



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Analyse biochimique de fibroblastes normaux (WI-38) et de fibroblastes (GM 00806 et SAN) provenant de patients atteints d'une maladie de surcharge lysosomale : la Galactosialidose

Gérard, Nathalie

Award date:
1990

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.



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

ANALYSE BIOCHIMIQUE DE FIBROBLASTES NORMAUX
(WI-38) ET DE FIBROBLASTES (GM 00806 ET SAN)
PROVENANT DE PATIENTS ATTEINTS D'UNE MALADIE DE
SURCHARGE LYSOSOMALE: LA GALACTOSIALIDOSE.

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

Nathalie GERARD

ANNEE 1989-1990

Au terme de ce mémoire, je tiens à exprimer ma reconnaissance envers toute personne qui, de près ou de loin, a contribué à la réalisation de ce travail.

Mes plus vifs remerciements s'adressent au Professeur R. Wattiaux, non seulement pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, mais également pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Toute ma reconnaissance revient au Professeur S. Wattiaux-De Coninck pour sa compétence et son dynamisme débordant mais également pour la disponibilité dont elle a toujours fait preuve à mon égard.

Je remercie également Jacqueline Thirion, co-promoteur de ce mémoire, pour ses conseils judicieux et la rigueur avec laquelle elle a guidé mes expériences.

Tout particulièrement, j'adresse un grand merci à Arlette Dautreloux pour son aide technique plus que précieuse ... sans oublier sa gentillesse et ses encouragements répétés.

J'adresse toute ma reconnaissance à Marie-Jeanne Vertez pour la partie microscopique de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Dubois pour m'avoir initiée lors de mes premières expériences.

Je tiens à remercier J.M. Van Dijk , A. Boutefeu ainsi que M. Savels pour l'aide qu'ils ont apportée dans la réalisation de ce mémoire.

Merci également à Isabelle, Anne et Laurence pour le soutien moral apporté tout au long de cette année.

Et j'ai une pensée toute spéciale pour mes parents, qui m'ont bien sûr permis d'entreprendre ces études, mais qui les ont vécues avec moi.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/23.03.91

**Analyse biochimique de fibroblastes normaux (WI-38)
et de fibroblastes (GM 00806 et SAN) provenant de
patients atteints d'une maladie de surcharge
lysosomale: la Galactosialidose.**

GERARD Nathalie

Résumé

Nous avons étudié les modifications enzymatiques et les propriétés de sédimentation de différents organites chez des fibroblastes provenant de patients atteints de Galactosialidose, maladie de surcharge lysosomale.

Dans les deux souches pathologiques (GM 00806 et SAN), les activités de β -galactosidase et d' α -neuraminidase sont considérablement déficientes. De façon plus surprenante, l'activité de la cathepsine C est également très fortement réduite (5 à 10% de l'activité des témoins WI-38). Par contre, les activités des enzymes de la membrane plasmique (5'-nucléotidase et phosphodiesterase alcaline) et de l'appareil de Golgi (galactosyltransférase) sont augmentées.

Différentes conditions de culture ont permis de restaurer totalement ou partiellement certaines des activités enzymatiques déficientes.

Les distributions des marqueurs enzymatiques des compartiments impliqués dans la biogenèse des enzymes lysosomales ont été étudiées en centrifugation différentielle et isopycnique.

Les résultats présentés dans ce mémoire ont fait l'objet d'une communication par poster lors de la 144^{ième} réunion de la Société Belge de Biochimie, le 12 mai 1990 à Bruxelles (VUB).

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Juin 1990

Promoteur: Prof. S. Wattiaux-De Coninck

Les résultats présentés dans ce mémoire ont fait l'objet d'une communication par poster lors de la 144^{ième} réunion de la Société Belge de Biochimie, le 12 mai 1990 à Bruxelles (VUB).

"Biochemical alterations of two strains of fibroblasts obtained from patients affected by the lysosomal disease: Galactosialidosis."

N. GERARD, J. THIRION, R. WATTIAUX & S. WATTIAUX-DE CONINCK

INTRODUCTION

I. LA GALACTOSIALIDOSE, DESCRIPTION DE LA MALADIE	1
II. LES LYSOSOMES	
A. Définition	3
B. Rôles des lysosomes	3
1. Le rôle hétérophagique	4
2. Le rôle autophagique	4
3. Les produits de dégradation	5
4. Les pathologies de la fonction lysosomale	5
C. La biogenèse des enzymes lysosomales	6
1. Aspect général	6
2. Trafic intracellulaire	6
a) Réticulum endoplasmique	6
b) Appareil de Golgi	7
c) Endosomes	8
d) Lysosomes	8
e) Voie accessoire	8
3. Sites d'altération	8
III. CADRE GENERAL DES MALADIES DE SURCHARGE LYSOSOMALES	9
III.1. Les déficiences enzymatiques	10
A. Premier groupe: <u>Surcharge en lipides</u>	
1. Le métabolisme des lipides membranaires	10
2. Le métabolisme lipidique sujet à des déficits génétiques variés	11
B. Second groupe: <u>Les mucopolysaccharidoses</u>	
1. Les mucopolysaccharides acides, les protéoglycanes, constituants importants du tissu conjonctif	12
2. Certaines déficiences enzymatiques sont source de mucopolysaccharidoses	12
C. Troisième groupe: <u>Surcharge en glycogène</u>	13
III.2. Les déficiences au niveau du transport	13
IV. THERAPEUTIQUE ET DIAGNOSTIQUE PRENATAL	15

V. CAS PARTICULIER DE LA GALACTOSIALIDOSE	17
A. Quels sont les phénotypes distincts dans la galactosialidose?	17
B. Caractérisation de la surcharge	17
1. Déficience isolée en α -neuraminidase et surcharge	18
2. Déficience isolée en β -galactosidase et surcharge	19
a) La GM1 gangliosidose	20
b) La mucopolysaccharidose IV, type B, syndrome de morquio	20
3. A quel type de surcharge peut-on s'attendre dans la galactosialidose?	21
C. Description biochimique de la galactosialidose: "Le Complexe de Galjaard"	22

BUT & DEMARCHE DU TRAVAIL 26

MATERIEL & METHODES

I. LE FOIE DE RAT	28
II. LES FIBROBLASTES WI-38, GM 00806 ET SAN	29
A. Culture cellulaire	29
1. Caractérisation des cellules	29
2. Méthodes de culture	30
3. Congélation et décongélation des cellules	30
B. Préparation d'homogénats cellulaires	31
C. Fractionnement complet par centrifugation différentielle	32
D. Centrifugation isopycniqne en gradient continu en saccharose	32
III. ENZYMES DE REFERENCE	33
IV. PRESENTATION DES RESULTATS	34
A. Homogénats	34
B. Fractionnement	34
C. Gradient continu en saccharose	35
V. COMMENTAIRES SUR LE DOSAGE DE L' α -NEURAMINIDASE	35

RESULTATS

1^{ère} PARTIE: Aspect morphologique des fibroblastes WI-38, GM 00806 et SAN

- I. Microscopie en contraste de phase 36
- II. Microscopie électronique: observation des lysosomes 36

2^{ème} PARTIE: Analyse de l'équipement enzymatique des fibroblastes normaux: comparaison avec le foie de rat

- I. Résultats
 - A. Mesures d'activités spécifiques de marqueurs enzymatiques des différents organites subcellulaires 38
 - B. Distribution des enzymes de référence après centrifugation fractionnée de l'homogénat 39
- II. Discussion
 - A. Activités spécifiques des enzymes marqueurs 40
 - B. Distribution par centrifugation différentielle 41

3^{ème} PARTIE: Etude des activités enzymatiques des fibroblastes provenant de patients atteints de galactosialidose

- I. Résultats
 - A. Détermination des activités spécifiques d'enzymes marqueurs de différents organites. Comparaison WI, GM et SAN 42
 - B. Distribution subcellulaire des enzymes marqueurs de différents compartiments 43
- II. Discussion 44

4^{ème} PARTIE: Distribution de marqueurs enzymatiques après centrifugation isopycnique de fraction MLP et ML+P en gradient de densité en saccharose: Comparaison WI, GM et SAN

48

**5ème PARTIE: "Restauration" d'activités enzymatiques:
modifications des conditions de culture**

I. Effet de la leupeptine	
A. Résultats	53
B. Discussion	55
II. Effet du saccharose	
A. Résultats	56
B. Discussion	57
III. Effet du milieu WI	
A. Résultats	
1. Mesure d'activités enzymatiques dans le milieu de culture des fibroblastes WI	58
2. Mesure d'activité de la β -galactosidase et de la cathepsine C dans le milieu de culture des fibroblastes GM et SAN	59
3. Restauration par le milieu WI	60
B. Discussion	61
CONCLUSIONS	62
BIBLIOGRAPHIE	68

INTRODUCTION

I. LA GALACTOSIALIDOSE, DESCRIPTION DE LA MALADIE.

La GALACTOSIALIDOSE est une affection récessive autosomale rare. Durant ces dernières années, environ une trentaine de cas ont été décrits. Il s'agit d'une maladie de surcharge lysosomale caractérisée par une déficience combinée en **β -galactosidase** et en **α -neuraminidase**, deux enzymes lysosomales.

Se manifestant à des âges très variables, la galactosialidose présente des phénotypes cliniques différents.

- La forme infantile précoce se caractérise par un œdème sévère, de l'ascite, des dysplasies squelettiques, des anomalies oculaires et surtout par des troubles psychomoteurs graves.

- Dans la forme infantile tardive, les patients présentent les premiers symptômes vers 6-12 mois. On observe une dysmorphie, une dysostose et une dysplasie squelettique. Les enfants souffrent également de viscéromégalie et d'un retard mental léger. Une atteinte typique se manifeste au niveau de la rétine par une tache rouge cerise au centre d'une zone grisâtre maculaire.

- Enfin, la forme juvénile-adulte, dont les symptômes se manifestent entre l'enfance et l'âge adulte, regroupe le plus grand nombre de patients; la plupart sont d'origine japonaise. Dans cette forme, on observe une dysplasie du squelette, un dysmorphisme, un trouble de la cornée et une tache rouge cerise au niveau de la rétine. Les patients peuvent présenter des troubles neurologiques associés à un retard mental.

Cette maladie de surcharge lysosomale porte le nom de SYNDROME DE GOLDBERG, de "CHERRY-RED SPOT MYOCLONUS". Mais elle est également connue sous le nom de SIALIDOSE de type II et, est plus fréquemment encore appelée GALACTOSIALIDOSE. C'est sous ce nom que nous la désignerons au cours de ce travail.

Les différents points qui seront abordés dans cette introduction sont les suivants:

- Le lysosome étant le principal organite impliqué dans cette affection, nous le définirons et nous décrirons ses rôles.

Comme la modification se situe au niveau de la biosynthèse, des deux enzymes lysosomiales, l' α -neuraminidase et β -galactosidase, nous développerons la voie de synthèse des enzymes lysosomales et nous localiserons les sites potentiels d'altération.

- Dans le but d'intégrer la galactosialidose parmi les autres maladies de surcharge lysosomales, nous présenterons une classification de celles-ci ainsi qu'un aperçu des espoirs thérapeutiques. Et nous terminerons en développant le cas particulier de la GALACTOSIALIDOSE.

II. LES LYSOSOMES.

A. DEFINITION

Le processus de la DIGESTION INTRACELLULAIRE a été mis en question, il y a plus d'un siècle, par Metchnikoff.

C'est en 1955 que, pour la première fois, de Duve et ses collaborateurs identifient les lysosomes dans le foie de rat. Dans cette découverte, la biochimie devance la morphologie et suggère l'existence d'un organe intracellulaire, existence qui fut confirmée par la suite par l'examen morphologique.

Le lysosome est souvent comparé à un sac à hydrolases ou estomac de la cellule. Les enzymes hydrolytiques de cet organe catalysent à pH optimum acide la dégradation spécifique de macromolécules telles les protéines, les acides nucléiques, les lipides, les polysaccharides.

Le contenu matriciel est entouré d'une membrane dont les propriétés de perméabilité sont d'une importance capitale pour limiter le processus de dégradation à l'intérieur du lysosome. Le maintien de l'acidité intralysosomale est le fruit d'une pompe électrogénique ATPasique située dans la membrane et transférant les protons dans la lumière de la vésicule, l'énergie étant fournie par l'hydrolyse de l'ATP.

B. ROLES DES LYSOSOMES

Un des rôles principaux des lysosomes est la NUTRITION. C'est en effet grâce aux processus de biodégradation de macromolécules exogènes ou endogènes que la cellule se nourrit. Ces macromolécules aboutissent aux lysosomes par deux processus différents: l'HETEROPHAGIE et l'AUTOPHAGIE.

1. Le rôle HETEROPHAGIQUE:

L'endocytose permet à la cellule d'intégrer des substances exogènes qui seront logées dans des vésicules, dites ENDOSOMES, dont la membrane limitante dérive d'une sélection de composants de la membrane plasmique de la cellule.

Ultérieurement, les endosomes peuvent fusionner avec les LYSOSOMES PRIMAIRES. Ils entrent alors en contact avec les enzymes et donnent naissance aux LYSOSOMES SECONDAIRES. Ces derniers sont donc à la fois d'origine endosomale et lysosomale. Attaques enzymatiques et digestions de composés susceptibles d'être dégradés se déroulent à l'intérieur de ces organites.

Les postlysosomes, appelés plus communément CORPS RESIDUELS, sont des lysosomes secondaires ayant terminé toute digestion et contenant des résidus indigestes.

2. Le rôle AUTOPHAGIQUE

Lors de l'autophagie, les composés à dégrader sont endogènes et donc, des constituants de la cellule. Cette digestion a pour but premier d'assurer le renouvellement normal des constituants de la cellule. Cependant, dans des conditions physiologiques défavorables, cela permet à la cellule de pourvoir à ses besoins immédiats, de préserver son organisation et de remplir ses fonctions.

Les substances à dégrader sont isolées et encerclées par des membranes subcellulaires, tel que le réticulum endoplasmique. La vacuole autophagique ainsi formée, fusionne avec un lysosome, le contenu est ensuite digéré.

Lors de la microautophagie, les structures à détruire sont encerclées par le lysosome lui-même.

3. LES PRODUITS DE DEGRADATION

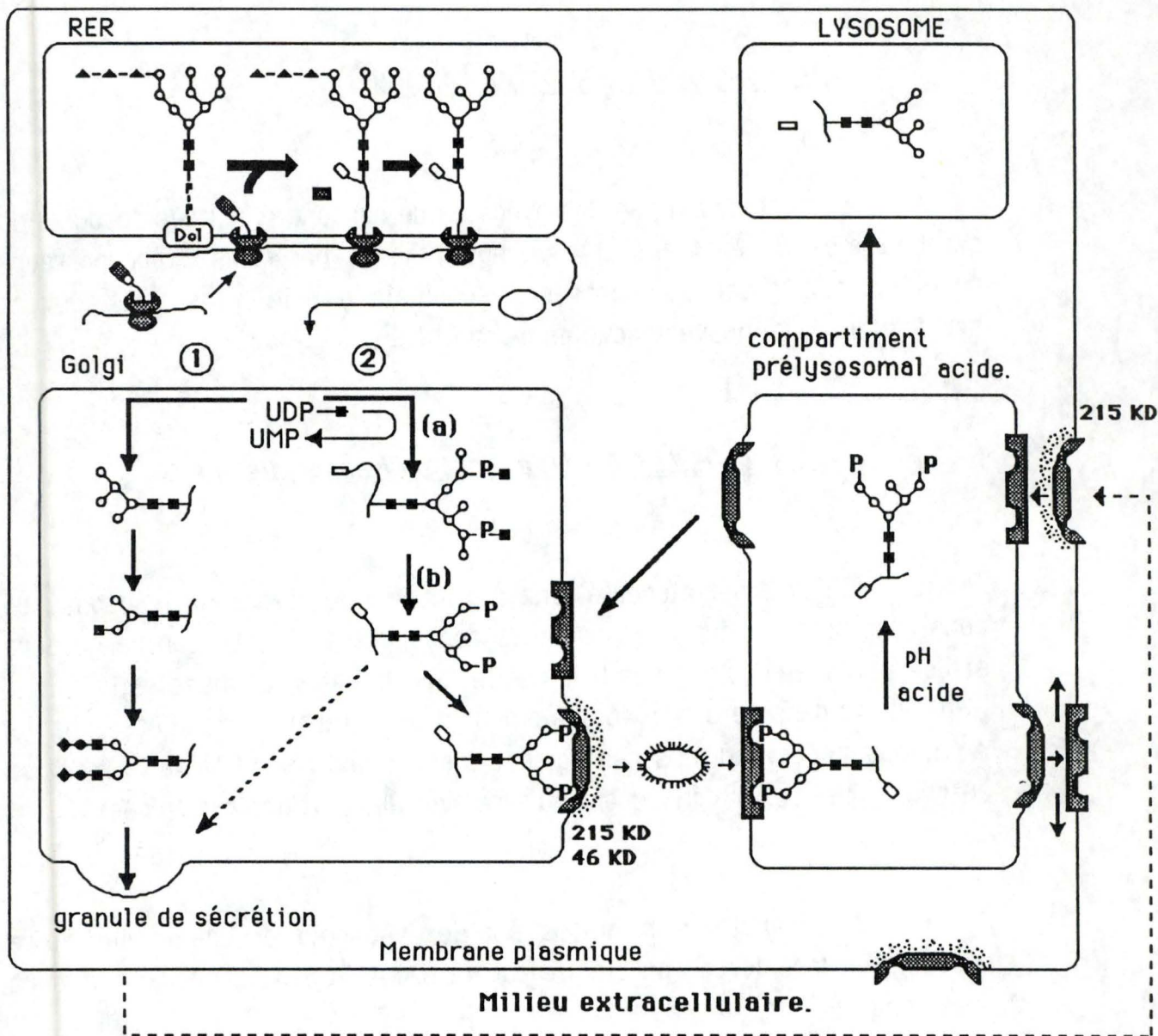
Les acides aminés, les hydrates de carbone et autres produits du catabolisme sont transportés, notamment par des transporteurs spécifiques, à travers la membrane lysosomale vers le cytosol. Ils peuvent servir alors, à de nouveaux cycles de synthèses.

4. Les PATHOLOGIES de la fonction lysosomale

S'il y a déficience(s) enzymatique(s) au niveau du lysosome, on constate une surcharge en produits non dégradés. Cette surcharge sera située au niveau des organes tels que le foie, la rate, les muscles, le rein ... Elle résulte dans ce cas, principalement d'une altération de l'hétérophagie. Au niveau du cerveau, la surcharge est due aux modifications de la fonction autophagique, et par conséquent du turn over des cellules concernées.

Ces fonctions remplies par le lysosome occupent une place essentielle dans le cas particulier de la GALACTOSIALIDOSE dont il sera question plus loin.

Fig I.1 Biosynthèse des enzymes de la matrice lysosomale.



1) VOIE PRINCIPALE

RER: Elimination du peptide signal [hatched box], glycosylation et transfert vers le Golgi par des vésicules ○

GOLGI: La plupart des enzymes lysosomales acquièrent le signal Mannose-6-P et se lient aux récepteurs M₆P [M₆P receptor]

ENDOSOMES: Les enzymes lysosomales liées au récepteur M₆P sont transportées par les "coated vesicles" [coated vesicle] aux endosomes où les deux se dissocient à pH acide.

LYSOSOMES: Maturation finale, élimination de [hatched box] et du signal M₆P

2) VOIE SECONDAIRE : Voie de sécrétion des enzymes lysosomales et recapture par le récepteur [215 kD receptor] de 215 KD

- ◆ NANA: acide N-Acétylneuraminique ou sialique
- GALACTOSE
- MANNOSE
- N ACÉTYL-GLUCOSAMINE

C. LA BIOGENESE DES ENZYMES LYSOSOMALES.

1. ASPECT GENERAL.

Le ciblage de toute protéine vers sa destination ultime est un problème complexe; celui des enzymes lysosomales est particulièrement bien étudié. L'existence d'une trentaine de maladies lysosomales, associées à une déficience en enzymes lysosomales, est un facteur stimulant pour l'étude de leur biosynthèse.

L'endocytose médiée par récepteurs a été proposée en 1972 par Hickman et Neufeld, comme constituant la voie principale du transport des enzymes lysosomales dans les fibroblastes. Mais, cinq années plus tard, cette hypothèse "Sécrétion-Recapture" était supplantée par une découverte importante.

En 1977, en effet, la mise en évidence (Kaplan *et al*), de **résidus mannose-6-phosphate**, marqueurs des enzymes lysosomales, et du **récepteur au mannose-6-phosphate** intracellulaire, a montré que la synthèse de beaucoup d'hydrolases acides se réalise par la voie, dite, **de ségrégation**.

2. Trafic intracellulaire

Biosynthèse et phosphorylation des enzymes lysosomales peuvent se résumer de la façon suivante: la voie principale de synthèse débute dans le réticulum endoplasmique se poursuit dans le Golgi et les endosomes et se termine dans les lysosomes.(Fig 1.1)

(Hasilik et Von Figura, 1984), (Kornfeld et Mellman, 1989).

a) Réticulum endoplasmique

Les étapes initiales de la biosynthèse des enzymes solubles sont communes à celles des protéines sécrétées:

- Traduction du message sur le réticulum endoplasmique rugueux.
- Clivage de la séquence signal du précurseur de masse moléculaire élevée et transfert co-translationnel dans la lumière du réticulum endoplasmique.
- Glycosylation de certains résidus asparagine sur la protéine naissante:
 - 3 glucoses
 - 9 mannoses
 - 2 N-acétyl glucosamines

b) Appareil de Golgi

Lors du transfert de la protéine en formation, à travers le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, remaniement des chaînes oligosaccharidiques: suppression des résidus glucose et de certains mannoses, ajout d'autres résidus hydrate de carbone (N-acétyl glucosamine, galactose, acide sialique, fucose.).

—> Le premier élément clé dans le ciblage de l'enzyme lysosomale est l'acquisition d'un **marqueur de reconnaissance** mannose-6-phosphate peu après que le précurseur ait quitté le réticulum endoplasmique. L'action concertée de deux enzymes distinctes génère un résidu phosphomannosyl:

- la N-acétyl glucosamine 1 phospho transférase (a)
- la N-acétyl glucosamine 1 phosphodiester- α -N-acétyl glucosaminidase.(b)

(a) et (b) se réfèrent à la Fig.I.1, Golgi, voie 2.

—> Le second élément clé de ce système de reconnaissance est la **fixation au récepteur** mannose-6-phosphate qui serait situé au niveau "cis" de l'appareil de Golgi.

c. Les endosomes

—> Le troisième élément clé est la **reconnaissance du fragment cytoplasmique des récepteurs** mannose-6-phosphate par des composants cellulaires qui induisent le transport sélectif des ensembles "Enzyme-Récepteur" aux lysosomes. Le transit par des "coated vésicules" est suivi du passage dans les endosomes, compartiment prélysosomal acide où les enzymes lysosomales sont détachées de leur récepteur à pH acide. Ensuite, les récepteurs sont recyclés vers le Golgi ou la surface cellulaire.

d. Les lysosomes

Les enzymes lysosomales sont dirigées vers les lysosomes où s'achève leur maturation finale. Le(s) phosphate(s) sont excisé(s) des résidus mannose.

e. Voie accessoire.

Une petite quantité d'enzyme peut ne pas être reprise par le récepteur mannose-6-phosphate et suit alors la voie des protéines de sécrétion. Ces enzymes peuvent se lier au récepteur mannose-6-phosphate situé dans les "coated pits" et de la sorte être internalisées dans le compartiment prélysosomal.

3. SITES D'ALTERATION DANS LA BIOGENESE

Au cours de ce processing empreint d'un grand nombre de finesses, on ne peut exclure que des erreurs puissent se produire.

Et, si l'incidence des déficiences lysosomales congénitales n'est heureusement pas élevée (5-10/1000 naissances), par contre les handicaps physiques et mentaux sont sévères.

Sur une cinquantaine d'enzymes lysosomales mises en évidence, on connaît pour environ trente d'entre elles, un défaut génétique de type récessif autosomal; pour deux d'entre elles le chromosome X est en cause.

Les maladies lysosomales peuvent résulter d'anomalies situées à différentes étapes de la biosynthèse des enzymes:

1. La synthèse peut être diminuée ou nulle, le gène est anormal. Citons la GM1 GANGLIOSIDOSE pour laquelle la mutation génétique se situe sur le locus de la β -galactosidase.

2. La synthèse est celle d'une enzyme mutante à faible activité. Citons la maladie de TAY SACHS où une sous-unité de l'hexosaminidase est anormale et rapidement dégradée.

3. Il existe un défaut dans le transport vers les lysosomes: absence de résidu mannose-6-phosphate, ce qui provoque une sécrétion anormale. Citons le cas d' I-CELL DISEASE.

4. La vitesse de dégradation est anormalement élevée: c'est ce point que nous envisagerons de façon plus complète ultérieurement car il concerne la GALACTOSIALIDOSE.

5. Il y a diminution anormale d'un cofacteur (activateur) nécessaire à l'activité de l'enzyme.

III. CADRE GENERAL DES MALADIES DE SURCHARGE LYSOSOMALES.

Une MALADIE CONGENITALE LYSOSOMALE est par définition la condition pathologique initiée par un défaut au niveau d'une protéine lysosomale.

On distingue deux sites d'altération au niveau du lysosome: d'une part, la **MATRICE** (déficiency enzymatique, ...), d'autre part, la **MEMBRANE** (modifications de perméabilité, absence de transporteur, ...) Nous les développerons successivement.

Tableau I.1: Résumé des maladies lysosomales caractérisées par une surcharge en lipides. (Hers, 1973)

<u>Maladies et symptômes majeurs</u>	<u>Déficiences enzymatiques</u>	<u>Matériel stocké</u>
<p>Maladie de Niemann-Pick Anomalie génétique rare qui apparaît chez l'enfant et provoque une hépatosplénomégalie, un retard mental ainsi qu'une mort précoce. On observe une forme infantile et juvénile de la maladie (1 pour 25000)</p>	<p>Elle est provoquée par un déficit génétique de la <u>Sphingomyélinase</u> qui clive la phosphocholine de la sphingomyéline</p>	<p>La sphingomyéline s'accumule dans le cerveau et dans les tissus parenchymateux (foie, rate, poumons)</p>
<p>Maladie de TAY-SACHS (GM2 Gangliosidose, type B) Anomalie provoquant une dégénérescence du système nerveux et conduisant à un retard mental, une cécité et une mort précoce. On observe une forme infantile, infantile tardive et juvénile (1 pour 30.000)</p>	<p>Absence quasi complète de la <u>N-acétyl β hexosaminidase A</u> qui normalement hydrolyse une liasion située entre la N-Acétyl-D-galactosamine et un résidu de D-galactose dans une tête polaire d'un ganglioside</p>	<p>Accumulation dans le cerveau et dans la rate du ganglioside GM2</p>
<p>Maladie de GAUCHER Symptôme d'hépatosplénomégalie et d'érosion du squelette. On observe une forme infantile, juvénile et adulte (1 pour 2000). Une atteinte du système nerveux central se manifeste chez certains patients.</p>	<p>Déficiences quasi complète de la <u>Glucocérébrosidase</u> (β-glucosidase) dans le cas de la forme infantile Activité résiduelle importante pour la forme juvénile et adulte.</p>	<p>Accumulation de Glycosyl (β 1,1) céramide principalement dans le système réticulo-endothélial, au niveau du foie, de la rate et du squelette.</p>
<p>Maladie de KRABBE Anomalie provoquant une détérioration rapide au niveau mental et moteur ainsi qu'une cécité. On distingue une forme infantile, infantile tardive et juvénile (1 pour 50.000)</p>	<p>Dans le cerveau, le foie, la rate et les leucocytes, l'activité résiduelle de la <u>Galactocérébrosidase</u> est réduite de 5 à 10%</p>	<p>Accumulation de Galactosylcéramide dans les lysosomes conduit à un arrêt de myélinisation.</p>
<p>Maladie de FABRY Le sujet présente un enrouement, des dermatites, une dystrophie cornéenne ainsi que des troubles au niveau rénal. De plus, il est affecté par une déformation du squelette et par un retard mental. L'évolution est très variable (1 pour 40.000)</p>	<p>Déficiences complètes en <u>α-Galactosidase</u> au niveau du foie, des reins, du cerveau et des leucocytes</p>	<p>Dans une variété de tissus, incluant les muscles, il y a accumulation de trihexosyl-céramide et de digalactosyl-céramide.</p>
<p>GM1-GANGLIOSIDOSE Anomalie provoquant un dysfonctionnement du cerveau, et des affections osseuses</p>	<p>Absence de la <u>β Galactosidase</u></p>	<p>Accumulation de GM1 ganglioside au niveau du cerveau et au niveau squelettique.</p>

III.1. Les déficiences enzymatiques.

Cette erreur du métabolisme provoque une accumulation intralysosomale de molécules complexes puisque non dégradées par l'enzyme manquante.

Les maladies de surcharge lysosomale sont généralement classées en trois groupes majeurs se référant à la nature chimique des matériaux accumulés: (Brady, R.O., 1983)

- surcharge en lipides
- surcharge en mucopolysaccharides
- surcharge en glycogène

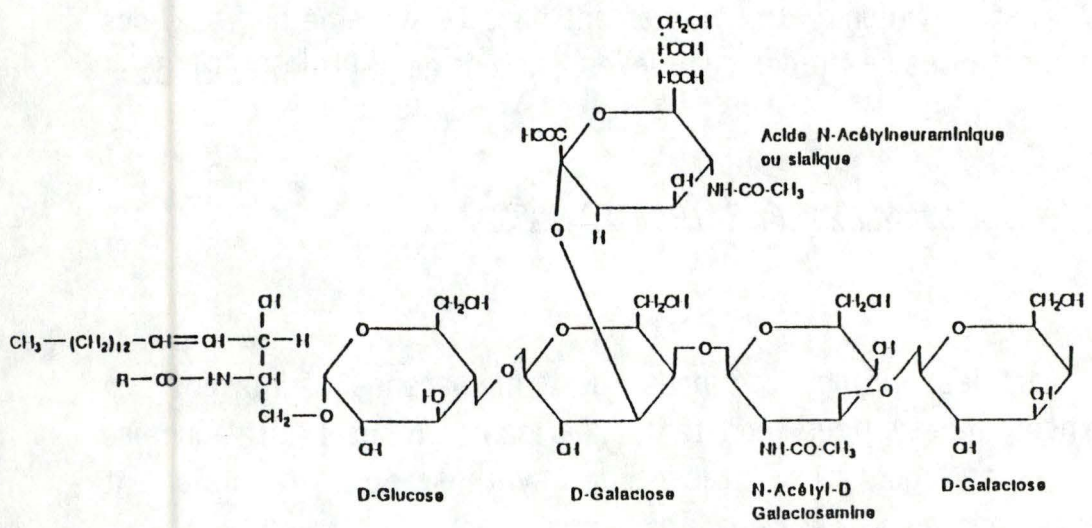
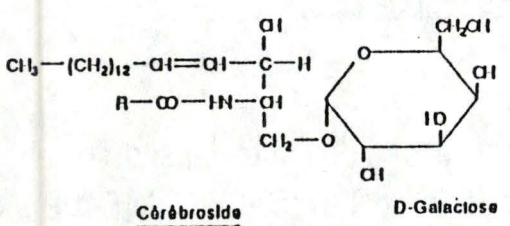
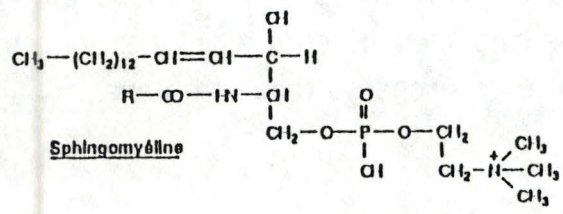
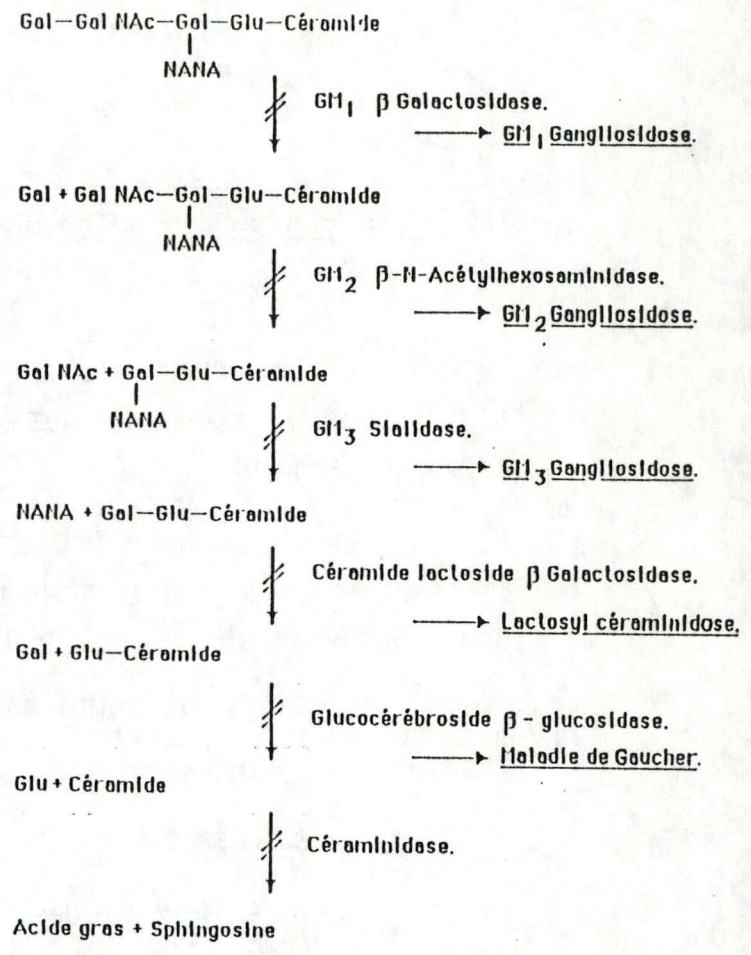
De plus, il existe des maladies qui demeurent non classées soit car trop peu fréquentes et donc les analyses biochimiques ne sont pas suffisantes, soit car elles présentent une surcharge trop complexe.

A. PREMIER GROUPE: SURCHARGE EN LIPIDES.

Une accumulation de cette nature se retrouve dans différentes affections telles que la maladie de GAUCHER, de TAY-SACHS, de FABRY, de NIEMANN-PICK et d'autres encore. Les patients accumulent de manière excessive, dans l'organisme et spécialement dans le système nerveux, des quantités importantes de lipides complexes, surtout des SPHINGOLIPIDES.

1. LE METABOLISME DES LIPIDES MEMBRANAIRES

Tous les lipides polaires des membranes subissent un renouvellement métabolique constant, réalisant un état stationnaire dynamique dans lequel la vitesse de synthèse est normalement contrebalancée par une vitesse égale de destruction.



Ganglioside GM1, M= un (mono) acide sialique, 1- 5 - 4 sucres neutres

Fig. I.2
Structure de 3 types de sphingolipides: sphingomyéline, cérébroside de ganglioside GM 1.

Fig. I.3:
Schéma de dégradation du ganglioside GM1 : enzymes impliqués dans ce catabolisme, sites de blocage possibles et maladies de surcharge lysosomale.

Le catabolisme des sphingolipides membranaires (la SPHINGOMYELINE, les CEREBROSIDES, et les GANGLIOSIDES) (Fig.1.2) est particulièrement sujet à des déficiences résultant d'altérations génétiques des enzymes impliquées.

Dans le cas plus précis de la galactosialidose, ce sont les GANGLIOSIDES qui suscitent notre intérêt. Ce sont les sphingolipides les plus complexes; ils contiennent des têtes polaires, très grandes, constituées de plusieurs unités de sucres. Plusieurs sucres terminaux sont de l'acide N-acétyl neuraminique, qui possède une charge négative à pH 7. A titre d'exemple, nous avons reproduit la structure du ganglioside GM1 dans la Fig.1.2, et dans la Fig.1.3, les sites d'action des enzymes qui interviennent dans le catabolisme de ce lipide complexe et les blocages qui mènent à des maladies de surcharge lysosomale.

2. LE METABOLISME LIPIDIQUE SUJET A DES DEFICITS GENETIQUES VARIÉS

Tableau I.1 (Hers, 1973)

B. SECOND GROUPE: LES MUCOPOLYSACCHARIDOSES.

1. LES MUCOPOLYSACCHARIDES ACIDES, LES PROTEOGLYCANES, CONSTITUANTS IMPORTANTS DU TISSU CONJONCTIF

La nature chimique exacte de la substance fondamentale du tissu conjonctif n'est pas encore complètement élucidée, mais comporte principalement des a) MUCOPOLYSACCHARIDES ACIDES ou GLYCOSAMINOGLYCANS et b) des complexes protéines-hydrates de carbone, connus sous le nom de PROTEOGLYCANES.

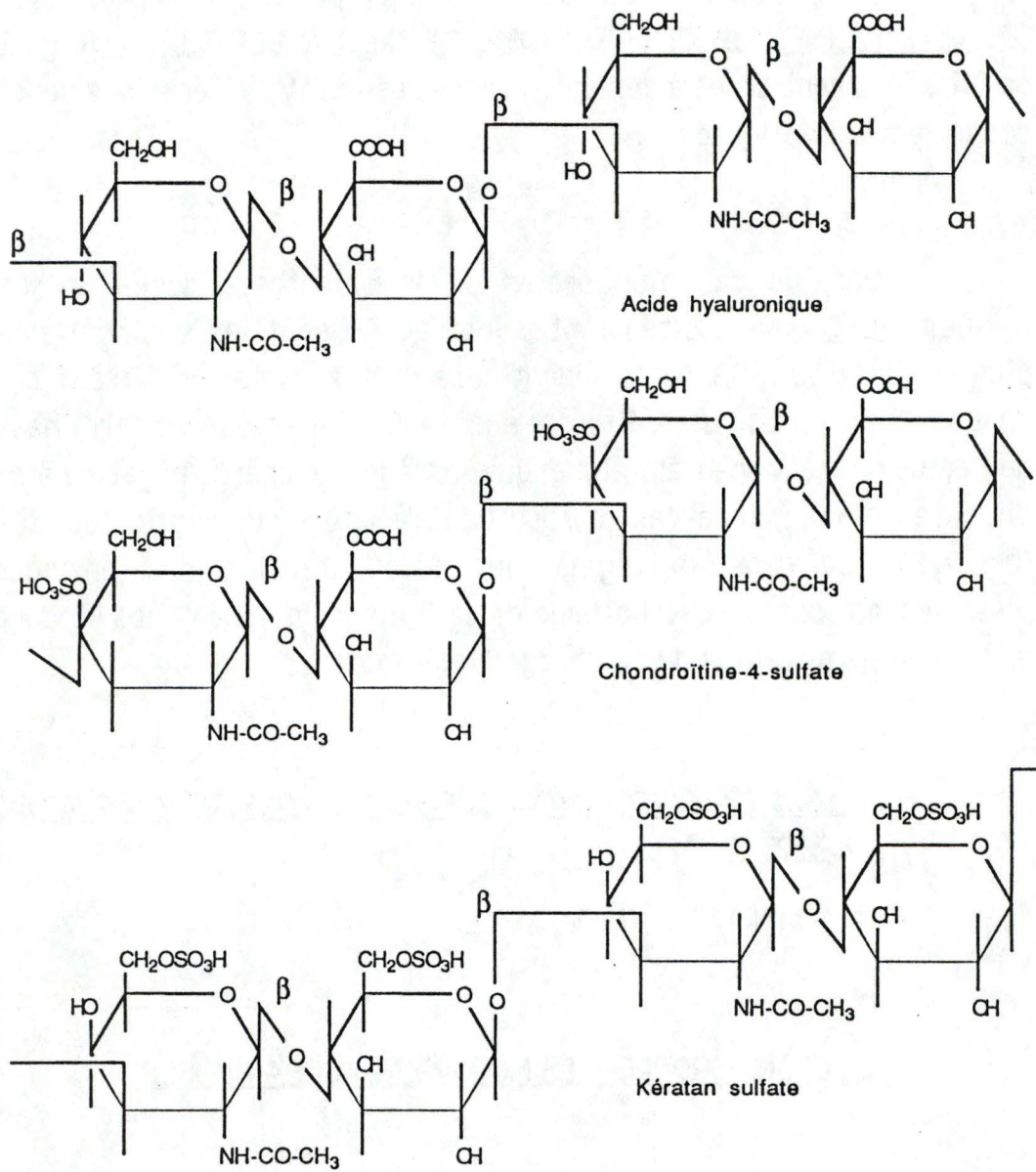


Fig. 1.4

Structure chimique de trois mucopolysaccharides: acide hyaluronique, chondroïtine sulfate et kératan sulfate.
 Structure schématique d'un protéoglycane.

Les **mucopolysaccharides acides** sont formés d'unités disaccharidiques, chacune d'entre elles contenant un dérivé d'un aminohexose, habituellement de la D-glucosamine ou de la D-galactosamine. Au moins un des deux sucres des unités disaccharidiques contient un groupe acide possédant une charge négative à pH 7, carboxyle généralement, ou sulfate. (Fig 1.4)

Les mucopolysaccharides acides sont habituellement attachés aux protéines pour former **les protéoglycanes**, nom réservé aux molécules hybrides de polysaccharides et de protéines dans lesquelles le polysaccharide constitue la plus grande partie du poids. Rappelons qu'à l'inverse, en ce qui concerne les glycoprotéines, c'est la protéine qui prédomine.

Les protéoglycanes sont synthétisés par les fibroblastes dans le tissu conjonctif, les chondrocytes dans le tissu cartilagineux, les cellules musculaires lisses dans la paroi des vaisseaux.

Les glycosaminoglycans les plus fréquents du tissu conjonctif sont l'acide hyaluronique, la chondroïtine sulfate, le dermatan sulfate, l'héparan sulfate, le kératan sulfate.

2. CERTAINES DEFICIENCES ENZYMATIQUES EN HYDROLASES LYSOSOMALES SONT SOURCES DE MUCOPOLYSACCHARIDOSES

Ces maladies de surcharge résultent de déficiences en enzymes lysosomales impliquées dans la dégradation de dermatan sulfate, d'héparan sulfate, ou de kératan sulfate.

Les maladies de ce groupe présentent une évolution progressive sur le plan clinique, et affectent des tissus et organes multiples.

Malgré les différences au niveau du gène muté, les mucopolysaccharidoses présentent des caractères cliniques communs dus à ces surcharges en glycosaminoglycans partiellement dégradés, qui s'accumulent dans les tissus et sont excrétés dans l'urine.

<u>Maladie</u>	<u>Mutation génétique</u>	<u>Modification fonctionnelle</u>	<u>Matériel stocké</u>
<u>MUCOPOLYSACCHARIDOSE, type I</u> 1-Syndrome de Scheie 1 pour 500 000 2- Syndrome de Hurler 1 pour 100.000 3- Syndrome de Hurler/Scheie rare	Absence d'activité de l' α -L- <u>iduronidase</u> (on n' a pas détecté les différences moléculaires au sein des trois affections alléliques)	Dans 1: présence de cataractes oculaires Dans 2 et 3, les anomalies tissulaires sont plus étendues	Les déficiences au niveau de la dégradation du dermatan et de l'héparan sulfate conduisent à une accumulation de mucopolysaccharides incomplètement dégradés.
<u>MUCOPOLYSACCHARIDOSE, type II</u> Syndrome de Hunter 1 pour 150.000	Absence de l'activité de la sulfatase iduronique	Fonctions cellulaires affectées dans beaucoup de tissus	Idem.
<u>MUCOPOLYSACCHARIDOSE, type III</u> Syndrome de Sanfilippo. 1 pour 24.000 4 affections non alléliques	Absence ou déficience enzymatique de: Type IIIA: <u>l'héparan-N-sulfatase</u> Type IIIB <u>La N-Acétyle α-D-glucosaminidase</u> Type IIIC <u>l'α-glucosaminidase N-acétyl-transférase</u> Type IIID <u>la N-Acétyle α-D-glucosaminidase 6-sulfatase.</u>	Fonctions cellulaires affectées fortement dans le système nerveux central	Les déficiences au niveau de la dégradation de l'héparan sulfate conduisent à un stockage de mucopolysaccharides incomplètement dégradés.
<u>MUCOPOLYSACCHARIDOSE, type IV</u> Syndrome de Morquio 2 affections non alléliques 1 pour 100.000	Absence d'activité de Type IV.A <u>la galactosamine-6-sulfate sulfatase</u> Type IV B <u>La β-galactosidase</u>	Disfonctionnement cellulaire au niveau du squelette et du système cardiovasculaire	Déficience de la dégradation lysosomale du kératan sulfate conduit à une accumulation de mucopolysaccharides Incomplètement dégradés.
<u>MUCOPOLYSACCHARIDOSE, type VI</u> Syndrome de Maroteaux-Lamy 1 pour 100 000	Absence ou déficience enzymatique de l' <u>arylsulfatase B</u>	Disfonctionnement cellulaire du squelette et du système cardiovasculaire	Déficience au niveau de la dégradation du dermatan sulfate. Accumulation de mucopolysaccharides Incomplètement dégradés.
<u>MUCOPOLYSACCHARIDOSE, type VII</u> Syndrome de Sly 12 cas rapportés	Absence ou déficience de la <u>β-glucuronidase</u>	Atteinte au fonctionnement cellulaire dans beaucoup de tissus	Déficience au niveau de la dégradation de dermatan et héparan sulfates. Accumulation de mucopolysaccharides incomplètement dégradés

Tableau I.2

Les différents signes cliniques présentés par les patients se situent principalement au niveau squelettique et articulaire. Ceux-ci s'accompagnent d'affections cardio-vasculaires, d'insuffisance respiratoire, et d'hépto- et splénomégalie. De plus une détérioration sévère se manifeste sur le plan mental et neurologique. (Tableau I.2) (McKusick, V.A., et Neufeld, E.F., 1983)

C. TROISIEME GROUPE: SURCHARGE EN GLYCOGENE

Des déficiences en une variété d'enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation du glycogène, principale forme de stockage des hydrates de carbone, peuvent être causes de maladies non réellement distinctes cliniquement.

Le premier cas observé est celui de la GLYCOGENOSE de type II mise en évidence par Hers en 1963. Il s'agit d'une déficience en α 1-4 glucosidase (maltase acide), enzyme lysosomale hydrolysant les oligosaccharides linéaires en unités libres de glucose.

Cette maladie lysosomale récessive donne lieu chez les enfants à une cardiomégalie importante s'accompagnant de troubles cardio-respiratoires causant le décès vers l'âge de deux ans. (Howell, R., et Williams, J.C., 1983)

III.2. Les déficiences au niveau du transport.

Récemment, des déficiences au niveau du transport de petites molécules à travers la membrane lysosomale furent rapportées.

(Renlund *et al.*, 1986) (Mancini *et al.*, 1989)

La CYSTINOSE NEPHROPATHIQUE est la première maladie, appartenant à cette classe, qui fut découverte.

Dans cette affection héréditaire, des cristaux de cystine sont déposés dans plusieurs tissus et organes (particulièrement dans le système réticulo-endothélial) de tout l'organisme. Elle est habituellement accompagnée d'une aminoacidurie généralisée et caractérisée par une augmentation considérable du taux de tous les acides aminés dans l'urine. Les fonctions rénales sont perturbées et les patients atteints de cette maladie meurent habituellement en bas âge avec toutes les manifestations d'une insuffisance rénale aiguë.

On a récemment prouvé que le défaut primaire est un défaut génétique du transporteur lysosomal spécifique du dimère de la cystéine : la cystine.

Une surcharge en VITAMINE B12 fut également décrite, elle résulte d'une déficience au niveau du transport de la molécule libre au travers de la membrane du lysosome.

Enfin, la MALADIE DE SALLA, caractérisée par une accumulation lysosomale d'acide N-acétyl neuraminique, est due à une déficience du transport de l'acide sialique à travers la membrane lysosomale. En 1989, les recherches ont conduit à établir l'existence d'un système de transport lysosomal pour l'acide sialique, médié par un proton.

L'évolution de cette maladie est lente. Les patients atteints de l'affection de SALLA présentent un retard psychomoteur modéré à sévère, une spasticité et une ataxie. D'autres manifestations s'ajoutent: l'excrétion abondante d'acide sialique libre dans l'urine et l'accumulation de 10 à 30 fois la quantité normale de ce composé dans de nombreux tissus de l'organisme.

IV. THERAPEUTIQUE ET DIAGNOSTIC PRENATAL.

(Stanbury *et al*, 1983)

Dans le cadre des maladies de surcharge lysosomale, résultant d'une déficience enzymatique, l'introduction de la protéine manquante est une approche séduisante pour le traitement de ces affections héréditaires récessives.

Cependant, le succès n'est pas encore venu couronner les nombreux efforts déjà tentés dans cette voie.

1°. Pour que la protéine manquante soit internalisée, il est nécessaire qu'elle se lie à un site spécifique de reconnaissance sur la membrane plasmique de la cellule cible. Pour les enzymes lysosomales, **le récepteur mannose-6-phosphate** est apparu comme étant le site d'action idéal.

Or, on ne peut négliger qu'une telle thérapie requiert une quantité importante d'enzymes lysosomales humaines purifiées contenant le résidu mannose-6-phosphate. Seul le placenta aurait pu être source de ces enzymes ... malheureusement, à ce stade la majeure partie des résidus mannose-6-phosphate sont déjà enlevés.

La spécificité tissulaire constitue un obstacle supplémentaire. Dans le cas de la maladie de Tay-Sachs, par exemple, surcharge affectant le cerveau, l'enzyme circulant devrait franchir la barrière hématoencéphalique.

2°. Une méthode alternative pour la livraison des enzymes lysosomales dans des tissus spécifiques a été proposée. Il s'agissait de **coupler** l'enzyme à une autre molécule pour laquelle le tissu expose des récepteurs. L'aspect attractif de ce schéma résidait dans la possibilité d'utiliser seulement des récepteurs présents sur certains tissus.

3°. Au lieu de coupler l'enzyme lysosomale à un ligand spécifique d'un récepteur, Desnick et al. (1976, 1979) ont proposé d'incorporer le ligand dans des vésicules artificielles, les **liposomes**, constituées d'une bicouche phospholipide-cholestérol. La surface de la vésicule est alors couverte de matériel dirigeant le liposome vers une cellule cible.

Beutler et ses collaborateurs ont modifié cette méthode en utilisant des vésicules issues de la lyse hypotonique et du rescantage de globules rouges dans lesquels de la glucocérobrosidase avait été incorporée. Ces **cellules artificielles** persistent plus longtemps dans la circulation que les liposomes, et éventuellement, sont captées par les macrophages du foie et de la rate.

Malheureusement, ces différentes approches tentées chez des patients affectés par la maladie de Gaucher, n'ont pas donné de résultat positif.

Dans l'état actuel des recherches, le **diagnostic prénatal**, acte médical permettant de dépister *in utero* la présence d'une anomalie et de poser l'indication d'une interruption de grossesse, demeure la seule "bouée de sauvetage"!

V. CAS PARTICULIER DE LA GALACTOSIALIDOSE.

A. QUELS SONT LES PHENOTYPES CLINIQUES DE LA GALACTOSIALIDOSE?

Comme déjà décrit précédemment, trois formes se distinguent:

- la forme infantile précoce
- la forme infantile tardive
- la forme juvénile-adulte

Il est frappant de constater les ressemblances très étroites entre les manifestations cliniques trouvées dans la galactosialidose et les signes existants dans les déficiences en α -neuraminidase ou en β -galactosidase.

Alors que les troubles s'avèrent d'une grande gravité (taux de mortalité élevé) chez les formes infantiles précoces, ceux-ci se révèlent plus légers chez les formes juvéniles et adultes.

Cette affection touche des fonctions essentielles de l'organisme: fonction neurologique, hépatosplénique, visuelle.

B. CARACTERISATION DE LA SURCHARGE.

DANS CETTE PATHOLOGIE OU COEXISTENT LES DEFICIENCES EN α -NEURAMINIDASE ET EN β -GALACTOSIDASE, QUELLE EST LA NATURE CHIMIQUE DE L'ACCUMULATION?

La question est posée, ... mais la littérature ne fournit aucune réponse claire. Cette absence peut être expliquée par le fait que la maladie est rare, donc peu d'études ont été entamées à ce sujet.

DANS LE CAS DE LA GALACTOSIALIDOSE, on peut penser que les produits d'accumulation sont à la fois ceux présents dans la déficience isolée en α -neuraminidase ainsi que ceux stockés dans la déficience isolée en β -galactosidase.

Nous développerons donc successivement les surcharges et les signes cliniques de ces deux maladies les plus proches.

1. DEFICIENCE ISOLEE EN α -NEURAMINIDASE

(ou SIALIDOSE de TYPE 1) ET SURCHARGE

(Beaudet *et al*, 1983)

Description clinique

La sialidose se déclare entre la huitième et la vingtième année. Les patients sont atteints progressivement par un handicap visuel qui évolue souvent sévèrement, atteignant parfois la cécité. La tache rouge cerise persiste mais peut revêtir un aspect atypique.

Au niveau neurologique, la myoclonie est généralisée et est fréquemment débilitante; elle est très peu contrôlée par les médicaments.

La ***nature génomique de l'altération*** n'a pas encore été identifiée.

Dans les phénotypes décrits, un défaut sévère en α -neuraminidase envers les liaisons α 2-3 et α 2-6 a été démontré.

La déficience enzymatique ne pourrait concerner que les GLYCOPROTEINES et certains liens OLIGOSACCHARIDIQUES de glycolipides et de protéoglycanes: donc des molécules où l'acide sialique est exposé naturellement en position terminale de la molécule.

Les glycoprotéines sont largement présentes dans les cellules, à leur surface et également extracellulairement. Leur turn-over habituel concerne donc une quantité importante de matériel demandant à être dégradé.

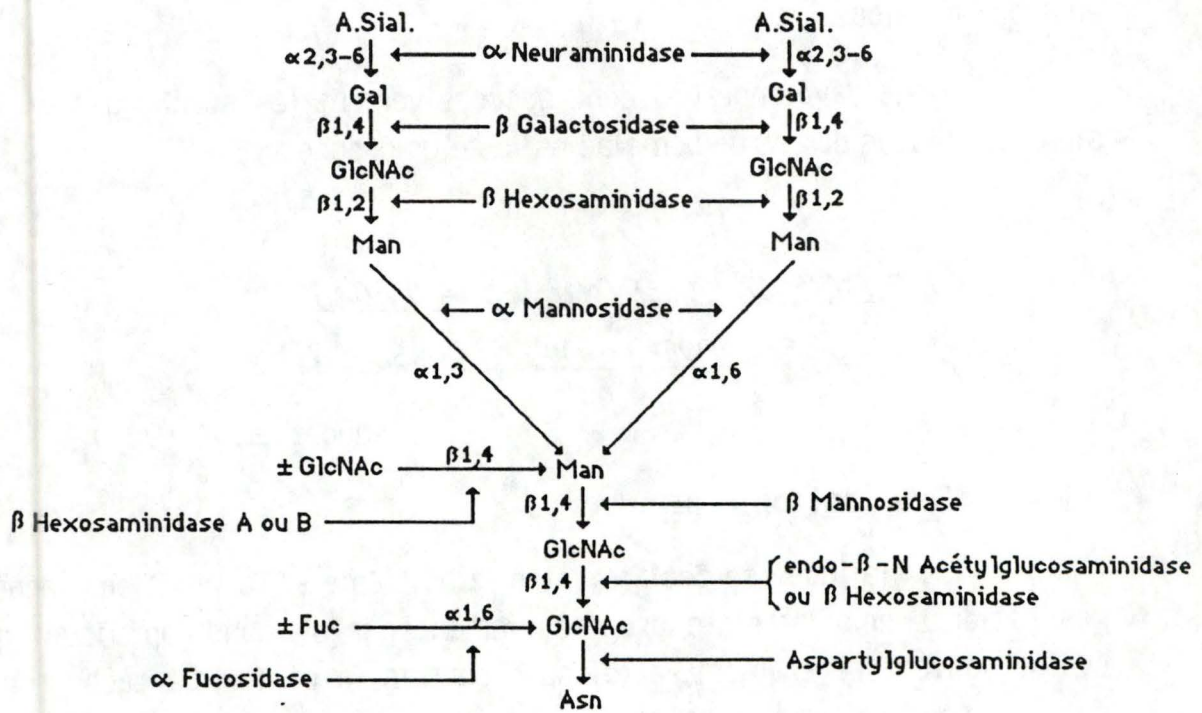


Fig. I.5

Glycoprotéine de type complexe. La liaison de la partie oligosaccharidique se fait sur une asparagine du polypeptide (N lié). Les enzymes impliquées dans la dégradation sont citées.

Le mécanisme majeur de la dégradation des glycoprotéines apparaît comme une séquence d'étapes hydrolytiques impliquant des enzymes spécifiques.

La Fig.1.5 présente le schéma des étapes probables de dégradation d'une structure complexe de type oligosaccharide.

Concernant *la nature chimique de la surcharge*, peu d'analyses biochimiques ont été effectuées sur les tissus de patients atteints de sialidose mais une accumulation de sialyloglycosaccharides doit être soupçonnée.

Les analyses pratiquées sur les lipides du cerveau ont montré peu d'anomalies.

L'excrétion urinaire d'oligosaccharides provenant de glycoprotéines N-liées contenant de l'acide sialique est augmentée, et est souvent jusqu'à 100 fois plus élevée que la normale, allant jusqu'à 5 à 15 mg/l d'oligosaccharides individuels.

Il peut exister d'autre part, une déficience en sialidase spécifique des gangliosides qui entraîne des troubles neurologiques. (Chigorno *et al*, 1986)

2. DEFICIENCE ISOLEE EN β -GALACTOSIDASE ET SURCHARGE

(O'Brien, J.S., 1983)

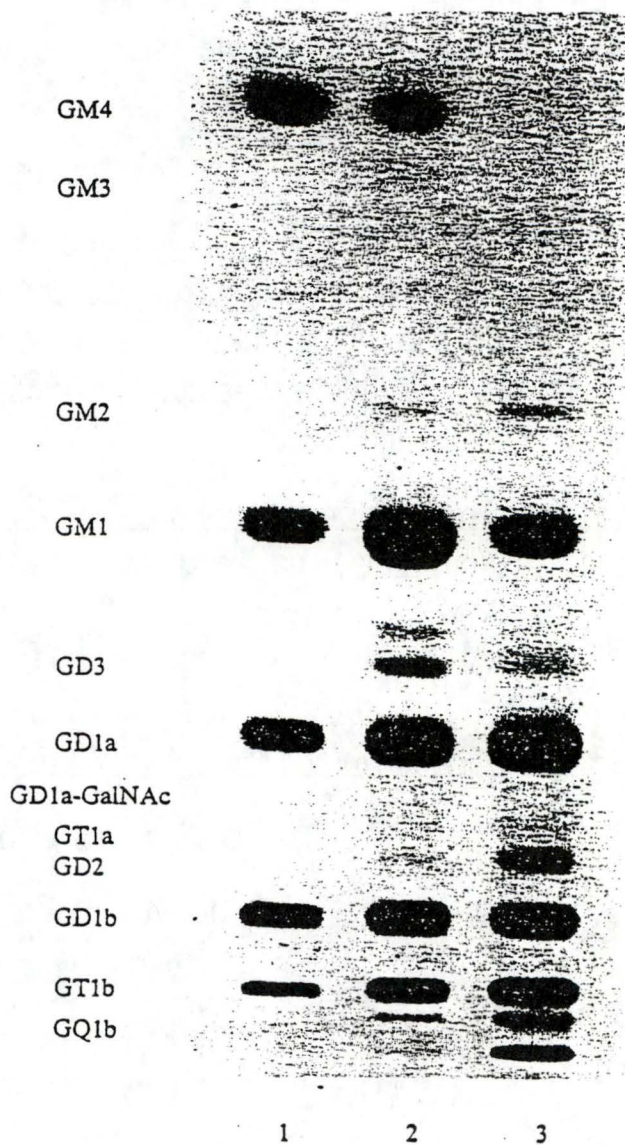
La β -galactosidase est déficiente dans deux types de maladies:

GM1 GANGLIOSIDOSE (lipidose)

MUCOPOLYSACCHARIDOSE IV, type B ou syndrome de Morquio. (Mucopolysaccharidose)

Sur le plan génomique dans les deux cas, le locus cible est identique: il s'agit du locus de la β -galactosidase dont le gène est situé sur le chromosome 3. Cependant, la nature de la mutation est différente car les troubles présentés par les patients atteints de GM1 gangliosidose sont nettement plus sévères que ceux rencontrés chez les malades atteints du syndrome de Morquio.

Figure 1.6: Chromatogramme sur couche mince de gangliosides issus de matière blanche (Piste 2) et de matière grise (Piste 3) d'humains normaux. La Piste 1 contient une mixture d'étalons. (Siegel *et al*, 1989)



a) La GM1 gangliosidose

Description clinique

La plupart des gangliosidoses sont caractérisées par une détérioration mentale et un retard moteur associé progressif, ainsi que par une lipidose neuronale secondaire.

La sévérité de la maladie s'explique par la localisation de la surcharge principalement au niveau du cerveau.

Description biochimique

Les gangliosides, sont des glycosphingolipides contenant de l'acide sialique dans leur chaîne oligosaccharidique. Ils sont **localisés** principalement dans le cerveau, et plus particulièrement dans les membranes nerveuses terminales; ils constituent 6% environ des lipides de la substance grise cérébrale. Les gangliosides sont également des sites récepteurs situés à la surface des membranes cellulaires. La Fig.1.6 reprend la composition en gangliosides des substances blanche et grise du cerveau humain. On constate que le GM1 est largement représenté.

Les gangliosides sont **catabolisés** selon une série d'étapes où les sucres sont enlevés progressivement à partir de l'extrémité non réduite de la chaîne oligosaccharidique

Dans la Fig.1.3 sont représentées les étapes d'hydrolyse du GM1 ganglioside et les points de blocage dans la poursuite de la dégradation en cas de déficiences enzymatiques. En absence de β -galactosidase, **la surcharge** est constituée essentiellement de GM1 gangliosides.

b) La mucopolysaccharidose IV, type B, Syndrome de Morquio.

La caractéristique clinique dominante dans le syndrome de Morquio a trait aux troubles squelettiques sévères accompagnés d'effets secondaires minimes du système nerveux. L'intelligence est normale, sinon faiblement réduite.

Dans ce syndrome est impliquée la déficience en β -galactosidase dont le rôle est *de cliver* le résidu galactose terminal permettant ensuite la désulfatation du mucopolysaccharide kératan sulfate. (Fig 1.4)

Dans un protéoglycane, la structure est plus complexe et sa dégradation nécessite l'intervention d'une β -galactosidase.

Ce mucopolysaccharide *se localise* essentiellement au niveau du cartilage, des os, de la rétine, des disques intervertébraux.

Chez les patients présentant une activité résiduelle significativement plus élevée envers les gangliosides que les oligosaccharides à galactose, ou encore les protéoglycanes, *la localisation de la surcharge* est spécifique du substrat non dégradé. Elle ne se situe plus au niveau du cerveau mais préférentiellement au niveau des os.

3. A quel type de surcharge peut-on s'attendre dans la galactosialidose ?

Suite à la déficience en β -galactosidase, il devrait y avoir une accumulation de GM1 gangliosides, de glycosaminoglycans à galactose et de glycoprotéines complexes

En ce qui concerne les autres sites d'action de la β -galactosidase, ceux-ci ne sont accessibles que si la sialidase a agi préalablement.

La nature chimique des autres substrats qui s'accumulent est donc due *au déficit en α -neuraminidase* Il s'agit essentiellement de sialyloligosaccharides, et en quantité moindre de GM3 gangliosides.

C. DESCRIPTION BIOCHIMIQUE DE LA GALACTOSIALIDOSE

LE "COMPLEXE DE GALJAARD"

Comme il a déjà été dit, la galactosialidose (α -Neu⁻, β -Gal⁻) est une déficience combinée en β -galactosialidase et en α -neuraminidase.

L'Equipe de Galjaard, de l'Université Erasmus à Rotterdam s'est intéressée depuis une dizaine d'années à la GALACTOSIALIDOSE et a identifié le défaut de base dans cette affection.

1°) Quels sont les éléments qui ont permis de mettre en évidence la cause moléculaire responsable de cette maladie?

Des données biochimiques relatives à cette étude, indiquent que dans les fibroblastes provenant de malades atteints de galactosialidose:

- la β -galactosidase, ne possède qu'une activité résiduelle de 10 à 15 % mais présente des propriétés cinétiques comparables à celles des fibroblastes normaux. La déficience quantitative en β -galactosidase résulterait d'une dégradation intralysosomale excessive qui réduit son temps de demi-vie de 10 jours (cellules normales) à 1 jour (cellules malades). (Van Diggelen *et al*, 1981)

- les activités de l' α -neuraminidase et de la β -galactosidase des cellules malades peuvent être restaurées par "un facteur correctif" de nature glycoprotéique produit par des fibroblastes normaux. La source de ce facteur est un milieu de culture provenant des cellules stimulées par le chlorure d'ammonium. Cette base faible a notamment comme effet de provoquer la sécrétion des précurseurs glycoprotéiques, nouvellement synthétisés, dans le milieu. (D'Azzo *et al*, 1982)

Ces auteurs suggèrent donc que **la déficience génétique de ce "facteur correctif" est la cause du défaut combiné en α -neuraminidase et β -galactosidase.**

2°) Puisque la β -galactosidase et l' α -neuraminidase sont restaurées par le même facteur, quel lien existe-il entre ces deux enzymes?

Des expériences de purification à partir de testicules bovins démontrent que, dans les conditions expérimentales utilisées par ces auteurs, l' α -neuraminidase est purifiée avec la β -galactosidase.

(Verheijen *et al*, 1982)

L'idée que la β -galactosidase et l' α -neuraminidase existent sous forme de complexe fut donc suggérée par l'équipe.

3°) Quelle relation existe-t-il entre, d'une part, le complexe β -galactosidase/ α -neuraminidase, et d'autre part, la "Protective Protein"?

Hoogeven et ses collaborateurs (1983) ont suggéré que la protection intralysosomale contre la dégradation de la β -galactosidase et le maintien de l'activité de l' α -neuraminidase, seraient dues à leur existence sous forme **d'un complexe de haut poids moléculaire lié à la membrane du lysosome. Complexe où sont unis le multimère de β -galactosidase, la sialidase (ou α -neuraminidase) et la "Protective Protein".**

Cette équipe a poursuivi son étude sur base de ces acquis.

Sur **fibroblastes normaux**, ces auteurs ont démontré que plus de 85% de la β -galactosidase active est présente dans un multimère de haut poids moléculaire (600 à 700 kD) qui contient aussi 10% de β -galactosidase sous forme monomérique (64kD). La forme précurseur de cette enzyme aurait un poids moléculaire de 85 kD. Quand la β -galactosidase est précipitée par l'antisérum anti β -galactosidase humaine, une troisième protéine de 52 kD l'accompagne, il s'agit de la "Protective Protein", dérivant d'un précurseur de 54 kD.

Chez **des fibroblastes β -Gal⁻/ α -Neu⁻**, d'Azzo *et al*. ont mis en évidence **l'absence de la glycoprotéine de 52 kD.**

Ces chercheurs ont montré en outre que selon les phénotypes cliniques, des différences apparaissent:

Dans la *forme infantile précoce*, la synthèse du précurseur est fortement réduite et la forme mature est absente.

Dans la *forme infantile tardive*, il y a accumulation du précurseur mais altération dans le processing.

Et dans la *forme juvénile-adulte*, il y a davantage de précurseurs que dans la première forme décrite mais le processing est altéré. (Palmeri *et al.*, 1986)

Au cours de l'évolution des recherches, le rôle supposé de la **"Protective Protein"** a connu des fluctuations et a été décrit chronologiquement de la façon suivante:

1°. Elle serait nécessaire pour unir la β -galactosidase et l' α -neuraminidase en un complexe de haut poids moléculaire de plus de 600 kD et ancrer celui-ci dans la membrane lysosomale.

2°. Dans les fibroblastes normaux la "Protective Protein" permettrait aussi le remaniement normal de la β -galactosidase, dont le précurseur est de 85 kD en la forme mature de 64 kD.

3°. La "Protective Protein" serait nécessaire à la transformation de la forme inactive de l' α -neuraminidase en forme enzymatiquement active.

4°. Enfin, la "Protective Protein" s'est révélée par clonage être une protéine de 452 acides aminés correspondant à un poids moléculaire de 54 kD; elle est scindée en deux sous-unités de 32 kD et 20 kD unies par un pont disulfure. Galjart et ses collaborateurs (1988) ont démontré que sa séquence ressemble à celle de la carboxypeptidase Y de levure. Et, TRES RECEMMENT, Tranchemontagne et son équipe (1990) ont mis en évidence l'activité carboxypeptidasique de la "Protective Protein". Elle aurait une activité de protéase ayant au site actif une sérine. La "Protective Protein" serait une carboxypeptidase qui remanierait la β -galactosidase avec comme résultat une stabilisation et une protection de celle-ci contre la dégradation. En outre, la "Protective Protein" activerait l' α -neuraminidase. La "Protective Protein" serait donc impliquée dans le remaniement des deux enzymes.

CEPENDANT, "Comment agit-elle?", "A quel niveau?", ..., sont toutes des questions actuellement sans réponse.

Lors de travaux réalisés précédemment au laboratoire (Gonze M.M., 1989), un anticorps monoclonal 10D10 dirigé contre la membrane lysosomale purifiée de foie de rat a été utilisé en vue d'apporter certaines informations au sujet de la biosynthèse d'une glycoprotéine lysosomale appelée, LGP 10D10. Les résultats obtenus suggèrent que la LGP 10D10 pourrait être l' α -neuraminidase de la membrane lysosomale de foie de rat. L'anticorps 10D10 provoque la précipitation de peptides qui pourraient appartenir au Complexe de Galjaard. Ces résultats sont donc d'un intérêt certain dans l'étude future de la biogenèse des composants du "Complexe de Galjaard".

BUT & DEMARCHE DU TRAVAIL

Notre travail s'inscrit dans le cadre de l'étude de la biogenèse de deux enzymes lysosomales. Ces deux hydrolases sont la β -galactosidase et l' α -neuraminidase, déficientes dans une maladie de surcharge lysosomale, la GALACTOSIALIDOSE.

Dans le cas de maladies lysosomales, la seule intervention possible actuellement se situe sur le plan de la PREVENTION, et non de la thérapeutique. Dans les cultures cellulaires réalisées à partir de prélèvement de liquide amniotique, les représentants majeurs sont les FIBROBLASTES. Le choix du type cellulaire, utilisé dans notre étude, se justifie donc par cet aspect de COMPLEMENTARITE pouvant exister entre les recherches effectuées sur fibroblastes issus de biopsie et sur fibroblastes prélevés *in utéro*.

Il est intéressant d'effectuer l'étude comparative de la biogenèse de ces enzymes, dans des fibroblastes normaux et dans des fibroblastes originaires de patients atteints de cette maladie. Ceci devrait permettre de préciser les différentes étapes de leur biosynthèse, ainsi que les causes moléculaires de la déficience.

La synthèse, le transport et le processing d'enzymes lysosomales en général, de la β -galactosidase et de l' α -neuraminidase en particulier, sont étudiées selon le schéma suivant: 1/ Incubation des cellules en présence d'un acide aminé marqué: la [35 S] méthionine. 2/ Immunoprécipitation des polypeptides marqués à l'aide d'anticorps anti- β -galactosidase, anti- α -neuraminidase. 3/ A partir d'homogénats cellulaires, détermination des poids moléculaires des précurseurs et protéines matures par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et fluorographie. 4/ Le trajet cellulaire de la protéine en cours de synthèse est déterminé en suivant les même étapes (2 et 3) à partir, non pas d'un homogénat, mais de fractions obtenues en gradient de densité. Sur ces fractions, déterminations parallèles des différents marqueurs enzymatiques des compartiments par lesquels doivent transiter les protéines en formation.

Les travaux PRELIMINAIRES à cette étude, et qui font l'objet de ce travail sont:

1°. La comparaison des activités enzymatiques de différents organites subcellulaires: (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, membrane plasmique, lysosomes), provenant de deux souches de cellules malades à celles de cellules saines. Ce, afin de déceler les altérations enzymatiques du lysosome et le cas échéant, des différents organites impliqués dans la biosynthèse des enzymes lysosomales. Il est d'autre part intéressant d'y inclure les mitochondries et les peroxysomes. Le foie de rat est choisi comme référence au départ.

2°. Une analyse par centrifugation différentielle et isopycnique afin de caractériser les organites provenant de cellules saines et malades et de pouvoir suivre ultérieurement le cheminement intracellulaire des enzymes lors de leur biosynthèse.

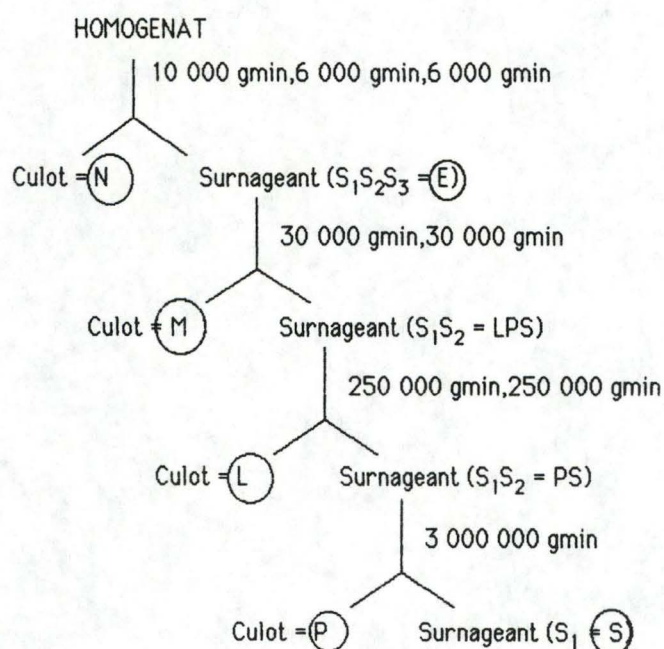
3°. La recherche de conditions de culture permettant la correction des déficiences en β -galactosidase et en α -neuraminidase, soit par une protection contre la dégradation trop rapide, soit par la stimulation d'une synthèse résiduelle.

MATERIEL & METHODES

I. LE FOIE DE RAT.

Nous avons utilisé des rats Wistar de 200 à 250 g, mis à jeûn 16 heures avant l'expérience. Une fois l'animal sacrifié, le foie est prélevé, pesé, coupé en fines lamelles puis broyé à l'aide d'un homogénéiseur coaxial de Potter dans un volume connu de saccharose isotonique glacé (0.25 M).

L'homogénat ainsi obtenu contient tous les organites des cellules hépatiques en suspension. Il est ensuite fractionné suivant le schéma de de Duve *et al.*, (1955) représenté ci-dessous.



La centrifugation est une technique qui permet la séparation des particules subcellulaires grâce à leur comportement différent dans un champ centrifuge.

On obtient donc cinq fractions hétérogènes:

La fraction N est constituée essentiellement de noyaux , de vésicules de membrane plasmique, de débris cellulaires et de quelques cellules intactes ayant résisté à l'homogénéisation.

La fraction M, ou mitochondriale lourde, renferme, quant à elle, des mitochondries mais aussi des lysosomes et des peroxysomes en quantité appréciable.

La fraction L, ou mitochondriale légère est enrichie en lysosomes et en peroxysomes.

La fraction P microsomale contient pour sa part, des éléments du réticulum endoplasmique et du Golgi, ainsi que des fragments de la membrane plasmique.

La fraction S, ou fraction soluble est constituée de tous les éléments non sédimentables de la cellule dans ces conditions.

La teneur relative en divers granules des fractions isolées par centrifugation est estimée en mesurant l'activité d'enzymes associées spécifiquement à un type donné de granules (enzymes de référence). (de Duve *et al*, 1955)

II. LES FIBROBLASTES WI-38, GM 00806 ET SAN.

A. CULTURE CELLULAIRE

1. Caractérisation des cellules

Les fibroblastes WI-38, dits normaux, proviennent d'un embryon de poumon humain; ces cellules furent mises en culture et caractérisées par Hayflick, en 1965. Elles nous ont été fournies par l'American Type Culture Collection.(c/o Sales and Marketing Department, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 USA)

Les fibroblastes déficients, de peau, proviennent de patients présentant les signes cliniques d'une maladie de surcharge lysosomale, de type galactosialidose. Cette affection résulte de la déficience en deux enzymes lysosomales: la β -Galactosidase et l' α -Neuraminidase.

Les fibroblastes GM-00806 proviennent d'une patiente âgée de 30 mois, atteinte de viscéromégalie mais ne présentant pas de troubles psychomoteurs. Ils nous ont été fournis par le Genetic Human Mutant Cell Repository. (Institute for Medical Research, Copewood and Davis Streets, Camden, New Jersey 08103)

Les fibroblastes SAN nous ont été aimablement fournis par le Docteur Carton et le Docteur Dacremont de l'Hôpital Universitaire de Gand. Ils proviennent d'une biopsie de peau réalisée sur un bébé nouveau-né présentant déjà un stade aigu de la maladie associée à d'importants troubles psychomoteurs.

2. Méthodes de culture

Les fibroblastes sont cultivés à 37°C dans un Milieu Essentiel Minimum (MEM) de Eagle; additionné de NaHCO_3 (2,18g/l), de pénicilline (100 000 U/l) et de streptomycine (100g/l). Extemporément, du sérum de veau foetal est ajouté à raison de 10% (WI-38 et GM-00806), ou de 15% (SAN), et le milieu est ajusté à pH 7,4.

Les cellules sont cultivées dans des boîtes "Falcon" fermées, en plastique (25 cm²-75 cm²). Elles adhèrent au plastique et se multiplient jusqu'à confluence. Dès leur arrivée à confluence, les cellules sont lavées avec une solution saline de trypsine (trypsine 0,1% dans du tampon citrate de sodium). Elles sont ensuite "repiquées" le plus généralement à une dilution de 1/4 (WI et GM) ou de 1/2 (SAN).

3. Congélation et décongélation des cellules

La congélation des cellules à des stades précoces de division nous a permis de réaliser des banques de fibroblastes des trois types à partir de cellules arrivées à confluence. Nous pouvons donc cultiver régulièrement des fibroblastes d'âge comparable.

Les fibroblastes en culture, après avoir été lavés avec une solution de HANKS, sont détachés de leur support par une solution de trypsine (0,1% dans du tampon citrate de sodium). Ils sont repris dans du milieu complet contenant 10% de sérum et centrifugés à 1000 RPM dans une centrifugeuse "Sorvall Instruments" (Rotor Sorvall 3900 RPM). Le culot de centrifugation est resuspendu dans 10 ml de milieu contenant 20% de sérum et 10% de Diméthyl Sulfoxyde (DMSO) et placé dans un tube à congélation. Celui-ci est amené progressivement à -80°C puis placé dans de l'azote liquide (-196°C).

Les cellules peuvent être conservées indéfiniment sans voir leur nombre de divisions modifié après décongélation.

Contrairement à la congélation, la décongélation des cellules doit être rapide.

Sorti de l'azote liquide, le tube congelé contenant les cellules est réchauffé rapidement dans un bain à 37°C . Ensuite, on place immédiatement les cellules dans 10 ml de milieu MEM complet dans un tube à centrifuger afin d'éliminer le DMSO. Le tube est centrifugé 5 minutes à 1.000 RPM à la centrifugeuse "Sorvall Instruments". Le milieu de décongélation est éliminé, le culot de cellules resuspendu dans le milieu MEM complet et les cellules sont remises en culture.

B. PREPARATION D'HOMOGENATS CELLULAIRES

Les fibroblastes sont rincés deux fois au moyen de tampon phosphate 10 mM pH 7,4 contenant du NaCl 0,15 M à 0°C (PBS) et une fois par du saccharose (0,25 M) glacé. Les cellules sont raclées dans le saccharose (0,25 M) glacé à l'aide d'une gomme et transférées dans des tubes coniques, puis centrifugées à 0°C à la centrifugeuse "Sorvall Instruments" pendant 10 minutes à 600g (1000 RPM).

L'homogénéisation des cellules est réalisée à l'homogénéiseur de Dounce de 7ml (Kontes Glass Co.) par 20 passages d'un piston serré. L'homogénat ainsi préparé contient tous les organites subcellulaires des fibroblastes

C. FRACTIONNEMENT COMPLET PAR CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE

L'homogénat de fibroblastes est soumis au fractionnement par centrifugation différentielle décrit pour le foie de rat (de Duve *et al*, 1955) en tenant compte des adaptations proposées par Remacle *et al*, (1980).

Nous avons réalisé des fractions MLP et ML+P en centrifugation différentielle pour les déposer ensuite sur un gradient continu en saccharose. Pour la fraction MLP, l'extrait E est centrifugé à 39.000 RPM pendant \pm 30 minutes (la durée de centrifugation est fonction du volume à centrifuger). Tandis que pour la fraction ML+P, l'extrait E est centrifugé \pm 5 minutes à 25.000 RPM (2 fois), le culot constitue la fraction ML, le surnageant est ensuite centrifugé \pm 30 minutes à 39.000 RPM, ce qui sédimente la fraction P. On additionne ensuite les fractions ML et P.

D. CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE EN GRADIENT CONTINU DE SACCHAROSE

En centrifugation isopycnique, les particules sont centrifugées dans un gradient de densité jusqu'à ce qu'elles occupent la position correspondant à leur densité d'équilibre; à ce moment leur vitesse de sédimentation est devenue nulle. Dans ce cas, la séparation des granules se fait selon un critère de densité.

Une fraction MLP (ou ML+P) est déposée au sommet d'un gradient linéaire de saccharose dont les limites de densité sont 1,09 / 1,26 (g/ml). Il est soumis à une centrifugation en rotor à godets basculants SW 65 pendant 17 heures à 39.000 RPM.

Après centrifugation, le tube est découpé en sections parallèles afin de récupérer les différentes fractions de densités croissantes. L'activité des enzymes de référence peut, dès lors, être mesurée.

III. LES ENZYMES DE REFERENCE.

La concentration relative des divers organites présents dans les fractions isolées par centrifugation (différentielle ou isopycnique) est estimée en mesurant dans ces fractions l'activité d'enzymes associées à un type donné de granules.

Les enzymes testées pour caractériser les organites sont,

pour,

- * les mitochondries : la cytochrome oxydase
- * les peroxysomes : la catalase
- * la membrane plasmique : la dipeptidyl peptidase IV, la 5'-nucléotidase et la phosphodiesterase alcaline.
- * l'appareil de Golgi : la galactosyl transférase
- * les lysosomes : la cathepsine C, la β -galactosidase, la N-acétyl- β -D-glucosaminidase, l' α -neuraminidase, l' α -mannosidase et l' α -glucosidase acide
- * le réticulum endoplasmique : la NADH cytochrome C réductase, la NADPH cytochrome C réductase et l' α -glucosidase alcaline

Outre les mesures d'activités enzymatiques, le dosage chimique du RNA, marqueur du réticulum endoplasmique rugueux a été effectué; il est basé sur les méthodes de Karsten et Wollenberg, 1977; Brunk *et al*, 1979.

Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry *et al*, 1951.

Le résumé des conditions expérimentales des dosages enzymatiques, ainsi que les références auxquelles nous avons fait appel, sont repris, dans le tableau M.M.1

Tableau M.M.1: Résumé des conditions de dosages des enzymes mesurées.

Organites subcellulaires	Enzymes	Substrats	Conc.	pH	Mesure	Références
Réticulum endoplasmique	NADH cyt.C réductase	Cytochrome C NADH	5 μ M 0,1 μ M	7,4	spectro- photométrique du cyt.réduit	Beaufay <i>et al.</i> (1974)
	NADPH cyt.C réductase	Cytochrome C NADPH	5 μ M 0,24 μ M	7,4	spectro- photométrique du cyt.réduit	Beaufay <i>et al.</i> (1974)
	α -Glucosidase alcaline	4-Méthylum- belliferyl α -D glucopyranoside	0,1mM	9	fluorimétrique du 4-méthylum- belliferyl- glucopyranoside	Peters <i>et al.</i> (1972)
Golgi	Galactosyl transférase	UDP Galactose C ¹⁴	1mM	6,2	transfert de galactose C ¹⁴	Beaufay <i>et al.</i> (1974)
Lysosomes	β -Galactosidase	4-Méthylum- belliferyl β -D galactopyranoside	0,5mM	4	fluorimétrique du 4-méthylum- belliferyl- galactopyranoside	Peters <i>et al.</i> (1972)
	Cathepsine C	Glycyl-L- arginine- β - naphthylamide	0,2mM	6	fluorimétrique de la β -naphthylamine	Jadot <i>et al.</i> (1984)

Membrane plasmique	α -Mannosidase	4-Méthylum-bélliféryl- α -mannopyranoside	0,1mM	4,5	fluorimétrique du 4-méthylum-bélliférone	Peters <i>et al.</i> (1972)
	N-Acétyle- β -D glucosaminidase	4-Méthylum-bélliféryl- β -glucosaminide	1mM	3,5	fluorimétrique du 4-méthylum-bélliférone	Peters <i>et al.</i> (1972)
	α -Neuraminidase	4-Méthylum-bélliféryl- α -N-acétyle neuraminic acid	0,1mM	4,2	fluorimétrique du 4-méthylum-bélliférone	Peters <i>et al.</i> (1972)
	α -Glucosidase acide	4-méthylum-bélliféryl- α -D glucopyranoside	1mM	4,5	fluorimétrique du 4-méthylum-bélliférone	Potier <i>et al.</i> (1979)
	Dipeptidyle peptidase IV	Glycyl-proline- β -naphthylamide	4,5mM	8	fluorimétrique de la β -naphthylamine	Peters <i>et al.</i> (1972)
	Phosphodiesterase alcaline	Thymidine 5' monophosphate p-nitrophényl ester	5mM	9,6	colorimétrique du p-nitrophényl	Beaufay <i>et al.</i> (1974)
Mitochondries	5'Nucléotidase	5'AMP	6mM	7,5	colorimétrique du phosphate inorganique	Wattiaux-De Coninck et Wattiaux (1969)
	Cytochrome oxydase	Cytochrome C réduit	17 μ M	7,4	spectrophotométrique du cytochrome réduit	Appelmans <i>et al.</i> (1955)
Peroxisomes	Catalase	H ₂ O ₂	1,5mM	7	colorimétrique de H ₂ O ₂	Baudhuin <i>et al.</i> (1964)

IV. PRESENTATION DES RESULTATS.

A. HOMOGENATS

Les mesures d'activités enzymatiques concernant toutes les enzymes, la catalase et la cytochrome oxydase exceptées, sont exprimées en nmole de substrat dégradé par minute.

Les unités de cytochrome oxydase utilisées sont définies par Cooperstein et Lazar, celles de la catalase selon Baudhuin *et al.* (1964).

B. FRACTIONNEMENT

Pour calculer et présenter les résultats, nous utilisons les méthodes décrites par de Duve *et al.* (1955).

Les résultats sont portés en graphique: il s'agit d'un histogramme avec, en ordonnée, l'activité spécifique relative à savoir le rapport entre le pourcentage d'activité totale de la fraction déterminée et le pourcentage de protéines dans cette même fraction, et, en abscisse, la quantité relative de protéines des cinq fractions cumulées de gauche à droite.

Chacune de ces fractions est représentée par un rectangle dont la *hauteur* est proportionnelle à la purification de l'enzyme, la *base* est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans la fraction et la *surface* représente le contenu relatif en enzyme dans la fraction.

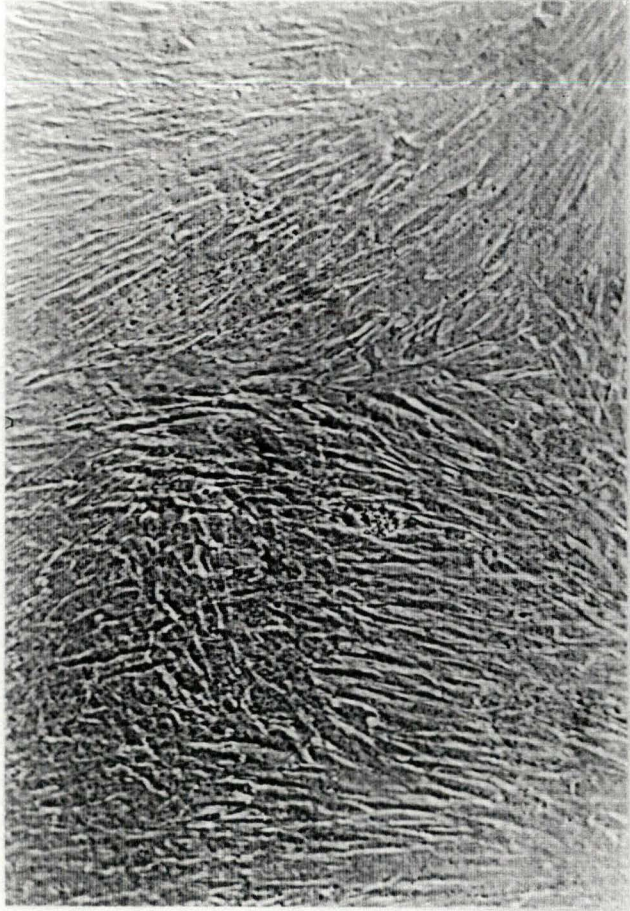
Pour les dosages enzymatiques, ainsi que pour le dosage de protéines, on calcule la récupération en sommant les valeurs d'activités enzymatiques trouvées dans les fractions N, M, L, P et S rapportées à l'activité de l'homogénat, qui équivaut à E + N.

Activité de l' α -neuraminidase de fibroblastes WI-38

Milieu	U.S.	Dounce
Eau distillée + Albumine (1 mg/ml)	0,315	0,396
Saccharose 0,25 mol/l	0,266	0,253
Saccharose 0,25 mol/l + Albumine (1 mg/ml)	0,261	0,299

Tableau M.M. 2. Les cellules sont homogénéisées, soit par une exposition de trois secondes aux ultra-sons (U.S.), soit à l'aide de l'homogénéiseur de Dounce (20 passages, piston "tight").

L'activité est mesurée selon une adaptation de la méthode de Potier et al. (1979). La concentration en substrat, acide N-acétyl-neuraminique-méthylumbelliférone, est de 100 μ mol/l dans le tampon acétate, 200 mmol/l, pH 4,2. La réaction est déclenchée par l'addition de 50 μ l d'homogénat dans un volume final de 0,2 ml; elle est stoppée, après une incubation de 30 min à 37°C, par l'addition de 1,3 ml de tampon glycine-NaOH 133 mmol/l, pH 10,4. Les activités sont exprimées en nmol/min.mg de protéines.



WI



GM



SAN

C. GRADIENT CONTINU EN SACCHAROSE.

Le mode de représentation en histogramme des résultats, utilisé pour le gradient continu de saccharose, est celui décrit par Beaufay *et al* (1964). Chaque fraction est matérialisée sous la forme d'un rectangle dont: la *base* correspond aux limites de densité de la fraction, la *hauteur* représente la fréquence qui équivaut au rapport du pourcentage d'activité enzymatique sur l'incrément de densité de chacune des fractions, et la *surface*, quant à elle, représente la proportion d'activité enzymatique dans la fraction en question.

V. COMMENTAIRES SUR LE DOSAGE DE L' α -NEURAMINIDASE.

Les méthodes colorimétriques de dosage de l'activité de l' α -neuraminidase ont été fréquemment utilisées pour déterminer la libération d'acide sialique à partir d'oligosaccharides, de glycolipides ou de glycoprotéines. Cependant, ces méthodes colorimétriques donnent des résultats fiables mais sont relativement fastidieuses lorsqu'elles sont appliquées sur des préparations enzymatiques grossières. (Potier *et al*, 1979)

Selon Potier *et al*, le pH maximal de l' α -neuraminidase des fibroblastes envers le 4-MU-NANA se situe entre pH 4,2 et 4,4.

Dans des mises au point préliminaires, nous avons constaté que l' α -neuraminidase des fibroblastes est relativement instable. L'activité de cette enzyme envers le 4-MU-NANA, dans des homogénats stockés à -20°C , représente seulement 56% de celle des homogénats frais. De plus, il existe une corrélation entre l'activité de l' α -neuraminidase et celle de la concentration en protéines dans la fraction; les protéines semblent jouer un rôle protecteur. Enfin, l'enzyme est légèrement inactivée en présence de saccharose 0,25 M, nous remarquons que l'albumine protège l'activité de l' α -neuraminidase. (Tableau M M.2). Dans les conditions de dosage reprises dans ce tableau, l'activité de l' α -neuraminidase reste linéaire jusqu'à 30 minutes.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

1ère PARTIE:

Aspect morphologique des fibroblastes WI-38, GM 00806 et SAN.

I. MICROSCOPIE EN CONTRASTE DE PHASE

Les fibroblastes **WI** et **GM**, appartenant à des cultures jeunes, sont fusiformes et se disposent en un mouvement organisé lorsque la culture arrive à confluence. Les fibroblastes **SAN** présentent un aspect plus granuleux et plus dilaté, la confluence n'est jamais parfaitement atteinte.

Le nombre maximal de générations aisément obtenu est différent selon le type cellulaire: il est de ± 45 pour les WI, de ± 40 pour les GM et de 15 à 16 pour les SAN. Le vieillissement précoce des fibroblastes SAN, ainsi que la difficulté de les cultiver, nous ont contraint à limiter les expériences en ce qui les concerne.

II. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE: OBSERVATION DES LYSOSOMES

Les cellules WI montrent un aspect classique des lysosomes. Ceux-ci contiennent des substances soumises à la digestion, ou des résidus indigestes.

Les photos de GM et SAN montrent un aspect surchargé des lysosomes. Ces organites, dans les maladies de surcharge lysosomale, échangent souvent leur nom contre celui de "corps myéloïdes" dont les aspects diffèrent suivant la nature de la surcharge. (Ghadially, 1978). Pour les cellules GM et SAN, on observe des lysosomes avec des inclusions lamellaires qui diffèrent:

Chez GM, les membranes accumulées sont plus concentrées et disposées en stries.

Chez SAN, les membranes non dégradées sont plus éparses, plus dilatées et disposées de manière concentrique.

Aspect des fibroblastes WI-38, GM00806 et SAN observés au microscope à contraste de phase (grossissement : 130x).

Deux idées ont été formulées pour expliquer la présence de ces figures myéliniques dans les lysosomes: (Ghadially, 1978)

1°. Tout résidu lipidique devenu hydraté peut donner naissance à ce type de figure.

2°. La figure myélinique peut être issue de cytomembranes incomplètement digérées.

Dans *la galactosialidose*, les corpuscules résiduels résulteraient de la déficience en sialidase hydrolysant les gangliosides.

EN EFFET, - dans *une sialidose*, déficience en sialidase ou α -neuraminidase, on retrouve au niveau de nombreux organes des corpuscules résiduels, semblables à ceux que nous avons observés.

- dans *une GM1 gangliosidose*, où manque la β -galactosidase, on ne retrouve de corps cytoplasmiques membranaires qu'au niveau du tissu neural. Seules des vacuoles claires sont retrouvées dans les organes viscéraux. Le diagnostic d'une maladie lysosomale nécessite toujours une confirmation biochimique des enzymes concernées.

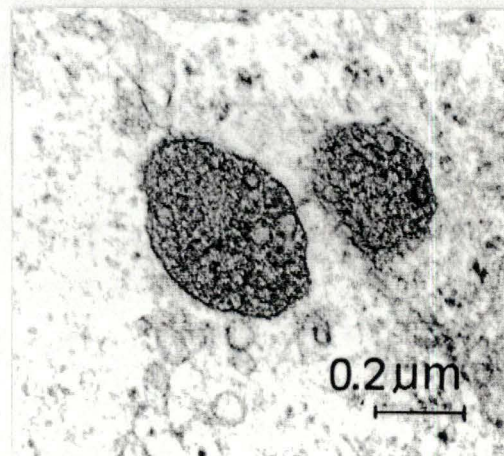
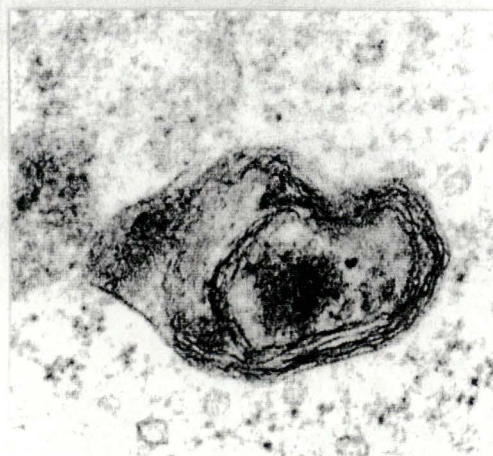
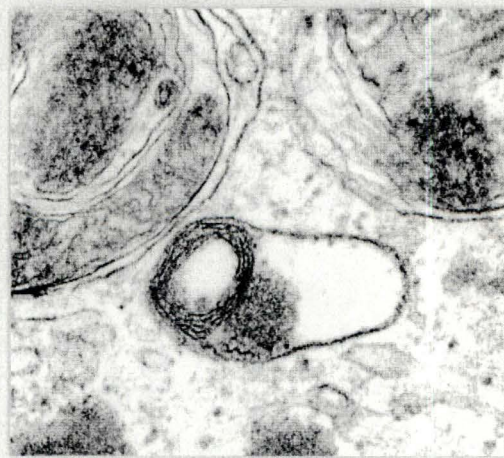
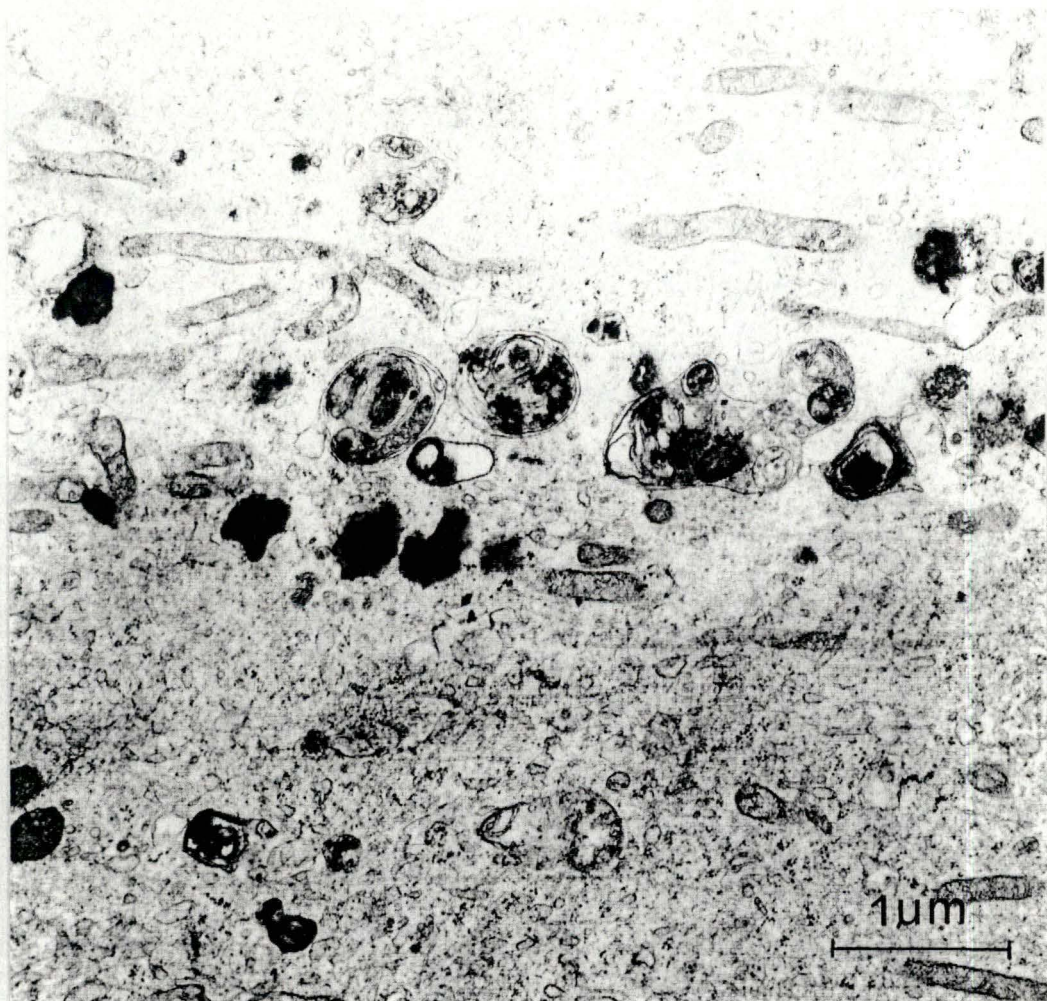
(Van Hoof, 1973) (Goebel *et al*, 1982)

Micrographie électronique de fibroblastes WI-38, GM00806 et SAN (section de 55,5 nm après fixation à la glutaraldéhyde et à l'acide osmique, déshydratation à l'éthanol et enrobage à l'Epon).

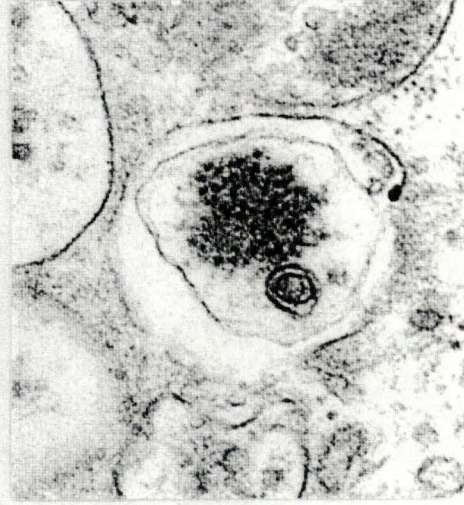
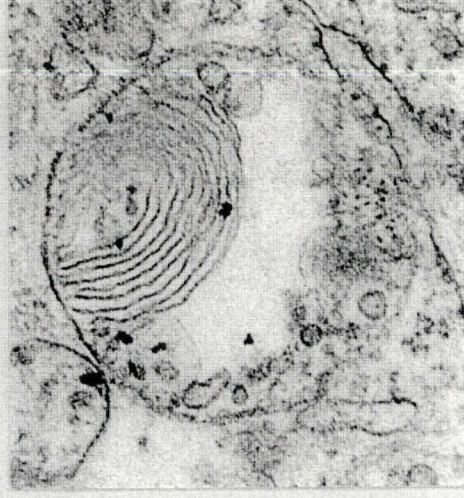
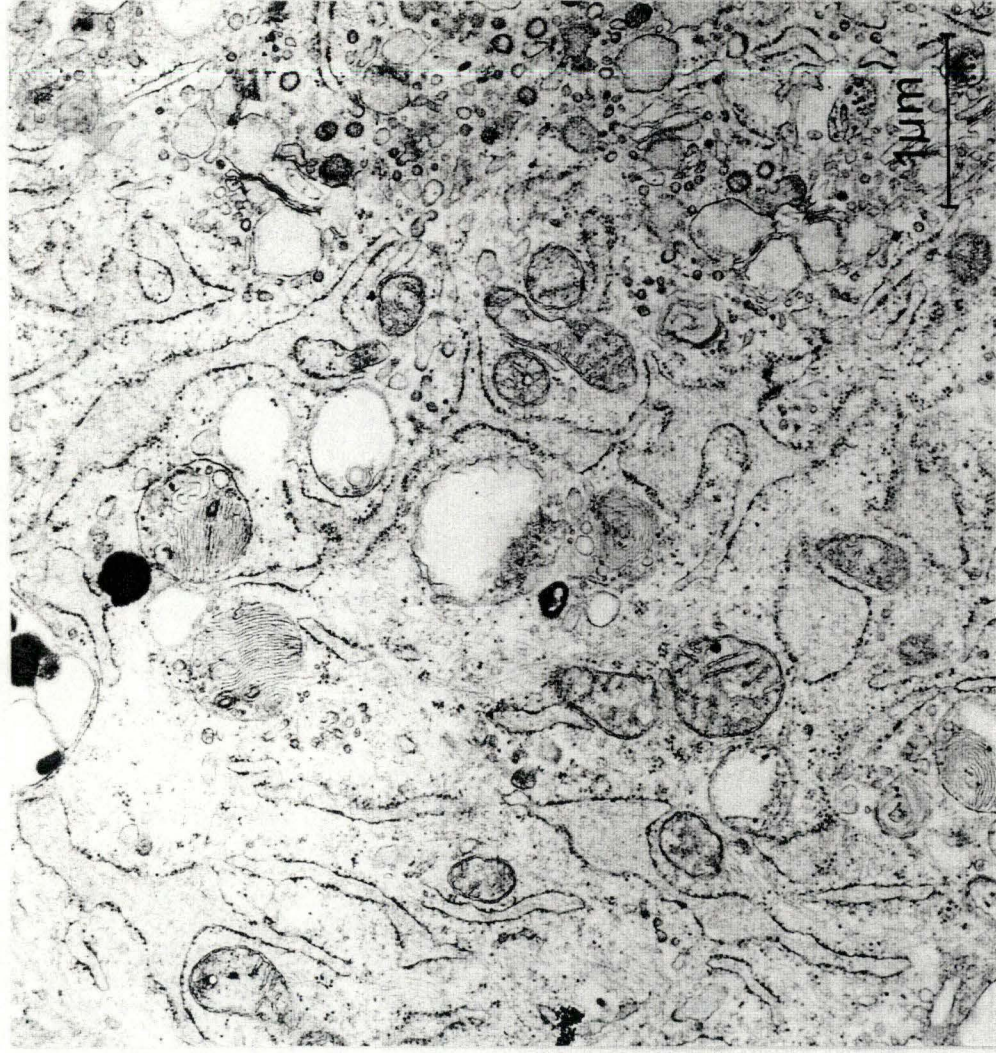
WI : Les lysosomes présentent différents aspects évoquant des stades variés de digestion.

GM et SAN : Les lysosomes sont engorgés par des structures membranaires : résidus indigestes des processus d'autophagie et d'hétérophagie.

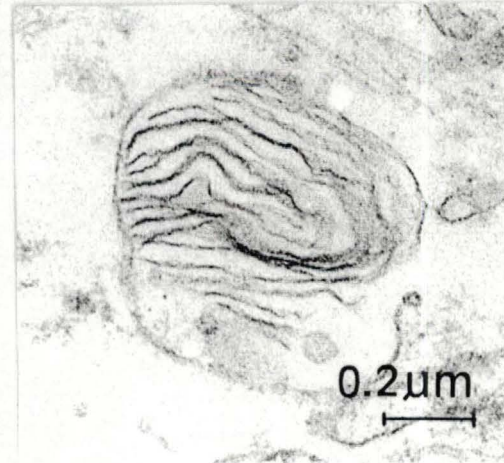
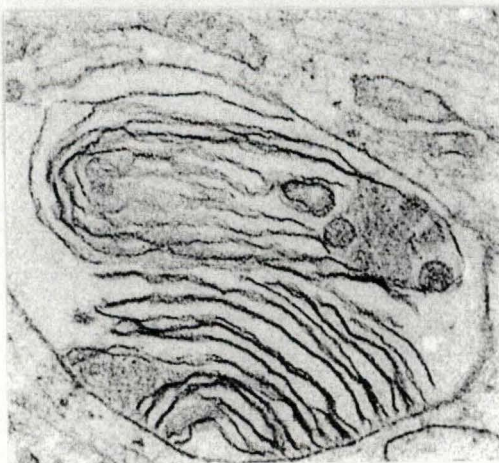
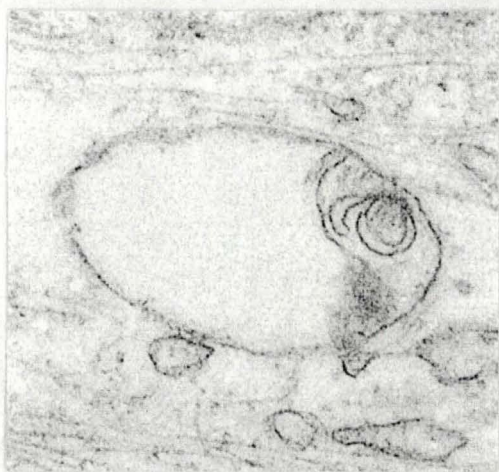
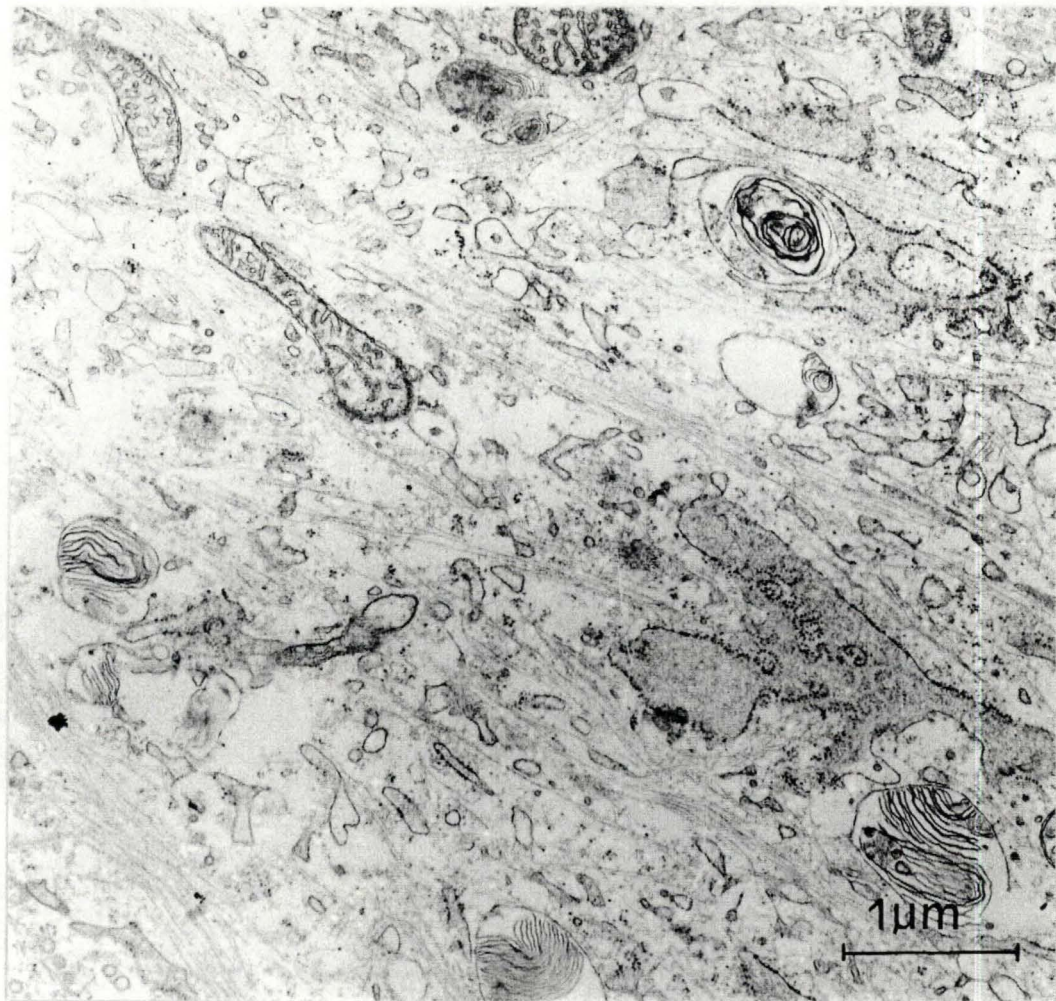
WI



GM



SAN



2^{ème} PARTIE:

Analyse de l'équipement enzymatique des FIBROBLASTES normaux: comparaison avec le FOIE de RAT.

Il nous est apparu intéressant, dans un premier temps, de comparer l'équipement enzymatique des fibroblastes témoins WI-38 avec celui du foie de rat, particulièrement bien documenté.

I.RESULTATS

A. Mesures d'activités spécifiques de marqueurs enzymatiques des différents organites subcellulaires.

Nous avons mesuré, sur des homogénats de foie et de fibroblastes normaux, l'activité spécifique de divers marqueurs enzymatiques. (Tableau R.1). Ces résultats sont exprimés en nmole de substrat dégradé par minute et par mg de protéines c'est-à-dire en activité spécifique.

Nous avons comparé les activités enzymatiques spécifiques des fibroblastes à celles du foie, on observe que pour:

- le réticulum endoplasmique, la NADH cytochrome C réductase et la NADPH cytochrome C réductase présentent des activités spécifiques **semblables**.
- l'appareil de Golgi, une activité spécifique **légèrement plus élevée** de la galactosyl transférase ($\pm 1,5X$).
- la membrane plasmique, des activités spécifiques **plus faibles** de la phosphodiesterase alcaline ($\pm 5,8X$) et la dipeptidyl peptidase IV ($\pm 2,7X$), et **plus élevée** pour la 5'AMPase ($\pm 3,9X$).
- les lysosomes, des activités spécifiques **assez semblables** pour la β -galactosidase, la cathepsine C, l' α -mannosidase.

Comparaison d'activités spécifiques du Foie et des Fibroblastes WI-38

	Foie	Fibroblastes
Reticulum endoplasmique		
NADH-Cyt. C réductase	123 ± 38 n=3	135 ± 3 n=3
NADPH-Cyt. C réductase	21,0 ± 4,2 n=3	13,1 n=1
Appareil de Golgi		
Galactosyltransférase	105 ± 3 n=3	165 ± 13 n=7
Membrane plasmique		
Dipeptidyl peptidase IV	18,5 ± 2,6 n=3	6,8 ± 1,9 n=7
5'-Nucléotidase	39,4 ± 6,4 n=3	153,0 ± 32,3 n=3
Phosphodiesterase alcaline	132 ± 31 n=3	22,7 ± 6,8 n=4
Lysosomes		
β-Galactosidase	1,76 ± 0,55 n=3	2,51 ± 0,10 n=7
Cathepsine C	363 ± 79 n=3	279 ± 72 n=7
α-Mannosidase	0,44 ± 0,14 n=3	0,57 ± 0,28 n=3
N-Acétyle-β-glucosaminidase	4,24 ± 0,28 n=3	52,2 ± 4,0 n=7
α-Neuraminidase	0,026 n=1	0,740 ± 0,053 n=7
Mitochondries		
Cytochrome oxydase	108 ± 8 n=3	10,8 ± 1,2 n=7
Peroxisomes		
Catalase	170 ± 23 n=3	8,2 ± 1,7 n=4

Tableau R.1. Mesures d'activités spécifiques de marqueurs enzymatiques des différents compartiments subcellulaires dans le foie de rat et dans les fibroblastes WI-38. Les activités sont exprimées en mU/mg de protéines. Les valeurs représentent les moyennes de n déterminations accompagnées de l'écart-type.

Et **supérieure** pour la N-acétyl- β -glucosaminidase ($\pm 10X$) et l' α -neuraminidase ($\pm 30X$).

- les mitochondries et les peroxysomes ont, respectivement, une activité spécifique de la cytochrome oxydase et de la catalase **fortement inférieure** ($\pm 10X$) et ($\pm 21X$).

B. Distribution des enzymes de référence après centrifugation fractionnée de l'homogénat.

Pour analyser la distribution subcellulaire d'enzymes de référence, nous avons soumis les homogénats de foie de rat et de fibroblastes à une centrifugation différentielle séparant les fractions N, M, L, P et S.

Les résultats sont repris à la figure R.1a et R.1b, et dans les tableaux Annexe I et II.

Pour le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les lysosomes, les distributions des enzymes de référence sont **semblables** dans le foie et dans les fibroblastes.

- la NADH cytochrome C réductase est distribuée dans les fractions M et P dans les deux cas.
- la galactosyl transférase est retrouvée principalement dans la fraction P.
- l' α -mannosidase, la N-acétyl- β -glucosaminidase, la β -galactosidase, la cathepsine C, l' α -neuraminidase présentent l'activité spécifique relative (ASR) ou purification la plus élevée dans la fraction L. Cependant, l'ASR moyenne atteint une valeur de 9,80 pour le foie alors qu'elle n'est que de 5,56 dans les fibroblastes. Cette différence s'explique par la proportion de protéines plus élevée dans la fraction L des fibroblastes que dans celle du foie.

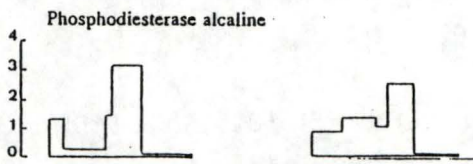
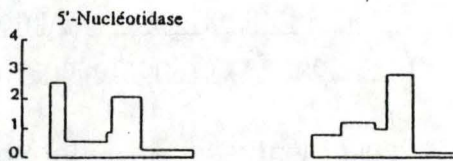
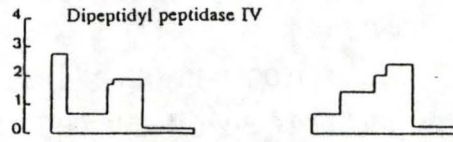
Les enzymes de la membrane plasmique, des mitochondries et des peroxysomes présentent des distributions **différentes** dans les fibroblastes et dans le foie.

- la dipeptidyl peptidase IV est surtout distribuée dans les fractions N, L, et P pour le foie et M, L et P pour les fibroblastes.

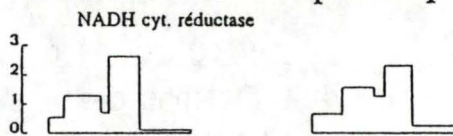
FOIE

WI

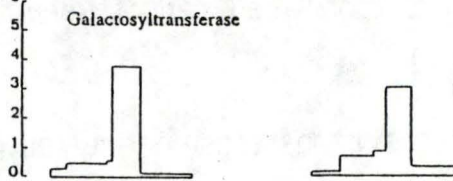
Membrane plasmique



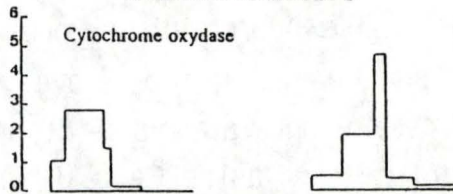
Réticulum endoplasmique



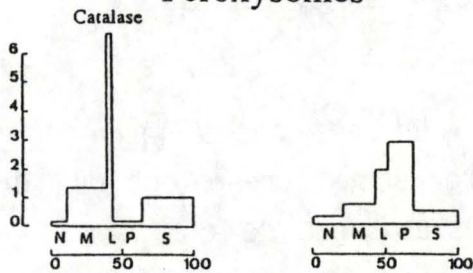
Appareil de Golgi



Mitochondries



Peroxisomes



Activité spécifique relative

Protéines (%)

Fig. R.1.a. Distribution intracellulaire de différents marqueurs enzymatiques après centrifugation différentielle d'homogénats (foie de rat et fibroblastes WI-38). Les résultats représentent les moyennes de trois fractionnements.

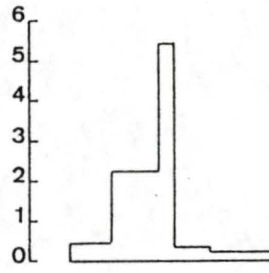
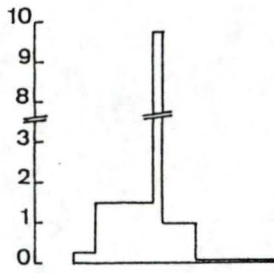
Lysosomes

FOIE

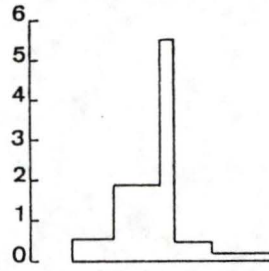
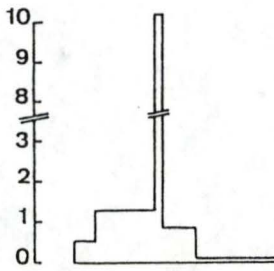
WI

Activité spécifique relative

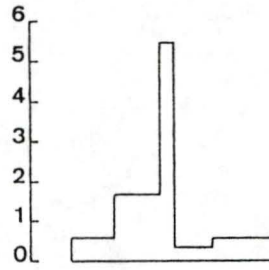
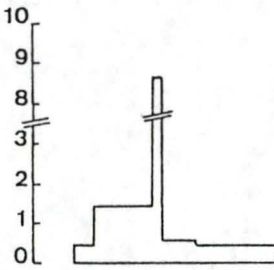
α -Mannosidase



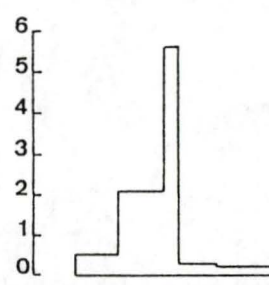
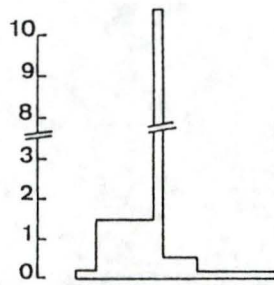
N-Acetyl β -glucosaminidase



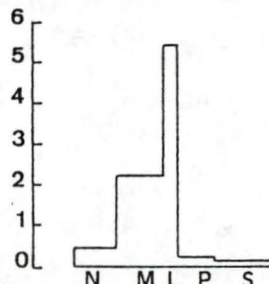
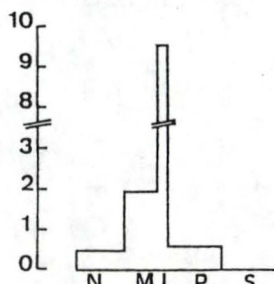
β -Galactosidase



Cathepsine C



α -Neuraminidase



Protéines (%)

Fig. R.1.b. Distribution intracellulaire de différentes enzymes lysosomales après centrifugation différentielle d'homogénats (foie de rat et fibroblastes WI-38). Les résultats représentent les moyennes de trois fractionnements.

- la 5'-nucléotidase et la phosphodiesterase alcaline sont distribuées dans les fractions N et P pour le foie et M et P pour les fibroblastes.
- la cytochrome oxydase, marqueur des mitochondries se retrouve en majeure partie dans la fraction M pour le foie et L pour les fibroblastes.
- la catalase des peroxysomes est distribuée dans les fractions M et L pour le foie et L et P pour les fibroblastes.

II. DISCUSSION

A. Activités spécifiques des marqueurs enzymatiques

Les **cellules hépatiques**, présentent une physiologie fonctionnelle incontestablement différente de celle des fibroblastes.

Le foie participe à la synthèse de protéines de structure et de protéines destinées à être sécrétées, l'albumine, la prothrombine, le fibrinogène; il sécrète la bile; il stocke des métabolites sous forme de graisse et de glycogène et il joue un rôle important dans la néoglycogénèse.

Les **fibroblastes** apparaissent comme les cellules les moins spécialisées du tissu conjonctif. Ils sécrètent une matrice extracellulaire non rigide, riche en collagène de type I et/ou de type III et sont responsables de la synthèse des glycosaminoglycans de la substance fondamentale. Les fibroblastes manifestent une capacité remarquable de différenciation, il est concevable que le tissu conjonctif contienne une mixture de lignées fibroblastiques distinctes, capables de différenciation soit en chondrocytes, soit en cellules osseuses, soit en adipocytes ou encore en cellules musculaires lisses. Les fibroblastes jouent également un rôle dans la réparation des dommages tissulaires en produisant une matrice de collagène au site affecté.

De façon générale, on ne peut pas établir, du moins avec les résultats relativement restreints que nous avons obtenus, de relation entre la physiologie du foie et des fibroblastes.

En ce qui concerne les activités enzymatiques, la différence majeure mise en évidence se situe au niveau de la cytochrome oxydase et de la catalase qui sont nettement moins actives dans les fibroblastes. La morphologie nous apprend qu'effectivement les hépatocytes sont très riches, et en mitochondries, et en peroxysomes, alors que les fibroblastes (voir plus loin) n'en possèdent que peu. Quoi qu'il en soit, il est certain que, pour chaque organite subcellulaire, une ou plusieurs enzymes utilisée(s) comme référence d'organites subcellulaires pour le foie peuvent l'être pour les fibroblastes.

B. Distribution par centrifugation différentielle.

Il ressort que la NADH cytochrome C réductase, la galactosyl transférase et les enzymes des lysosomes se distribuent de façon comparable dans le foie et dans les fibroblastes.

Par rapport au foie, la caractéristique "nucléo-microsomale" de la distribution de la 5'-nucléotidase et de la phosphodiesterase alcaline n'est pas retrouvée dans les homogénats de fibroblastes. Les fragments de membrane plasmique du foie se répartissent en deux populations: ceux qui dérivent du voisinage du canalicule biliaire sédimentent dans la fraction N vu leur organisation et leur complexité, ceux qui dérivent du front sinusoïdal forment de petites vésicules et sédimentent dans la fraction P. C'est dans cette fraction que sédimentent les petites vésicules de la membrane plasmique provenant de cellules en culture.

La cytochrome oxydase, marqueur spécifique des mitochondries, ne présente pas de maximum d'activité dans la fraction M des fibroblastes, ce qui est le cas pour le foie. Ceci laisse supposer que les mitochondries des fibroblastes sont de taille inférieure à celles du foie, ce qui correspond à l'examen morphologique. Le raisonnement proposé pour les mitochondries est applicable aux peroxysomes. La catalase des fibroblastes n'est pas associées aux fractions M et P mais L et P, ce qui suggère l'existence de peroxysomes de petite taille.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Tulkens *et al* (1974) sur fibroblastes d'embryon de rat et de Remacle *et al* (1980) sur fibroblastes WI-38.

Comparaison d'activités spécifiques de Fibroblastes normaux et malades

	WI	GM	SAN
Reticulum endoplasmique			
NADH-Cyt. C réductase	135,3 ± 2,9 100 ± 2 % n=3	165,9 ± 31,4 123 ± 23 % n=3	133,7 99 % n=1
Appareil de Golgi			
Galactosyltransférase	165,2 ± 13,3 100 ± 8 % n=7	220,4 ± 49,0 133 ± 30 % n=7	481,5 ± 37,7 291 ± 23 % n=3
Membrane plasmique			
Dipeptidyl peptidase IV	6,8 ± 1,9 100 ± 28 % n=7	17,2 ± 4,9 253 ± 72 % n=7	6,4 ± 1,5 94 ± 22 % n=3
5'-Nucléotidase	153,0 ± 32,3 100 ± 21 % n=3	204,4 ± 104,7 133 ± 68 % n=3	290,3 ± 67,8 189 ± 44 % n=3
Phosphodiesterase alcaline	22,7 ± 6,8 100 ± 30 % n=7	48,0 ± 13,6 211 ± 60 % n=6	63,3 ± 9,5 279 ± 42 % n=3
Lysosomes			
β-Galactosidase	2,51 ± 0,10 100 ± 4 % n=7	0,63 ± 0,21 25 ± 8 % n=7	0,13 ± 0,04 5,2 ± 1,6 % n=3
Cathepsine C	279 ± 72 100 ± 26 % n=7	35,6 ± 21,8 13 ± 7,8 % n=7	9,4 ± 2,8 3,4 ± 1,0 % n=3
α-Mannosidase	0,57 ± 0,17 100 ± 30 % n=3	0,56 ± 0,08 98 ± 14 % n=3	0,57 ± 0,28 100 ± 49 % n=3
N-Acétyle-β-glucosaminidase	52,2 ± 4,0 100 ± 8 % n=7	75,2 ± 24,4 144 ± 47 % n=5	39,3 ± 3,6 75 ± 7 % n=3
α-Glucosidase acide	100,6 ± 17,6 100 ± 17 % n=4	147,1 ± 45,5 146 ± 45 % n=4	77,8 ± 6,7 77 ± 7 % n=3
α-Neuraminidase	0,740 ± 0,053 100 ± 7 % n=7	non décelable 0 % n=7	non décelable 0 % n=3
Mitochondries			
Cytochrome oxydase	10,75 ± 1,18 100 ± 11 % n=7	10,04 ± 3,05 93 ± 28 % n=7	6,12 ± 0,73 57 ± 7 % n=3
Peroxisomes			
Catalase	8,2 ± 1,7 100 ± 21 % n=4	7,3 ± 0,8 88 ± 10 % n=3	4,4 ± 0,2 55 ± 2,4 % n=3

Tableau R.2. Mesures d'activités spécifiques de marqueurs enzymatiques de différents compartiments subcellulaires. Comparaison des cellules témoins (WI-38) et des cellules malades (GM00806 et SAN). Les activités sont exprimées en mU/mg de protéines. Les valeurs représentent les moyennes de n déterminations accompagnées de l'écart-type. Les pourcentages sont calculés par rapport aux activités des cellules témoins WI-38.

3^{ème} PARTIE:

Etude des activités enzymatiques des fibroblastes provenant de patients atteints de galactosialidose.

Analyse de la distribution subcellulaire de différents marqueurs.

Les fibroblastes provenant de patients atteints de GALACTOSIALIDOSE (GM 00806 et SAN) présentent, comme souligné dans l'introduction, une déficience en α -neuraminidase et en β -galactosidase.

Pour poursuivre notre travail, il était nécessaire de déterminer, non seulement, l'**ampleur** de la déficience combinée en ces deux enzymes, mais également de s'assurer de l'**absence ou de l'existence** d'autres variances enzymatiques. Cette étude s'est accompagnée d'une analyse en centrifugation différentielle en vue de mettre en évidence d'éventuelles modifications du comportement des organites.

I. RESULTATS

A. Détermination des activités spécifiques de marqueurs enzymatiques de différents organites. Comparaison WI, GM et SAN.

Pour chaque souche de fibroblastes, sains et pathologiques, nous avons déterminé les activités spécifiques de marqueurs enzymatiques des différents organites subcellulaires. (Tableau R.2) Pour plus de clarté, nous avons traduit chacune de ces activités en pour-cent par référence au témoin WI-38. (Valeurs reprises dans le Tableau R.1)

D'UNE PART, nous ne distinguons pas de différences majeures d'activité pour la NADH cytochrome C du réticulum endoplasmique, la cytochrome oxydase des mitochondries, la catalase des peroxysomes ainsi que pour certains enzymes des lysosomes: l' α -mannosidase, la N-acétyl- β -glucosaminidase, l' α -glucosidase acide.

Réticulum endoplasmique

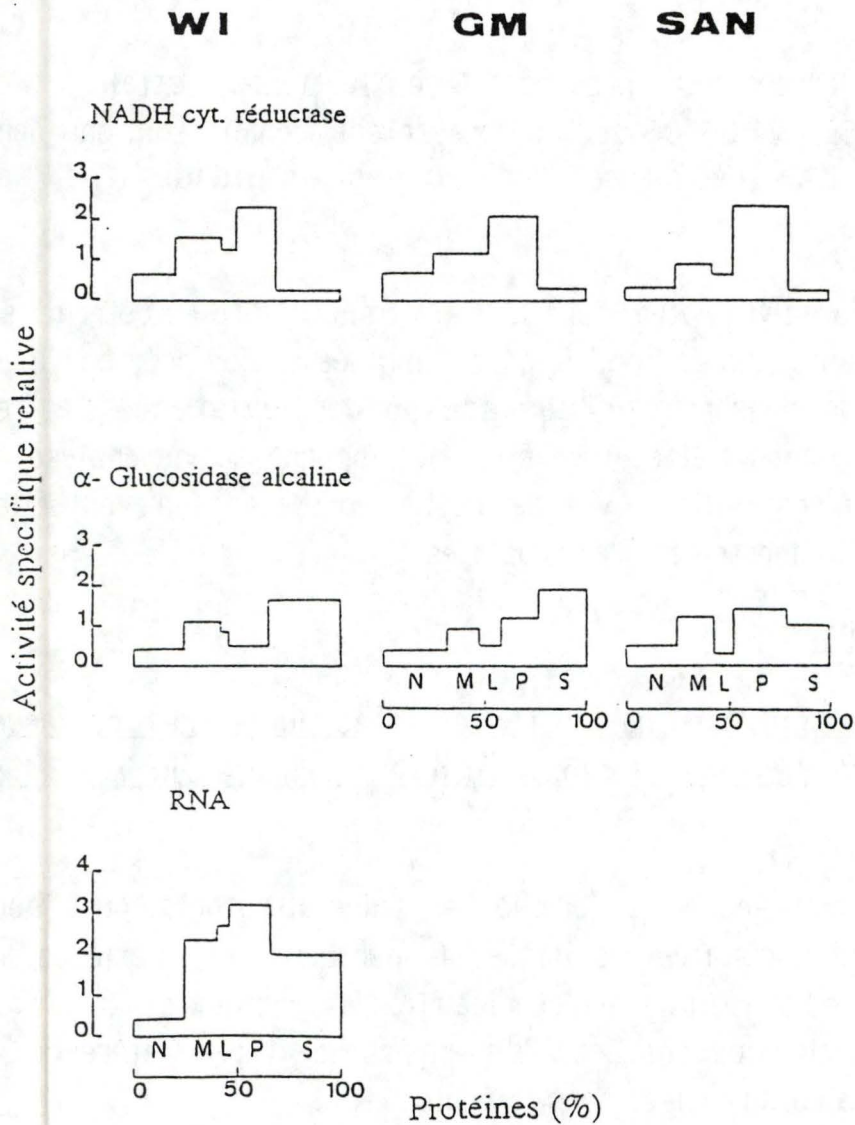


Fig. R.2.a. Distribution intracellulaire de différents marqueurs enzymatiques du réticulum endoplasmique après centrifugation différentielle d'homogénats de fibroblastes témoins (WI-38) et malades (GM00806 & SAN). Les résultats représentent pour les cellules WI-38 et GM, les moyennes de trois fractionnements; et pour les cellules SAN, les valeurs d'un seul fractionnement.

D'autre part, en comparant les données au sein des trois souches cellulaires, nous observons des différences importantes d'activités spécifiques pour les trois compartiments subcellulaires suivants: l'appareil de Golgi, la membrane plasmique et les lysosomes.

1°) L'appareil de Golgi: l'activité spécifique de la **galactosyl transférase** est SUPERIEURE aux témoins dans les cellules malades SAN (291%).

2°) La membrane plasmique:

- dans les cellules malades, la **5'-nucléotidase** et surtout la **phosphodiesterase alcaline** présentent des activités SUPERIEURES aux témoins: pour la 5'-nucléotidase, 133% (GM) et 189% (SAN), pour la phosphodiesterase alcaline, 211% (GM) et 279% (SAN).

- la **dipeptidyl peptidase IV** montre une activité SUPERIEURE pour GM (253%) alors que celle de SAN (94%) est SEMBLABLE aux témoins.

3°) Les lysosomes: comme attendu, la **β -galactosidase** est DEFICIENTE chez les cellules malades: 25% pour GM et 5,2% pour SAN. L' **α -neuraminidase** n'a pu être mise en évidence.

Est inattendu le fait que l'activité de la **cathepsine C** CHUTE CATASTROPHIQUEMENT: 13% pour GM et 3,4% pour SAN.

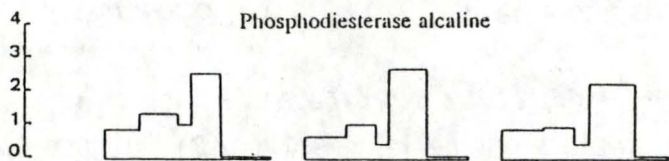
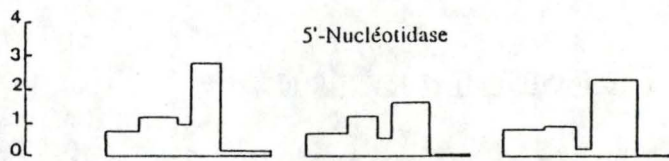
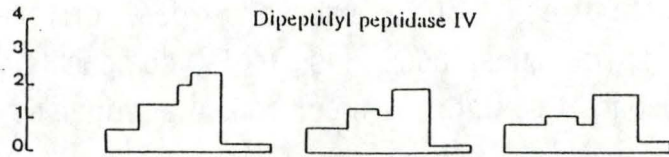
B. Distribution subcellulaire de marqueurs enzymatiques de différents compartiments

Pour chacune des trois souches de fibroblastes, nous avons analysé la distribution en centrifugation différentielle des différents organites subcellulaires.

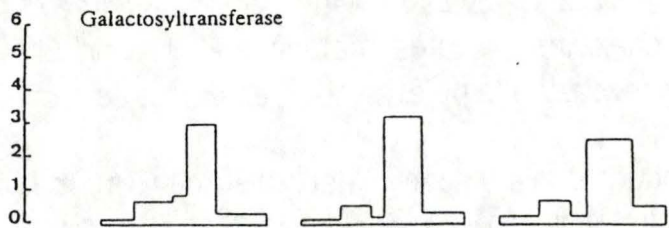
La Figure R.2 (R.2a, R.2b, R.2c) permet de comparer la distribution des enzymes de référence, les résultats sont repris dans les Tableaux Annexe II, III et IV.

WI**GM****SAN**

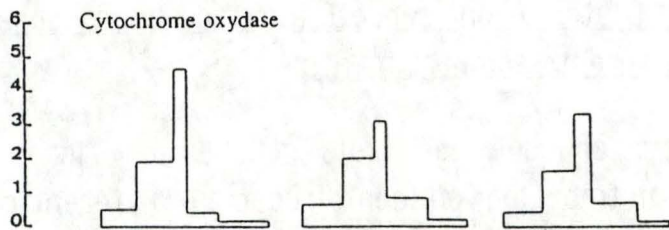
Membrane plasmique



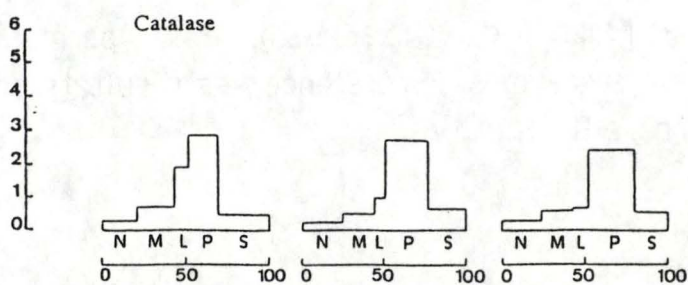
Appareil de Golgi



Mitochondries



Peroxisomes



Activité spécifique relative

Protéines (%)

Fig. R.2.b. Distribution intracellulaire de différents marqueurs enzymatiques après centrifugation différentielle d'homogénats de fibroblastes témoins (WI-38) et malades (GM00806 & SAN). Les résultats représentent pour les cellules WI-38 et GM, les moyennes de trois fractionnements; et pour les cellules SAN, les valeurs d'un seul fractionnement.

Fig. R.2.b. Distribution intracellulaire de différents marqueurs enzymatiques après centrifugation différentielle d'homogénats de fibroblastes témoins (WI-38) et malades (GM00806 & SAN). Les résultats représentent pour les cellules WI-38 et GM, les moyennes de trois fractionnements; et pour les cellules SAN, les valeurs d'un seul fractionnement.

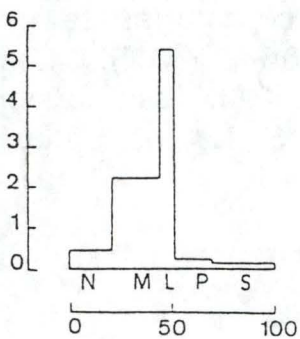
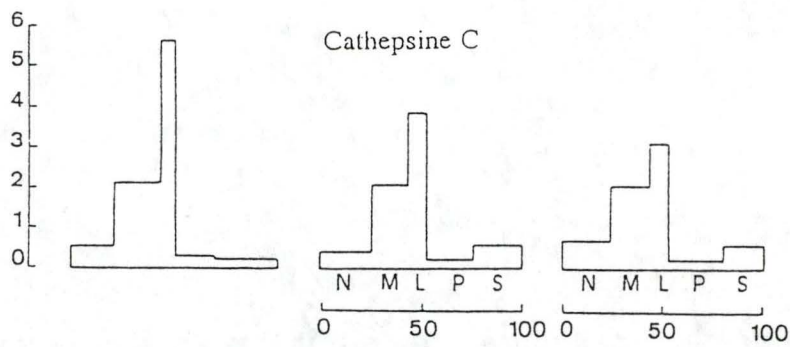
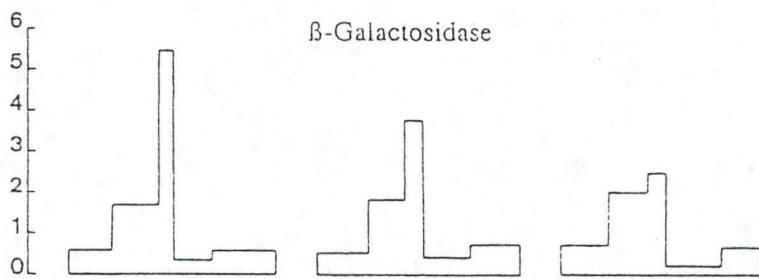
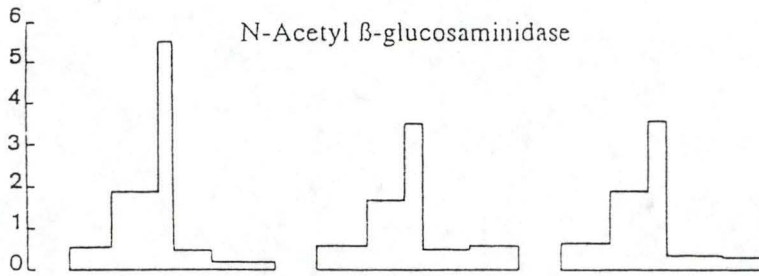
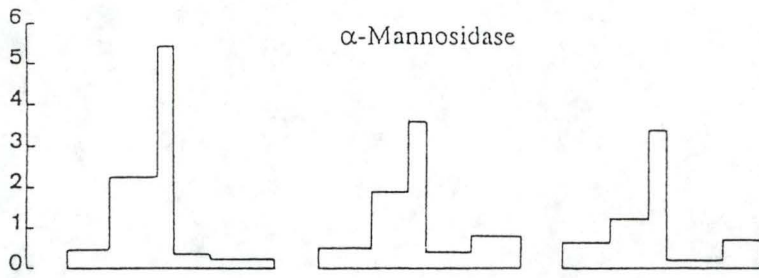
Lysosomes

WI

GM

SAN

Activité spécifique relative



Protéines (%)

Fig. R.2.c. Distribution intracellulaire de différentes enzymes lysosomales après centrifugation différentielle d'homogénats de fibroblastes témoins (WI-38) et malades (GM00806 & SAN). Les résultats représentent pour les cellules WI-38 et GM, les moyennes de trois fractionnements; et pour les cellules SAN, les valeurs d'un seul fractionnement.

Nous ne discernons aucune différence majeure au sein des trois souches de fibroblastes. Nous suggérons donc que la maladie n'engendre pas de modifications de structures subcellulaires suffisamment importantes que pour être révélées par centrifugation différentielle

Cependant, on remarque que la fraction S (Soluble) des cellules malades contient un pourcentage plus élevé d'activité des hydrolases lysosomales que les cellules témoins. Cette observation peut suggérer une fragilité des lysosomes de GM et SAN.

II. DISCUSSION

Quelles significations apporter aux différences observées dans les activités enzymatiques des cellules GM et SAN ?

Pour l'appareil de Golgi et la membrane plasmique:

Les souches pathologiques montrent une augmentation significative des activités des enzymes de l'appareil de Golgi (galactosyl transférase) et celles de la membrane plasmique (5'-nucléotidase, phosphodiesterase alcaline, dipeptidyl peptidase IV).

Ces observations sont comparables à ce qui se passe lors de l'acquisition d'une surcharge intralysosomale en saccharose dans les fibroblastes. Warburton et Wynn (1976) ont démontré les phénomènes consécutifs à cette surcharge. Beaucoup de cellules de mammifères en culture accumulent par pinocytose du saccharose dans leur système lysosomal. Le saccharose ne pouvant être dégradé par les lysosomes dépourvus d'invertase, il persiste dans ces organites. Pour maintenir la balance osmotique entre l'intérieur du lysosome et le cytosol, il y a un afflux d'eau qui provoque une hypertrophie du lysosome. La surcharge du système lysosomal avec du matériel indigeste et la vacuolisation qui s'ensuit, conduisent à une augmentation de l'activité, non seulement de toutes les enzymes lysosomales mais également des enzymes des autres composants du SYSTEME VACUOLAIRE: la membrane plasmique et l'appareil de Golgi.

L'endocytose, qui peut constituer un mécanisme où certaines enzymes de la membrane plasmique sont dégradées, cesse rapidement lors de l'acquisition de la surcharge. Il en résulterait donc une augmentation du taux de ces enzymes. (Warburton et Wynn, 1976)

En ce qui concerne les cellules faisant l'objet de notre travail, la DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV constitue un cas particulier. Seules les cellules GM présentent une augmentation, très franche d'ailleurs, de l'activité de cette peptidase (253%). Saison *et al* (1983) ont identifié la dipeptidyl peptidase IV de fibroblastes humains. Elle est localisée sur la surface externe de la membrane plasmique et outre son rôle enzymatique (clivage spécifique de dipeptides de type Gly-Pro), la dipeptidyl peptidase IV est une glycoprotéine qui intervient dans des phénomènes d'adhésion. Selon Beauvois (1988), il existe des interactions cellule-collagène qui sont indépendantes de liens avec d'autres protéines telles la laminine, ... Piazzini *et al* (1989) suggèrent l'existence d'un lien dipeptidyl peptidase IV-fibronectine jouant un rôle important dans l'assemblage *in vivo* de la matrice extracellulaire.

Pour les lysosomes:

Comme attendu, la β -galactosidase est déficiente dans les cellules provenant de patients atteints de galactosialidose. L'activité résiduelle est de 25% pour GM et de 5,2% pour SAN. Pour rappel, le patient "GM" serait atteint de la forme infantile tardive de la galactosialidose, le bébé "SAN" présentait déjà un stade aigu de la maladie et aurait été atteint de la forme infantile précoce. Il existe donc un **parallélisme évident** entre la **déficience en β -galactosidase** et la **gravité de la maladie**. Ceci est aisément justifiable: la β -galactosidase initie l'hydrolyse des GM1 gangliosides présents essentiellement au niveau du cerveau. Et donc, plus il y a de déficience en β -galactosidase, plus il y a de GM1 gangliosides non dégradés dans les lysosomes et plus la surcharge se traduit par des troubles neurologiques sévères.

L'activité en α -neuraminidase n'a pas pu être détectée chez les cellules GM et SAN. La banque de fibroblastes GM a été réalisée à la génération 12, les expériences sont donc effectuées sur des cellules ayant atteint 20 à 25 passages, or nous disposons d'une valeur d'activité résiduelle de 10% pour des homogénats cellulaires de GM à la génération 7.

Nous pouvons donc émettre deux hypothèses:

1°) Perte de l'activité de l' α -neuraminidase des cellules GM au fil des générations.

2°) L'activité de l' α -neuraminidase serait faible mais son inactivation rapide empêcherait sa détection.

L'observation la **plus surprenante** est la **chute catastrophique** de l'activité de la cathepsine C chez les fibroblastes malades: 13% pour GM et 3,4% pour SAN. Nous retrouvons le même parallélisme que pour la β -galactosidase: la déficience est d'autant plus prononcée que les troubles sont sévères. Ceci est donc une QUATRIEME activité déficiente dans cette maladie.

En effet, Tranchemontagne et ses collaborateurs (1990) ont mis en évidence très récemment la déficience en carboxypeptidase chez des patients atteints de galactosialidose (forme infantile tardive et juvénile).

QUELLES RELATIONS EXISTENT-T-IL ENTRE LA DEFICIENCE COMBINÉE EN α -NEURAMINIDASE / β -GALACTOSIDASE / "PROTECTIVE PROTEIN" ET LE DEFAUT EN CATHEPSINE C?

Cette question n'a pas encore reçu de réponse! La cathepsine C est une dipeptidyl aminopeptidase qui clive des dipeptides contenant le groupe NH_2 terminal. Les seules données dont nous disposons sont celles de d'Agrosa et Callahan (1988). Ces auteurs démontrent que la cathepsine C active *in vitro* l' α -neuraminidase dans le complexe β -galactosidase/ α -neuraminidase / "Protective Protein". Cette stimulation est inhibée par la leupeptine qui est un inhibiteur de protéases à sérine (ou thiol). Ils suggèrent que l'activation *in vitro* de l' α -neuraminidase mime la conversion intralysosomale *in vivo* du précurseur de l' α -neuraminidase en forme mature de l'enzyme.

En centrifugation différentielle, nous ne discernons aucune différence majeure, au sein des trois souches de fibroblastes, dans les distributions des marqueurs du réticulum endoplasmique, du Golgi, de la membrane plasmique, des mitochondries et des peroxysomes.

Nous observons une nette séparation du compartiment lysosomal des autres compartiments: réticulum endoplasmique et appareil de Golgi. Les hydrolases lysosomales présentent, en effet, une activité spécifique relative élevée dans la fraction L.

COMMENTAIRE SUR LE CHOIX D'UN MARQUEUR ENZYMATIQUE DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE (RE)

La NADPH cytochrome C réductase, excellent marqueur du RE dans le foie de rat, n'a pu être utilisée pour les fibroblastes: son activité spécifique est trop faible que pour être aisément mesurée dans les cellules en culture (± 10 fois plus faibles que celle de la NADH cytochrome C réductase).

La NADH cytochrome C réductase, dans le foie de rat, est distribuée dans le RE et dans les mitochondries. Selon Trouet *et al.*, cette enzyme ne présente qu'une faible portion de son activité dans les mitochondries de fibroblastes. Nous avons testé l'effet de la ROTENONE, inhibiteur de l'activité mitochondriale de cette enzyme, et nous n'avons observé aucune diminution de l'activité de la NADH cytochrome C réductase ni aucune modification dans sa distribution.

Nous avons analysé la distribution de l' α -glucosidase alcaline des fibroblastes. Son profil n'est pas représentatif d'un marqueur du RE; elle est principalement localisée dans la fraction soluble.

De même, nous avons étudié la distribution compartimentale du RNA, marqueur du RE rugueux. Son activité spécifique relative est maximale dans la fraction microsomale; sa localisation dans la fraction soluble n'est pas négligeable.

A ce stade des expériences, le choix d'un bon marqueur du réticulum endoplasmique se révèle difficile. L'analyse en gradient isopycniqne permettra de mieux orienter notre choix.

4ème PARTIE:

DISTRIBUTION DE MARQUEURS ENZYMATIQUES APRES CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE DE FRACTIONS MLP ET ML+P EN GRADIENT DE DENSITE EN SACCHAROSE. COMPARAISON WI, GM ET SAN.

Nous avons réalisé des centrifugations isopycniques des fractions sédimentables postnucléaires provenant de fibroblastes WI, GM et SAN selon le schéma proposé par Beaufay *et al.* (1964). Les fractions MLP ou ML+P (voir Mat&Méth) sont déposées sur un gradient de saccharose dont les limites de densité sont 1,09-1,26 g/cm³

I. GRADIENTS ISOPYCNIQUES MLP

RESULTATS ET DISCUSSION

La fraction MLP déposée sur le gradient résulte d'une centrifugation à 3×10^6 g.min de la fraction postnucléaire.

Les médianes obtenues pour chaque organite figurent dans le tableau R.3, les profils de distribution dans la Figure R.3.

1°) Le réticulum endoplasmique (RE)

- pour les trois types de cellules, la *NADH cytochrome C réductase* (Réticulum endoplasmique) montre un profil de distribution très hétérogène. Les densités d'équilibration sont, dans ce cas, impossibles à calculer en raison de cette hétérogénéité.

Tulkens *et al.* (1974) ont réalisé des expériences similaires sur de fibroblastes d'embryon de rat, homogénéisés et fractionnés dans du saccharose 0,25 M contenant 1mM d'E.D.T.A., ce dernier prévenant l'agglutination des particules par le Ca⁺⁺. Dans de telles conditions, la distribution de la *NADH cytochrome C réductase* est unimodale et la densité médiane d'équilibre est de 1,166.

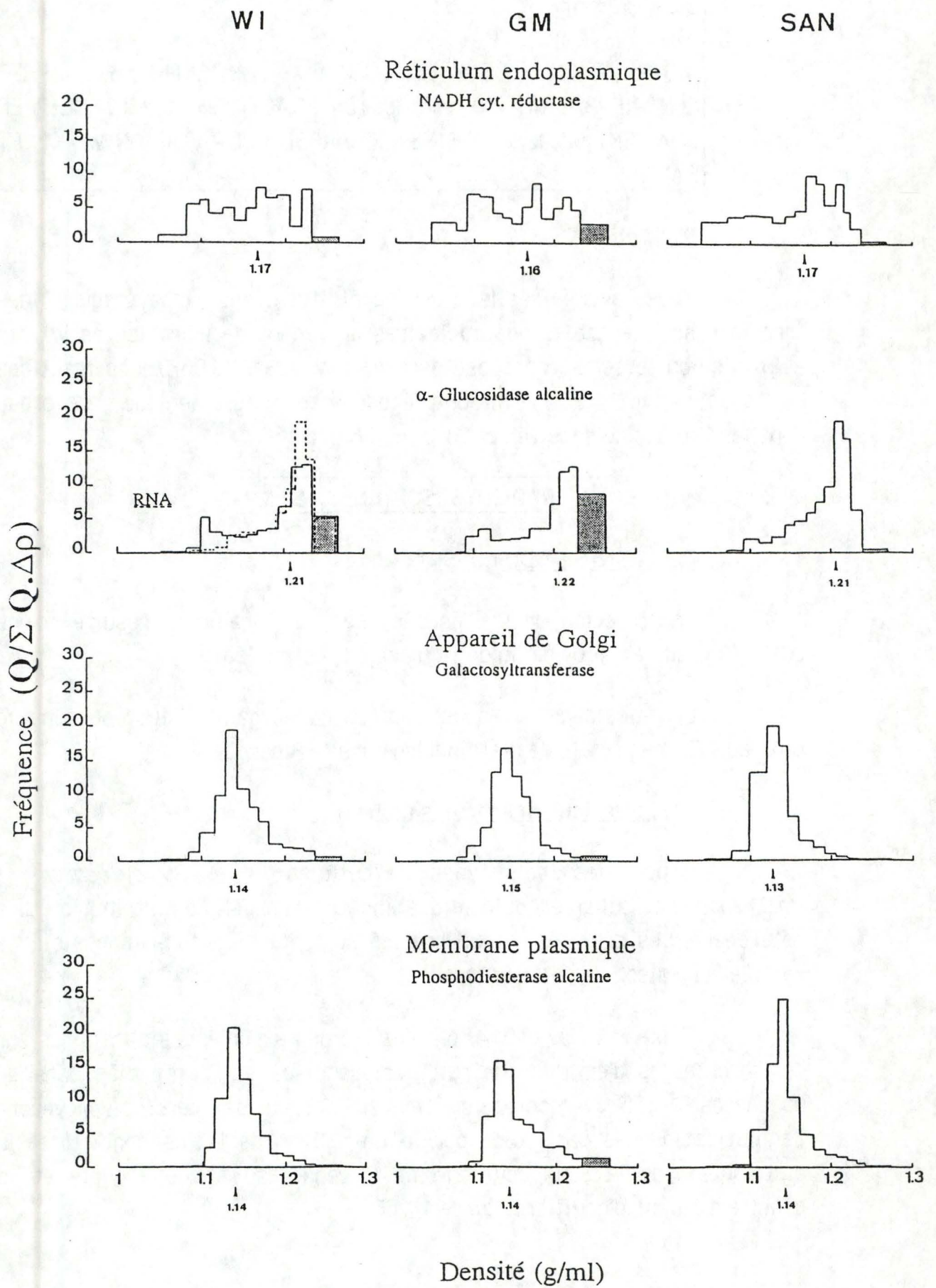


Fig R.3. Distribution de marqueurs enzymatiques des compartiments subcellulaires impliqués dans la biogenèse des lysosomes après centrifugation isopycniqne en gradient de saccharose (1,09–1,26 g/ml) d'une fraction MLP de fibroblastes témoins (WI-38) et malades (GM00806 & SAN). MLP représente la fraction post-nucléaire sédimentée à $3 \cdot 10^6$ g.min. Les flèches indiquent, pour chaque enzyme, la position de la densité médiane d'équilibre.

**Densités médianes en centrifugation isopycnique.
Fraction MLP de fibroblastes.**

WI	GM	SAN
----	----	-----

Reticulum endoplasmique			
NADH-Cyt. C réductase	1,170	1,164	1,166
α -Glucosidase alcaline	1,212	1,223	1,206
RNA	1,220	—	—
Appareil de Golgi			
Galactosyltransférase	1,140	1,145	1,130
Membrane plasmique			
Phosphodiesterase alcaline	1,138	1,143	1,140
Lysosomes			
N-Acétyle- β -glucosaminidase	1,174	1,215	1,201
α -Mannosidase	—	1,223	1,200
α -Glucosidase acide	—	1,223	1,200
β -Galactosidase	1,170	1,212	1,187
Cathepsine C	1,174	1,223	1,200

Tableau R.3. Marqueurs enzymatiques des compartiments subcellulaires impliqués dans la biogenèse des lysosomes : densités médianes après centrifugation isopycnique en gradient de saccharose (1,09–1,26 g/ml) d'une fraction MLP de fibroblastes témoins (WI-38) et malades (GM00806 et SAN). MLP représente la fraction post-nucléaire sédimentée à 3.10^6 g.min.

D'autre part, Remacle *et al* (1980) ont analysé les fibroblastes WI-38, homogénéisés dans les mêmes conditions. Ils décrivent une distribution bimodale de la NADH cytochrome C réductase présentant un premier maximum à une densité de 1,13 g/ml et un second à une densité de 1,16 g/ml. Selon ces auteurs, le second pic correspondrait à la position des mitochondries.

Il n'est peut-être pas impossible que la divergence entre ces résultats et les nôtres résulte de la présence d'EDTA dans les homogénats, celle-ci modifierait les propriétés de sédimentation des éléments du réticulum endoplasmique rugueux.

- l'*α*-glucosidase alcaline se révèle être un excellent marqueur du RE en gradient de densité. Elle présente un même profil de distribution pour les trois souches de cellules avec des densités médianes très voisines: WI: 1,212, GM: 1,223, SAN: 1,206.

- le *RNA*, étudié pour les cellules WI seulement, présente une densité médiane de 1,220. Sa distribution se superpose parfaitement à celle de l'*α*-glucosidase alcaline, ce qui indique une association de l'*α*-glucosidase alcaline particulière au réticulum endoplasmique rugueux.

2°) Le Golgi

- la *galactosyl transférase* offre une distribution et une densité médiane assez semblables pour les trois types cellulaires: WI: 1,140, GM: 1,143, SAN: 1,130.

3°) La membrane plasmique

- la *phosphodiesterase alcaline* montre une distribution et une densité médiane similaires pour les trois types cellulaires: WI: 1,140, GM: 1,145, SAN: 1,130.

4°) Distribution des enzymes lysosomales

La Figure R.4 représente les distributions, le Tableau R.3 reprend les densités médianes obtenues pour la N-acétyl- β -glucosaminidase, l' α -mannosidase, l' α -glucosidase acide, la β -galactosidase, la cathepsine C, l' α -neuraminidase de WI, GM et SAN.

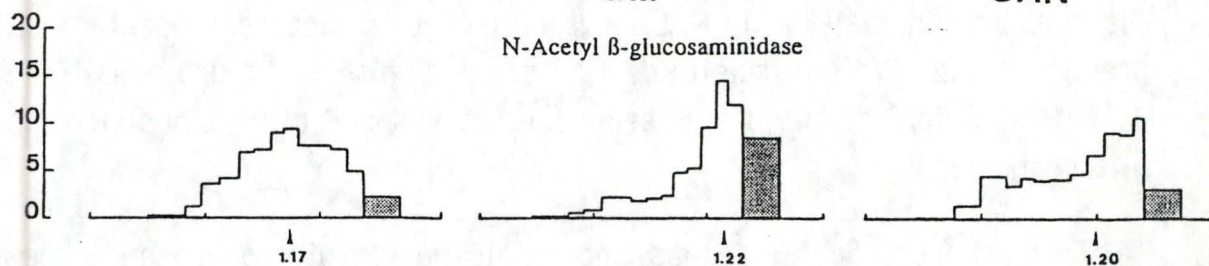
Lysosomes

WI

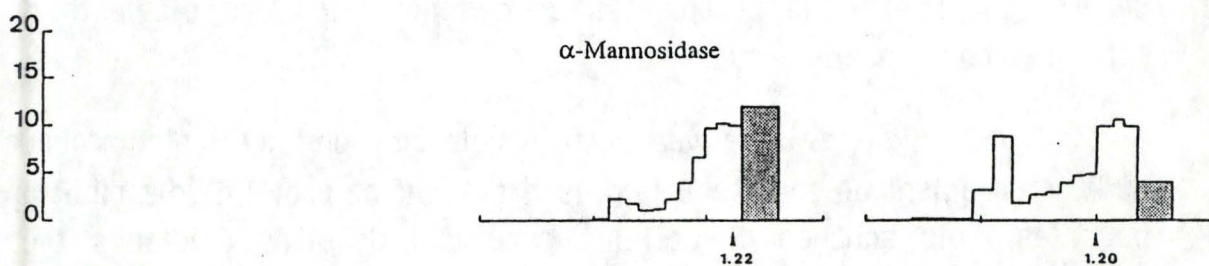
GM

SAN

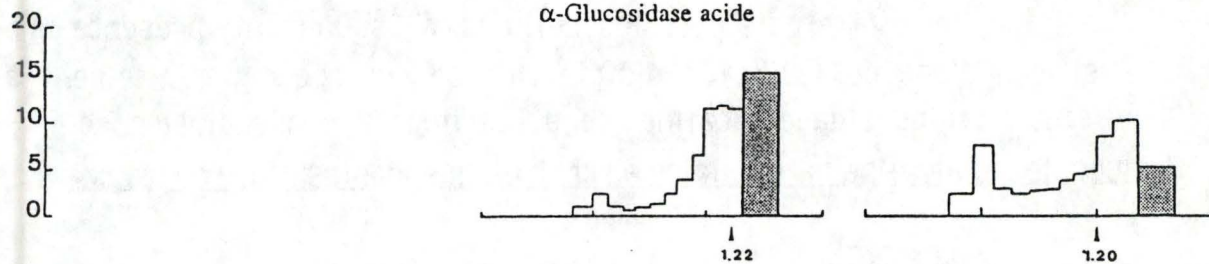
N-Acetyl β -glucosaminidase



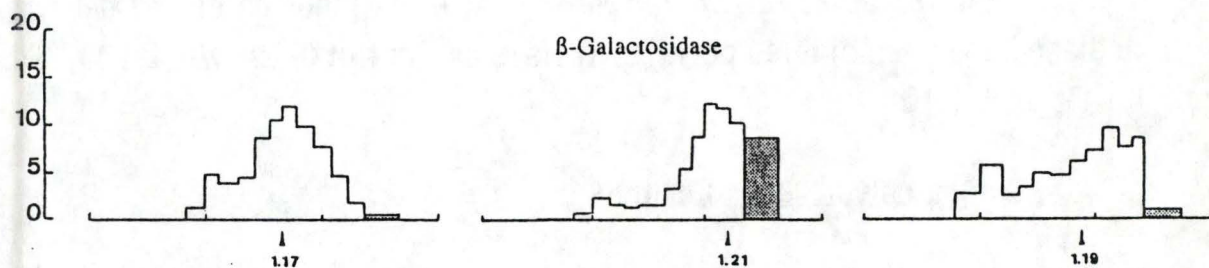
α -Mannosidase



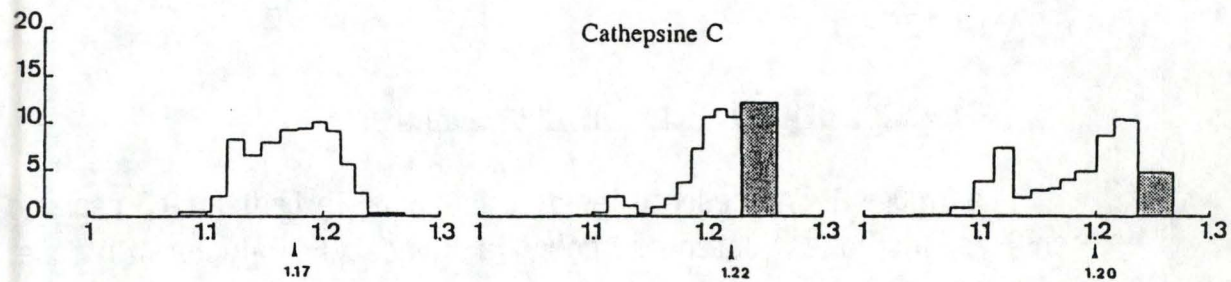
α -Glucosidase acide



β -Galactosidase



Cathepsine C



Densité (g/ml)

Fig R.4. Distribution de différentes enzymes lysosomales après centrifugation isopycniqne en gradient de saccharose (1,09–1,26 g/ml) d'une fraction MLP de fibroblastes témoins (WI-38) et malades (GM00806 & SAN). MLP représente la fraction post-nucléaire sédimentée à $3 \cdot 10^6$ g.min. Les flèches indiquent, pour chaque enzyme, la position de la densité médiane d'équilibre.

Nous observons **trois éléments essentiels**:

1°. Un **shift de la distribution vers des valeurs supérieures** pour les cellules issues de patients atteints de galactosialidose et une densité médiane supérieure chez GM par rapport à SAN. Cette dernière pourrait s'expliquer par l'importante concentration des structures membranaires que nous observons en microscopie électronique.

Chez les WI: le réticulum endoplasmique (α -glucosidase alcaline, RNA) présente une distribution en gradient de densité très nettement différente de celles de l'appareil de Golgi (galactosyl transférase) et des lysosomes (N-acétyl- β -glucosaminidase, l' α -mannosidase, l' α -glucosidase acide, la β -galactosidase, la cathepsine C, l' α -neuraminidase). La fraction postnucléaire, "MLP", permet donc de distinguer de façon satisfaisante le réticulum endoplasmique ($\pm 1,21\text{g/ml}$) des éléments du Golgi ($\pm 1,14\text{g/ml}$) mais non des lysosomes dont la distribution est largement étalée.

Chez les GM et SAN: les distributions des enzymes du réticulum endoplasmique (α -glucosidase alcaline) et des lysosomes se superposent. Par contre, la galactosyl transférase (Golgi) est cette fois individualisée.

2°. Au sein d'une **même souche cellulaire, les enzymes lysosomales sont toutes assez bien superposées**. Nous ne distinguons pas de différence selon qu'il s'agisse d'une hydrolase dont l'activité demeure constante pour les trois types cellulaires ou d'une enzyme présentant une déficience par rapport au témoin.

3°. Il existe des différences entre les cellules WI témoins et les cellules malades: le profil pour les cellules malades est légèrement **bimodal**; une deuxième population d'enzymes lysosomales nettement apparente pour les cellules SAN s'équilibre aux alentours d'une densité de $1,10\text{ g/cm}^3$. Ceci nous a conduit à proposer deux hypothèses:

1- Cette seconde population pourrait être apparentée aux vésicules issues du Golgi. (Rome *et al*, 1979).

2- Il s'agirait d'enzymes lysosomales libérées du lysosome lors des nombreuses manipulations précédant l'obtention de la fraction MLP.

**Densités médianes en centrifugation isopycnique.
Fraction ML + P de fibroblastes.**

	WI	GM	SAN
N-Acétyle-β-glucosaminidase	1,210	1,220	1,218
α-Mannosidase	1,211	1,221	1,209
α-Glucosidase acide	1,211	1,221	1,212
β-Galactosidase	1,211	1,215	1,204
Cathepsine C	1,208	1,217	1,208

Tableau R.4. Densités médianes des enzymes lysosomales après centrifugation isopycnique en gradient de saccharose (1,09–1,26 g/ml) d'une fraction ML + P de fibroblastes témoins (WI-38) et malades (GM00806 et SAN). ML + P représente le cumul des fractions post-nucléaires ML et P sédimentées respectivement à 250 000 et 3.10⁶ g.min.

Les lysosomes des cellules GM et SAN auraient une résistance mécanique moindre.

Cette seconde hypothèse a été testée en modifiant les conditions expérimentales.

II. GRADIENTS ISOPYCNIQUES ML + P

RESULTATS ET DISCUSSION

Lorsqu'on prépare une fraction postnucléaire totale MLP, tous les organites, dont les lysosomes, sont soumis à une centrifugation à 39.000 RPM pendant ± 30 minutes. Si l'on prépare une fraction ML+P, un premier culot ML contenant la majorité des lysosomes est obtenu après centrifugation à 250.000 g.min, un deuxième culot P par une centrifugation à 3.000.000 g.min. Les deux culots ainsi obtenus sont additionnés. De ce fait, la pression hydrostatique à laquelle sont soumis les lysosomes est inférieure à celle qui s'exerce dans le cas d'une fraction "MLP".

Les résultats de la distribution des enzymes lysosomales sont repris dans la figure R.5 et le tableau R.4.

Les densités médianes obtenues dans l'étude de la distribution des enzymes lysosomales des cellules GM et SAN sont semblables à celles obtenues en gradient isopycnique issu d'une fraction MLP. Les différences observées sont faibles par rapport au schéma expérimental précédent.

CEPENDANT, nous observons une modification importante en ce qui concerne les cellules WI. La distribution des hydrolases lysosomales montre une densité médiane qui est nettement supérieure à celle obtenue pour une fraction MLP. La densité médiane est de 1,21 g/ml pour une fraction ML + P au lieu de 1,17 g/ml pour une fraction MLP.

La différence majeure entre une fraction MLP et ML+P est la pression hydrostatique à laquelle sont soumis les granules contenus dans ces fractions. Or, les travaux effectués par Wattiaux *et al* (1973) montrent que les mitochondries peuvent subir des sérieuses modifications quand elles sont soumises à une vitesse de centrifugation trop élevée.

Lysosomes

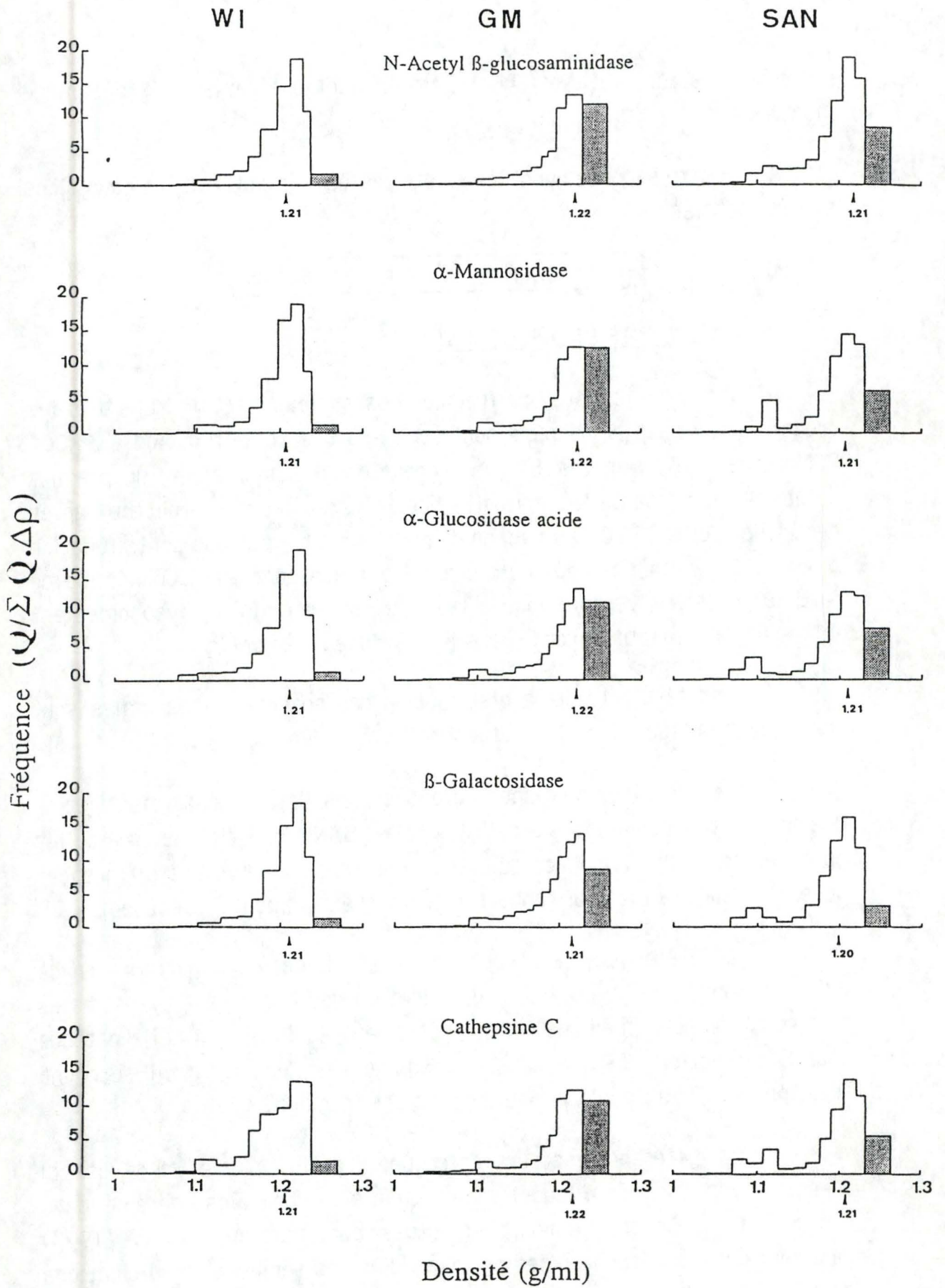


Fig R.5. Distribution de différentes enzymes lysosomales après centrifugation isopycniqne en gradient de saccharose (1,09–1,26 g/ml) d'une fraction ML + P de fibroblastes témoins (WI-38) et malades (GM00806 & SAN). ML + P représente le cumul des fractions post-nucléaires ML et P sédimentées respectivement à 250 000 et $3 \cdot 10^6$ g.min. Les flèches indiquent, pour chaque enzyme, la position de la densité médiane d'équilibre.

Il semble que la pression hydrostatique puisse modifier la membrane de telle sorte qu'elle devienne perméable. D'autre part, lorsqu'une préparation de lysosomes est soumise à une vitesse de centrifugation de 65.000 RPM, on constate une élévation de l'activité libre de certaines hydrolases lysosomales ce qui traduit également une altération de leur membrane. Le fait marquant est que seuls les lysosomes des fibroblastes témoins (WI) sont affectés par le mode de préparation de la fraction MLP et ML+P et non les lysosomes des cellules GM et SAN. Il semblerait donc que les lysosomes des cellules GM et SAN aient une résistance membranaire identique quels que soient les modes de préparation MLP ou ML+P.

Nous ne pouvons pas exclure qu' au cours de la culture cellulaire une altération des fibroblastes WI-38 se soit produite. Cependant, aucune des analyses biochimiques que nous avons effectuées ne confirme cette hypothèse

Pour les cellules WI, les dépôts des fractions MLP et ML+P permettent de séparer respectivement le réticulum endoplasmique du Golgi et le Golgi des lysosomes. La combinaison de ces deux types de gradients est avantageuse dans le cas de l'étude de la biogenèse des enzymes lysosomales.

On peut penser que le dépôt d'une fraction ML+P en gradient de densité en saccharose permettrait, pour les cellules WI, une séparation nette de deux compartiments de la biosynthèse des enzymes lysosomales: le Golgi et les lysosomes. Et donc, la réalisation des deux types de gradients permettrait la séparation des trois compartiment principaux de la biosynthèse: réticulum endoplasmique, Golgi et lysosomes.

Effet de la leupeptine

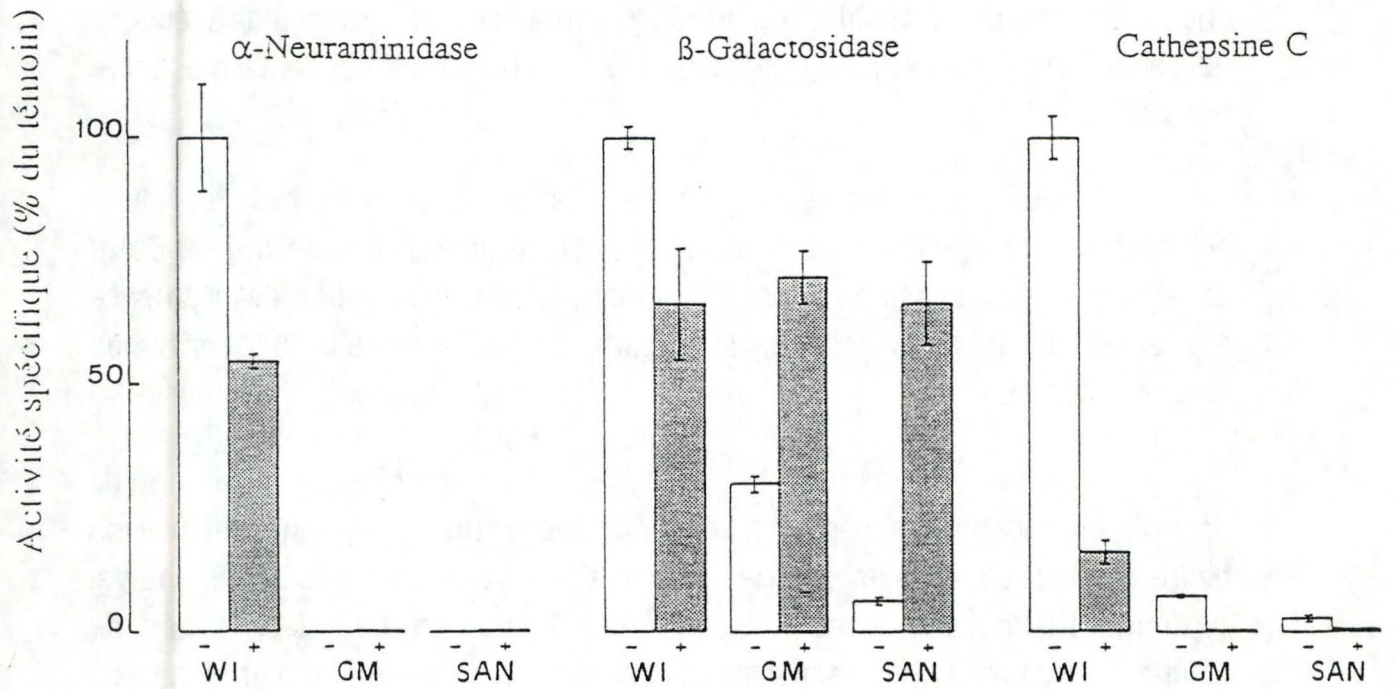


Fig. R.6. Effet de la composition du milieu de culture sur le contenu enzymatique des fibroblastes : effet de la leupeptine. Les cellules sont cultivées durant 6 jours dans le milieu MEM complet additionné (+) ou non (-) de leupeptine (10 μ g/ml). Les activités spécifiques des enzymes sont représentées en pour-cent de celles des cellules témoins (WI-38). Les valeurs représentent les moyennes de quatre déterminations accompagnées de l'écart-type.

5^{ème} PARTIE:

"RESTAURATION" D'ACTIVITES ENZYMATIQUES: MODIFICATIONS
DES CONDITIONS DE CULTURE

I. EFFET DE LA LEUPEPTINE

Une déficience de l'activité en β -galactosidase peut résulter d'une diminution de sa synthèse ou d'une augmentation de la dégradation de l'enzyme.

La LEUPEPTINE est un inhibiteur compétitif des sérine- et thiol-protéases. (D'Agrosa et Callahan, 1988) Additionnée au milieu de culture, elle est décrite comme protégeant l'activité de la β -galactosidase de diverses souches déficientes. (Palmeri *et al*, 1986)

Nous avons donc modifié les conditions expérimentales de culture avec pour but d'analyser les conséquences de la présence de leupeptine sur les activités d'enzymes déficientes chez les cellules malades. Nous disposons d'une part, de cellules témoins (-), WI, GM ou SAN, contenant uniquement du milieu MEM complet, d'autre part, de boîtes de fibroblastes (+), WI, GM ou SAN, où 10 μ g/ml de leupeptine ont été additionnés au milieu MEM complet. L'expérience a été conduite pendant 6 jours pour les trois souches cellulaires.

A. RESULTATS

L' "effet leupeptine" sur l'activité spécifique des enzymes déficientes chez les cellules malades est représenté à la Figure R.6, les résultats sont repris dans le Tableau R.5. Toutes les activités spécifiques sont calculées en **unités d'activité enzymatique par milligramme de protéines** et exprimées en pour-cent par rapport au témoin WI.

Action de la leupeptine sur le contenu en protéines et en ADN.

La leupeptine, inhibiteur de protéases, influence de façon positive la quantité de protéines présente par boîte de culture.

Effet de la composition du milieu de culture sur le contenu enzymatique des fibroblastes.

Effet de la Leupeptine

Enzyme	WI —	WI +	GM —	GM +	SAN —	SAN +
α-Neuraminidase (n=4)	0,768 ± 0,086 100 ± 11,2 %	0,417 ± 0,013 54,3 ± 1,7 %	non décelable	non décelable	non décelable	non décelable
β-Galactosidase (n=4)	2,53 ± 0,06 100 ± 2,5 %	1,67 ± 0,29 66,2 ± 11,6 %	0,757 ± 0,042 30,0 ± 1,7 %	1,812 ± 0,134 71,8 ± 5,3 %	0,156 ± 0,018 6,2 ± 0,7 %	1,670 ± 0,214 66,2 ± 8,5 %
Cathepsine C (n=4)	296 ± 14 100 ± 4,7 %	49,2 ± 7,8 16,6 ± 2,6 %	21,4 ± 0,5 7,2 ± 0,2 %	2,0 ± 1,5 0,7 ± 0,5 %	8,0 ± 1,8 2,7 ± 0,6 %	1,9 ± 0,8 0,6 ± 0,3 %
Galactosyltransférase (n=4)	165 ± 13 100 ± 8,1 %	136 ± 16 82,5 ± 9,9 %	240 ± 26 145,0 ± 15,4 %	159 ± 23 96,3 ± 13,7 %	500 ± 28 302,7 ± 17,0 %	475 ± 78 287,5 ± 47,3 %
Dipeptidyl peptidase IV (n=4)	7,1 ± 0,9 100 ± 12,7 %	6,2 ± 1,0 87,3 ± 13,7 %	14,2 ± 3,3 200,0 ± 46,5 %	20,0 ± 3,7 281,7 ± 52,1 %	5,6 ± 0,5 78,9 ± 6,8 %	16,1 ± 0,4 226,8 ± 5,0 %
Protéines (mg/boîte de culture) (n=4)	1,04 ± 0,30	1,54 ± 0,46	0,78 ± 0,22	1,29 ± 0,52	0,95 ± 0,07	1,16 ± 0,09
DNA (µg/boîte de culture) (n=2)	27,2	30,8	16,7	14,1	—	—

Tableau R.5. Les cellules sont cultivées durant 6 jours dans le milieu MEM complet additionné (+) ou non (–) de leupeptine (10 µg/ml). Les activités enzymatiques sont exprimées en mU/mg de protéines. Les valeurs représentent les moyennes de n déterminations accompagnées de l'écart-type. Les pourcentages sont calculés par rapport aux activités des cellules témoins WI-38. Les mesures de protéines et de DNA sont rapportées à une boîte de culture.

En moyenne la quantité de protéines par boîte est multipliée par un facteur 1,2 à 1,5. Le contenu en ADN par contre n'est quasi pas modifié.

Effet de la leupeptine sur l'activité spécifique de l' α -neuraminidase:

- elle diminue chez les fibroblastes WI(+) (54,3%)
- elle n'est pas détectée chez les cellules malades en absence ou présence de leupeptine.

Effet de la leupeptine sur l'activité de la β -galactosidase

- elle diminue chez les fibroblastes WI(+), l'activité spécifique résiduelle est égale à 66,22%.
- elle augmente chez les cellules malades et atteint l'activité résiduelle des WI(+): GM: 71,72%, SAN: 66,15.

Effet de la leupeptine sur l'activité résiduelle de la cathepsine C

- elle diminue fortement chez les WI(+), l'activité spécifique résiduelle est égale à 16,58%.
- elle est quasi inexistante chez les cellules malades: GM: 0,6%, SAN: 0,64%.

L' "effet leupeptine" sur les activités spécifiques d'enzymes non déficientes chez les cellules malades: la galactosyl transférase et la dipeptidyl peptidase IV: (Tableau R.5)

- la leupeptine provoque une diminution légère de l'activité spécifique de la galactosyl transférase chez les trois souches de fibroblastes.
- l'activité spécifique de la dipeptidyl peptidase IV est augmentée chez les cellules malades.

A. DISCUSSION

En ce qui concerne la β -Galactosidase

Nous observons sous l'action de la leupeptine une diminution de l'activité spécifique de la β -galactosidase chez les WI(+). En vérité, il s'agit d'une diminution apparente due à une augmentation du rapport Protéines/ADN. En effet, la leupeptine inhibe l'hydrolyse normale des protéines mais ne stimule pas la synthèse de celles-ci, ni la croissance cellulaire, ni donc la quantité d'ADN.

Dès lors nous nous trouvons en présence d'une restauration complète de l'activité de la β -galactosidase chez les cellules malades. La leupeptine a multiplié respectivement par 2,4 et par 10,7 l'activité β -galactosidasique des fibroblastes GM et SAN.

Selon d'Azzo *et al*, l'addition de leupeptine à des cellules α -neu⁻/ β -gal⁻ résulte en une augmentation du précurseur de la β -galactosidase (85 kD) et de sa forme mature (64 kD). Cela suggère donc que la synthèse de l'enzyme est NORMALE chez les cellules malades mais qu'il y aurait une dégradation exagérée de la β -galactosidase par des protéases intralysosomales.

En présence de leupeptine, les trois souches de fibroblastes possèdent une même activité en β -galactosidase, indicatrice d'une même **capacité de synthèse**

En ce qui concerne l' α -neuraminidase

L'action de la leupeptine ne stimule pas l'activité de l' α -neuraminidase chez les cellules GM et SAN. La cause de la déficience est donc différente.

En ce qui concerne la cathepsine C

La diminution dans les trois souches de fibroblastes de l'activité de la cathepsine C, s'explique aisément par la présence de leupeptine inhibiteur des thiol-protéases et donc de l'enzyme.

Effet du saccharose

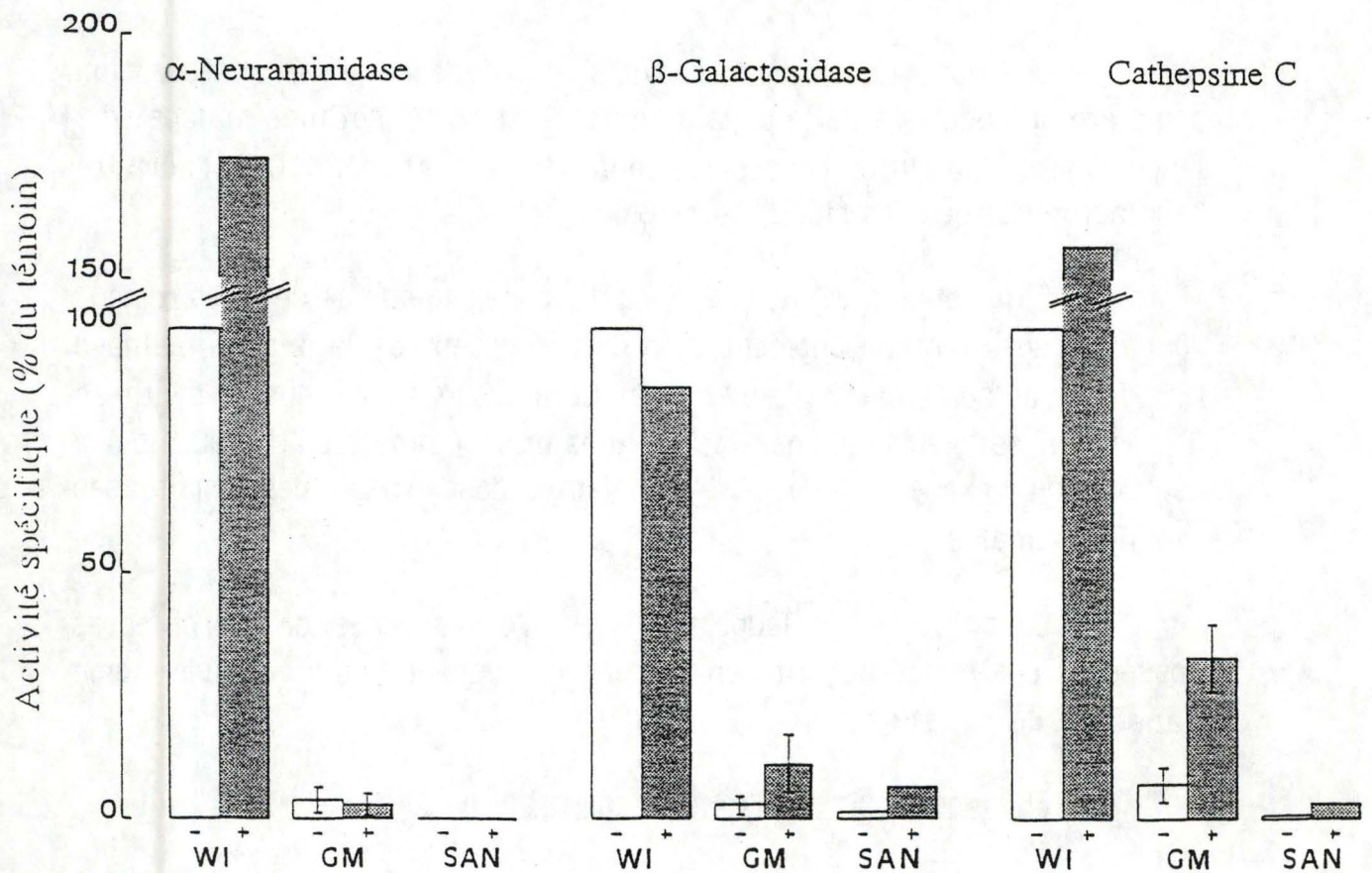


Fig. R.7. Effet de la composition du milieu de culture sur le contenu enzymatique des fibroblastes : effet du saccharose. Les cellules sont cultivées durant 10 jours dans le milieu MEM complet additionné (+) ou non (-) de saccharose 100 mmol/l. Les activités spécifiques des enzymes sont représentées en pour-cent de celles des cellules témoins (WI-38). Les valeurs représentent les moyennes de deux déterminations (WI & SAN), ou quatre accompagnées de l'écart-type (GM)..

En ce qui concerne la dipeptidyl peptidase IV

La leupeptine induit une augmentation de l'activité de la dipeptidyl peptidase IV chez les cellules malades, cet inhibiteur des sérine- et thiol-protéases pourrait diminuer le turn over habituel de la membrane plasmique et donc provoquer une augmentation de la dipeptidyl peptidase IV.

II. EFFET DU SACCHAROSE

L'addition de saccharose au milieu de culture induit une hyperactivité de nombreuses enzymes appartenant aux organites du système VACUOLAIRE: l'appareil de Golgi, les lysosomes et la membrane plasmique. (Kato *et al.*, 1984) Les premières expériences positives concernant les cellules malades ont été réalisées sur des cellules provenant de patients atteints de I-Cell Disease. Cependant, dans certaines maladies telles que la GM1 gangliosidose, la mannosidose et la maladie de Sandhoff, la surcharge en saccharose n'induit aucune synthèse d'hydrolase dont l'activité est déficiente. (Kato *et al.*, 1982)

Nous avons appliqué ce schéma expérimental aux cellules GM et SAN. Du saccharose 100 mM a été additionné au milieu de culture des trois souches de fibroblastes; le milieu est demeuré inchangé pendant 10 jours. Sur des homogénats cellulaires, nous avons mesuré l'activité enzymatique de l' α -neuraminidase, la β -galactosidase et la cathepsine C.

A. RESULTATS

Les résultats sont représentés dans la Figure R.7 et repris dans le tableau R.6. Toutes les valeurs sont estimées en pour-cent par rapport aux témoins.

Effet du saccharose sur l'activité spécifique de l' α -neuraminidase

- il augmente l'activité des cellules WI (X 1,75).
- il n'induit pas d'élévation de l'activité pour les cellules GM et aucune activité de cette enzyme n'est observée pour SAN en présence comme en absence de saccharose.

**Effet de la composition du milieu de culture sur le contenu enzymatique des fibroblastes.
Effet du Saccharose**

Enzyme	WI	WI	GM	GM	SAN	SAN
	—	+	—	+	—	+
α-Neuraminidase	70,5	124	2,8 ± 1,8	2,0 ± 1,8	non décelable	non décelable
	100 %	175,8 %	4,0 ± 2,6 %	2,8 ± 2,6 %		
β-Galactosidase	6,8	5,98	0,227 ± 0,122	0,766 ± 0,402	0,154	0,450
	100 %	87,9 %	3,3 ± 1,8 %	11,3 ± 5,9 %	1,8 %	6,6 %
Cathepsine C	526	827	39,5 ± 11,7	174 ± 35	5,5	17
	100 %	157 %	7,5 ± 3,4 %	33,1 ± 6,7 %	1,04 %	3,2 %

Tableau R.6. Les cellules sont cultivées durant dix jours dans le milieu MEM complet additionné (+) ou non (–) de saccharose 100 mmol/l. Les activités spécifiques de l'α-neuraminidase sont exprimées en pmol/min.mg de protéines; les activités de la β-galactosidase et de la cathepsine C sont exprimées en nmol/min.mg de protéines. Les pourcentages sont calculés par rapport aux activités des cellules témoins WI-38.

Effet du saccharose sur la β -galactosidase

- il ne modifie pas de façon apparente l'activité chez les WI (87%).
- il induit une forte augmentation de l'activité chez les GM et SAN (X 3,4 et X 3,6 respectivement)

Effet du saccharose sur l'activité de la cathepsine C

- il provoque une augmentation de l'activité chez les WI (X 1,9).
- il induit une forte augmentation de l'activité chez GM et SAN (X 4,4 et X 3,1 respectivement).

Nous observons donc que le saccharose induit plus fortement les enzymes déficientes chez les cellules malades que ces mêmes enzymes chez les cellules saines.

B. DISCUSSION

Le saccharose est capable de restaurer PARTIELLEMENT l'activité de la β -galactosidase et de la cathepsine C chez GM et SAN.

Le mécanisme de l'INDUCTION des activités des hydrolases lysosomales par la surcharge en saccharose est encore controversé. Kato *et al.*, (1984) se sont interrogés sur ce mécanisme dans l'étude de la I-Cell Disease, affection caractérisée par la déficience en glycoprotéine N-acétylglucosaminyl phosphotransférase, enzyme impliquée dans l'élaboration du signal de mannose-6-phosphate des enzymes lysosomales. Ces auteurs avaient émis l'hypothèse que la normalisation de l'activité enzymatique pourrait être due à l'endocytose d'enzymes préalablement sécrétées dans le milieu. Or, lorsqu'on ajoute dans la culture du mannose-6-phosphate, inhibiteur compétitif de l'endocytose médiée par récepteur mannose-6-phosphate, on n'observe aucun blocage de la stimulation enzymatique provoquée par le saccharose. Ces résultats montrent donc que le FACTEUR STIMULATEUR est l'accumulation de saccharose localisé dans les lysosomes, ce qui constituerait le facteur nécessaire à l'induction d'activités enzymatiques intralysosomales.

III. EFFET DU MILIEU WI.

Le milieu de culture des fibroblastes contient les produits de sécrétion, entre autres des enzymes lysosomales libérées. (Von Figura, 1978) Les enzymes libérées peuvent demeurer dans le milieu ou retourner dans l'appareil lysosomal des cellules par ENDOCYTOSE adsorptive. La quantité d'enzymes lysosomales extracellulaires résulte du bilan sécrétion (ou exocytose)/endocytose.

Deux phénomènes contribuent à cette libération:

1°. Le modèle "Sécrétion-Recapture" implique la libération d'enzymes à un stade **pré-lysosomal**. Les enzymes, équipées d'un récepteur mannose-6-phosphate sont sécrétées (en faible quantité, cfr introduction) dans le milieu extracellulaire; ultérieurement, sont recaptées par endocytose médiée par récepteur et dirigées vers les lysosomes.

2°. L'EXOCYTOSE du contenu **lysosomal** libère dans le milieu extracellulaire des enzymes lysosomales. (Halley *et al.*, 1978)

Les enzymes libérées constituent une source enzymatique potentielle dans la correction métabolique de défauts génétiques. Dans des maladies de surcharge lysosomale, l'enzyme déficiente pourrait être remplacée.

Dans le but d'étudier l'effet du milieu WI sur les cellules malades GM et SAN, nous avons d'abord mesuré différentes activités enzymatiques présentes dans ce milieu.

A. RESULTATS

1. Mesure d'activités enzymatiques dans le milieu de culture des fibroblastes WI.

Ont été mesurées les activités de: l' α -mannosidase, la N-acétyl β -glucosaminidase, la β -galactosidase, la cathepsine C et l' α -neuraminidase. Catastrophiquement déficientes dans les cellules malades, les trois dernières enzymes occupent le centre de notre intérêt.

Activités d'enzymes sécrétées par les fibroblastes WI dans leur milieu de culture.

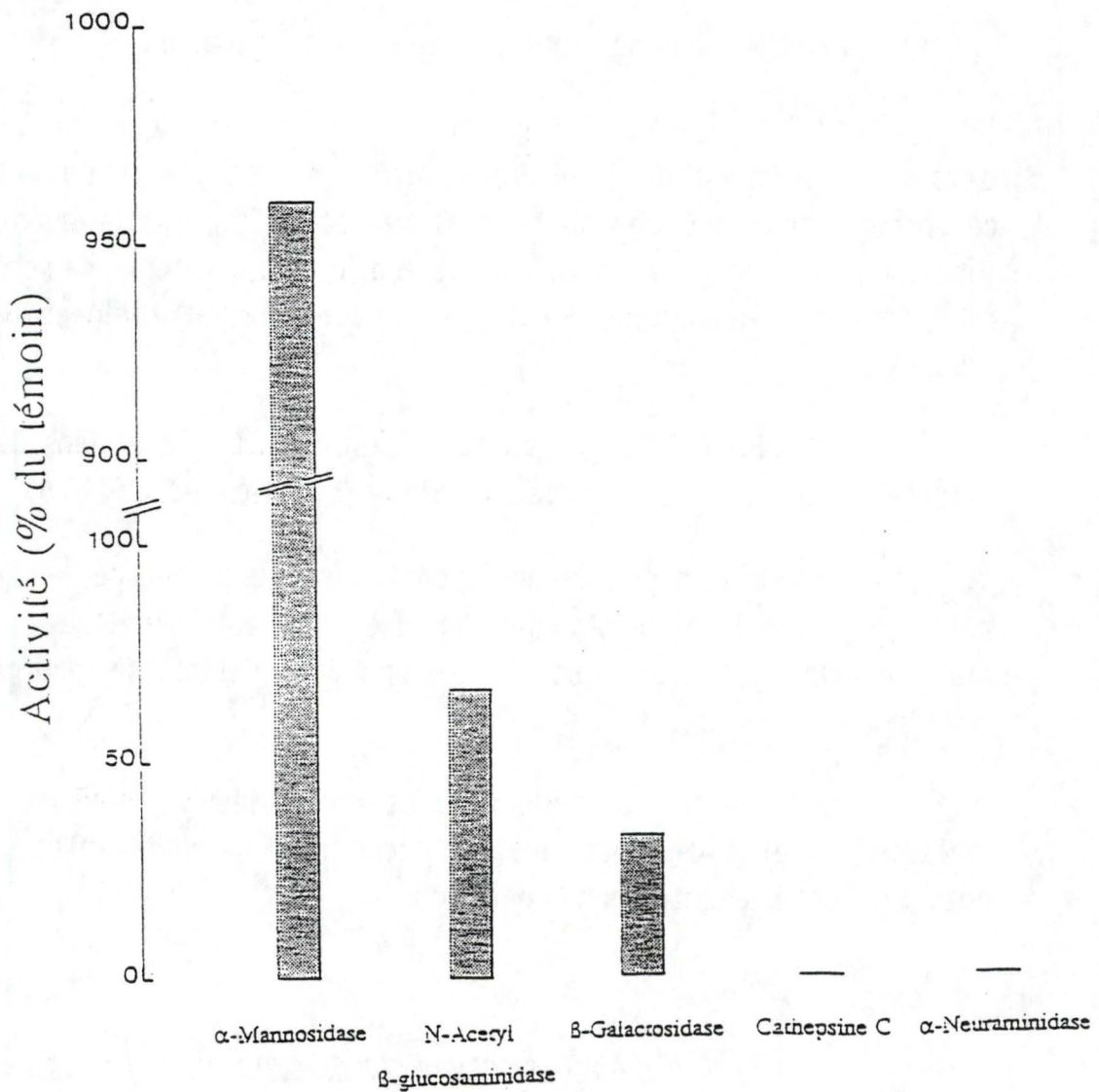


Fig. R.8. Activités d'enzymes lysosomales sécrétées par les fibroblastes WI-38 dans leur milieu de culture. Les activités enzymatiques sont mesurées après 24 h de culture confluente, dans les cellules et dans le milieu de culture. Les activités présentes dans la totalité du milieu sont exprimées en pour-cent de l'activité du tapis cellulaire. Les résultats représentent les moyennes de deux expériences.

Pour chaque hydrolase considérée, la Figure R.8 exprime en pourcent l'activité enzymatique extracellulaire (après 1 jour) rapportée à l'activité présente dans le tapis cellulaire. Les valeurs d'activité enzymatiques sont reprises dans le Tableau Annexe V.

L'activité que nous observons pour l' α -mannosidase est 9,57 fois supérieure à celle présente dans le tapis cellulaire. Pour la N-acétyl- β -glucosaminidase et la β -galactosidase, nous avons mesuré des activités valant respectivement 72,3% et 35,2% de l'activité intracellulaire. Par contre, aucune trace de cathepsine C ni d' α -neuraminidase n'a été relevée dans le milieu de culture des fibroblastes WI. Devant ces résultats, nous posons deux hypothèses:

- Il n'y a pas de libération de ces enzymes.
- Ces enzymes sont libérées mais instables dans le milieu.

2. Mesure d'activité de la β -galactosidase et de la cathepsine C dans le milieu de culture des fibroblastes GM et SAN.

Nous avons observé une forte déficience en β -galactosidase et en cathepsine C dans les cellules GM et SAN. La β -galactosidase est-elle également sécrétée en quantité déficiente dans le milieu de culture ou est-elle libérée en quantité normale?

La Figure R.9 montre les activités de β -galactosidase, de cathepsine C mesurées dans les trois types cellulaires et dans les trois types de milieux après 24 heures. Elles sont exprimées en pourcentage par comparaison à l'activité spécifique enzymatique du tapis cellulaire WI. Les résultats sont repris dans le Tableau Annexe VI.

Les déficiences en β -galactosidase et en cathepsine C, décrites précédemment, sont retrouvées dans les homogénats cellulaires. Cependant, les activités β -galactosidasiques extracellulaires sont très **semblables** pour les trois souches de fibroblastes. Comme déjà observé pour WI, aucune activité en cathepsine C n'est détectée dans le milieu de culture des cellules GM.

Activités d'enzymes sécrétées par les fibroblastes dans leur milieu de culture.

β -Galactosidase

Cathepsine C

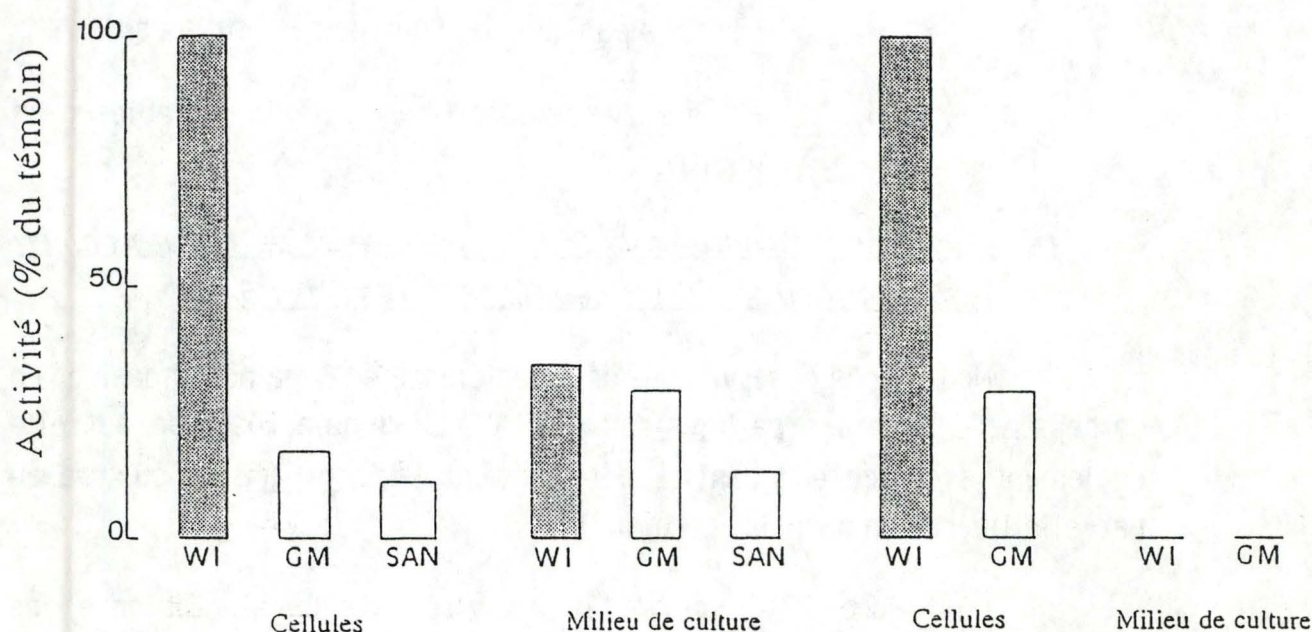


Fig. R.9. Activités d'enzymes lysosomales sécrétées par les fibroblastes dans leur milieu de culture : β -galactosidase et cathepsine C. Comparaison des trois types cellulaires. Les activités sont mesurées après 24 h de culture confluente dans les cellules et dans le milieu de culture. Les activités présentes dans la totalité du milieu sont exprimées en pour-cent de l'activité du tapis cellulaire. Les résultats représentent les moyennes de deux expériences.

3. Restauration par le milieu WI.

Les fibroblastes WI sécrètent donc des enzymes lysosomales dans leur milieu: α -mannosidase, N-acétyl- β -glucosaminidase, β -galactosidase. De plus, selon Palmeri *et al* (1986), ils libèrent également la "Protective Protein".

Nous avons étudié la capacité du milieu WI à restaurer les activités enzymatiques déficientes des enzymes malades.

Le milieu WI est prélevé tous les deux jours à partir de boîtes de fibroblastes WI et remplacé par du milieu frais ("WI donneuses"). Les boîtes de cellules GM(+) et SAN(+) reçoivent tous les deux jours de ce milieu WI. Le milieu des boîtes de fibroblastes WI(-), GM(-), SAN(-) demeurent inchangé. L'expérience dure 6 jours.

Les résultats sont repris à la Figure R.10 et dans le Tableau R.7.

Effet du milieu WI sur l'activité de l' α -neuraminidase

Lors de cette expérience, nous avons détecté une activité α -neuraminidasique sur certains homogénats GM(-) et GM(+). Bien qu'il semble y avoir une stimulation de cette activité en présence de milieu WI, nous ne pouvons pas l'affirmer fermement car les activités sont faibles, et donc les résultats s'accompagnent d'une imprécision évidente.

Effet du milieu WI sur l'activité de la β -galactosidase

Pour les cellules GM(-) et SAN(-), nous retrouvons la déficience en β -galactosidase; plus sévère pour les fibroblastes SAN. Le milieu WI restaure l'activité de la β -galactosidase des cellules malades: GM: 25,79%, SAN: 27,07%. L'activité a été augmentée de 1,57 fois pour les fibroblastes GM alors qu'elle l'a été 7,85 pour les fibroblastes SAN.

Effet du milieu WI sur l'activité de la cathepsine C

Le milieu WI induit une restauration partielle de l'activité de la cathepsine C. Les activités des cellules SAN et GM sont respectivement de 29,34% et de 7,49%. L'activité a été multipliée par 1,6 pour GM et par 2,5 pour SAN.

Effet du milieu WI

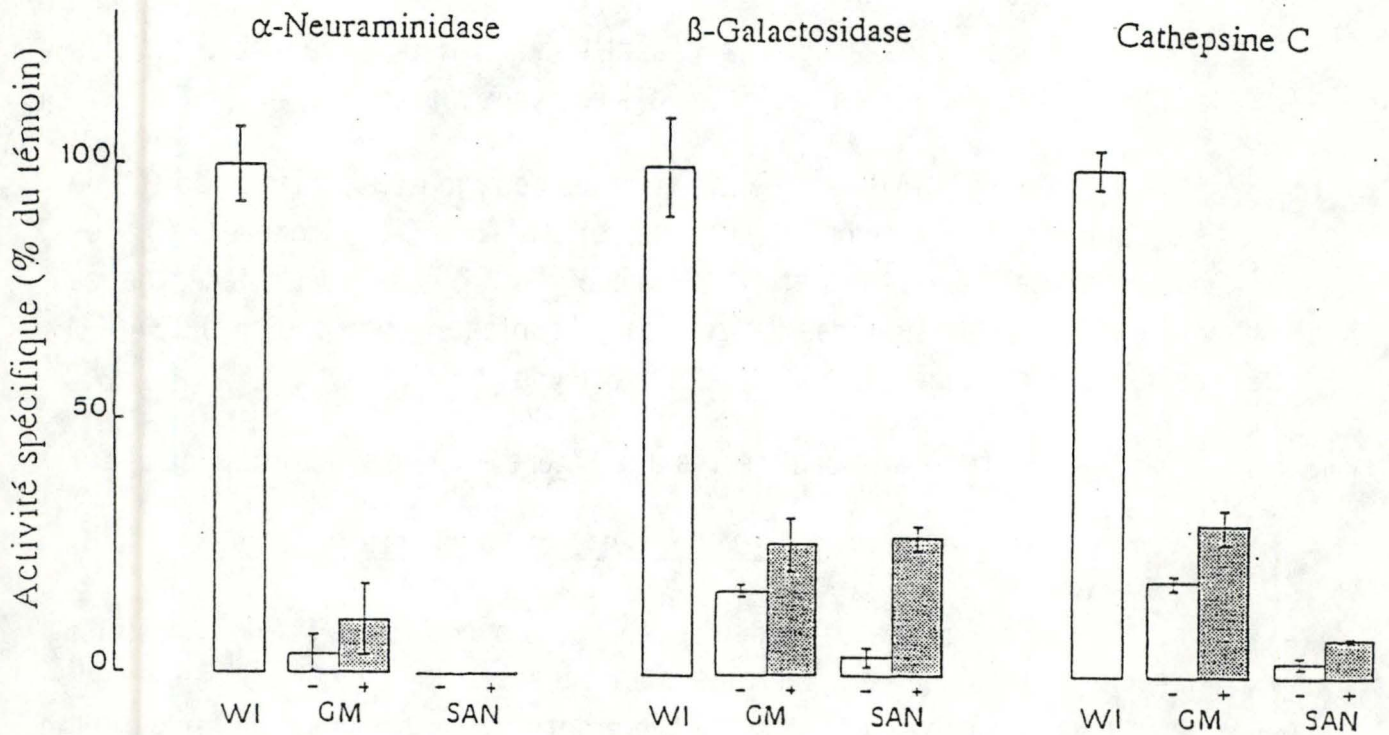


Fig. R.10. Effet de la composition du milieu de culture sur le contenu enzymatique des fibroblastes : effet du milieu WI. Les cellules WI, GM (-) et SAN (-) sont cultivées dans le milieu MEM complet, inchangé pendant 6 jours. Les cellules GM (+) et SAN (+) reçoivent tous les 2 jours du milieu où des fibroblastes WI ont été cultivés préalablement. Les activités spécifiques des enzymes sont représentées en pour-cent de celles des cellules témoins (WI-38). Les résultats représentent les moyennes de six déterminations.

Effet de la composition du milieu de culture sur le contenu enzymatique des fibroblastes.

Effet du milieu WI

Enzyme	WI donneurs	WI témoins	GM —	GM +	SAN —	SAN +
α -Neuraminidase	93,3 \pm 20,6 137 \pm 30 %	68,0 \pm 5,0 100 \pm 7,5 %	2,6 \pm 2,5 3,8 \pm 3,3 %	7,0 \pm 4,9 10,3 \pm 7,2 %	non décelable	non décelable
β -Galactosidase	2,54 \pm 0,41 57,2 \pm 9,2 %	4,44 \pm 0,43 100 \pm 9,7 %	0,727 \pm 0,050 16,4 \pm 1,1 %	1,145 \pm 0,216 25,8 \pm 4,9 %	0,153 \pm 0,085 3,5 \pm 1,9 %	1,202 \pm 0,118 27,1 \pm 2,7 %
Cathepsine C	287 \pm 37 81,8 \pm 10,5 %	351 \pm 14 100 \pm 3,9 %	71,5 \pm 9,2 18,6 \pm 1,4 %	111 \pm 16 29,3 \pm 3,6 %	10,3 \pm 3,3 3,0 \pm 0,9 %	26,3 \pm 0,9 7,5 \pm 0,3 %

Tableau R.7. Les cellules WI témoins, GM (–) et SAN (–) sont cultivées dans le milieu MEM complet, inchangé pendant 6 jours. Les cellules GM (+) et SAN (+) reçoivent tous les deux jours le milieu où ont été cultivées les cellules "WI donneurs". Les activités spécifiques de l' α -neuraminidase sont exprimées en pmol/min.mg de protéines; les activités spécifiques de la β -galactosidase et de la cathepsine C sont exprimées en nmol/min.mg de protéines. Les résultats représentent les moyennes de six déterminations accompagnées de l'écart-type. Les pourcentages sont calculés par rapport aux activités des cellules témoins WI-38.

B. DISCUSSION

Nous avons observé une libération abondante d' α -mannosidase et de N-acétyl- β -glucosaminidase dans le milieu de culture; cette observation est en accord avec ce que renseigne la littérature. (Von Figura, 1978)

Le fait que la β -galactosidase est sécrétée en quantité normale dans le milieu de culture de GM et SAN, confirme la capacité des cellules malades à synthétiser cette enzyme. Capacité déjà mise en évidence par l'action de la leupeptine.

Nous n'avons détecté aucune trace d'activité de la cathepsine C dans le milieu WI, **OR** ce milieu est capable de restaurer partiellement l'activité de cette enzyme chez GM et SAN. Nous supposons donc que le milieu WI contiendrait des constituants qui, une fois endocytés par les cellules malades, seraient capables d'induire l'activité la cathepsine C.

CONCLUSION

La GALACTOSIALIDOSE est une affection récessive autosomale rare, dont la cause génétique serait l'absence ou l'anomalie d'une protéine, appelée "Protective Protein". Celle-ci serait requise pour assurer la stabilité de la β -galactosidase (protection contre une dégradation intralysosomale excessive) et l'activité de l' α -neuraminidase, deux hydrolases lysosomales. (Hoogeven *et al*, 1983). L'altération de la "Protective Protein" serait la cause première de l'importante diminution de l'activité de ces deux enzymes chez les cellules malades. Les dommages cellulaires dans cette affection sont provoqués par une accumulation intralysosomale des substrats normalement digérés par ces deux enzymes, principalement des gangliosides, des glycoprotéines, des mucopolysaccharides. Les caractéristiques phénotypiques cliniques les plus marquées sont des altérations du squelette, une viscéromégalie, accompagnées ou non de troubles neurologiques sévères. (D'Azzo *et al*, 1983)

Notre travail s'inscrit dans le cadre de l'étude de la biogenèse des constituants lysosomaux. Plus particulièrement, notre intérêt se porte sur les trois protéines impliquées dans la galactosialidose et qui forment le "Complexe de Galjaard": la β -galactosidase, l' α -neuraminidase et la "Protective Protéine", complexe normalement lié à la membrane du lysosome. (Hoogeven *et al*, 1983). L'utilisation de fibroblastes normaux et de fibroblastes provenant de patients atteints de galactosialidose semble particulièrement adéquate pour cette étude.

Pour suivre le cheminement intracellulaire d'une protéine lysosomale au cours de sa **biosynthèse**, il faut à la fois pouvoir mettre en évidence les différents précurseurs ainsi que la forme mature de cette protéine (après incorporation d'acides aminés marqués et immunoprécipitation) et pouvoir identifier les différents compartiments subcellulaires impliqués dans ce "processing". Cette dernière étape fait appel à la centrifugation isopycnique qui doit permettre de repérer au moyen de marqueurs enzymatiques les différents organites par lesquels transitent les protéines en cours de formation.

1. Conditions de centrifugation.

Nous avons comparé le comportement en centrifugation des constituants cellulaires des fibroblastes témoins (WI-38) et malades (GM 00806 et SAN) dans le but de mettre au point des conditions telles que ces différents compartiments subcellulaires soient distincts et individualisés.

- Chez les cellules témoins, la centrifugation isopycnique en gradient de saccharose de la fraction postnucléaire (sédimentée à 3×10^6 g.min), "MLP", permet de distinguer de façon satisfaisante le réticulum endoplasmique (1,21g/ml) des éléments du Golgi (1,14g/ml) mais non des lysosomes dont la distribution est largement étalée. Par contre, si la fraction postnucléaire analysée représente le cumul de ML et P, soit ML+P (ML: 250.000g.min. et P: 3×10^6 g.min), les lysosomes s'équilibrent à une densité plus élevée (1,20g/ml). On peut supposer, par comparaison avec les résultats décrits ci-dessus pour MLP, que les lysosomes se distribueraient de façon réellement distincte de l'appareil de Golgi (1,14g/ml) mais ne se sépareraient pas du réticulum endoplasmique (1,21g/ml).

Toutefois, on ne peut exclure que certains des éléments du Golgi, du réticulum endoplasmique et de la membrane plasmique voient leur densité médiane également modifiée dans le cas d'une fraction ML+P.

- Chez les cellules malades, le Golgi (1,14g/ml) est toujours nettement distinct du réticulum endoplasmique (1,21g/ml) et des lysosomes (1,22g/ml), ces deux derniers organites restant superposés.

Ces résultats montrent l'importance d'une étude systématique des conditions de centrifugation avant d'aborder tout problème de localisation intracellulaire dans un nouveau type d'organe ou de cellules.

L'analyse de la fraction MLP a mis en évidence l'alourdissement des lysosomes des cellules malades par rapport aux lysosomes des cellules témoins (densité 1,21 par rapport à 1,17 g/ml). On pourrait mettre en parallèle ces données avec les observations morphologiques qui révèlent chez GM et SAN une accumulation de matériel membranaire dans les lysosomes, résultant probablement de la surcharge en substrats non

digérés, amenés par autophagie et hétérophagie. Cependant, les résultats de l'analyse de la fraction ML+P ne sont pas en faveur de cette interprétation puisque dans ces conditions les lysosomes des trois types cellulaires s'équilibrent tous à la même densité (1,21-1,22 g/ml). Nous suggérons donc que la membrane des lysosomes des fibroblastes normaux, très sensible à une centrifugation à haute vitesse (3×10^6 g.min), puisse subir des modifications de perméabilité qui provoqueraient un allègement des organites tandis que celle des fibroblastes malades auraient perdu cette sensibilité.

2. Modifications d'activités enzymatiques.

La détermination des activités des marqueurs enzymatiques a été réalisée non seulement pour les lysosomes mais également pour les autres organites subcellulaires impliqués dans la biogenèse des enzymes lysosomales: réticulum endoplasmique, Golgi, membrane plasmique. Chez les cellules malades des activités accrues ont été détectées au niveau du Golgi (galactosyl transférase) et de la membrane plasmique (5'-nucléotidase et dipeptidyl peptidase IV). Ces phénomènes sont comparables à ce qui s'observe lors de l'acquisition par les fibroblastes d'une surcharge intralysosomale en saccharose (Warburton et Wynn, 1976).

Comme attendu, les cellules GM et SAN se sont montrées déficientes en β -galactosidase, mais nous avons observé que cette déficience est nettement plus prononcée chez SAN que chez GM, or c'est principalement le patient SAN qui présentait les troubles neurologiques les plus sévères. Il existe donc un **parallélisme évident** entre la **déficience en β -galactosidase** et la **gravité de la maladie**.

Quant à l'activité de l' **α -neuraminidase**, dans les conditions expérimentales utilisées, elle n'a jamais été mise en évidence pour SAN, alors que nous l'avons détectée quelques fois pour GM (2 à 3% de l'activité des cellules témoins).

De façon SURPRENANTE, et encore inexplicée actuellement, nous avons relevé une déficience **considérable** en **cathepsine C** chez les cellules malades. L'importance de ce défaut enzymatique semble être, comme pour les deux autres enzymes lysosomales, parallèle à la gravité de la maladie.

3. Est-il possible de porter remède à ces déficiences?

1°) Lorsque les cellules sont cultivées en présence de **leupeptine**, un inhibiteur spécifique des thiol- et sérine-protéases (D'Agrosa *et al*, 1988), on constate chez GM et SAN une restauration complète de l'activité de la β -galactosidase. Les cellules malades sont donc capables de synthétiser normalement l'enzyme, la déficience d'activité résulte par conséquent d'une dégradation intralysosomale excessive, dégradation inhibée par la leupeptine.

2°) **Les milieux de culture cellulaire** contiennent normalement des protéines de sécrétion parmi lesquelles des enzymes lysosomales. Si on analyse les milieux de culture et donc la sécrétion des trois types cellulaires, on constate que le contenu en β -galactosidase, dans les trois cas, est d'importance identique à celui des cellules témoins WI-38. Ceci est une deuxième preuve montrant que la synthèse s'effectue normalement chez les cellules GM et SAN

La culture des cellules malades dans un milieu où les cellules WI ont été cultivées au préalable, permet une restauration partielle de l'activité de la β -galactosidase et de la cathepsine C.

Comment expliquer la restauration de l'activité de la β -galactosidase? Puisque les milieux de culture de cellules et témoins et malades sont comparables du point de vue de leur contenu en β -galactosidase, il est peu probable que cette restauration partielle d'activité résulte d'une endocytose de l'enzyme. Par contre la "Protective Protein" est sécrétée dans le milieu de culture des cellules saines sous sa forme normale et active (Hoogeveen *et al*, 1981), alors qu'elle est déficiente dans les cellules malades. Il est donc vraisemblable que ce soit la capture par les cellules malades de la "Protective Protein" sécrétée par les cellules saines qui entraîne une protection de la β -galactosidase (normalement synthétisée).

3°) Fait plus surprenant: la restauration partielle de la cathepsine C. Ceci ne s'explique pas par une internalisation de l'enzyme puisque le milieu ne manifeste aucune activité en cathepsine C. Il faut donc supposer que le milieu de culture des cellules saines recèle un

composé qui une fois endocyté, protégerait la cathepsine C intracellulaire de cellules malades.

4°) Quelle relation existe-t-il entre la déficience en β -galactosidase, en α -neuraminidase et en "Protective Protein" ("Complexe de Galjaard") et la déficience en cathepsine C?

On peut penser **qu'il existe une relation entre l' α -neuraminidase, la β -galactosidase et la cathepsine C, située soit au niveau de leur activité, soit au niveau de leur synthèse. D'Agrosa et Callahan (1988) ont démontré que la cathepsine C est capable d'activer *in vitro* l' α -neuraminidase dans le complexe de β -galactosidase / α -neuraminidase / "Protective Protein". Ils suggèrent que cette activation de l' α -neuraminidase mime *in vitro* la conversion intralysosomale *in vivo* du précurseur de l' α -neuraminidase en forme mature de l'enzyme.**

Il est suggéré d'autre part que la maturation *in vivo* fasse aussi intervenir une activité protéasique de la "Protective Protein": en effet la "Protective Protein" possède une séquence homologue avec la carboxypeptidase Y de levure (Galjart *et al.*, 1988). Et, de plus très récemment, Tranchemontagne *et al.* (1990) ont attribué une activité carboxypeptidase à la "Protective Protein". Ils ont mis en évidence une déficience très prononcée de cette activité dans les fibroblastes provenant de patients atteints de galactosialidose (Forme infantile tardive et juvénile). Notons que la cathepsine C est une dipeptidase agissant du côté amino terminal de la protéine, alors que la carboxypeptidase clive un dipeptide du côté carboxy terminal. La question qui se pose est donc: "Quel(s) rôle(s) remplissent ces deux enzymes?"

D'autres questions surgissent encore:

La "Protective Protein", nécessaire à l'activité enzymatique de la β -galactosidase et de l' α -neuraminidase, l'est-elle également pour celle de la cathepsine C. Dans ce cas, il est possible que la cathepsine C fasse partie, elle aussi, du complexe. Cependant la plus grande prudence s'impose dans l'interprétation de ces résultats. D'une part, il faudrait montrer que la cathepsine C fait partie du complexe de Galjaard. D'autre part, il faudrait prouver que la déficience en cathepsine C n'accompagne pas fortuitement

celles en β -galactosidase et en α -neuraminidase. En effet, on constate d'autres modifications enzymatiques telles que l'augmentation des enzymes du Golgi et de la membrane plasmique. Une maladie de surcharge, due à une déficience en une enzyme ou deux enzymes bien déterminées, pourrait s'accompagner d'autres altérations, surajoutées ou conséquentes. Les modifications autres que la diminution en β -galactosidase et α -neuraminidase sont multiples: outre la diminution en cathepsine C, on note une augmentation de la galactosyl transférase, de la 5'-nucléotidase et de la phosphodiesterase alcaline.

Les données obtenues au cours de ce travail permettent l'ouverture à deux voies principales de recherche:

- L'étude de la relation existant au niveau de la biosynthèse des quatre enzymes déficientes

Le 10D10, anticorps monoclonal, produit dans notre laboratoire (Gonze M.M., 1989) dirigé contre la membrane lysosomale de foie de rat, semble provoquer la précipitation de peptides qui participeraient au complexe décrit par Galjaard et dans lequel sont unies la β -galactosidase, l' α -neuraminidase et la "Protective Protein". L'utilisation combinée de cet anticorps et d'un anticorps anti-cathepsine C sur homogénat d'hépatocytes renseignerait sur l'absence ou la présence de la cathepsine C dans le "Complexe de Galjaard".

- L'étude de la relation existant entre les quatre déficiences présentes dans la galactosialidose

Nous suggérons l'introduction de la cathepsine C dans le milieu de culture de cellules provenant de patients atteints de galactosialidose. Nous savons qu'une préparation commerciale de cathepsine C ajoutée dans le milieu de culture est instable. L'endocytose de la cathepsine C, pour être efficace, nécessiterait donc un couplage avec une protéine-ligand possédant de nombreux sites de fixation sur la membrane cellulaire. Il s'agirait ensuite d'étudier l'effet éventuel de la restauration de l'activité de la cathepsine C sur les autres activités déficientes: β -galactosidase, α -neuraminidase et carboxypeptidase.

BIBLIOGRAPHIE

Appelmans, F., Wattiaux, R. & de Duve, C., 1955.

Tissue fractionation studies. 5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver.

Biochem. J. **59**: 438-445

Baudhuin, P., Beaufay, H., Rahman-Li, Y., Sellinger, O.P., Wattiaux, R., Jacques, P. & de Duve, C., 1964.

Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat liver tissue.

Biochem. J. **92**: 179-184

Beaudet, A.L., 1983.

Disorders of glycoprotein degradation: Mannosidosis, fucosidosis, Sialidosis and Aspartylglycosaminuria.

The metabolic basis of inherited disease, Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Eds (McGraw-Hill, New York)

Beaufay, H., Amar-Costesec, A., Thinès-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M. & Berthet, J., 1974.

Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver: III Subfractionation of the microsomal fraction by isopycnic and centrifugation in density gradient.

J. Cell. Biol. **61**: 213-231

Beaufay, H., Amar-Costesec, A., Feytmans, E., Thinès-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M. & Berthet, J., 1974.

Analytical of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. I. Biochemical methods.

J. Cell. Biol. **61**: 188-200

Beauvois, B., 1988.

A collagen-binding glycoprotein on the surface of mouse fibroblasts is identified as dipeptidyl peptidase IV.

Biochem. J **252**: 723-731

Brady, R.O., 1983.

Lysosomal storage diseases.

Pharmac. ther. **19**: 327-336

Brunck, C.F., Jones, K.C. & James, T.W., 1979.

Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates.

Anal. Biochem **92**: 497-500

Chigorno, V., Cardace, G., Pitto, M., Sonnino, S., Ghidoni, R. & Tettamanti, G., 1986.

A radiometric assay for ganglioside sialidase apply to the determination of the enzyme subcellular location in culture human fibroblasts.

Anal. Biochem **153**: 283-294

D'Agrosa, R.M. and Callahan, J.W., 1988.

In vitro activation of neuraminidase in the β -galactosidase-neuraminidase-Protective Protein complex by cathepsine C.

Biochem. Biophys. Res. Comm **157**: 770-775

D'Azzo, A., Hoogeveen, A., Reuser, A.J.J., Robinson, D. and Galjaard, H., 1982.

Molecular defect in combined β -galactosidase deficiency in man.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**: 4535-4539

De Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F., 1955.

Tissu fractionation studies 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue.

Biochem. J. **60**: 604-617

Desnick, R.J., Thorpe, S.R. & Fiddler, M.B., 1976
Toward enzyme therapy for lysosomal storage diseases
Physiol. Rev. **56**: 57

Ghadially, F.N., 1978.
Ultrastructural Pathobiology of the Cell, Edition
Butterworths, London and Boston.

Galjart, N.J., Gillemans, N., Harris, A., van der Host, G.T.J.,
Verheijen, F.W., Galjaard, H. & D'Azzo, A., 1988.
Expression of cDNA encoding the human "Protective Protein"
associated with lysosomal β -galactosidase and
neuraminidase: Homology to Yeast Proteases.
Cell **54**: 755-764

Gonze, M.M., 1989
Biosynthèse d'une glycoprotéine de la membrane lysosomale
(LGP10D10).
Thèse de Doctorat.

Halley, D.J.J., de Wit-Verbeek, H.A., Reuser, A.J.J. & Galjaard,
H., 1978.
The distribution of hydrolytic enzyme activities in human
fibroblasts cultures and their intracellular transfer.
Biochem. Biophys. Res. Comm **82**: 1176-1182

Hasikick, A. & Von Figura, K., 1984.
Processing of lysosomal enzymes in fibroblasts.
Lysosomal in biology and pathobiology, edited by Dingle,
J.T., Dean, R.T. and Sly, W.

Hayflick, L., 1965.
The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains.
Exp. Cell. Res **37**:614-636

Hers, H.J., 1983.
Lysosomal and storage disease, Hers, H.G. and Van Hoof, F.,
Eds (Academic Press, New York)

Hickman, S. & Neufeld, E.F., 1972

A hypothesis for I-Cell Disease: defective hydrolases that do not enter lysosomes.

Biochem. Biophys. Res. Comm **49**: 992-999

Hoogeveen, A.T., Verheijen, F.W. & Galjaard, H., 1983.

The relation between human lysosomal β -galactosidase and its Protective Protein.

J. Biol. Chem. **258**: 12.143-12.146

Howell Rodney, R. & Williams, J.C., 1983.

The glycogen storage diseases.

The metabolic basis of inherited disease, Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Eds (McGraw-Hill, New York)

Jadot, M., Colmant, C., Wattiaux-De Coninck, S. & Wattiaux, R., 1984.

Intralysosomal hydrolysis of glycy-L-phénylalanine 2 naphthylamide.

Biochem. J. **219**: 965-970

Kaplan, A., Achord, D.T. & Sly, S.W., 1977.

Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors on human fibroblasts.

Proc. Natl. Acad. Sci **74**: 2.026-2.030

Karsten, U. & Wollenberger, A., 1972.

Improvements in the Ethidium Bromide Method for direct fluorometric estimation of cDNA and RNA in cell and tissue homogenates.

Anal. Biochem **77**: 464-469

Kato, T., Okada, S., Ohshima, T., Inui, K., Yutaka, T. & Yabuuchi, H., 1982.

Normalisation of intracellular lysosomal hydrolases in I-Cell Disease. Fibroblasts with sucrose loading.

J. Biol. Chem **257**: 7.814-7.819

Kato, T., Okada, S., Ohshima, T., Yutaka, T. & Yabuuchi, H., 1984.

The effects of sucrose loading on lysosomal hydrolases.
Molecular and Cellular Biochemistry **60**: 83-98

Kornfeld, S., & Mellman, I., 1989.

The biogenesis of lysosomes.
Annu. Rev. Cell. Biol. **5**: 483-525

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J., 1951.

Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Cell. Biol. Chem. **193**: 265-275

Mancini, G.M.S., de Jonge, R., Galjaard, H. & Verheijen, F.W., 1989.

Characterization of a proton-driven carrier for sialic acid in the lysosomal membrane.
J. Biol. Chem. **264**: 15 247-15 254

McKusick, V.A. & Neufeld, E.F., 1983.

The mucopolysaccharide storage diseases.
The metabolic basis of inherited disease, Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Eds (McGraw-Hill, New York)

O'Brien, J.S., 1983.

The gangliosidoses.
The metabolic basis of inherited disease, Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Eds (McGraw-Hill, New York)

Palmeri, S., Hoogeveen, A.T., Verheijen, F.W. & Galjaard, H., 1986.

Galactosialidosis: Molecular heterogeneity among distinct clinical phenotypes.
Am. J. Hum. Genet. **38**: 137-148

Peters, T.J., Müller, M. & de Duve, C., 1972.

Lysosomes of the arterial wall.

J.Exp. Med. **136**: 1117-1139

Piazza, G.A., Callanan, H.M., Mowery, J. & Hixon, D.C., 1989.

Evidence for a role of dipeptidyl peptidase IV in fibronectine-mediated interactions of hepatocytes with extracellular matrix.

Biochem. J. **262**: 327-334

Potier, M., Mameli, L., Belisle, M., Dallaire, L. & Melançon, S.B., 1979.

Fluorimetric assay of neuraminidase with a sodium (4-Methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminate) substrate.

Anal. Biochem. **94**: 287-296

Remacle, J.A., Houbion, A. & Houben, A., 1980.

Subcellular fractionation of WI-38 fibroblasts. Comparison Between young and old cells.

Biochim. Biophys. Acta **630**: 57-70

Renlund, M., Tietze, F. & Gahl, W.A., 1986.

Defective sialic acid egress from isolated fibroblast lysosomes from patients with Salla Disease.

Reports **232**: 759-761

Rome, L.H., Garvin, A.J., Allietta, M.M. & Neufeld, E.F., 1979.

Two species of lysosomal organelles in cultured human fibroblasts.

Cell **17**: 143-153

Saison, M., Verlinden, J., Van Leuven, F., Cassiman, J.J. & Van Den Berghe, H., 1983.

Identification of cell surface dipeptidyl peptidase IV in human fibroblasts.

Biochem. J. **216**: 177-183

Siegel, G., Agranoff, B., Albers, R.W. & Molinoff, P., 1989
Basic Biochemistry, Raven Press, Fourth Edition

Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1983.

The metabolic basis of inherited disease, Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Eds (McGraw-Hill, New York)

Tranchemontagne, J., Michaud, L. & Potier, M., 1990.

Deficient lysosomal carboxypeptidase activity in galactosialidosis.

Biochem., Biophys. Res. Comm **168**: 22-29

Tulkens, P., Beaufay, H. & Trouet, A., 1974.

Analytical fractionation of homogenates from rat embryo fibroblasts.

J. Cell. Biol **63**: 383-401

Tulsiani, D.R.P. & Carubelli, R., 1970.

Studies of soluble and lysosomal neuraminidase of rat liver.

J. Biol. Chem **245**: 1.821-1.827

Van Diggelen, O.P., Schram, A.W., Sinnott, M.L., Smith, P.J., Robinson, D. & Galjaard, H., 1981.

Turnover of β -galactosidase in fibroblasts from patients with genetically different types of β -galactosidase

Biochem. J. **200**: 143-151

Van Hoof, F., 1973.

GM1 Gangliosidosis.

Lysosomal and storage disease, Hers, H.G. and Van Hoof, F., Eds (Academic Press, New York)

Von Figura, K., 1978.

Secretion of β -hexosaminidase by cultured human skin fibroblasts.

Exp. Cell Res **111**: 15-21

Verheijen, F., Brossmer, R. & Galjaard, H., 1982.
Purification of acid neuraminidase from bovine testis:
Evidence for an enzyme complex.

Biochem. Biophys. Res. Comm **108**: 868-875

Warburton, M.J. & Wynn, C.H., 1976.
The activity of hamster fibroblast lysosomal enzymes after
endocytosis of sucrose.

Biochem. Biophys. Res. Comm **70**: 94-100

Wattiaux, R., 1976.
Influence de la pression hydrostatique sur le comportement
des mitochondries en centrifugation.

Annales des Sciences Naturelles **17**: 293-300

Wattiaux, R., Wattiaux-De Coninck, Collot, M. & Ronveaux-
Dupal, M.F., 1973.

Effet de la centrifugation à haute vitesse sur les particules
subcellulaires du foie de rat.

Spectra 2000 **4**: 64-69

Wattiaux-De Coninck, S. & Wattiaux, R., 1969.
Nucleoside diphosphate activity in plasma membrane of rat
liver.

Biochim. Biophys. Acta **183**: 118-128

Distribution intracellulaire de différents marqueurs enzymatiques après centrifugation différentielle d'un homogénat de foie de rat.

Foie de rat	Activité (E+N)	N (% NMLPS)	M (% NMLPS)	L (% NMLPS)	P (% NMLPS)	S (% NMLPS)	Récup. (% de E+N)
Protéines (mg)	223 ± 22	11,2 ± 3,2	28,5 ± 2,2	3,4 ± 0,4	20,5 ± 3,3	36,4 ± 8,0	98,6 ± 1,1
Reticulum Endoplasmique NADH-Cyt. C réductase	123 ± 38	5,6 ± 1,7	34,8 ± 9,8	2,6 ± 0,4	53,6 ± 9,4	3,4 ± 1,1	91,2 ± 12,8
Appareil de Golgi Galactosyltransférase	105 ± 3	3,2 ± 0,7	12,5 ± 8,8	1,7 ± 1,0	77,8 ± 11,0	4,8 ± 1,0	90,5 ± 2,6
Membrane plasmique Dipeptidyl peptidase IV	18,5 ± 2,6	30,4 ± 2,2	18,9 ± 4,2	5,7 ± 0,9	38,4 ± 7,1	6,6 ± 1,0	99,0 ± 4,6
5'-Nucléotidase	39,4 ± 6,4	28,9 ± 1,3	15,5 ± 2,8	2,9 ± 0,6	42,3 ± 9,8	10,4 ± 5,3	93,5 ± 8,3
Phosphodiesterase alcaline	132 ± 31	20,0 ± 3,6	8,4 ± 2,3	4,8 ± 0,7	64,4 ± 3,2	2,5 ± 0,2	106,4 ± 6,3
Lysosomes β-Galactosidase	1,76 ± 0,55	4,8 ± 3,4	38,8 ± 4,5	29,3 ± 6,6	11,8 ± 3,8	15,7 ± 4,1	103,8 ± 13,3
Cathepsine C	363 ± 79	2,5 ± 1,1	43,0 ± 8,6	36,0 ± 5,5	11,1 ± 3,4	7,6 ± 3,5	91,9 ± 2,7
α-Mannosidase	0,437 ± 0,143	3,0 ± 1,1	41,6 ± 12,3	33,0 ± 6,3	19,4 ± 10,1	3,0 ± 1,4	108,4 ± 11,4
N-Acétyle-β-glucosaminidase	4,24 ± 0,28	6,1 ± 1,3	37,2 ± 5,6	34,6 ± 4,1	17,2 ± 2,9	5,0 ± 1,7	86,9 ± 4,6
α-Neuraminidase (n=1)	0,026	11,8	37,1	32,2	14,6	4,2	21,0
Mitochondries Cytochrome oxydase	108 ± 8	11,4 ± 9,9	80,1 ± 7,9	5,0 ± 1,6	3,5 ± 2,0	0	95,0 ± 9,9
Peroxisomes Catalase	170 ± 23	2,0 ± 0,1	37,0 ± 10,2	20,9 ± 11,6	3,3 ± 1,1	36,6 ± 20,5	90,6 ± 0,9

Tableau Annexe I. Les activités enzymatiques sont exprimées en mU/mg de protéines. Les valeurs représentent les moyennes de trois déterminations accompagnées de l'écart-type.

Distribution intracellulaire de différents marqueurs enzymatiques après centrifugation différentielle d'un homogénat de fibroblastes WI-38.

Fibroblastes WI	Activité (E+N)	N (% NMLPS)	M (% NMLPS)	L (% NMLPS)	P (% NMLPS)	S (% NMLPS)	Récup. (% de E+N)
Protéines (mg)	14,4 ± 2,5	21,6 ± 2,8	22,4 ± 4,8	6,8 ± 4,2	18,0 ± 2,8	31,3 ± 3,2	94,6 ± 5,5
Reticulum Endoplasmique NADH-Cyt. C réductase	135,3 ± 3,0	14,1 ± 2,7	33,0 ± 13,4	8,3 ± 2,2	41,5 ± 5,2	7,6 ± 1,8	89,1 ± 7,0
Appareil de Golgi Galactosyltransférase	250 ± 18	4,2 ± 0,9	15,6 ± 4,3	5,4 ± 2,2	63,7 ± 4,2	11,1 ± 2,0	92,3 ± 3,6
Membrane plasmique Dipeptidyl peptidase IV	6,3 ± 3,1	14,9 ± 4,3	31,7 ± 7,2	10,8 ± 1,4	34,5 ± 2,1	8,2 ± 2,9	90,5 ± 5,2
5'-Nucléotidase	153 ± 33	15,1 ± 2,6	26,0 ± 7,4	5,7 ± 2,2	49,2 ± 10,8	4,0 ± 2,6	98,8 ± 2,0
Phosphodiesterase alcaline	13,3 ± 6,3	18,0 ± 3,2	30,1 ± 9,0	5,9 ± 1,8	45,2 ± 10,2	0,8 ± 0,4	91,4 ± 1,5
Lysosomes β-Galactosidase	2,48 ± 0,74	12,4 ± 2,1	37,1 ± 6,9	28,5 ± 3,3	5,8 ± 2,7	16,3 ± 3,1	113,3 ± 3,5
Cathepsine C	257 ± 90	11,3 ± 2,6	45,6 ± 8,9	30,8 ± 6,0	5,3 ± 2,6	7,0 ± 3,7	101,9 ± 10,1
α-Mannosidase	0,57 ± 0,17	10,2 ± 3,3	49,4 ± 9,8	27,7 ± 5,2	6,2 ± 2,6	6,4 ± 1,7	91,1 ± 5,1
N-Acétyle-β-glucosaminidase	28,8 ± 4,0	12,3 ± 2,7	42,9 ± 9,4	29,0 ± 3,9	9,2 ± 3,5	6,7 ± 0,1	96,6 ± 1,8
α-Neuraminidase	0,72 ± 0,02	10,6 ± 2,7	49,6 ± 3,4	27,4 ± 9,1	4,1 ± 2,1	4,2 ± 4,9	102,7 ± 2,8
Mitochondries Cytochrome oxydase	10,8 ± 1,2	11,1 ± 1,5	52,4 ± 10,4	24,6 ± 4,6	7,4 ± 3,5	4,5 ± 0,9	100,8 ± 6,6
Peroxisomes Catalase	8,9 ± 1,3	6,1 ± 1,2	15,7 ± 4,1	11,1 ± 2,5	51,6 ± 7,7	15,6 ± 1,3	86,7 ± 3,3

Tableau Annexe II. Les activités enzymatiques sont exprimées en mU/mg de protéines. Les valeurs représentent les moyennes de trois déterminations accompagnées de l'écart-type.

Distribution intracellulaire de différents marqueurs enzymatiques après centrifugation différentielle d'un homogénat de fibroblastes GM00806.

Fibroblastes GM	Activité (E+N)	N (% NMLPS)	M (% NMLPS)	L (% NMLPS)	P (% NMLPS)	S (% NMLPS)	Récup. (% de E+N)
Protéines (mg)	17,7 ± 1,2	24,8 ± 6,8	18,5 ± 4,6	8,0 ± 2,0	23,0 ± 4,7	25,6 ± 1,5	96,3 ± 2,5
Reticulum Endoplasmique NADH-Cyt. C réductase	166 ± 31	14,2 ± 1,0	19,7 ± 3,2	7,5 ± 4,2	50,4 ± 8,7	8,1 ± 2,5	91,6 ± 4,0
Appareil de Golgi Galactosyltransférase	195 ± 67	4,5 ± 1,4	10,6 ± 4,6	1,7 ± 1,0	72,5 ± 5,7	10,7 ± 1,7	93,8 ± 9,8
Membrane plasmique Dipeptidyl peptidase IV	21,1 ± 3,7	17,1 ± 5,7	23,2 ± 6,0	7,7 ± 2,6	46,1 ± 3,0	6,0 ± 0,9	104,7 ± 5,5
5'-Nucléotidase	204 ± 105	17,3 ± 5,2	22,0 ± 7,1	6,3 ± 4,1	52,0 ± 5,6	2,5 ± 1,7	97,4 ± 11,3
Phosphodiesterase alcaline	69 ± 47	15,6 ± 5,3	19,4 ± 5,7	3,7 ± 1,6	59,4 ± 2,0	1,6 ± 0,2	101,7 ± 7,5
Lysosomes β-Galactosidase	0,465 ± 0,089	11,8 ± 5,2	32,3 ± 8,1	26,5 ± 7,9	8,2 ± 4,4	21,9 ± 5,3	105,4 ± 9,5
Cathepsine C	54,7 ± 20,0	10,3 ± 2,9	38,3 ± 6,3	30,5 ± 8,4	5,6 ± 3,6	15,3 ± 3,9	99,0 ± 1,7
α-Mannosidase	0,562 ± 0,080	11,8 ± 5,3	32,6 ± 4,6	28,2 ± 6,4	7,3 ± 2,6	19,8 ± 6,6	99,6 ± 3,9
N-Acétyle-β-glucosaminidase	26,3 ± 4,4	14,4 ± 3,6	30,5 ± 3,7	27,7 ± 5,1	11,7 ± 3,5	15,0 ± 3,8	116,7 ± 5,3
α-Neuraminidase	non décelable	—	—	—	—	—	—
Mitochondries Cytochrome oxydase	6,85 ± 0,35	16,2 ± 3,2	35,9 ± 6,7	24,1 ± 5,2	18,7 ± 1,8	5,2 ± 1,9	89,5 ± 9,6
Peroxisomes Catalase	7,26 ± 0,80	6,4 ± 3,0	9,4 ± 4,0	8,2 ± 3,1	59,1 ± 11,3	16,9 ± 6,8	106,3 ± 12,0

Tableau Annexe III. Les activités enzymatiques sont exprimées en mU/mg de protéines. Les valeurs représentent les moyennes de trois déterminations accompagnées de l'écart-type.

Distribution intracellulaire de différents marqueurs enzymatiques après centrifugation différentielle d'un homogénat de fibroblastes SAN.

Fibroblastes SAN	Activité (E+N)	N (% NMLPS)	M (% NMLPS)	L (% NMLPS)	P (% NMLPS)	S (% NMLPS)	Récup. (% de E+N)
Protéines (mg)	13,0	24,0	18,9	9,5	26,6	21,0	106,7
Reticulum Endoplasmique NADH-Cyt. C réductase	134	9,4	17,0	6,2	62,1	5,4	98,7
Appareil de Golgi Galactosyltransférase	445	6,3	13,6	1,5	67,8	10,8	104,4
Membrane plasmique Dipeptidyl peptidase IV	8,0	19,4	20,6	7,8	45,6	6,6	100,3
5'-Nucléotidase	219	19,6	16,9	2,1	60,6	0,8	101,6
Phosphodiesterase alcaline	60	20,2	16,8	3,6	58,0	1,5	104,6
Lysosomes β-Galactosidase	0,083	17,3	38,4	23,5	6,1	14,7	102,5
Cathepsine C	12,3	15,2	38,8	29,3	4,8	11,9	98,0
α-Mannosidase	0,89	14,5	34,3	31,7	5,0	14,5	107,8
N-Acétyle-β-glucosaminidase	26,4	16,1	35,8	31,9	9,3	6,9	100,1
α-Neuraminidase	non décelable	—	—	—	—	—	—
Mitochondries Cytochrome oxydase	6,51	11,5	31,9	32,2	20,0	4,38	101,6
Peroxisomes Catalase	4,41	7,4	13,3	6,0	63,4	11,9	114,2

Tableau Annexe IV. Les activités enzymatiques sont exprimées en mU/mg de protéines.

Activités d'enzymes lysosomales sécrétées par les fibroblastes WI-38 dans leur milieu de culture

Enzyme	Cellules Activités spécifiques (mU/mg de protéines cellulaires)	Milieu Activités totales rapportées à 1 mg de protéines cellulaires
α -Mannosidase	0,368	3,52 (957 %)
N-Acétyle- β -Glucosaminidase	43,35	31,36 (72,3 %)
β -Galactosidase	4,69	1,65 (35,2 %)
Cathepsine C	520	0,18 (0,04 %)
α -Neuraminidase	0,099	non décelable

Tableau Annexe V. Les activités enzymatiques sont mesurées après 24 h de culture confluente, dans les cellules et dans le milieu de culture. Les résultats représentent les moyennes de deux expériences.

β -Galactosidase et Cathepsine C dans les cellules et le milieu de culture.

Comparaison des trois types cellulaires.

Enzyme	WI	GM	SAN
β-Galactosidase			
Cellules : activités spécifiques (mU/mg de protéines cellulaires)	4,69 100 %	0,75 16,0 %	0,51 10,1 %
Milieu : activités totales rapportées à 1 mg de protéines cellulaires	1,65 35,2 %	1,30 27,7 %	0,63 13,4 %
Cathepsine C			
Cellules : activités spécifiques (mU/mg de protéines cellulaires)	520 100 %	153 29,4 %	—
Milieu : activités totales rapportées à 1 mg de protéines cellulaires	0,18 0,04 %	0,31 0,06 %	—

Tableau Annexe VI. Les activités sont mesurées après 24 h de culture confluente dans les cellules et dans le milieu de culture. Les valeurs en pour-cent expriment ces activités en fonction de celles des cellules témoins WI-38. Les résultats représentent les moyennes de deux expériences.