

Compartiments intracellulaires : réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, lysosomes

Le cytosol des cellules correspond à une organisation très complexe. Chez les **Eucaryotes**, le cytosol représente environ 50 à 60 % du volume cellulaire et une partie importante des réactions du métabolisme s'y déroule. Le cytosol renferme par ailleurs une grande variété d'organites et de vésicules intra cytoplasmiques entourées de membranes.

Si les compartiments présentent une apparente discontinuité dans la cellule, ils n'en sont pas moins interdépendants pour ce qui est de leur fonctionnement. On pourra ainsi dégager leur importance relative et leur connexion dans les voies où ils sont impliqués :

- **les voies de l'industrie exportatrice** : il s'agit des mécanismes de synthèse, sécrétion et exocytose, qui sont assurés par le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et ses dérivés ;
- **les voies de l'industrie importatrice et/ou lytique** : il s'agit des mécanismes de « digestion » intracellulaire, qui sont assurés par le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et surtout par le compartiment terminal que constituent les lysosomes dans le cas des cellules animales ou la vacuole dans le cas des cellules végétales.

1. ORGANISATION MORPHOLOGIQUE DES COMPARTIMENTS

Malgré leur apparente diversité, les compartiments endomembranaires présentent une même organisation de base : ils correspondent en effet toujours à *une cavité limitée par une membrane simple*.

A. Au microscope optique

À cause de leur petite taille les compartiments endomembranaires sont difficiles à caractériser à l'échelle du microscope optique. Le **réticulum endoplasmique** en particulier ne peut être décrit précisément : ce compartiment ne devient visible que lorsqu'il est très abondant et qu'une masse de ribosomes lui est associée, par exemple dans les cellules à activité de synthèse particulièrement forte.

La découverte de **l'appareil de Golgi** est relativement ancienne et a donc été réalisée à l'aide du microscope optique. En 1898, Camillo GOLGI, Un biologiste italien. Spécialiste du système nerveux, réalisait des imprégnations à l'aide de métaux lourds (osmium, argent) dans des cellules du cervelet de la chouette. Après réduction de ces métaux il observait une précipitation qui se localisait toujours au même endroit dans les cellules au niveau d'un organite dans lequel on pouvait repérer une zone chromophile et une zone chromophobe. L'appareil de Golgi était décrit mais la résolution du microscope optique était telle que la discussion sur son existence et surtout son rôle est restée longtemps ouverte entre les biologistes, jusqu'à l'avènement du microscope électronique.

La découverte des **lysosomes** est beaucoup plus récente. En 1949, DE DUVE, en recherchant des activités phosphatasiques acides dans des fractions cellulaires de foie, postulait l'existence d'une fraction correspondant à des compartiments clos et enrichis en hydrolases acides ; cette fraction était récupérée à des vitesses de sédimentation voisines de celles permettant d'obtenir la fraction mitochondriale.

B. Au microscope électronique

a. **Le réticulum endoplasmique** En 1950, Keith PORTER découvrait un système de membranes intracellulaires qu'il nomma **réticulum endoplasmique** (du latin *reticulum*, réseau ; il s'agit d'un réseau à l'intérieur du cytoplasme) en raison de sa forme. Peu d'années après, Georges PALADE

montrait que des grains (les grains de Palade ou les futurs ribosomes), étaient associés à ce réseau dans certaines régions.

Le réticulum endoplasmique était décrit alors comme un ensemble complexe de membranes délimitant des cavités closes, ou *citernes*, et comportant ainsi deux faces : la *face hyaloplasmique*, c'est-à-dire celle tournée vers le cytosol, et la *face luminale*, ou *intracisternale*, c'est-à-dire celle tournée vers la lumière des citernes (*fig.-1*). Il était aussi montré que le réticulum endoplasmique est en continuité avec l'enveloppe nucléaire.

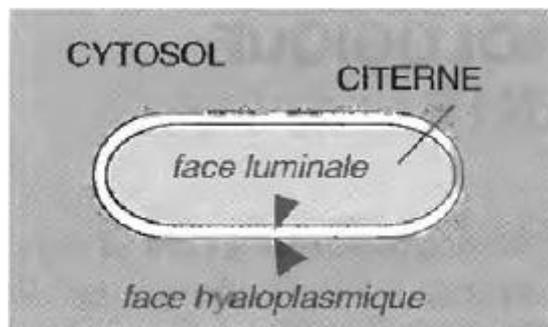


Fig. 1: Représentation schématique du réticulum endoplasmique. Il s'agit d'un compartiment clos comportant deux faces membranaires fonctionnellement différentes.

Le réticulum endoplasmique existe sous deux formes qui correspondent à deux aspects fonctionnels :

- le **réticulum endoplasmique rugueux** ou granulaire (RER, de l'anglais *Rough Endoplasmic Reticulum* : *rough* = rugueux). Il porte des ribosomes sur sa face hyaloplasmique. Il est en continuité avec l'enveloppe nucléaire, elle aussi parsemée de ribosomes ;
- le **réticulum endoplasmique lisse** ou agranulaire (SER de l'anglais *Smooth Endoplasmic Reticulum* ; *smooth* = lisse). Ses membranes ne portent pas de ribosomes. Il peut être en continuité avec le RER.

Qu'il soit lisse ou rugueux le réticulum endoplasmique est morphologiquement très variable, et ceci selon le type cellulaire où il est observé. Aucune description générale n'est donc possible. De façon très schématique on peut toutefois distinguer (*fig.2*) :

- de fins tubules très contournés et anastomosés, rencontrés surtout dans les cellules où le SER est très abondant, telles les adipocytes où le métabolisme lipidique est très actif, les cellules qui fabriquent des hormones (celles des testicules), les cellules musculaires (dans ce dernier cas le réticulum endoplasmique, très complexe, se nomme réticulum sarcoplasmique);
- des vésicules globulaires ;
- des sacs aplatis formant de véritables nappes parallèles. C'est le cas des cellules où le RER est très abondant. telles les cellules élaborant des protéines ou des glycoprotéines (cellules acineuses du pancréas, cellules du plasma sécrétrices d'anticorps, par exemple).

La quantité de réticulum endoplasmique peut être très importante dans une cellule. À titre d'exemple 1 gramme de foie contient à peu près 10 m² de réticulum endoplasmique. Une cellule hépatique dont le diamètre est environ de **20 µm**, contient **40 000 µm²** de réticulum endoplasmique.

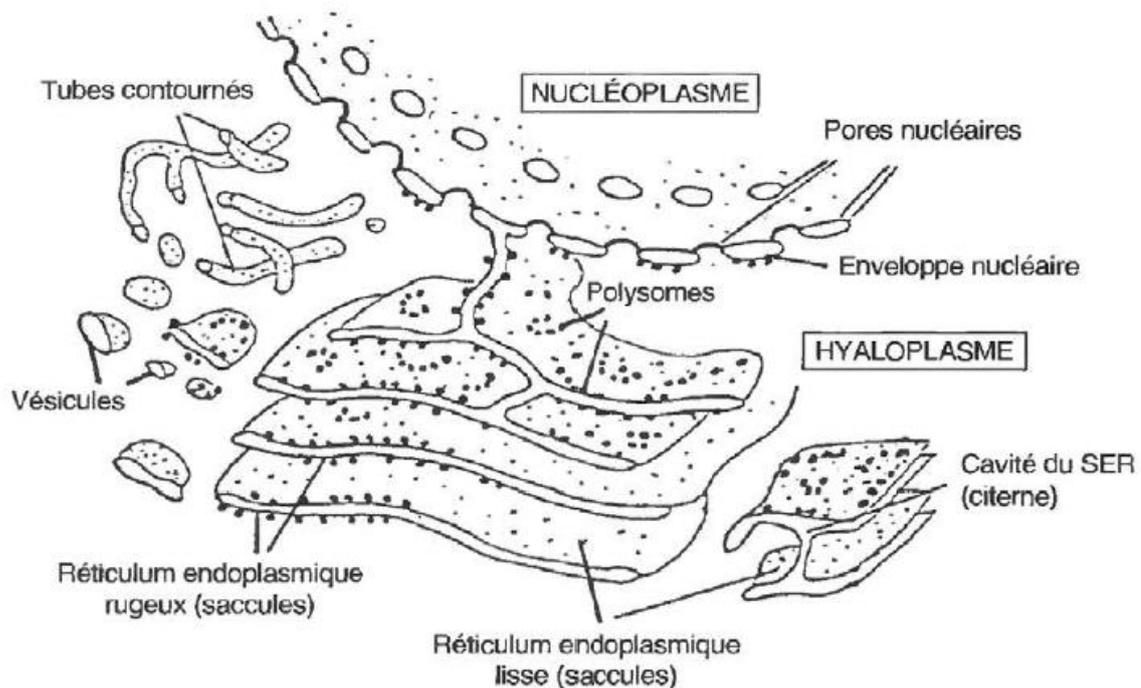


Fig.2 : Le réticulum endoplasmique (RER et SER).

b. L'appareil de Golgi

L'**appareil de Golgi** a aussi une morphologie variable. Il est constitué par l'ensemble de plusieurs éléments appelés **dictyosomes** (du grec *dictuon*, filet). Chaque dictyosome comprend un empilement de 4 à 8 saccules aplatis en forme de disque dont les extrémités forment des ampoules élargies. L'organisation de l'appareil de Golgi est différente selon qu'il appartient à une cellule animale ou une cellule végétale. Dans les cellules animales Les dictyosomes sont souvent associés formant un véritable réseau (**fig.3, A**). Dans les cellules végétales les dictyosomes sont le plus souvent isolés, donc plus difficiles à observer dans la mesure où ils ne forment pas un appareil aussi organisé que dans les cellules animales.

Même si tous les éléments qui vont être décrits - de façon un peu schématique – ne sont pas toujours identifiables sur les documents, on peut reconnaître dans chaque dictyosome les sous-compartiments suivants (**fig.3**) :

- **un compartiment *cis***, tourné du côté du RER avec lequel il établit des interrelations par des vésicules de transition. Il correspond à la *face de formation* des dictyosomes ;
- **un compartiment médian**, qui comporte quelques saccules régulièrement empilés (le nombre dépend du type cellulaire, il est souvent voisin de 5). Les saccules sont souvent très fenestrés ;
- **un compartiment *trans***, prolongé le plus souvent par de très nombreuses vésicules, dont certaines peuvent être recouvertes de clathrine ou d'autres protéines selon la destination d'adressage. Il correspond à la *face de maturation*

Au-delà de la face *trans* du dictyosome on peut rencontrer le **réseau trans-golgien** (aussi appelé réticulum du **trans-Golgi**) ou **TGN** (*trans Golgi Network*): il s'agit d'un réseau fait de saccules polymorphes et de vésicules. L'aspect de ce réseau est particulièrement variable et dépend de la

destination des composés transportés. Il existe donc une **polarisation** dans cet organite. On verra que cette polarisation correspond à un fonctionnement très sophistiqué de l'appareil de Golgi.

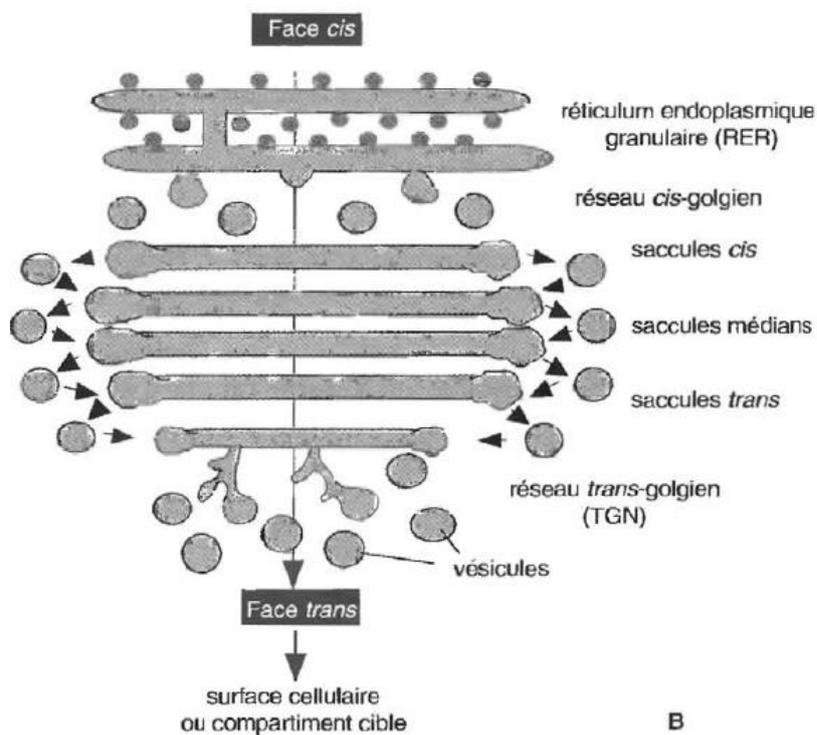
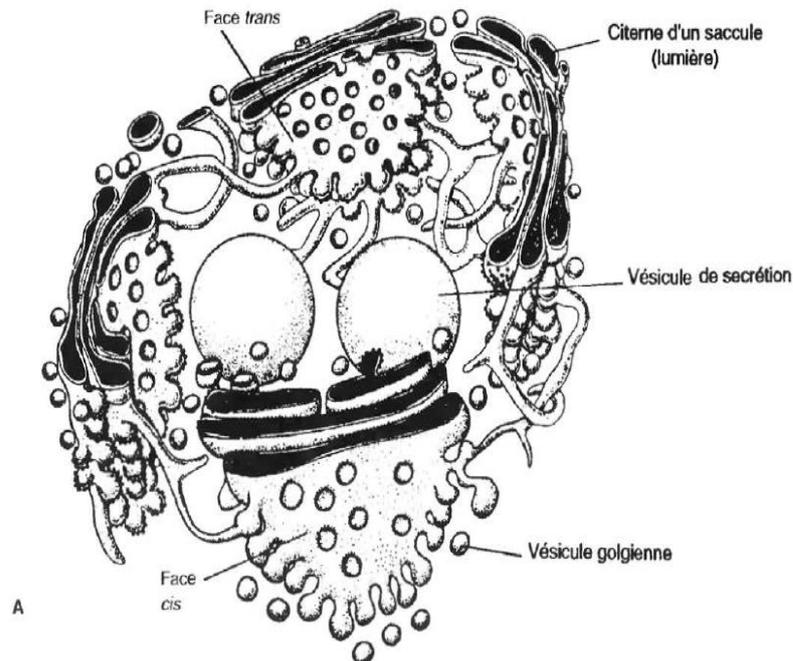


Fig.3 : L'appareil de Golgi.

A) Réseau de Golgi formé de l'arrangement de 4 dictyosomes dans une cellule animale.

B) Schéma d'un dictyosome. La flèche rouge indique la polarité du compartiment

c. Les lysosomes

Les **lysosomes** (du grec *luisis*, dissolution, *soma*, le corps) sont des organites cellulaires, très hétérogènes sur le plan morphologique, de taille comprise entre **0,05** et **0,5 μm** dans les cellules

animales, qui contiennent les enzymes digestives capables de dégrader la plupart des macromolécules biologiques. Ce sont aussi les organites cellulaires où se fait cette digestion : on peut donc parler d'un véritable « estomac cellulaire ». On verra aussi que ce compartiment, à cause de son contenu enzymatique, peut être aussi considéré comme un réservoir d'armes chimiques dangereuses et à la limite devenir un « sac suicide ». Dans les cellules végétales ce compartiment est le *compartiment vacuolaire*.

Les lysosomes sont des sacs contenant des *hydrolases acides*, c'est-à-dire des enzymes dont l'optimum d'activité est à un pH compris entre 4 et 5. C'est la valeur du pH maintenu à l'intérieur de ces organites (**fig.4**). À ce jour plus de 50 enzymes ont été identifiées dans les lysosomes. Ces enzymes sont hermétiquement enfermées dans une membrane.

L'intégrité de la membrane des lysosomes est donc tout à fait nécessaire. La membrane lysosomale présente plusieurs caractéristiques (**fig.4**) :

- elle doit maintenir le système clos ;
- elle doit permettre le passage des ions H^+ du cytosol vers l'intérieur du lysosome de façon à maintenir un pH acide (rappelons que le pH du cytosol est voisin de 7,2). La membrane comporte donc des pompes à protons ATP-dépendantes pour permettre ce passage ;
- elle doit permettre la sortie vers le cytosol des produits résultant de la digestion effectuée à l'intérieur du lysosome, ce qui implique la présence de perméases ;
- elle doit être elle-même protégée de sa propre digestion par les enzymes qu'elle retient ; sans que les mécanismes soient complètement élucidés, il semble que la membrane du lysosome soit protégée de l'intérieur par un revêtement glycoprotéique qui forme un véritable parapluie de protection.

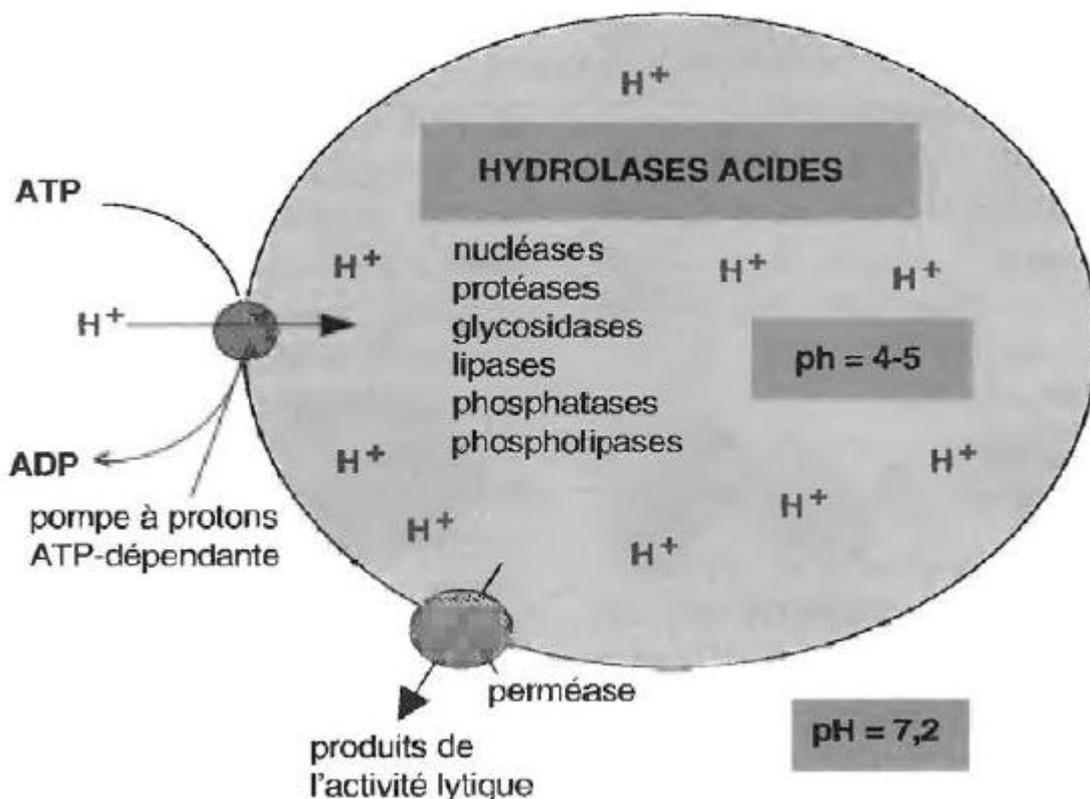


Fig.4 : Les caractéristiques d'un lysosome.

Morphologiquement les lysosomes sont des *organites très hétérogènes*. Ils ont été décrits relativement tardivement, dans les années 1960. Il est très difficile de décrire les lysosomes : leur aspect morphologique est dépendant du tissu envisagé, de leur origine, de leur mode de

fonctionnement et de l'état de différenciation de la cellule. Très schématiquement on peut distinguer 3 catégories de lysosomes (*fig.5*):

- les **phagolysosomes** qui reçoivent, par l'intermédiaire de vésicules de phagocytose, les microorganismes ou les larges particules indésirables et destinés à être détruits. ns sont particulièrement fréquents dans les cellules spécialisées dans la phagocytose, tels les macrophages et les globules blancs ;
- les **lysosomes** proprement dits qui reçoivent, venus des endosomes (sans doute *via* des vésicules recouvertes), les éléments extracellulaires internalisés par pinocytose.
- les **autophagolysosomes**, ou vacuoles autophagiques, qui s'organisent à l'intérieur d'une cellule pour une auto dégradation d'une partie de la cellule elle-même.

Bien entendu ces systèmes peuvent communiquer et cette classification reste relativement arbitraire. Par ailleurs tous les lysosomes reçoivent, du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi les enzymes hydrolytiques ainsi que les protéines destinées à être intégrées aux membranes lysosomales.

Il existe une autre terminologie, plus classique, qui distingue deux catégories de lysosomes selon les événements qui s'y déroulent :

- les **lysosomes primaires** : ce sont toutes les vésicules et vacuoles contenant des enzymes hydrolytiques actives mais non encore en présence de leur substrat. Elles correspondent aux vésicules dérivées du TGN qui apportent les enzymes aux lysosomes ;
- les **lysosomes secondaires** : ce sont toutes les vacuoles où la digestion se fait après que la fusion avec les lysosomes primaires a eu lieu et que les enzymes ont été déversées.

Au total les compartiments endomembranaires constituent des systèmes extrêmement complexes, variables dans l'espace et dans le temps, auxquels il faut ajouter de multiples vésicules recouvertes ou non.

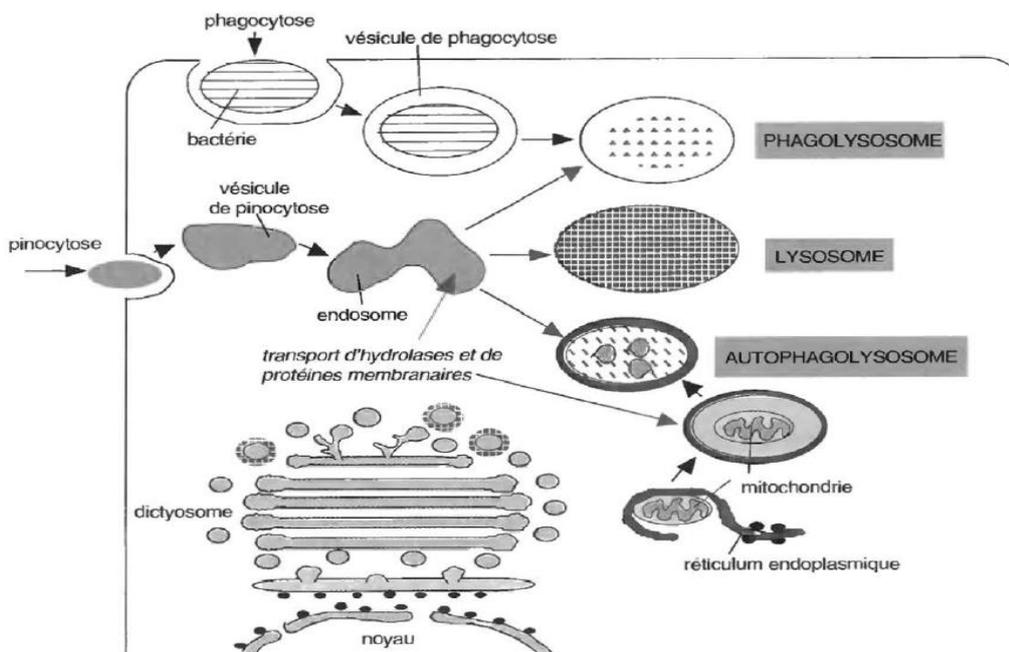


Fig.5 : Les différentes catégories de lysosomes.

2. RÔLES PHYSIOLOGIQUES

Les fonctions des compartiments endomembranaires sont très variées. Elles sont essentielles dans la mesure où elles participent à la fois :

- à l'édification des constituants cellulaires : synthèse de lipides et de protéines des membranes, synthèse des protéines enzymatiques destinées à être intégrées aux membranes);
- à la machinerie du métabolisme, par tous les mécanismes de sécrétion, de digestion, de détoxification
- ...

Même si globalement le fonctionnement des compartiments endomembranaires est similaire dans les cellules animales et les cellules végétales, il existe des différences notables, en particulier au niveau de l'appareil de Golgi et des lysosomes.

2.1. BIOSYNTHÈSE DES LIPIDES ET DES GLYCOLIPIDES MEMBRANAIRES

Cette synthèse a lieu essentiellement dans le réticulum endoplasmique. Les membranes du réticulum possèdent en effet tout l'équipement enzymatique nécessaire pour faire de nombreuses réactions du métabolisme des lipides. Le réticulum endoplasmique est dans la cellule un véritable « pourvoyeur » de membranes.

• Biosynthèse des phospholipides

Elle est importante puisque cette synthèse va permettre d'assurer le renouvellement des membranes. La synthèse se fait par élongation et désaturation à partir d'acides gras simples présents dans le cytosol. Les enzymes impliquées sont localisées sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique.

Il est admis que, après la synthèse d'une masse de lipides sur la moitié cytosolique, des protéines spécifiques, les flippases, sont capables de transférer sélectivement des lipides sur l'autre face de la membrane (fig.6).

Les phospholipides nouvellement synthétisés sont donc incorporés à la membrane dont ils assurent ainsi le renouvellement. Des morceaux de membrane neuve peuvent parfois être transmis en bloc et permettre l'extension de secteurs membranaires. Le greffage des sucres, tels le galactose ou l'acide sialique, sur les glycolipides, a lieu dans l'appareil de Golgi.

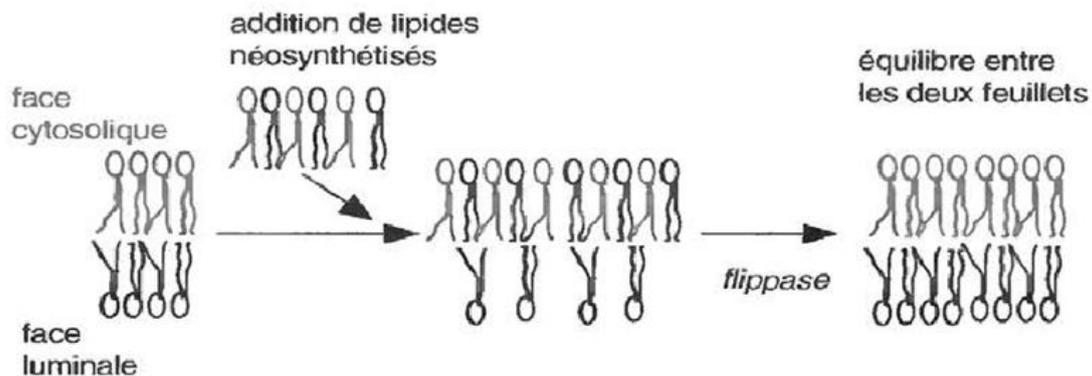


Fig. 6: Schéma montrant le rôle d'une protéine de transfert (flippases) dans le passage de phospholipides de la face cytosolique de la membrane vers la face luminale dans le réticulum endoplasmique.

• Biosynthèse des triglycérides

Cette synthèse est effectuée par le réticulum endoplasmique lisse. Dans les adipocytes par exemple, c'est-à-dire des cellules situées sous la peau et dont la fonction est de stocker des lipides, le SER est particulièrement abondant.

• Biosynthèse du cholestérol

Dans les cellules animales, la synthèse du cholestérol s'effectue surtout dans les hépatocytes où un important SER est développé.

C'est aussi le réticulum endoplasmique qui est engagé dans la synthèse des hormones stéroïdes : la testostérone dans les testicules, la progestérone dans l'ovaire, les cortisones dans les glandes surrénales. Toute la partie lipidique de ces hormones est synthétisée dans le SER.

2.2. BIOSYNTHÈSE, TRANSFERT ET CONCENTRATION DE (GLYCO) PROTÉINES

A. **Ségrégation des protéines** : On peut distinguer deux types de protéines :

- les protéines synthétisées sur les polysomes Libres qui constituent les protéines cytosoliques.
 - les protéines synthétisées sur les polysomes liés au réticulum endoplasmique qui constituent les protéines de sécrétion (ou d'exportation), les protéines intrinsèques de membranes (réticulum endoplasmique, dictyosomes et surtout membrane plasmique qui est une membrane terminale), les protéines destinées au compartiment interne représenté par les lysosomes dans les cellules animales.
- Plusieurs questions se posent : comment se fait le choix entre protéines du cytosol, protéines exportées, protéines de stockage ? Comment les polypeptides synthétisés à l'extérieur du RER peuvent-ils gagner la lumière de ce compartiment ? Comment les ribosomes sont-ils dirigés vers le réticulum endoplasmique dans le cas des protéines non cytosoliques ? Où et comment les protéines vont-elles cheminer ?

• Les protéines de sécrétion nouvellement synthétisées sont contenues dans les citernes du RER.

Une expérience simple permet de montrer où sont localisées les protéines de sécrétion juste après leur synthèse (fig. 7).

On prépare des microsomes rugueux (fragmentation du RER) à partir de cellules ayant subi un pulse de leucine tritiée. Cette fraction microsomes est radioactive ce qui signifie que des polypeptides se sont formés pendant le pulse et sont associés à ces microsomes.

On ajoute à la fraction :

- de la protéinase. Après un temps d'incubation on observe que les polypeptides néosynthétisés sont intacts. Ils sont protégés par la membrane des microsomes.
- de la protéinase après traitement des microsomes par un détergent qui solubilise partiellement la membrane. On observe alors que les polypeptides néosynthétisés sont dégradés. Il n'apparaît donc que les protéines nouvellement synthétisées sont contenues à l'intérieur des saccules du réticulum endoplasmique granulaire.

• **La traversée de la membrane du RER est permise par une séquence signal.** En fait c'est la présence d'une séquence signal dans le polypeptide naissant (donc de codons correspondants dans l'ARNm) qui détermine la synthèse sur le RER des protéines destinées à être incorporées dans les cavités du réticulum endoplasmique.

Le schéma de la figure 8 résume les mécanismes (encore hypothétiques pour certaines étapes) de la synthèse d'une protéine exportable. Les ribosomes, libres dans le cytosol, se fixent sur l'ARNm au niveau d'un codon AUG (codon de départ). L'extrémité amine terminale du polypeptide est d'abord une séquence constituée par 16 à 30 acides : c'est la séquence signal (parfois appelée peptide signal ou séquence-guide). Cette séquence comprend généralement quelques acides aminés chargés positivement à l'extrémité N-terminale puis une douzaine d'acides aminés hydrophobes. La séquence signal est guidée au réticulum endoplasmique par l'intervention de deux systèmes :

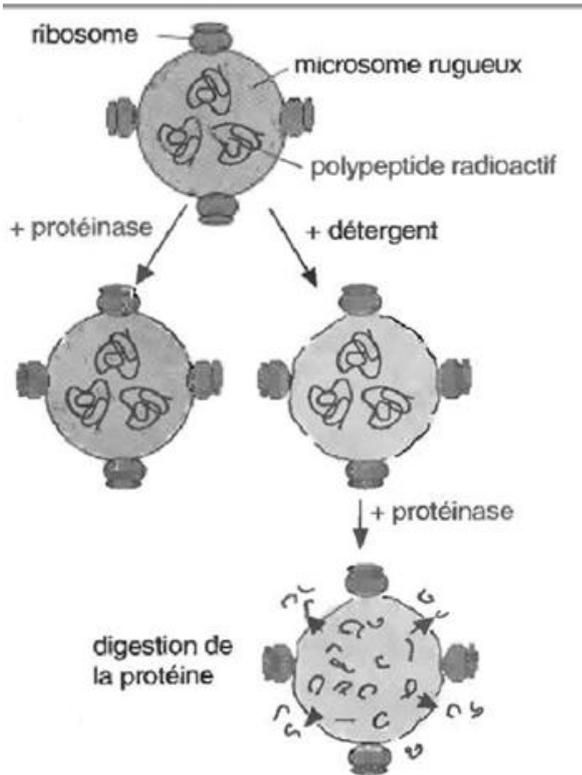


Fig.7 : Expérience montrant que les protéines sont contenues dans la lumière du RER.

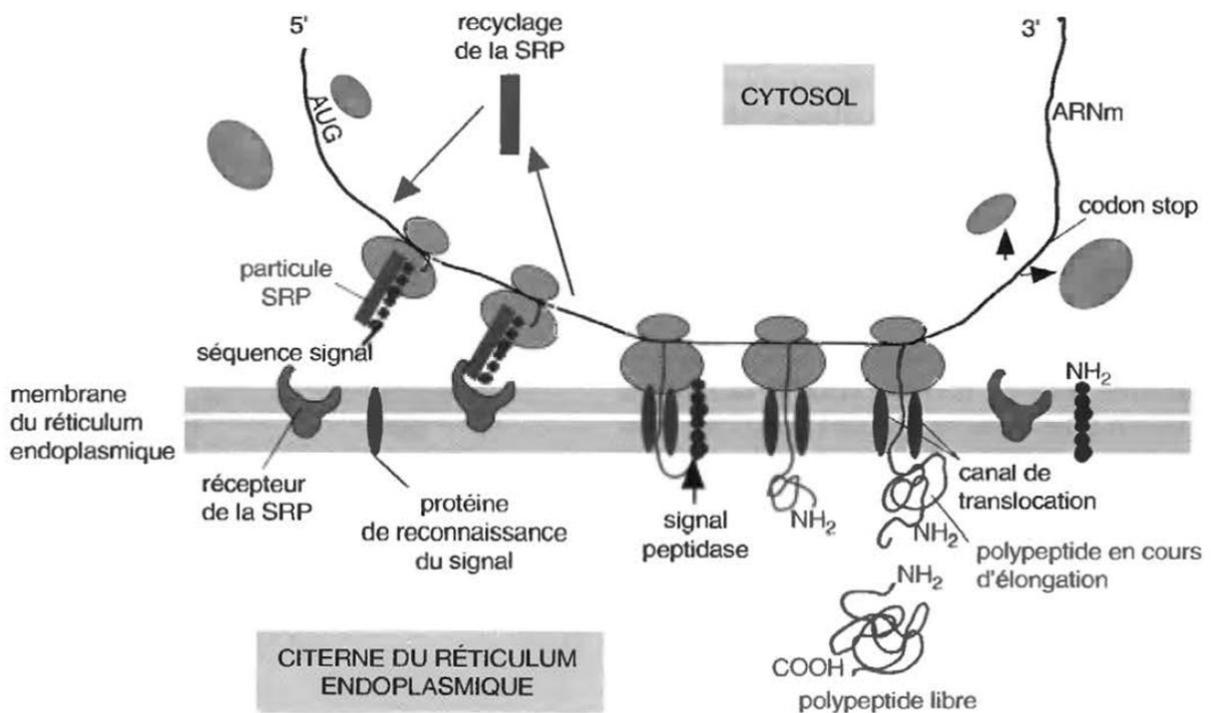


Fig. 8 : Biosynthèse d'une protéine exportable. Importance de la séquence signal et des protéines de reconnaissance.

- une particule qui reconnaît le peptide signal, appelée particule SRP (signal recognition particle). C'est une particule cytosolique faite de 6 polypeptides différents et d'un ARN de 300 nucléotides. La particule SRP s'attache à la fois au ribosome et au peptide signal ; elle fait la navette entre le réticulum endoplasmique et le cytosol ;

- un récepteur de la particule SRP qui est présent sur la face cytosolique du RER et qui permet l'arrimage du ribosome sur le RER.

Sans que les mécanismes en soient très clairs, il semble que, lors de la fixation du complexe ribosome + particule SRP sur le récepteur de la SRP, la séquence-guide soit reconnue par un récepteur de la séquence signal, protéine intrinsèque de la membrane du RER. Ceci conduit à l'organisation d'un tunnel transmembranaire, le canal de translocation, grâce à des protéines réceptrices des ribosomes permettant ainsi le passage du polypeptide en cours de synthèse dans la citerne de RER. Le polypeptide est alors synthétisé dans son entier par lecture du message de l'ARNm.

Dans la cavité du RER la séquence signal est très rapidement reconnue par l'intervention d'une signal-peptidase (ou clipase) présente sur la face luminale du RER. À la fin de l'élongation, c'est-à-dire lors de la lecture du codon stop, le polypeptide (donc dépourvu de son peptide signal) peut être libéré dans la cavité du RER.

La séquence signal est donc une séquence transitoire. C'est cette séquence en bases qui détermine si le polysome sera libre ou associé au RER.

• **Les protéines intrinsèques sont orientées dans la membrane par des séquences topogéniques**

Qu'en est-il des protéines transmembranaires, c'est-à-dire des protéines qui restent intégrées aux membranes ? Certaines sont au départ synthétisées comme des protéines exportables, mais un signal constitué par exemple par une longue séquence hydrophobe interrompt le transfert. La protéine produite possède son extrémité N-terminale dans la cavité du RER et la C-terminale dans le cytosol. La question se pose pour les protéines ayant une orientation inverse ou traversant plusieurs fois la membrane.

Là encore tous les mécanismes ne sont pas parfaitement élucidés. Il semble toutefois qu'il existe dans le polypeptide des « séquences topogéniques » qui permettent l'ancrage de régions polypeptidiques dans la membrane et qui sont de deux types : des séquences signal de départ de transfert et des séquences signal d'arrêt de transfert.

Selon le nombre et la place de ces séquences topogéniques dans le polypeptide on aboutira à des intégrations de protéines différentes dans la membrane (fig.9).

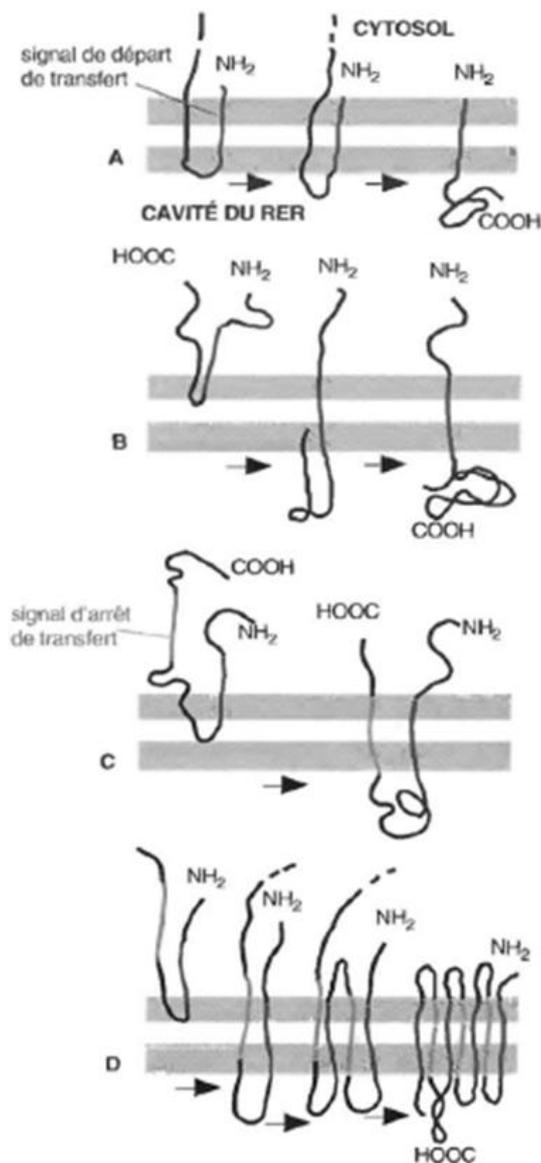


Fig. 9 : Séquences topogéniques et protéines transmembranaires. Schémas hypothétiques.

A) Signal départ de transfert au début du polypeptide, à l'extrémité NH₂. La protéine possède un seul domaine tourné vers la cavité du RER.

B) Signal de départ de transfert au milieu du polypeptide. La protéine possède deux domaines : l'un cytoplasmique, l'autre luminal.

C et D) Alternance de signal de départ de transfert et d'arrêt de transfert conduisant à des protéines transmembranaires traversant la membrane un plus ou moins grand nombre de fois (sous forme d'hélice a).

B. Transport des protéines

Deux types d'expérience ont permis de montrer les voies que pouvaient suivre les protéines dans la cellule après leur synthèse.

a. Mise en évidence par autoradiographie : C'est l'expérience effectuée par JAMIESON et PALADE en 1967 et dont le protocole est résumé sur la figure 10.

Des tranches de pancréas de cobaye sont mises en culture en boîte de Pétri. De la leucine H³ est ajoutée pendant un temps bref (3 minutes) à la culture : c'est un pulse.

Quelques échantillons sont lavés, fixés chimiquement et préparés pour une observation en microscopie électronique. Un marquage est observé à la base des cellules, dans la région où des nappes de RER sont très abondantes (fig. 11, A). La leucine a été incorporée pendant le pulse dans le réticulum endoplasmique granulaire : *la synthèse des protéines a eu lieu dans les polyribosomes liés au réticulum endoplasmique.*

Après le pulse, d'autres échantillons sont transférés dans un milieu froid (c'est-à-dire un milieu où la leucine est non radioactive) et maintenus en incubation pendant des périodes de 7, 37 et 117 minutes.

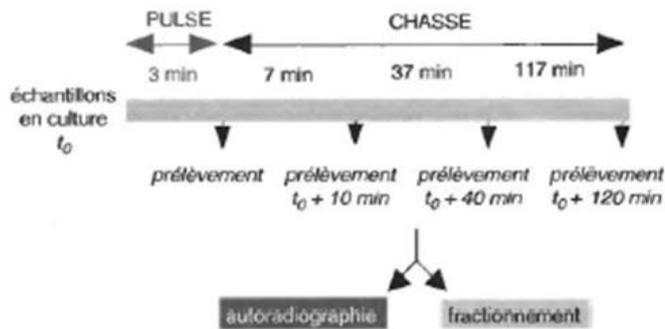


Fig. 10: Protocole de l'expérience de JAMIESON et PALADE (1967).

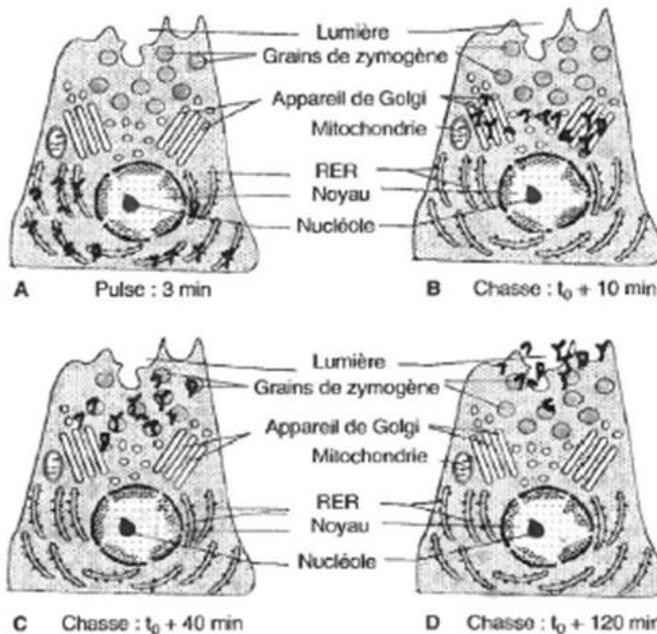


Fig. 11 : Expérience de Jamieson et Palade (1967).

A) Pulse dans la leucine tritiée pendant 3 minutes.
 B, C et D) Chasse (respectivement 7, 37 et 117 minutes).

À la fin de chaque période, les échantillons sont lavés, fixés chimiquement et préparés pour la microscopie électronique. Après une chasse de 7 minutes, le marquage est localisé dans la partie médiane de la cellule, riche en dictyosomes (fig. 11, B). Après 40 minutes, le marquage est localisé sur les vésicules de sécrétion immatures, voisines de l'appareil de Golgi, et appelées grains de zymogène dans ce tissu (fig. 11, C). Deux heures après le début de l'expérience, le marquage se retrouve dans les grains de zymogène matures, dans ceux en cours d'exocytose et dans la lumière de l'acinus pancréatique (fig. 11, D). Cette expérience de chasse indique que les protéines radioactives ont migré après leur synthèse : elles passent dans l'appareil de Golgi où elles semblent se concentrer (les grains d'argent paraissent nombreux sur une faible surface); puis elles sont enfermées dans un grain de sécrétion et libérées à l'extérieur de la cellule deux heures après leur synthèse. Il y a donc eu transport, concentration et export des protéines, apparemment via les compartiments endomembranaires.

b. Mise en évidence par les techniques biochimiques

Cette expérience d'autoradiographie devait être confirmée par des analyses biochimiques effectuées en parallèle sur le même type d'échantillons. Le protocole expérimental de mise en culture est le même (fig. 10). Après le pulse de 3 minutes avec la leucine H^{3+} , certains échantillons subissent un fractionnement cellulaire de façon à obtenir 4 fractions : une fraction microsomes rugueux (RER). Une fraction microsomes lisses (principalement l'appareil de Golgi et ses dérivés). Une

fraction grains de sécrétion (grains de zymogène) et une fraction surnageant (cytosol dilué). La radioactivité de ces fractions est mesurée à la fin du pulse au moyen d'un compteur à scintillation. Le résultat de ces mesures, exprimé en coups par minutes en fonction du temps, apporte deux sortes d'information (fig.12) :

- la radioactivité du surnageant est très faible et surtout ne varie pas pendant toute la durée de l'expérience. Ceci confirme l'hypothèse que les protéines ne passent à aucun moment dans le cytosol. Les protéines exportées transitent donc par les compartiments endomembranaires ;
 - on observe un décalage des courbes indiquant que, après leur synthèse dans le RER. Les protéines passent dans l'appareil de Golgi, sont stockées environ une heure dans les grains de sécrétion avant d'être libérées dans la lumière (La radioactivité est alors perdue en raison des lavages).
- Il y a donc un transfert RER ~ appareil de Golgi ~ grains de zymogène ~ lumière de l'acinus.

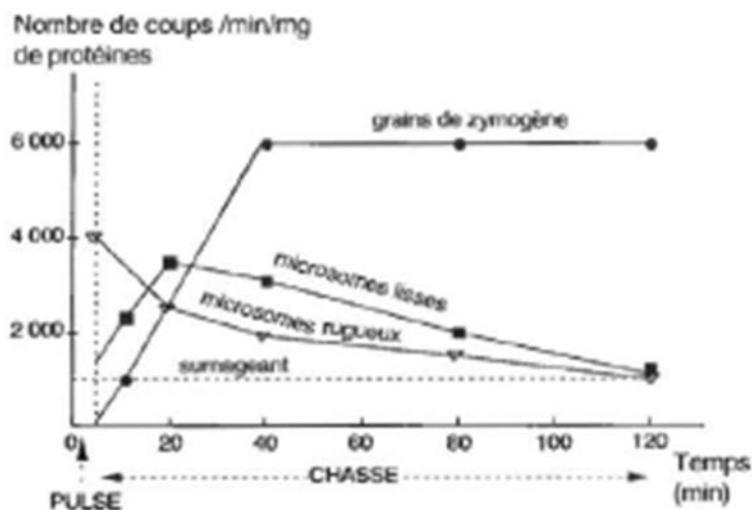


Fig. 12 : Radioactivité spécifique des fractions après un pulse en présence de leucine tritiée et une chasse.

C. Maturation des protéines

Le long de ce cheminement les protéines subissent de nombreuses transformations. Elles sont de plusieurs sortes :

- la formation de liaisons disulfure (les ponts S-S établis entre les résidus cystéine).
- le pliage des protéines leur permettant d'acquérir une conformation tridimensionnelle.
- des clivages protéolytiques aboutissant à l'excision de certaines séquences polypeptidiques.
- l'addition d'oligosaccharides et la modification éventuelle de ces séquences oligosaccharidiques (glycosylation et élagage).

Toutes ces transformations permettent à la protéine d'acquérir son état définitif : c'est la maturation des protéines.

• Des protéines chaperons interviennent dans le repliement des protéines

En ce qui concerne le repliement des protéines, nous avons vu qu'il est déterminé par la séquence primaire du polypeptide mais sous le contrôle de protéines chaperons. Le concept de protéines chaperons est un concept nouveau important dans la mesure où il remet en cause ce dogme bien établi de la biologie cellulaire selon lequel la structure tridimensionnelle d'une protéine active dépend de sa séquence et correspond à l'état thermodynamique le plus stable pour la protéine dans son environnement. En se fixant sur le polypeptide déplié au fur et à mesure de sa synthèse, aussi bien au niveau des polysomes libres dans le cytosol que des polysomes liés aux membranes du RER

(fig.13), les protéines chaperons recouvrent apparemment les acides aminés hydrophobes les empêchant d'interagir avec d'autres acides aminés hydrophobes voisins dans la même chaîne ou dans une protéine voisine. Cette protection évite probablement un repliement prématuré de la protéine (Avant que la totalité de la macromolécule soit élaborée ; en effet, un repliement prématuré interdirait des interactions entre acides aminés éloignés), minimise le risques de repliement incorrect et empêche l'agrégation entre polypeptides voisins.

Dans ce rôle il semble que plusieurs protéines chaperons agissent en coopération (HSP 70, HSP 40, Oro EL ...).

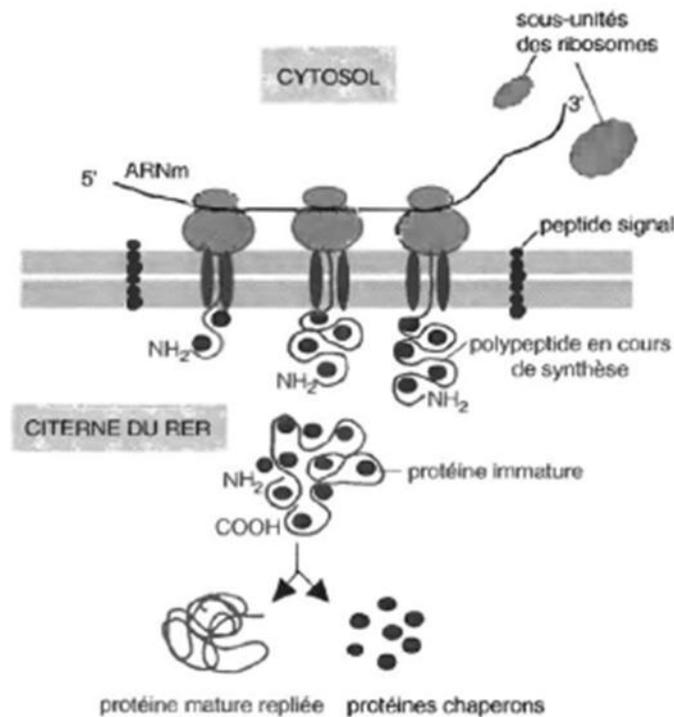


Fig. 13 : Rôle possible des protéines chaperons dans le contrôle du repliement des polypeptides en cours de synthèse.

• Clivages protéolytiques

La maturation de l'insuline peut être prise comme exemple d'une transformation impliquant un clivage protéolytique important (fig. 14). L'insuline est une protéine de sécrétion qui comporte donc une séquence signal permettant son entrée dans la lumière du réticulum endoplasmique.

L'insuline mature est un polypeptide comprenant deux chaînes (la chaîne A et la chaîne B) réunies par des ponts disulfure. Elle dérive d'un précurseur, la pro-insuline, qui comprend une troisième chaîne, le peptide C (fig. 14, A).

On peut résumer les principales étapes de la maturation de l'insuline (fig. 14). La synthèse a lieu sur les polysomes liés au RER où grâce à une séquence signal (le segment pré) le polypeptide - appelé pré-pro-insuline est injecté dans la citerne du RER. Le peptide signal est rapidement éliminé, des liaisons S-S se forment conduisant à la formation de la pro-insuline

Par des vésicules de transition la pro-insuline est amenée sur la face cis d'un dictyosome et transite dans les compartiments médians par des sauts de vésicules. Sur la face trans du dictyosome la pro-insuline est concentrée dans des vésicules mantelées couvertes de clathrine, qui se détachent et migrent vers la surface en perdant rapidement leur manteau.

C'est au cours de ce déplacement que dans les vésicules, un clivage protéolytique de la pro-insuline a lieu : un polypeptide (le peptide C) est éliminé et la molécule qui sera exportée par exocytose est donc l'insuline mature.

Ce mécanisme de clivage protéolytique est fréquent. Beaucoup de protéines de sécrétion et de protéines membranaires sont en effet synthétisées sous une forme trop longue et inactive et doivent être amputées d'un ou de plusieurs secteurs pour devenir matures et actives : c'est le cas de l'albumine, une protéine du sérum et du glucagon, une protéine hormonale.

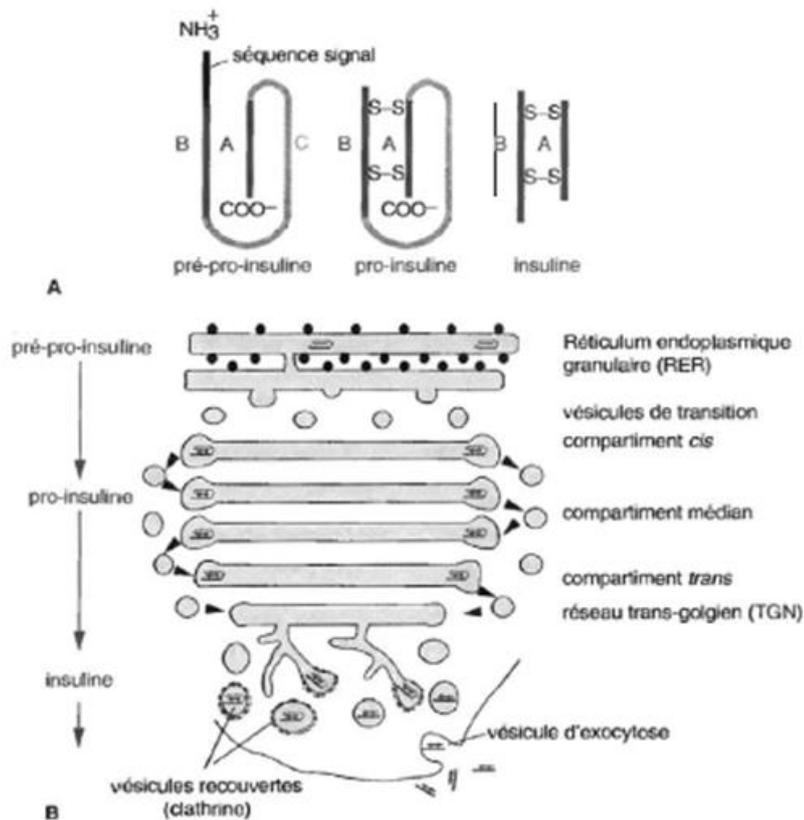


Fig. 14 : La maturation de l'insuline.

A) Structure schématique de la pré-pro-insuline (avec le peptide signal), de la pro-insuline et de l'insuline.

B) Les principales étapes de la biosynthèse de l'insuline.

• Glycosylation et élagage

Beaucoup de protéines sécrétées vont être glycosylées : ce sont en fait des glycoprotéines.

Une expérience classique d'autoradiographie révèle où à lieu la glycosylation (fig.15).

Des cellules sécrétrices de l'intestin de rat (cellules à mucus) sont incubées en milieu de culture. Sur un lot de cellules on effectue un pulse de 3 minutes avec du mannose tritié (H^3 mannose). Sur un autre lot on effectue un pulse de 3 minutes avec du fucose H^3 . Les tissus sont lavés, fixés chimiquement et préparés pour une autoradiographie en microscopie électronique.

Le résultat des deux marquages indique que le mannose est incorporé aux protéines dès le réticulum endoplasmique (fig. 15A) alors que le fucose est incorporé plus tardivement dans l'appareil de Golgi (fig. 15B).

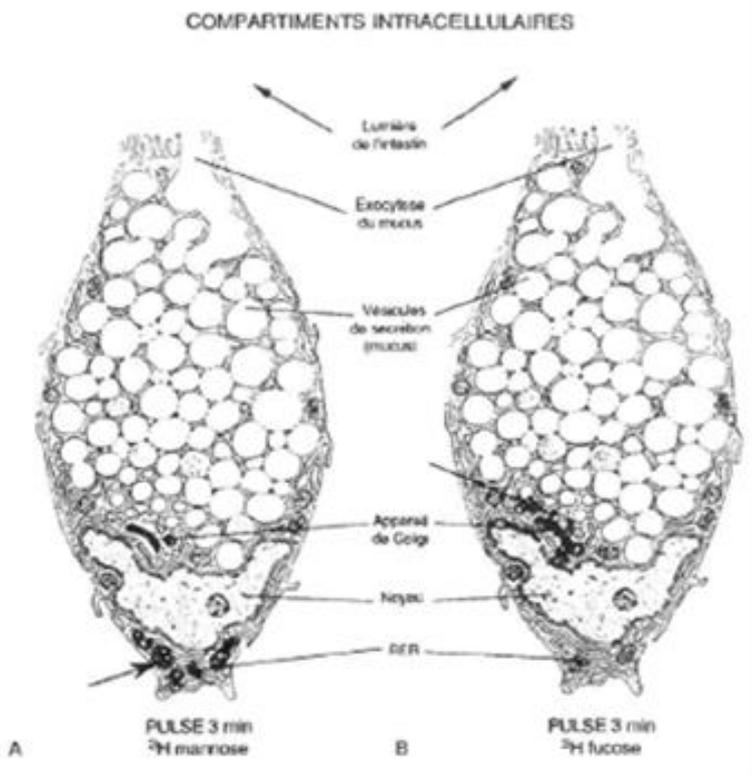


Fig. 15: Expérience montrant la glycosylation séquentielle des protéines dans les cellules de l'intestin spécialisées dans la sécrétion du mucus.

A) Après un pulse de 3 minutes dans du mannose tritié.

B) Après un pulse de 3 minutes dans du galactose tritié.

Les flèches indiquent la position des grains d'argent, donc le niveau d'incorporation des précurseurs.

a glycosylation apparaît donc séquentielle. Elle commence dans le RER. Chez les Eucaryotes les glucides sont fixés à 4 résidus d'acides aminés différents. On distingue :

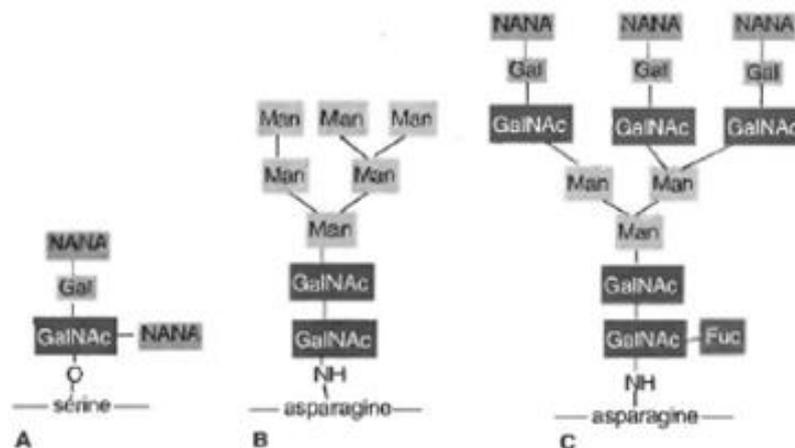
- a) les glucides liés à O (groupe glycol de la sérine, de la thréonine ou de l'hydroxylysine).
- b) les glucides liés à N (groupe amide de l'asparagine). La structure de ces glucides est différente (fig.16).

Fig. 16: Structure d'oligosaccharides liés à Net à O.

A) Oligosaccharide lié à O (oxygène des groupes hydroxyles de la sérine, ou de la thréonine).

B) Oligosaccharide lié à N (azote amide de l'asparagine), type à mannose prédominant.

C) Oligosaccharide lié à N, type complexe. NANA, N-acétylneuraminique ; Gal, galactose ; GlcNAc, N-acétylglucosamine ; GalNAc, N-acétylgalactosamine; Man, mannose; Fuc, fucose.



Nous prendrons comme exemple l'accrochage des glucides liés à l'Asparagine (glucides N-liés). Le précurseur de tous les glucides liés à N est commun pour toutes les cellules: c'est un oligosaccharide comprenant 14 résidus glucidiques dont le mannose est un sucre très majoritaire. Ce précurseur lié à 2 phosphates, donc « activé », et fixé à un élément lipidique de la membrane du RER est transféré en bloc à la chaîne polypeptidique en cours d'élongation.

La liaison se fait grâce à une glycosyl-transférase et aux dépens de 1 'énergie contenue dans les liaisons phosphate (fig. 17).

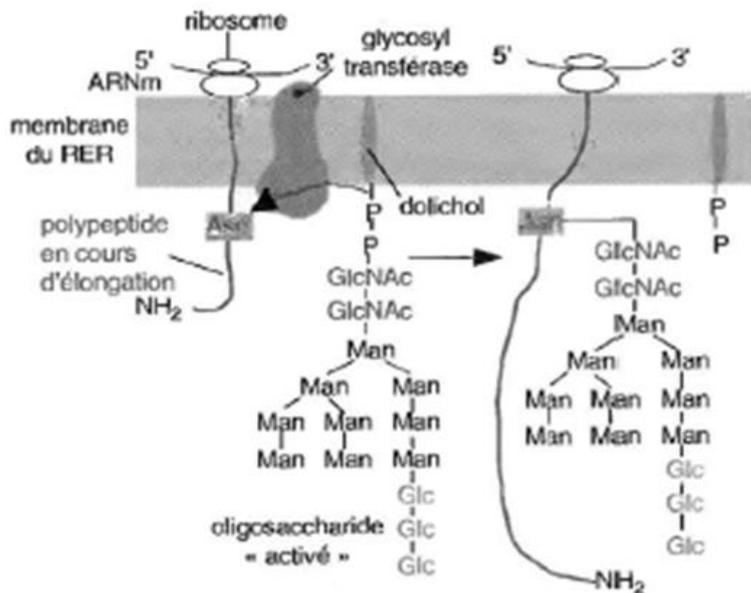


Fig. 17 : Glycosylation dans le RER. Transfert catalytique en bloc d'un oligosaccharide activé du dolichol (son transporteur) au résidu asparagine d'un polypeptide en cours de synthèse.

On peut distinguer deux régions dans l'antenne glucidique :

- **une région proximale** : qui ne sera pas changée ; elle est définitive ;
- **une région terminale** : riche en mannose et en glucose, qui sera remaniée (fig. 18, A).

Dans l'appareil de Golgi les protéines glycosylées subissent des transformations portant sur la structure et la composition de l'oligosaccharide.

Par l'action séquentielle de glycosidases qui élaguent (par exemple des mannosidases) et de glycosyl-transférases qui accrochent des sucres (galactose, fucose, NANA), la région terminale est transformée de façon très spécifique et programmée (fig. 18, B). En effet, cette transformation provient de l'intervention dans un ordre déterminé d'enzymes qui reconnaissent pour substrat le produit de la réaction précédente. C'est donc la spécificité des enzymes insérées dans les membranes (codées par le génome nucléaire) qui définit le type d'oligosaccharide mis en place. Il a été montré que l'élagage intervenait dans la face cis et surtout dans le compartiment médian de l'appareil de Golgi, alors que l'addition de nouveaux sucres (par les galactosyl-transférases, les fucosyl-transférases...) intervenait sur la face trans de l'appareil de Golgi (fig. 19).

Contrairement à ce qui a été vu pour les protéines, la séquence oligosaccharidique est donc obtenue non pas à l'aide d'une matrice mais grâce à l'activité séquentielle et coordonnée de plusieurs systèmes enzymatiques fixés sur les membranes des compartiments.

• Sulfatation

Par des expériences d'autoradiographie avec du soufre marqué on peut aussi visualiser les niveaux où des groupements sulfate sont accrochés à des protéines. Ainsi en utilisant l'isotope ^{35}S on peut observer un marquage dans les dictyosomes des cellules à mucus ; quand elle a lieu, la sulfatation des protéines se fait aussi dans l'appareil de Golgi grâce à l'intervention de sulfo-transférases liées à la membrane dans la face trans (fig. 19).

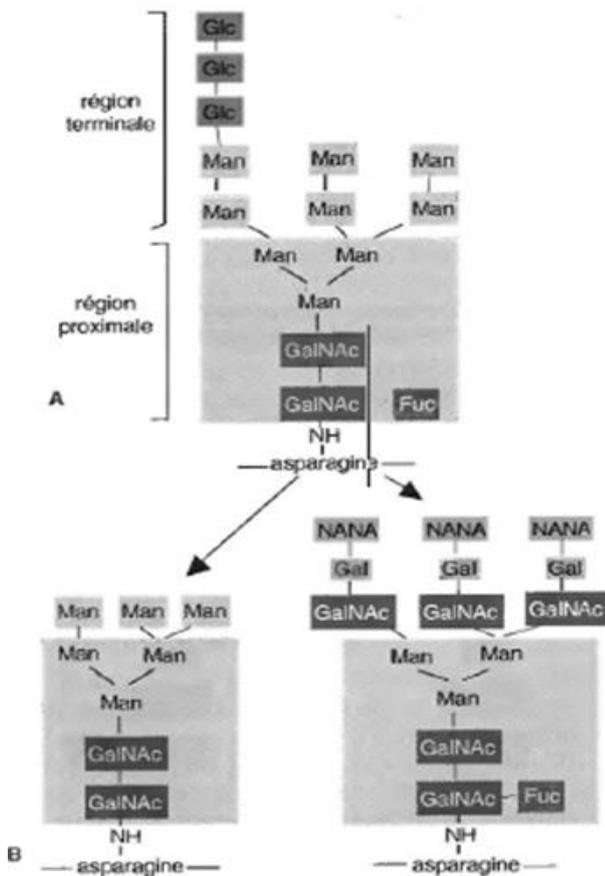


Fig. 18: Exemples de modifications des oligosaccharides par élagage et addition de nouveaux sucres.

A) Motif oligosaccharidique transféré en bloc pendant la synthèse sur le RER; il comprend une région proximale (en grisé) définitive et une région terminale qui sera remaniée.

B) Oligosaccharides matures après remaniements dans l'appareil de Golgi.

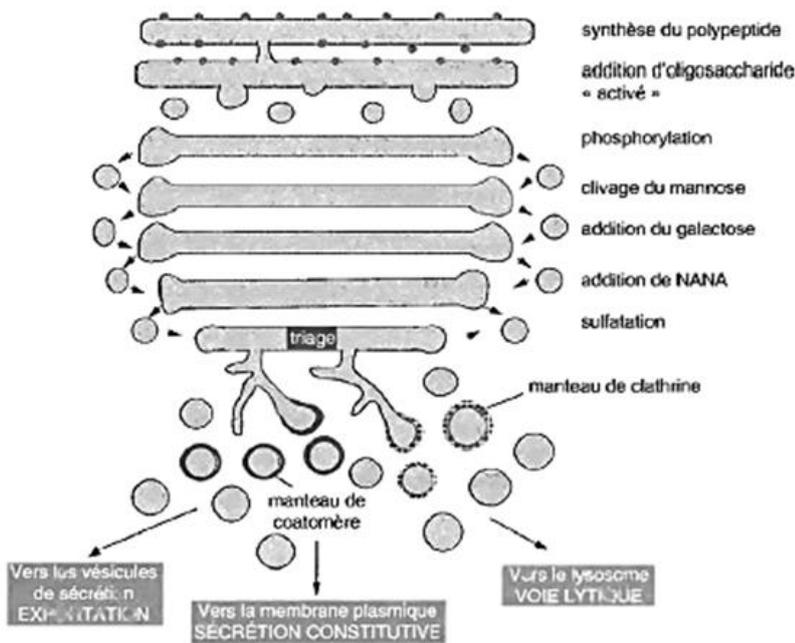


Fig. 19: Compartimentation dans l'appareil de Golgi.

Quelques étapes de maturation et les trois principales destinations après tri dans la face trans du dictyosome et le réseau trans-golgien.

D. Adressage des protéines

Il est admis que la glycosylation des protéines sert probablement de moyen de protection de celles-ci contre d'éventuelles attaques enzymatiques au cours de leur transit.

Mais le rôle le plus important des chaînes latérales glycosylées est sans doute de permettre l'adressage des protéines vers la bonne destination.

L'appareil de Golgi est considéré comme un centre de tri à partir duquel 3 voies principales peuvent être suivies par les protéines dans les cellules animales (fig. 19):

- **l'exportation à l'extérieur de la cellule** : Elle se fait par des vésicules souvent couvertes de clathrine qui bourgeonnent sur la face trans des dictyosomes (TGN), perdent ensuite leur revêtement de clathrine et peuvent ensuite fusionner avec le plasmalemme pour permettre l'exocytose. Les séquences oligosaccharidiques servent d'étiquette pour cet adressage.

- **l'incorporation à la membrane plasmique** : pour en permettre le recyclage: c'est ce que l'on appelle la sécrétion constitutive. Pour cette voie très importante (elle permet le renouvellement de la membrane plasmique) le code d'adressage n'est pas parfaitement connu. Il est possible que cette voie corresponde à un adressage par défaut d'étiquette. Les vésicules de transport possèdent généralement un manteau de coatomère.

- **la voie lysosomale**, ou voie lytique pour laquelle 1 'étiquette, est un mannose-6-phosphate. Les vésicules de transport de cette voie sont couvertes de clathrine.

Dans les cellules qui présentent une nette polarité, c'est probablement aussi au niveau de l'appareil de Golgi que se fait le tri entre les protéines destinées au pôle apical et celles destinées au pôle basolatéral.

2.3. BIOGENÈSE DES LYSOSOMES: UN EXEMPLE DE TRI ET D'ADRESSAGE DES GLYCOPROTÉINES :

Les lysosomes reçoivent du matériel à dégrader par 3 voies différentes.

Une question est de savoir comment se fait la biosynthèse à la fois des hydrolases stockées dans les lysosomes et des protéines qui constituent leurs membranes.

On connaît assez bien les mécanismes qui permettent la synthèse, le transport et l'adressage des hydrolases lysosomales dans les cellules animales.

Comme pour les protéines exportables, les hydrolases lysosomales sont synthétisées sur le RER. Grâce à une séquence signal, elles peuvent passer dans la cavité du RER et transiter ensuite par l'appareil de Golgi selon le processus habituel. Les vésicules de transport qui délivrent les protéines vers les lysosomes bourgeonnent du réseau trans-golgien (TGN).

Ces vésicules doivent incorporer les protéines lysosomales en excluant les autres. La question est donc de comprendre comment les protéines lysosomales sont reconnues et choisies de façon aussi précise.

A. Les protéines lysosomales sont triées par un récepteur du mannose-6-phosphate :

C'est rattachage d'un marqueur qui donne aux hydrolases lysosomales l'« étiquette » indiquant la bonne adresse à laquelle elles doivent être livrées. Ce marqueur est apparemment le même pour toutes les hydrolases: c'est le mannose-6-phosphate (M6P), c'est-à-dire un résidu mannose terminal sur lequel un groupement phosphate a été lié et qui est attaché aux oligosaccharides de ces protéines (fig. 20).

L'accrochage du marqueur se fait relativement tôt, dès le compartiment cis des dictyosomes (fig. 21).

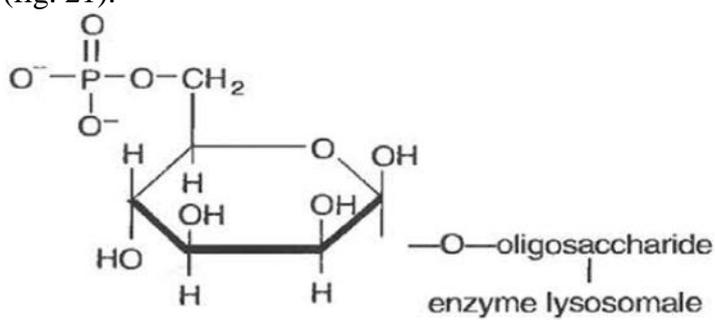


Fig. 20 : Le mannose-6 phosphate, marqueur des enzymes lysosomales.

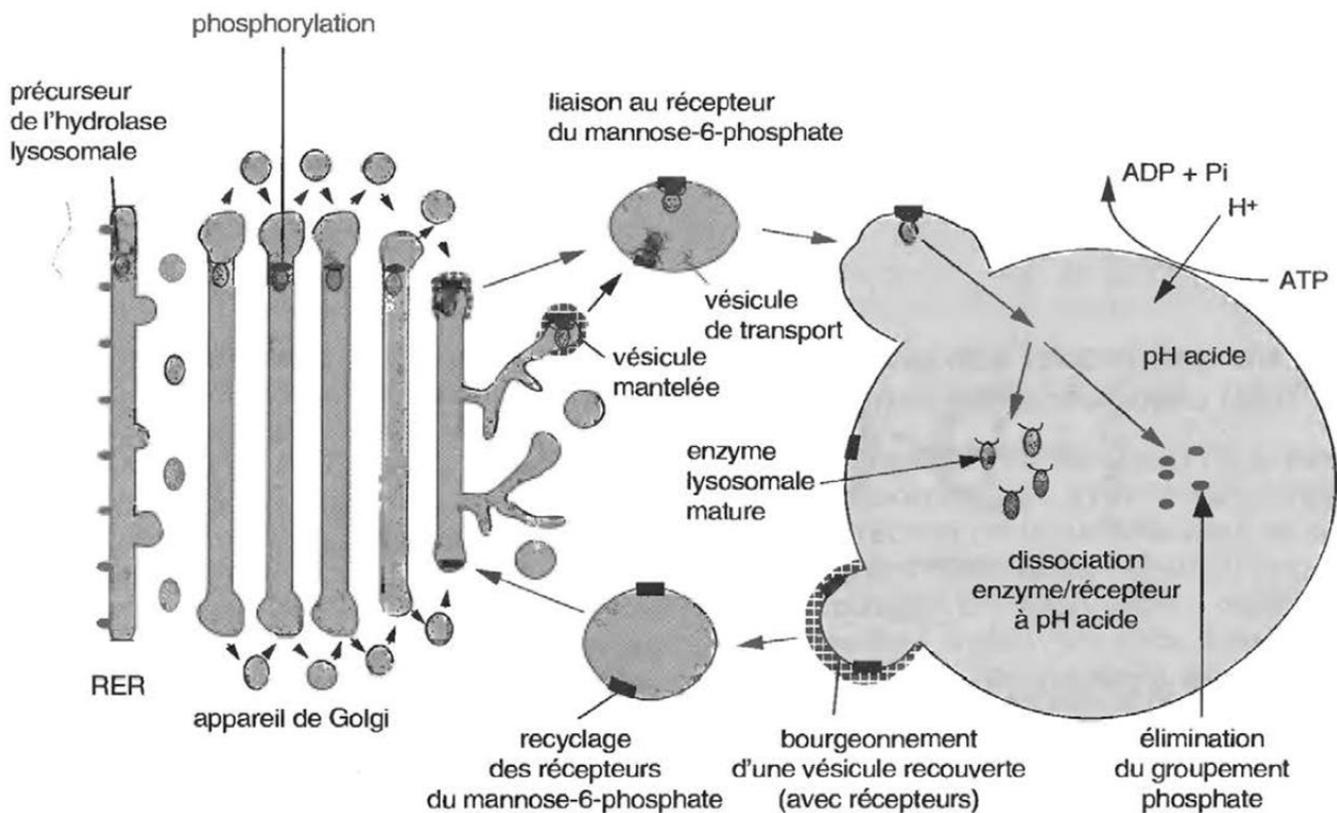


Fig.21 : Biosynthèse des hydrolases lysosomales, adressage aux lysosomes, déchargement et navette des récepteurs.

Les protéines ainsi marquées sont reconnues par des récepteurs complémentaires localisés dans les membranes des dictyosomes et tournés vers la face luminale. Après s'être chargés des protéines, ces récepteurs se regroupent, se concentrent sur le réseau trans-golgien en vésicules couvertes de clathrine et bourgeonnent en formant des vésicules mantelées spécialisées dans le transport de protéines lysosomales. Au cours de leur transport les vésicules perdent leur manteau et sont dirigées vers les lysosomes avec lesquels elles peuvent fusionner. Cette étape, là encore, fait intervenir d'autres protéines qui permettent une reconnaissance des membranes entre elles et leur fusion (fig. 21).

B. Navette des récepteurs du mannose-6-phosphate (M6P) :

Après la fusion des vésicules et de la membrane du lysosome, les hydrolases se dissocient des récepteurs membranaires et sont donc libérées dans la cavité du lysosome où elles peuvent éventuellement « attaquer » les substances à hydrolyser. Cette dissociation est permise par le pH qui règne dans le lysosome. Des expériences *in vitro* montrent en effet que les récepteurs se lient à l'oligosaccharide spécifique à pH 7 et commencent à se détacher à pH voisin de 6 (rappelons que le pH des lysosomes est voisin de 5). Les hydrolases peuvent parfois se détacher dans des vésicules pré-lysosomales, dont le contenu est acide.

Une fois libérés, les récepteurs du M6P se regroupent géographiquement dans le lysosome dans un secteur qui se recouvre de clathrine et bourgeonne en formant une vésicule mantelée. Au cours de la migration les vésicules mantelées perdent leur manteau et peuvent à nouveau fusionner avec les membranes golgiennes dans le TGN, assurant ainsi un recyclage des récepteurs (fig.21).

2.4. DIGESTION INTRACELLULAIRE ET DÉTOXICATION

A. Les lysosomes, estomacs cellulaires

Grâce aux enzymes qu'ils contiennent, les lysosomes permettent une digestion intracellulaire. Ces digestions sont de deux sortes : les phénomènes d'autophagie ou d'hétérophagie.

• **Phénomènes d'autophagie :** C'est ce qui permet l'auto-entretien des constituants cellulaires. La digestion se fait dans les vacuoles autophagiques où sont digérées les propres substances de la cellule. Deux voies sont possibles (fig. 22):

- invagination de la surface des lysosomes permettant la capture et l'englobement d'un matériel cytoplasmique. C'est un mécanisme fréquemment observé dans les cellules végétales ;
- encerclement et isolement d'une portion de cytoplasme par une lame de réticulum endoplasmique. Des hydrolases sont déversées et les différents organites du territoire séquestré sont dégradés (mitochondries, plastes, plages de glycogène ...).

La vitesse d'autophagie est surprenante. Dans certains organes, surtout le foie et le rein, l'autophagie est un mécanisme régulier. Ainsi une cellule hépatique détruit en moyenne la majeure partie de son contenu en une semaine.

Pour 1 gramme de cellules hépatiques, 1 milliard de mitochondries sont détruites par heure, ce qui signifie que les mitochondries sont renouvelées 15 fois pendant la demi-vie d'une cellule hépatique (soit 150 jours).

Dans d'autres systèmes l'autophagie est un événement ponctuel. Elle peut intervenir pour assurer le nettoyage des vieux organites. C'est le cas aussi des tissus ou des organes qui involuent, par exemple lors des métamorphoses des insectes ou des amphibiens. Sous l'influence d'un stimulus hormonal, les organes (en particulier les muscles) sont digérés et les monomères libérés sont récupérés pour la construction de nouveaux tissus. L'autophagie intervient aussi pour assurer la régulation de la sécrétion lors du sevrage des femelles chez les mammifères : la sécrétion du lait continue mais il n'y a plus de décharge ; les lysosomes assurent la destruction des grains de sécrétion et même des structures impliquées dans leur synthèse (RER, ribosomes ...).

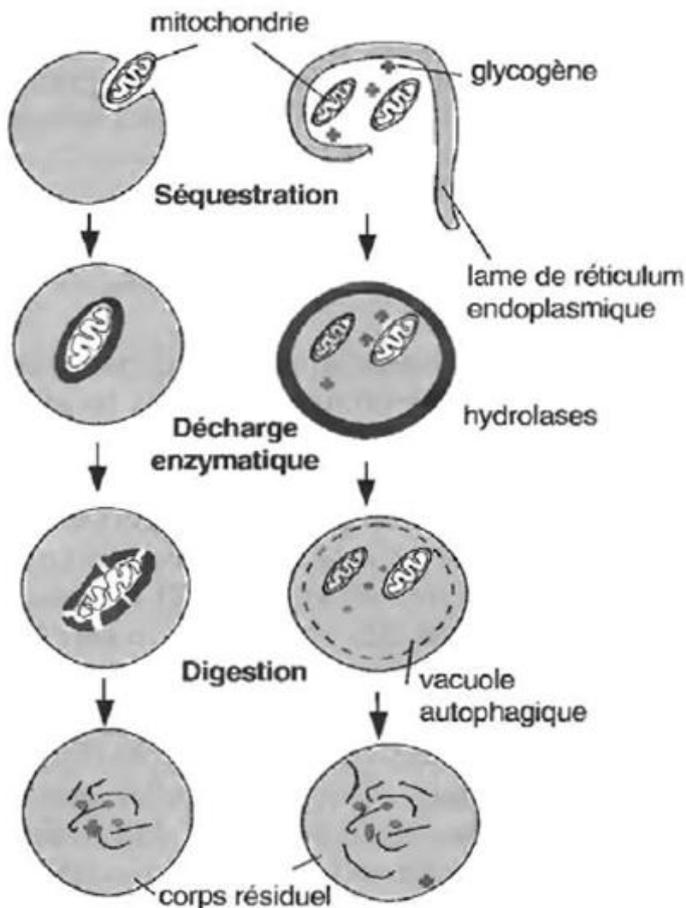


Fig.22 : Deux voies de formation des vacuoles autophagiques.

• **Phénomènes d'hétérophagie** : Ce sont les mécanismes de phagocytose et de pinocytose qui permettent de digérer des matériaux d'origine exogène.

Les macrophages sont des cellules spécialisées dans la phagocytose. Disséminés dans les tissus, en particulier dans les poumons, les macrophages sont spécialisés dans le nettoyage.

Après la digestion intra-lysosomale, la cellule récupère les produits de la digestion (acides aminés, sucres, nucléotides ...) qui traversent la membrane du lysosome, probablement grâce à des transporteurs. Quelques bactéries sont irréductibles : c'est le cas des bactéries de la lèpre qui vivent très bien dans les lysosomes, se trouvant ainsi à l'abri des défenses immunitaires.

De nombreux protozoaires se nourrissent de cette façon. Après digestion intracellulaire des matériaux exogènes, les déchets non utilisés peuvent être expulsés par exocytose ou stockés dans la cellule formant des corps résiduels.

La pinocytose est un mécanisme très général permettant la réabsorption de protéines. Leur dégradation et leur réutilisation par les cellules. C'est le mécanisme qui permet aux cellules rénales des tubes contournés de récupérer les molécules protéiques qui ont filtré dans l'espace urinaire au niveau des glomérules ; de même dans le foie les protéines sont retirées du plasma sanguin, dégradées par les lysosomes et récupérées par les cellules.

L'exemple des cellules folliculeuses de la glande thyroïde dans lesquelles la production de l'hormone thyroïdienne est en partie le résultat d'une activité de pinocytose est un bon modèle illustrant les phénomènes d'hétérophagie (fig. 23). Le précurseur de l'hormone est la thyroglobuline, protéine exportable synthétisée au niveau du RER avec une séquence signal.

La protéine transite dans les compartiments intracellulaires où elle subit une maturation (en particulier des glycosylations) et s'accumule dans la lumière des follicules. Dans cette région la

thyroglobuline subit une iodination, c'est-à-dire que de l'iode est attaché aux résidus tyrosine): elle constitue ce que l'on appelle le colloïde formé de thyroglobuline inactive. Sous l'influence de stimuli hormonaux (action de l'adénohypophyse) la thyroglobuline est internalisée par pinocytose, stockée dans des vésicules formant des gouttes de colloïde intracellulaires, déversées dans des endo-lysosomes qui reçoivent des hydrolases du réseau trans-golgien.

Dans les lysosomes matures la dégradation de la thyroglobuline intervient : elle libère des sucres, des acides aminés et des résidus di-peptidiques de tyrosine iodée qui peuvent sortir du lysosome. Les dipeptides iodés qui constituent l'hormone thyroïdienne active franchissent la membrane plasmique de la région basale des cellules et peuvent ainsi entrer dans la circulation sanguine.

Dans ce cas il y a donc synthèse d'une énorme molécule inactive qui par un système de régulation de type hétérophagique sous contrôle hormonal aboutit à la formation d'un dipeptide actif.

L'hétérophagie permet dans de nombreux cas un stockage temporaire des réserves.

Dans les organismes animaux elle intervient dans les œufs. Il a été vu précédemment que dans les œufs la vitellogénine est internalisée dans les cellules par pinocytose et est stockée sous la forme de phosphoprotéines dans des systèmes clos formant les grains de vitellus.

Ces réserves ne sont pas utilisées directement par l'embryon mais sont dégradées dans les lysosomes quand cela est nécessaire libérant ainsi des acides aminés phosphatés directement utilisables.

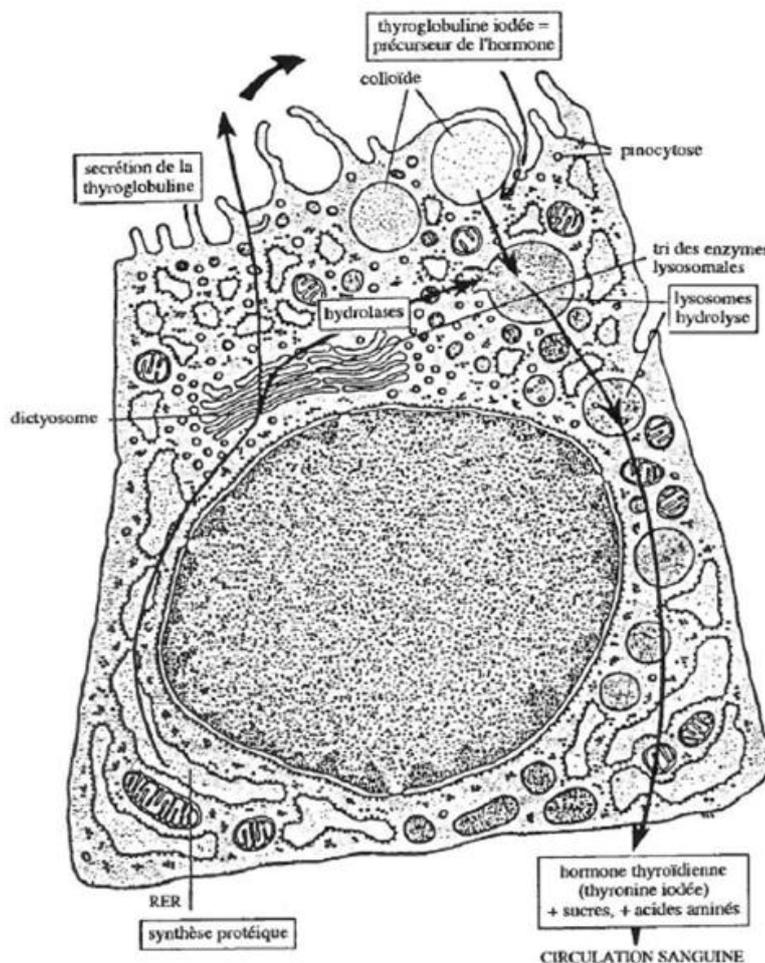


Fig.23 : Biosynthèse de la thyroglobuline, endocytose et digestion lysosomale.

1.2. MÉTHODES D'APPROCHE ET COMPOSITION CHIMIQUE

A. Isolement, purification et identification de fractions

Les méthodes de fractionnement cellulaire ont été détaillées dans d'autres chapitres (voir en particulier les chapitres concernant la membrane plasmique et la traduction). Rappelons que les membranes des compartiments intracellulaires se retrouvent dans le culot post-mitochondrial: elles constituent la *fraction microsomes* à partir de laquelle il est possible de séparer les **microsomes lisses**, c'est-à-dire les membranes du réticulum endoplasmique lisse (SER) et de l'appareil de Golgi, et les **microsomes rugueux**, c'est-à-dire les membranes du RER (voir p. 228).

Pour ce *qui* est des lysosomes, il est difficile de donner une technique précise. La taille des lysosomes est en effet très variable et dépend du type cellulaire. En règle générale, les lysosomes peuvent être récupérés dans les premières étapes de la centrifugation différentielle, à des vitesses voisines de celles qui permettent de sédimenter les mitochondries. Les conditions de préparation sont très délicates: en particulier il est important de protéger la membrane des lysosomes des chocs osmotiques pour éviter la « fuite » des enzymes lysosomales.

Pour établir la composition biochimique des différents compartiments, le premier problème est un problème d'**identification** des compartiments dans les fractions obtenues. Pour cela il est nécessaire de disposer de marqueurs. Les marqueurs les plus utilisés sont les **marqueurs enzymatiques**, certaines enzymes étant spécifiques de tel ou tel compartiment (*fig. VII-6*). Ce sont des enzymes qui sont enchâssées dans la bicouche lipidique. Il est très difficile de donner des indications sur la composition chimique des différents compartiments internes (membranes et contenus): elle est en effet très variable selon les types cellulaires et même au sein d'un même compartiment. En revanche, les méthodes de la cytochimie ultrastructurale permettent maintenant une approche nouvelle riche en informations.

| | Épaisseur des membranes | « Marqueurs » de fractions |
|-------------------------|-------------------------|---|
| Réticulum endoplasmique | 5-6 nm | glucose-6-phosphatase cytochrome P-450 cytochrome b5 réductase |
| Appareil de Golgi | 6-7,5 nm | nucléosides diphosphatases glycosyltransférases sulfotransférases |
| Lysosomes et vacuoles | 7,5 nm | nucléases phosphatases phospholipases glycosidases protéases... |

Fig. VII-6: Quelques caractéristiques biochimiques et structurales des compartiments endomembranaires.

B. Cytochimie ultrastructurale

La cytochimie ultrastructurale permet de connaître la nature des composés liés aux membranes ou contenus dans les compartiments spécialisés. Plusieurs approches sont maintenant possibles.

a. Recherche de composés chimiques: exemple des polysaccharides

Parmi les composés détectables *in situ*, les polysaccharides ont fait l'objet de nombreuses visualisations. En particulier le test PATAg permet de localiser les polysaccharides à l'échelle ultrastructurale. Le principe a été détaillé dans le chapitre concernant les glucides (voir chap. V, 1re partie).

L'utilisation du test PATAg est particulièrement intéressante pour détecter en place les éléments de l'appareil de Golgi spécialisés dans la synthèse et la transformation des polysaccharides. Selon les types cellulaires, on peut ainsi observer un marquage plus ou moins important des extrémités renflées des saccules golgiens et surtout des vésicules dérivées sur la face *trans*, indiquant une accumulation de polysaccharides ou de glycoprotéines possédant suffisamment de motifs glucidiques pour être détectables. La **figure VII-7** montre un exemple de détection de polysaccharides dans un dictyosome et ses vésicules dérivées: il s'agit d'une cellule végétale en cours de synthèse active de polysaccharides de paroi. Une réactivité est détectable dans les vésicules de la face *trans* de l'appareil de Golgi ainsi que dans des vésicules de sécrétion qui dérivent de celui-ci. La réactivité est toutefois faible comparée à celle des grains d'amidon où les polysaccharides sont massivement réactifs.

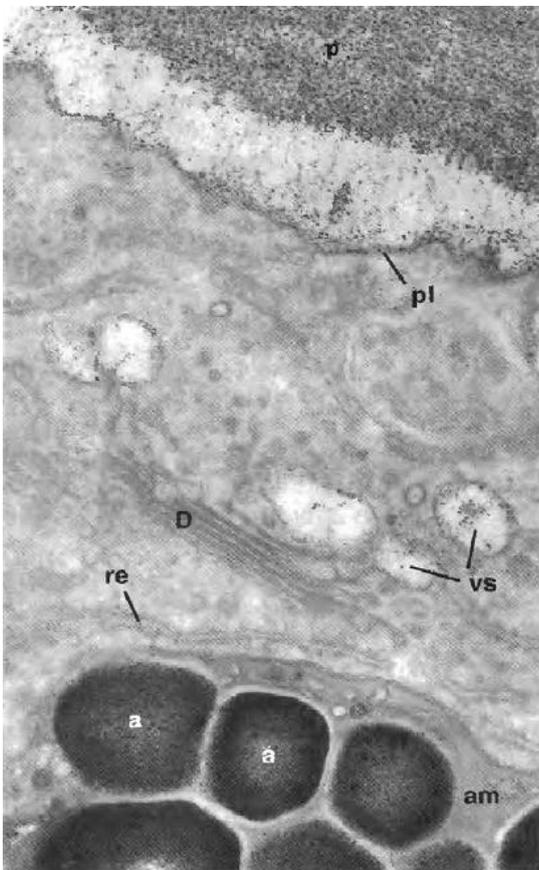


Fig. VII-7: Dictyosome contrasté par le test PATAg pour visualiser les polysaccharides. On observe une réactivité dans les vésicules de sécrétion (vs) dérivées de la face *trans* du dictyosome (D). La réactivité au test est plus intense dans la paroi (p) et dans les grains d'amidon (a) des amyloplastes (am), où les polysaccharides sont massivement présents ; pl, membrane plasmique ou plasmalemma ; re, réticulum endoplasmique. G. x 30 000. (Cliché B. VIAN.)

b. Recherche d'activités enzymatiques

La recherche d'activités enzymatiques est la méthode de choix pour repérer et identifier les compartiments endomembranaires qui transportent de nombreuses enzymes. C'est particulièrement le cas des lysosomes.

La méthode permettant cette détection est la suivante: une coupe dans un échantillon biologique fixé chimiquement (la fixation doit être suffisamment contrôlée pour que les protéines enzymatiques conservent une certaine activité) est mise en présence d'un substrat susceptible d'être dégradé. Si l'hydrolyse enzymatique a lieu, un des produits est couplé à un réactif qui précipite et

change de couleur (pour être vu en microscopie photonique) ou devient opaque aux électrons (pour être vu en microscopie électronique). Par exemple une méthode classique de recherche de phosphatases en microscopie électronique utilise une visualisation à l'aide de sels de plomb (*fig. VII-8*). Aux sites où la phosphatase est présente et active, on aura donc un précipité opaque aux électrons.

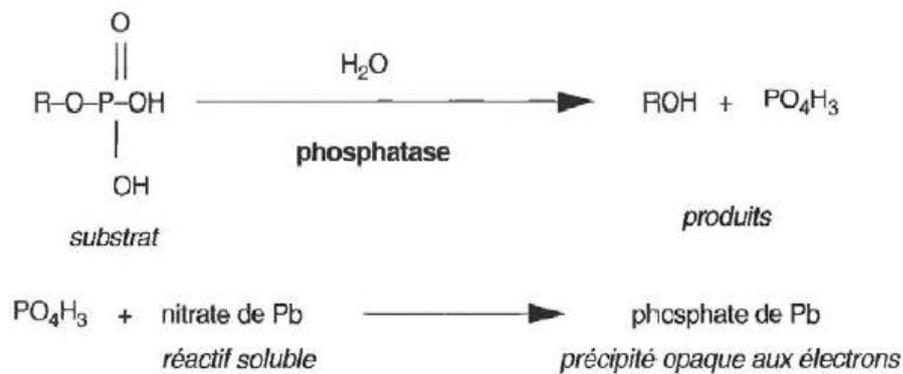


Fig. VII-8: Principe de la réaction permettant la détection d'une phosphatase

Le principe est ici très général. De nombreuses phosphatases existent qui hydrolysent spécifiquement différents substrats et à des pH très définis (phosphatases dites acides, neutres ou alcalines). Leur détection spécifique sera donc contrôlée par le *choix du substrat* et le *contrôle du pH* du milieu d'incubation. Ce type de méthode a conduit à localiser de nombreuses enzymes - ou au moins des sites où ces enzymes sont présentes sous une forme active - dans les différents compartiments endomembranaires.

En ce qui concerne les dictyosomes cette méthode permet de préciser la distribution des systèmes enzymatiques dans les *différents sous-compartiments golgiens, cis, médian et trans* (*fig. VII-9*). On voit que l'activité des enzymes associées aux membranes n'est souvent décelable que dans certains sous-compartiments qui ne seront pas les mêmes selon les enzymes recherchées. Il existe une **polarisation biochimique** des saccules golgiens. Grâce à ces détections il devient ainsi possible d'établir une « carte » des dictyosomes.

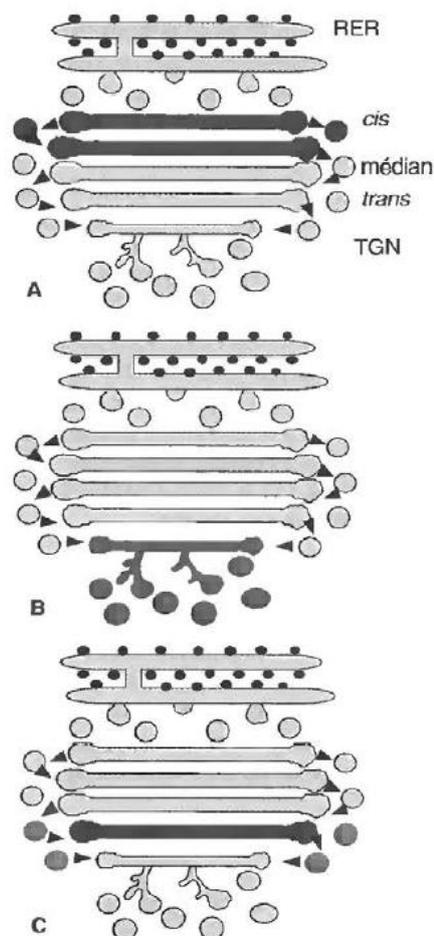


Fig. VII-9: Polarisation biochimique des dictyosomes révélée par la détection à l'échelle ultrastructurale de quelques activités enzymatiques.

A) Détection de la NAD-phosphatase.
 B) Détection d'une phosphatase acide.
 C) Détection de la nucléoside-diphosphatase.

c. Détection immunocytochimique des composants membranaires ou des contenus intracisternaux

C'est actuellement la méthode la plus utilisée dans la mesure où elle atteint un degré de spécificité difficile à obtenir avec les autres méthodes. Le principe de l'immunocytochimie a déjà été développé dans d'autres chapitres (voir en particulier le chapitre concernant les protéines dans la 1^{re} partie, p. 90). On prépare des anticorps aussi purs que possibles dirigés contre tel ou tel composant (antigène) présent dans un organite. Les anticorps sont ensuite utilisés comme **sondes** pour rechercher l'antigène *in situ*, aussi bien en microscopie optique (grâce à des marqueurs fluorescents) qu'en microscopie électronique (grâce à des marqueurs métalliques visibles, par exemple l'or colloïdal).

Deux objectifs peuvent être poursuivis:

- soit la recherche des *macromolécules qui font partie intégrante des membranes des compartiments*;
- soit l'identification des *macromolécules qui sont contenues dans les compartiments et éventuellement destinées à être exportées*.

C. Autoradiographie

La méthode d'autoradiographie permet de repérer les lieux de synthèse et de suivre éventuellement le cheminement des molécules dans la cellule après leur synthèse. Les résultats obtenus avec ce type de méthode seront analysés en détail dans l'expérience de JAMIESON et PALADE (voir p. 300).