

Modifications rapides du système lysosomal hépatique du rat en fonction de l'état nutritionnel

par B. LARDEUX, Geneviève BOURDEL, Bozena ANTOSZEWSKA *

avec la collaboration technique de Marguerite FORESTIER et Betty GOUHOT

Centre de Recherches sur la Nutrition du C. N. R. S.,
9, rue Jules Hetzel, 91290, Meudon Bellevue, France.

* Polish Academy of Sciences.

Institute of Genetics and animal Breeding.
Jastrzebiec 05-551 Mrokow, Poland.

Summary. *Influence of protein ingestion on the isopycnic distribution pattern of rat liver lysosomes.*

Adult rats fed proteins as a meal given during the daytime exhibit alterations of liver protein metabolism characterized by simultaneous stimulations of protein synthesis and degradation, particularly during the hours following protein ingestion. The purpose of the present work was to determine if the stimulation of liver protein breakdown could be related to biophysical alterations of the lysosomal system. There is a growing amount of evidence to suggest that the lysosomal vacuolar system is involved in the physiological regulation of overall proteolytic rate.

Rats, trained to eat a protein meal 2 hrs after the onset of light, were killed 6, 9, 18, 21 and 24 hrs after protein intake. Three fractions were isolated from 0.25 M sucrose liver homogenates after differential centrifugation. The mitochondrial-lysosomal fraction was further analyzed by isopycnic centrifugation in sucrose gradients. Three specific lysosomal enzyme activities were assessed : N-acetyl- β -D glucosaminidase (marker), cathepsin D and cathepsin C (proteolytic enzymes).

Total activities remained unchanged at all time-points, but the distributions between the different fractions recovered after differential centrifugation were altered 6 and 9 hrs after protein intake. A significantly higher percentage of N-acetyl- β -D-glucosaminidase, cathepsin D and cathepsin C activities were recovered in the M + L fraction, suggesting a shift towards lysosomal forms of lighter density. This was confirmed by density gradient analysis.

Thus, even in adapted rats, acute administration of protein during the daytime quickly induced biophysical alterations in the lysosomal system. The lysosomal distribution pattern observed at 6 and 9 hrs after protein intake might be due to lysosome enlargement by active autophagy and/or by the sequestration of lighter cellular material.

Introduction.

Le système lysosomal dans le foie représente très probablement un des sites majeurs de la dégradation des protéines intracellulaires. Des altérations biophysiques et morphologiques des lysosomes ont été observées en association avec la stimulation

de la protéolyse sur foie perfusé (Neely, Nelson et Mortimore, 1974 ; Neely *et al.*, 1977 ; Ward, Cox et Mortimore, 1977 ; Mortimore et Schworer, 1977), sur hépatocytes isolés (Seglen et Reith, 1976 ; Seglen et Solheim, 1977) ou après injection de glucagon, hormone stimulant la dégradation des protéines (Deter et de Duve, 1967 ; Deter, 1971).

Des travaux récents de l'équipe de Khairallah (1978) ont montré *in vivo* après un repas complet, une diminution très rapide de la vitesse de dégradation des protéines du foie associée à une diminution du nombre et de la taille des lysosomes et surtout des vacuoles autophagiques. Dans notre laboratoire, nous avons observé des modifications rapides et importantes du métabolisme protéique hépatique après la consommation des protéines sous forme d'un repas ponctuel au cours de la période diurne (Lardeux, Bourdel et Girard-Globa, 1978). Ces résultats nous ont amené à conclure, à l'existence d'une stimulation simultanée de la synthèse et de la dégradation des protéines, allant de pair avec une augmentation de la néoglucogenèse et de l'uréogénèse (Lardeux, Bourdel et Girard-Globa, 1978 ; Peret, Chanez et Bois, 1978), qui pourrait être liée à des altérations rapides de l'équilibre hormonal : élévation du glucagon porte (Jarousse *et al.*, 1980) et de l'AMP cyclique du foie (données non publiées). Nous avons recherché, dans ces conditions expérimentales, si des modifications biophysiques du système lysosomal pouvaient apparaître parallèlement à la stimulation de la dégradation protéique dans le foie.

Matériel et méthodes.

a. *Animaux.* — Des rats mâles Sprague-Dawley de 250 à 300 g sont soumis à l'alimentation séparée pendant une période de 3 semaines. Le repas protéique (90 p. 100 caséine), administré 2 h après le début de la période diurne, est rapidement consommé (20-30 min). Les rats disposent ensuite d'un régime protéoprive qu'ils consomment librement et *ad libitum*. L'analyse de la consommation spontanée de ce régime met en évidence une désynchronisation entre les apports protéique et énergétique. En effet, au cours des 6 h qui suivent le repas protéique, les animaux consomment seulement 16.2 p. 100 de l'ingéré protéoprive total alors que plus de 60 p. 100 des protéines ont déjà quitté l'estomac (Bourdel, données non publiées).

Deux groupes de 9 rats sont sacrifiés soit pendant la période diurne (6 et 9 h après le repas protéique) soit pendant la période nocturne (18 et 21 h après ce repas). Un groupe de 6 rats est sacrifié immédiatement avant le repas protéique (Oh) soit 24 h après le repas précédent.

b. *Dosages.* — Les lysosomes sont caractérisés par les activités de la N-acétyl β -D-glucosaminidase (Carroll, 1978) et des cathepsines D et C (Barrett, 1972 ; Mettrione, Neves et Fruton, 1966). Les mitochondries ont été étudiées en suivant l'activité ornithine carbamyl transférase (Schimke, 1962). Les protéines ont également été dosées (Lowry *et al.*, 1951).

c. *Fractions subcellulaires du foie et gradient de densité.* — Après homogénéisation du foie dans un milieu isotonique (saccharose 0.25 M) 3 fractions subcellulaires sont obtenues par centrifugation différentielle. La fraction C₁, culot de première centrifu-

gation à $5\,000 \times g$ pendant 2 min contient les noyaux, les débris cellulaires et une partie importante de mitochondries. La fraction C_2 , culot de deuxième centrifugation à $12\,500 \times g$ pendant 20 min, correspond à la fraction mitochondries-lysosomes ($M + L$). La fraction S_2 correspond au surnageant postmitochondrial. Les résultats de répartition entre les fractions C_1 et C_2 exprimés par le rapport C_2/C_1 (fig. 1) nous permettent d'apprécier les caractéristiques de sédimentation des particules subcellulaires.

La distribution de densité des lysosomes contenus dans la fraction C_2 est déterminée en suivant l'activité lysosomale N-acétyl β -D-glucosaminidase dans les différentes fractions d'un gradient de saccharose (35-50 p. 100) après ultracentrifugation à $150\,000 \times g$ pendant 95 min.

Résultats.

Les résultats présentés dans la figure 1 montrent une localisation préférentielle des mitochondries dans la fraction C_1 (rapport C_2/C_1 nettement inférieur à 1) alors que nous retrouvons seulement 5 p. 100 de l'activité mitochondriale dans la fraction S_2 . La répartition des protéines entre les 2 fractions est parallèle à celle de l'activité ornithine carbamyltransférase. Par ailleurs, il n'apparaît pas de modifications impor-

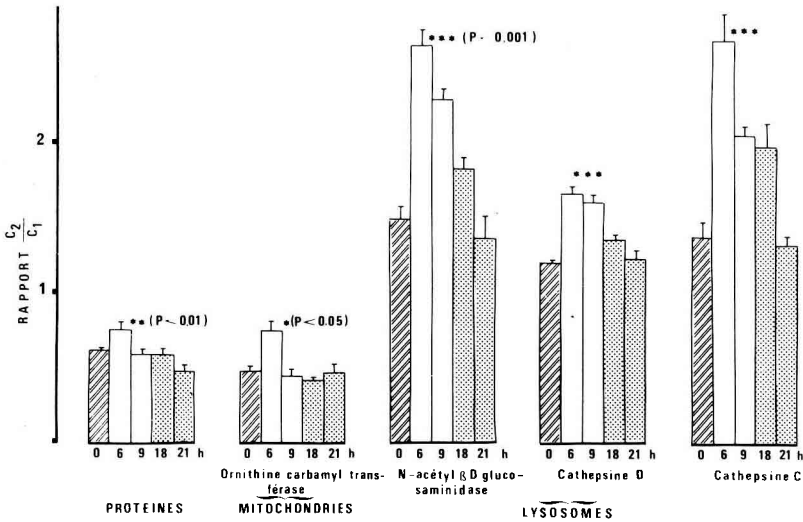


FIG. 1. — Distribution subcellulaire des protéines, mitochondries et lysosomes en fonction du temps après le repas protéique. Le foie est homogénéisé dans un milieu saccharose 0,25 M et les culots de sédimentation C_1 et C_2 sont obtenus par centrifugation différentielle respectivement à $5\,000 \times g$ (2 min) et $12\,500 \times g$ (20 min). Les protéines et les activités enzymatiques mitochondriales (ornithine carbamyl transférase) et lysosomales (N-Acétyl β -D-glucosaminidase, cathepsine D et cathepsine C) sont déterminées dans chacun des 2 culots. Le rapport des valeurs (C_2/C_1) est représenté sous forme d'un histogramme en fonction du temps après la consommation des protéines : 6 et 9 h (blanc), 18 et 21 h (grisé) et 0 h ou 24 h (hachuré). Les valeurs sont les moyennes \pm erreur type. Les différences significatives (* : $P < 0,05$), ** : $P < 0,01$ et *** : $P < 0,001$) résultent de l'analyse orthogonale comparant le groupe 6-9 h au groupe 18-21-0 h.

tantes en fonction du temps après le repas protéique, si ce n'est la légère augmentation de ce rapport 6 h après le repas, à la fois au niveau des protéines et des mitochondries. En ce qui concerne les lysosomes, les activités de la N-acétyl β -D-glucosaminidase et de deux enzymes protéolytiques montrent une localisation préférentielle dans la fraction C_2 . Le surnageant post-mitochondrial (S_2) ne contient que 10 à 15 p. 100 des activités enzymatiques. L'évolution en fonction du temps après le repas protéique est parallèle pour les 3 enzymes lysosomales et montre une nette augmentation 6 et 9 h après ce repas dans la fraction C_2 . De plus, 18 et 21 h après, le rapport C_2/C_1 n'est pas différent de celui observé immédiatement avant le repas protéique (0 h).

Les résultats concernant la distribution isopycnique de la population lysosomale contenue dans la fraction C_2 sont illustrés dans les figures 2a et 2b. Nous avons comparé la distribution de la N-acétyl β -D-glucosaminidase 6 et 18 h (fig. 2a) ou 9 et 21 h (fig. 2b) après la consommation des protéines à celle observée immédiatement avant (0 h). On observe une augmentation importante de l'activité lysosomale dans les fractions légères ($d = 1,149$ à $1,180$) du gradient pour les groupes 6 et 9 h alors que la distribution des groupes 18 et 21 h est identique à celle du groupe 0 h.

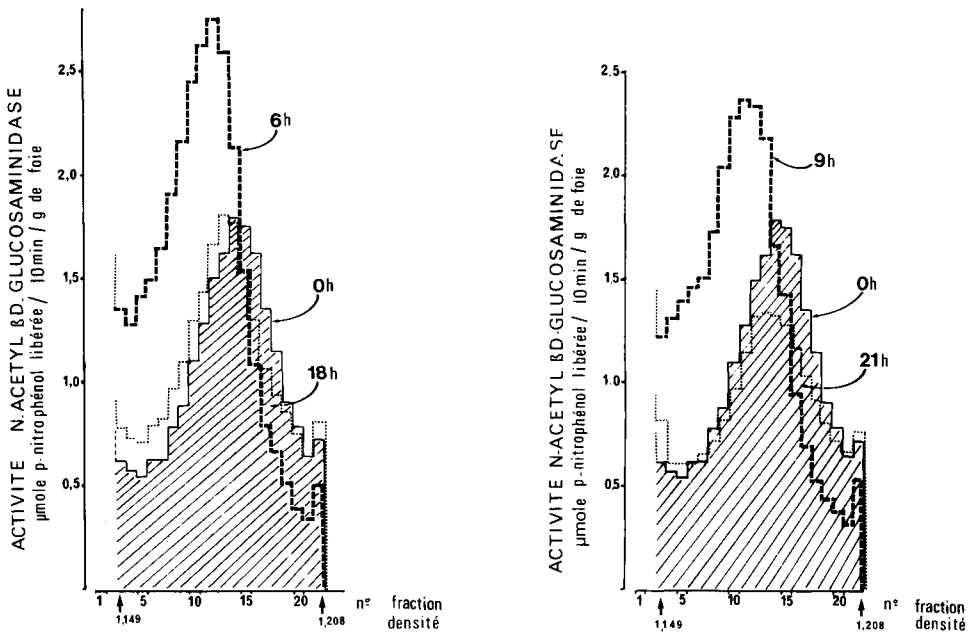


FIG. 2. — Distribution de l'activité lysosomale N-Acétyl β -D-glucosaminidase sur gradient de densité de saccharose. Les lysosomes de la fraction C_2 (0,5 ml) sont analysés sur gradient linéaire de saccharose (35-50 p. 100) après ultracentrifugation à $150\,000 \times g$ pendant 95 min ($4^\circ C$). L'activité lysosomale est déterminée dans chacune des 22 fractions du gradient. Figure 2a représente les répartitions 6 et 18 h après le repas protéique comparées à celle immédiatement avant le repas (0 h). Figure 2b représente les répartitions 9 et 21 h après le repas protéique également comparées à 0 h. Pour chacun des groupes 6, 9, 18 et 12 h la distribution représente la moyenne de 9 rats et 6 rats pour le groupe 0 h.

Discussion.

La vitesse de sédimentation des lysosomes est donc plus lente dans les heures qui suivent la consommation des protéines. Cette modification est confirmée par les données de distribution sur gradient de densité qui indiquent un déplacement de la répartition des lysosomes vers les fractions de plus faible densité.

Ces altérations des caractéristiques biophysiques des lysosomes en fonction du temps après le repas protéique reflètent très probablement une modification de l'état d'autophagie du foie soit par une augmentation du volume des éléments du système lysosomal, soit par la séquestration de matériel intracellulaire de faible densité, soit aux deux phénomènes à la fois.

En effet, la teneur en glycogène, substance de forte densité ($d = 1,54$), diminue 6 et 9 h après le repas protéique (12,4 et 10,7 mg/mg DNA à 6 et 9 h contre 30,8, 33,3 et 31,6 mg/mg DNA à 18, 21 et 0 h), ce qui pourrait expliquer, du moins en partie, une densité plus faible du matériel cytoplasmique. En ce qui concerne les changements de taille ou de volume des éléments du système lysosomal, une étude en microscopie électronique en cours de réalisation devrait nous permettre, à partir de mesures morphométriques, d'apprécier des altérations au niveau de ces paramètres morphologiques.

6^e Réunion du groupe Développement I.N.R.A.,
Clermont-Ferrand/Theix, 22-23 mai 1980.

References

- BARRETT A. J., 1972. Lysosomes, 46-126. In DINGLE J. T., *A laboratory handbook*, North Holland Publ. Co, Amsterdam.
- CARROLL M., 1978. Characterization of protein structurally related to human N-acetyl β -D-glucosaminidase. *Biochem. J.*, **173**, 191-196.
- DETER R. L., 1971. Quantitative characterization of dense body, autophagic vacuole, and acid phosphatase-bearing particulate populations during the early phases of glucagon-induced autophagy in rat liver. *J. Cell Biol.*, **48**, 473-489.
- DETER R. L., de DUVE C., 1967. Influence of glucagon, inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J. Cell Biol.*, **33**, 437-449.
- JAROUSSE C., LARDEUX B., BOURDEL G., GIRARD-GLOBA A., ROSSELIN G., 1980. Portal insulin and glucagon in rats fed protein as a meal : immediate variations and circadian modulations. *J. Nutr.*, **110**, 1764-1773.
- KHAIRALLAH E. A., 1978. *In vivo* determination of rates of protein degradation in liver of meal-fed rats : implications of amino acids compartmentation, 89-104. In SEGAL H. L., DOYLE J. D., *Protein turnover and lysosome function*, Acad. Press, New-York.
- LARDEUX B., BOURDEL G., GIRARD-GLOBA A., 1978. Regulation of hepatic synthesis of proteins by the chronology of protein ingestion. *Biochim. Biophys. Acta*, **518**, 113-124.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- METRIONE R. M., NEVES A. G., FRUTON J. S., 1966. Purification of dipeptidyltransferase (cathepsine C). *Biochemistry*, **5**, 1597-1604.
- MORTIMORE G. E., SCHWORER C. M., 1977. Induction of autophagy by amino acid deprivation in perfused rat liver. *Nature*, **270**, 174-176.
- NEELY A. N., COX J. R., FORTNEY J. A., SCHWORER C. M., MORTIMORE G. E., 1977. Alterations of lysosomal size and density during rat liver perfusion. *J. biol. Chem.*, **252**, 6948-6954.

- NEELY A. N., NELSON P. B., MORTIMORE G. E., 1974. Osmotic alterations of the lysosomal system during rat liver perfusion : reversible suppression by insulin and amino acids. *Biochim. biophys. Acta*, **338**, 458-472.
- PERET J., CHANEZ M., BOIS B., 1978. Schedule of protein ingestion and circadian variations of glycogen phosphorylase, glycogen synthetase and phosphoenol-pyruvate carboxykinase in rat liver. *J. Nutr.*, **108**, 265-272.
- SCHIMKE R. T., 1962. Adaptative characteristics of urea cycle enzymes in the rat. *J. biol. Chem.*, **237**, 459-468.
- SEGLÉN P. O., REITH A., 1976. Ammonia inhibition of protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Exp. Cell Res.*, **100**, 276-280.
- SEGLÉN P. O., SOLHEIM A. E., 1977. Protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Acta biol. med. germ.*, **36**, 1789-1804.
- WARD W. F., COX J. R., MORTIMORE G. E., 1977. Lysosomal sequestration of intracellular protein as a regulatory step in hepatic proteolysis. *J. biol. Chem.*, **252**, 6955-6961.
-