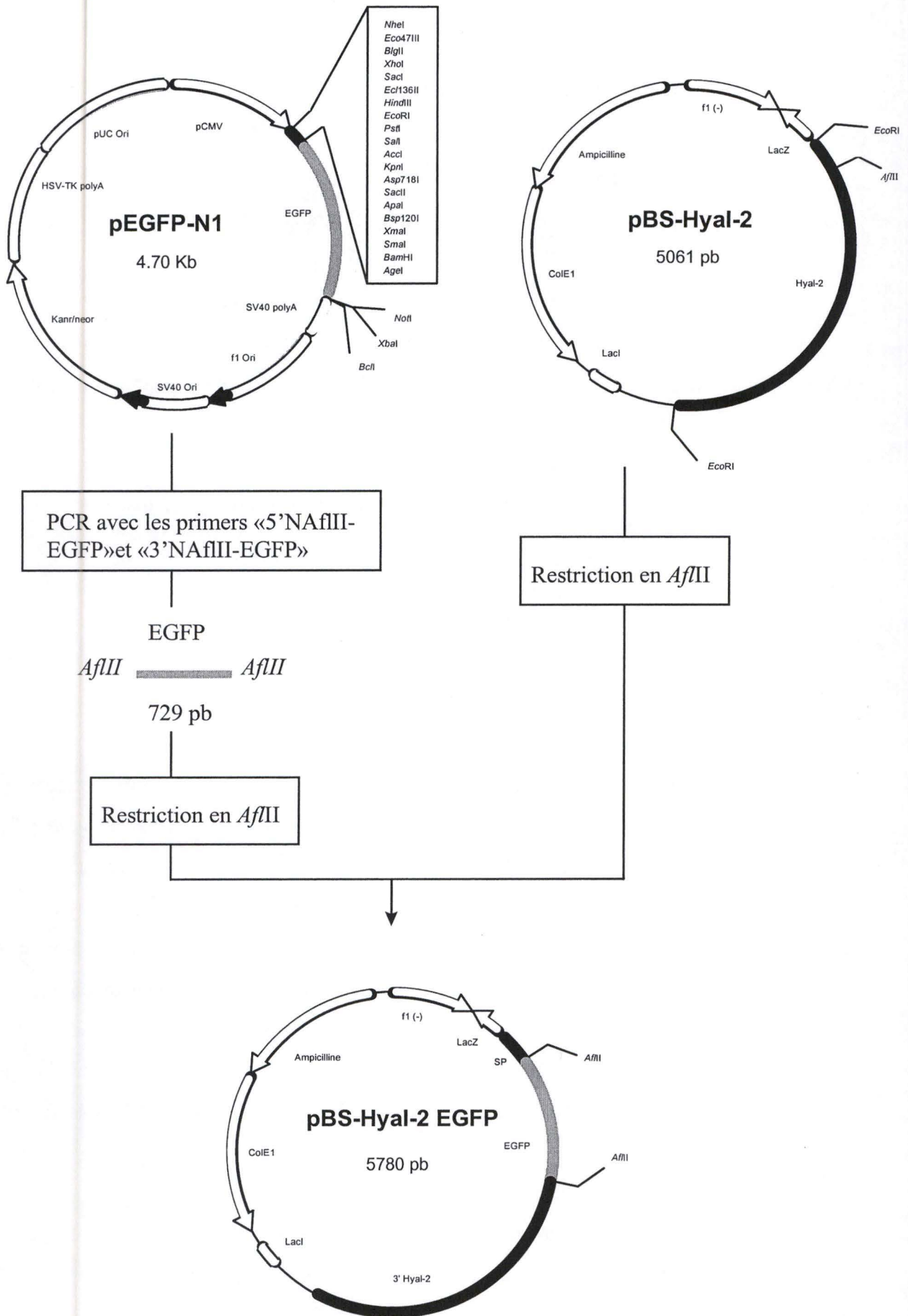


Fig. 4.26. Schéma de la construction pJBS-Hyal-2 EGFP.

IV.4.1 Construction de pJMEGFP

Le plasmide pEGFP-N1 (Clontech) contient la phase codante de l'EGFP. Celle-ci a été amplifiée par PCR, en aval du codon d'initiation et en amont du codon stop, avec les amorces "5'NAflIII-EGFP" en 5' et "3'NAflIII-EGFP" (cf Tableau 3.2 Matériel et Méthodes). Ces amorces vont ajouter un site *AflIII* de chaque côté du fragment amplifié. En effet, un site *AflIII* est présent dans l'ADNc de Hyal-2, en position 3' de la séquence codant pour le peptide signal, c'est-à-dire précisément à l'endroit où nous souhaitons insérer l'EGFP dans Hyal-2 (Fig. 4.26).

Le produit d'amplification obtenu (729 pb) et le plasmide pBS-Hyal-2 (5061 pb) ont été restreints par *AflIII*, purifiés puis ligués (Fig. 4.26 et 4.27). Le mélange de ligation a été électroporé dans la souche de bactéries électrocompétentes DH11S. Après avoir poussé sur LB ampicilline, les colonies présentes sont testées par PCR avec les primers "sForward-EGFP" et "asPB14". Une seule des colonies testées s'est avérée positive (Fig. 4.28). L'insertion a été vérifiée par des réactions de PCR et de séquençage. Ce dernier a été réalisé à l'aide des amorces "sM13 reverse" de pBLUESCRIPT et "asPB4" ou "asHyal3SD" (cf Tableau 3.3 Matériel et Méthodes). Il nous a permis de confirmer que la phase ouverte de lecture était bien respectée dans la protéine de fusion "SP-EGFP-Hyal-2".

Pour être transfectée en cellules COS-7, cette construction doit être déplacée dans un vecteur possédant un promoteur fort. Le vecteur que nous allons utiliser est pcDNA1/Amp (4800 pb) de Invitrogen (Fig. 4.29).

Les plasmides pBS-Hyal-2 EGFP et pcDNA1/Amp sont restreints par *BamHI* et *XhoI*. L'insert ainsi que son vecteur pcDNA1/Amp sont purifiés puis ligués. Le mélange de ligation est électroporé dans la souche de bactéries électrocompétentes DH11S. Les colonies ayant poussés sur LB ampicilline sont testées par PCR avec les amorces "sForward-EGFP" et "asPB14" (cf Tableau 3.2 Matériel et Méthodes). Trois colonies des colonies testées sont positives (Fig. 4.30).

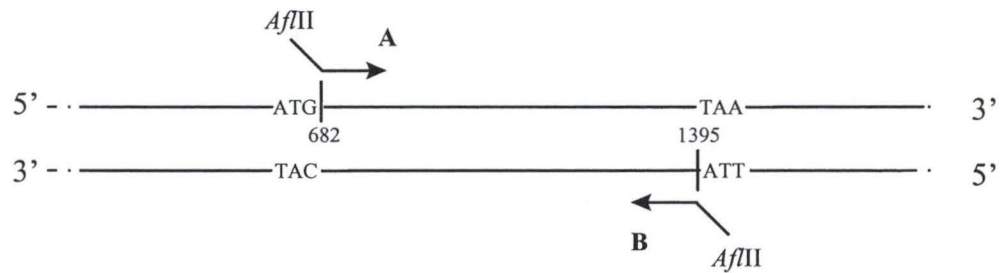
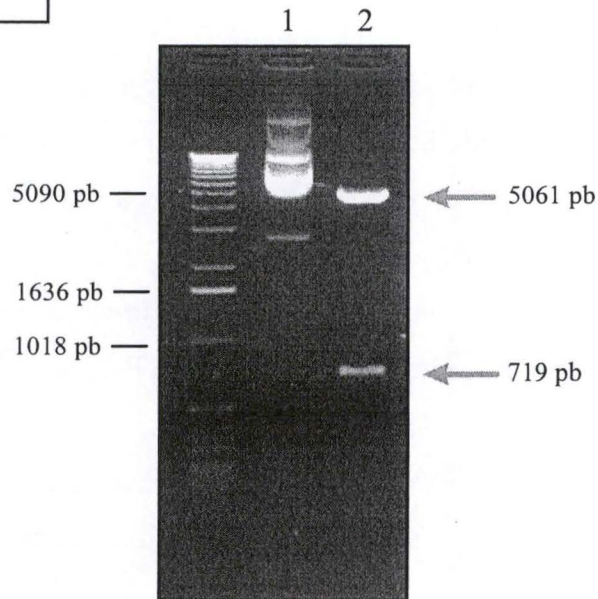
A**B**

Fig. 4.27. Représentation de la démarche suivie pour l'insertion de l'ADNc de l'EGFP en 3' du peptide signal d'Hyal-2.

A, Positionnement des amorces «5'NAflIII-EGFP» (A) et «3'NAflIII-EGFP» (B) sur l'ADNc de l'EGFP. Ces amorces contiennent le site de restriction *Afl*III. Le fragment amplifié sera ensuite ligué dans le plasmide pBS-Hyal-2.

B, Migration sur gel d'agarose 1% de la construction «pBS-Hyal-2 EGFP», soit le plasmide non restreint (1), soit le plasmide restreint par *Afl*III (2).

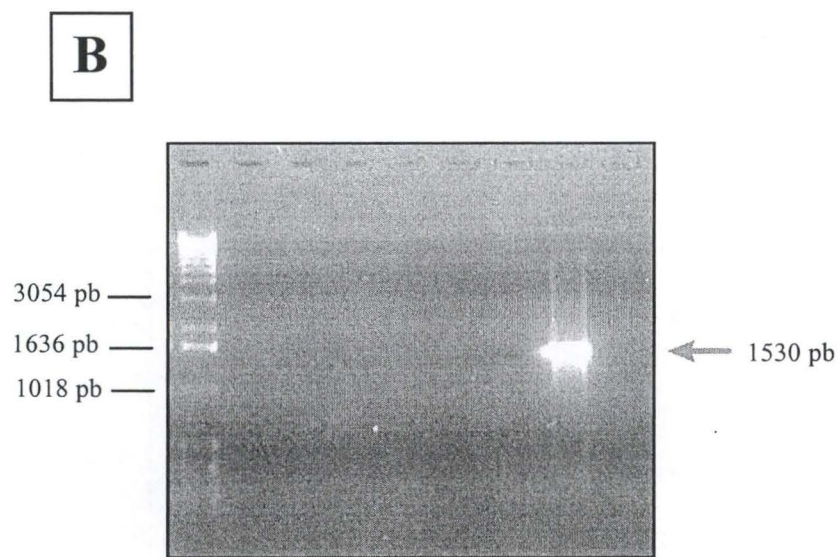
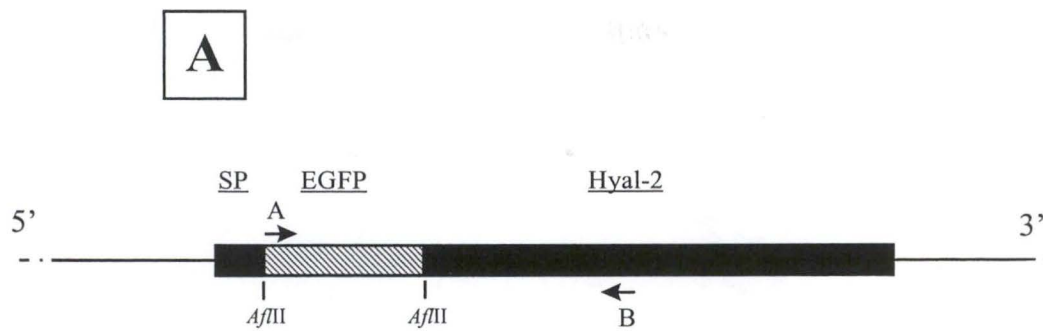


Fig. 4.28. Contrôle de la construction «pBS-Hyal-2 EGFP».

A, Représentation de la position de l'amorce sens «sForward-EGFP» (A) et de l'amorce antisens «asPB14» (B) utilisées pour le contrôle de l'insertion d'EGFP dans pBS-Hyal-2.

B, Migration sur gel d'agarose 1% du fragment de «pBS-Hyal-2 EGFP» amplifié par PCR à partir des amorces ci-dessus. La figure montre une bande positive, qui présente la bande de taille attendue (1530 pb).

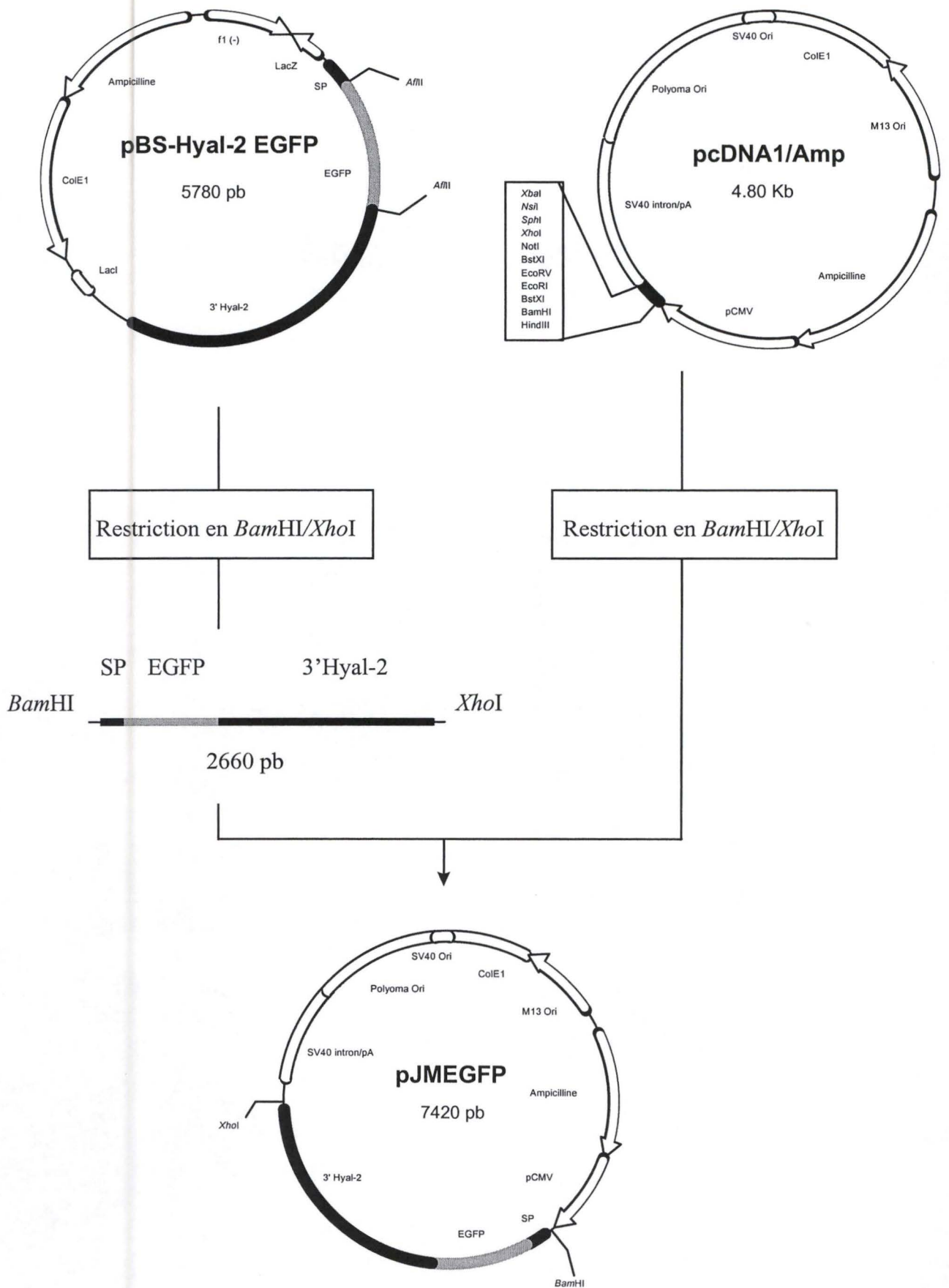


Fig. 4.29. Schéma de la construction pJMEGFP.

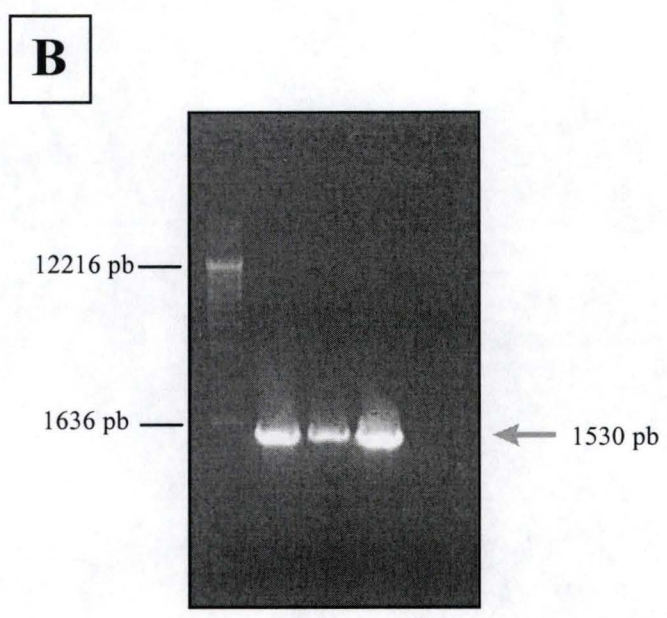
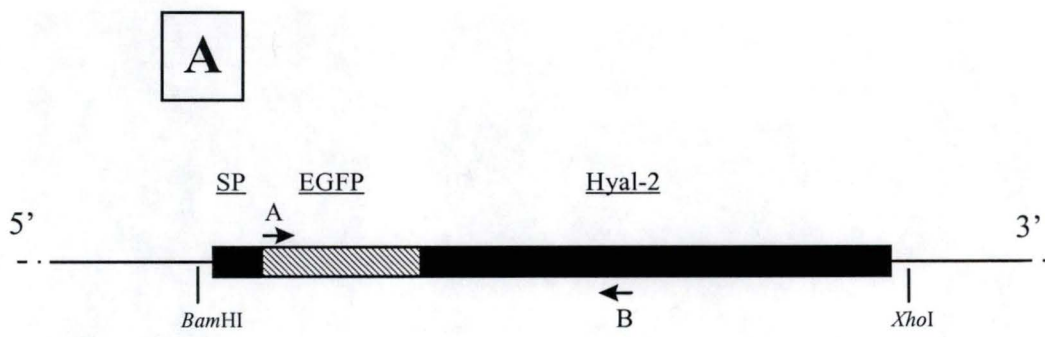


Fig. 4.30. Contrôle de la construction «pJMEGFP».

A, Représentation de la position de l'amorce sens «sForward-EGFP» (A) et de l'amorce antisens «asPB14» (B) utilisées pour le contrôle de l'insertion d'«Hyal-2 EGFP» dans pcDNA1/Amp.

B, Migration sur gel d'agarose 1% du fragment de pJMEGFP amplifié par PCR à partir des amorces ci-dessus. La figure montre 3 colonies positives, qui présentent la bande de taille attendue (1530 pb).

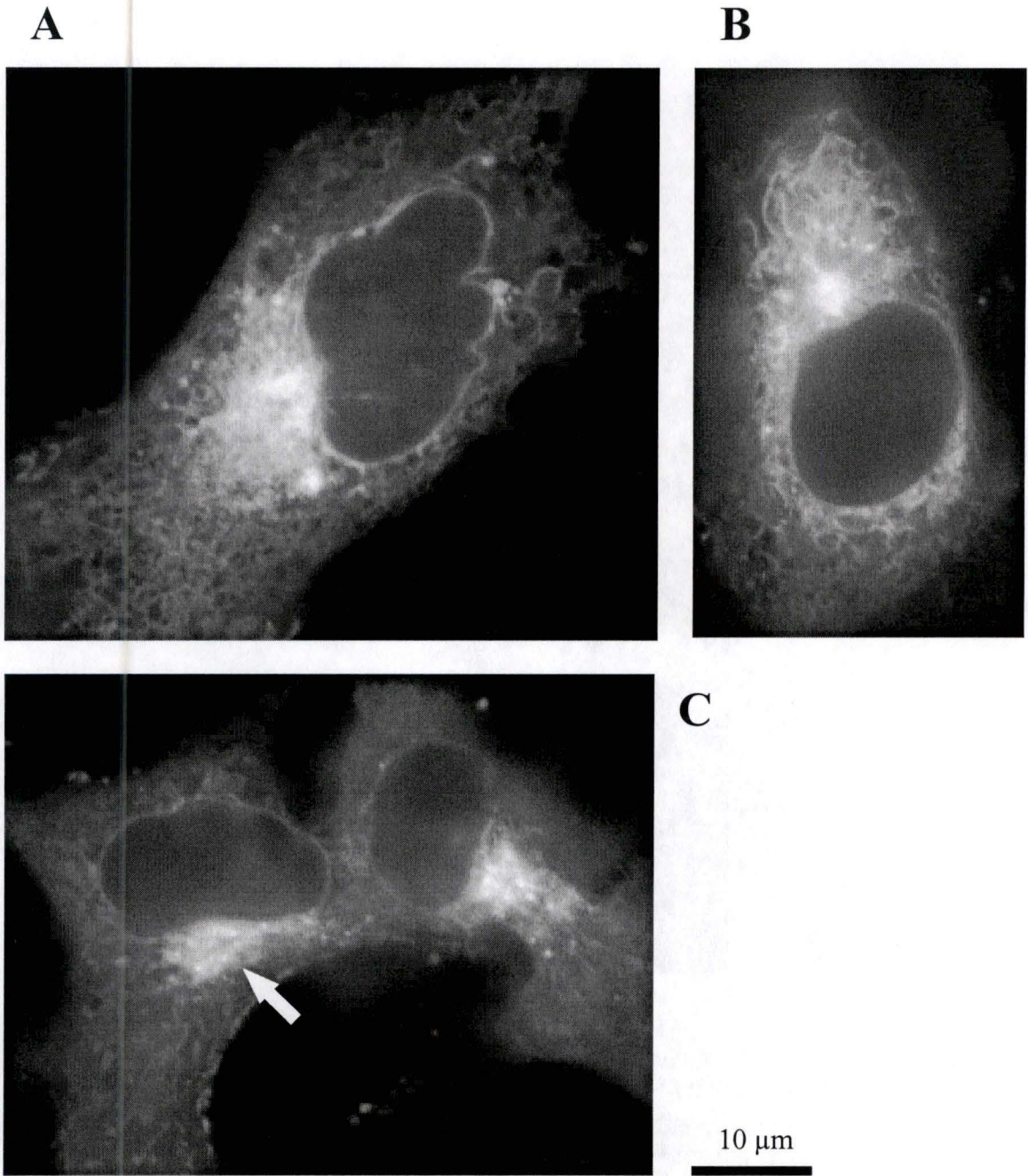


Fig. 4.31. Observation de la fluorescence des cellules COS-7 24 h après leur transfection avec la construction pJMEGFP (protéine de fusion «SP-EGFP-Hyal2») à raison de 0.6 µg d'ADN par puits de 9.6 cm². La flèche indique une région de fluorescence plus intense, compatible avec la position du Golgi.

On réalise une maxipréparation d'ADN plasmidique sur une des colonies positives. Le plasmide obtenu a été nommé " pJMEGFP " (7420 pb) ; il contient la séquence codant pour une protéine de fusion " SP-EGFP-Hyal-2 ".

IV.4.2 Microscopie

Dans le cadre de ce travail, quelques expériences de transfection de cellules COS-7 au moyen de pJMEGFP ont pu être menées à terme. Nous avons utilisé la technique de transfection à la Lipofectamine[®], car elle avait donné de bons résultats dans le laboratoire (Gillot, 1998). Le protocole est légèrement modifié ; il s'agit maintenant d'une nouvelle forme commerciale de lipides de transfection appelée Lipofectamine Plus[®]. La quantité d'ADN utilisée a été maintenue aussi faible que possible pour obtenir une fluorescence mesurable par la caméra. Nous avons utilisé 0.6 ou 0.3 µg d'ADN par puits de culture de 9.6 cm².

La proportion de cellules COS-7 transfectées qui présentent une fluorescence intracellulaire détectable est assez élevée ; elle tourne autour de 50%. Dans le cadre de mon mémoire, nous nous sommes contentés d'observations microscopiques "simples", sans tenter de colocaliser d'autres protéines par des méthodes immunohistochimiques. Nous ne pouvons donc que spéculer sur la signification de l'aspect de la fluorescence intracellulaire. Cet aspect est assez varié (Fig. 4.31 et 4.32).

Vingt quatre heures après la transfection, la fluorescence intracellulaire obtenue présente souvent un aspect réticulaire et elle souligne nettement le contour du noyau (Fig. 4.31A par exemple). Toutefois, l'apparence réticulaire est moins typique, ou moins exclusive, d'un marquage du réticulum endoplasmique que celle observée l'année dernière avec la construction " SP-Hyal-2-EGFP ". Dans toutes les expériences que nous avons réalisées, un marquage fluorescent fortement suggestif de l'appareil de Golgi est évident (Figs. 4.31 et 4.32). Dans certaines cellules, la membrane plasmique est également soulignée. Ce marquage de la membrane plasmique devient en fait de plus en plus visible avec le temps passé après la transfection (Fig. 4.32). Nous avons ainsi pu observer des cellules COS-7 transfectées avec une quantité plus faible d'ADN (0.3 µg / puits), jusqu'à 72 h après la transfection (Fig. 4.32C). Dans certaines d'entre elles, le marquage membranaire prenait le pas sur le reste de la

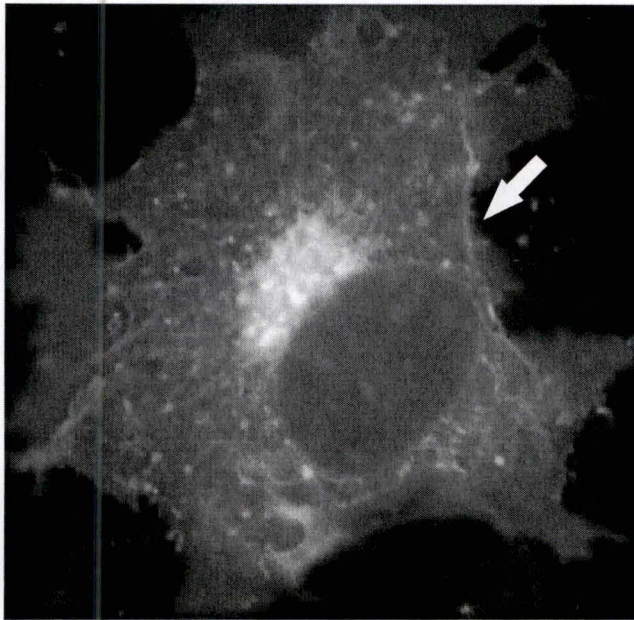
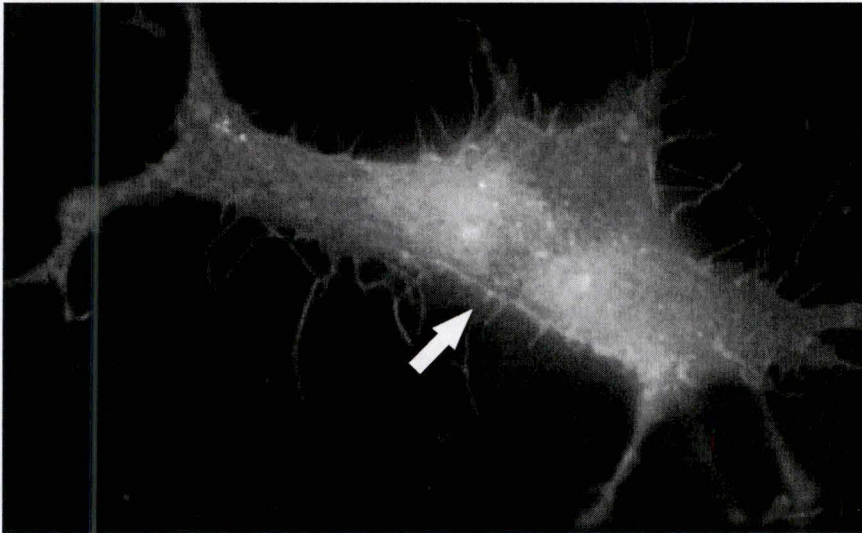
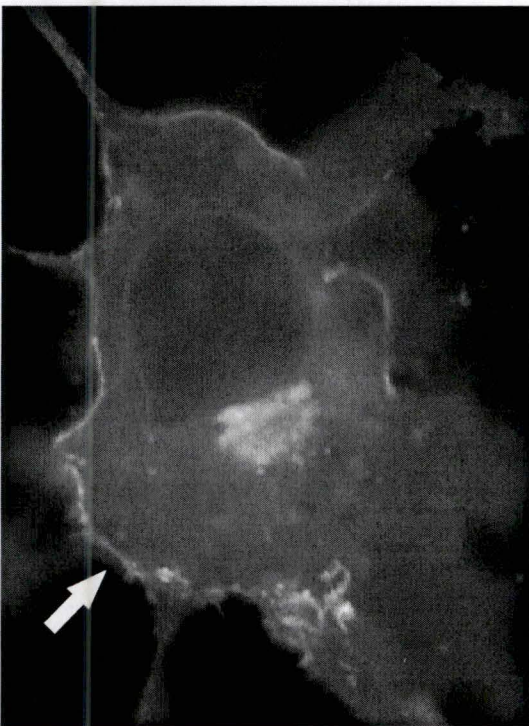
A10 μ m**B****C**

Fig. 4.32. Observation de la fluorescence des cellules COS-7 48 h (A et B) et 72 h (C) après transfection avec la construction pJMEGFP (protéine de fusion «SP-EGFP-Hyal2») à raison de 0.3 μ g d'ADN par puits de 9.6 cm². Dans chaque image, la membrane plasmique montre une fluorescence accentuée (flèches). L'image B a été prise dans un plan focal situé dans la partie basale de la cellule en contact avec la lamelle de verre.

fluorescence intracellulaire. Parfois, également, un marquage de la membrane, ou d'extensions cytoplasmiques filiformes, était observé dans la partie basale de la cellule, contre la lamelle en verre qui leur sert de support lors de la transfection (Fig. 4.32B). Ce dernier type d'image n'était toutefois objectivé que dans un petit nombre de cellules.

Dans aucun cas nous n'avons pu observer de fluorescence de type exclusivement vésiculaire, telle qu'on pourrait en observer si la protéine de fusion séjournait uniquement dans les lysosomes. C'est pourtant une image exclusivement vésiculaire que Lepperdinger et al. (1998) présentaient dans leur article décrivant la localisation intracellulaire d'une protéine de fusion "Hyal2-EGFP" dans des cellules de gliome. Une colocalisation avec des marqueurs lysosomaux était même démontrée par ces auteurs. Il faut donc reconnaître que le type de construction effectuée ("SP-EGFP-Hyal-2" dans notre cas ; "SP-Hyal-2-EGFP" dans leur cas), et peut-être le type de cellules transfectées, influence le devenir intracellulaire de la protéine de fusion. Ce mystère sera un beau sujet d'expérience future.

			Mesure de l'activité		Mesure de l'expression
			Electrophorèse en gel d'agarose	Zymographie	Western Blot
Rat	<i>Organes</i>	Cœur	+	+	+
		Cerveau	+	+	+
		Rate	+	+	+
		Poumon	+	+	+
		Foie	+	+	+
		Muscle squelettique	+	+	+
		Rein	+	+	+
	<i>Rein</i>	Cortex	+	+	+
		Médullaire externe	+	+	+
		Médullaire interne	+	+	+
	<i>Cellules rénales</i>	Tubulaires	?	+	-
		Interstitielles de type I	?	-	-
		Interstitielles de type II	?	-	-
		NRK-49F	?	+	-
		RMIC	?	+	-
	<i>Milieux des cellules rénales</i>	Tubulaires	+	+	N.E.
		Interstitielles de type I	+	-	N.E.
		Interstitielles de type II	+	-	N.E.
NRK-49F		+	+	N.E.	
RMIC		+	+	N.E.	
Insecte	S2	Cellules	-	-	-
		Milieux	-	-	N.E.

Tableau 5.1 : Récapitulatif des résultats obtenus dans la détection de l'activité hyaluronidasique et dans le détection de l'expression d'Hyal-2.

N.E.: non étudié

V. Discussion et perspectives

Le Tableau 5.1 résume à la fois les résultats des mesures d'activité hyaluronidasique et des Western blots.

V.1 L'activité hyaluronidasique

Tout d'abord, ce travail a permis de confirmer avec certitude l'existence d'une activité hyaluronidasique dans différents organes du rat et dans les trois parties du rein. Cette conclusion s'applique aussi bien à la technique mesurant une dégradation totale (la zymographie) qu'à celle qui détecterait aussi une dégradation partielle (l'électrophorèse en gel d'agarose). Dans chacun des échantillons testés, la zymographie révèle plusieurs formes moléculaires douées d'activité hyaluronidasique. Ceci suggère un polymorphisme tissulaire. Or, un polymorphisme de l'hyaluronidase plasmatique était déjà connu (Fischer-Szafarz, 1984), mais l'origine de ces formes plasmatiques n'a pas été déterminé. Nous suggérons qu'elles proviennent de l'ensemble des tissus de l'organisme.

En ce qui concerne les cellules, que ce soient les cultures primaires ou les lignées de cellules interstitielles rénales, les résultats sont plus complexes à interpréter.

Ce qui est certain, c'est que les cellules tubulaires de la médullaire interne et les lignées NRK-49F et RMIC démontrent toutes la présence d'une forme protéique, apparemment unique, douée d'activité hyaluronidasique complète, détectée par la zymographie. En gel d'agarose, il est assez difficile d'interpréter les résultats correspondants. Aucune activité nette n'est démontrable, un fait dont on pourrait s'étonner car le gel d'agarose devrait détecter tous les types de dégradation de l'hyaluronan. De plus, les quantités de protéines utilisées pour le gel d'agarose sont plus grandes que pour les zymographies correspondantes. La première hypothèse que l'on peut émettre est une présence d'inhibiteurs des hyaluronidasases dans les

extraits cellulaires, car ces inhibiteurs protéiques ne pourraient pas interférer avec l'enzyme au sein du gel de polyacrylamide de la zymographie. Cependant, il serait étonnant que ces inhibiteurs soient démontrables dans les extraits cellulaires, mais pas dans ceux des tissus. Une seconde hypothèse, plus plausible, est la sensibilité plus grande de la zymographie par rapport au gel d'agarose.

Une activité hyaluronidasique importante est présente dans les milieux des cellules en culture. Une quantité non négligeable de l'enzyme doit donc être sécrétée. La présence d'hyaluronidase dans les milieux de cellules en culture a été démontrée pour de nombreuses lignées cancéreuses (Victor et al., 1997). Ceci ouvre la voie à de multiples hypothèses concernant les mécanismes de sécrétion d'une enzyme souvent considérée comme lysosomale (Frost et al., 1996).

En ce qui concerne les cultures primaires de cellules interstitielles de la médullaire interne, nous disposons malheureusement d'une quantité insuffisante de matériel pour pouvoir tirer des conclusions définitives. Néanmoins, ces cellules, de façon très intéressante, semblent sécréter dans le milieu une protéine douée d'une activité hyaluronidasique partielle. D'autres types cellulaires ont déjà démontré de telles activités, qui ne parviennent pas à dépolymériser l'hyaluronan jusqu'aux disaccharides ou aux tétrasaccharides (Nakamura et al., 1990b ; Sampson et al., 1992 ; Tanaka et al., 1994). Dans certains cas, il pourrait s'agir d'une production de radicaux oxygénés, dont on sait qu'ils peuvent agir de cette façon sur l'hyaluronan (Philips, 1998). Dans d'autres cas, il pourrait aussi s'agir de l'hyaluronidase Hyal-2, dont l'activité mesurée après transfection *in vitro* en cellules de gliome n'était que partielle (Lepperdinger et al., 1998).

Le laboratoire de Physiologie et de Pharmacologie dispose d'un clone d'ADNc de Hyal-2 de rat ; nous avons tenté de mesurer le type d'activité hyaluronidasique que pourrait générer cette protéine après sa transfection dans des cellules qui n'expriment pas cette activité de façon endogène, ou qui ne l'expriment que de façon très faible. Des cellules d'insecte de type S2 possèdent ces propriétés.

V.2 Expression d'Hyal-2 en cellules d'insecte

La transfection a fonctionné, mais à un taux très faible, comme l'ont montré les essais de visualisation fluorescente d'une protéine de fusion Hyal-2-EGFP dans les cellules S2. Cependant, aucune activité de dépolymérisation de l'hyaluronan n'a pu être mesurée dans les extraits de cellules S2 transfectées, par comparaison avec les cellules non transfectées. L'activité de l'hyaluronidase n'était pas démontrable dans les milieux non plus.

Les cellules S2 sont pourtant capables d'exprimer d'autres enzymes après transfection, mais il faut remarquer que la plupart de ces transfections se font de façon stable (ex. : Angelichio et al., 1991).

V.3 Mesure de l'expression d'Hyal-2 par Western Blot

L'anticorps anti-Hyal-2 "S25" reçu du groupe autrichien qui a cloné cette forme d'hyaluronidase chez l'homme et la souris est un anticorps polyclonal dressé contre une séquence peptidique de 17 acides aminés tout à fait spécifique d'Hyal-2. Dans nos mains, cet anticorps a donné des résultats fort différents de ceux obtenus par le groupe autrichien. En effet, les Western blots effectués sur de nombreux tissus de rat et de souris montrent deux bandes, de tailles apparemment plus basses que celle qui est attendue sur base de la séquence en acides aminés de Hyal-2, soit environs 62 kDa. Peut-être l'anticorps S25 détecte-t-il une autre protéine, non décrite jusqu'ici, qui aurait une certaine homologie de séquence avec Hyal-2. Une autre hypothèse est que Hyal-2 subisse une protéolyse, ou d'importants remaniements post-traductionnels, qui la priveraient de certaines parties et réduiraient son PM. Dans tous les cas, les résultats que nous observons compliquent la suite des expériences envisageables. Il sera probablement nécessaire d'obtenir d'autres types d'anticorps.

Les Western blots avec l'anticorps S25 sont restés négatifs dans les extraits de cellules en culture. Ce résultat est difficile à interpréter tant que nous ne disposons pas de plus d'informations sur la spécificité de l'anticorps S25, ainsi que sur son affinité, qui paraît faible.

Une possibilité qui vient à l'esprit est que l'expression d'Hyal-2 disparaisse des cellules en cultures en raison de leur situation particulière, ou que la protéine soit entièrement sécrétée. A ce propos, nous n'avons pas pu tester de façon fiable les milieux des cellules par Western blot. Une immunoprécipitation serait souhaitable, mais notre stock d'anticorps est très faible. L'hypothèse d'une sécrétion d'Hyal-2 dans le milieu a déjà été évoquée à propos des mesures de l'activité hyaluronidasique.

Le fait que l'anticorps S25 n'ait pas pu détecter la protéine Hyal-2 après expression en cellules S2 doit être considéré comme une observation préliminaire, vu le trop faible taux d'expression obtenu dans ces transfections transitoires.

V.4 Devenir intracellulaire d'une construction SP-EGFP-Hyal-2

De façon très encourageante, cette construction est très bien exprimée dans les cellules COS-7 où elle a été transfectée ; la fluorescence est visible à divers endroits de la cellule. Le marquage apparent du réticulum endoplasmique et surtout de l'appareil de Golgi suggère que cette protéine suit la « voie de la sécrétion ». Le fait qu'un marquage de la membrane plasmique soit aussi visible dans certaines cellules, surtout sur les images tardives, suggère qu'en plus, la construction SP-EGFP-Hyal2 pourrait contenir un signal d'accrochage membranaire.

Tout cela génère de nombreuses questions sur le devenir intracellulaire d'une protéine qui, vu son pH d'activité supposé, est sensée agir au sein des lysosomes. Mais, pour interpréter correctement les résultats microscopiques actuels, d'autres renseignements sont nécessaires, en premier lieu des mesures de colocalisation immunohistochimiques. De plus, il faut vérifier que l'EGFP n'est pas scindée d'Hyal-2. Cela paraît fort improbable, notamment au vu de la fluorescence dans la membrane plasmique. Même si elle conservait le peptide signal mais pas le reste de la molécule d'Hyal-2 attachée, l'EGFP ne devrait pas être envoyée dans la membrane plasmique sans un système d'accrochage particulier.

V.5 Perspectives

Pour progresser dans l'étude de l'expression et dans la compréhension des mécanismes d'action de l'hyaluronidase, il est évident qu'il faut d'abord améliorer les techniques de mesure d'activité, notamment celle qui utilise le gel d'agarose. Nous pouvons suggérer deux voies d'approche. La première serait de traiter à la pronase les échantillons d'hyaluronan digérés par les extraits tissulaires. Cette manoeuvre devrait réduire les interactions protéiques lors de la migration et de la coloration du gel d'agarose. La seconde voie serait d'optimiser la détection des fragments d'hyaluronan de PM différents, par exemple en scannant directement le gel au moyen d'un densitomètre qui sélectionne la longueur d'onde ad hoc.

Il faut également améliorer le taux d'expression d'Hyal-2 en cellules transfectées. Des transfections stables de cellules S2 seraient sans doute capables de produire de plus grandes quantités d'Hyal-2. De plus, d'autres systèmes d'expression ont parfois un rendement meilleur. A cet égard, on peut signaler que l'expression d'une hyaluronidase de venin d'abeille s'est avérée beaucoup plus efficace dans un système utilisant le baculovirus et les cellules d'insecte Sf9 que dans E. Coli (Soldatova et al., 1998).

Finalement, l'approche immunologique doit aussi être revue. De nouveaux anticorps, dont la spécificité et l'affinité soient mieux contrôlées, sont attendus. Les techniques d'immunoprécipitation doivent être entreprises.

Le dernier point, qui soulève le plus de questions, concerne la localisation intracellulaire d'Hyal-2. Nos premières observations suggèrent un adressage à la membrane plasmique. Cette observation est compatible avec la présence d'une queue GPI dans la séquence en acides aminés d'Hyal-2. Pour confirmer ou infirmer cette impression, on pourra se tourner vers des préparations subcellulaires et des techniques biochimiques variées.

Bibliographie

- Afify A.M., Stern M., Guntenhöner M., and Stern R.** (1993) Purification and characterization of human serum hyaluronidase. *Arch Biochem Biophys* **305** : 434-441.
- Angelichio M.L., Beck J.A., Johansen H., and Ivey-Hole M.** (1991) Comparaison of several promoters and polyadenylation signals for use in heterologous gene expression in cultured Drosophila cells. *Nucl Acids Res* **19** : 5037-5043.
- Arbogast B., Hopwood J.J., and Dorfman A.** (1975) Absence of hyaluronidase in cultured human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **67** : 376-382.
- Arming S., Stobl B., Wechselberger C., and Kreil G.** (1997) In vitro mutagenesis of PH-20 hyaluronidase from human sperm. *Eur J Biochem* **247** : 810-814.
- Aronson N.N., and Davidson E.A.** (1967) Lysosomal hyaluronidase from rat liver. *J Biol Chem* **242** : 441-444.
- Aruffo A., Stamenkovic I., Melnick M., Underhill C.B., and Seed B.** (1990) CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* **61** : 1303-1313.
- Bailey L.C., and Levine N.A.** (1993) Optimization of the USP assay for hyaluronidase. *J Pharm Biomed Anal* **11** : 285-292.
- Banerji S., Ni J., Wang S.X., Clasper S., Su J., Tammi R., Jones M., and Jackson D.G.** (1999) LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* **144** : 789-801.
- Baumgartner G., Gomar-Höss Ch., Sakr L., Ulsperger E., and Wogritsch Ch.** (1998) The impact of extracellular matrix on the chemoresistance of solid tumors - experimental and clinical results of hyaluronidase as additive to cytostatic chemotherapy. *Cancer Letters* **131** : 85-99.
- Bentsen K.D., Henriksen J.H., and Laurent T.C.** (1986) Circulating hyaluronate: concentration in different vascular beds in man. *Clin Sci* **71** : 161-165.
- Bertrand P., Girard N., Duval C., d'Anjou J., Chauzy C., Menard J.F., and Delpech B.** (1997) Increased hyaluronidase levels in breast tumor metastases. *Int J Cancer* **73** : 327-331.
- Bollet A.J., Bonner W.M., and Nance J.L.** (1963) The presence of hyaluronidase in various mammalian tissues. *J Biol Chem* **238** : 3522-3527.

- Canard B., Garnier T., Saint-Joanis B., and Cole S.T.** (1994) Molecular genetic analysis of the nagH gene encoding a hyaluronidase of *Clostridium perfringens*. *Mol Gen Genet* **243** : 215-224.
- Canzian F.** (1997) Phylogenetics of the laboratory rat *Rattus norvegicus*. *Genome Res* **7** : 262-267.
- Cashman D.C., Laryea J.U., and Weissmann B.** (1969) The hyaluronidase of rat skin. *Arch Biochem Biophys* **135** : 387-395.
- Chain E. , and Duthie E.S.** (1939) A mucolytic enzyme in testis extract. *Nature* **144** : 977-978.
- Cherr G.N., Meyers S.A., Yudin A.I., VandeVoort C.A., Primakoff P., and Overstreet J.W.** (1996) The PH-20 Protein in *cynomolgus* macaque spermatozoa : identification of two different forms exhibiting hyaluronidase activity. *Dev Biol* **175** : 142-153.
- Comper W.D., and Laurent T.C.** (1978) Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol Rev* **58** : 255-315.
- Cramer J.A., and Bailey L.C.** (1991) A reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography method for bovine testicular hyaluronidase digests using postcolumn derivatization with 2-cyanoacetamide and ultraviolet detection. *Anal Biochem* **196** : 183-191.
- Croix B.S., Rak J.W., Kapitain S., Sheehan C., Graham C.H., and Kerbel R.S.** (1996) Reversal by hyaluronidase of adhesion-dependent multicellular drug resistance in mammary carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* **88** : 1285-1296.
- Csóka T.B., Frost G.I., Heng H.H., Scherer S.W., Mohapatra G., and Stern R.** (1998) The hyaluronidase gene *HYAL1* maps to chromosome 3p21.2-3p21.3 in human and 9F1-F2 in mouse, a conserved candidate tumor suppressor locus. *Genomics* **15** : 63-70.
- Delpech B., Bertrand P., and Maingonnat C.** (1985) Immunoassay of the hyaluronic acid-hyaluronectin interaction: application to the detection of hyaluronic acid in serum of normal subjects and cancer patients. *Anal Biochem* **149** : 555-565.
- Delpech B., Bertrand P., Maingonnat C., Girard N., and Chauzy C.** (1995) Enzyme-linked hyaluronectin: a unique reagent for hyaluronan assay and tissue location and for hyaluronidase activity detection. *Anal Biochem* **229** : 35-41.
- Di Nocera P.P., and Dawid I.B.** (1983) Transient expression of genes introduced into cultured cells of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci* **80** : 7095-7098.
- Dicker S.E., and Elliott A.B.** (1963) Viscosity-reducing activity of tissues in the rat. *J Physiol* **165** : 89-97.
- Duran-Reynals F.** (1928) Exaltation de l'activité du virus vaccinal par les extraits de certains organes. *CR Séances Soc Biol Fil* **99** : 6-7.

- Engström-Laurent A., and Hellström S.** (1990) The role of liver and kidneys in the removal of circulating hyaluronan. An experimental study in the rat. *Connect Tissue Res* **24** : 219-224.
- Fiszer-Szafarz B.** (1984) Hyaluronidase polymorphism detected by polyacrylamide gel electrophoresis. Application to hyaluronidases from bacteria, slime molds, bee and snake venoms, bovine testes, rat liver lysosomes, and human serum. *Anal Biochem* **143** : 76-81.
- Fiszer-Szafarz B., Rommain M., Brossard C., and Smets P.** (1988) Hyaluronic acid-degrading enzymes in rat alveolar macrophages and in alveolar fluid : stimulation of enzyme activity after oral treatment with immunomodular RU 41740. *Biol Cell* **63** : 355-360.
- Flamion B., Lacreman J., and Mertens-Strijthagen J.** (1997) Effect of water intake on renal inner medullary hyaluronan (HA) and hyaluronidase. *FASEB J* **11** : 17A.
- Flamion B., Mertens-Strijthagen J., and Boël P.** (1998) Cloning of the cDNA for a rat hyaluronidase expressed in the kidney. *FASEB J* **12** : A423.
- Flamion B., Mertens-Strijthagen J., Bernier B., and Boël P.** (1999) Primary culture of rat inner medullary interstitial cells: evidence for hyaluronan-synthetizing and -degrading activities. *Nephrol Dial Transplant* (in press).
- Forsberg N., and Gustafson S.** (1991) Characterization and purification of the hyaluronan-receptor on liver endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* **1078** : 12-18.
- Fraser J.R.E., and Laurent T.C.** (1989) Turnover and metabolism of hyaluronan. In : *The Biology Of Hyaluronan*. Evered D. and Whelan J., Eds. John Willey & Sons, Chichester : 41-59.
- Fraser J.R.E., Laurent T.C., and Laurent U.B.G.** (1997) Hyaluronan : its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* **242** : 27-33.
- Frost G.I., Csóka T., and Stern R.** (1996) The hyaluronidases: a chemical, biological and clinical overview. *Trends Glycosci Glycotechnol* **8** : 419-434.
- Gately C.L., Muul L.M., Greenwood M.A., Papazoglou S., Dick S.J., Kornblith P.L., Smith B.H., and Gately M.K.** (1984) In vitro studies on the cell-mediated immune response to human brain tumors.II. Leukocyte-induced coats of glycosaminoglycan increase the resistance of glioma cells to cellular immune attack. *J Immunol* **133** : 3387-3395.
- Gerdin B., and Hällgren R.** (1997) Dynamic role of hyaluronan (HYA) in connective tissue activation and inflammation. *J Intern Med* **242** : 49-55.
- Gillot E.** (1998) Devenir intracellulaire d'une hyaluronidase révélé par différentes constructions moléculaires. *Mémoire*. FUNDP, Namur.

- Gluzman Y.** (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23** : 175-182.
- Gmachl M., and Kreil G.** (1993) Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* **90** : 3569-3573.
- Goggins J.F., Lazarus G.S., and Fullmer H.M.** (1968) Hyaluronidase activity of alveolar macrophages. *J Histochem Cytochem* **16** : 688-692.
- Gold E.W.** (1982) Purification and properties of hyaluronidase from human liver. *J Biochem* **205** : 69-74.
- Green M.R.** (1978) Simultaneous differential staining of phosphoproteins, sialoglycoproteins, hyaluronic acid, sulfated glycosaminoglycans, proteins, and nucleic acids in human breast tissue with a cationic carbocyanine dye. *J Natl Cancer Inst* **61** : 951-960.
- Hardingham T.E., and Muir H.** (1972) The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. *Biochim Biophys Acta* **279** : 401-405.
- Hardwick C., Hoare K., Hohn H.P., Hook M., Moore D., Cripps V., and Austen L.** (1992) Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility. *J Cell Biol* **117** : 1343-1350.
- Heldin P.** (1998) Structure et regulation of mammalian hyaluronan synthase. In : *The Chemistry, Biology And Medical Applications Of Hyaluronan And its Derivatives*. Laurent T.C., Ed. Portland Press, London : **72** : 77-83.
- Hotez P.J., Narasimhan S., Haggerty J., Milstone L., Bhopale V., Schad G.A., and Richards F.F.** (1992) Hyaluronidase from infective *Ancylostoma* hookworm larvae and its possible function as a virulence factor in tissue invasion and in cutaneous larva migrans. *Infect Immun* **60** : 1018-1023.
- Hutterer F.** (1966) Degradation of mucopolysaccharides by hepatic lysosomes. *Biochim Biophys Acta* **115** : 312-319.
- Hynes W.L., and Ferreti J.J.** (1994) Assays for hyaluronidase activity. *Methods enzymol* **235** : 606-616.
- Joy M.B., Dogson K.S., Olavsen A.H., and Gacesa P.** (1985) The purification and some properties of pig liver hyaluronidase. *Biochim Biophys Acta* **838** : 257-263.
- Knoflach A., Azuma H., Denton M., Murphy B., Iyengar A., Buelow R., and Sayegh M.H.** (1999) Immunomodulatory functions of low-molecular weight hyaluronate in an acute rat renal allograft rejection model. *J Am Soc Nephrol* **10** : 1059-1066.
- Knudson C.B., and Knudson W.** (1993) Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J* **7** : 1233-1241.

- Knudson W., Biswas C., Li X.-Q., Nemecek R.E., and Toole B.P.** (1989) The role and regulation of tumour-associated hyaluronan. In : *the Biology Of Hyaluronan*. Evered D., and Whealan J., Eds. John Willey & Sons, Chisester. : 150-169.
- Körner T., Kropf J., and Gressner A.M.** (1996) Serum laminin and hyaluronan in liver cirrhosis: markers of progression with high prognostic value. *J Hepatol* **25** : 684-688.
- Kreil G.** (1995) Hyaluronidases - A group of neglected enzymes. *Prot Sci* **4** : 1666-1669.
- Kumar S., West D.C., Ponting J.M., and Gattamaneni H.R.** (1989) Sera of children with renal tumours contain low-molecular-mass hyaluronic acid. *Int J Cancer* **44** : 445-448.
- Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** : 680-685.
- Laurent T.C., and Fraser J.R.E.** (1992) Hyaluronan. *FASEB J* **6** : 2397-2404.
- Lee H.G., and Cowman M.K.** (1994) An agarose gel electrophoretic method for analysis of hyaluronan molecular weight distribution. *Anal Biochem* **219** : 278-287.
- Lepperdinger G., Strobl B., and Kreil G.** (1998) *HYAL2*, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity. *J Biol Chem* **273** : 22466-22470.
- Lokeshwar V.B., Lokeshwar B.L., Pham H.T., and Block N.L.** (1996) Association of elevated levels of hyaluronidase, a matrix-degrading enzyme, with prostate cancer progression. *Cancer Res* **56** : 651-657.
- Lu G., Kochoumian L., and King T.P.** (1995) Sequence identity and antigenic cross-reactivity of white face hornet venom allergen, also a hyaluronidase, with other proteins. *J Biol Chem* **270** : 4457-4465.
- Meyer K.** (1947) The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiol Rev* **27** : 629-634.
- Meyer K.** (1971) Hyaluronidases. In : *The Enzymes (Third ed)*. Boyer P.D., Ed. Academic Press New York : 307-320.
- Meyer K. and Palmer J.W.** (1934) The polysaccharide in vitreous humor. *J Biol Chem* **107** : 629-634.
- Myles D.G., and Primakoff P.** (1997) Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol Reprod* **56** : 320-327.
- Nakamura T., Majima M., Kubo K., Takagaki K., Tamura S., and Endo M.** (1990a) Hyaluronidase assay using fluorogenic hyaluronate as a substrate. *Anal Biochem* **191** : 21-24.

- Nakamura T., Takagaki K., Kubo K., Morikawa A., Tamura S., and Endo M.** (1990b) Extracellular depolymerization of hyaluronic acid in cultured human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **172** : 70-76.
- Orkin R.W., and Toole B.P.** (1980) Isolation and characterisation of hyaluronidase from cultures of chick embryo skin- and muscle-derived fibroblasts. *J Biol Chem* **255** : 1036-1042.
- Patterson G.H., Knopel S.M., Sharif W.D., Kain S.R., and Piston D.W.** (1997) Use of green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* **73** : 2782-2790.
- Peach C., and Christianson T.** (1994) Zymography of proteases. *Cell Biol* **3** : 264-271.
- Philips G.O.** (1998) Degradation of hyaluronan systems by free radicals. In: *The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives*. Laurent T.C., Ed. Portland Press, London. **72** : 93-111.
- Poh C.H., Yuen R., Chung M.C., and Khoo H.E.** (1992) Purification and partial characterization of hyaluronidase from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. *Comp Biochem Physiol* **101** : 159-163.
- Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., and Cormier M.J.** (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* greenfluorescent protein. *Gene* **111** : 229-233.
- Prehm P.** (1983) Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells. Characterization of the synthase. *Biochem J* **211** : 181-189.
- Pritchard D.G., and Lin B.** (1993) Group B streptococcal neuraminidase is actually a hyaluronidase. *Infect Immun* **61** : 3234-3239.
- Reed R.K., Lilja K., and Laurent T.C.** (1988) Hyaluronan in the rat with special reference to the skin. *Acta Physiol Scand* **134** : 405-411.
- Reissig J.L., Stominger J.L., and Leloir L.F.** (1955) A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J Biol Chem* **217** : 959-966.
- Rodén L., Campbell P., Fraser J.R.E., Laurent T.C., Pertoft H., and Thompson J.N.** (1989) Enzymic pathways of hyaluronan catabolism. In : *The Biology Of Hyaluronan* Evered D., and Whelan J., Eds. John Willey & Sons, Chisester : 60-86.
- Sampson P.M., Rochester C.L., Freundlich B., and Elias J.A.** (1992) Cytokine regulation of human lung fibroblast hyaluronan (hyaluronic acid) production. *J Clin Invest* **90** : 1492-1503.
- Schneider I.** (1972) Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryo Exp Morph* **27** : 363-365.

- Schwartz D.M., Shuster S., Jumper M.D., Chang A., and Stern R.** (1996) Human vitreous hyaluronidase: isolation and characterization. *Curr Eye Res* **15** : 1156-1162.
- Schwartz D.M., Jumper M.D., Lui G.M., Dang S., Shuster S., and Stern R.** (1997) Corneal endothelial hyaluronidase: a role in anterior chamber hyaluronic acid catabolism. *Cornea* **16** : 188-191.
- Smedsrod B., Pertoft H., and Laurent T.C.** (1990) Scavenger functions of the liver endothelial cell. *Biochem J* **266** : 313-27.
- Soldatova L.N., Cramer R., Gmachl M., Kemeny D.M., Schmidt M., Weber M., and Mueller U.R.** (1998) Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with *Escherichia coli*. *J Allergy Clin Immunol* **101** : 691-698.
- Stephens R.W., Ghosh P., and Taylor T.K.** (1975) The characterization and function of the polysaccharidases of human synovial fluid in rheumatoid and osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* **399** : 101-112.
- Stern M., and Stern R.** (1992) An ELISA-like assay for hyaluronidase and hyaluronidase inhibitors. *Matrix* **12** : 397-403.
- Strobl B., Wechselberger C., Beier D.R., and Lepperdinger G.** (1998) Structural organization and chromosomal localization of *Hyal2*, a gene encoding a lysosomal hyaluronidase. *Genomics* **53** : 214-219.
- Tamakoshi K., Kikkawa F., Maeda O., Suganuma N., Yamagata S., Yamata T. and Tomoda Y.** (1997) Hyaluronidase activity in gynaecological cancer tissues with different metastatic forms. *Br J Cancer* **75** : 1807-1811.
- Tanaka K., Nakamura T., Ikeya H., Higushi T., Tanaka A., Morikawa A., Saito Y., Takagi K., and Endo M.** (1994) Hyaluronate depolymerization activity induced by progesterone in cultured fibroblasts derived from human uterine cervix. *FEBS Letters* **347** : 95-98.
- Tarasova N.I., Stauber R.H., Choi J.K., Hudson E.A., Czerwinski G., Miller J.L., Pavlakis G.N., Michejda C.J., and Wank S.A.** (1997) Visualization of G protein-coupled receptor trafficking with the aid of the green fluorescent protein. endocytosis and recycling of cholecystokinin receptor type A. *J Biol Chem* **272** : 14817-14824.
- Toole B.P.** (1998) Hyaluronan-cell interactions in morphogenesis. In : *The Chemistry, Biology And Medical Applications Of Hyaluronan And Its Derivatives*. Laurent T.C., Ed. Portland Press, London : 155-160.
- Triggs-Raine B., Salo T.J., Zhang H., Wicklow B.A., and Natowicz M.R.** (1999) Mutations in *HYAL1*, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX. *Genetics* **96** : 6296-6300.

- Vaes G.** (1967) Hyaluronidase activity in lysosomes of bone tissue *Biochem J* **103** : 802-804.
- Victor R., Maingonnat C., Chauzy C., Bertrand P., Olivier A., Maunoury R., Gianni J., and Delpech B.** (1997) Hyaluronidase production in culture by cells from human tumours. *C R Acad Sci (Paris)* **320** : 805-810.
- West D.C., and Shaw D.M.** (1998) Tumour hyaluronan in relation to angiogenesis and metastasis. In: *The Chemistry, Biology And Medical Applications Of Hyaluronan And its Derivatives*. Laurent T.C., Ed. Portland Press, London: 227-233.
- West D.C., Hampson I.N., Arnold F., and Kumar S.** (1985) Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* **228** : 1324-1326.