



GLYCOPROTÉINES, LYSOSOMES ET MALADIES LYSOSOMALES

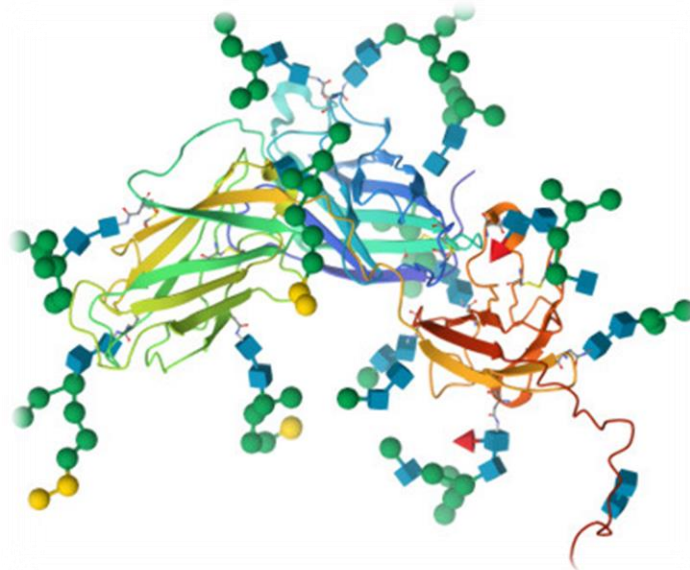
UE BMCP – 11/10/2024

1

Clément Janot

PREMIERE PARTIE

GLYCOPROTEINES



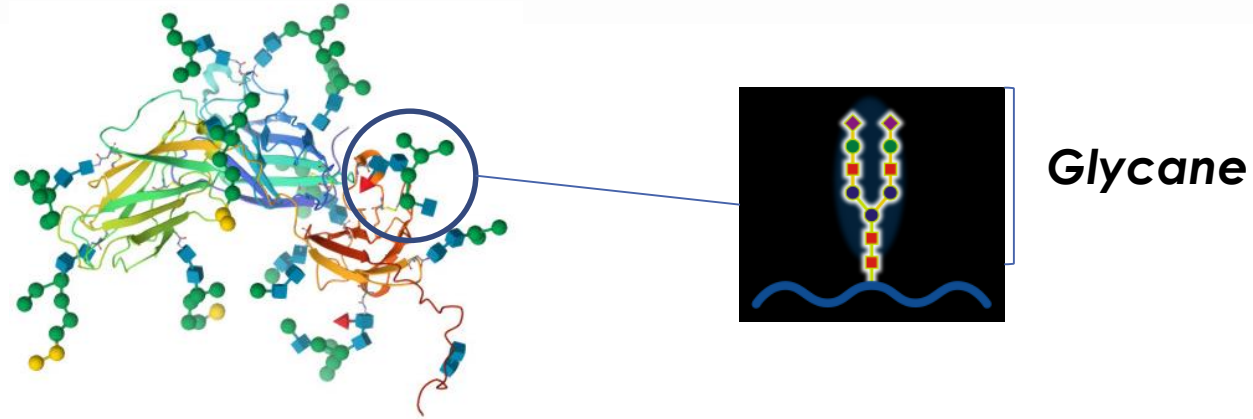
PLAN

- **Définitions**
 - **Structure**
 - **Localisation**
 - **Constitution**
- Les N- et les O- glycoprotéines

STRUCTURE

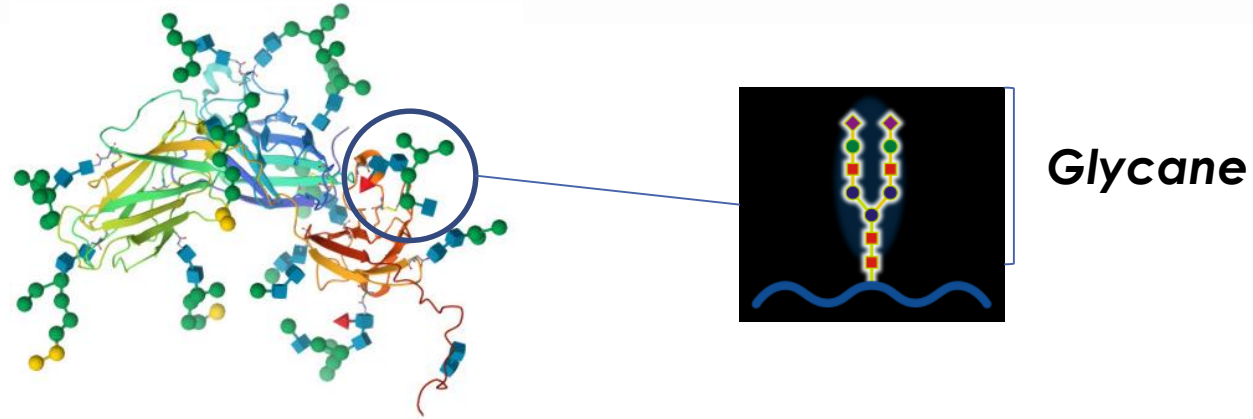
- **Hétéroprotéine** = composé protéique dont la structure chimique totale comporte entre autres une partie non-protéique.
- **Glycoprotéine (Gp)** = protéine **glycosylée** = modification **post-traductionnelle** ayant greffé **1 à plusieurs sucres** de façon **covalente**, en chaînes linéaires et ramifiées.
- Contingent osidique des glycoprotéines :
 - Plutôt de **petites chaînes** glucidiques (environ n=10 sucres)
 - **5% de la masse totale** en moyenne

STRUCTURE



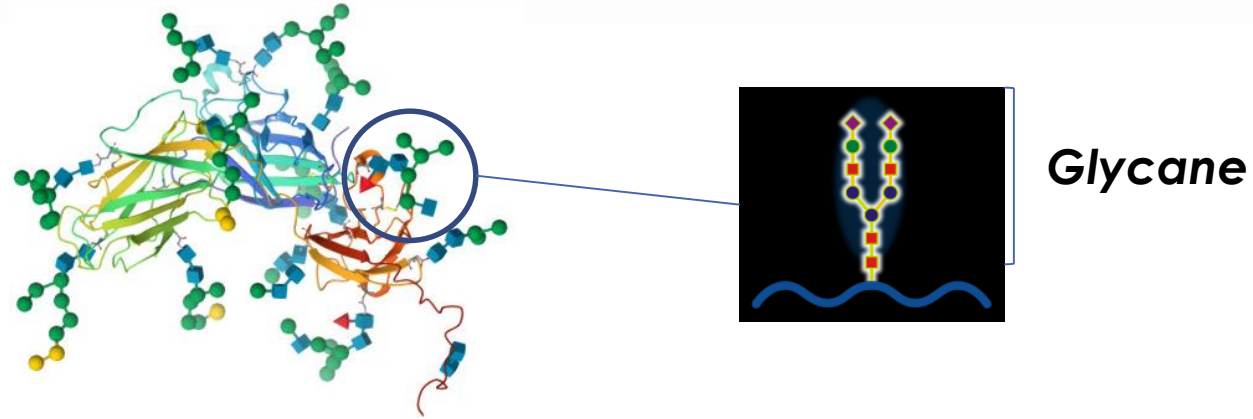
- Rôles physicochimiques de la glycosylation
 - Confère caractère **hydrophile**
 - **Solubilité** dans le plasma (protéines plasmatiques)
 - Participe de leur **stabilité**
 - **Repliement** pour acquérir une bonne conformation tridimensionnelle

STRUCTURE



- Rôles fonctionnels de la glycosylation
 - **Adressage** cellulaire
 - Membrane, Lysosome, Compartiment Extra-cellulaire
 - **Propriétés spécifiques** :
 - **Enzymes**
 - Signalisation intercellulaire : **Chimiokines, cytokines,**
 - Reconnaissance Ligand-Récepteur spécifique : **Hormones,**
 - Greffage membranaires : **Récepteurs, Canaux,**

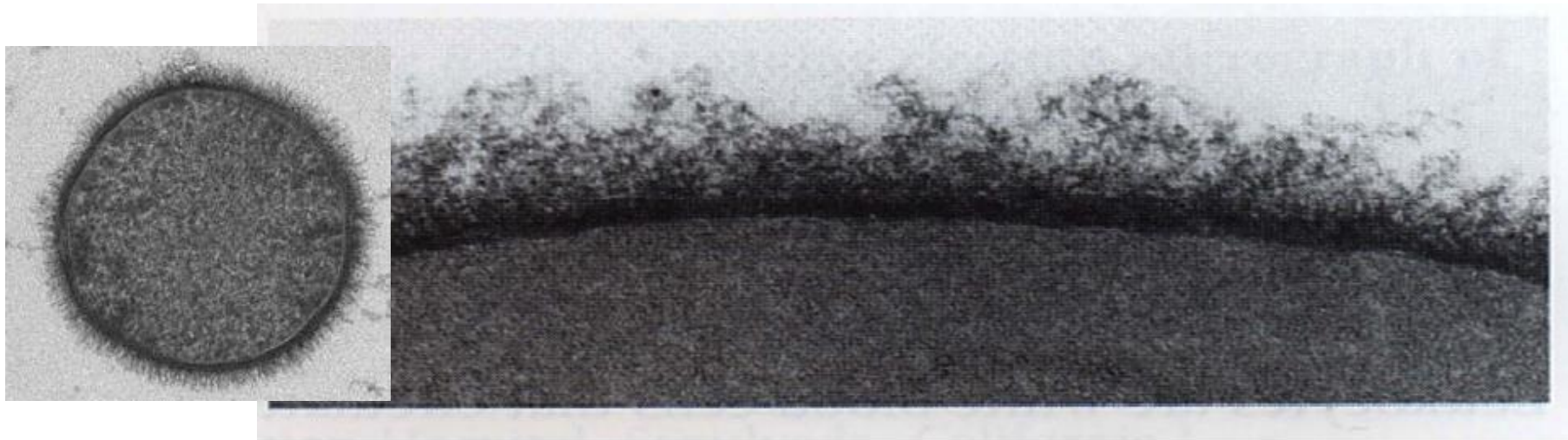
LOCALISATION



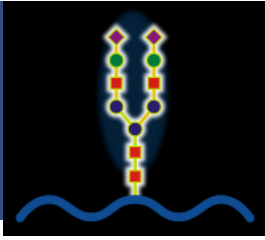
- ...partout !
- Dans les **liquides biologiques**
 - **Protéines plasmatiques** (\approx toutes sauf l'albumine)
 - **Protéines urinaires** (P de Tamm Horsfall)
- Tous les tissus
 - compartiments intracellulaire
 - compartiments extracellulaire

LOCALISATION

- **Glycocalyx** : Revêtement glucidique tapissant la face externe des membranes plasmiques cellulaires.



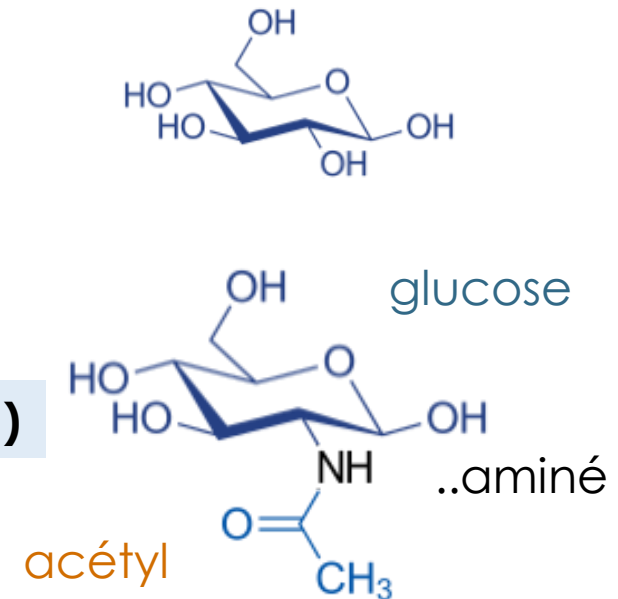
- Protection, reconnaissance intracellulaire, diffusion de composés hydrosolubles (perméabilité).
- Erythrocytes : groupe des **glycophorines** : empêche l'agrégation spontanée.



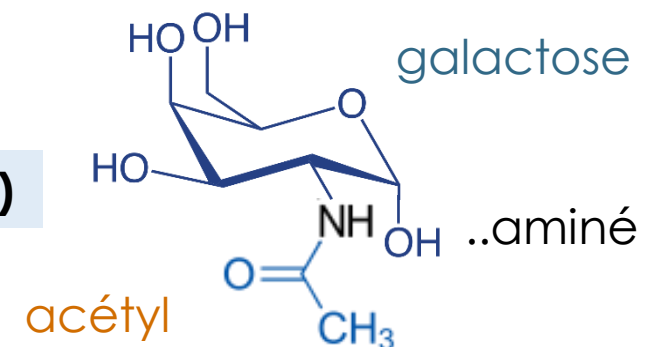
CONSTITUTION

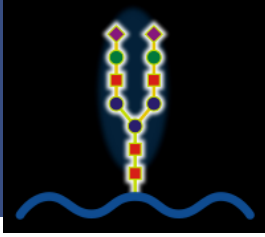
- Chaînes d'oses simples (hexoses, pentoses,...)
 - Mannoses, galactoses, glucoses
 - Au cœur des chaînes
- Osamines : sucres aminés
 - Premier résidu d'ancrage à la chaîne polypeptidique

N-Acétyl glucosamine (NAcGlc)



N-Acétyl galactosamine (NAcGal)

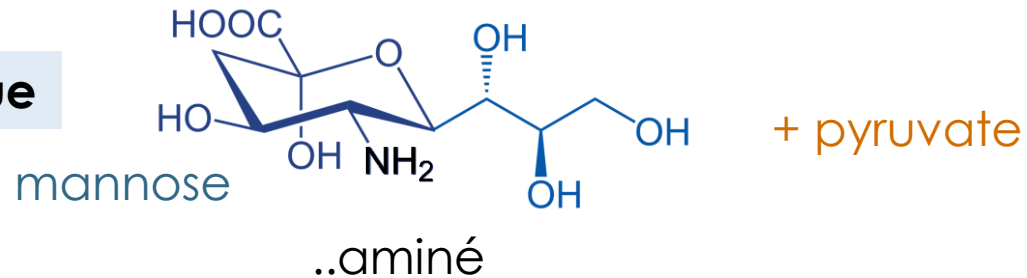




CONSTITUTION

- Chaînes d'oses simples (hexoses, pentoses,...)
 - Mannoses, galactoses, glucoses
 - Au cœur des chaînes
- Osamines : sucres aminés

Acide neuraminique



- Les **acides sialiques** = dérivés N- ou O- de l'acide neuraminique.
- Acide **N-acétylneuraminique**, représentant principal

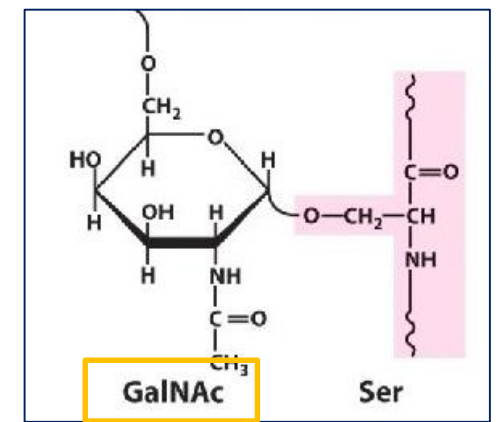
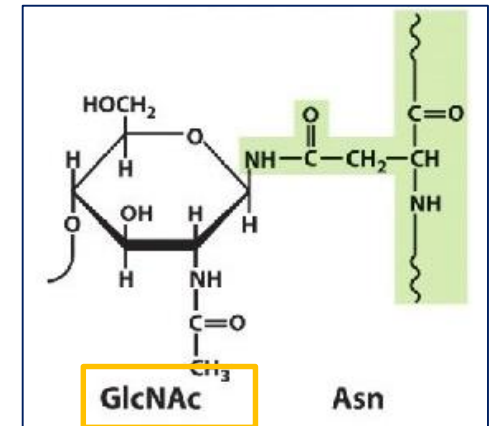
- Souvent greffés aux extrémités terminales des chaînes polypeptidiques
- Participent du caractère acide et soluble des glycoprotéines

PLAN

- Définitions
- **Les N- et les O- glycoprotéines**
 - Généralités
 - Maturation
 - Aspects pathologiques
 - Rôles et Fonctions

GÉNÉRALITÉS

- **N-glycosylation:** liaison d'un sucre sur la fonction NH_2 radicalaire d'un résidu **asparagine**, au sein d'un motif **Asn-X-Ser** ou **Asn-X-Thr**.
 - Modif post-traductionnelle (+ co-traductionnelle) réalisée dans le **RE**, puis le **Golgi**
 - **Osamine d'ancrage = GlcNAc**
- **O-glycosylation:** liaison d'un sucre sur la fonction OH d'un résidu **sérine** ou **thréonine**.
 - Abondant dans les mucines, les collagènes,...
 - Modif post-traductionnelle stricte réalisée dans le **Golgi**
 - **Osamine d'ancrage = GalNAc**

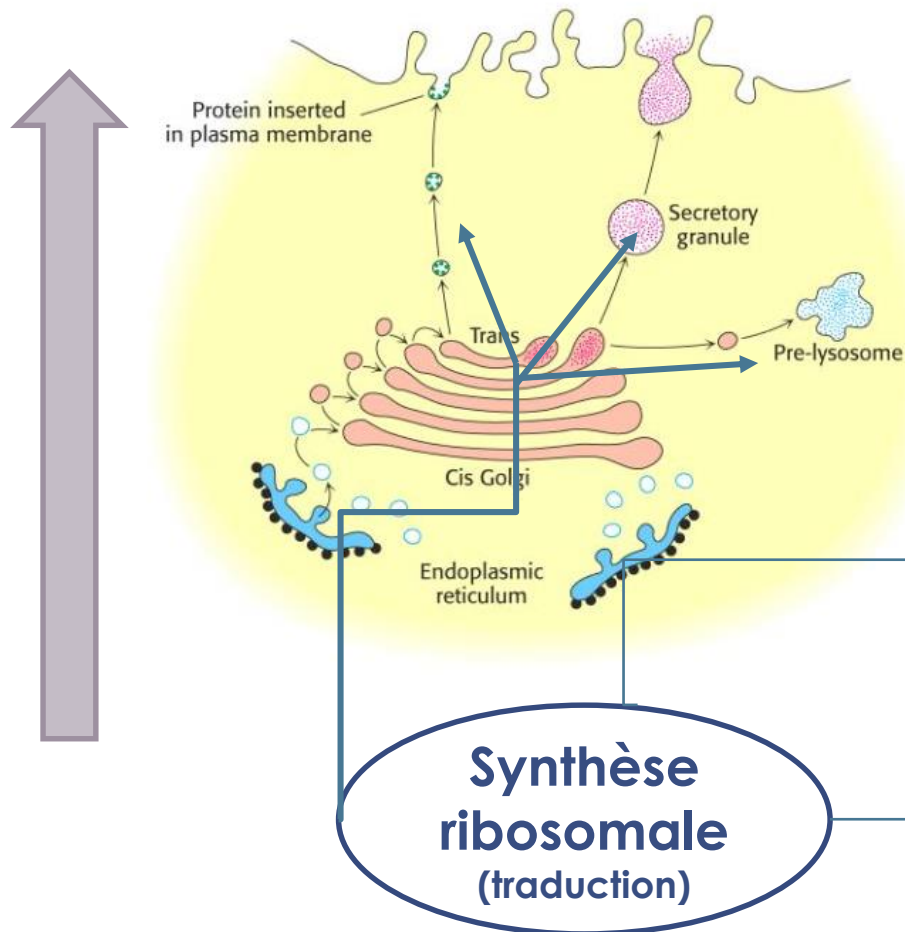


Premier osamine
= ancrage de la chaîne

GÉNÉRALITÉS

Réticulum endoplasmique

Appareil de Golgi



Glycoprotéines

RE + Golgi

- Protéines excrétées hors cellule
Circulation sanguine (protéines plasmatiche, hormones,...)
- Protéines membranaires (récepteurs,...)
- Protéines intraluminales (cytosol, organites, lysosome,...)

RE

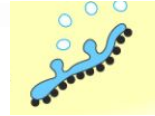
- Protéines du réticulum

STOP :

- Protéines cytoplasmiques, nucléaires ou mitochondriales

GÉNÉRALITÉS

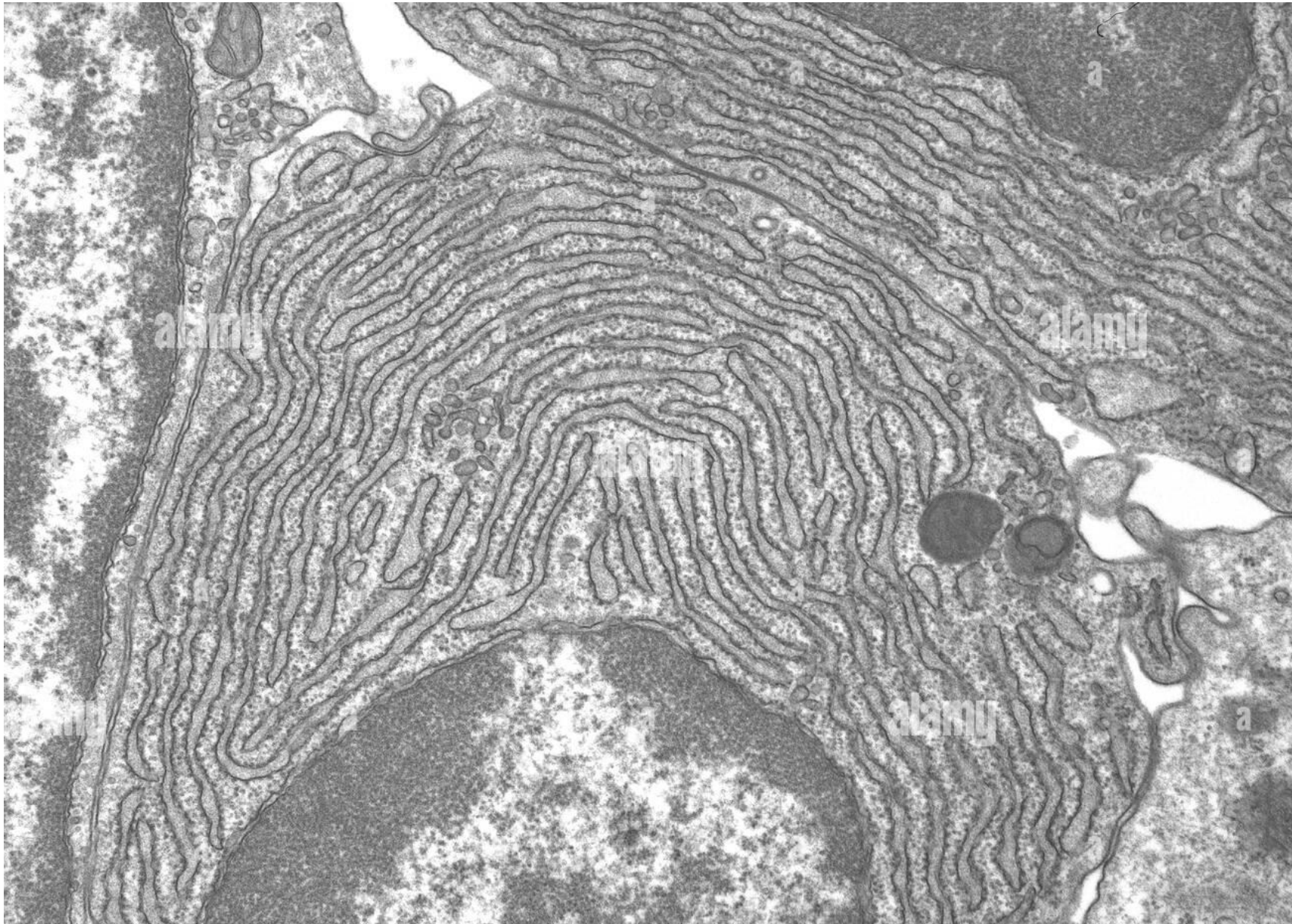
Réticulum endoplasmique



- RE **granuleux** ou **rugueux** (ribosomes)

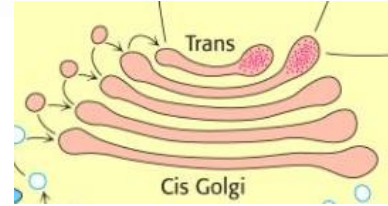
vs RE lisse (autres fonctions : synthèse de membrane, hormones stéroïdiennes, métabolisme des xénobiotiques, stock de Ca^{2+} , ...).

- Réseau diffus dans tout le cytoplasme et au contact de la membrane nucléaire
- Rôles :
 - « **Folding** » = premier repliement = structure tridimensionnelle
 - Système de **contrôle qualité** du bon repliement des protéines
 - Premières étapes de **glycosylation**



GÉNÉRALITÉS

Appareil de Golgi

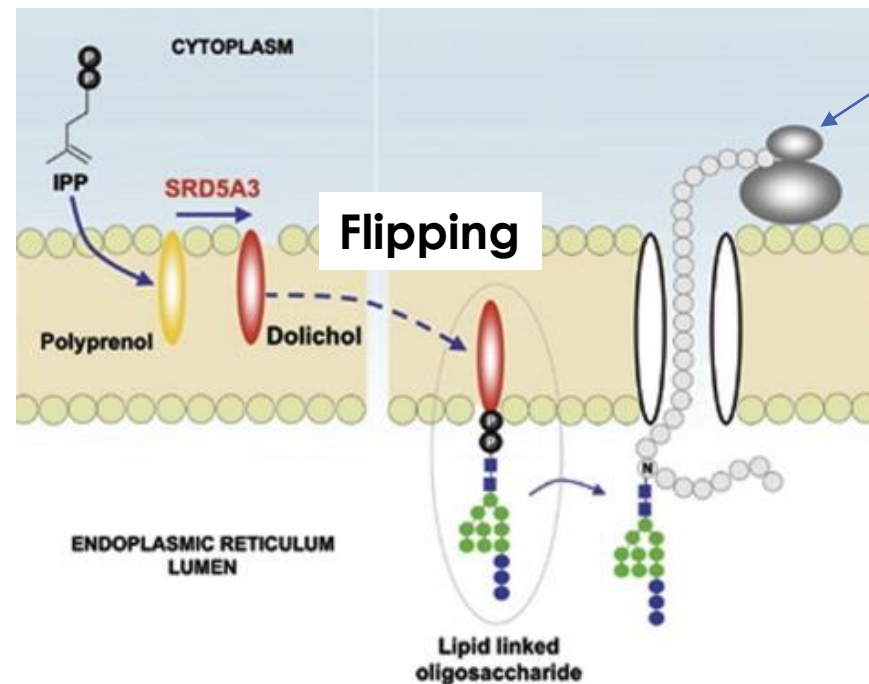
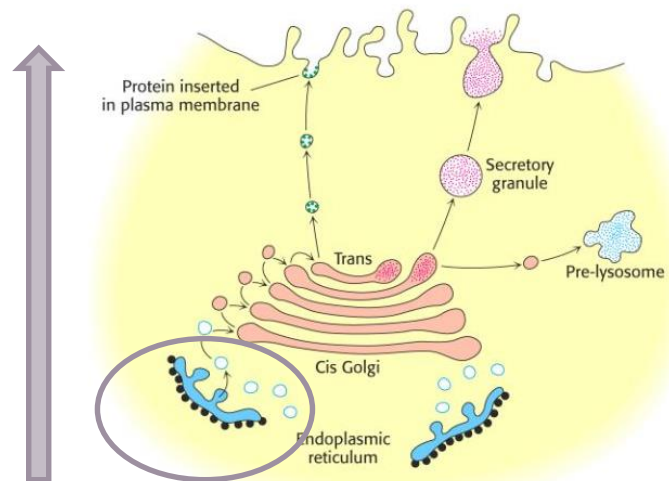


- Proche du RE granuleux
- Cis → median → trans -golgi
- Rôles
 - Autres **glycosylations**
 - **Repliements** supplémentaires
 - Greffes de groupements **phosphates**
 - **Export** vers les membranes et les organites vésiculaires

MATURATION

RE : N-glycosylation

- Contemporain de la traduction
- Greffe d'une chaîne N-osidique depuis le dolichol-phosphate



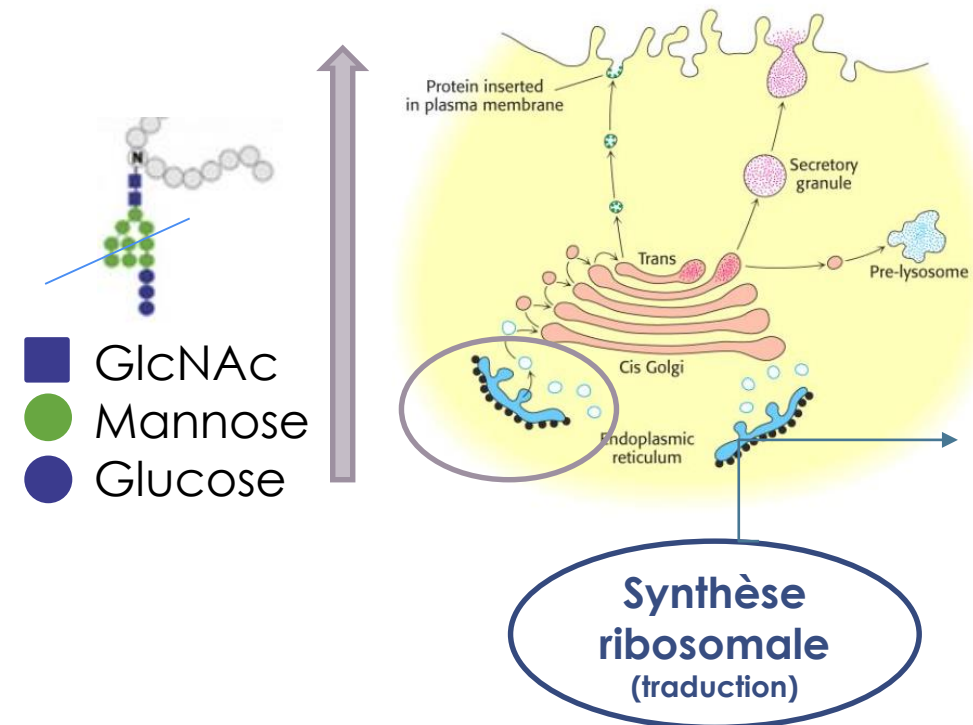
Ribosome
(traduction)

■ GlcNAc
● Mannose
● Glucose

MATURATION

RE : N-glycosylation

- La chaîne N-glycosylée est réduite, augmentée ou diversifiée (maturation) en fonction de sa fonction/destination

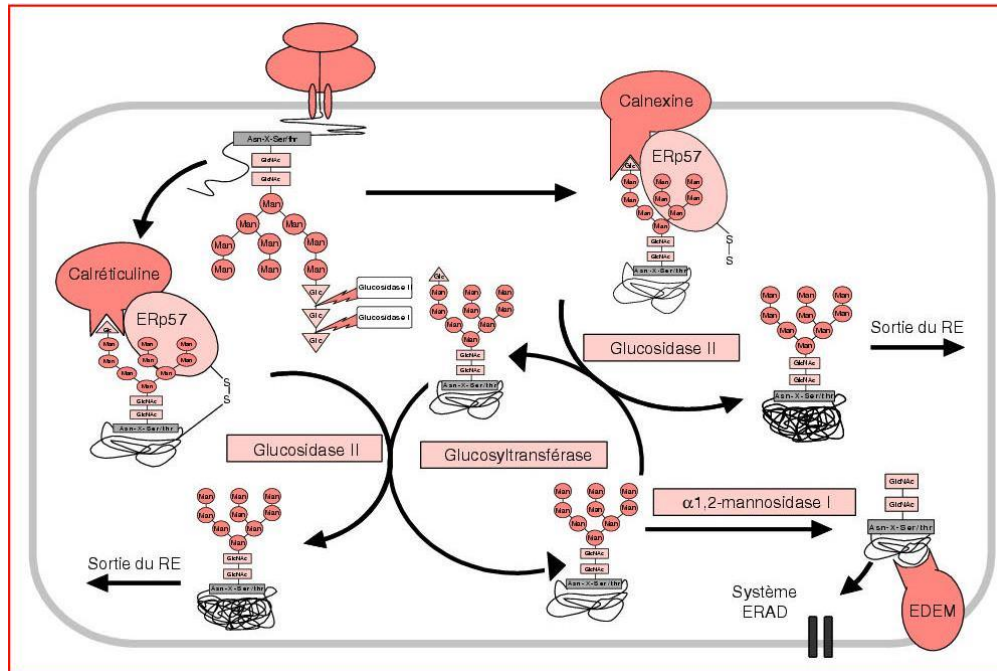


- **Clivage** de résidus **mannoses** et **glucoses** (mannosidases, glucosidases) = Gp restant dans le RE
 - Ex : HMG-CoA Réductase, synthèse endogène de cholestérol
- OU maintien d'une longue chaîne et poursuite vers cis-Golgi

MATURATION

RE : « Folding » et contrôle

- Rôle des lectines chaperonnes : la **calnexine** et la **calréticuline**

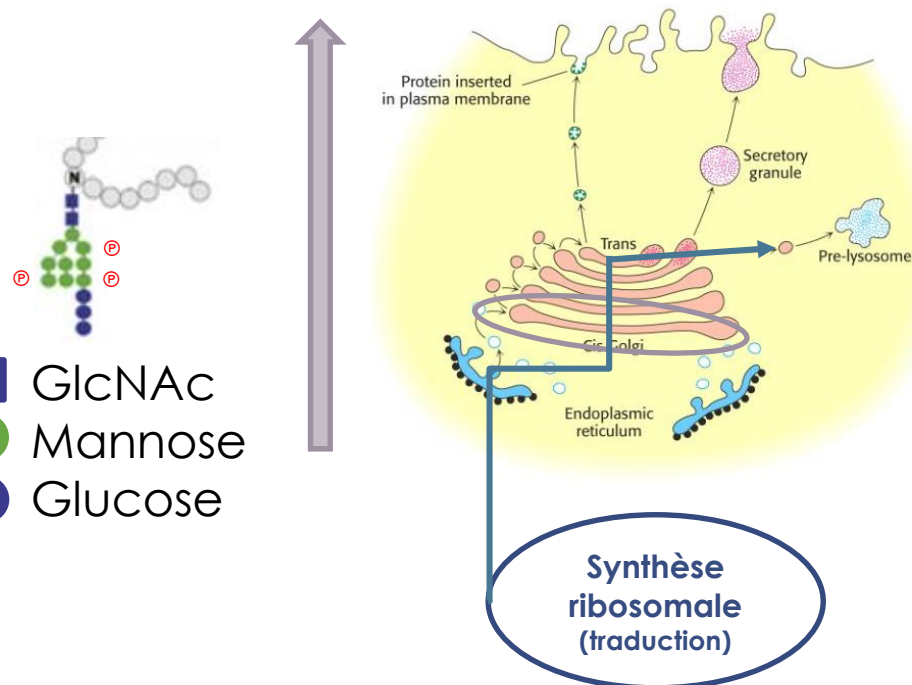


- « Cycle CNX-CRT »
 - Assistance au repliement des chaînes protéiques = **maturation**
- Si échec de maturation : dirigé vers le **protéasome**
- « Contrôle qualité » du repliement

MATURATION

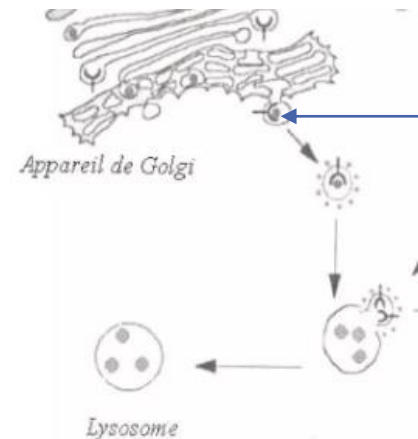
Golgi : poursuite des glycosylations et adressage

- La chaîne N-glycosylée est réduite, augmentée ou diversifiée (maturation) en fonction de sa fonction/destination

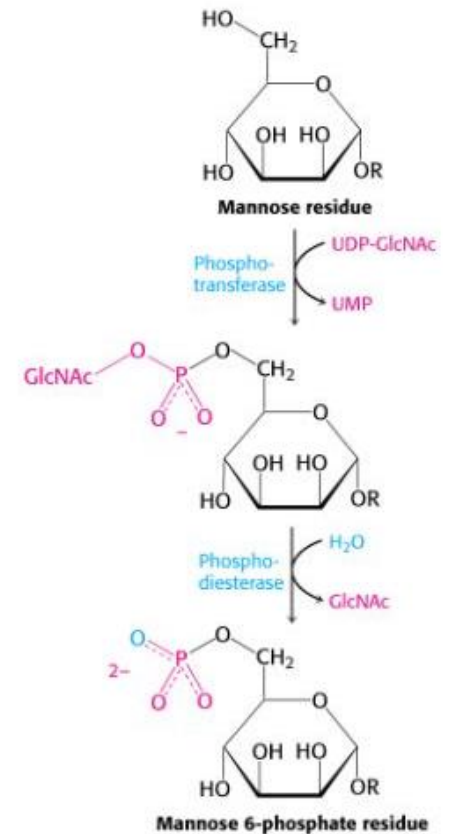


Cis Golgi :

- Code de reconnaissance pour destination lysosomale : **phosphorylation des mannoses en C6** (enzymes lysosomales)



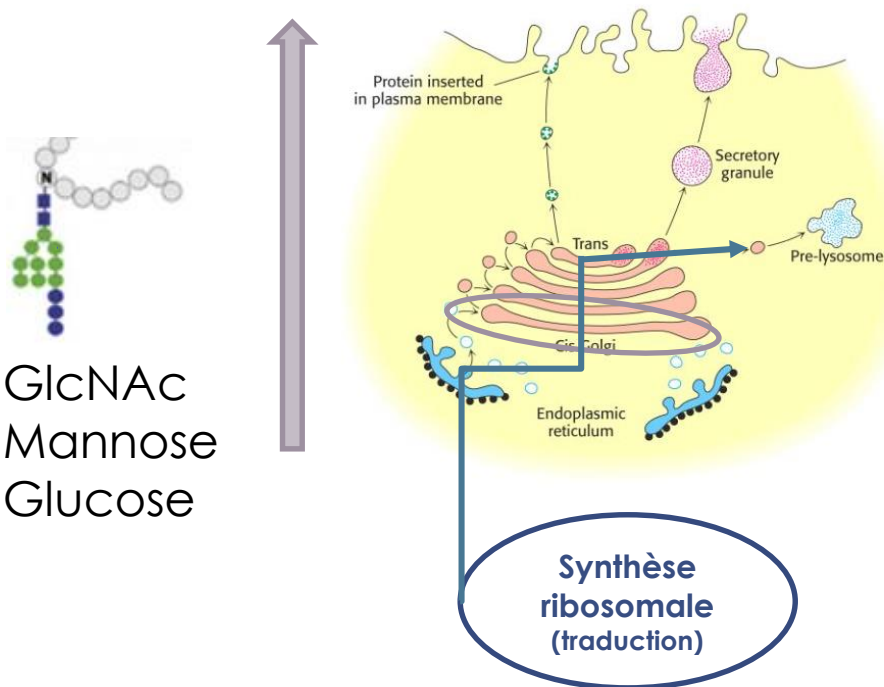
Récepteur du mannose-6-P



MATURATION

Golgi : poursuite des glycosylations et adressage

- La chaîne N-glycosylée est réduite, augmentée ou diversifiée (maturation) en fonction de sa fonction/destination



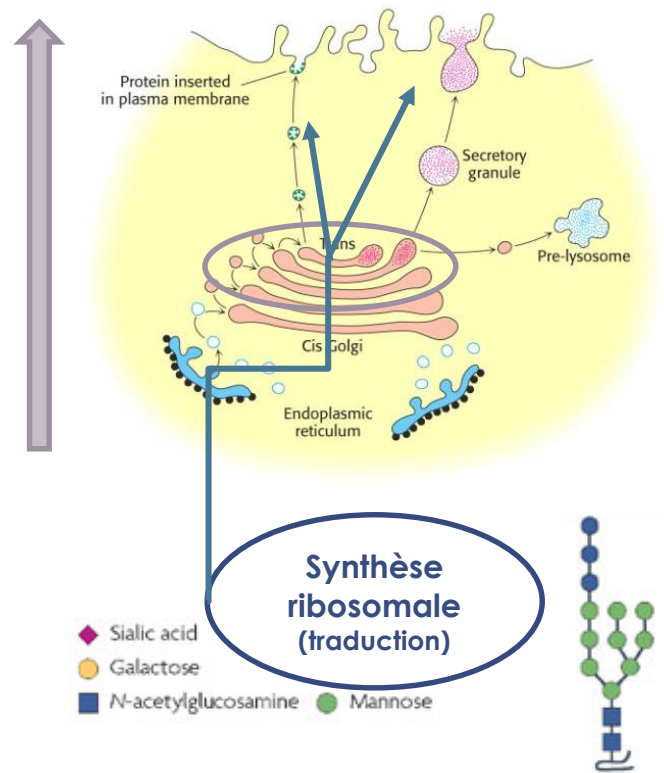
• Cis Golgi :

- Code de reconnaissance pour destination lysosomale :
phosphorylation des mannoses en C6 (enzymes lysosomales)
- OU poursuite vers medial-golgi pour destination exocytose

MATURATION

Golgi : poursuite des glycosylations et adressage

- La chaîne N-glycosylée est réduite, augmentée ou diversifiée (maturation) en fonction de sa fonction/destination



• Médial et Trans Golgi :

- Clivage de glucoses/mannoses
- Greffages de **N-acétyl glucosamines** sur différents carbones des mannoses : ramifications/branches
- Rajout de résidus **galactose** (*jaune*) et d'**acides sialiques** (*violet*)



ASPECTS PATHOLOGIQUES : EX 1

- Déficiences congénitales **de la N-glycosylation** = « **CDG syndromes** »
 - Maladies rares (1/50000 à 1/10000)
 - Mode de transmission : autosomiques récessif
 - **Anomalie de la synthèse des N-glycoprotéines** par déficit d'enzyme clé du RE ou du Golgi dans les étapes précédentes.
- **Tableau clinique**
 - A la naissance : Strabisme, dysmorphie typique avec yeux en amande
 - Signes lipocutanés : aspects en peau d'orange
 - Atteintes multiorganiques : hépatiques, rénales, cardiaques, endocriniennes...
 - Plus tardivement : retard psychomoteur.

ASPECTS PATHOLOGIQUES : EX 2

Autosomique récessif
(GNPTAB) 12q23.2

- Déficit de maturation de la chaîne glucidique :
 - Déficit en N-Acetylglucosamine-1-phosphotransférase qui permet le phosphorylation du mannose en C6 (Golgi):

Mucopolidose de type II

Fait partie du Groupe des **maladies lysosomale**

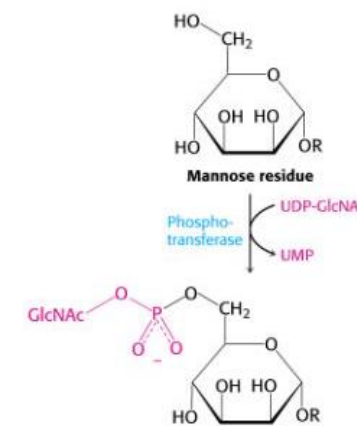
N-glycanes de type **MAN6P** = marque des **enzymes lysosomales**



X Libéré en **extracellulaire**
(exocytose : interstitium,
fluides biologiques,...)

Patho

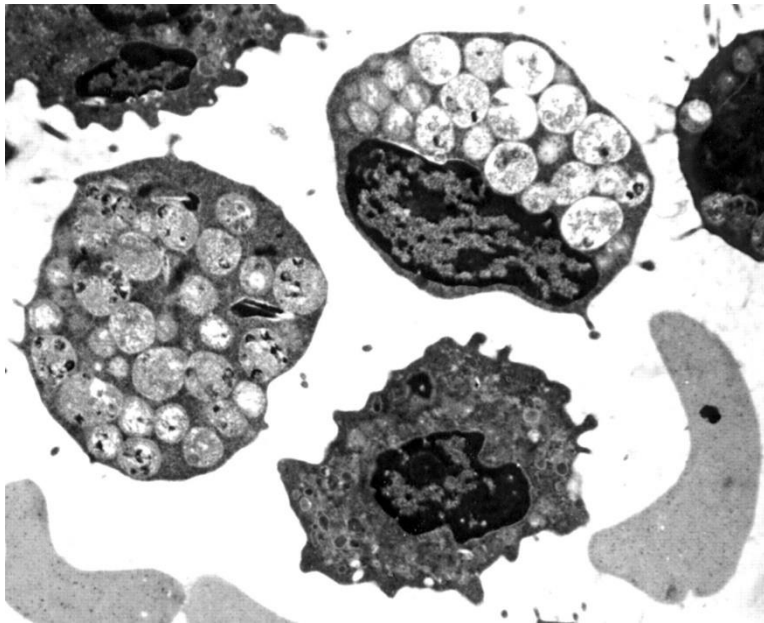
Accumulations toxiques



ASPECTS PATHOLOGIQUES : EX 2

Mucopolidose de type II = maladie des inclusions

Autosomique récessif
(GNPTAB)12q23.2



J Clin Pathol

Inclusions intracellulaires =
accumulations lysosomales de
produits incapables d'être recyclés

Retard psychomoteur
Anomalies squelettiques
Petite taille
HSMG

RÔLES ET FONCTIONS : N-GLYCANES

- Rôles des N-glycanes dans le bon **repliement conformationnel**
- Rôle dans la **dégradation des protéines**
- Signal de **bonne qualité** de la protéine
 - Equilibre maintien/dégradation



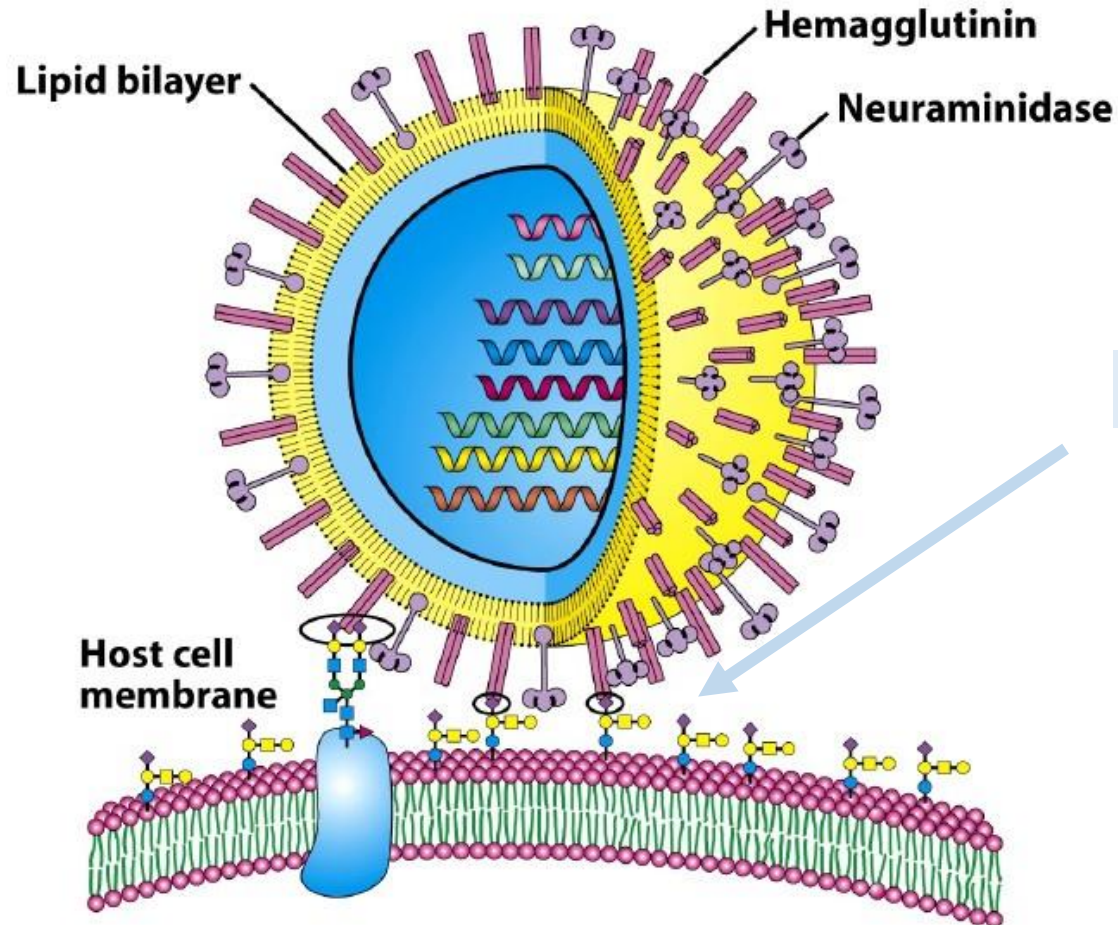
RÔLES ET FONCTIONS : N-GLYCANES

- Rôle dans la **reconnaissance**

Exemples en **infectiologie**:

- **VIH** : le protéine Gp120 (entrée du virus dans la cellule) interagit *via* une reconnaissance de motif N-glycanes riche en mannose <-> lectine membranaire.
- **Plasmodium (palu)** : Entrée du parasite de le GR par reconnaissance des sucres du glycocalyx (les glycophorines)
- **Influenza virus (grippe)** : Reconnaissance Hémagglutinine <-> acide N-acétylneuraminique (acide sialique)

RÔLES ET FONCTIONS : N-GLYCANES



Acide N-acétylneuraminique

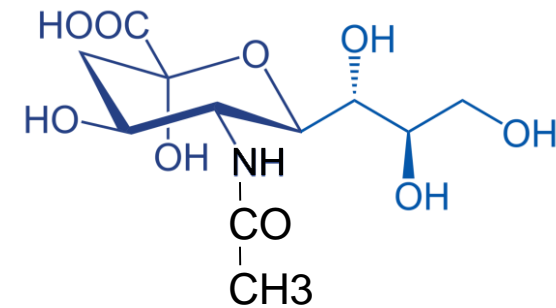
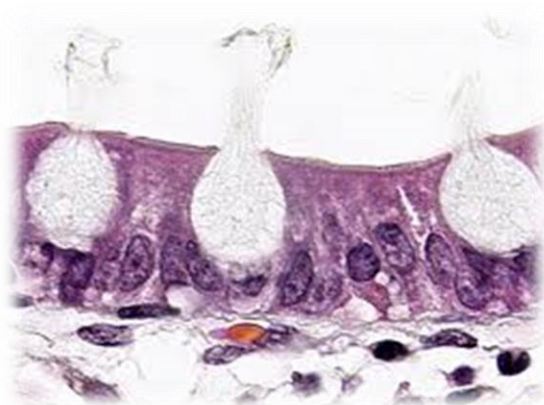


Figure 11-29
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

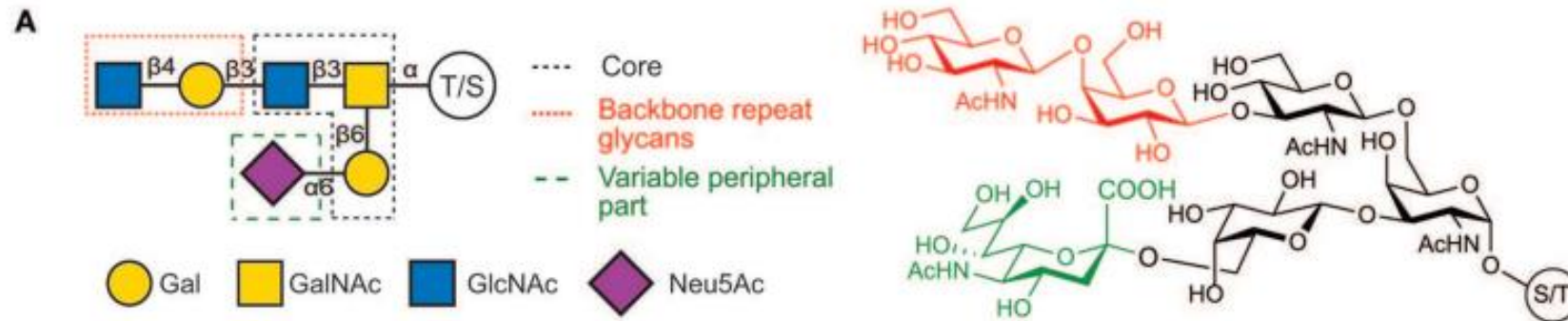
RÔLES ET FONCTIONS : O-GLYCANES

- Exemple de fonction : les **mucines**
 - Gp filamenteuse,
 - Haut PM
 - Sécrétées à leur pôle apical par des **cellules épithéliales** du tractus **trachéo-bronchique**, du tractus **digestif**, de glandes exocrines (glandes **muqueuses**)
 - Rôle de **protection** par recouvrement de l'épithélium (antimicrobiens, protection vis-à-vis de polluants et de toxiques, protection vis-à-vis du pH acide,...)



RÔLES ET FONCTIONS : O-GLYCANES

- Exemple de fonction : les **mucines**
 - 80% du PM est glycanique



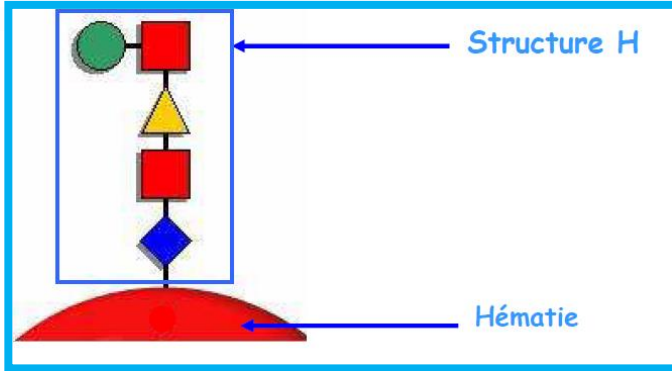
Pinzon Martin, Seeberger and Varon Silva, Frontiers, 2019

- Mucines sécrétées : multimères de mucines en réseaux = **gel** de mucus
- Mucines ancrées à la membrane

RÔLES ET FONCTIONS : O-GLYCANES

- Exemple de fonction : groupe sanguin ABO.
- Les GR portent à la face externe de leur membrane plasmique des **antigènes de groupe ABO** = **protéines O-glycosylées** avec un assemblage osidique **propre au groupe**
- **Caractère hérité** : 2 gènes codant pour 2 enzymes → greffage des sucres propre au groupe

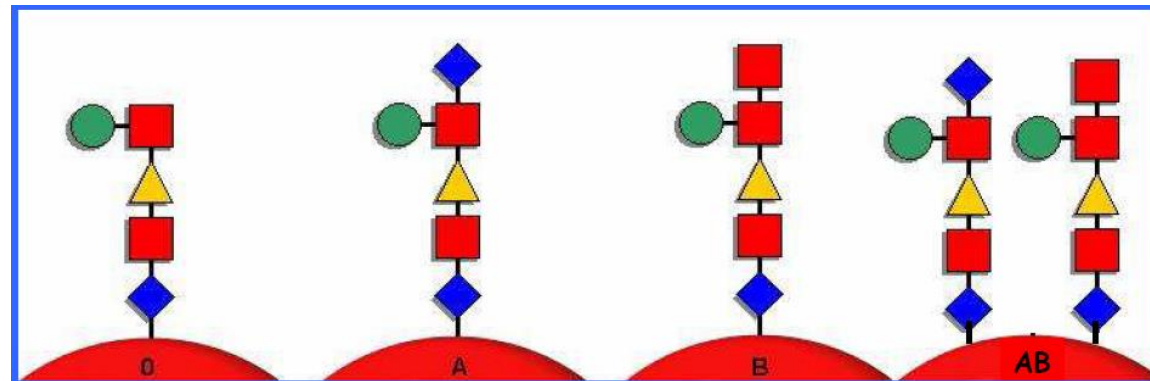
RÔLES ET FONCTIONS : O-GLYCANES



A = alpha N-acétyl
galactosamine
transférase

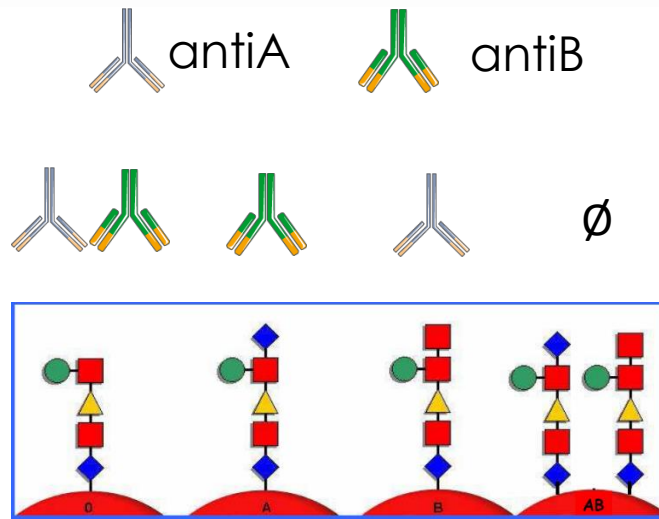
B = alpha galactose
transférase

A et B



Allèle enzyme A	-	+	-	+
Allèle enzyme B	-	-	+	+

RÔLES ET FONCTIONS : O-GLYCANES

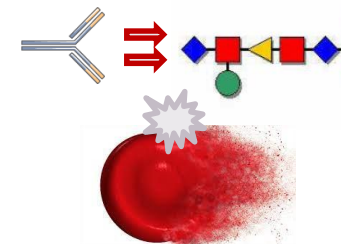


- Antigène ABO présents chez un individu font partie du « **soi** »
- Immunité humorale (immunoglobulines) contre le « non-soi »

• Transfusion de CGR → Nécessite un phénotypage érythrocytaire = détermination du groupe sanguin

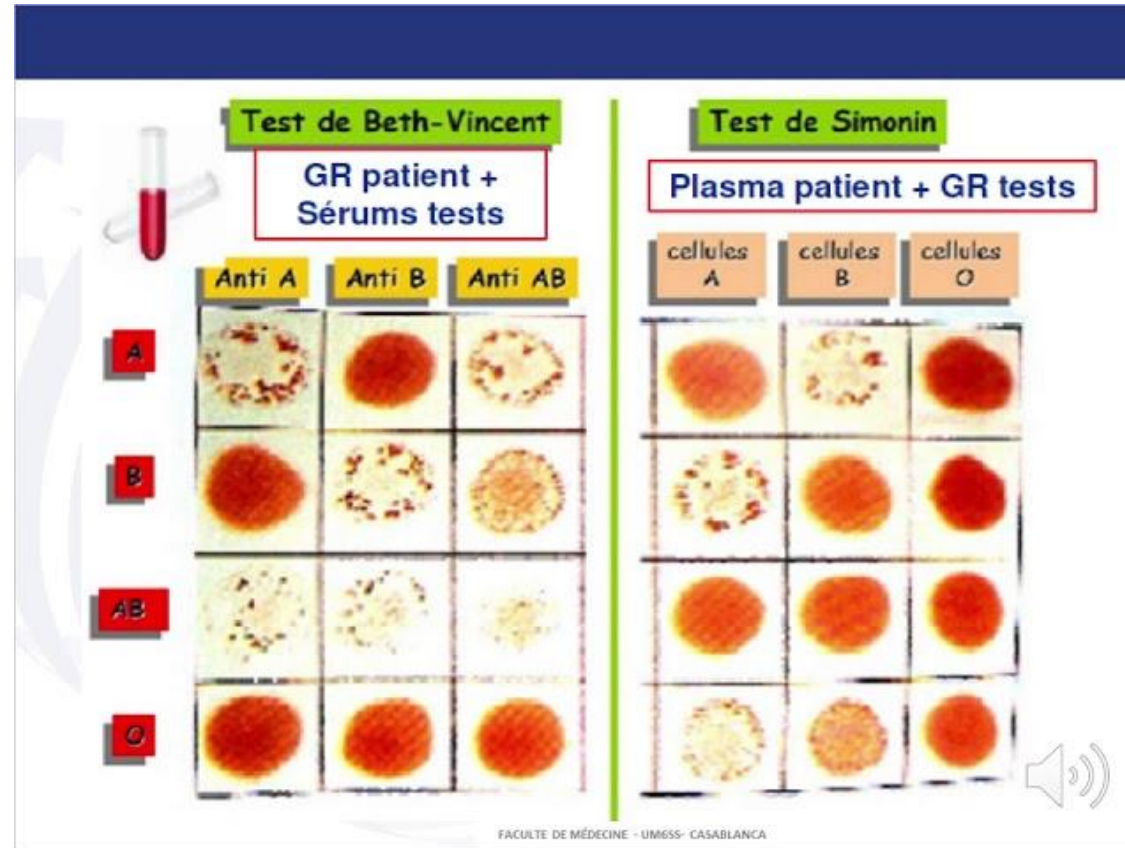
• Sinon : **hémolyse aigüe intravasculaire**

- Aggravation de l'anémie
- Insuffisance rénale
- HSMG



RÔLES ET FONCTIONS : O-GLYCANES

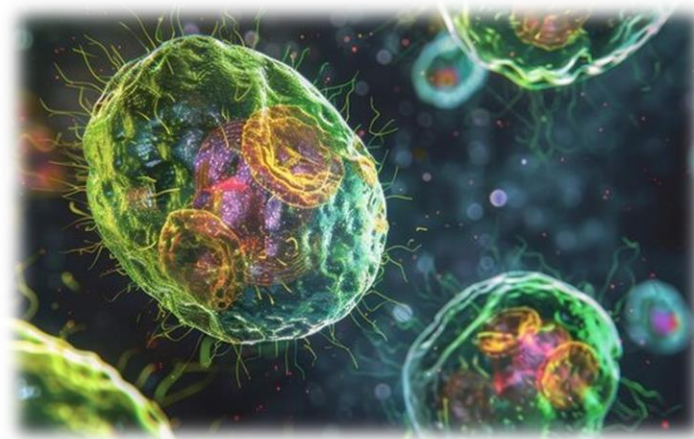
- Tests de Beth Vincent et Simonin



- Agglutinats de GR = on parle **d'agglutinines**

DEUXIÈME PARTIE

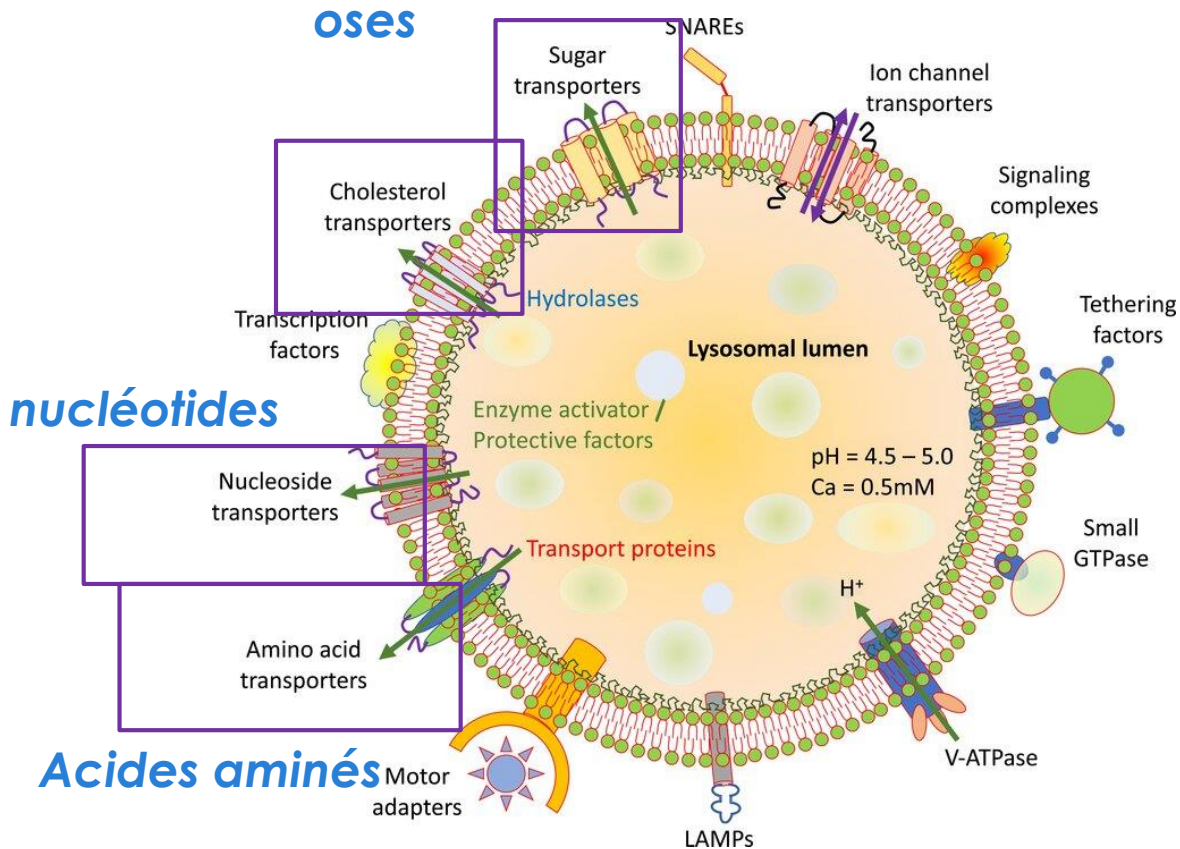
LYSOSOMES ET MALADIES DE SURCHARGE



PLAN

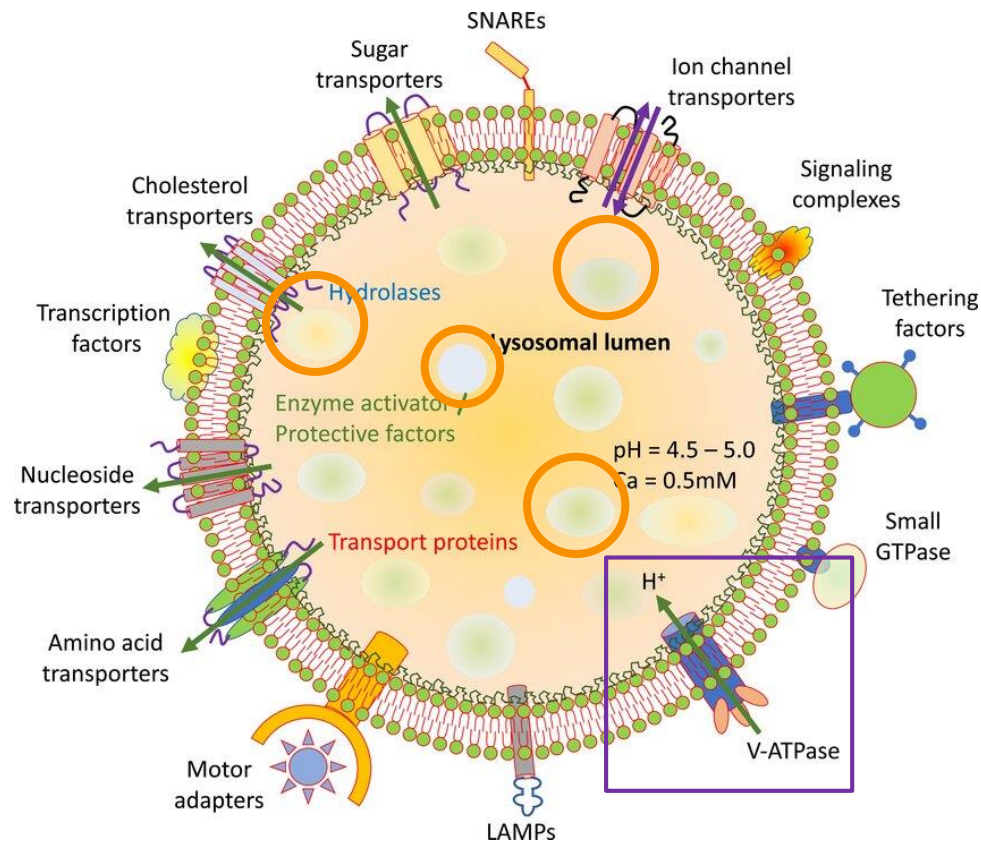
- **Rôle du lysosome**
- **Maladies Lysosomales**
 - Descriptions
 - Diagnostic moléculaire

ROLE DU LYSOSOME



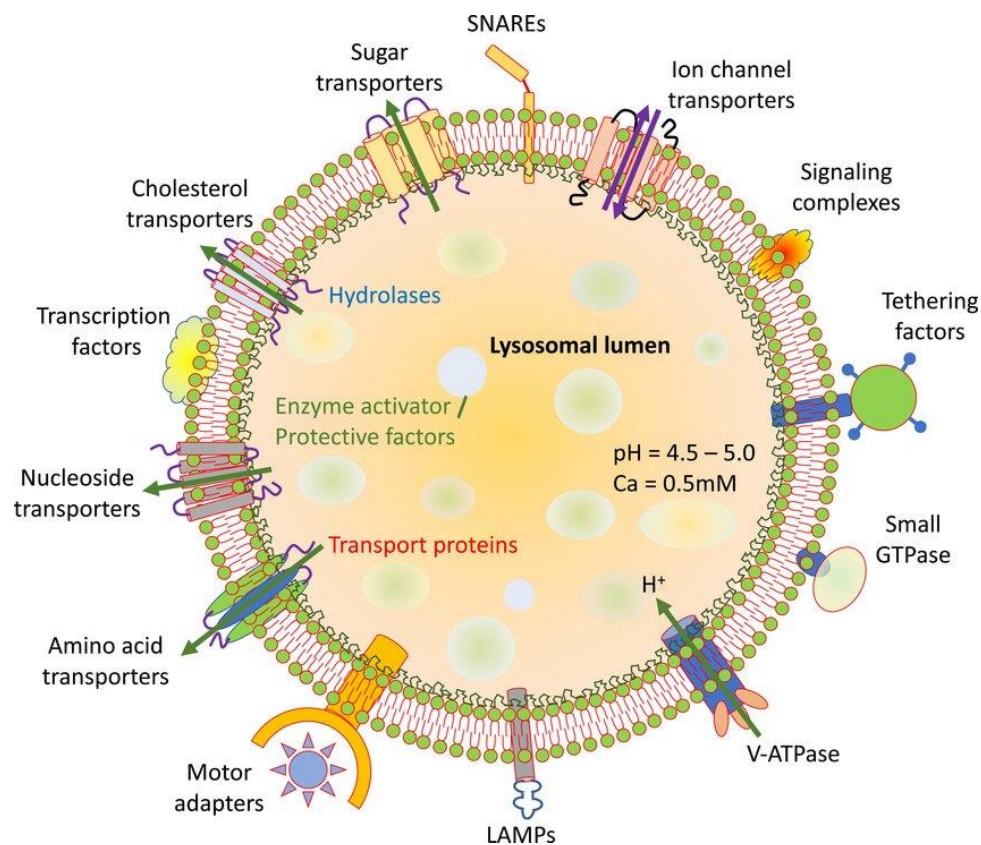
- Vésicule sphérique à bicouche lipidique
- Cytoplasme de toutes les cellules (sauf le GR)
- Origine : bourgeonnement depuis l'appareil de **Golgi**.
- **Rôle** : **usine de recyclage** des composants moléculaires de la cellule
 - Libération de molécules biologiques simples vers le cytosol
 - Expression à la membrane de canaux et transporteurs (sortie)

ROLE DU LYSOSOME



- Centre de **dégradation** et de **recyclage** des macromolécules de la cellule
 - Protéines → a.a.
 - Protéoglycanes → oses simples et a.a.
 - Acides nucléiques → nucléosides
 - Sphingolipides → lipides et dérivés
 - Organites (mitochondries)
- Grande hétérogénéité **d'hydrolases** (enzymes), des glycoprotéines porteuses du signal **mannose-6-phosphate (MAN6P)**
- Active seulement à **pH acide**
 - Entrée importante de proton H⁺

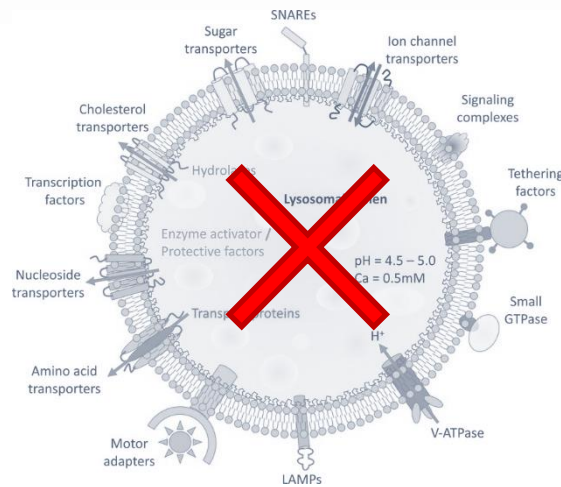
ROLE DU LYSOSOME



- Autres rôles :
 - Homéostasie et flux d'ions intracellulaires (Ca^{2+})
 - Digestion de composants extracellulaires
 - Phagolysosome : lutte antibactérienne (PNN et macrophages)
 - Signalisation extra-cellulaire

MALADIES LYSOSOMALES

DESCRIPTION



Accumulation de
macromolécules
=
« Surcharge »

Conséquences
délétères cellulaire
et tissulaire

- Maladies **génétiques dite (« de surcharge ») lysosomale**
- **Transmission sur un mode**
 - Autosomique récessif
 - Récessif lié à l'X (maladie de Fabry)

MALADIES LYSOSOMALES

DESCRIPTION

1. **Déficits enzymatiques** par variation génétiques codant les **hydrolases**

- **Sphingolipidoses**
- **Glycoprotéinoses**
- **Glycogénoses**
- **Mucopolysaccharidoses** (glycosaminoglycanes = GAG = composant des protéinoglycanes)

2. Anomalie de **modifications post-traductionnelles** (ex: *Mucopolipidose de type II* → diapositives 24-25)

3. Anomalie de **protéines membranaires** du lysosome

...

→ Les tissus et organes touchés ainsi que la présentation clinique **dépendent du sous-type de maladies lysosomales**

MALADIES LYSOSOMALES

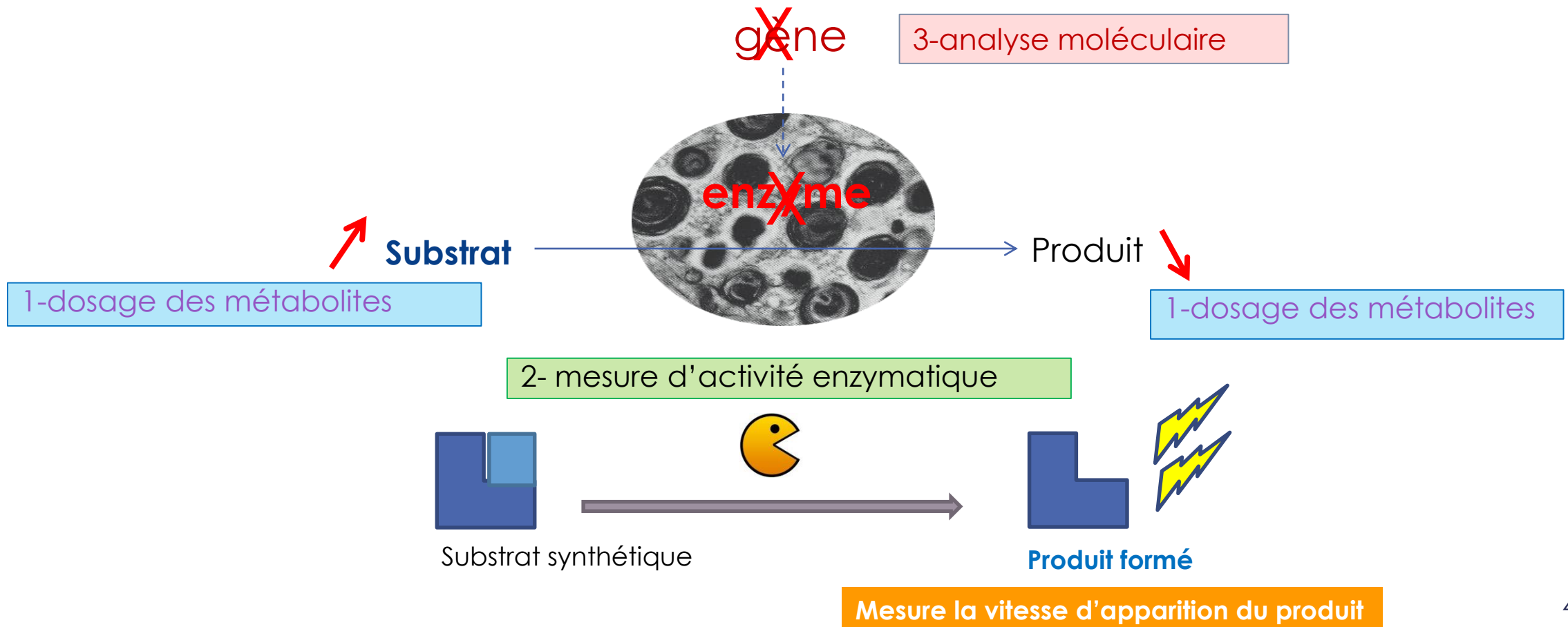
DESCRIPTION

- **Epidémiologie :**
 - Au total : **1 naissances sur 5000** en France
 - Quelques disparités ethniques et géographiques
 - *Incidence ↑ Finlande, Europe centrale et orientale, ashkénazes, populations insulaires,...*
- Exemples de déficit enzymatique = enzymopathies
 - **2 Sphingolipidoses :**
 - **Maladie de Fabry**
 - **Maladie de Gaucher**
 - **1 Glycogénose:**
 - **Maladie de Pompe**

MALADIES LYSOSOMALES

DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE

- Principe du diagnostic moléculaire des maladies métaboliques



MALADIES LYSOSOMALES

DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE

Lié à l'**X**, pénétrance incomplète
(GLA) Xq21.3-q22

- **Maladie de Fabry**

- = Déficit en **alpha-galactosidase A** (catabolisme des céramides), **lié à l'**X****
- **Hommes** hémizygotés **et Femmes** hétérozygotés **sont atteints**
 - Sous-diagnostic et sous-ttt des femmes ++
- Atteinte des **cellules endothéliales (vasculaires)**

- **Forme Classique**

Douleurs, acroparesthésies

Atteinte de la cornée

Signes dermato :
angiokératomes, thermophobie

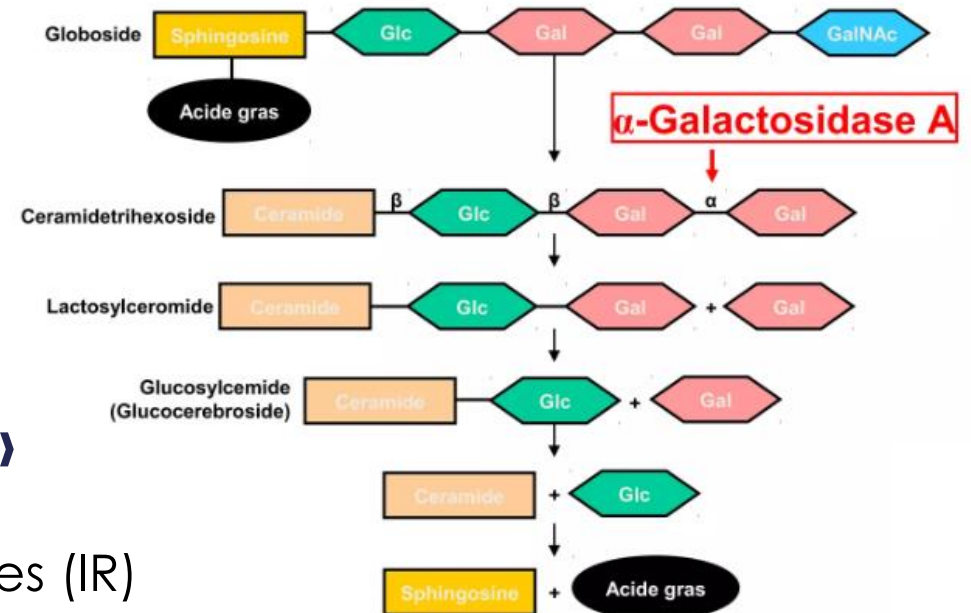
Dès l'enfance

- **Forme « Variant »**

Atteinte cardiaques
(hypertrophie) et rénales (IR)
tardives

Atteintes neurovasculaire (risque
AVC) modérée

Age adulte



MALADIES LYSOSOMALES

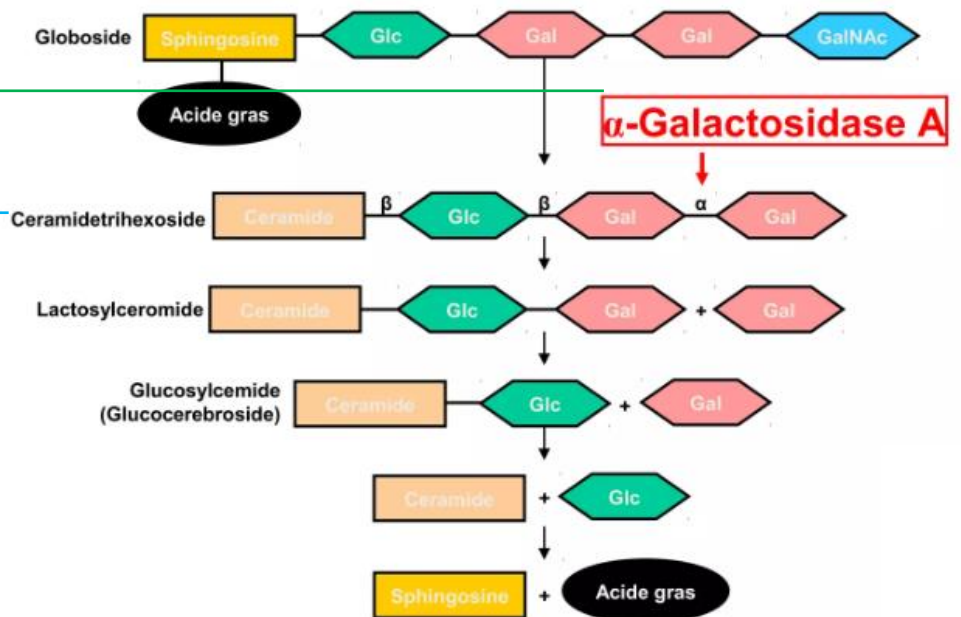
DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE

Lié à l'**X**, pénétrance incomplète
(GLA) Xq21.3-q22

• Maladie de Fabry

- Screening : **LysoGB3 urinaire** 1-
 - Existe aussi dans le plasma
 - Peut être normal chez les femmes atteintes
- Mesure de **l'activité enzymatique α -galactosidase** 2-
 - Sur Leucocytes = sang EDTA
 - Apparenté à une analyse génétique (consentement)
 - Peut être normal chez les femmes atteintes
- Confirmation par **étude génétique de GLA** 3-
 - Examen préférentiel chez les femmes
 - Peu de corrélation génotype-phénotype
- **Traitement de la cause** : enzymothérapie substitutive

déacylation



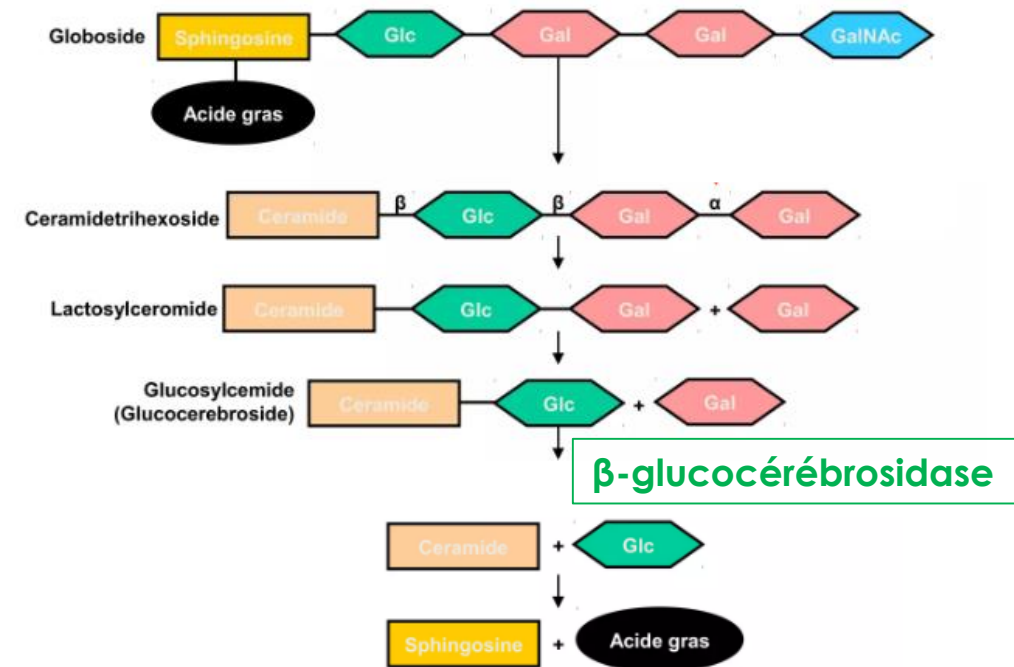
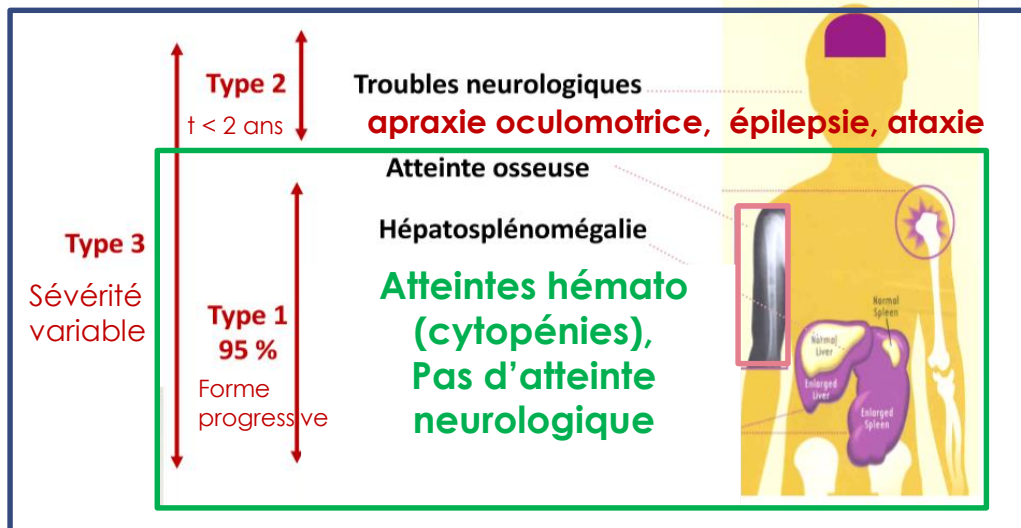
MALADIES LYSOSOMALES

DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE

Autosomique récessive
GBA (1q21)

• Maladie de Gaucher

- = Déficit en **beta-glucocérébrosidase** (catabolisme des céramides)
- 1/1 400 000 naissances
- Atteinte du **système réticulo-endothélial** = accumulation dans les **monocytes et macrophages**



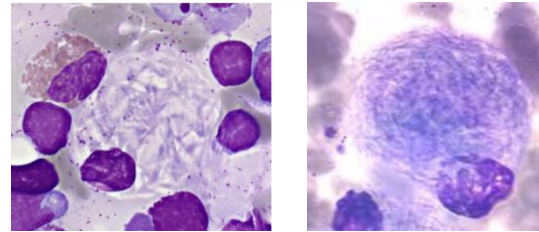
MALADIES LYSOSOMALES

DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE

- **Maladie de Gaucher**

- **Cellule de Gaucher**

- Diagnostic différentiel : lymphome



Autosomique récessive
GBA (1q21)

- Screening : **Lysohexosylcéramide** 1-

- Sang sur EDTA, sur buvard
 - Toujours élevé

- Mesure de l'activité enzymatique **beta-glucocérébrosidase** 2-

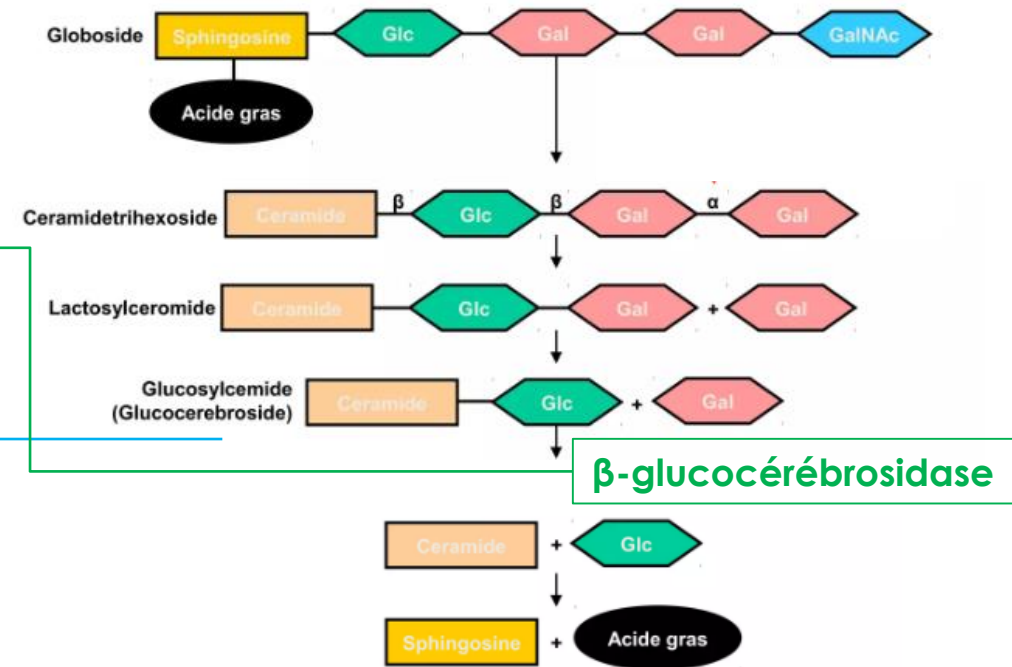
- Peut être difficile d'interprétation si leucopénie

- Confirmation par **étude génétique de GBA** 3-

- Peu de corrélation génotype-phénotype

- **Traitement de la cause** : enzymothérapie substitutive, blocage de la synthèse des céramides (Eliglustat)

déacylation



MALADIES LYSOSOMALES

DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE

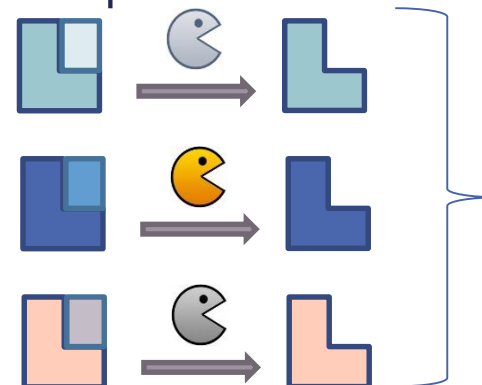
- **Un cas clinique**

- Sacha, né à 38 semaines d'aménorrhées, a présenté des épisodes de bradycardies en période néonatale. Les parents trouvent que l'enfant a une mauvaise tenue de la tête, et semble « ramolli ». Il est hospitalisé à l'âge de 1 mois :
 - Echographie cœur : cardiomyopathie hypertrophique
 - Examen clinique général : hépatosplénomégalie
 - Examen neurologie : hypotonie axiale majeure

- Screening de maladie héréditaires métaboliques

ACTIVITES ENZYMATIQUES SUR TACHE de SANG SECHE

- Gaucher
- Fabry
- Pompe
- Krabbe
- Niemann-Pick A/B
- MPS I



Approche
multiplex
**Spectrométrie de
masse
LC-MSMS**

MALADIES LYSOSOMALES

DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE

- **Un cas clinique**
- Résultats
 - Activité maltase acide effondrée : **0.26** $\mu\text{mol/L/h}$ (VR : 2.9-13.5)

DEPISTAGE DE LA MALADIE DE POMPE

Activité de la maltase acide dans du sang déposé sur papier buvard

*Détermination par spectrométrie de masse en tandem.
Kit NeoLSD TM MSMS (Perkin-Elmer).
L'alpha-L-iduronidase (Idu) a été déterminée à titre d'activité témoin.*

	Résultats	Unités	Valeurs de référence	Antériorités
Maltase acide	✚ 0.26	$\mu\text{mol/L/heure}$	2.90-13.50	
alpha-L-Iduronidase	4.31	$\mu\text{mol/L/heure}$	3.32-14.20	
Rapport Maltase/Idu	✚ 0.06		>0.48	
Conclusion:	Activité maltase acide nettement diminuée.			

- Maladie évoqué : **Maladie de Pompe**

MALADIES LYSOSOMALES

DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE

Autosomique récessif
(GAA) 17q25.3

• Maladie de Pompe

- Déficit en **maltase acide** (alpha 1-4 glucosidase acide) ou **lysosomale**.
- Accumulation de disaccharides dans le **lysosome** et de glycogène dans la cellule (muscle squelettique, myocarde, foie,...) = atteintes majeures des organes glycogéniques

Forme Infantile

→ Tableau de la forme classique : **sévère**

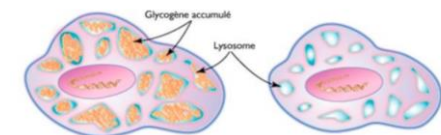
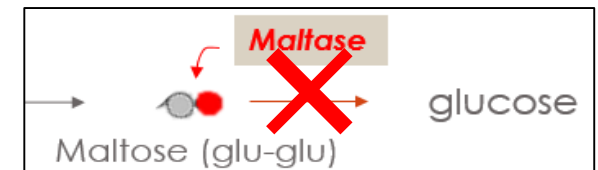
++

- **Cardiomégalie, insuffisance cardiaque.**
 - **Hypotonie musculaire néonatale majeure**
 - **Insuffisance respiratoire**
- Décès dans la majorité des cas <1 an

Forme Juvénile

Forme Tardive

- **Atteinte appareil musculaire moteur et respiratoire**
→ Progressif



MALADIES LYSOSOMALES

DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE

Autosomique récessif
(GAA) 17q25.3

• Maladie de Pompe

- Activité **maltase acide** : confirmer sur un second prélèvement biologique

- Sang EDTA, sang séché buvard
- Biopsie musculaire
- Biopsie cutanée → fibroblastes

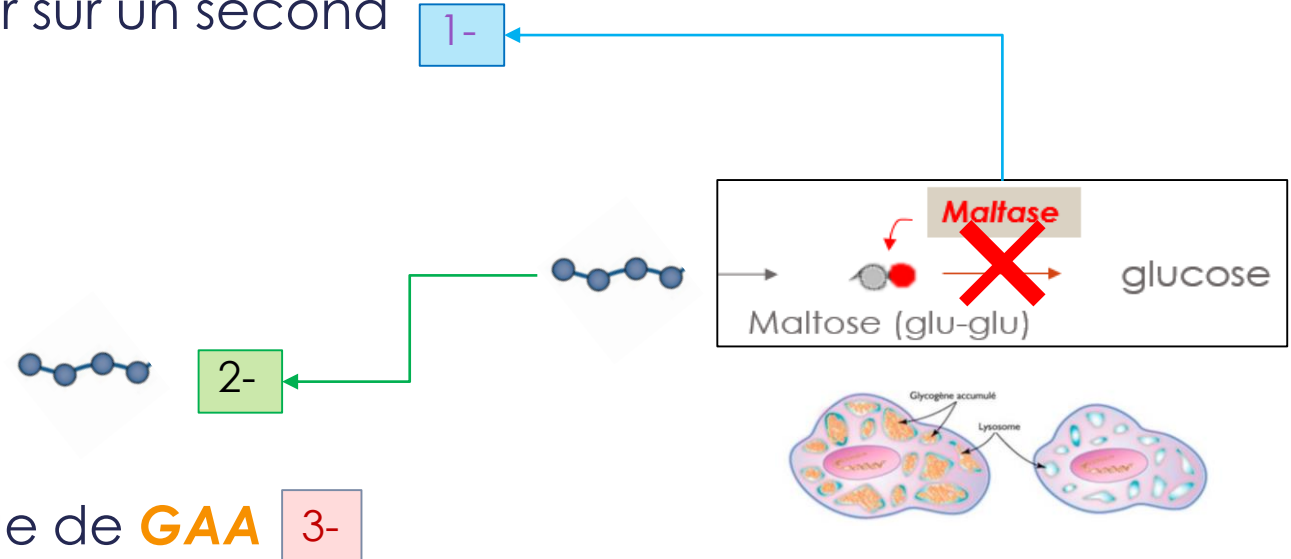
- Dosage de **tétraglucose** (Glc4)

- Nombreux faux positifs
- Intérêt dans le suivi de la maladie

- Confirmation par étude génétique de **GAA**

- **Maladie toujours évolutive** → PEC pluridisciplinaire

- Cardio-respiratoire ++
- Kinésiologie/Orthopédie ++



PRINCIPALES SOURCES

- *“Novel Approaches of Dysregulating Lysosome Functions in Cancer Cells by Specific Drugs and Its Nanoformulations”*. K Allemailem et al. 2021
- *Centre de Compétences des maladies héréditaires du métabolisme*
- *« Lysosomal Storage Diseases »*, Frances M. Platt¹. Nature Reviews 2018
- *K Kaushansky et al. Williams Haematology 9th edition*
- *Maladies de Surcharge Lysosomales, Nouveaux biomarqueurs Plasmatiques, Magali Pettazzoni JFBM 2019*
- *Master CGMP 2023*
- *Campus Sanofi*
- *Société Française pour l'étude des erreurs innées du Métabolisme*