

# Journée du CETG

Bichat, 26 Novembre 2010

## Physiopathologie

$\beta$ -glucocérébrosidase : fonctionnement *in vivo*  
Nouveaux outils/ modèles d'étude de l'enzyme  
normale ou mutante

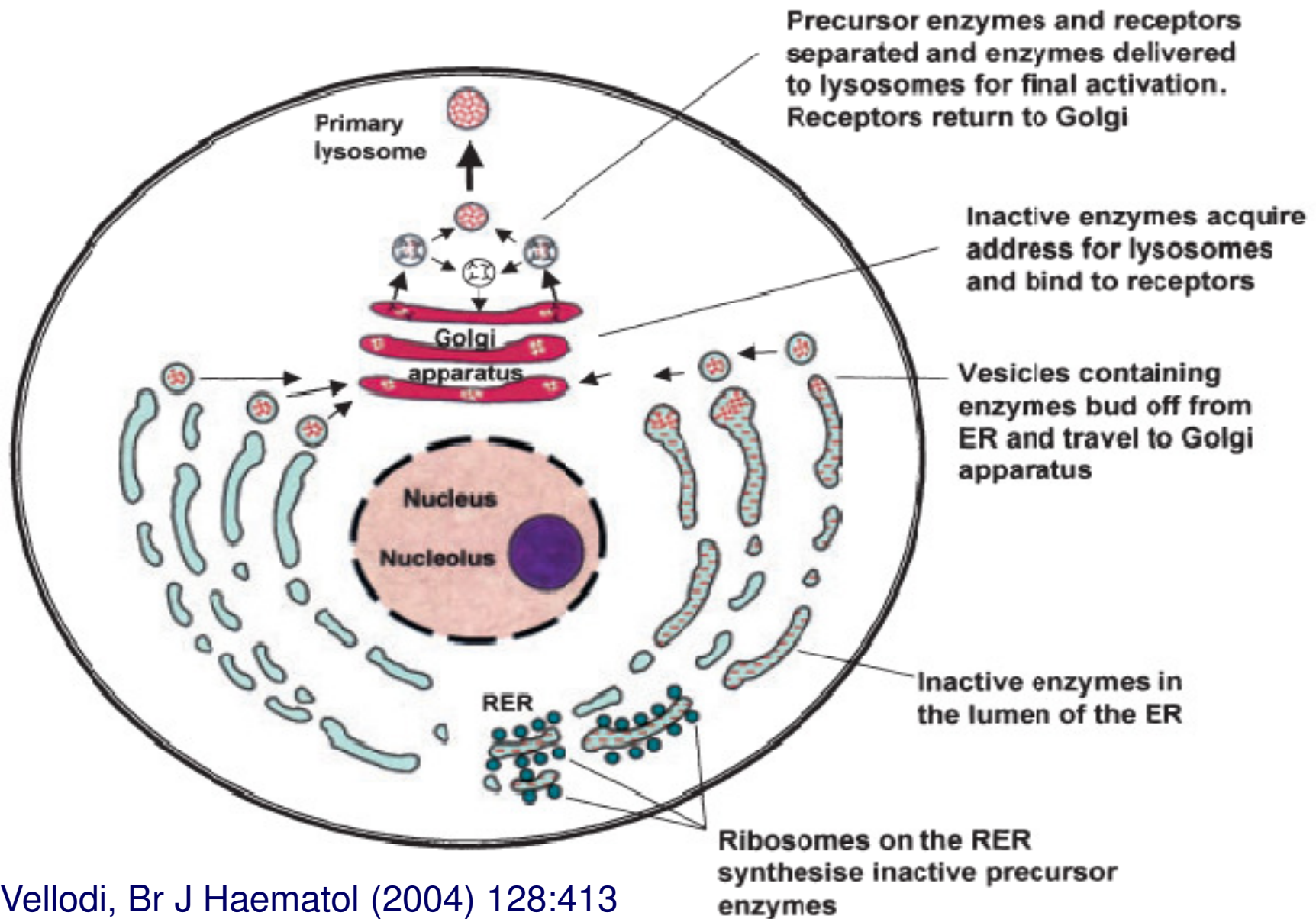
Marie T. Vanier MD PhD

INSERM U820, Faculté de Médecine Lyon-Est  
et Laboratoire MHM , Hopitaux Est, Lyon

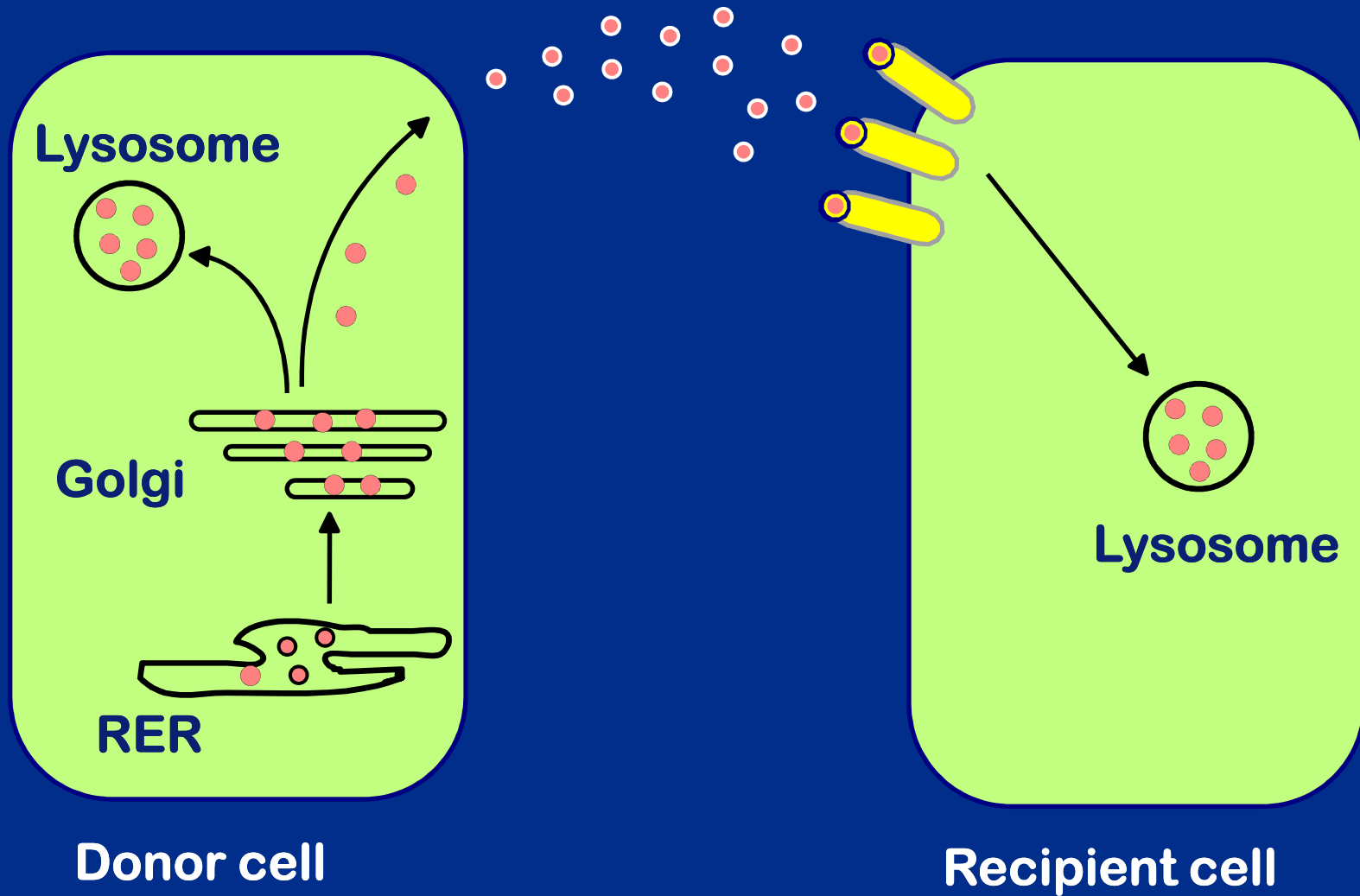
# Fonctionnement *in vivo* de la glucocérébrosidase ( $\beta$ GC)

- Comme toutes les hydrolases lysosomales, la  $\beta$ -GC pour être fonctionnelle doit subir des **modifications post-traductionnelles** (glycosylations, “trimming”) puis être **transportée jusqu’au lysosome**

# Comment la cellule fabrique une enzyme lysosomale



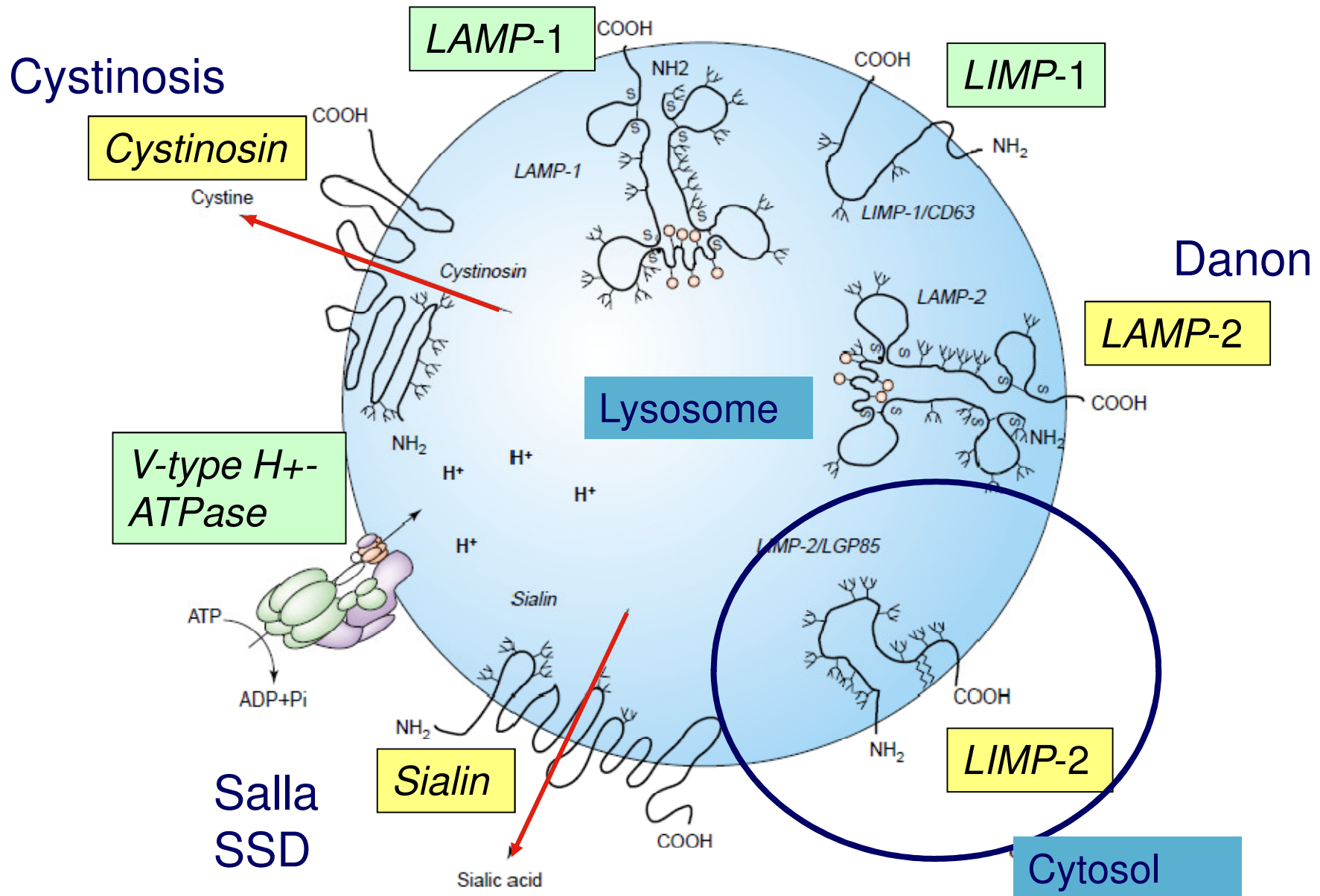
# Transfert intercellulaire par sécrétion-recapture



# 1. Particularité de le $\beta$ GC concernant son transport au lysosome

- Pour la plupart des enzymes lysosomales, transport par le biais du récepteur au mannose-6-phosphate
- Mais transport différent pour la  $\beta$ -GC
  - Activité normale dans les fibroblastes ML-II (déficit en N-acetylglucosamine-1-phosphotransférase, I-cell disease)
  - Récente découverte du rôle de LIMP-2
    - Group of P Saftig: Reczek et al Cell (2007) 131:770

# Main lysosomal membrane proteins



# Transport au lysosome LIMP2-dependant de la $\beta$ -GC

- $\beta$ -GC ne reçoit pas de “marquage” M6P
- Liaison sélective et spécifique entre  $\beta$ GC et LIMP2, pH dépendante
- **Liaison de la  $\beta$ GC avec la partie luminale de LIMP2 – prend place au niveau de la partie sécrétoire du RE**
- Souris déficitaire en LIMP2: sécrète  $\beta$ -GC
- Donc arguments très convaincants
  - Reczek et al Cell (2007) 131:770
  - Saftig and Klumperman Nature Reviews Mol Cell Biol (2009) 10:623
- NB: LIMP2 a très vraisemblablement d'autres fonctions

# Déficit en LIMP2

## “Action myoclonus-renal failure syndrome”

Berkovic et al Amer J Hum Genet (2008); Balreira et al Hum Mol Genet (2008); Dardis et al Mol Genet Metab (2009); Blanz et al Hum Mol Genet (2010)

- **Maladie autosomique récessive très rare associant une glomérulosclérose focale, une épilepsie myoclonique progressive et une ataxie**
- **Activité de la  $\beta$ glucocérébrosidase normale dans les leucocytes et très basse dans les fibroblastes (cf autres enzymes dans ML II)**
- Les patients avec mutations nulles accumulent une substance encore non identifiée dans le cerveau.
- 1 seul patient connu avec mutation faux-sens: a une épilepsie myoclonique progressive
- **Le déficit en LIMP2 n'entraîne pas une maladie de Gaucher mais LIMP-2 a été proposé en tant que gène modificateur putatif ...**



## 2. *In vivo*, la $\beta$ GC n'est pas suffisante pour hydrolyser le glucosylceramide: nécessité de la saposine C (sap-C)

- Le Sap-C active la  $\beta$ GC lysosomale en permettant sa liaison avec les phospholipides anioniques membranaires
- Il existe une interaction directe entre l'enzyme et le sap-C, mais le modèle exact reste putatif
- En pratique il est important de se rappeler qu'un déficit en sap-C entraîne une maladie de Gaucher
  - Phénotype clinique: type 3 mais aussi type 1
  - ce déficit est rarissime : seulement 5 familles actuellement publiées – mais peut-être sous-diagnostiqué ?

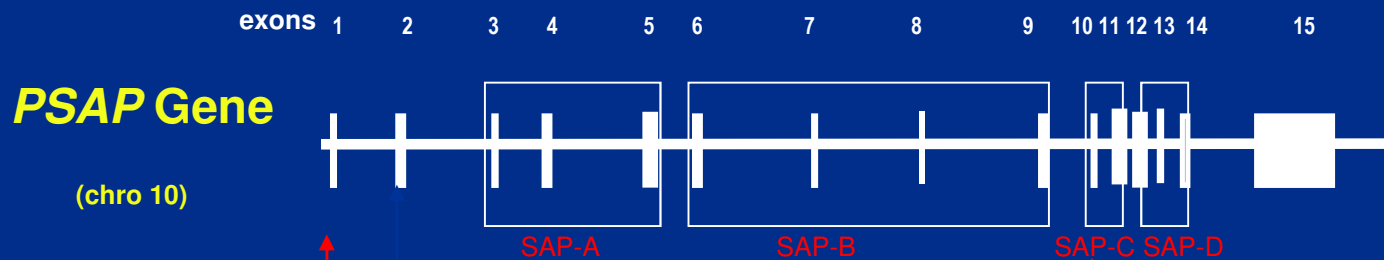
# Déficits en activateurs protéiques des sphingolipides (SAPs)

- **Activité enzymatique / essai conventionnel normale** (système *in vitro* non dépendant de l'activateur)  
= piège
- **Diagnostic final nécessitant une étude de biologie moléculaire**
- **Certains tests d'orientation peuvent être utiles**
  - Maladie de Gaucher par déficit en Sap C :
    - cellules de Gaucher, chitotriosidase élevée
    - [Si on avait une biopsie de foie: élévation du glucosylcéramide]
- NB: Avant de se lancer dans une recherche de sap C, s'assurer que le dosage d'activité  $\beta$ GC trouvé normal est correct!

# GD type 1 due to Sap-C deficiency

- Polish family, 2 affected siblings (our family 2)
  - Tylki-Szymanska et al. Clin Genet (2007) 72:538
- Clinically : type 1 Gaucher
  - Index case (male)
    - 2y: hepatosplenomegaly, thrombocytopenia
    - 6 years: Gaucher cells in bone marrow, no enzymology done
    - 35 years: spleen +++, severe hypersplenism, bone pain, no neurological involvement
    - Normal glucosylceramidase but very high chitotriosidase
  - A 30-years-old affected sister
    - only splenomegaly so far

# Sap-C deficiency Mutation analysis



Family 1: type 3

**M1V**

Family 2: type 1

**M1L**

Family 3: type 1  
or 3?

**C315S**

**L349P**

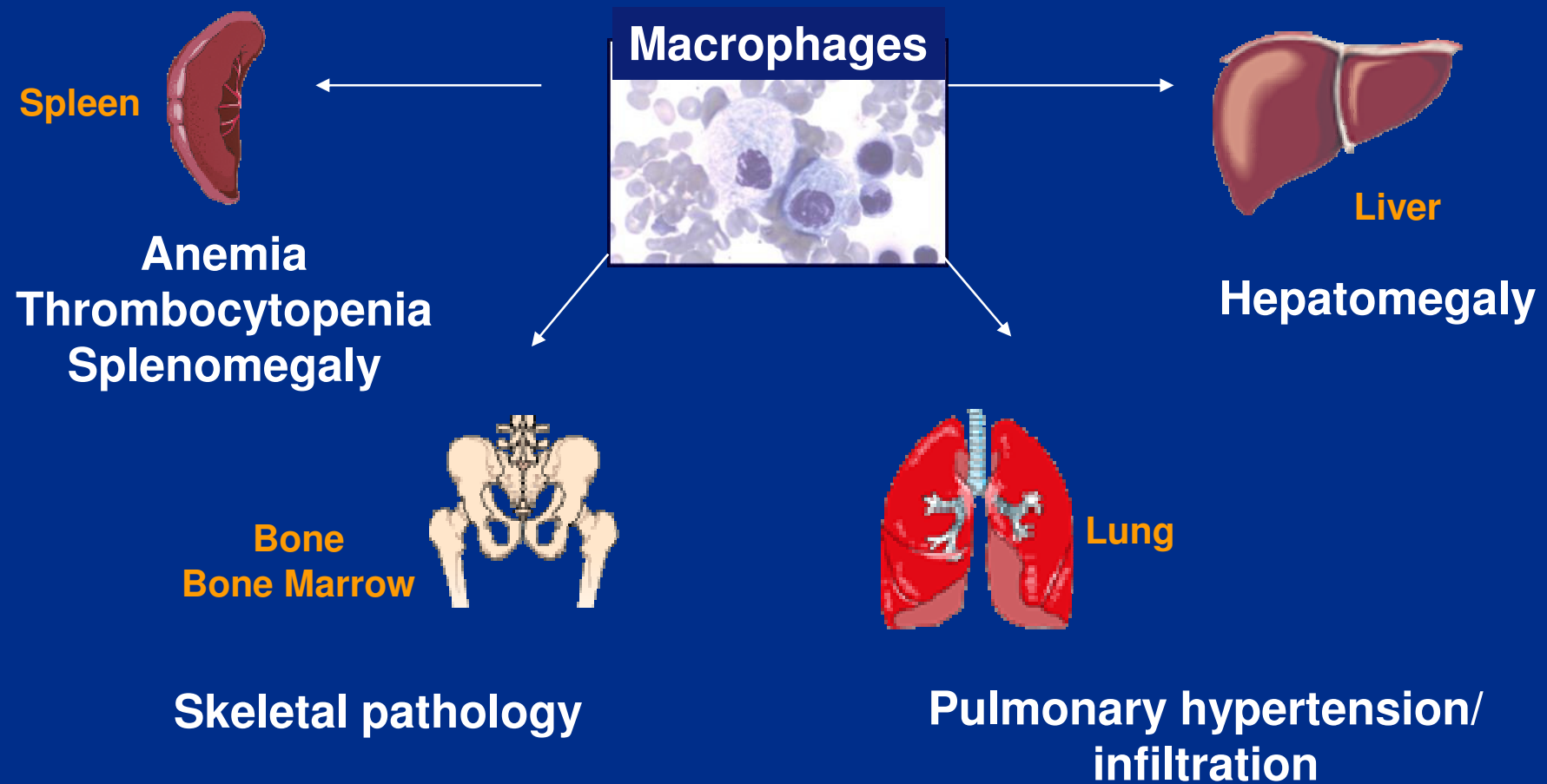
**del242-248 / del242-248**



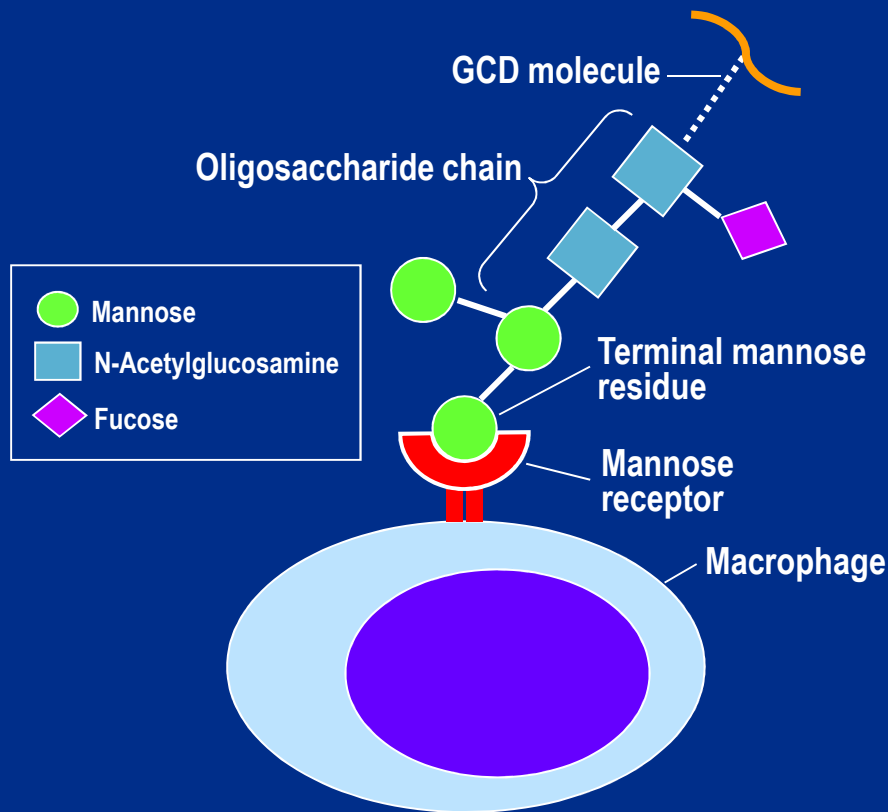
M1V and M1L abolish the production of all 4 SAPs  
missense mutations C315S or L349P in sap C domain

Additional studies on mutated protein in: Hum Mol Genet (2010) 19:2987

### 3. La thérapie enzymatique doit cibler les sites cellulaires de surcharge du substrat



# Enzymothérapie substitutive: ciblage au macrophage et donc à son récepteur mannose



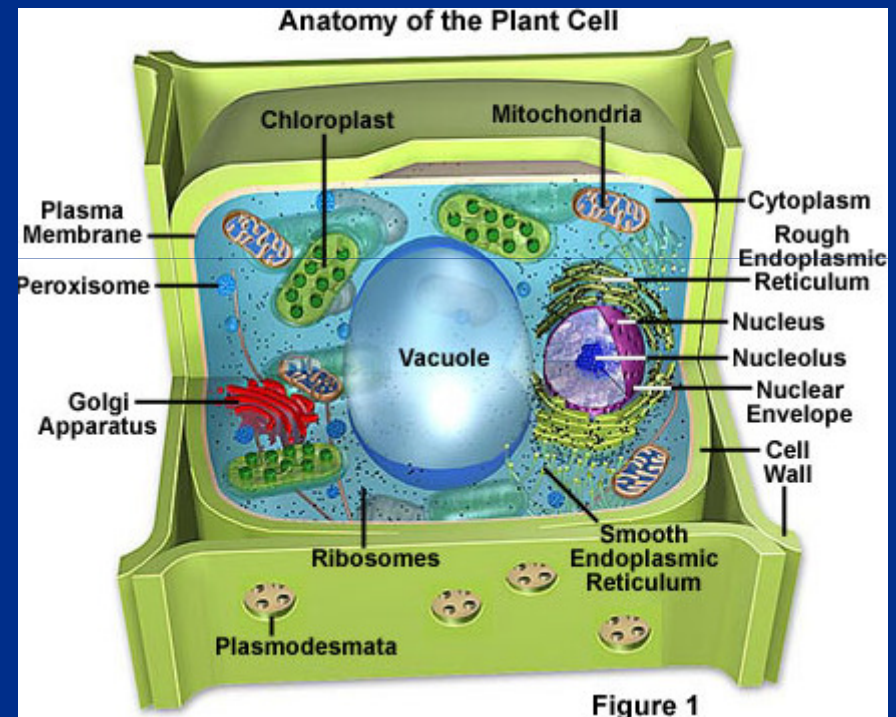
- Nécessité d'avoir une chaîne oligosaccharidique de l'enzyme avec des mannoses terminaux
- Ceci implique pour l'enzyme obtenue par génie génétique à partir de cellules CHO ou fibroblastes humains l'action séquentielle de plusieurs glycohydrolases afin d'exposer les mannoses

Adapted from: [http://google.brand.edgar-online.com/EFX\\_dll/EDGARpro.dll?FetchFilingHTML1?SessionID=OA90W5ugM3MkeC0&ID=5512697](http://google.brand.edgar-online.com/EFX_dll/EDGARpro.dll?FetchFilingHTML1?SessionID=OA90W5ugM3MkeC0&ID=5512697)

Courtesy of G. Pastores, adapted

# Un côté technologique intéressant de l'enzyme préparée à partir de plantes: on peut contrôler le profil de glycosylation

- Achieving the biologically active glycosylation patterns: a major challenge when using current production systems
- Plant-based technology targets **taliglucerase alfa** to a specific desired compartment within the plant cell, thus controlling the glycosylation pattern
- **No need for any additional downstream glycosylation modifications**



Courtesy of G. Pastores, adapted

Nouveaux outils  
pour l'étude de la  $\beta$ GC  
et nouveau modèle animal



# Etude de structure en dynamique moléculaire sur $\beta$ -GC normale et mutant N370S

- Groupe de **AH Futerman** (Offman et al J Biol Chem 2010, in press)
- Partant de la structure cristal de  $\beta$ GC, étude comparative de la flexibilité de la molécule enzymatique normale ou mutée à différents pH, et aussi en présence de miglustat
  - Étude de la protéine entière, du site actif et de 3 boucles structurellement importantes
  - N370S affecte l'activité mais aussi l'activation et la liaison avec les PL
  - Les résultats indiquent un effet chaperone du miglustat améliorant pour N370S le ciblage au lysosome, la liaison au sap C et l'activité au pH lysosomal
- L'intérêt du travail est avant tout une nouvelle approche pour une étude ciblée *in silico* de mutants  $\beta$ GC
  - NB: les simulations devront finalement être vérifiées par technique complémentaire

# Visualisation *in situ* des molécules $\beta$ GC actives

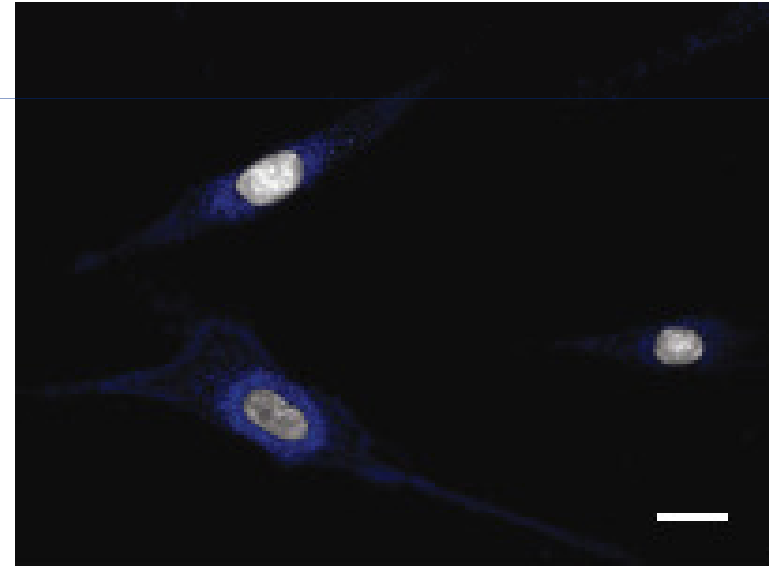
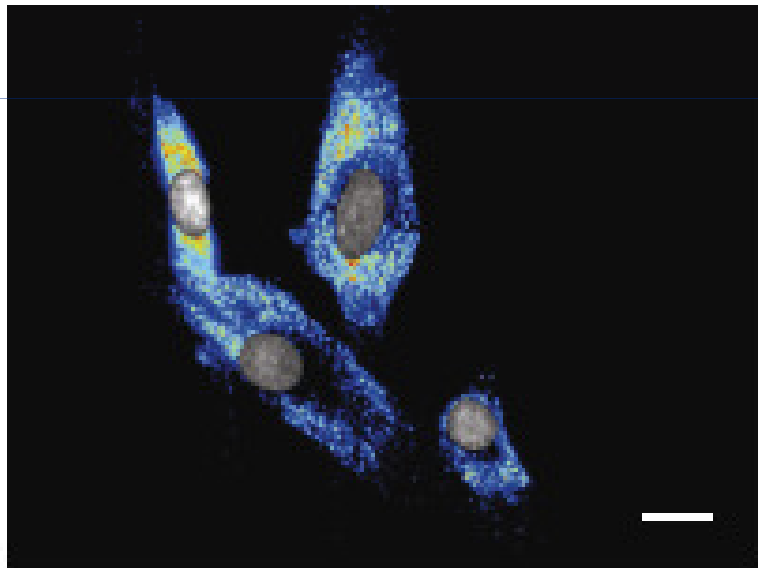
- Travail particulièrement intéressant du groupe de JM Aerts, Witte et al Nature Chem Biol (2010) 6:907
- Deux composés inhibiteurs irréversibles de l'enzyme permettent la révélation ultrasensible en fluorescence des molécules enzymatiquement actives (bodipy-couplés, MDW933, vert, et MDW941, rouge)
- Vaste champ d'application, incluant le marquage *in situ* de cellules
- Avantage sur les AC qui ont une spécificité d'espèce, et réagissent avec la protéine inactive ou active

# Marquage par MDW941

Cellules contrôles

Mutant RecNci

MDW941 Ⓢ



# Un nouveau modèle murin de maladie de Gaucher montrant une dysregulation cellulaire et moléculaire au delà du macrophage

- Mistry et al. PNAS (2010)107:19473
- Problèmes bien connus pour obtenir un bon modèle murin de maladie de Gaucher
  - KO letal en néonatal
  - Knock in: résultats variables mais pas bonne phénocopie de la maladie humaine
  - Un KO conditionnel [Enquist et al (2006) PNAS] meilleur pour manifestations viscérales mais pas de manifestations osseuses
  - Ce nouveau KO conditionnel (délétion dans cellules hématopoiétiques et lignée mésenchymateuse via un promoteur Mx1) montre une maladie viscérale et hématologique et une profonde ostéopénie

# Nouvelle souris GBA1

PNAS (2010)107:19473

- Hépatosplénomégalie (rate x8), anémie, tendance à une thrombocytopénie, HDL-cholesterol bas
- Immunophenotypage: réminiscent de la maladie humaine
- Squelette: phénocopie de l'ostéonécrose focale et de l'ostéopénie
  - Il semble que l'inactivation des PKC (due à lysoGC et GC) contribue à la déficience des ostéoblastes
- Pas d'étude de la surcharge en lipides dans ce papier
- Cette souris pourrait se révéler très utile, en particulier pour des essais thérapeutiques et sans doute pour des études touchant à la physiopathologie