

TD Trafic

## **SYNDROMES DE HURLER ET DE HUNTER**

= Mucopolysaccharidoses

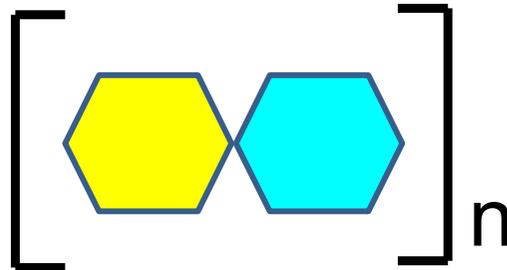
Maladies génétiques récessives, caractérisées par une accumulation anormale de mucopolysaccharides à l'intérieur des cellules qui les produisent.

## A – Introduction :

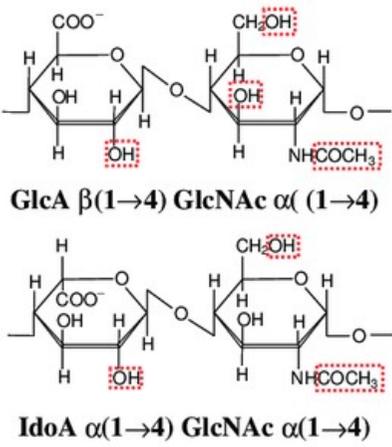
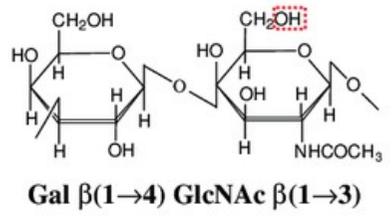
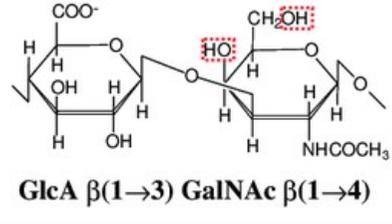
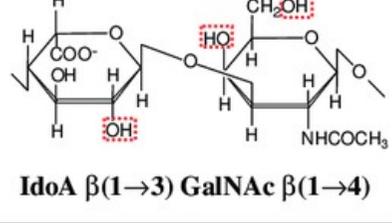
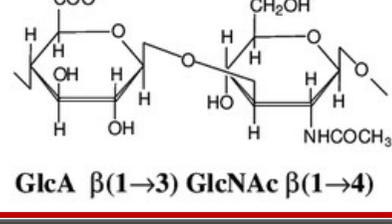
- ❖ Structure et propriétés des MPS acides (=Glycosaminoglycanes).
- ❖ Structure, synthèse, localisation des protéoglycanes.

# Structure des mucopolysaccharides (MPS) ou glycosaminoglycanes (GAG)

- Les MPS (ou GAG) sont des polymères linéaires d'unités disaccharidiques répétitives.



- Le motif disaccharidique répété est constitué d'un **hexose** (acide hexuronique ou galactose) et d'une **hexoamine**.
- Les composants du motif disaccharidique de base peuvent subir de nombreuses modifications chimiques post-synthétiques (N-sulfatation, O-sulfatation, épimérisation) et le nombre d'unités répétées composant le MPS peut être très variable.
- les MPS sont divisés en 5 grandes familles, selon la nature du motif disaccharidique qui les constitue.

| GAG                                       | Hexuronic or Iduronic acid   | Galactose                | Hexosamine                        | Disaccharide composition  |
|---|--|--------------------------|-----------------------------------|---|
| <b>Heparan sulphate/ Heparin</b>          | D-glucuronic acid ( <b>GlcA</b> )<br>L-iduronic acid ( <b>IdoA</b> ) | -                        | D-glucosamine ( <b>GlcNAc</b> )   |  <p><b>GlcA</b> <math>\beta(1\rightarrow4)</math> <b>GlcNAc</b> <math>\alpha(1\rightarrow4)</math></p> <p><b>IdoA</b> <math>\alpha(1\rightarrow4)</math> <b>GlcNAc</b> <math>\alpha(1\rightarrow4)</math></p> |
| <b>Keratan sulphate</b><br>(4-19 kDa)     | -  | Galactose ( <b>Gal</b> ) | D-glucosamine ( <b>GlcNAc</b> )   |  <p><b>Gal</b> <math>\beta(1\rightarrow4)</math> <b>GlcNAc</b> <math>\beta(1\rightarrow3)</math></p>  |
| <b>Chondroitin sulphate</b><br>(5-50 kDa) | D-glucuronic acid ( <b>GlcA</b> )                                    | -                        | D-galactosamine ( <b>GalNAc</b> ) |  <p><b>GlcA</b> <math>\beta(1\rightarrow3)</math> <b>GalNAc</b> <math>\beta(1\rightarrow4)</math></p>  |
| <b>Dermatan sulphate</b><br>(15-40 kDa)   | D-glucuronic acid ( <b>GlcA</b> )<br>L-iduronic acid ( <b>IdoA</b> ) | -                        | D-galactosamine ( <b>GalNAc</b> ) |  <p><b>IdoA</b> <math>\beta(1\rightarrow3)</math> <b>GalNAc</b> <math>\beta(1\rightarrow4)</math></p>   |
| <b>Hyaluronic acid</b><br>(4-8000 kDa)    | D-glucuronic acid ( <b>GlcA</b> )                                    | -                        | D-glucosamine ( <b>GlcNAc</b> )   |  <p><b>GlcA</b> <math>\beta(1\rightarrow3)</math> <b>GlcNAc</b> <math>\beta(1\rightarrow4)</math></p>   |

## Familles de MPS

 Sites potentiels de sulfatation (OH  $\rightarrow$  OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)

Au pH physiologique, les groupements COOH et Sulfates sont déprotonés ce qui confèrent aux MPS une forte charge négative et un fort pouvoir osmotique.

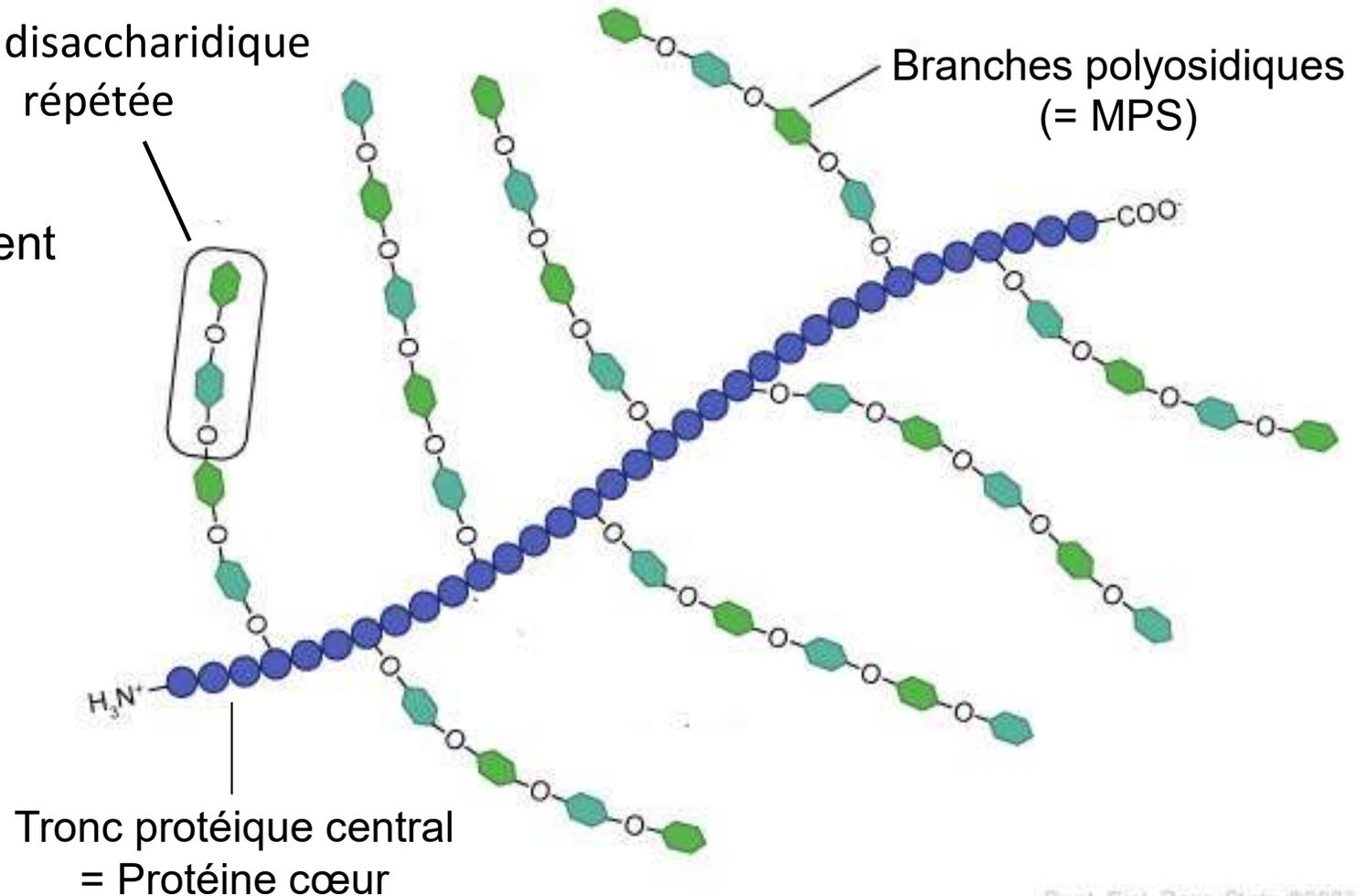
MPS non sulfaté, synthétisé au niveau de la membrane plasmique et non lié de manière covalente à une protéine.

# Structure des protéoglycanes

A l'exception de l'AH, tous les MPS sont attachés par une liaison covalente à une protéine "cœur" pour former un protéoglycane.

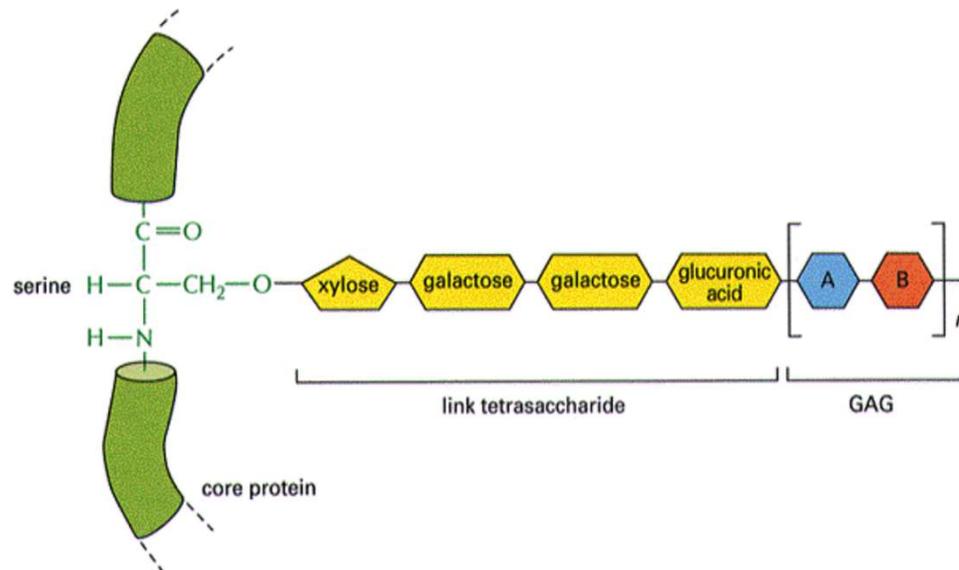
Les PG se distinguent par :

- La nature de la protéine cœur,
- le type, le profil de modification biochimique, le nombre et la longueur des MPS liés.



## Synthèse des protéoglycanes (PG)

- La biosynthèse des PG débute par la formation de la protéine centrale dans le Réticulum Endoplasmique (RE).
- Dans le cas des CS, HS et DS, un tétrasaccharide particulier (AcGlu-Gal-Gal-Xyl) est ensuite greffé sur certains résidus sérines de la protéine par liaison entre le xylose et la fonction hydroxyle de ces sérines.
- Les chaînes de MPS sont ensuite polymérisées à partir de ces structures d'ancrage (par addition successive et alternée d'une hexoamine et d'un hexose) essentiellement dans l'appareil de Golgi. Les réactions d'acétylation et de sulfatation ont également lieu dans le golgi.



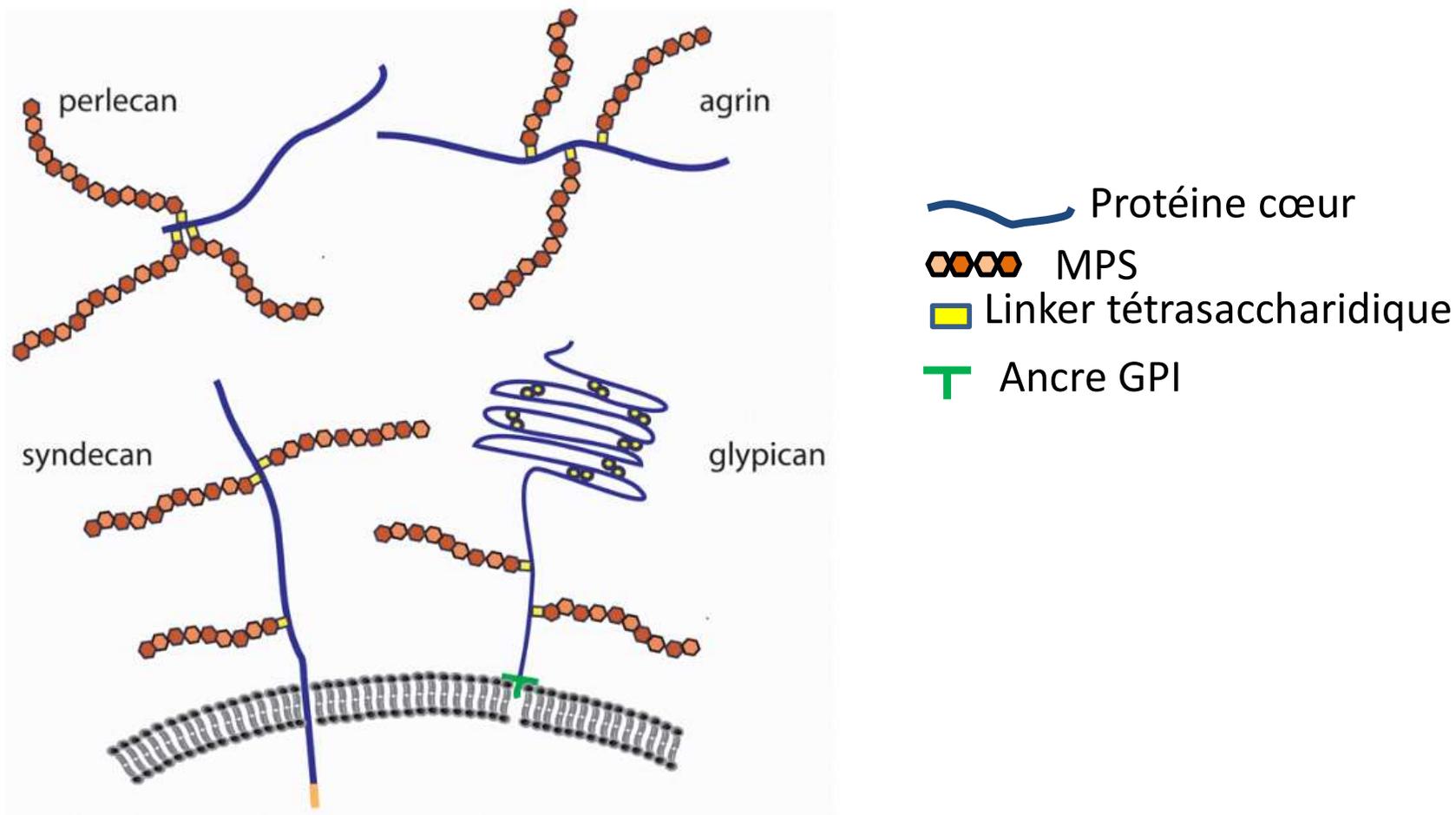
## Synthèse des protéoglycanes (PG): suite

Les kératanes sulfates de type I sont liés de façon covalente à la protéine cœur via des résidus Asparagines.

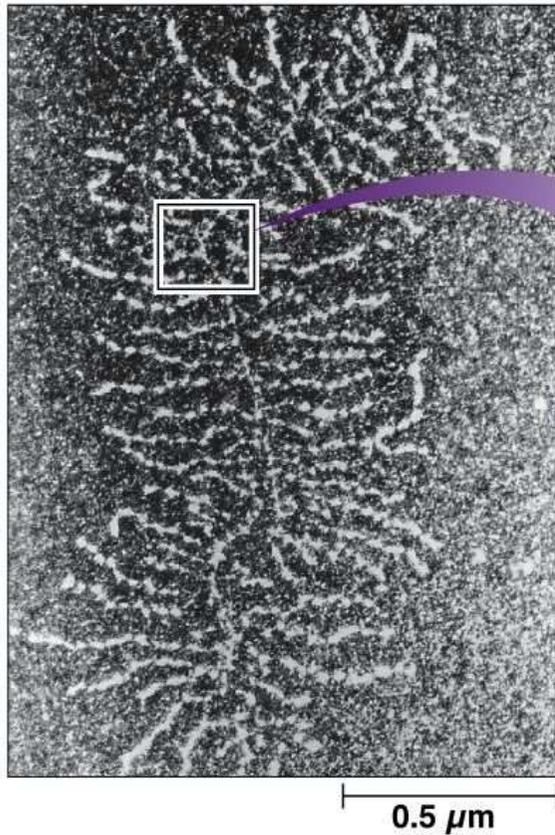
Les Kératanes sulfates de type II et III sont liés de façon covalente à la protéine cœur via des résidus Sérines ou Thréonines mais pas par l'intermédiaire du pont tétrasaccharidique décrit précédemment.

## Localisation des protéoglycanes

Les protéoglycanes sont majoritairement sécrétés dans le milieu extracellulaire ou présents à la surface de la cellule.

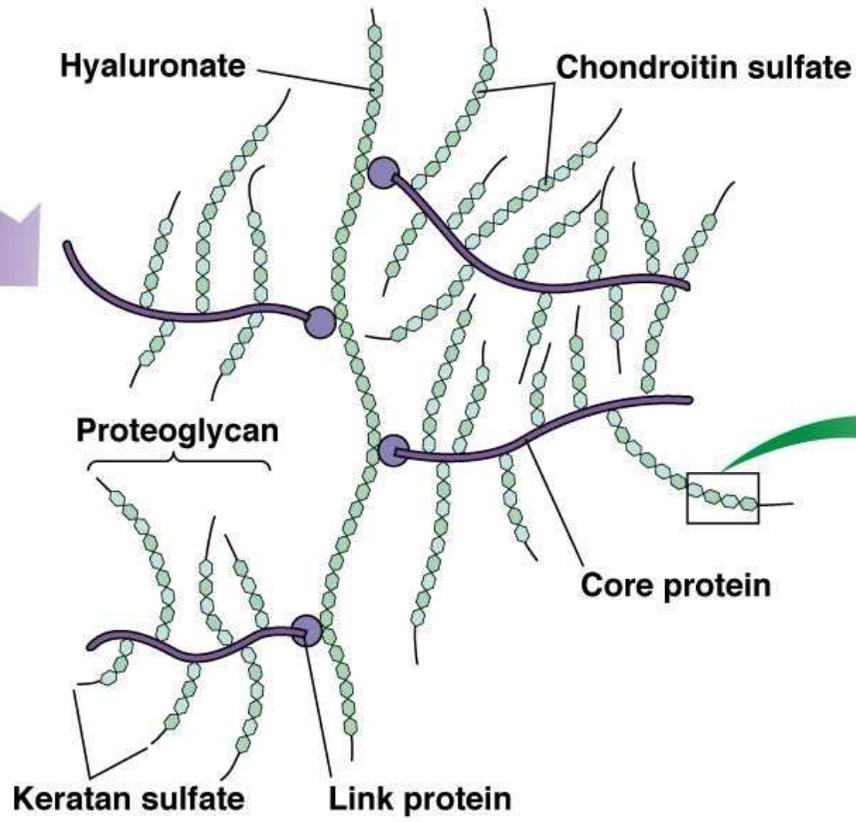


# Les protéoglycans peuvent former des agrégats dans la matrice extracellulaire

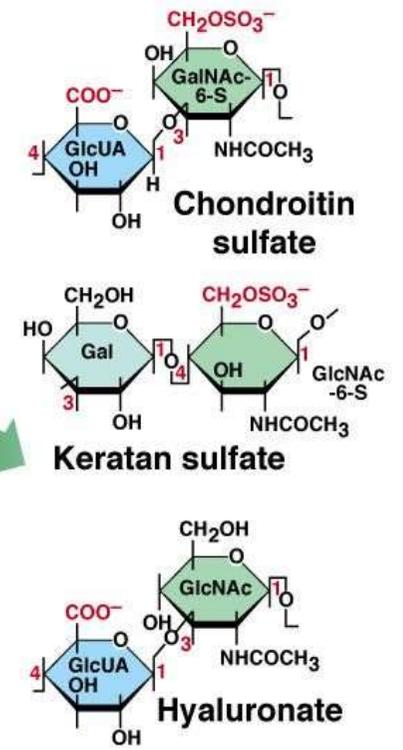


**(a)**

© 2012 Pearson Education, Inc.



**(b)**



**(c)** Repeating units of several common GAGs

## B - Etude des mécanismes impliqués dans le développement des syndromes de Hunter ou de Hurler

### I) Etude cytologique :

Modèles : cultures de fibroblastes établies à partir de biopsies de peau d'individus normaux ou atteints du syndrome de Hunter ou de Hurler.

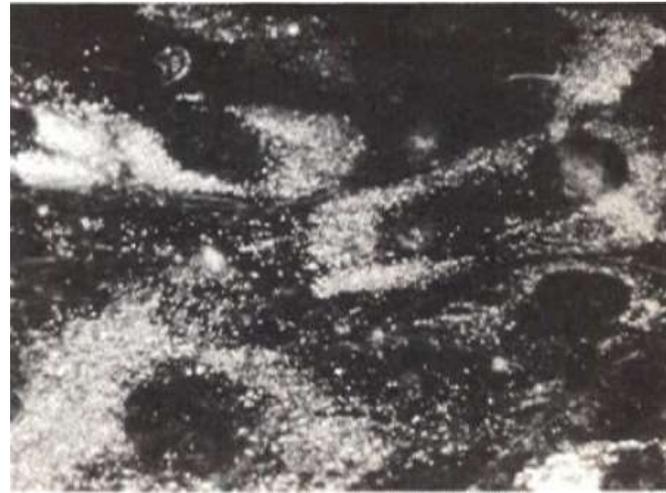
### Résultats :

- Matrice extra-cellulaire normale.
- Présence de très nombreux lysosomes devenus énormes par suite d'une accumulation très importante de MPS, dans les fibroblastes de malades.

**Q 1 –cette observation vous permet-elle de proposer un mécanisme sur l'origine de la maladie et sur l'accumulation des MPS dans les cellules de malades, sachant qu'elle ne résulte pas d'une erreur d'adressage au niveau de l'appareil de Golgi ?**



A. Patient témoin



B. Patient présentant un syndrome de Turner

\* Augmentation du nombre et de la taille des lysosomes.

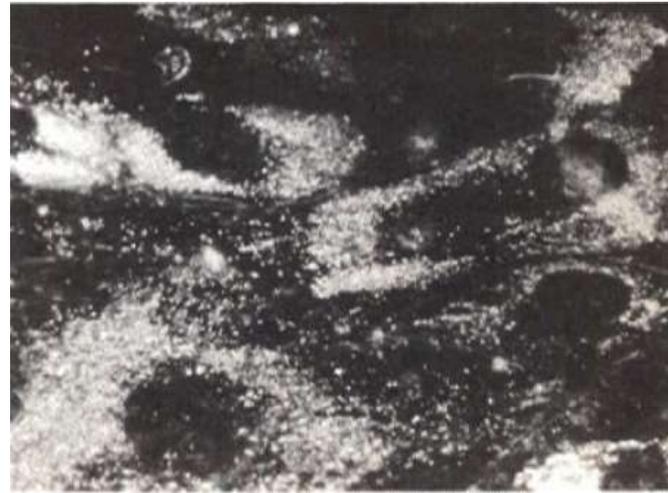
Origines possibles de l'augmentation du nombre et de la taille des lysosomes ?

- Augmentation anormale de la production de MPS et des PG provoquant l'engorgement du lysosome et un délai dans leur dégradation.
- Défaut de dégradation des MPS internalisés par endocytose.

**Q 1 –cette observation vous permet-elle de proposer un mécanisme sur l'origine de la maladie et sur l'accumulation des MPS dans les cellules de malades, sachant qu'elle ne résulte pas d'une erreur d'adressage au niveau de l'appareil de Golgi ?**



A. Patient témoin



B. Patient présentant un syndrome de Turner

La composition de la matrice extracellulaire n'est pas altérée chez les patients atteints d'un syndrome de Turner. Il est donc probable que la synthèse et la sécrétion des MPS s'effectuent normalement.

L'accumulation des MPS dans les lysosomes est probablement plutôt due à un défaut dans leur catabolisme.

## II – Analyses cinétiques :

### II .1 : Cas des cellules normales :

Modèles : cultures de fibroblastes établies à partir de biopsies de peau d'individus normaux.

Méthode : Technique dite du pulse chase

Les cellules en culture sont d'abord cultivées dans un milieu contenant des ions sulfates radioactifs ( $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ ) qui ne vont être incorporés que dans les MPS (phase de marquage ou « pulse »).

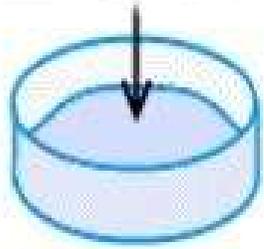
Après 48h d'incubation avec les ions  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ , les cellules vont être placées dans un milieu dit « froid », qui contient de grandes quantités d'ions sulfates  $^{32}\text{SO}_4^{2-}$  non radioactifs (phase de chasse).

L'évolution des quantités de  $^{35}\text{S}$ -MPS associés aux cellules, ainsi que de la radioactivité apparaissant dans le milieu de culture est analysée en fonction de la durée de la chasse.

## Protocole expérimental

« Pulse »

Milieu contenant des ions  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$   
(radioactifs)



48h

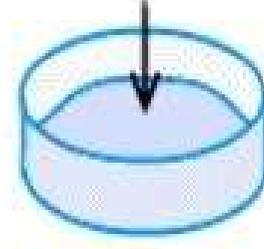


Lavage



«Chase»

Milieu contenant des ions  $^{32}\text{SO}_4^{2-}$   
(non radioactifs)



0-24h



Récupération du milieu de culture  
puis lavage des cellules



- Mesure de la radioactivité associée aux cellules
- Mesure de la radioactivité présente dans le milieu (dialysable et non dialysable)

La fraction « non dialysable » correspond aux MPS radioactifs intacts, la fraction dialysable correspond à des petits fragments de MPS radioactifs.

Tableau 1 : cas des cellules normales

| Temps de<br>chasse<br>(h) | MPS associés<br>aux cellules<br>(cpm) | Matériel radioactif     |                     |
|---------------------------|---------------------------------------|-------------------------|---------------------|
|                           |                                       | Non dialysable<br>(cpm) | Dialysable<br>(cpm) |
| 0                         | 36500                                 | 0                       | 0                   |
| 2                         | 30500                                 | 2800                    | 4700                |
| 9                         | 14200                                 | 3800                    | 17200               |
| 24                        | 5400                                  | 2900                    | 29200               |

Qu'observe-t-on, au fil du temps?

- Diminution de la radioactivité associée aux cellules
- Augmentation concomitante de la radioactivité présente dans le milieu de culture, très majoritairement associée à des produits de dégradation des MPS.

## Q 2 - Que représente le matériel radioactif cellulaire et quelle serait sa localisation ?

La durée de la période de marquage (pulse) est longue (2 jours) et supérieure à la durée de la synthèse des MPS.

A  $t=0$ , la radioactivité associée aux cellules correspond à celle incorporée dans les MPS :

- en cours de synthèse,
- empaquetés dans les vésicules de sécrétion post-golgiennes,
- attachés à la face externe de la membrane plasmique,
- en transit vers les lysosomes après avoir été internalisés.

### **Q3.1) Expliquez la décroissance, au cours de la chasse, de la teneur en MPS radioactifs associés aux cellules.**

Elle peut refléter:

- la sécrétion d'une partie des MPS synthétisés dans le milieu extracellulaire
- la disparition des MPS radiomarqués de la surface des cellules suite à leur dégradation.

Cette dégradation pourrait avoir lieu:

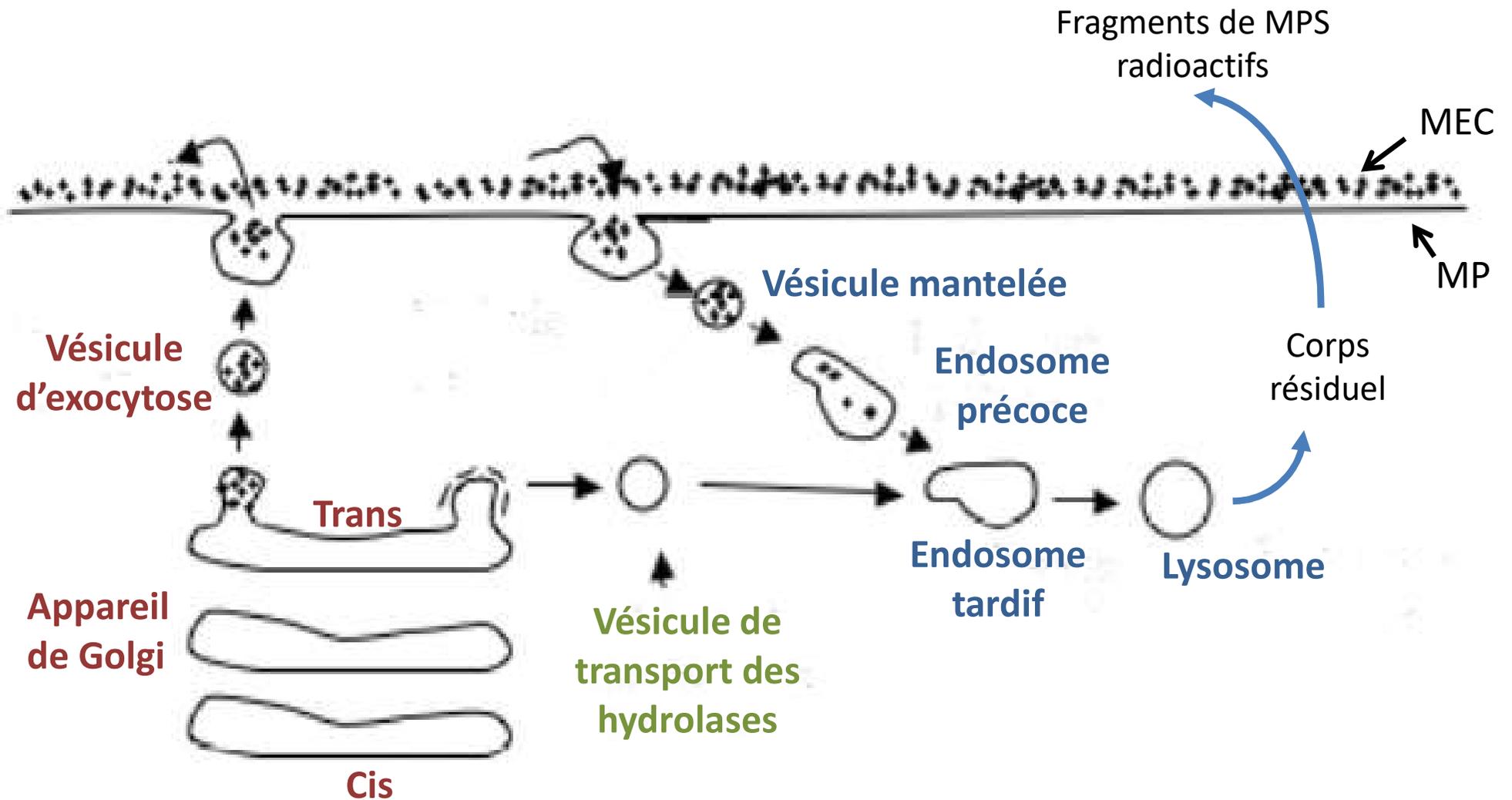
- au niveau de la membrane plasmique (sous l'effet d'enzymes présentes dans le milieu de culture),
- dans les lysosomes après internalisation des MPS radioactifs attachés à la surface de la cellule.

**Q3.2) Expliquez l'origine et l'augmentation du matériel dialysable dans le milieu de culture, sachant qu'aucune dégradation des MPS n'a pu être détectée dans le milieu de culture.**

Si les MPS ne sont pas dégradés par des enzymes présentes dans le milieu de culture, cela suggère que le clivage des chaînes polysaccharidiques a lieu à l'intérieur des cellules après que les MPS aient été endocytés.

La dégradation des MPS est pratiquement totale au bout de 24h.

Q 4 - Faites un schéma du cheminement des MPS à partir de leur synthèse.



## II.2) Comparaison des cellules normales et des cellules issues de patients présentant un syndrome de Hunter ou de Hurler :

La même expérience de marquage des MPS suivi éventuellement d'une chasse est effectuée avec des cellules provenant d'individus normaux ou atteints des syndromes de Hunter ou de Hurler cultivées dans deux lots A et B de boîtes de Pétri :

**Le lot A** est utilisé pour déterminer l'évolution en fonction du temps de **marquage** de la quantité de  $^{35}\text{S}$ -MPS associés aux cellules (Fig. 1) et libérés dans le milieu de culture (Fig. 2).

**Le lot B** est utilisé pour déterminer l'évolution en fonction du temps de **chasse** du contenu en  $^{35}\text{S}$ -MPS associé aux cellules (Fig. 3).

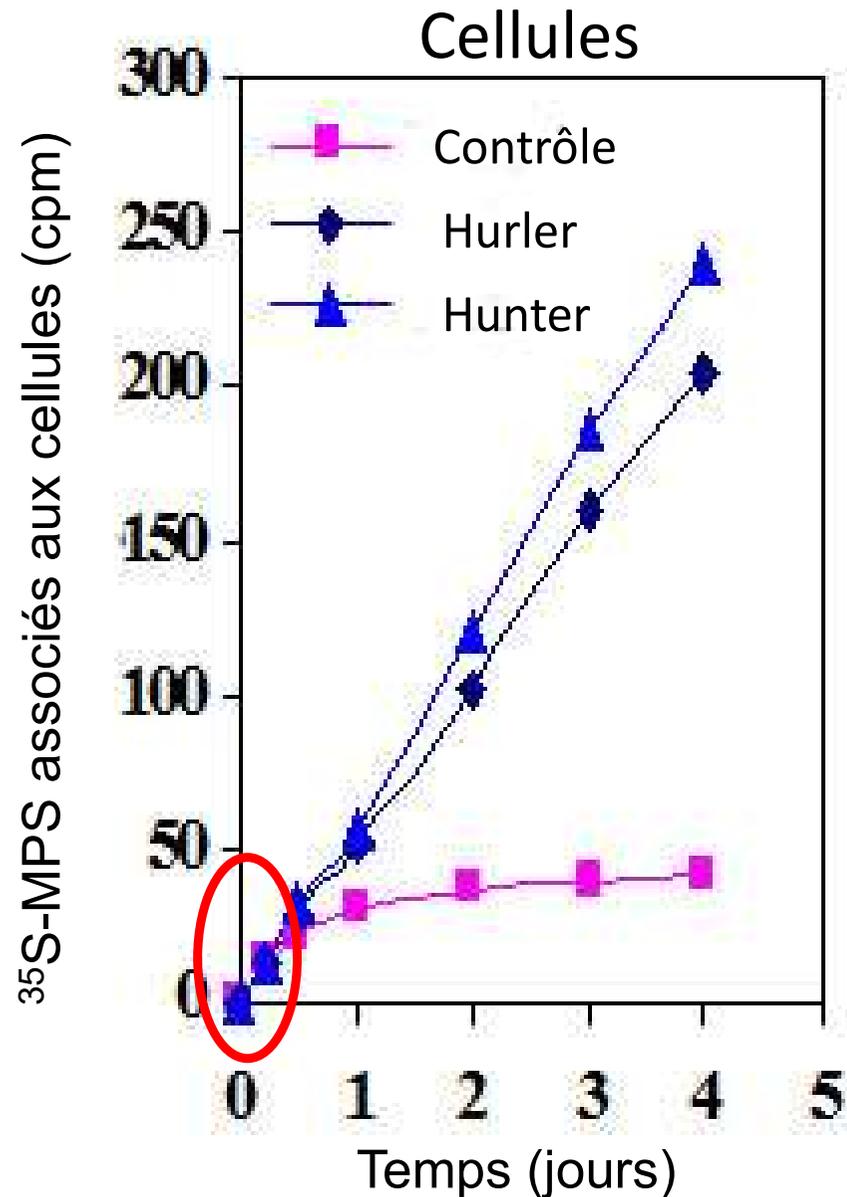
**Q 5 - En fonction de vos réponses précédentes, où serait localisée dans les cellules normales, de Hurler ou de Hunter la radioactivité apparaissant au cours de la première heure suivant l'ajout des ions sulfates radioactifs (figure 1) ?**

Au cours de la première heure de marquage seuls les MPS en cours de synthèse sont marqués au  $^{35}\text{S}$ .

La radioactivité apparaît donc d'abord dans le Golgi où s'effectuent les sulfatations.

Les MPS ainsi marqués apparaîtront ensuite dans les vésicules sécrétoires puis au niveau de la surface cellulaire et dans le milieu de culture.

**Q 6 - Qu'exprime la pente initiale des trois courbes de la figure 1 ? Le fait qu'elle soit identique apporte-t-il des informations sur les capacités de synthèse des MPS par les trois types de cellules ?**

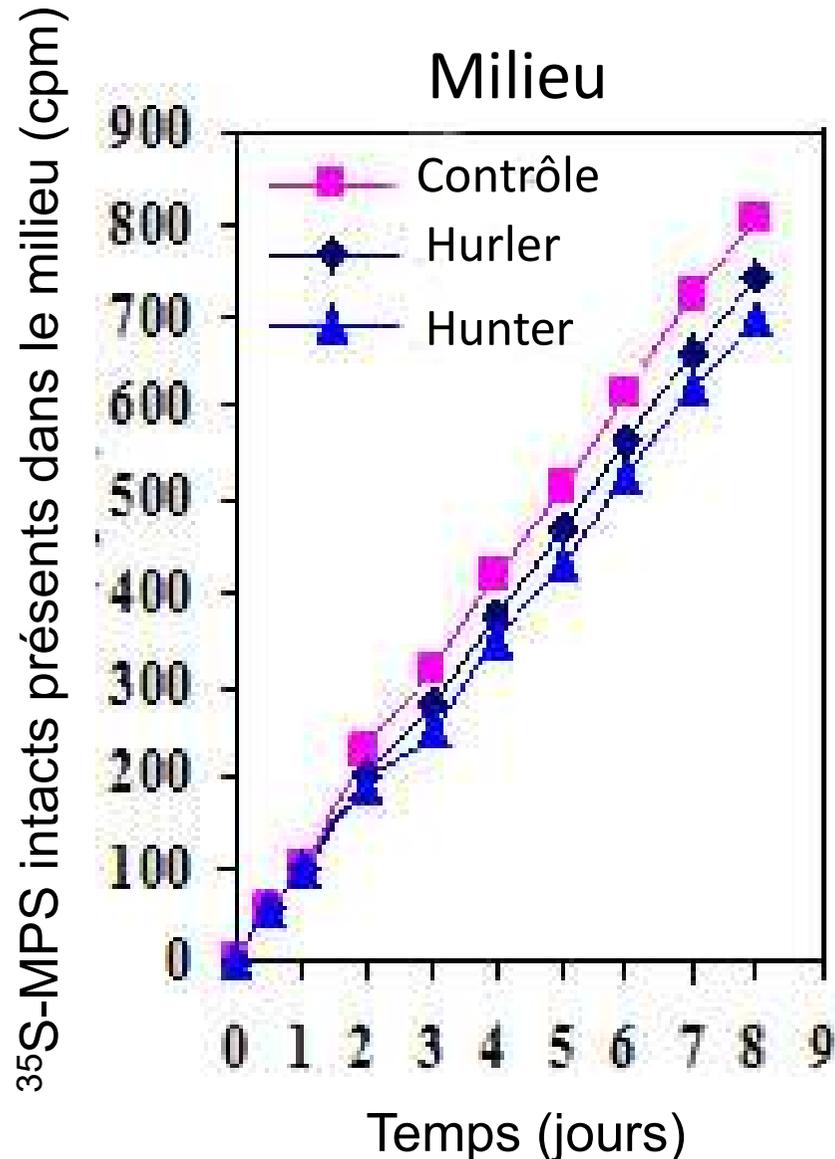


La pente initiale reflète la vitesse à laquelle les MPS radioactifs apparaissent dans les cellules et donc la vitesse à laquelle ils sont synthétisés.

La vitesse de synthèse est identique dans les trois types de cellules.

L'accumulation intracellulaire des MPS observée chez les patients atteints des syndromes de Hunter ou de Hurler n'est donc pas due à une accélération de leur synthèse.

**Q 7 - Les trois courbes de la figure 2 apportent-elles des informations sur les capacités de sécrétion des MPS synthétisés par les trois types de cellules étudiées ?**



Les 3 courbes représentent l'évolution de la quantité de MPS radioactifs intacts présents dans le milieu de culture en fonction du temps.

La pente de la courbe reflète la vitesse de sécrétion des MPS radiomarqués.

Cette vitesse est identique chez le sujet contrôle et chez les sujets malades.

L'accumulation intracellulaire des MPS observée chez les patients atteints des syndromes de Hunter ou de Hurler n'est donc pas due à un défaut de sécrétion.

**Q 8 - Dès lors, et tenant compte de vos réponses précédentes et des observations cytologiques, dans quel organite devrait être localisé l'excès de radioactivité associée aux cellules de Hunter et de Hurler après le premier jour de marquage (figure 1) ?**

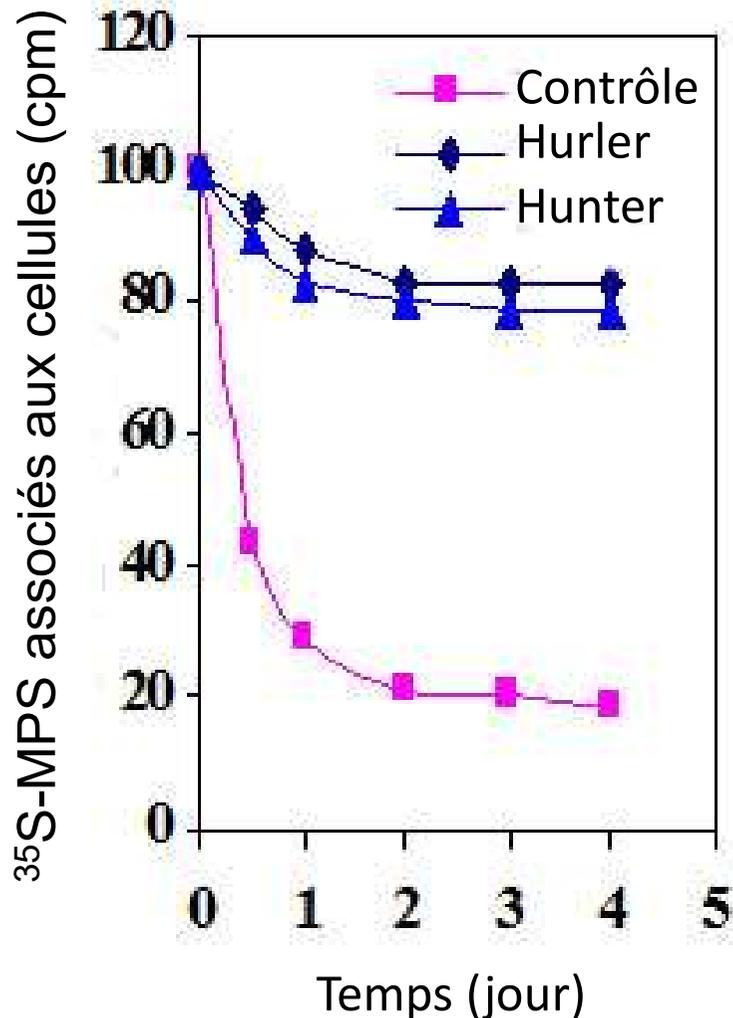
Si la synthèse et la sécrétion des MPS sont normales dans les cellules des patients atteints des syndromes de Hunter et de Hurler, l'excès de radioactivité associé à ces cellules après 24 heures de marquage devrait être localisé dans les endosomes ou dans les lysosomes.

L'analyse cytologique a montré une augmentation du nombre et de la taille des lysosomes matures dans les cellules de patients. C'est donc probablement dans les lysosomes que s'accumulent les MPS radioactifs.

Si les MPS s'accumulent dans les lysosomes des cellules de patients, cela suggère qu'ils peuvent être **normalement endocytés** par ces cellules.

**Q 9 - Pourquoi la radioactivité restant associée aux cellules de Hunter et de Hurler ne décroît-elle que peu au cours de la chasse (figure 3) ?**

A  $t=0$ , élimination des ions  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  du milieu de culture.



Les MPS endocytés s'accumulent dans les lysosomes au lieu d'y être dégradés en petits fragments normalement rejetés dans le milieu extracellulaire.

Les ions  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  associés aux MPS restent donc piégés à l'intérieur de la cellule.

## Q 10 - Quelle pourrait-être l'origine du défaut des cellules Hunter et Hurler?

Synthèse  
Sécrétion  
Endocytose

} normales

Dégradation dans les lysosomes altérée

Défaut de fonctionnement des enzymes lysosomales impliquées dans le catabolisme des MPS?

- Mauvais adressage des hydrolases acides qui ne parviennent plus jusqu'aux lysosomes.
  - Dysfonctionnement de la pompe à protons qui permet l'acidification des lysosomes.
  - Dysfonctionnement d'une des enzymes impliquées dans le catabolisme des MPSs.
- } Peu probable car le catabolisme d'autres constituants cellulaires serait aussi affecté.

### III- ANALYSE DES ENZYMES LYSOSOMALES

Dosage de l'activité de certaines enzymes lysosomales susceptibles d'être impliquées dans la dégradation des MPS, chez des sujets normaux (contrôles) ou présentant un syndrome de Hurler.

| Cellules | Activité enzymatique |                |                |                       |
|----------|----------------------|----------------|----------------|-----------------------|
|          | Iduronidase          | Galactosidase  | Glucuronidase  | Acétyl hexosaminidase |
| Contrôle | $0,87 \pm 0,3$       | $0,35 \pm 0,1$ | $0,19 \pm 0,1$ | $3,6 \pm 1,5$         |
| Hurler   | 0                    | $0,37 \pm 0,1$ | $0,20 \pm 0,1$ | $4,9 \pm 1,5$         |



Q11. L'iduronidase est absente ou non fonctionnelle ce qui pourrait expliquer l'accumulation des MPS dans les lysosomes.

**Q 12 - Dans les cellules de Hunter, l'activité de l'iduronidase est normale. Quelle pourrait être l'origine du défaut des cellules de Hunter ?**

- Les cellules Hunter présentent le même phénotype que les cellules Hurler.
- Les mutations génétiques qui conduisent au développement des deux syndromes affectent des gènes qui ne sont pas portés par le même chromosome.

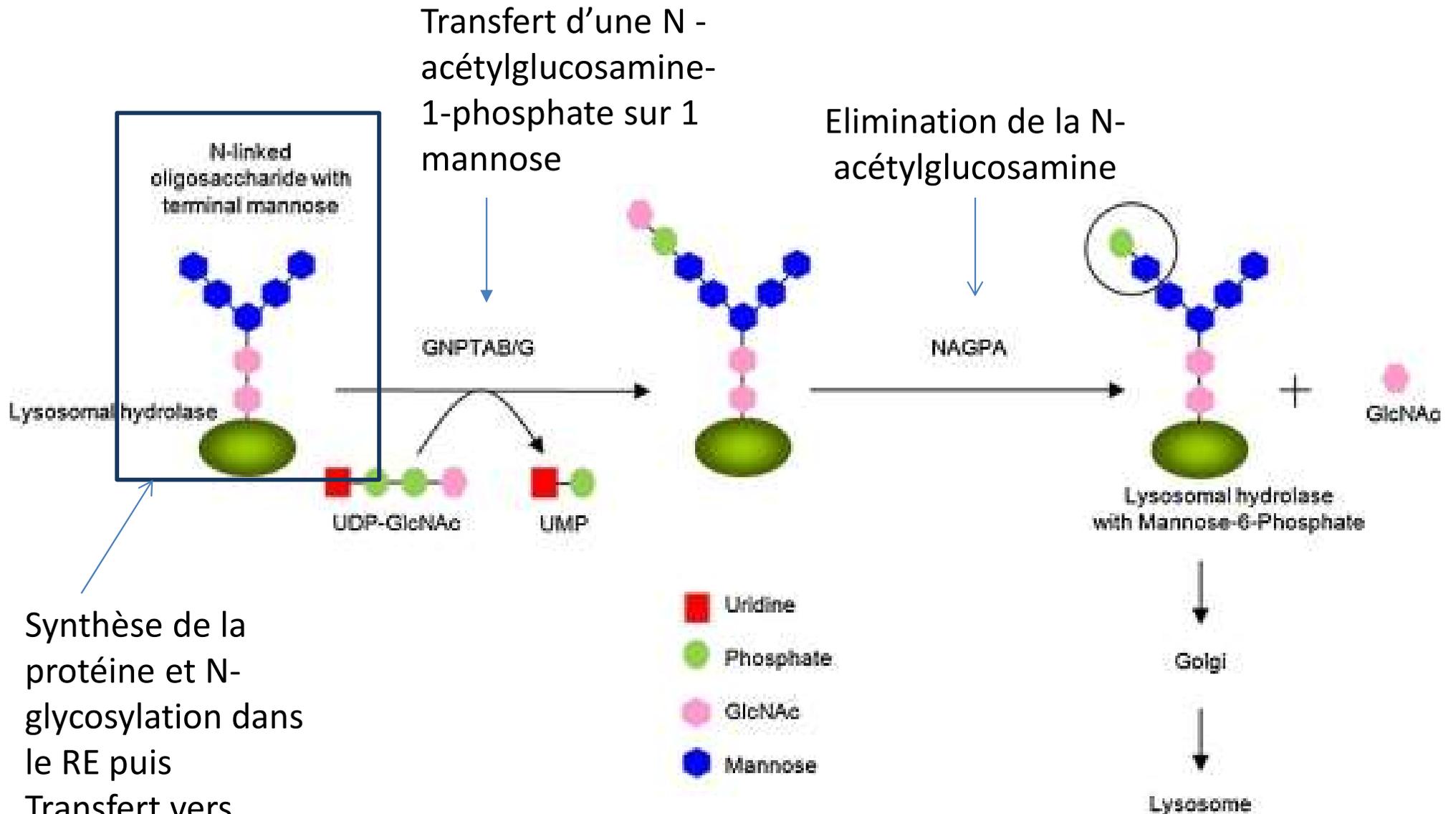
Une enzyme différente de l'Iduronidase mais elle aussi impliquée dans la dégradation lysosomale des MPS est probablement absente ou défectueuse.

Remarque: il a été montré que l'enzyme lysosomale l'iduronidate sulfatase est absente dans les cellules de Hunter.

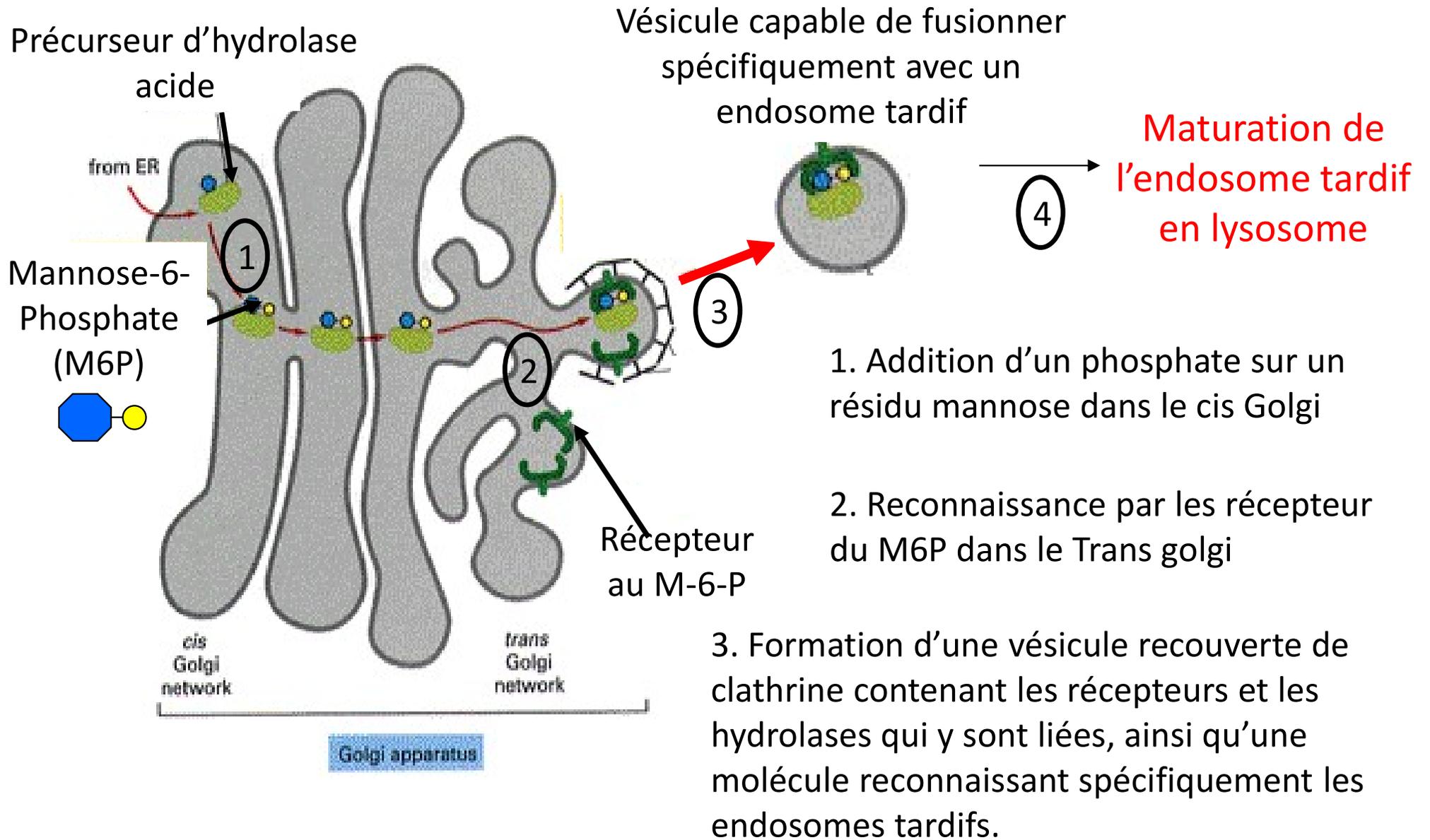
## Q 13- Où les enzymes lysosomales sont-elles synthétisées et comment sont-elles adressées aux lysosomes ?

1. La synthèse des enzymes lysosomales est initiée dans le cytoplasme et se poursuit au niveau du réticulum endoplasmique rugueux.
2. Transfert vésiculaire de ces enzymes vers les saccules Cis golgiennes où elles subissent une phosphorylation d'un de leur résidu mannose (M6P).
3. Liaison des hydrolases aux récepteurs du M6P au niveau du trans Golgi.
4. Bourgeonnement au niveau des saccules trans golgiennes de vésicules, adressée par la suite au compartiment endosomal.
5. Acidification progressive du contenu vésiculaire, entraînant une dissociation du complexe enzyme récepteur.
6. Recyclage des récepteurs du M6P (vers le Golgi et éventuellement la membrane plasmique) et maturation des enzymes lysosomales (incluant la déphosphorylation du résidu mannose).

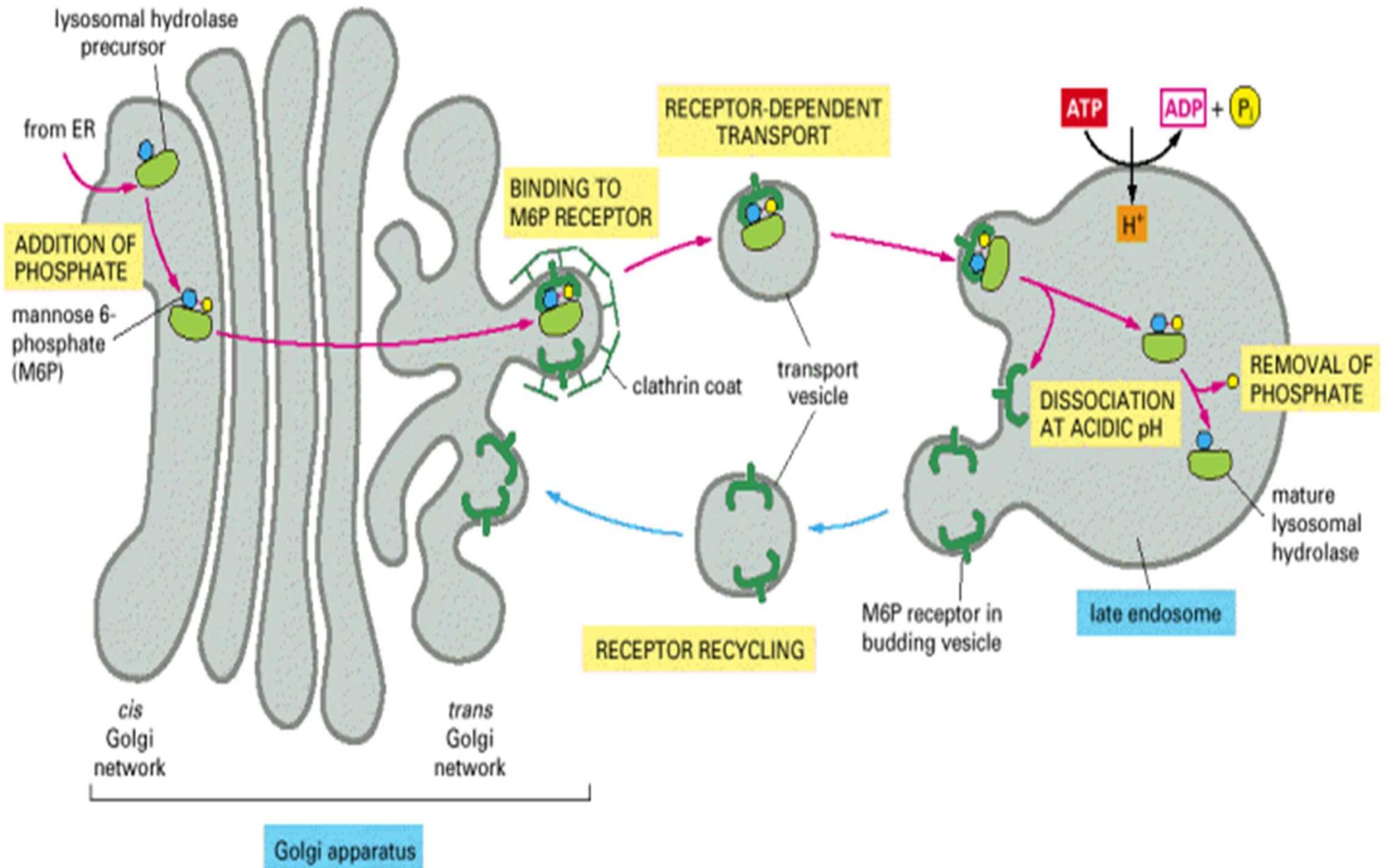
Addition d'un groupement phosphate sur l'un des résidus mannose (en position 6) porté par les enzymes lysosomales (cis golgi).



Synthèse de la protéine et N-glycosylation dans le RE puis Transfert vers l'appareil de golgi.



4. Transport, reconnaissance et fusion avec l'endosome tardif. Maturation de ce dernier en lysosome.



<https://www.youtube.com/watch?v=u38LjCOvDZU>

Q14. Une faible fraction des enzymes lysosomales échappent à cet adressage et se retrouve dans le milieu extracellulaire. Pourquoi ne peuvent-elles pas y exercer leur activité hydrolytique ?

Ces enzymes requièrent un pH acide pour être actives or le pH du milieu extracellulaire est voisin de 7,4.

Il a été observé que lorsque des cellules de Hurler sont cultivées en présence de cellules normales, elles retrouvent en quelques jours un phénotype normal.

**Q 15 - Pouvez vous proposer une hypothèse pour expliquer cette observation ?**

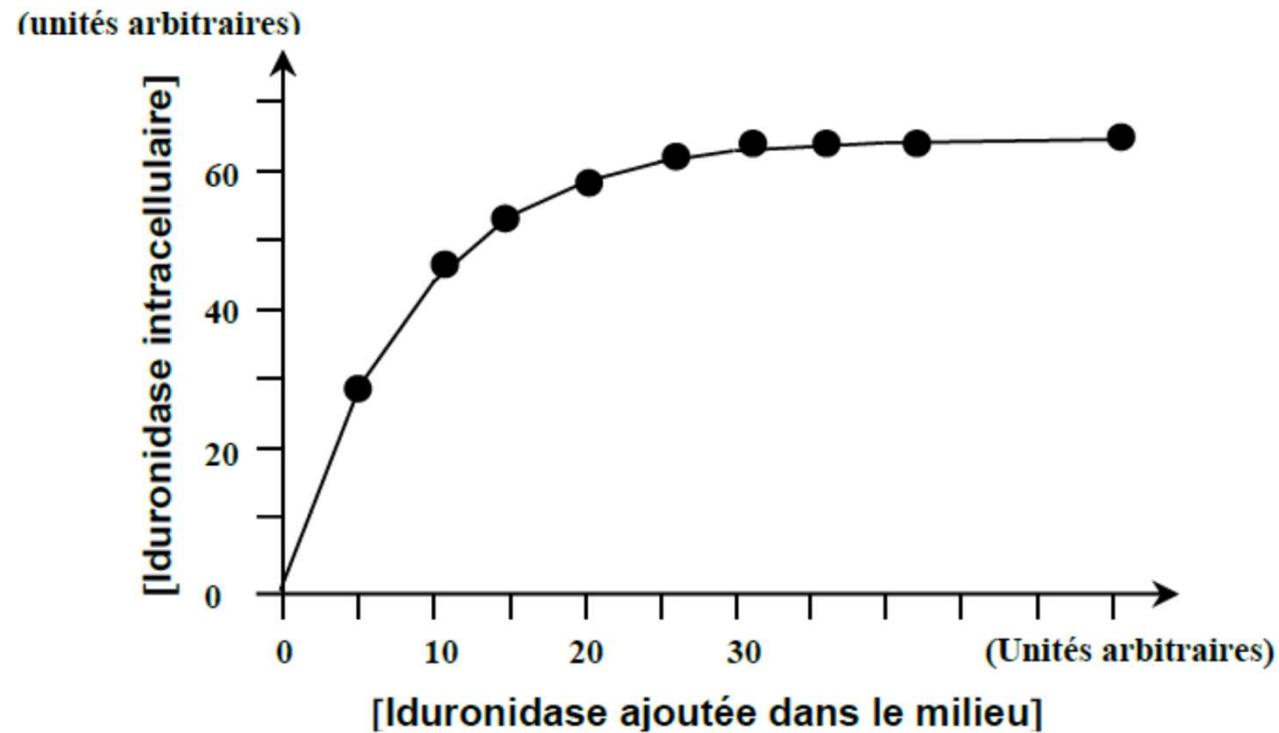
Les cellules de Hurler retrouvent un phénotype normal: elles sont donc devenues capables de dégrader les MPS au niveau des lysosomes.

Ceux-ci doivent donc contenir l'iduronidase qui leur manquait et qui ne peut provenir que des cellules normales.

Hypothèse:

les cellules normales ont sécrété dans le milieu extracellulaire de l'iduronidase qui a pu être ultérieurement endocytée par les cellules de Hurler et dirigée vers les lysosomes.

Des quantités croissantes d'iduronidase purifiée sont ajoutées dans une série de boîtes de Pétri maintenues à 37°C et contenant le même nombre de cellules de type Hurler. Deux heures plus tard, la quantité d'iduronidase intracellulaire est mesurée. Les résultats sont portés sur la figure 4. **Q 16 - Quelle précision apporte la figure 4 ?**



**Figure 4**

Des quantités croissantes d'iduronidase purifiée sont ajoutées dans une série de boîtes de Pétri maintenues à 37°C et contenant le même nombre de cellules de type Hurler. Deux heures plus tard, la quantité d'iduronidase intracellulaire est mesurée. Les résultats sont portés sur la figure 4. **Q 16 - Quelle précision apporte la figure 4 ?**

L'iduronidase purifiée ajoutée dans le milieu de culture est retrouvée dans les cellules. L'iduronidase peut donc effectivement être internalisée par les cellules de Hurler.

Lorsque la quantité d'iduronidase ajoutée dans le milieu extracellulaire dépasse 20 UI, la quantité d'enzyme retrouvée à l'intérieur de la cellule n'augmente plus. Ceci suggère une saturation du mécanisme d'internalisation.

La figure 4 montre donc que de l'internalisation de l'iduronidase par les cellules de Hurler fait intervenir un processus d'endocytose et que cette endocytose est médiée par des récepteurs présents en nombre limité à la surface des cellules et donc saturables.

Par ailleurs, on a constaté qu'en ajoutant du mannose-6-phosphate dans le milieu de culture, les quantités d'iduronidase cellulaire restaient très faibles, quelle que soit la concentration de l'enzyme ajoutée au milieu. Cet effet est spécifique du mannose-6-phosphate et ne s'observe pas en présence de mannose.

**Q 17 - Interprétez les résultats obtenus avec le mannose-6-phosphate.**

L'inhibition de l'internalisation par le mannose-6-phosphate suggère une compétition entre ce dernier et l'iduronidase pour occuper le site de liaison au récepteur membranaire.

Le récepteur impliqué dans l'endocytose de l'iduronidase est probablement le récepteur du mannose-6P (*Rappel : l'élimination du groupement phosphate porté par le résidu mannose a lieu lors de la maturation du lysosome*).

Q18. En vous aidant de vos connaissances, proposez un schéma décrivant le cheminement de l'iduronidase depuis ses lieux de synthèse jusqu'aux lysosomes dont le pH acide permet à cet enzyme d'exercer son activité mucopolysaccharidasique.

