

Université Paris Sud - Faculté des Sciences

Date: 14.6.2017	Unité d'enseignement EN188: Dynamique cellulaire (L3S5)
Année: 2016/2017	Durée: 1h

Numéro d'anonymat :
Sujet B

Une maladie lysosomale a été dénommée I-cell disease (ICD) par suite de l'apparition de nombreuses inclusions visibles en microscopie dans les lysosomes des cellules des malades. Les malades présentent par ailleurs dans le sérum et les sécrétions un taux anormalement élevé d'hydrolases lysosomales. Cette maladie a un déterminisme génétique autosomal et récessif.

Les expériences décrites ici ont été réalisées avec des cultures de fibroblastes établies à partir de biopsies de peau d'individus homozygotes normaux ou atteints d'ICD.

Q1 - - D'après vos connaissances, quels sont le contenu et la fonction des lysosomes dans les cellules normales ? (1pt)

Les lysosomes sont des vésicules intracytoplasmiques contenant des hydrolases ou enzymes de destruction
Ils interviennent dans la dégradation de structures cellulaires ou extracellulaires

Q2 - Proposez une hypothèse expliquant l'apparition de nombreuses inclusions dans les cellules ICD. (1pt)

La maladie se caractérise par une sécrétion importante d'hydrolases et la présence de nombreuses inclusions cytoplasmiques
On peut proposer l'hypothèse suivante : Les inclusions qui apparaissent dans le cytoplasme des cellules ICD correspondent à une accumulation de matériel biologique non dégradé du fait de l'exocytose anormale des hydrolases

A la suite d'expériences de pulse-chasse avec de la leucine ^3H , ou du mannose ^3H , ou du phosphate ^{32}P , on a constaté que, contrairement à celles des cellules témoin, les enzymes lysosomales des cellules ICD (cathepsine D, glucosidase, hexosaminidase) sont essentiellement trouvées dans le milieu de culture, et de plus sous forme de précurseurs glycosylés mais non phosphorylés.

Q3 - Comment expliquez-vous, en utilisant vos connaissances, les anomalies présentées par ces enzymes dans les cellules ICD ? (1.5pt)

L'expérience de pulse chasse montre que les hydrolases des cellules ICD sont bien glycosylées mais pas phosphorylées
 Ces Hydrolases n'étant pas phosphorylées, elles ne sont donc pas reconnues par le récepteur au mannose 6 phosphate, responsable du tri et de l'adressage des hydrolases depuis le réseau trans-golgien vers les vésicules à hydrolases puis les lysosomes
 De ce fait elles sont secrétées en dehors de la cellule
 Les lysosomes sont non fonctionnels car non alimentés en hydrolases, il y a accumulation de matériel biologique non dégradé donnant des inclusions

Dans les cellules normales, les mannoses des enzymes lysosomales sont phosphorylés. Ces phosphorylations font intervenir deux étapes successives contrôlées par une phosphotransférase et une phosphodiesterase. Les activités de ces deux enzymes ont été mesurées sur la fraction de glycoprotéines provenant des cellules normales et des cellules ICD.

Cellules	Activité enzymatique (par mg de protéines)	
	Phosphotransférase	Phosphodiesterase
Normales	0,7-1,46	2,5-5,5
ICD	<0,02	2,5-5,5

Q4 - Quelle est la cause initiale de cette maladie ? (0.5pt)

Ici on observe l'activité enzymatique et non la présence ou l'absence d'enzyme
 Concernant la phosphodiesterase les cellules normales et ICD présentent la même activité on en déduit que l'enzyme est fonctionnelle dans les deux types cellulaires
 Concernant la phosphotransférase les cellules ICD ne présentent aucune activité contrairement aux cellules normales. On en déduit que la maladie repose sur la perte d'activité de cette enzyme.

Deux enzymes lysosomales, l'iduronidase et la glucuronidase ont été purifiées à partir de cultures de cellules normales et de cellules ICD. Ces enzymes sont ajoutées aux milieux de cultures de trois types de cellules mutantes

cellules ICD

cellules dites de Hurler (ne synthétisant pas d'iduronidase)

cellules appelées X ne synthétisant pas de glucuronidase

Au bout d'un certain temps d'incubation, on a dosé dans chaque type de cellules mutantes l'activité enzymatique initialement déficiente

Provenance des enzymes exogènes	Activité enzymatique dans les cellules (unité/mg de cellules)					
	Cellules ICD		Cellules de Hurler		Cellules X	
	Glu	Idu	Glu	Idu	Glu	Idu
Cellules normales	0.6-0.8	0.8-0.9	Non mesuré	0.8-0.9	0.6-0.8	Non mesuré
Cellules ICD	0	0	Non mesure	0	0	Non mesuré

Q5 Comparer le devenir des enzymes exogènes provenant des cellules normales et ICD lorsqu'elles sont mises en présence des trois types de cellules (1pt)

Les enzymes exogènes provenant des cellules normales sont capables de rentrer dans les 3 types cellulaires et d'avoir une activité biologique, elles sont donc capables de remplacer les enzymes endogènes défectueuses (première ligne)
L'absence d'activité pour les enzymes provenant des cellules ICD montre qu'elles ne pénètrent pas dans les cellules (deuxième ligne)

Q6 Pouvez-vous compléter votre réponse à la question 3 en ce qui concerne les effets de l'anomalie de structure des enzymes lysosomales des cellules ICD ? (1pt)

L'anomalie de phosphorylation des enzymes lysosomales des cellules ICD (observée question 3) en plus de provoquer leur détournement vers l'extérieur de la cellule empêche leur endocytose quand elles sont dans le milieu externe

De l'iduronidase radioactive purifiée provenant de cellules normales a été ajoutée au milieu de culture de cellules normales et de cellules ICD

-soit seule

-soit en présence de mannose-6-phosphate en concentration très supérieure à celle de l'enzyme

-soit en présence de glucose-6-phosphate en concentration très supérieure à celle de l'enzyme

La quantité d'enzyme internalisée dans les cellules a été mesurée. Lorsque l'enzyme est ajoutée seule ou en présence de glucose-6-phosphate la quantité d'enzyme internalisée est significative et équivalente dans les deux types de culture. Par contre, en présence de mannose-6-phosphate la quantité d'enzyme internalisée est nulle dans les deux types de culture.

Q7 Interprétez et comparez les résultats obtenus avec les cellules normales et ICD (2pt)

Iduronidase exogène seule, pénètre dans les 2 types de cellules
On en déduit la présence d'un récepteur membranaire sur ces deux types de cellules faisant entrer l'enzyme dans la cellule
Iduronidase en présence de glucose 6P pénètre dans les 2 types de cellules
Le glucose 6P n'interfère pas dans la reconnaissance iduronidase récepteur
Iduronidase en présence de mannose 6P ne pénètre plus dans les 2 types de cellules
Le mannose 6P interfère dans la reconnaissance iduronidase récepteur
Les deux types de cellules normales et ICD comportent à leur surface externe des récepteurs au mannose 6 P. les mêmes qui sont présents au niveau du Golgi

Etude de cultures mixtes

On réalise trois types de cultures mixtes en mettant dans la même boîte des cellules fibroblastiques d'origines différentes

- culture 1 ; cellules normales et cellules ICD
- culture 2 ; cellules normales et cellules de Hurler
- culture 3 ; cellules ICD et cellules de Hurler

Quelques temps après, on observe les cellules des trois types de cultures par microscopie

Q8 Quel est le phénotype des cellules présentes dans chacune des cultures (2pt)

On ne s'intéresse pas au phénotype des cellules de départ mais des cellules après quelques temps de culture
Culture 1 : les cellules normales secrètent de façon non voulue leurs enzymes lysosomales dont la phosphotransférase
Ces enzymes sont récupérées et internalisées dans les cellules ICD qui deviennent normales
Toutes les cellules auront un phénotype sauvage
Culture 2 : les cellules normales secrètent leurs enzymes lysosomales dont l'iduronidase
Ces enzymes sont récupérées et internalisées dans les cellules de Hurler qui deviennent normales
Toutes les cellules auront un phénotype sauvage
Culture 3 : les cellules ICD secrètent leurs enzymes lysosomales sans mannose 6, ces enzymes ne peuvent pas être récupérées par les cellules de Hurler qui conserveront un phénotype anormal
: les cellules de Hurler secrètent leurs enzymes lysosomales sauf l'iduronidase, ces enzymes sont récupérées par les cellules ICD. Mais l'absence de l'iduronidase ne permettra pas aux cellules ICD de récupérer un phénotype normal