

# Université Paris Saclay - Faculté des Sciences Orsay

Date: 09/06/2022	Unité d'enseignement OLSV303: <b>Dynamique cellulaire</b>
Année: 2021/2022	Durée: 2h

**Toutes les réponses doivent être justifiées**

A) Etude comparative de trois maladies touchant le système lysosomal :

Ces trois maladies se caractérisent en microscopie par l'apparition de nombreux lysosomes devenus plus ou moins énormes suite à l'accumulation de molécules non dégradées dans ces organites.

- la maladie de Hurler, mucopolysaccharidose, de type I caractérisée par l'absence totale de l' $\alpha$  Iduronidase,
- la maladie de Sly mucopolysaccharidose de type VII caractérisée par l'absence totale de la  $\beta$  glucuronidase,
- la maladie dénommée I-cell disease (ICD), mucopolipidose de type II, caractérisée par un taux anormalement élevé d'hydrolases lysosomales excrétées de la cellule

**Q1 A ce stade de l'étude et d'après vos connaissances, quelle(s) hypothèse(s) permettent d'expliquer de l'accumulation de molécules non dégradées dans ces lysosomes pour ces trois types de maladies ?**

Pour les maladies de Hurler et Sly :

L'accumulation des lysosomes est due à un dysfonctionnement de ces derniers.

Les deux enzymes citées sont des enzymes de dégradation des résidus glucidiques (suffixe ase) agissant normalement dans les lysosomes

L'absence d'une enzyme de dégradation dans le lysosome entraîne donc une accumulation de molécules non dégradés

Dans les lysosomes il existe toute une cascade de réactions de dégradation l'absence d'une enzyme bloque tout le système

Pour la maladie dite ICL

Les hydrolases sont sécrétées à l'extérieur de la cellule et ne sont plus envoyées dans le système lysosomal ce qui explique que du matériel non dégradé s'accumule dans les lysosomes

Afin de caractériser la maladie ICD, différentes expériences de pulse-chasse avec de la  $^3\text{H}$ -leucine, du  $^3\text{H}$ -mannose et d'ATP ( $^{32}\text{P}$ ) ont été réalisées in vitro sur des fibroblastes de patients ICD. On constate que les enzymes lysosomales de ces cellules (cathepsine,  $\alpha$  iduronidase,  $\beta$  glucuronidase, hexosaminidase...) sont essentiellement trouvées dans le milieu de culture. En présence de  $^3\text{H}$ -leucine et de  $^3\text{H}$ -mannose ces protéines sont radiomarquées. A l'inverse dans les expériences réalisées avec de l'ATP ( $^{32}\text{P}$ ) ces protéines ne présentent aucune radioactivité.

**Q2 Ces résultats apportent-ils des compléments d'informations sur l'origine des anomalies observées en microscopie et vous permettent-ils de préciser le dysfonctionnement moléculaire à l'origine du phénotype observé ?**

Les protéines sont normalement traduites et glycosylées (puisque radioactivement marquées avec de la  $^3\text{H}$ -leucine et de  $^3\text{H}$ -mannose) mais ne sont pas phosphorylées (puisque non radioactives en présence l'ATP ( $^{32}\text{P}$ ))

cette absence de phosphorylation entraîne une erreur d'adressage des protéines. Le Phosphate doit intervenir de façon directe dans l'adressage des protéines vers les lysosomes

B) Les deux enzymes lysosomales : l'  $\alpha$  iduronidase et la  $\beta$  glucuronidase ont été purifiées à partir de l'appareil de Golgi de cellules normales et de cellules ICD. Ces enzymes ont été ajoutées aux milieux de culture de deux types cellulaires :

- Cellules de « Hurler »
- Cellules de « Sly »

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

	Activités enzymatiques dans les cellules (unités arbitraires)			
	Cellules de « Hurler »		Cellules de « Sly »	
	gluc	idu	gluc	idu
Enzymes provenant de cellules normales	NM	0.8-0.9	0.6-0.8	NM
Enzymes provenant de cellules ICD	NM	0	0	NM

Gluc : glucuronidase, idu : iduronidase, NM non mesuré

**Q3 Comparez le devenir des enzymes exogènes provenant des Golgi des cellules normales et ICD lorsqu'elles sont mises en présence de ces types cellulaires. Proposez un mécanisme expliquant la récupération par une cellule d'une activité enzymatique lysosomale initialement déficiente. A partir de ce mécanisme, proposez des hypothèses expliquant les résultats obtenus dans le tableau.**

Les protéines provenant de cellules normales pénètrent dans les deux types de cellules elles ont dû être captées par des récepteurs présents à la surface de la membrane plasmique, puis internalisées et acheminées via l'endosome aux lysosomes  
 Pour les protéines provenant des cellules ICD elles ne rentrent pas dans la cellule car n'étant pas phosphorylées elles ne peuvent donc pas être reconnues par un récepteur situé sur la membrane plasmique.

C) On a cherché ensuite à déterminer le mécanisme moléculaire de l'internalisation des enzymes exogènes dans les cellules en culture. De l'iduronidase radioactive purifiée provenant du Golgi cellules normales a été rajoutée au milieu de culture de cellules normales et de cellules ICD :

Soit seule.

Soit en présence de mannose 6 phosphate en concentration supérieure à l'enzyme.

Soit en présence de glucose 6 phosphate en concentration supérieure à l'enzyme.

La quantité d'enzymes internalisées dans les cellules a été mesurée. Lorsque l'enzyme est ajoutée seule ou en présence de glucose 6 phosphate la quantité d'enzymes internalisées est significativement augmentée et équivalente dans les deux types cellulaires. Par contre en présence de mannose 6 phosphate la quantité d'enzymes internalisées est nulle dans les deux cas.

**Q4 Interprétez et comparez les résultats obtenus avec ces deux types cellulaires et complétez votre réponse à la question précédente en réévaluant vos hypothèses faites en Q3.**

L'iduronidase seule pénètre dans les cellules normales et comme dans les cellules ICL  
 En présence de mannose 6 P dans le milieu il n'y a plus de pénétration dans les cellules le mannose 6 P entre en compétition avec l'enzyme pour le récepteur membranaire  
 En présence de glucose 6 P dans le milieu il y a pénétration dans les deux types de cellules le glucose 6 P n'interagit pas avec le récepteur  
 On en déduit qu'il y a intervention entre un récepteur membranaire et un mannose 6 phosphate présent sur l'enzyme.  
 La question 3 indiquait la nécessité d'une phosphorylation de la protéine sans indiquer la position  
 Maintenant on sait que le phosphate doit être porté par le mannose (en position 6).

D) Sur la base de ces expériences d'internalisation de molécules exogènes, des cultures mixtes de cellules ont été menées.

On a réalisé différents types de culture en mettant dans la même boîte des cellules fibroblastiques d'origine différentes

Culture 1 : cellules normales et cellules ICD.

Culture 2 : cellules normales et cellules de Hurler.

Culture 3 : cellules normales et cellules de Sly

Culture 4 : cellules ICD et cellules de Hurler.

Culture 5 : cellules ICD et cellules de Sly

Culture 6 : cellules de Sly et cellules de Hurler

Après quelques heures on observe les cellules de ces cultures en microscopie

**Q5 Pour chaque expérience, comment se présenteront les lysosomes, quel sera le phénotype des cellules et pourquoi ?**

**Culture 1 : cellules normales et cellules ICD.**

Toutes les cellules seront normales, les cellules ICD internaliseront les enzymes lysosomales secrétées par les cellules normales et verront leurs lysosomes fonctionner.

**Culture 2 : cellules normales et cellules de Hurler.**

Toutes les cellules seront normales, les cellules de Hurler internaliseront de l' $\alpha$  Iduronidase, sécrétée par les cellules normales et verront leurs lysosomes fonctionner

**Culture 3 : cellules normales et cellules de Sly**

Toutes les cellules seront normales les cellules de Sly internaliseront de la  $\beta$  glucuronidase, sécrétée par les cellules normales et verront leurs lysosomes fonctionner

**Culture 4 : cellules ICD et cellules de Hurler.**

Aucune cellule ne deviendra normale, les cellules ICD internaliseront les enzymes lysosomales secrétées par les cellules de Hurler mais pas l' $\alpha$  Iduronidase non synthétisée par ces cellules : leurs lysosomes ne pourront donc pas fonctionner

Les cellules de Hurler ne pourront pas internaliser l' $\alpha$  Iduronidase des cellules ICD puisque non porteuse du mannose 6P

**Culture 5 : cellules ICD et cellules de Sly**

Aucune cellule ne deviendra normale les cellules ICD internaliseront les enzymes lysosomales secrétées par les cellules de Sly mais pas la  $\beta$  glucuronidase, leurs lysosomes ne pourront pas fonctionner

Les cellules de Sly ne pourront pas internaliser  $\beta$  glucuronidase des cellules ICD puisque non porteuse du mannose 6P

**Culture 6 : cellules de Sly et cellules de Hurler**

Les cellules redeviendront normales

les cellules de Hurler internaliseront l' $\alpha$  Iduronidase des cellules de Sly et récupéreront des lysosomes fonctionnels

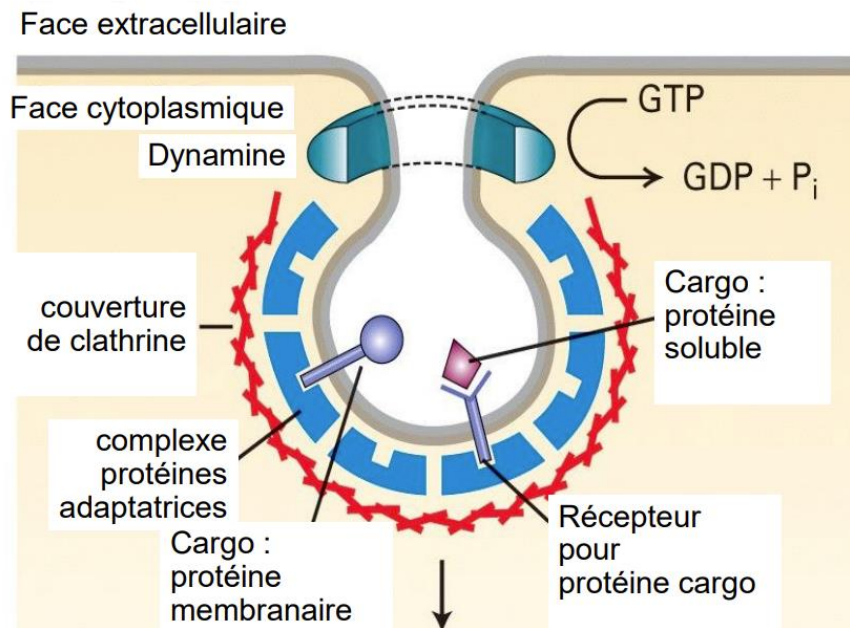
les cellules de Sly internaliseront la  $\beta$  glucuronidase des cellules de Hurler et récupéreront des lysosomes fonctionnels

**Q6 Quelle est la fonction de la clathrine dans le processus d'adressage des enzymes lysosomales ?**

la clathrine est un complexe protéique intracytoplasmique qui vient se fixer sur les protéines membranaires adaptatrices elles-mêmes fixées aux récepteurs au mannose 6 p déjà associés à des hydrolases, à la surface cytoplasmiques des saccules du réseau trans golgien une fois fixées elles se regroupent entraînant avec elles les récepteurs et permettent la formation de la vésicules a hydrolases

CF diapo du cours

## Formation de vésicules à clathrine

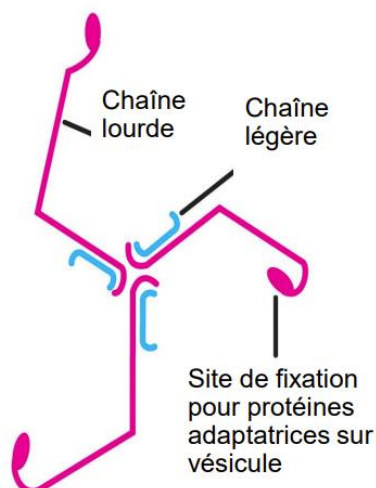


Q7 Quelle est l'organisation moléculaire de la clathrine ?

Complexe moléculaire constitué de 3 chaînes lourdes et 3 chaînes légères formant un triskélium  
Ces triskéliums s'associent entre eux pour faire une sorte de cage

Cf diapo du cours

### Triskélium



### Clathrine

2 protéines avec  
une structure  
particulière

L'assemblage d'une cage  
de clathrine

