

Thèse de pharmacie

Déficits congénitaux de la glycosylation avec troubles de l'homéostasie golgienne : l'apolipoprotéine C-III à la rescousse !

Alexandre Raynor

12/09/2022

Faculté de Pharmacie de l'Université Paris-Saclay / Hôpital Bichat, AP-HP / INSERM U1193

Table des matières

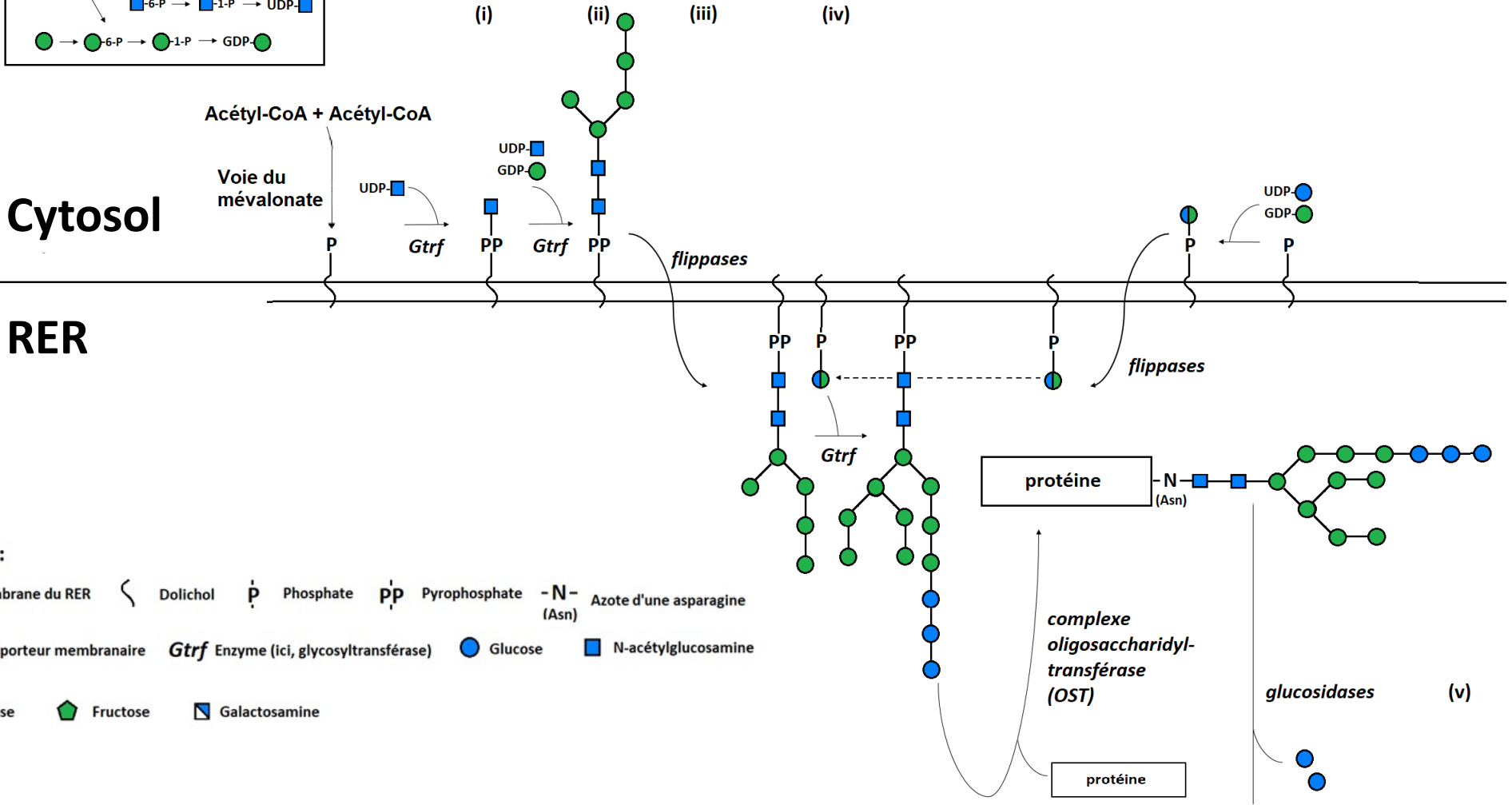
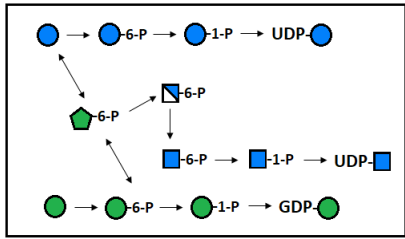
- I. Généralités sur la glycosylation des protéines ; exemple de la N-glycosylation
- II. Pathologies innées de la glycosylation : les CDG ; dépistage et diagnostic des CDG
- III. Notre étude : patients, méthodes, résultats
- IV. Conclusions

Généralités sur la glycosylation des protéines

- Modification co- et/ou post-traductionnelle
- Liaison covalente de substrats glucidiques à la protéine => glycoprotéine
- Ensemble de réactions complexes catalysées par des enzymes hautement spécifiques
- Réactions localisées :
 - Cytosol/RER : N-glycosylation (synthèse et liaison à la protéine des chaînes glycanes);
 - Golgi : N-glycosylation (maturation) et O-glycosylation.
- La glycosylation joue de nombreux rôles :
 - Repliement protéique ;
 - Protection face à la protéolyse ;
 - Adressage à la membrane cellulaire ;
 - Liaison aux ligands...

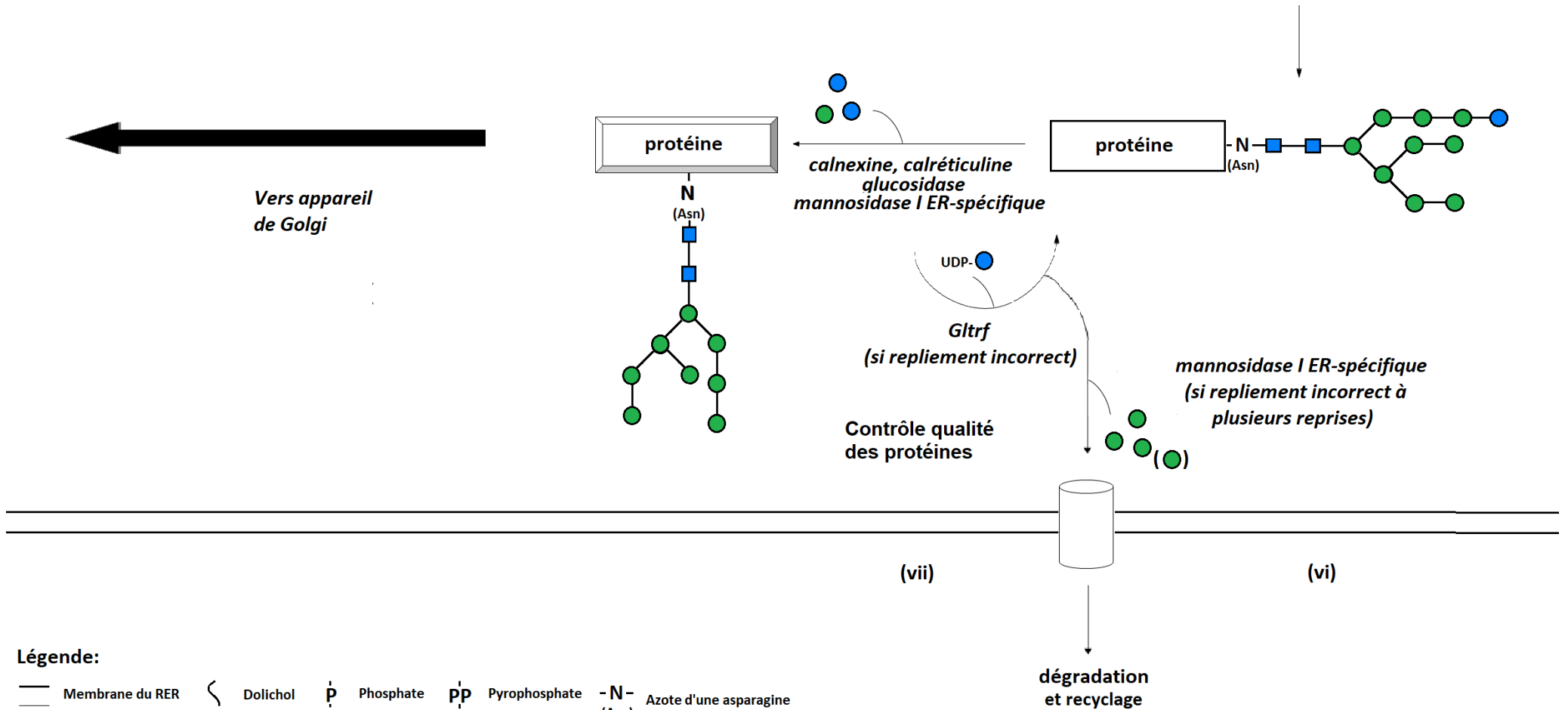
Exemple de la N-glycosylation

Synthèse des nucléotides-oses



Légende:

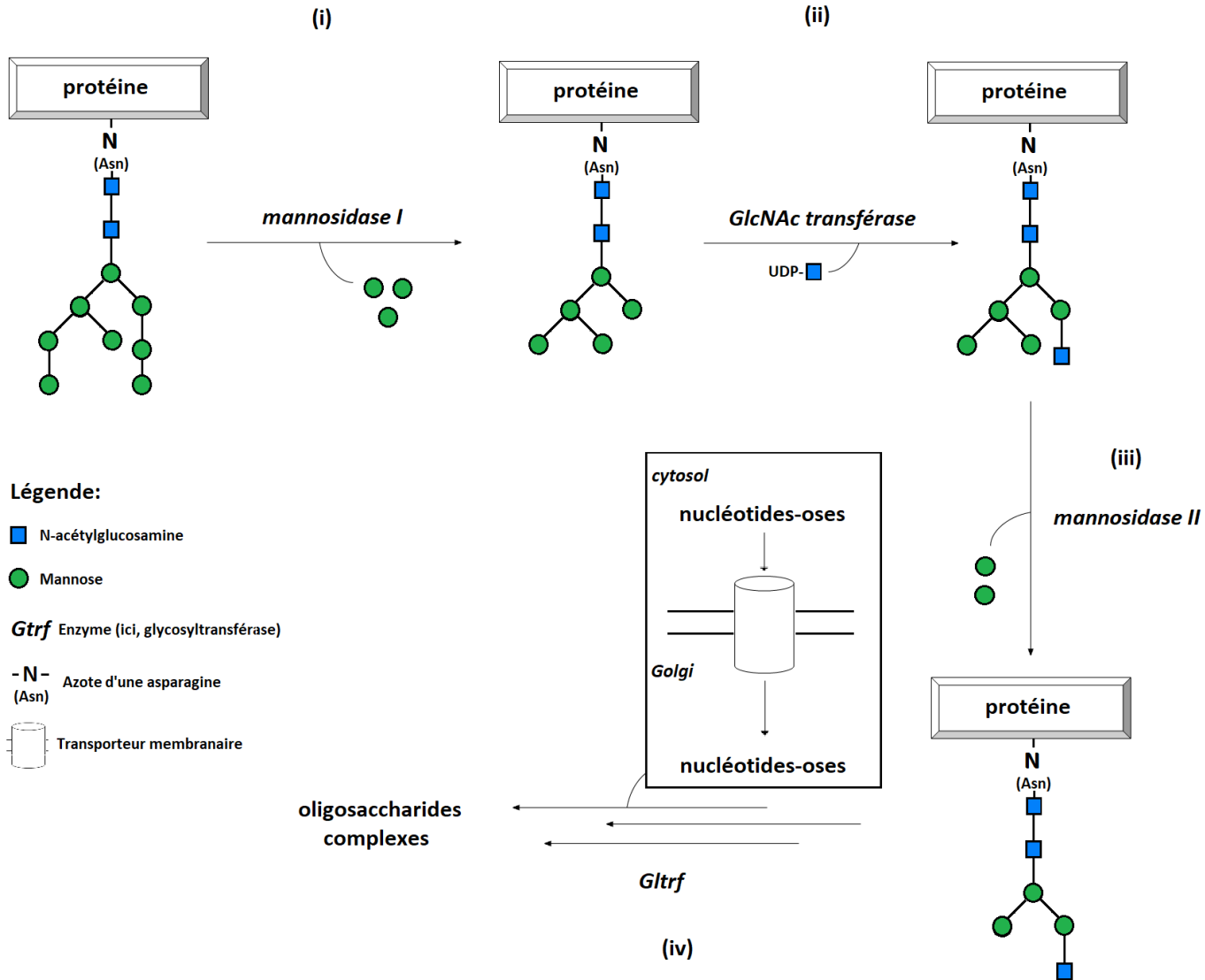
- Membrane du RER
- ⤵ Dolichol
- P Phosphate
- PP Pyrophosphate
- N- (Asn) Azote d'une asparagine
- ⌊ Transporteur membranaire
- Gtrf Enzyme (ici, glycosyltransférase)
- Glucose
- N-acétylglucosamine
- Mannose
- ⬠ Fructose
- ⬠ Galactosamine



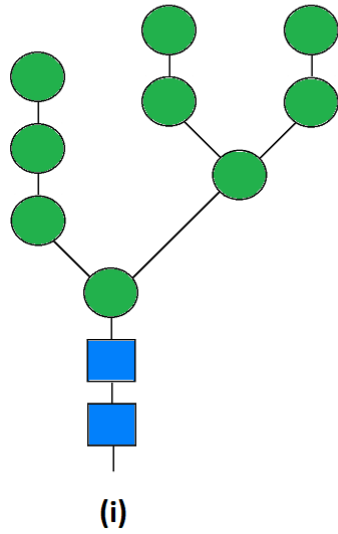
Légende:

- Membrane du RER
- ⤵ Dolichol
- P Phosphate
- PP Pyrophosphate
- N- Azote d'une asparagine (Asn)
- ⌈ Transporteur membranaire
- Gtrf Enzyme (ici, glycosyltransférase)
- Glucose
- N-acétylglucosamine
- Mannose
- ⬠ Fructose
- ⬠ Galactosamine

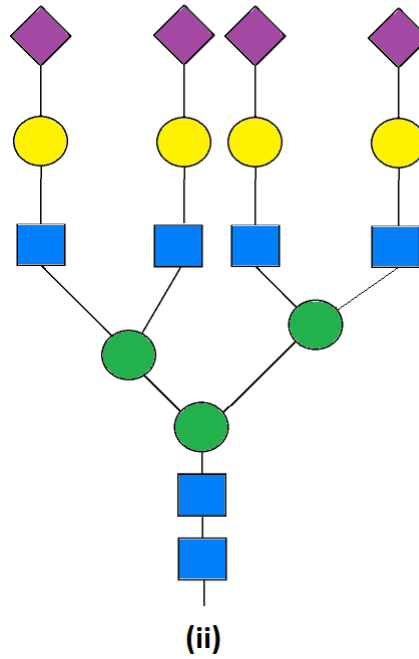
Golgi



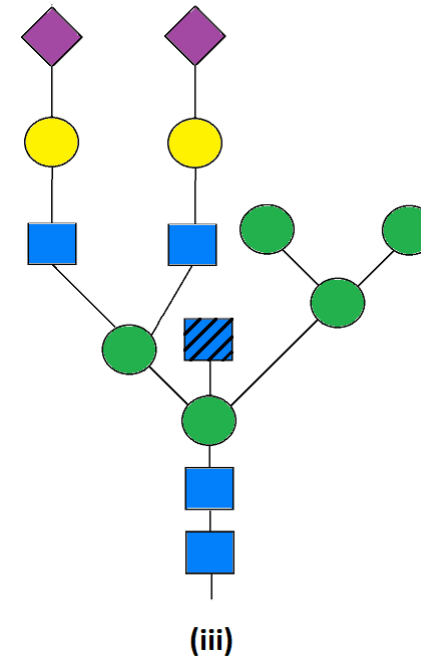
Forme "riche en mannose"



Forme dite "complexe"




Forme dite "hybride"





Légende:

 N-acétylglucosamine

 Galactose

 Mannose

 Acide sialique

 N-acétylglucosamine bissecteur, non systématiquement présent et conférant des propriétés particulières aux glycoprotéines

Pathologies innées de la glycosylation : les CDG

- Déficiences congénitales de la glycosylation (CDG : *congenital disorders of glycosylation*)
- Maladies héréditaires du métabolisme
- Plus de 150 CDG connus
- Transmission généralement autosomique récessive
- Clinique :
 - Troubles systémiques, rarement spécifiques
 - Signes neurologiques ;
 - Retard de croissance ;
 - Hypotonie ;
 - Dysmorphie ;
 - Coagulopathie...
- CDG avec troubles de la N-glycosylation :
 - Défaut localisé au cytosol/RER : CDG « type I »
 - Défaut localisé dans Golgi : CDG « type II » (atteinte supplémentaire de la O-glycosylation dans certains sous-types)
- Autres types de CDG plus rares : atteinte stricte de la O-glycosylation, des ancres GPI...

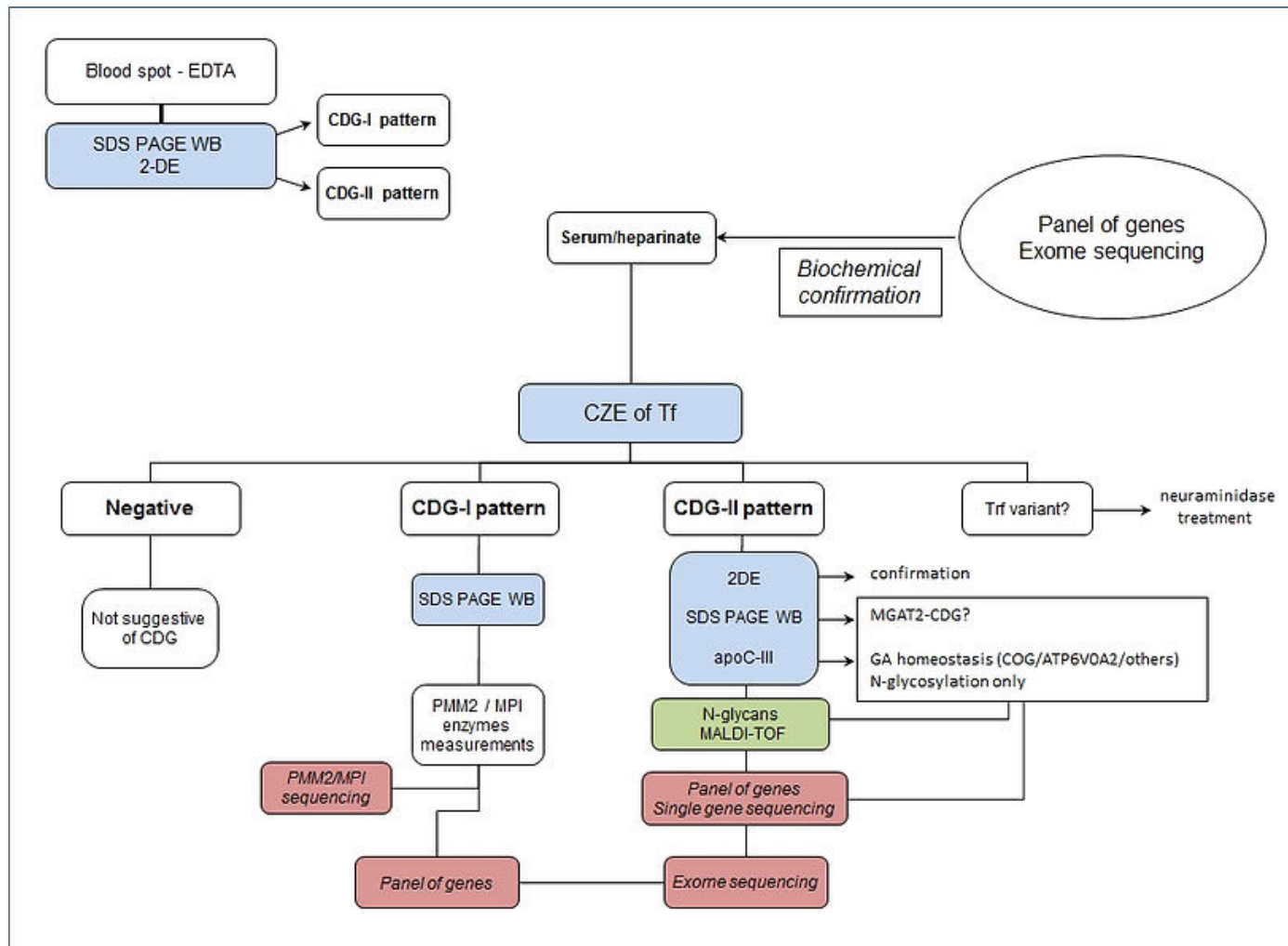
Pathologies de la glycosylation : les CDG

- Sous-groupe particulier : CDG avec troubles de l'homéostasie golgienne
- CDG de type II
- Troubles du pH golgien (ex: ATP6V0A2-CDG), du trafic golgien (ex: COG-CDG), de l'homéostasie ionique (ex: TMEM165-CDG)
- Atteinte du Golgi avec atteinte de la N-glycosylation et de la O- glycosylation

Dépistage et diagnostic des CDG

- Généralement difficile
- Clinique : rarement spécifique
- Génétique : pas toujours conclusive
- Biochimique : examens diagnostics historiques des CDG => objectivent les défauts de glycosylation des protéines
- Examens de choix :
 - N-glycosylation : **étude de la transferrine sérique** (IEF, CE, MS) ; N-glycome (MS) ; autres glycoprotéines (ex : chaîne β de l'haptoglobine) (Western blot, 2-DE)...
 - O-glycosylation : **étude de l'apoC-III** (IEF, 2-DE).

Algorithm diagnostic CDG



Notre étude

- L'étude de la transferrine sérique par IEF/CE est l'examen de dépistage biochimique de 1^{ère} intention des CDG
- Excellente sensibilité
- De par l'algorithme diagnostique, un profil de la transferrine normal conduit à l'arrêt des investigations
- Cependant, cas exceptionnels de véritables CDG avec profils de la transferrine normaux
- Dans cette étude, nous évoquons 3 cas de CDG avec troubles de l'homéostasie golgienne et profils de la transferrine sérique normaux
- Nous montrons que la 2-DE de l'apoC-III permet toutefois de mettre en évidence des anomalies caractéristiques de la glycosylation

Patients de l'étude

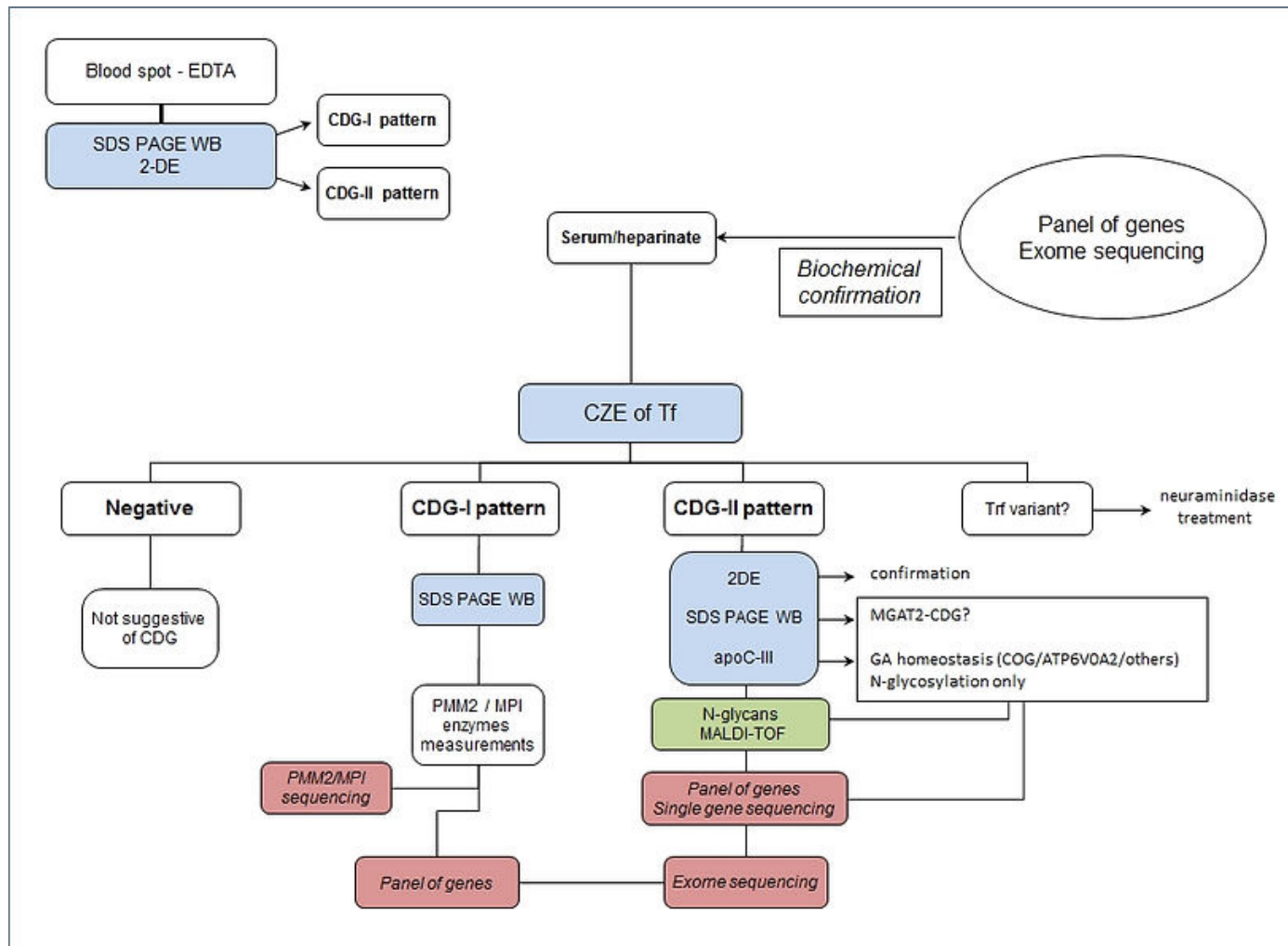
- P1 : dystonie, dysmorphie faciale, *cutis laxa* (typique ++ d'ATP6V0A2-CDG), retard de croissance, frère atteint d'ATP6V0A2-CDG
- Référés par le Dr Vincent-Delorme, CHRU de Lille



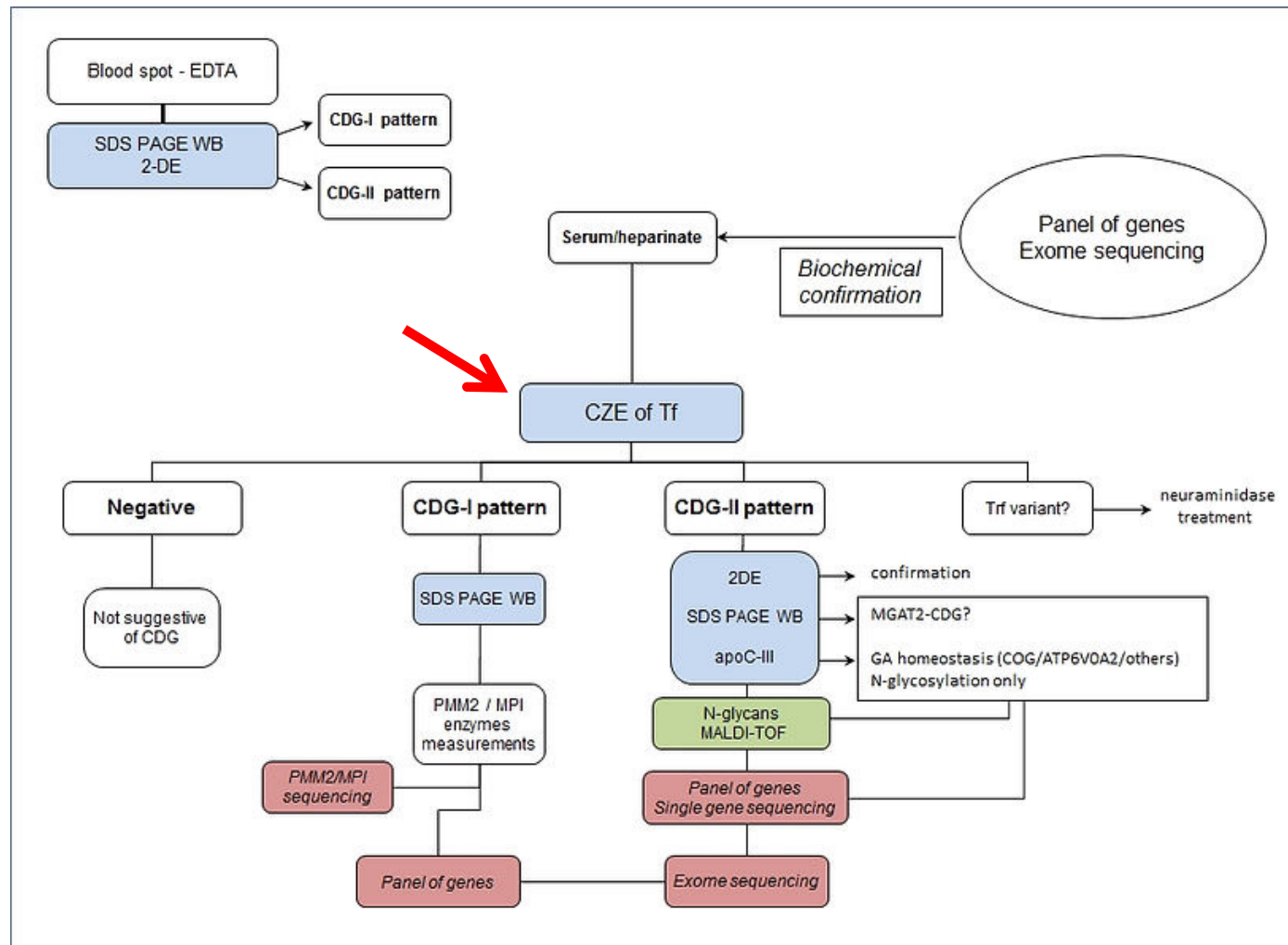
Patients de l'étude

- P2 et P3 : frère et sœur issus d'un mariage consanguin, parents Tunisiens. Retard de croissance, dystonie globale, microcéphalie, absence de parole ou de marche, syndrome tétra-pyramidal, IRM cérébrales normales.
- Explorations métaboliques normales (dont lysosomes, peroxyosomes).
- Référé par le Pr Arnold Munnich (Hôpital Necker, Paris).

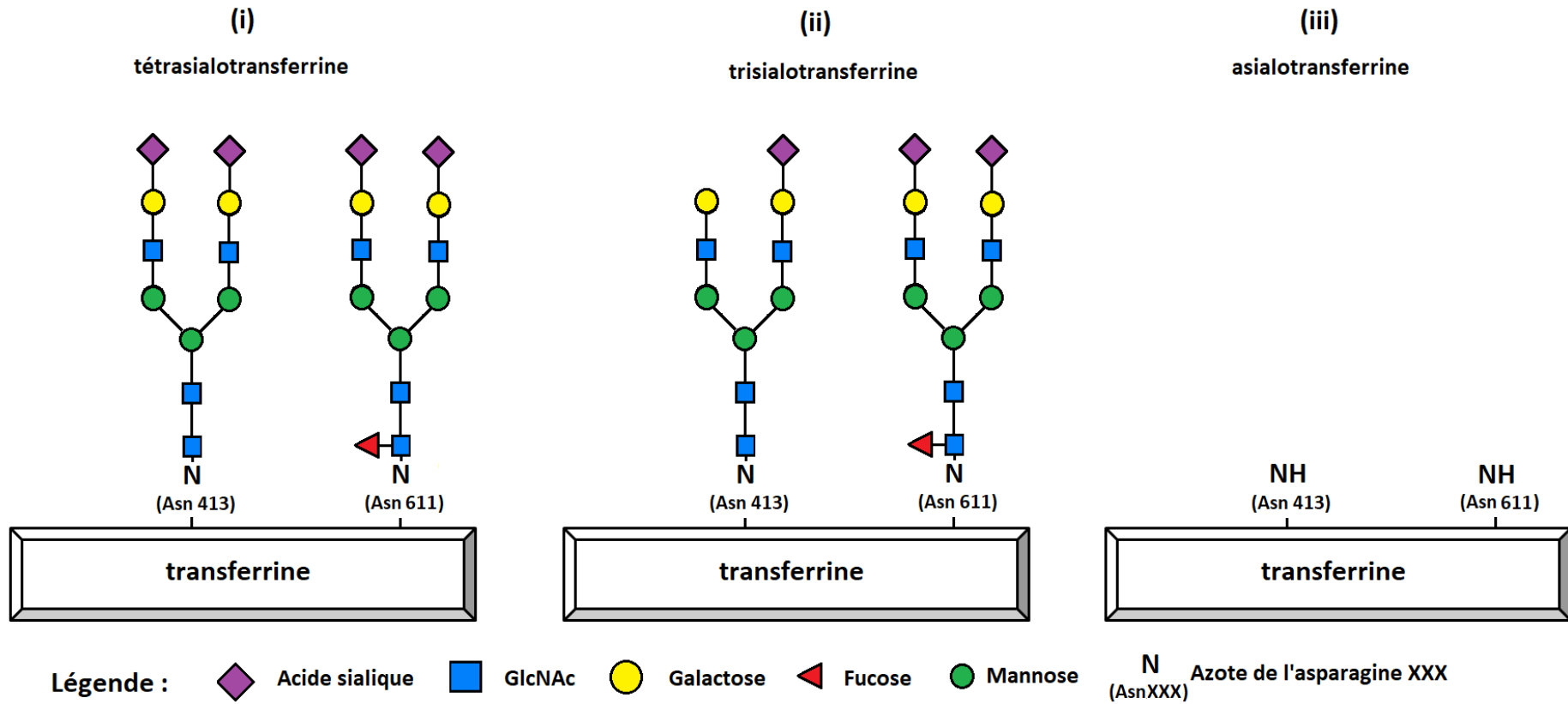
Algorithm diagnostic CDG



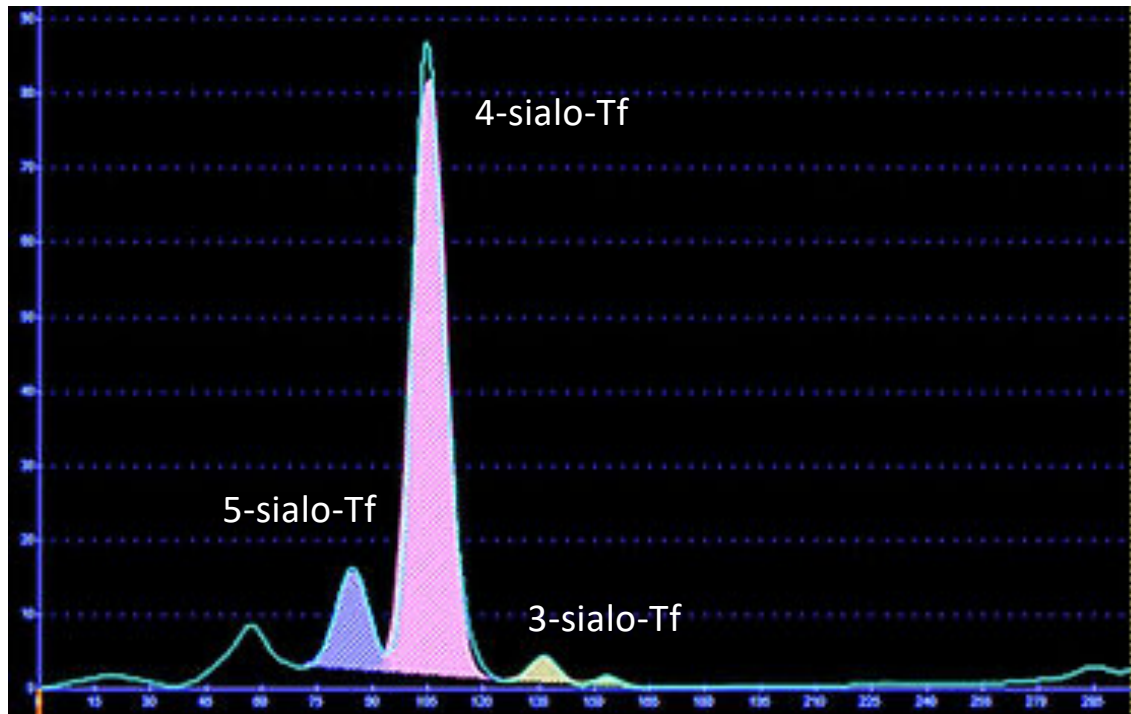
Algorithm diagnostic CDG



Transferrine

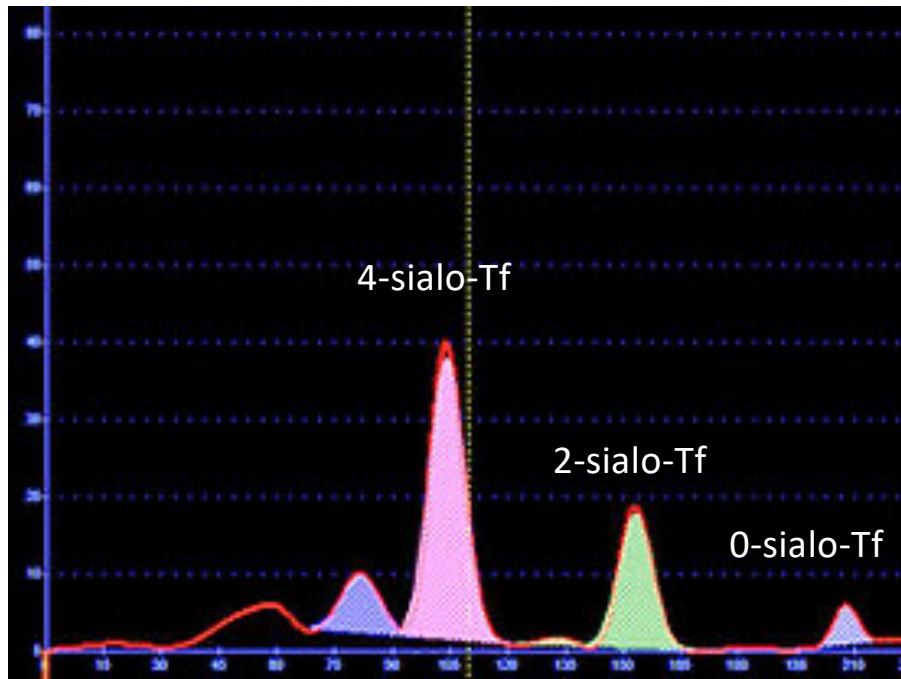


Transferrine : électrophorèse capillaire

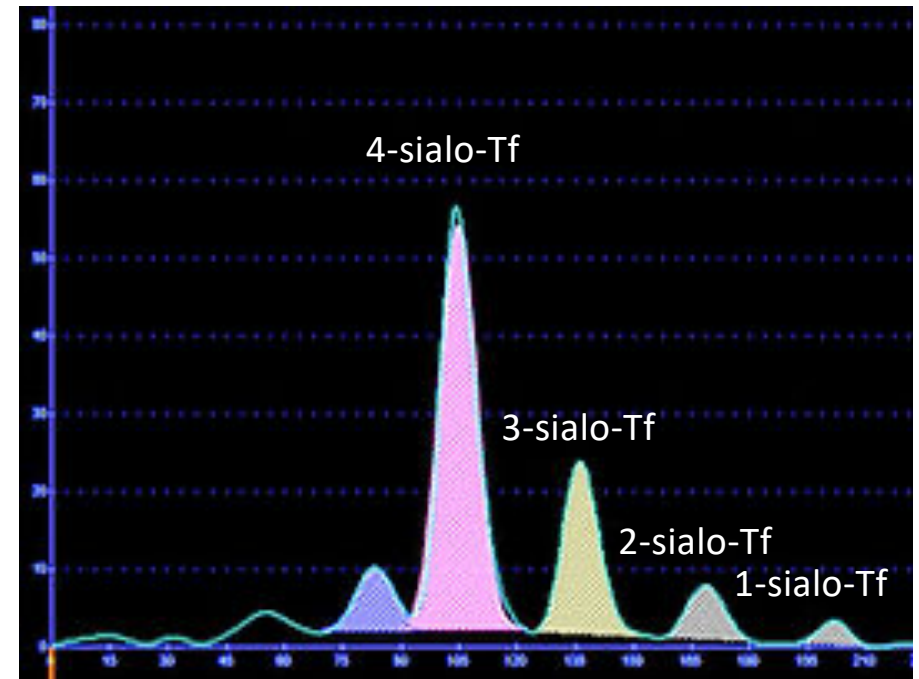


PROFIL NORMAL

Transferrine : électrophorèse capillaire



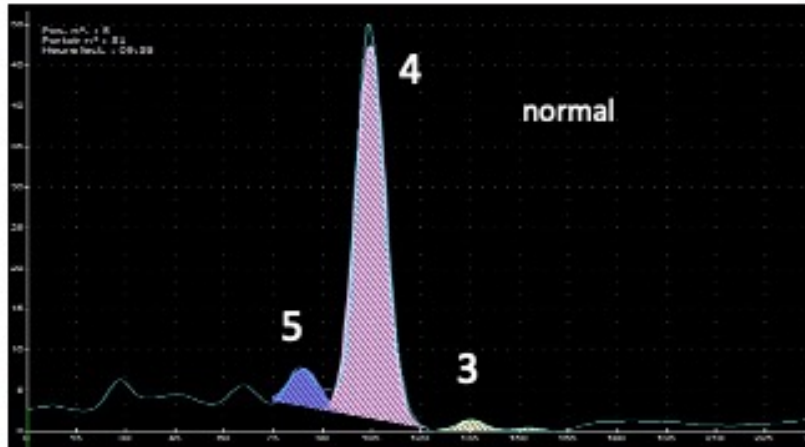
CDG type I



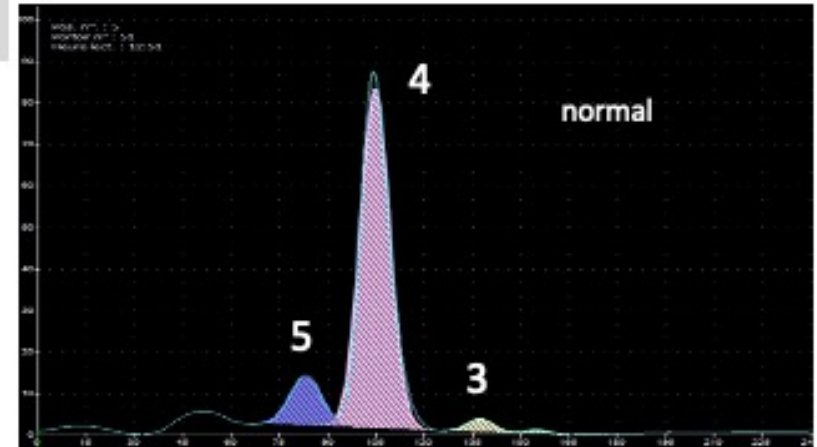
CDG type II

Chez nos patients...

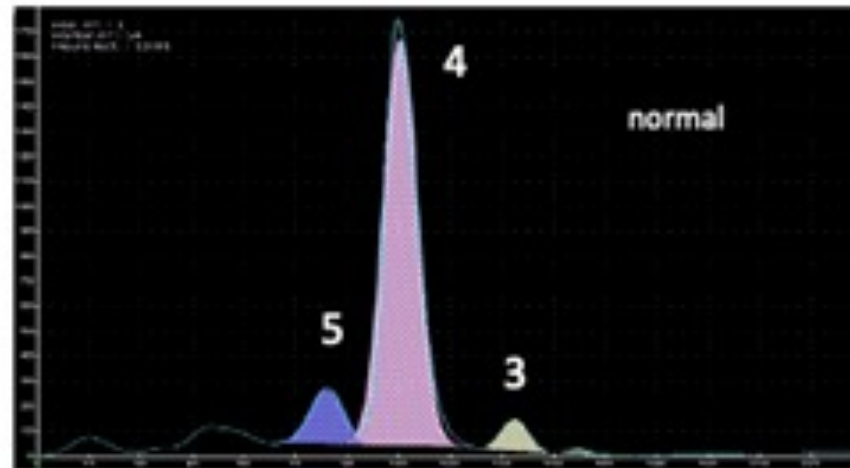
P1-1



P2-1

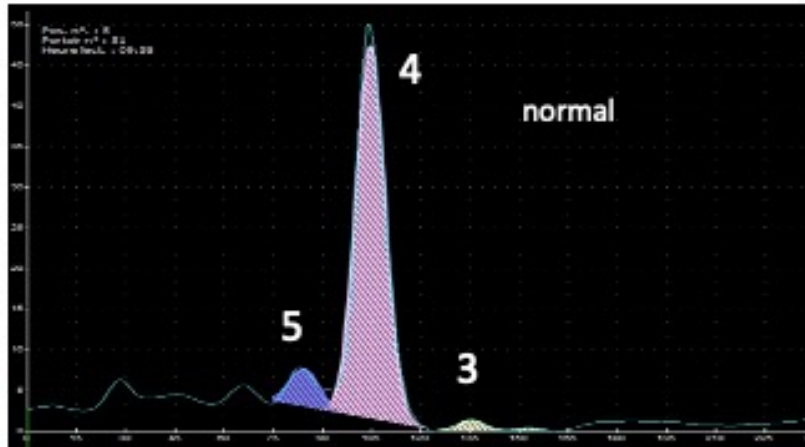


P3

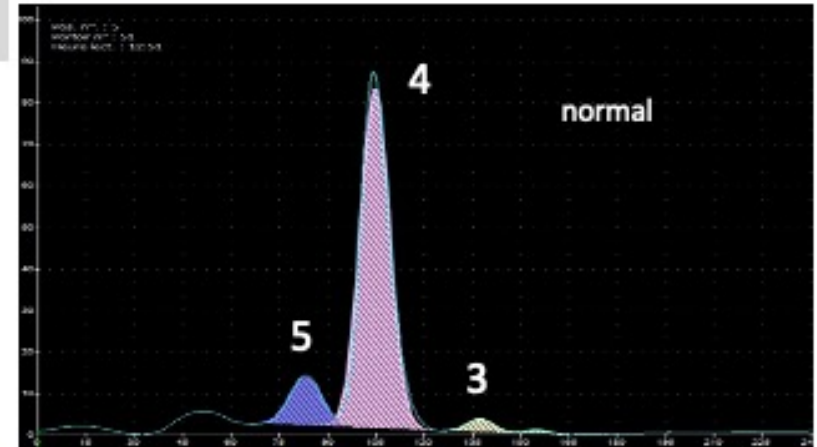


Chez nos patients...

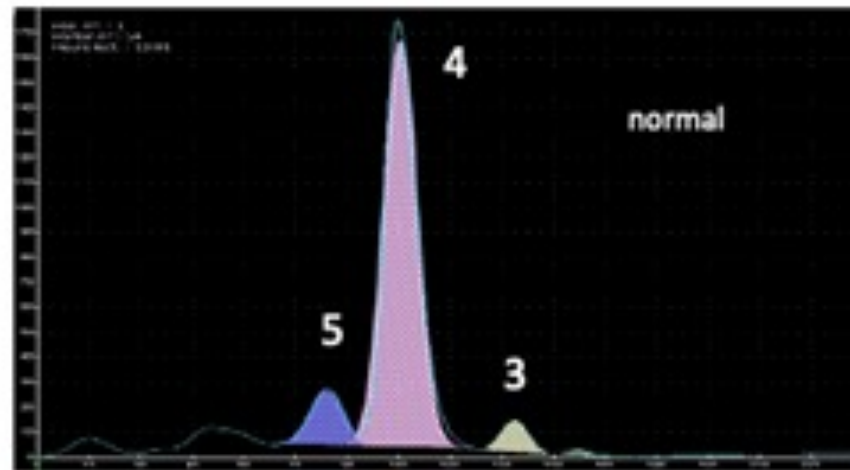
P1-1



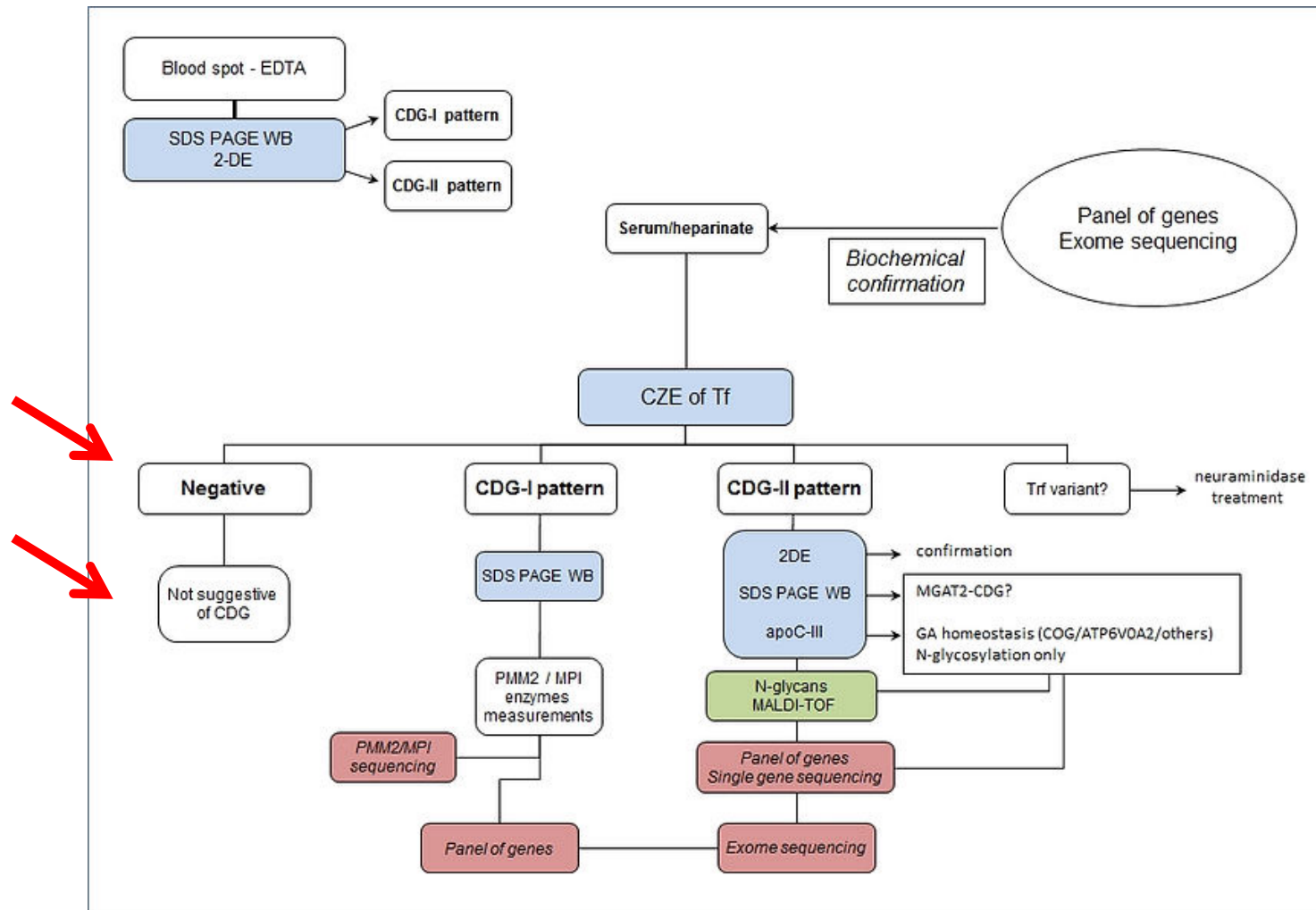
P2-1



P3



Algorithm diagnostic CDG



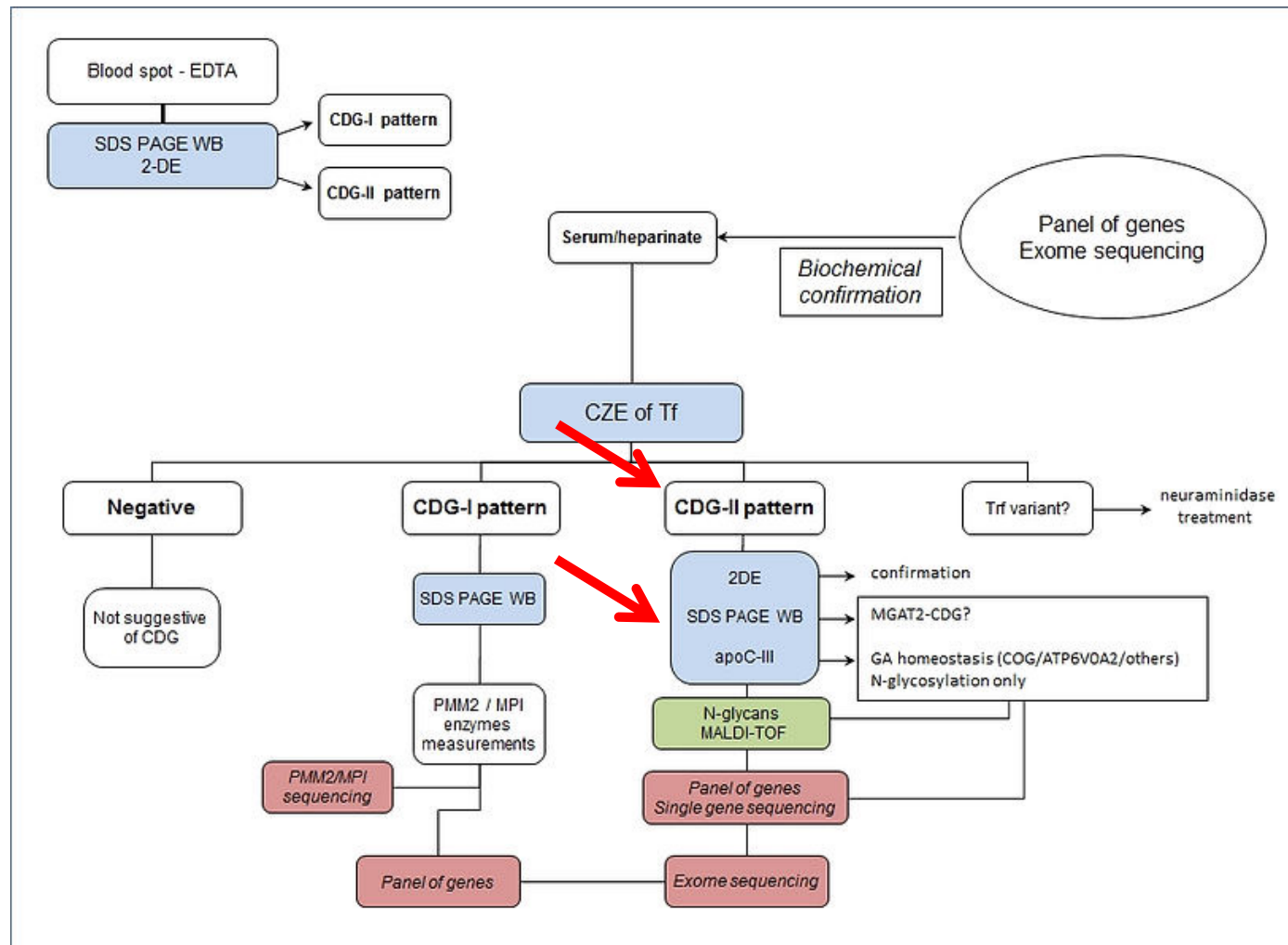
Mais...

- P1 : frère connu avec ATP6V0A2-CDG, → séquençage Sanger du gène *ATP6V0A2* chez P1: mêmes variants que son frère (*ATP6V0A2:c.522-3_522-2del* et *ATP6V0A2:c.2293C>T,p.Gln765**) → donc génétique en faveur d'ATP6V0A2-CDG **et** clinique évocatrice ++ (*cutis laxa*),
- P2 et P3 : clinique « compatible » CDG (bien que plus sévère que l'unique cas rapporté dans la littérature), *Whole exome sequencing* : homozygotes pour variant de signification indéterminée *COG4*. Et autres investigations (imagerie, métabolique des peroxysomes...) normales.

⇒ Dans les 2 cas, les CDG potentiels sont des CDG type II, avec troubles de l'homéostasie golgienne

Donc... on reprend l'algorithme et on poursuit le chemin des CDG type II

Algorithm diagnostic CDG

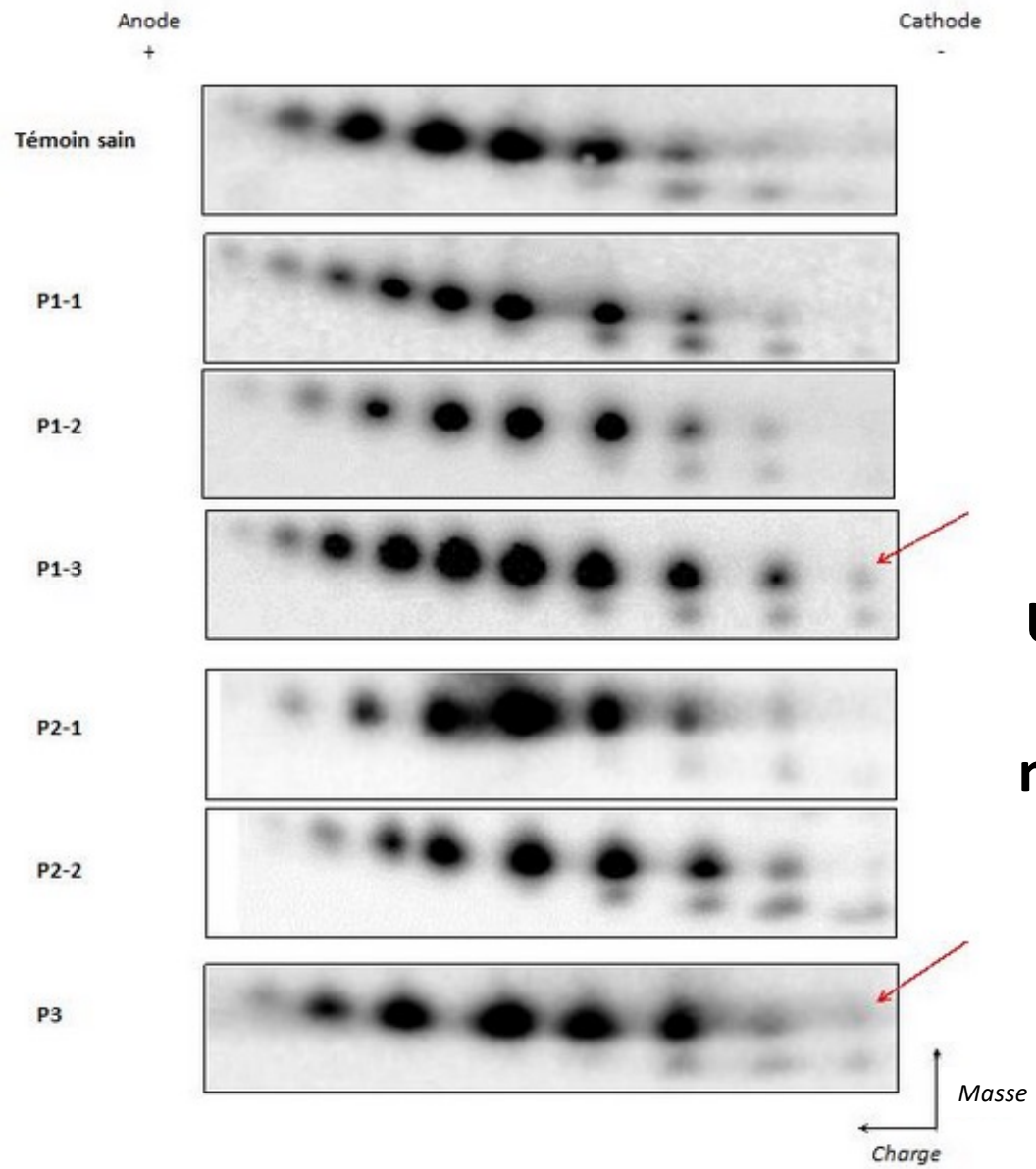


Western blot N-glycoprotéines

- Haptoglobine, orosomucoïde, transferrine, alpha-1-antitrypsine
- Ici, sans anomalie, comme attendu dans un CDG type II

Électrophorèse 2D des N-glycoprotéines

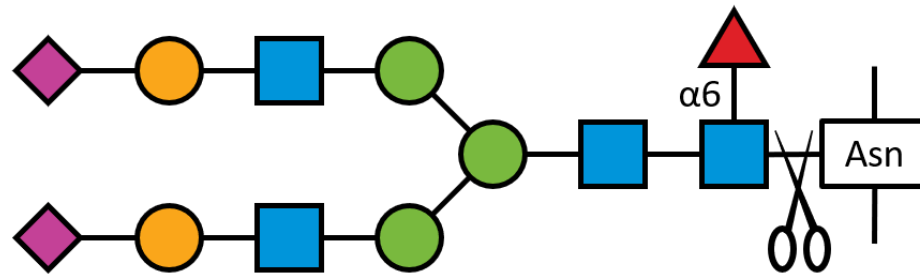
- Mêmes protéines, mais plus sensible (séparation masse moléculaire et pI)



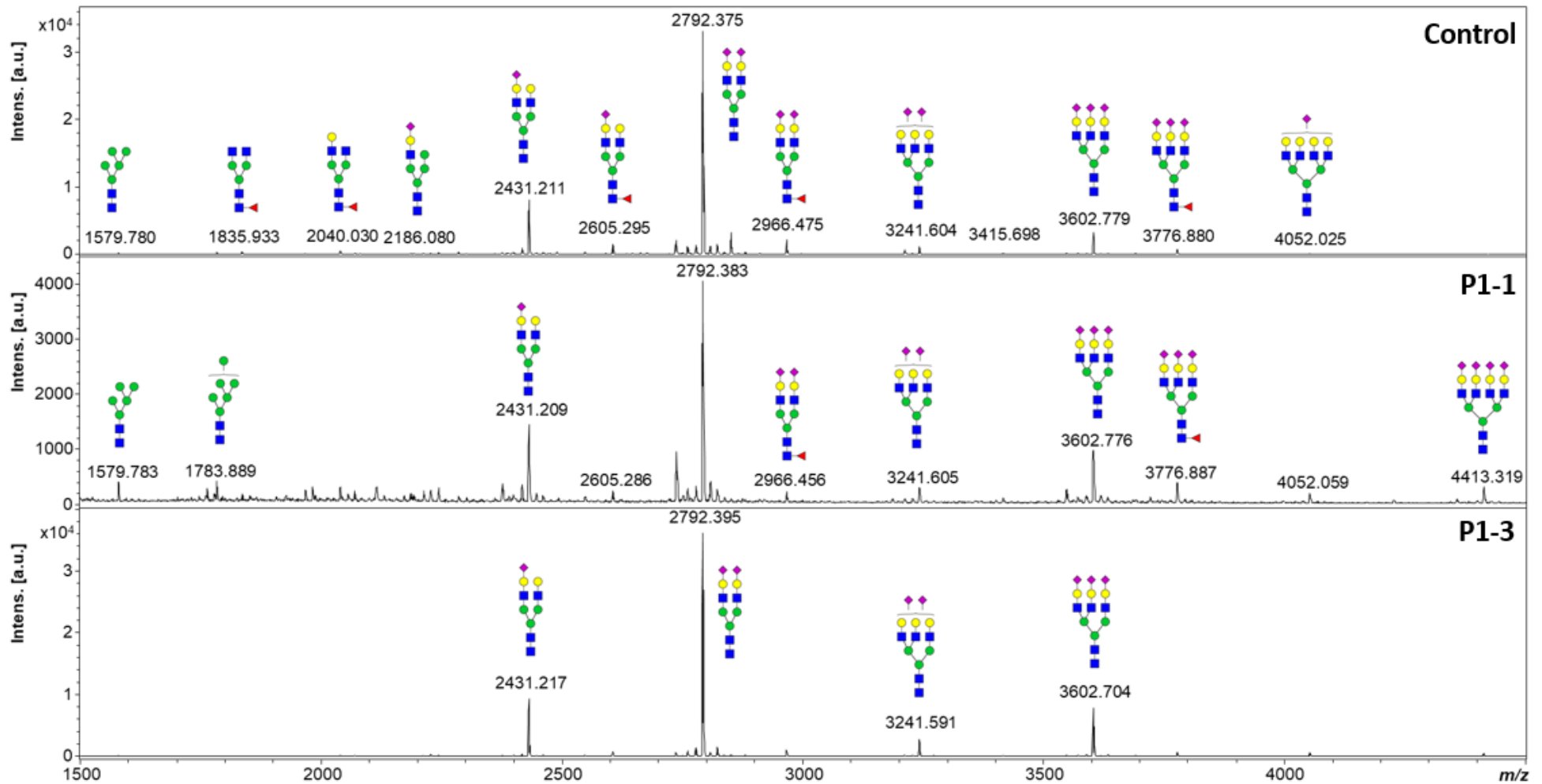
**Un peu évocateur de
CDG...
mais pas la panacée !**

N-glycome par spectrométrie de masse

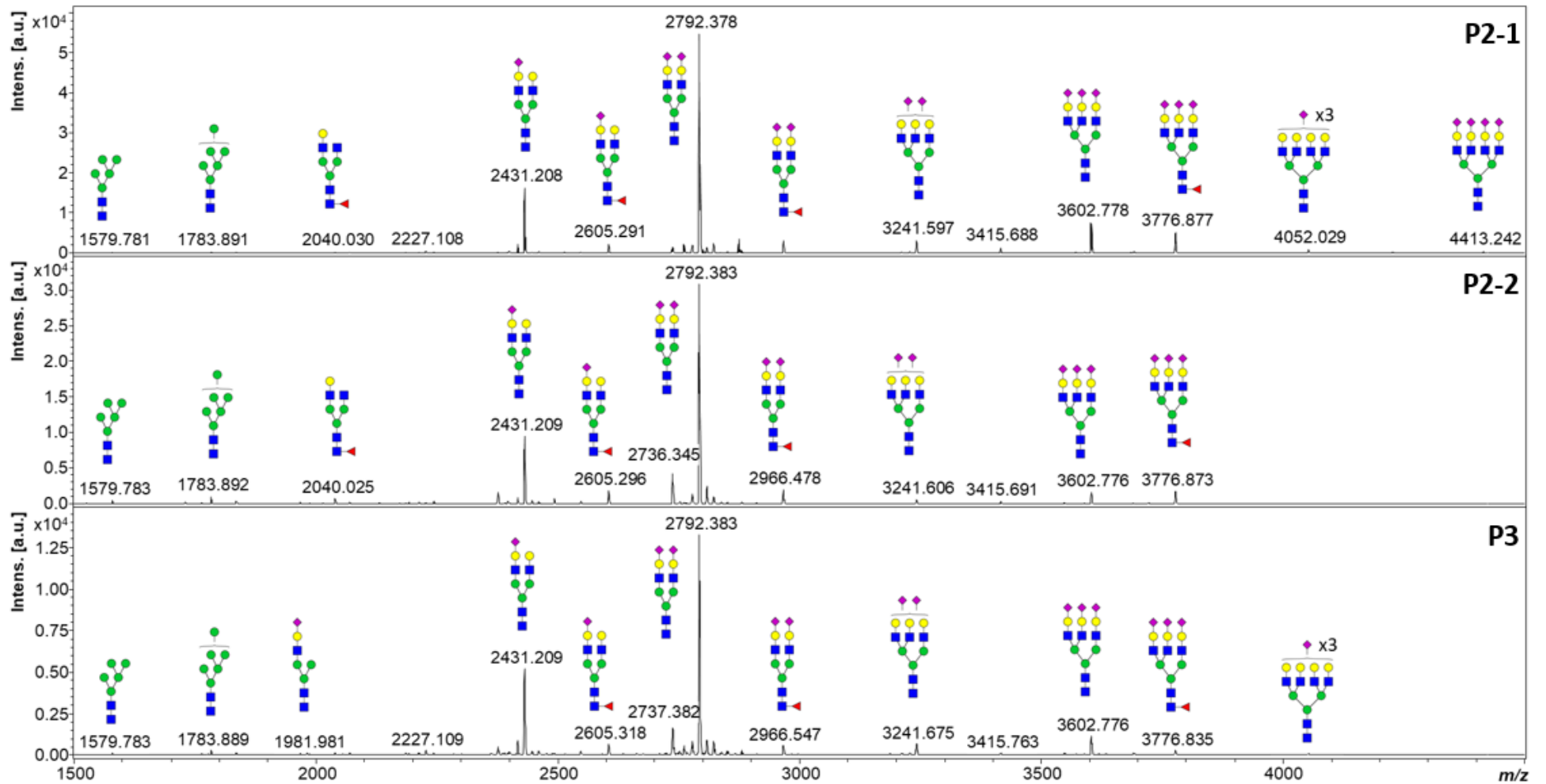
- MALDI-TOF sur sérum après digestion enzymatique par PNGase-F



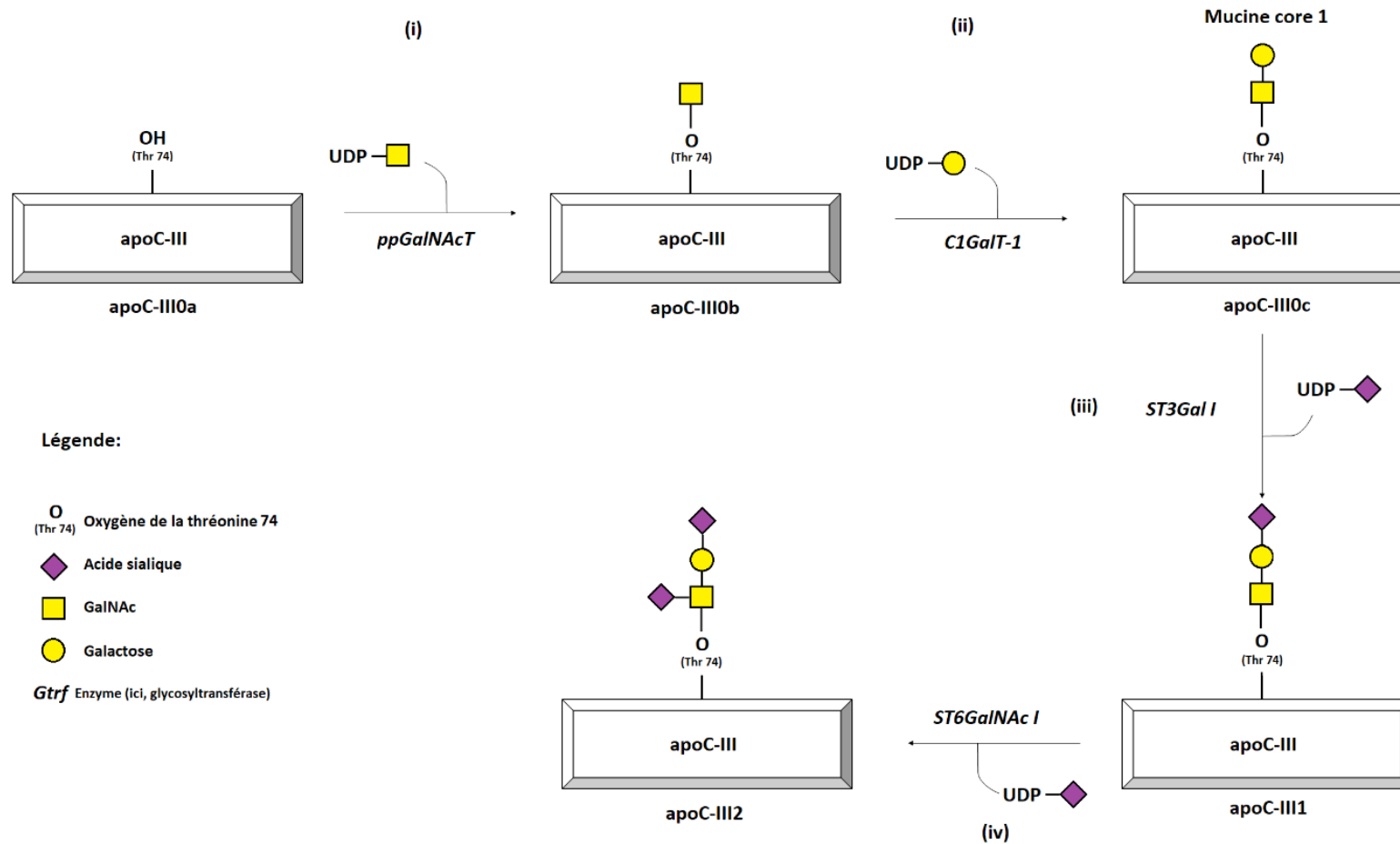
N-glycome par spectrométrie de masse



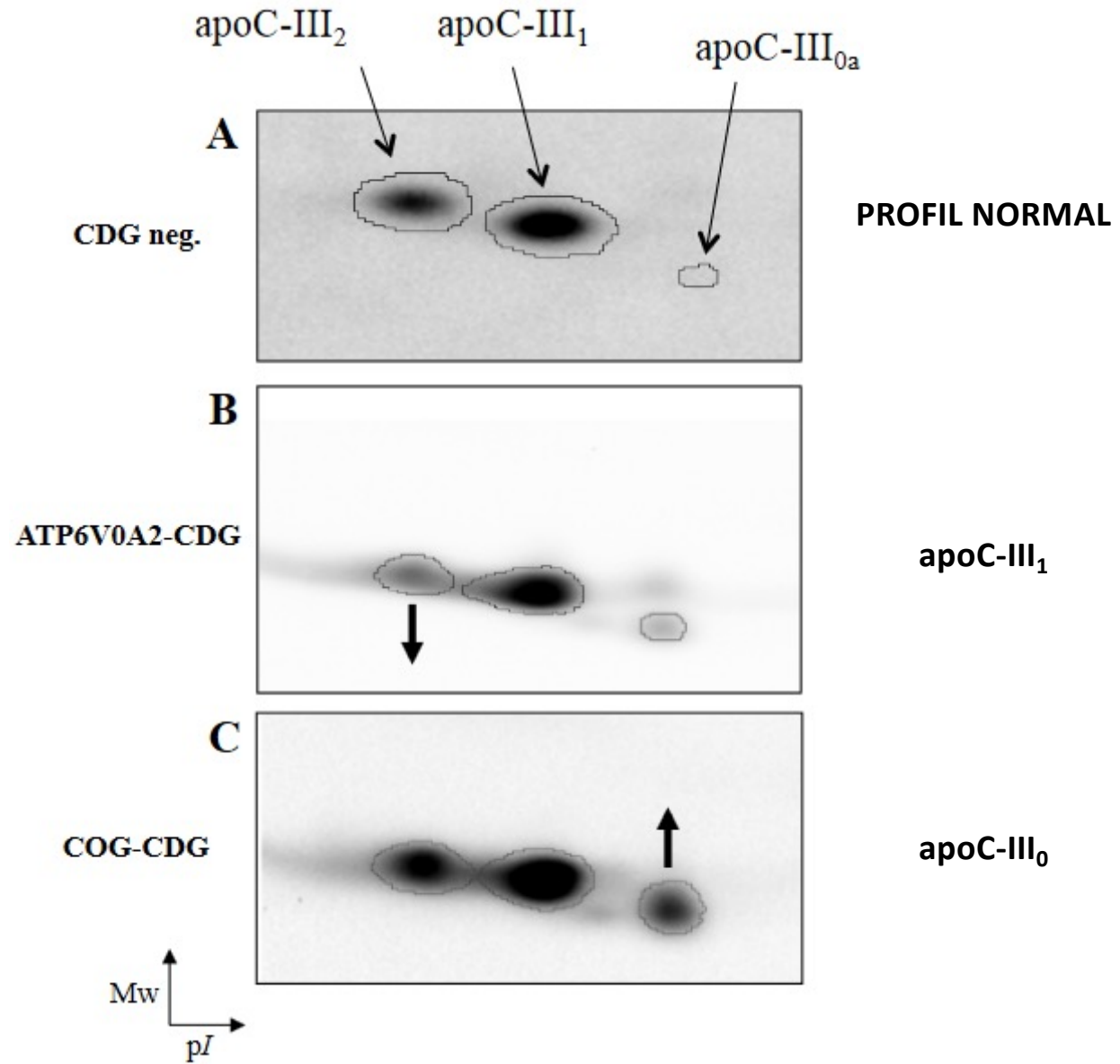
N-glycome par spectrométrie de masse

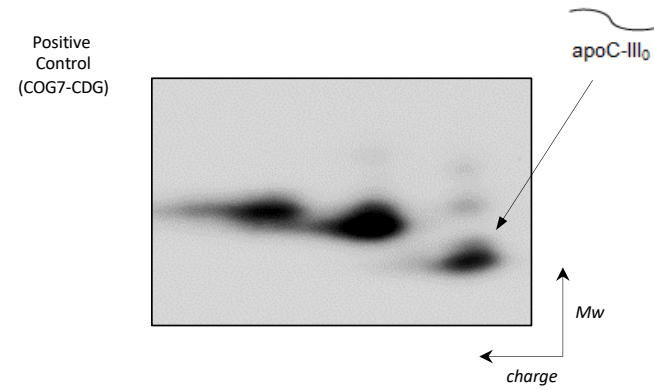
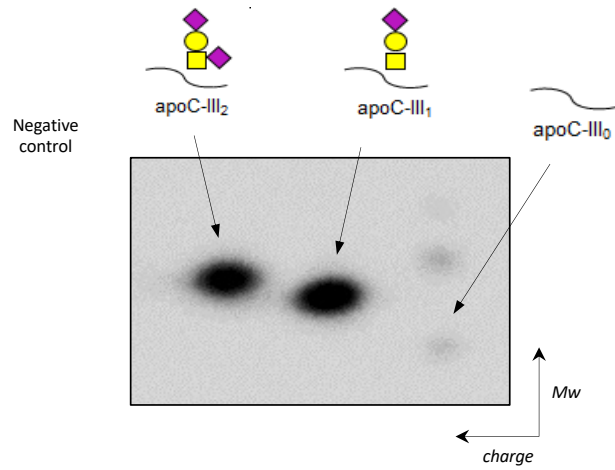


apolipoprotéine C-III

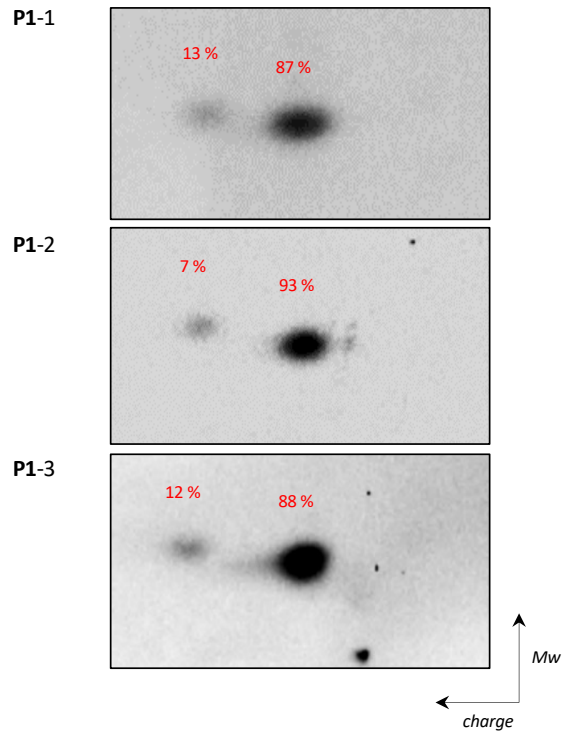


apoC-III

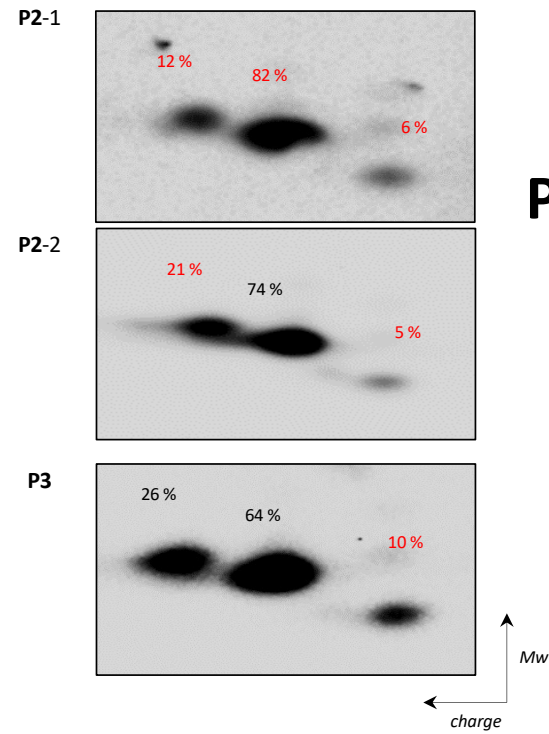


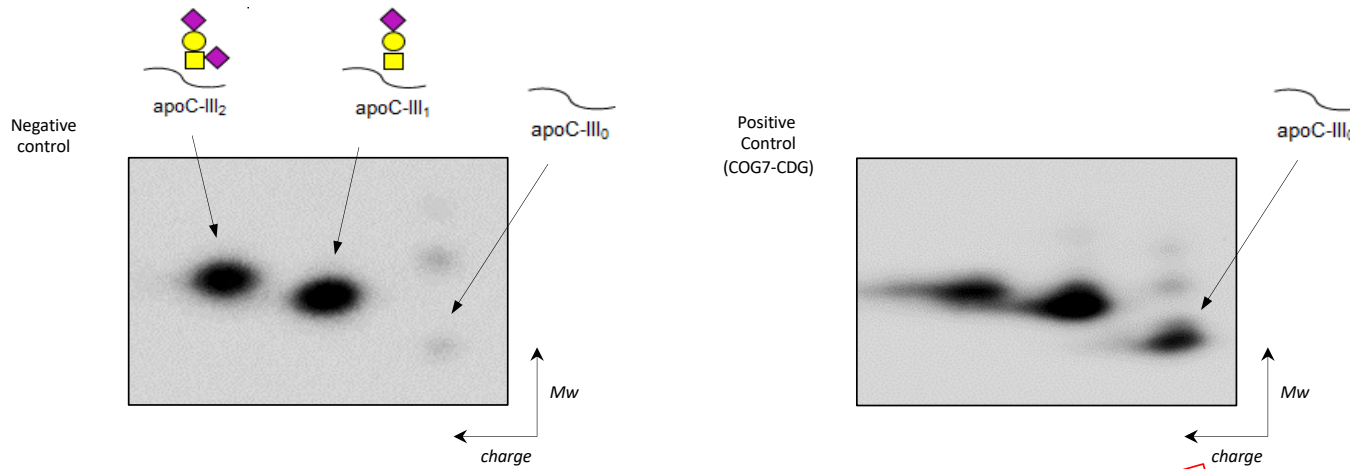


P1 : apoC-III₁

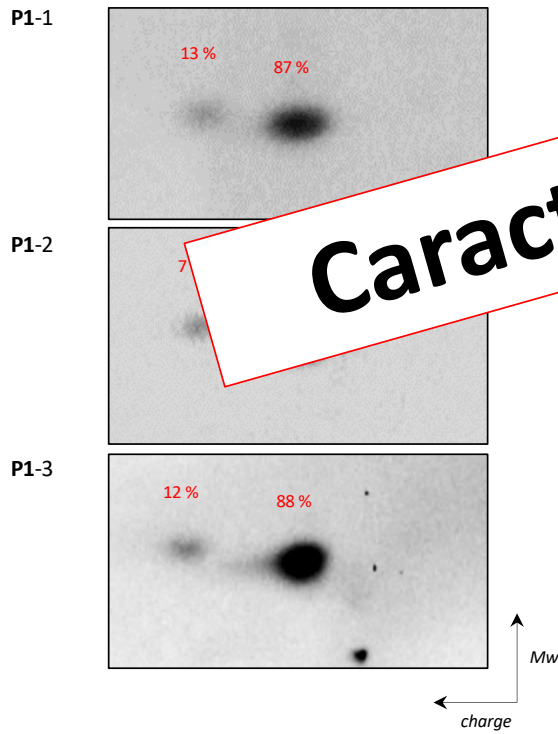


P2, P3 : apoC-III₀



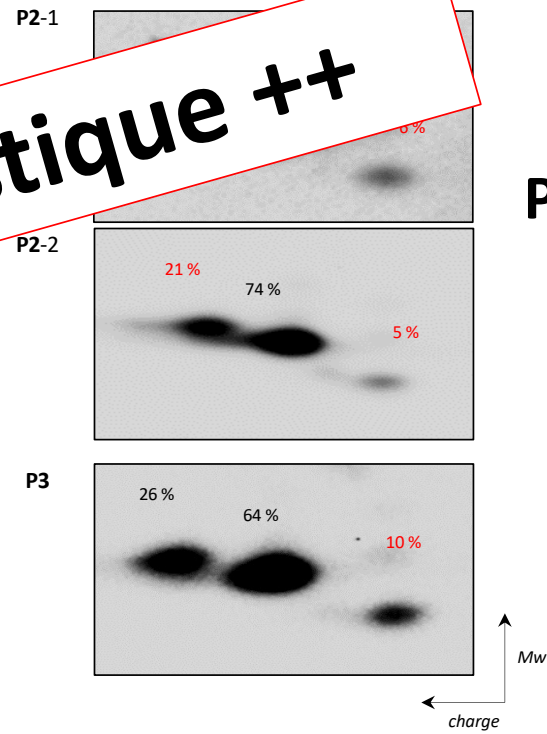


P1 : apoC-III₁



Caractéristique ++

P2, P3 : apoC-III₀







Quid des variants *COG4* de P2 et P3 ?

- Dépend du transcrit étudié

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24.

Quid des variants *COG4* de P2 et P3 ?

NM_001195139.2:c.3G>A,p.Met1Ile

PVS1   Very Strong 	Null variant (start loss) in gene <i>COG4</i> . Loss-of-function is a known mechanism of disease (gene has 14 pathogenic LOF variants and gnomAD Loss-of-Function Observed/Expected = 0.495 is less than 0.755), associated with ALG2-CDG, <i>COG4</i> -CDG and Microcephalic Osteodysplastic Dysplasia, Saul-Wilson Type.
PM2   Moderate 	GnomAD exomes homozygous allele count = 0 is less than 2 for AD/AR unable to check gnomAD exomes coverage. Variant not found in gnomAD genomes with good gnomAD genomes coverage = 31.0.

+ PP1_weak + PM3_weak

Conclusion : ***Pathogenic***

Quid des variants *COG4* de P2 et P3 ?

NM_015386.3:c.5G>A,p.Met5Ile

PM2 ?
Supporting ▾

Using strength Supporting because the variant doesn't alter the protein length (missense), and the position is conserved (phyloP100way = 5.34 is greater than 3.81).
GnomAD exomes homozygous allele count = 0 is less than 2 for AD/AR unable to check gnomAD exomes coverage.
Variant not found in gnomAD genomes with good gnomAD genomes coverage = 31.0.

+ PP1_weak + PM3_weak

Conclusion : ***Variant of unknown significance***

Quid des variants *COG4* de P2 et P3 ?

- Dépend du transcrit étudié
- **NM_001195139.2** : code pour la protéine canonique selon Uniprot (Q9H9E3)
- **NM_015386.3** : transcrit de référence NCBI et ENSEMBL; code pour JK3NI1 : Q9H9E3 + 4 acides aminés supplémentaires en N-terminal
- Quelle réalité au niveau cellulaire, tissulaire ?
- Localisation différentielle des isoformes de *COG4* selon cellules, tissus ?
- Reste à étudier.

Quid de l'absence de défauts de la N-glycosylation chez nos patients ?

- Mal compris :
 - Effet de l'âge ? Il a déjà été rapporté qu'en vieillissant les défauts de glycosylation s'atténuent chez certains patients CDG. Possible pour P2 et P3 (dépistés à 19 et 25 ans), mais pas pour P1 (dépisté à 1 mois)
 - Effet de l'alimentation ? Apports alimentaires d'oligoéléments (cofacteurs enzymatiques ? Mn^{2+} , Zn^{2+} ...), de sucres (galactose, mannose)... Difficilement démontrable.
 - Effet de l'expression différentielle des mutations selon les cellules/tissus ? Possible pour P2 et P3 (isoformes COG4 ?), pour P1 non car le profil CE de la transferrine finit par devenir franchement pathologique.
- À élucider...

Conclusions

- 2-DE de l'apoC-III semble plus sensible pour mettre en évidence des défauts de glycosylation dans CDG avec troubles de l'homéostasie golgienne comparativement aux études de la N-glycosylation
- Les COG-CDG sont caractérisés par un profil spécifique apoC-III₀. Dans ATP6V0A2-CDG, profil apoC-III₁ en faveur, mais moins spécifique
- Méthode facile à déployer en laboratoire de biologie médicale, robuste, d'exécution rapide
- Pourrait être utilisée en 1^{ère} ligne en cas de forte suspicion de CDG avec troubles de l'homéostasie golgienne, ou en 2^{ème} ligne si étude de la N-glycosylation normale mais forte suspicion de CDG avec atteinte de la O-glycosylation.

Référence: Raynor A, Vincent-Delorme C, Alaix AS, Cholet S, Dupré T, Vuillaumier-Barrot S, Fenaille F, Besmond C, Bruneel A. Normal transferrin patterns in congenital disorders of glycosylation with Golgi homeostasis disruption: apolipoprotein C-III at the rescue! Clin Chim Acta. 2021 May 19:S0009-8981(21)00172-8.