

Master 1 de recherche

**Impacts du manganèse sur la synthèse
hépatique et les modifications post-
traductionnelles de la bikunine**

Laboratoire d'accueil :

UMR-S-1193 INSERM (Equipe n°4 du Pr. Christian POÛS)

Physiopathogénèse et traitement des maladies du foie

Etudiant : Alexandre RAYNOR

Maître de stage :

Dr. Arnaud BRUNEEL

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement Arnaud Bruneel pour m'avoir accepté dans son stage, m'avoir impliqué dans son passionnant travail de recherche sur la bikunine, à la fois si pratique et si fondamental, et pour m'avoir donné goût à la recherche.

De même, je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe du laboratoire, et surtout Anita, Ameetha, Béatrice, Isabelle et Walid pour m'avoir fait participer à la vie de laboratoire, m'avoir enseigné les gestes de base du chercheur en Biologie, et avoir partagé avec moi leur passion ardente pour la recherche.

Table des matières

I.	Abréviations	4
II.	Introduction	5
1.	La bikunine.....	5
a.	Caractéristiques et biosynthèse.....	5
b.	Fonctions biologiques.....	7
2.	Les déficits congénitaux de la glycosylation (CDG).....	7
a.	Définition et classification.....	7
b.	Epidémiologie et clinique.....	8
c.	Diagnostic biologique.....	8
d.	TMEM165-CDG	8
3.	La bikunine et TMEM165-CDG : description et objectifs de l'étude.....	10
III.	Matériels et méthodes.....	12
1.	Cultures cellulaires et traitements	12
2.	Electrophorèse SDS-PAGE et Western blot.....	13
a.	Dosage des protéines totales.....	13
b.	Conditionnement des échantillons.....	13
c.	Migration, transfert des échantillons et incubation des membranes.....	14
d.	Révélation des membranes	14
IV.	Résultats et interprétation.....	15
1.	Résultats de la première expérience (n=1)	15
a.	Dosages des protéines totales dans les prélèvements	15
b.	Résultats des Western blot.....	17
2.	Résultats de la deuxième expérience (n=2).....	20
a.	Dosages des protéines totales dans les prélèvements	20
b.	Résultats des Western blot.....	21
V.	Discussion et perspectives.....	23
VI.	Conclusion.....	25
VII.	Références bibliographiques	26

I. Abréviations

α 1MG :	α 1-microglobuline
BCA :	Bi-Cinchoninic acid Assay
Bkn :	Bikunine
BSA :	Bovine Serum Albumin
CDG :	Congenital Disorder of Glycosylation (Déficit Congénital de la Glycosylation)
CS :	Chondroïtine Sulfate
DTT:	Dithiothréitol
EDTA :	Acide éthylènediaminetétraacétique
GAG :	Glycosaminoglycane
HC:	Heavy chain (chaîne lourde)
HRP :	Horse Radish Peroxydase
ITI :	Inter- α -Trypsin Inhibitor
kDa :	kilodalton
MEC :	Matrice extra-cellulaire
MOPS :	Acide 3-morpholino-1-propanesulfonique
P α I :	Pro- α -Trypsin Inhibitor
SDS :	Dodécylsulfate de sodium
SVF :	Sérum de Veau Foetal
TMEM :	TransMEMbrane Protein
Tris :	Tris(hydroxyméthyl)aminomethane
TTBS :	Tween-Tris Buffer Saline
UTI :	Urinary Trypsin Inhibitor

II. Introduction

1. La bikunine

a. Caractéristiques et biosynthèse

La bikunine est une protéine de masse molaire 25kDa, de synthèse hépatique et codée par le gène *AMBP*, qui code également l' α 1-microglobuline. Elle est sécrétée dans le sérum où elle est présente à des concentrations importantes (0,1 à 0,5 g/l). Elle s'y retrouve sous quatre formes (Figure 1) (Table 1) :

- D'une part, deux formes légères : la forme « core », composée exclusivement de la bikunine libre et la forme « urinary-trypsin inhibitor (UTI) » correspondant à la bikunine libre sur laquelle a été greffée une chaîne chondroïtine sulfate (CS).
- D'autre part, deux formes lourdes : la forme « pro- α -trypsin inhibitor (P α I) » correspondant à l'UTI estérifiée par une glycoprotéine nommée « chaîne lourde » et la forme « inter- α -trypsin inhibitor (ITI) » correspondant à l'UTI estérifiée par deux chaînes lourdes.

Trois chaînes lourdes différentes existent : HC1, HC2 et HC3, codées par les gènes *ITIH1*, *ITIH2* et *ITIH3*, distincts du gène *AMBP*, qui présentent une forte homologie de séquence. Ces chaînes lourdes sont N-glycosylées et O-glycosylées (1) (2) (3).

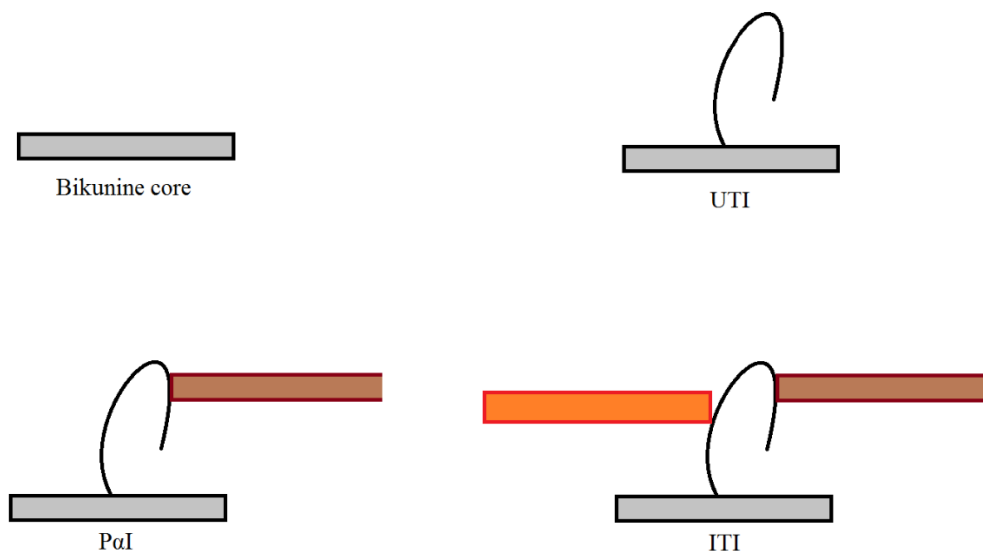


Figure 1 : Formes circulantes de la bikunine.

La boucle noire correspond à la chaîne chondroïtine sulfate, les rectangles de couleur correspondent aux chaînes lourdes HC1, HC2 ou HC3.

Forme	Masse molaire	Description	Fraction dans le sérum
Core	16 kDa	Bikunine libre	<2%
UTI	37-43 kDa	Forme core allongée d'une chaîne CS	
PαI	125 kDa	Forme UTI estérifiée par une chaîne lourde	~98%
ITI	225 kDa	Forme UTI estérifiée par deux chaînes lourdes	

Table 1 : Formes circulantes de la bikunine.

La synthèse des différentes formes de la bikunine commence donc dans le foie par la transcription du gène *AMB* dans le noyau des cellules hépatocytaires, puis se poursuit par la traduction du transcrit au niveau du réticulum endoplasmique.

Le peptide AMBP entre dans l'appareil de Golgi où il subit de nombreuses modifications post-traductionnelles, dont une réaction de glycosylation, ainsi qu'éventuellement la greffe d'une chaîne chondroïtine sulfate avec estérification par une ou deux chaînes lourdes.

Enfin, le peptide AMBP est clivé au niveau des vésicules sécrétoires, donnant naissance à la bikunine et à l' α 1-microglobuline qui seront sécrétées séparément dans le sérum (4) (Figure 2).

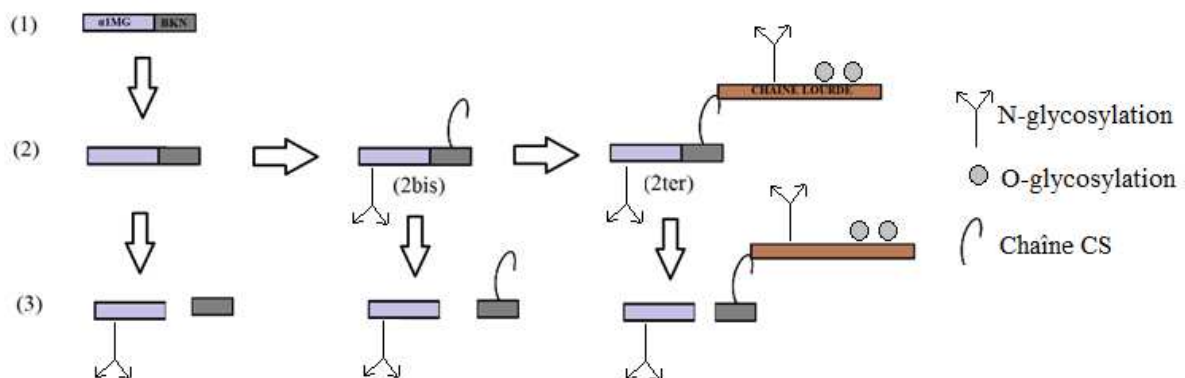


Figure 2 : Synthèse de la bikunine.

Le peptide AMBP est synthétisé dans le réticulum endoplasmique (1), puis une maturation intervient dans l'appareil de Golgi (2), avec éventuel ajout d'une chaîne chondroïtine sulfate (2bis) voire estérification par une chaîne lourde (2ter). Enfin, le peptide AMBP est clivé dans les vésicules sécrétoires.

Ainsi, la bikunine mature est une protéine N-glycosylée parfois greffée d'une chaîne CS (forme UTI) pouvant elle-même être estérifiée par une (forme PαI) ou deux protéines HC (forme ITI). La présence d'une chaîne CS dans certaines formes de la bikunine fait ainsi d'elle un protéoglycane.

La bikunine étant sécrétée dans le sérum, il s'agit alors d'un des rares protéoglycanes circulants décrits à ce jour.

b. Fonctions biologiques

La bikunine tire son nom de la présence de deux domaines Kunitz-like (« bi-kunine »), responsables d'une activité anti-protéasique vis-à-vis des protéases à sérine.

La bikunine, sous forme P α I ou ITI, est également capable d'échanger une ou deux de ses chaînes lourdes avec l'acide hyaluronique au niveau des matrices extracellulaires (MEC) du tissu conjonctif, conduisant alors à leur stabilisation. La bikunine est alors sous forme UTI, qui se retrouve sécrétée dans l'urine.

Ces deux effets interviennent par exemple dans la régulation de l'inflammation (activité anti-inflammatoire de la bikunine) et dans la maturation ovocytaire (par stabilisation des MEC) (5) (6).

2. Les déficits congénitaux de la glycosylation (CDG)

a. Définition et classification

Les déficits congénitaux de la glycosylation (CDG) sont des maladies innées du métabolisme résultant de mutations délétères à l'origine de troubles de la glycosylation des protéines ou des lipides (N-glycosylation principalement, mais aussi O-glycosylation, synthèse des protéoglycanes...). Une glycosylation correcte étant un prérequis à la fonction et régulation d'un grand nombre de protéines, on comprend que les CDG aient des répercussions clinico-biologiques importantes chez les patients (7).

Plus d'une centaine de CDG ont été décrits, de transmission principalement autosomique récessive, impliquant la présence d'une mutation chez chacun des deux parents de l'enfant malade (8) (9). Ici, nous nous intéresserons exclusivement à l'incidence des CDG sur les protéines.

Les CDG sont classés en deux grands groupes selon leur origine :

- Les CDG de type I (CDG-I), qui correspondent à des mutations délétères sur les enzymes impliquées dans la partie initiale du processus de glycosylation (synthèse et fixation du précurseur oligosaccharidique sur la protéine), au niveau du réticulum endoplasmique. Ce sont les CDG les plus fréquents ;
- Les CDG de type II (CDG-II), qui correspondent à des mutations délétères sur les enzymes impliquées dans la partie tardive du processus de glycosylation (modification qualitative de l'oligosaccharide fixé sur la protéine), au niveau de l'appareil de Golgi.

Cette définition est historique. De nos jours, toute maladie génétique affectant la glycosylation est intégrée dans les CDG.

L'atteinte biochimique à l'origine du CDG est variable, avec défaut d'une seule enzyme (ex : PMM2-CDG, le plus fréquent des CDG avec déficit de l'enzyme phosphomannomutase 2) ou de l'homéostasie entière d'un compartiment cellulaire (ex : TMEM165-CDG avec perturbation de l'homéostasie golgienne décrit plus bas).

b. Epidémiologie et clinique

Dans l'ensemble, les CDG constituent une famille de maladies rares, avec une fréquence estimée de 1/50.000 à 1/100.000 naissances dans la population générale.

Le tableau clinique est généralement sévère : typiquement, on retrouve chez un enfant en bas âge des troubles neurologiques (ataxie, épilepsie, rétinopathie...), hépatiques (insuffisance hépatique), cardiaques, une dysmorphie notable... Mais parfois également des troubles biologiques comme une coagulopathie ou une hypoglycémie hyper-insulinémique. Les CDG étant pour la plupart incurables, le décès survient en général dans le jeune âge (10).

c. Diagnostic biologique

Face à un tableau clinique évocateur de CDG, il est nécessaire de réaliser des analyses biologiques chez le patient afin de montrer s'il existe des anomalies de la glycosylation des protéines et de réaliser un examen génétique dans le but d'identifier la mutation à l'origine de la maladie. Si la mutation est identifiée, cela permettra d'offrir un conseil génétique approprié aux parents en cas de nouveau projet de grossesse.

Il s'agit de dépister les anomalies qualitatives de la glycosylation des protéines : pour cela, un échantillon de sang est recueilli et le sérum est alors analysé par techniques d'électrophorèse voire de spectrométrie de masse. L'étude des profils de migrations de la transferrine et de l'apolipoprotéine-CIII permet d'étudier respectivement les troubles de la N- et de la O-glycosylation. Si le profil est anormal, et selon son aspect, on peut évoquer un possible CDG. Il est alors nécessaire de rechercher la mutation causale par des techniques génétiques (biologie moléculaire) (11).

Ces techniques de dépistage et d'identification sont souvent longues et délicates à mettre en œuvre, ce qui constitue autant de limites à leur usage.

d. TMEM165-CDG

Le sous-type particulier de CDG étudié dans ce mémoire est le TMEM165-CDG.

TMEM165 est une protéine golgienne à sept domaines transmembranaires de masse molaire 34,9 kDa récemment identifiée et appartenant à la famille de protéines UPF0016 (Figure 3).

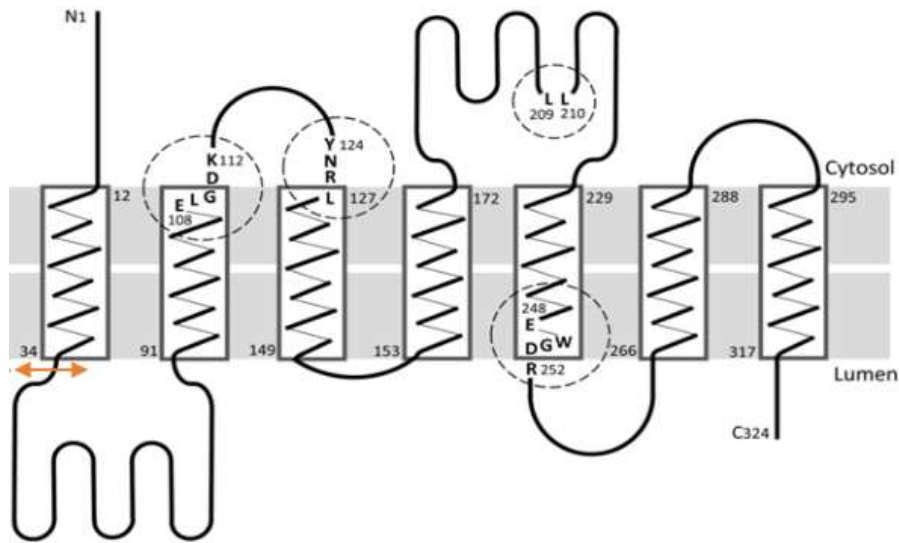


Figure 3 : Structure de TMEM165.

Noter les motifs caractéristiques au niveau des 2^{ème} et 5^{ème} domaines transmembranaires.

Dulary, Potelle *et al.*, 2016.

Cette famille de protéines, dont les membres sont retrouvés chez la plupart des êtres vivants, est définie par la présence d'un ou deux motif(s) E-φ-G-D-(K/R)-(T/S), avec φ un acide aminé hydrophobe. Ce motif comportant plusieurs acides aminés anioniques, les membres de la famille UPF0016 sont présumés être dans l'ensemble des transporteurs cationiques. En plus de cet aspect fonctionnel, il posséderait également une fonction régulatrice de l'expression protéique.

Des études récentes ont montré un rôle de TMEM165 dans le transport du manganèse et du calcium entre le cytosol et la lumière de l'appareil de Golgi, ainsi que son implication dans la régulation du pH golgien (12).

Ainsi, bien que la fonction exacte de TMEM165 ne soit pas encore complètement élucidée, plusieurs hypothèses existent pour décrire son rôle dans l'homéostasie golgienne (Figure 4) :

- Co-transporteur antiport Ca²⁺/Mn²⁺ faisant rentrer un ion calcium dans l'appareil de Golgi depuis le cytosol, contre un ion manganèse qui en sort ;
- Co-transporteur antiport Ca²⁺/Mn²⁺ faisant rentrer un ion manganèse dans l'appareil de Golgi depuis le cytosol, contre un ion calcium qui en sort ;
- Avec une fonction additionnelle potentielle d'importation de protons dans l'appareil de Golgi depuis le cytosol (13).

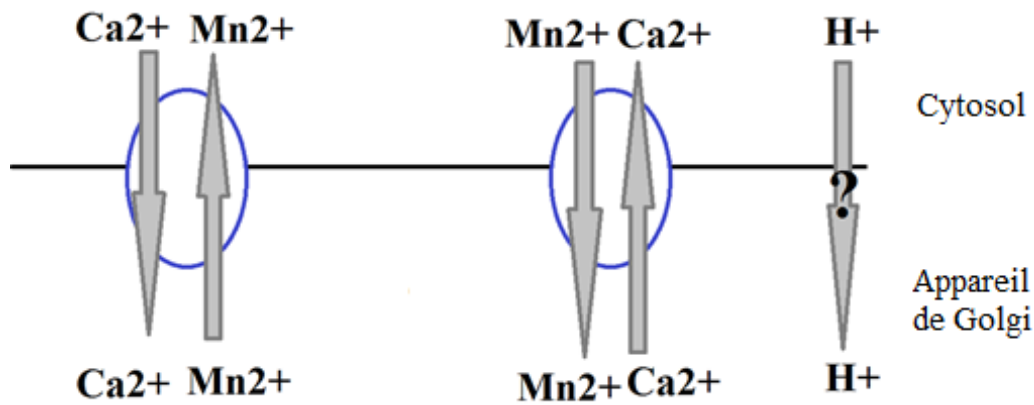


Figure 4 : Hypothèses de fonctionnement du transporteur TMEM165.

La présence de mutations du gène *TMEM165* chez l'Homme provoque un CDG de type II, le TMEM165-CDG, avec une atteinte de l'homéostasie golgienne affectant la maturation des résidus sucrés des glycoprotéines. Il existe donc biologiquement de nombreuses anomalies de la glycosylation des protéines.

Ces anomalies sont à mettre en lien avec un défaut d'entrée de Mn^{2+} dans le Golgi, ce qui provoque un défaut de fonctionnement des enzymes Mn^{2+} -dépendantes qui se retrouvent privées de leur cofacteur. En effet, il a été décrit qu'une supplémentation en Mn^{2+} dans les cellules TMEM165-K.O. corrigeait les défauts de la glycosylation observés.

Il n'est cependant pas exclu que le défaut d'homéostasie golgienne du Mn^{2+} perturbe d'autres processus que les réactions enzymatiques.

Le tableau clinique du TMEM165-CDG est sévère, les jeunes patients présentant une dysmorphie et un retard de croissance. Il existe également des signes plus spécifiques avec une dysplasie squelettique majeure, une laxité articulaire et une petite taille.

De nombreuses mutations affectant le gène *TMEM165* ont été décrites à ce jour chez des patients : certaines provoquent l'apparition de sites d'épissage cryptiques (ex : 792 + 182G>A), d'autres sont localisées au niveau du motif conservé ELGDK (ex : E108G), ou encore au niveau du peptide signal (ex : R126H), etc. Ces mutations ont différents impacts sur l'expression, la localisation ou encore la fonction de transporteur de TMEM165. Les conséquences en termes de perturbation de l'homéostasie golgienne et d'anomalies de la glycosylation sont donc variables (14).

3. La bikunine et TMEM165-CDG : description et objectifs de l'étude

Comme décrit en I.1.a, la bikunine est un protéoglycane circulant qui lors de sa maturation dans l'appareil de Golgi subit de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que N-glycosylation, ajout d'une chaîne CS (O-xylosylation), sulfatations et transestérifications, dont certaines sont réalisées par des enzymes

Mn²⁺-dépendantes. La richesse de ces modifications post-traductionnelles a encouragé l'étude de la bikunine comme biomarqueur des CDG (15).

En effet, lors d'un CDG provoquant des troubles de l'homéostasie du Mn²⁺, comme le TMEM165-CDG, on peut s'attendre à une altération de la maturation de la bikunine dans les hépatocytes, donc à une altération de sa masse moléculaire, et donc à une altération de son profil de migration électrophorétique.

Effectivement, il a été montré que chez des patients atteints de TMEM165-CDG (ainsi que dans d'autres patients atteints de CDG avec perturbation de l'homéostasie golgienne), le profil de migration de la bikunine sérique (Western blot) était altéré significativement (Figure 5). La bikunine sérique pourrait donc être un biomarqueur utile au dépistage du TMEM165-CDG par Western blot sur sérum.

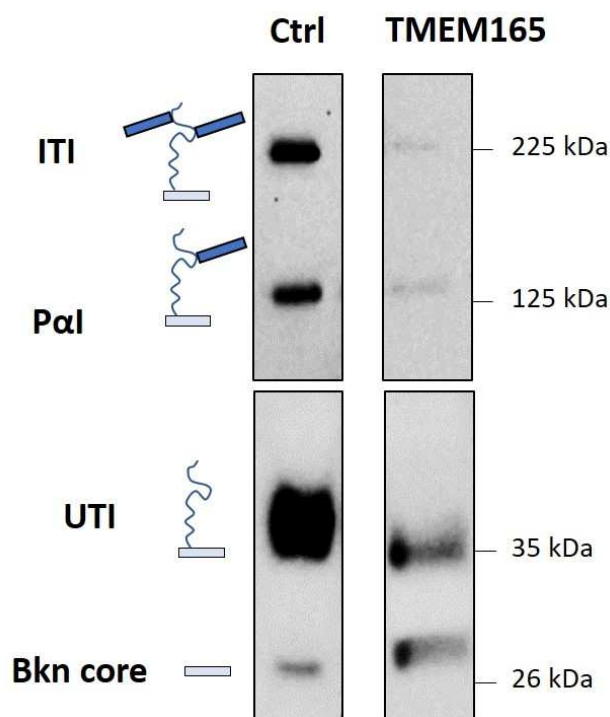


Figure 5 : Western blot de la bikunine chez un patient contrôle (à gauche) et TMEM165-CDG (à droite).

Par rapport au contrôle, on constate chez le patient TMEM165-CDG une diminution quantitative des formes UTI, ITI et PaI, et des modifications qualitatives des bandes UTI (plus basse) et surtout de la bikunine core (plus haute), compatible avec des anomalies des modifications post-traductionnelles de la bikunine.

Il a été montré *in-vitro* dans certains modèles cellulaires qu'une supplémentation importante du milieu de culture en Mn²⁺ induisait une dégradation lysosomale accrue de TMEM165. Ce mécanisme serait régulé par la sensibilité du motif ELGDK de TMEM165 envers la concentration cytosolique en Mn²⁺ (16).

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes demandé si, en supplémentant des cellules hépatiques en culture par un excès de Mn²⁺ qui induirait une dégradation de

TMEM165, nous pourrions créer un modèle TMEM165-CDG-like *in-vitro* reproduisant les anomalies observées chez les patients.

Nous avons choisi d'étudier les conséquences d'une supplémentation en Mn²⁺ sur la synthèse et les modifications post-traductionnelles de la bikunine.

En effet, en retrouvant un profil de migration de la bikunine *in-vitro* similaire à celui observé *in-vivo* chez les patients TMEM165-CDG, cela suggérerait que le modèle cellulaire étudié reproduit possiblement les conditions biochimiques décrites *in-vivo*, et serait donc un bon modèle *in-vitro* de TMEM165-CDG.

Dans un second temps, nous pourrions nous intéresser aux effets de cette supplémentation sur les biomarqueurs standards de la N- et O-glycosylation.

III. Matériels et méthodes

1. Cultures cellulaires et traitements

Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé deux lignées cellulaires hépatiques immortalisées disponibles au laboratoire : les cellules HepG2 et les cellules HuH7.

Des aliquotes de cellules de ces lignées conservés dans de l'azote liquide ont été récupérés puis cultivés dans des boîtes en plastique de surface 75cm² (boîtes T75ensemencées avec 2,1 millions de cellules chacune) à l'étuve à 37°C sous 5% de CO₂ pendant une semaine (pour obtenir 80% de confluence soit 6,7 millions de cellules). Le milieu de culture utilisé était le milieu DMEM (ThermoFisher).

Après une semaine, les cellules ont été récupérées et repiquées dans des boîtes en plastique de surface 25cm² (boîtes T25ensemencées avec 700.000 cellules chacune), mises à l'étuve à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 72h. Le milieu de culture utilisé était le milieu OPTIMEM (Gibco). Contrairement au DMEM, le milieu OPTIMEM ne contient pas de sérum de veau fœtal (SVF) et donc de bikunine. Ce milieu était enrichi ou non en Mn²⁺ à différentes concentrations.

Pour cela, une solution mère de concentration 6 mM en Mn²⁺ a été réalisée en ajoutant 12 mg de poudre Mn²⁺,4H₂O (Sigma) à 100 ml d'eau désionisée.

Dans le cadre de la première expérience (n=1), quatre boîtes T25 de cellules HepG2 dans du milieu OPTIMEM ont été mises à incuber. Une boîte témoin a été réalisée dans laquelle il n'y avait pas de Mn²⁺ ajouté au surnageant. Trois boîtes ont été réalisées dans lesquelles du Mn²⁺ a été rajouté dans le surnageant pour obtenir des concentrations finales de 50 µM, 100 µM et 150 µM. Le volume total de surnageant était de 6 ml.

En parallèle, 4 boîtes T25 de cellules HuH7 ont été incubées dans les mêmes conditions.

A 24h et 48h 100 µl de surnageant ont été récupérés pour étude. A 72h, 1 ml de surnageant a été récupéré, et les cellules ont été lysées dans une solution de TE2X (tampon Tris pH=6,8, SDS, glycérol, HCl) à 100°C en 10 minutes. L'intégralité des lysats a été récupérée.

Tous les prélèvements ont été stockés au congélateur à -20°C avant étude.

Dans le cadre de la seconde expérience (n=2), cinq boîtes T25 de cellules HepG2 ont été traitées de la même façon que dans la première expérience, à la différence cependant qu'il y avait une boîte témoin sans Mn²⁺ et quatre boîtes avec des concentrations de Mn²⁺ dans le surnageant de 50 µM, 150 µM, 300 µM et 500 µM.

2. Electrophorèse SDS-PAGE et Western blot

a. Dosage des protéines totales

Les échantillons ont été décongelés puis un dosage BCA (Bi-cinchoninic acid Assay) a été réalisé afin de déterminer leurs concentrations protéiques. Une gamme au BSA (*Bovine Serum Albumin*) a été réalisée pour établir une droite d'étalonnage.

Les échantillons de lysats auront préalablement été dilués au 1/10^e compte tenu de leurs concentrations protéiques prévisionnelles élevées (risque de concentrations mesurées hors zone de linéarité de la droite d'étalonnage).

Pour le calcul de la corrélation entre concentration ajoutée en Mn²⁺ dans le milieu et concentration totales en protéines, un test de corrélation de Pearson a été réalisé.

b. Traitement des échantillons

Les échantillons ont été prélevés dans des volumes variables selon leurs concentrations protéiques afin de garantir un dépôt dans chaque puits du gel d'électrophorèse d'une même quantité de protéines (pour permettre des comparaisons quantitatives ultérieurement).

Une solution de TE4X NuPage (Invitrogen) a été ajoutée aux échantillons (bleu de bromophénol, SDS, glycérol, tampon Tris pH=6,8) ainsi qu'une solution réductrice NuPage (Invitrogen) (DTT) permettant l'homogénéisation des charges et la linéarisation des protéines.

Les mélanges ont ensuite été chauffés à 100°C pendant 10 minutes pour dénaturation.

c. Migration, transfert des protéines et révélation des protéines

Les mélanges ont été déposés dans des gels de migration PAGE (gradient 4%-12% en acrylamide) (Invitrogen) et mis à migrer à 150 V pendant 15 minutes puis à 200 V pendant 45 minutes dans du tampon de migration MOPS 1X (Invitrogen) (MOPS, tampon Tris pH=7,7, SDS, EDTA).

Les gels d'électrophorèse ont été ensuite récupérés et un transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose a été réalisé, avec application d'un courant de 100 V pendant 1h30 dans du tampon de transfert Tris-glycine-éthanol 1X.

Les membranes de nitrocellulose ont été récupérées et colorées au rouge ponceau pour s'assurer de la qualité du transfert et d'un dépôt de quantités équivalentes de protéines dans chaque puits.

Les membranes ont ensuite été rincées trois fois 5 minutes dans du tampon TTBS, puis « saturées » pendant 1h30 dans une solution de lait 10%-TTBS, puis à nouveau rincées trois fois 5 minutes dans du tampon TTBS, puis incubées 1h en présence de l'anticorps primaire anti-bikunine (origine : lapin ; Millipore) dilué au 1/5000^e dans une solution de lait 5%-TTBS. Après incubation, les membranes ont été rincées trois fois 5 minutes dans du tampon TTBS, puis incubées 1h30 en présence de l'anticorps secondaire anti-anticorps de lapin couplé HRP (GE Healthcare) dilué au 1/5000^e dans une solution de lait 5%-TTBS. Enfin, un dernier rinçage de trois fois 5 minutes dans du tampon TTBS a été réalisé.

d. Révélation des membranes

Les membranes ont été révélées sur film argentique par réaction d'électro-chimio-luminescence après ajout de 1 ml de réactif (GE Healthcare) par membrane.

IV. Résultats et interprétation

1. Résultats de la première expérience (n=1)

a. Dosages des protéines totales dans les prélèvements

Dans les surnageants :

Cellules HepG2			
	24h	48h	72h
Témoin	0,50 g/l	0,45 g/l	0,54 g/l
(Mn ²⁺) = 50 µM	0,57 g/l	0,56 g/l	0,56 g/l
(Mn ²⁺) = 100 µM	0,65 g/l	0,54 g/l	0,62 g/l
(Mn ²⁺) = 150 µM	0,71 g/l	0,58 g/l	0,63 g/l

Table 2 : Dosages des protéines totales dans les surnageants de cellules HepG2 de la première expérience.

Cellules HuH7			
	24h	48h	72h
Témoin	0,74 g/l	0,63 g/l	0,49 g/l
(Mn ²⁺) = 50 µM	0,84 g/l	0,76 g/l	0,63 g/l
(Mn ²⁺) = 100 µM	0,77 g/l	0,76 g/l	0,69 g/l
(Mn ²⁺) = 150 µM	0,83 g/l	0,83 g/l	0,74 g/l

Table 3 : Dosages des protéines totales dans les surnageants de cellules HuH7 de la première expérience.

Dans les lysats (72h) :

Cellules HepG2	
	72h
Témoïn	1,0 g/l
(Mn ²⁺) = 50 μ M	1,79 g/l
(Mn ²⁺) = 100 μ M	0,69 g/l
(Mn ²⁺) = 150 μ M	1,7 g/l

Table 4 : Dosages des protéines totales dans les lysats de cellules HepG2 de la première expérience.

Cellules HuH7	
	72h
Témoïn	1,0 g/l
(Mn ²⁺) = 50 μ M	1,25 g/l
(Mn ²⁺) = 100 μ M	0,50 g/l
(Mn ²⁺) = 150 μ M	0,98 g/l

Table 5 : Dosages des protéines totales dans les lysats de cellules HuH7 de la première expérience.

Dans le cas des surnageants : on constate dans les cellules HepG2 (Table 2) une relation linéaire significative (p-value < 0,05) entre la concentration en protéines totales et la concentration de Mn²⁺ ajoutée pour les durées 24h (p-value = 0,001) et 72h (p-value = 0,037). Une relation linéaire significative n'est pas retrouvée pour la durée 48h (p-value = 0,16).

Dans les cellules HuH7 (Table 3), une relation linéaire significative est retrouvée pour la durée 72h (p-value = 0,033). Une relation linéaire significative n'est pas retrouvée pour les durées 24h (p-value = 0,46) et 48h (p-value = 0,07).

Dans le cas des lysats : une relation linéaire significative entre ces deux paramètres n'est pas retrouvée ni pour les cellules HepG2 (p-value = 0,76) (Table 4), ni pour les cellules HuH7 (p-value = 0,67) (Table 5).

b. Résultats des Western blot

Premier gel :

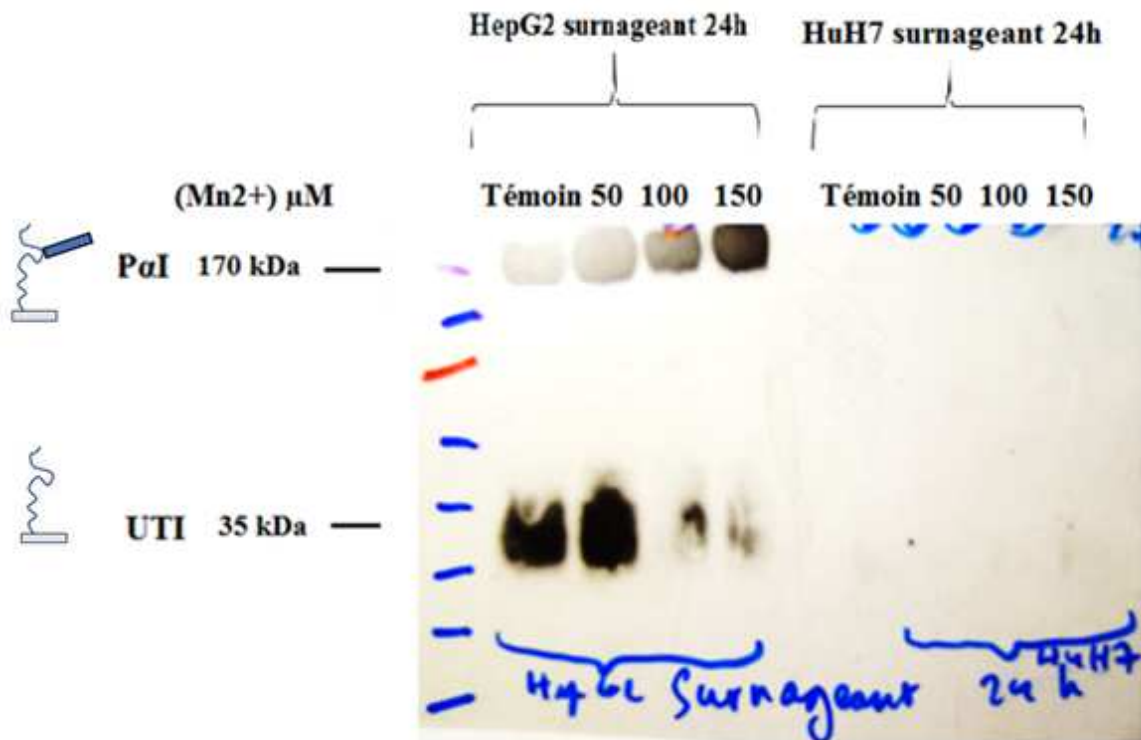


Figure 6 : Western blot de la bikunine dans les surnageants de cellules HepG2 et HuH7 au temps 24h. Temps d'exposition : 8 minutes.

Ce film correspond à un temps d'exposition de 8 minutes.

De haut en bas, les formes de la bikunine observées successivement sont : PaI et UTI.

Dans le cas des cellules HepG2, on constate une diminution quantitative de la forme UTI de la bikunine proportionnelle à l'augmentation de la concentration en Mn^{2+} ajoutée dans le surnageant.

Les bandes ITI et bikunine core ne sont pas visibles.

Dans le cas des cellules HuH7, aucune forme de la bikunine n'a pu être révélée.

Deuxième gel :

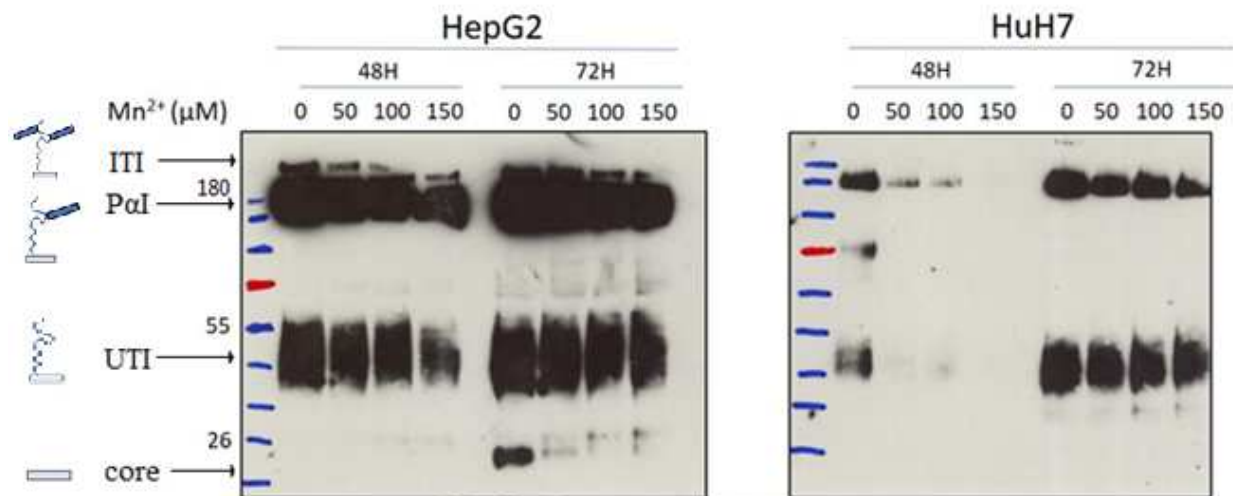


Figure 7 : Western blot de la bikunine dans les surnageants de cellules HepG2 et HuH7 aux temps 48h et 72h. Temps d'exposition : 10 secondes.

Ces films correspondent à un temps d'exposition de 10 secondes.

De haut en bas, les formes de la bikunine observées successivement sont : ITI, P α I, UTI et bikunine core.

Dans le cas des cellules HepG2 (48h et 72h), on constate une diminution quantitative de l'ensemble des formes de la bikunine proportionnelle à l'augmentation de la concentration en Mn²⁺ ajoutée dans le surnageant. Cette diminution semble particulièrement importante pour la forme bikunine core à 72h.

On constate également à 72h l'apparition progressive d'une bande bikunine core anormale de poids moléculaire légèrement plus élevé que celui de la bikunine core normale. Cette bande devient de plus en plus importante proportionnellement à l'augmentation de la concentration en Mn²⁺ ajoutée dans le surnageant.

Cette augmentation à 72h de la bikunine core anormale semble se faire aux dépens de la bikunine core normale, dont l'intensité de la bande s'atténue au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en Mn²⁺ ajoutée dans le milieu.

Dans le cas des cellules HuH7 (48h et 72h), on constate également une diminution quantitative de l'ensemble des formes de la bikunine proportionnelle à l'augmentation de la concentration en Mn²⁺ ajoutée dans le surnageant.

La bande bikunine core n'est pas visible à 48h ni à 72h. La bande ITI n'est pas visible à 48h.

Les profils de migration de la bikunine à 72h mettent donc en évidence des anomalies qualitatives et quantitatives dans cette première expérience. Les profils de migration à 48h sont moins informatifs puisque montrant moins de bandes.

Troisième gel :

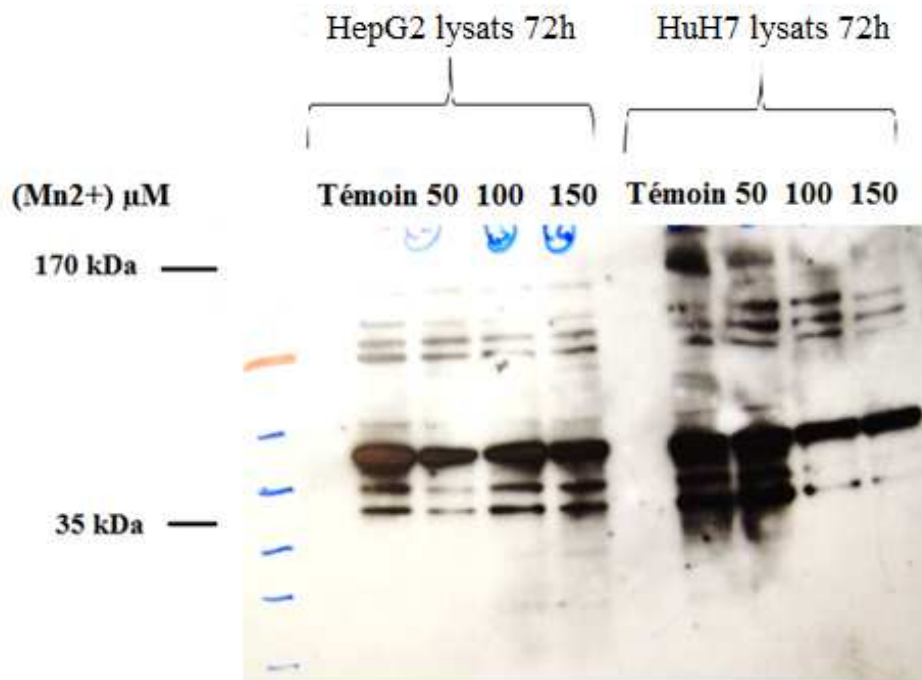


Figure 8 : Western blot de la bikunine dans les lysats de cellules HepG2 et HuH7 au temps 72h. Temps d'exposition : 30 minutes.

Ce film correspond à un temps d'exposition de 30 minutes.

Les lysats n'ont pas été interprétés dans le cadre de ce travail.

2. Résultats de la deuxième expérience (n=2)

a. Dosages des protéines totales dans les prélèvements

Dans les surnageants :

Cellules HepG2			
	24h	48h	72h
Témoin	1 g/l	0,53 g/l	0,56 g/l
(Mn ²⁺) = 50 µM	1,49 g/l	1,08 g/l	0,58 g/l
(Mn ²⁺) = 150 µM	1,75 g/l	1,54 g/l	0,68 g/l
(Mn ²⁺) = 300 µM	1,79 g/l	1,2 g/l	0,97 g/l
(Mn ²⁺) = 500 µM	2,13 g/l	1,75 g/l	0,68 g/l

Table 6 : Dosages des protéines totales dans les surnageants de cellules HepG2 de la deuxième expérience.

Dans les lysats (72h) :

Cellules HepG2	
	72h
Témoin	1,63 g/l
(Mn ²⁺) = 50 µM	2,08 g/l
(Mn ²⁺) = 150 µM	1,92 g/l
(Mn ²⁺) = 300 µM	2,27 g/l
(Mn ²⁺) = 500 µM	1,32 g/l

Table 7 : Dosages des protéines totales dans les lysats de cellules HepG2 de la deuxième expérience.

Dans le cas des surnageants (Table 6) : on constate une relation linéaire significative (p-value < 0,05) entre la concentration en protéines totales et la concentration en Mn²⁺ ajoutée pour la durée 24h (p-value = 0,038). On ne constate pas l'existence d'une relation linéaire significative entre ces deux paramètres pour les durées 48h (p-value = 0,11) et 72h (p-value = 0,38).

Dans le cas des lysats (Table 7) : une relation linéaire significative entre ces deux paramètres n'est pas retrouvée (p-value = 0,55).

b. Résultats des Western blot

Premier gel :

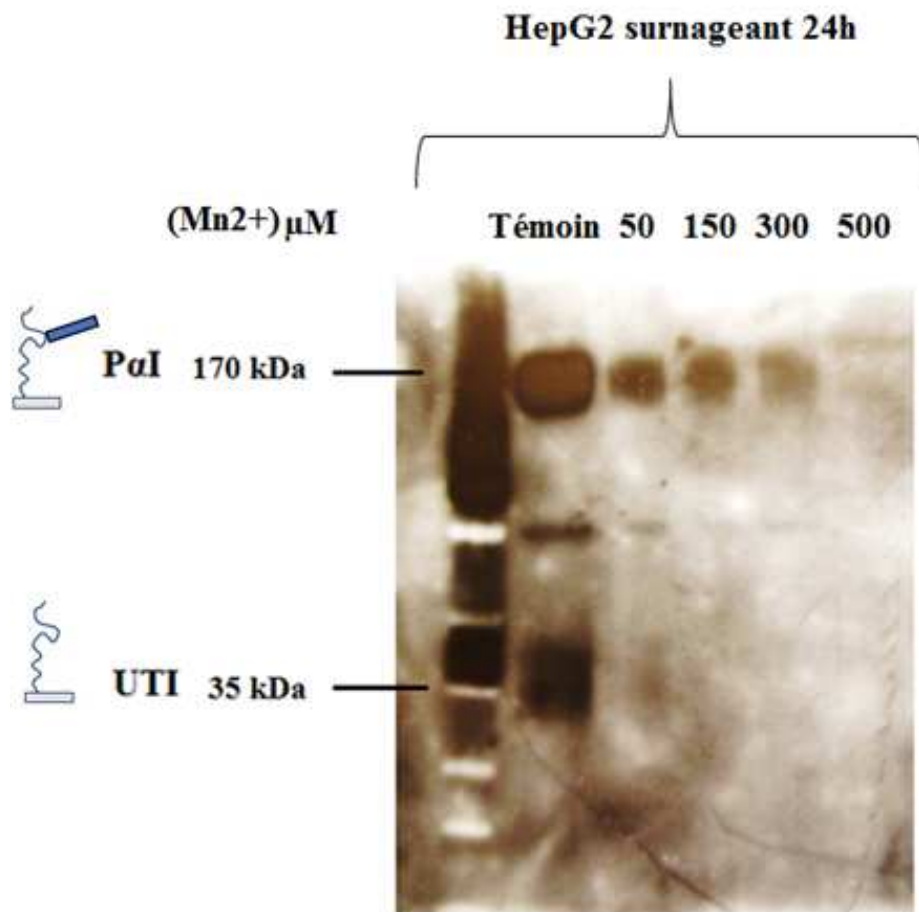


Figure 9 : Western blot de la bikunine dans les surnageants de cellules HepG2 au temps 24h. Temps d'exposition : une heure.

Ce film correspond à un temps d'exposition d'une heure.

On constate une diminution quantitative de l'ensemble des formes visibles de la bikunine, proportionnelle à l'augmentation de la concentration en Mn^{2+} ajoutée dans le surnageant.

Les bandes bikunine core et ITI ne sont pas visibles.

Deuxième gel :

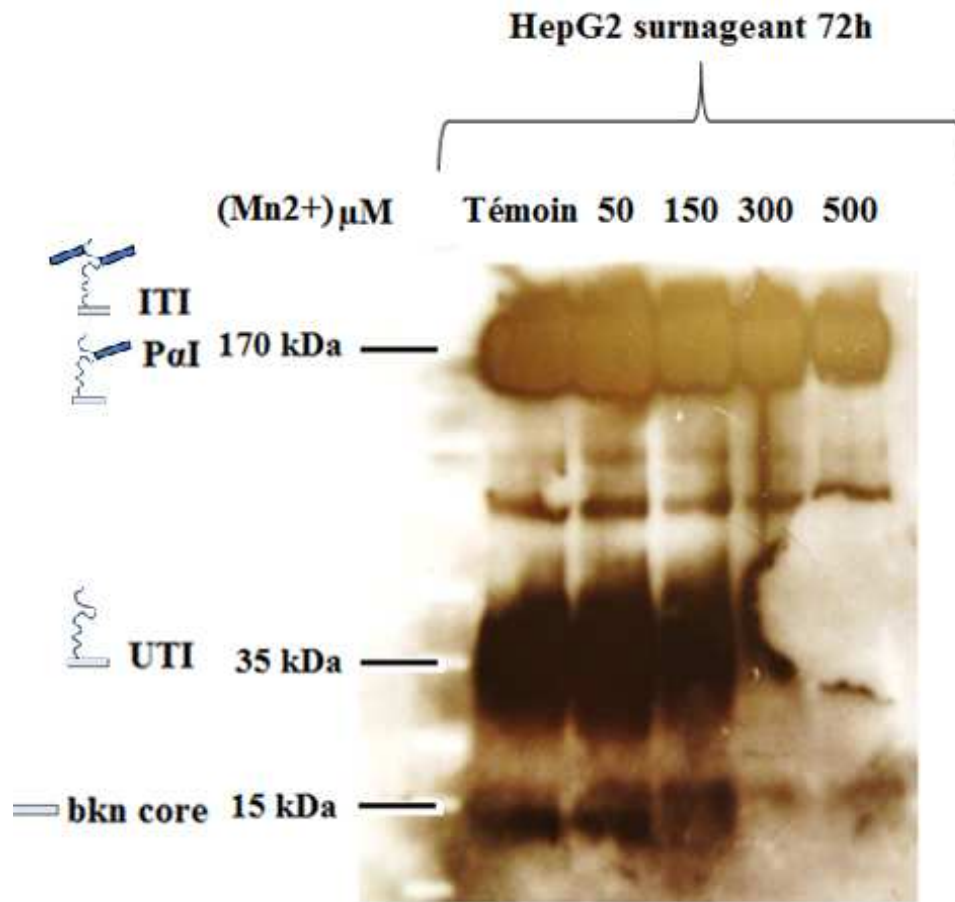


Figure 10 : Western blot de la bikunine dans les surnageants de cellules HepG2 au temps 72h. Temps d'exposition : une heure.

Ce film correspond à un temps d'exposition d'une heure.

On constate l'apparition progressive d'une bande bikunine core anormale de poids moléculaire légèrement plus élevé que celui de la bikunine core normale. Cette bande devient de plus en plus importante proportionnellement à l'augmentation de la concentration en Mn^{2+} ajoutée dans le surnageant.

Un défaut lors du transfert a empêché l'interprétation des bandes UTI.

V. Discussion et perspectives

Tout d'abord, il est intéressant de s'attarder sur la démonstration d'un lien statistique entre concentrations protéiques et concentrations en Mn^{2+} ajouté dans le surnageant. En effet, nous avons montré à l'aide des dosages protéiques qu'il existait une relation linéaire et directement proportionnelle entre ces deux facteurs. Deux hypothèses peuvent alors être évoquées :

- Le Mn^{2+} est inducteur de mortalité cellulaire. Les protéines libérées lors de la lyse cellulaire toxique se sont retrouvées dans les surnageants, augmentant la concentration protéique totale.
- Le Mn^{2+} augmente la synthèse des protéines par son action de cofacteur de nombreuses enzymes du métabolisme.

Ces deux hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives. Néanmoins, la toxicité du Mn^{2+} à forte concentration sur les cellules et en particulier les hépatocytes a déjà été démontrée lors de travaux de recherche antérieurs (18). De plus, dans les lysats, la concentration en protéines n'était pas statistiquement corrélée à celle du Mn^{2+} ajouté dans le surnageant. Donc les concentrations protéiques augmentées dans les surnageants paraissent provenir d'une lyse plutôt que d'une synthèse accrue qu'on aurait retrouvée dans les lysats. La première hypothèse semble donc prévaloir ici.

Cette donnée est importante, puisqu'elle constitue un facteur limitant pour la construction d'un modèle *in-vitro* de TMEM165-CDG. Il n'est en effet pas possible dans ce cas de saturer au-delà d'une certaine concentration le surnageant en Mn^{2+} au risque d'induire une lyse complète des cellules en culture.

Cette donnée présente un second intérêt, au regard des résultats quantitatifs obtenus par Western blot.

En effet, nous avons constaté lors des différents Western blots révélant la bikunine dans les surnageants que l'augmentation de la concentration en Mn^{2+} ajouté dans le surnageant induisait une diminution de la quantité de bikunine synthétisée, comme en témoigne la diminution de l'intensité des bandes pour une même quantité de protéines déposée dans chaque puits.

Donc, en augmentant les concentrations en Mn^{2+} ajouté dans le surnageant, les concentrations en protéines totales et en bikunine évoluent en sens inverse. Cette dichotomie renforce l'hypothèse d'une forte diminution de la synthèse de bikunine par le Mn^{2+} dans les cellules HepG2 et HuH7.

Cette relation montrée *in-vitro* rappelle les résultats observés *in-vivo* chez les patients TMEM165-CDG, qui ont également une concentration de bikunine circulante diminuée. Cette anomalie est caractéristique de TMEM165-CDG.

Cependant, bien que la diminution de synthèse de la bikunine soit probablement liée à une perturbation de sa maturation dans l'appareil de Golgi, on ne peut affirmer ici qu'elle soit directement due à un défaut d'expression de TMEM165 avec dysfonctionnement des enzymes Mn²⁺-dépendantes.

Cette hypothèse est néanmoins étayée par l'anomalie qualitative constatée par Western blot. On constate en effet l'accumulation d'une forme anormale de bikunine core de poids moléculaire légèrement plus élevé que la bikunine core normale, d'autant plus importante que la concentration en Mn²⁺ dans le surnageant est élevée. Cette anomalie est également présente chez les patients TMEM165-CDG, bien que non spécifique de cette mutation puisque retrouvée dans la plupart des linkeropathies.

Il faut rappeler que la bikunine core est une protéine qui peut servir de support à la greffe d'une chaîne CS, dont la synthèse commence par celle d'un tétrasaccharide dit « linker » (Figure 11) (17).

Étant donné l'intervention dans cette voie de synthèse de nombreuses enzymes dépendantes du Mn²⁺, on peut émettre l'hypothèse qu'une carence de Mn²⁺ dans l'appareil de Golgi (due au déficit d'entrée par dégradation excessive de TMEM165) provoque un blocage enzymatique au niveau d'étapes de la synthèse de la chaîne chondroïtine sulfate.

Ainsi, il y aurait sécrétion de formes anormales de bikunine core de masses légèrement plus lourdes que la bikunine core normale, et qui pourrait s'accompagner d'un déficit en formes lourdes porteuses de la chaîne chondroïtine sulfate. Ces formes anormales devront être étudiées plus en détail (spectrométrie de masse, électrophorèse bidimensionnelle...) afin de préciser les déficits enzymatiques associés à la dégradation de TMEM165 si celle-ci est démontrée.

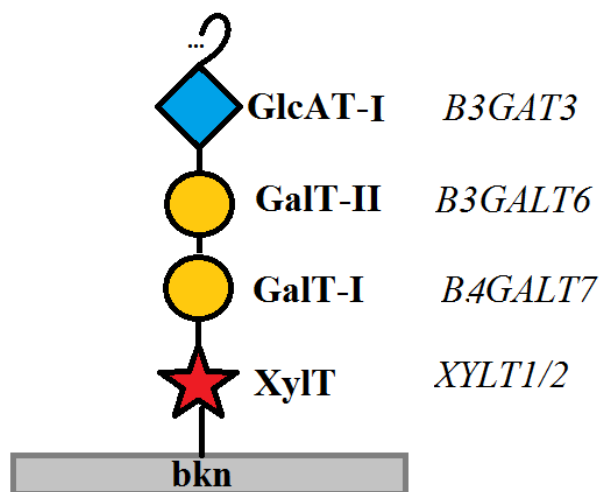


Figure 11 : Tétrasaccharide « linker » greffé à la bikunine.

En gras les noms des sucres, en italique les noms des enzymes.

On peut aussi évoquer d'éventuelles anomalies de la N-glycosylation sur la bikunine core, bien que la multiplicité des enzymes impliquées dans cette voie et leur moindre dépendance au Mn²⁺ comme cofacteur strict pourrait limiter ces effets.

Ces résultats permettent donc de corroborer l'hypothèse que nous avons réussi à recréer *in-vitro*, grâce à l'ajout de Mn²⁺ dans le surnageant, des conditions biochimiques intracellulaires proches de celles observées chez un patient TMEM165-CDG. Par ailleurs, on notera que ce modèle est intéressant aux temps d'étude 48h et surtout 72h, la synthèse de la bikunine étant insuffisante à 24h pour permettre des interprétations intéressantes en Western blot.

Cependant, de nombreuses études complémentaires restent à mener pour confirmer la réalité de cette hypothèse.

Il conviendrait de confirmer qu'il y a bien eu dégradation de TMEM165 induite par le Mn²⁺, par exemple à l'aide d'un Western blot dirigé contre cette protéine.

Il faudrait également étudier les profils de migration des protéines utilisées classiquement dans le dépistage des CDG : marqueurs de la N-glycosylation (transferrine) et de la O-glycosylation (apoC-III), pour comparer les profils obtenus à ceux observés classiquement dans TMEM165-CDG.

Nous pourrions également approfondir l'étude des effets du stress cellulaire induits par le Mn²⁺ : nous avons en effet émis l'hypothèse d'une mortalité cellulaire dose-dépendante, qu'il faudrait confirmer par des comptages cellulaires aux différentes durées d'incubation. Il conviendrait aussi d'étudier les effets du Mn²⁺ sur l'autophagie, le stress oxydatif... Autant de résultats qui seraient utiles pour affiner la mise au point d'un modèle *in-vitro* TMEM165-CDG-like.

VI. Conclusions

Les CDG sont un groupe de maladies hétérogènes dans leurs mécanismes moléculaires, leurs conséquences sur le métabolisme des sucres et leurs manifestations cliniques. L'intérêt qu'ils rencontrent va croissant, avec la multiplication des patients CDG identifiés par l'étude des biomarqueurs circulants de la glycosylation.

Cependant, ces maladies restent toujours fondamentalement incomprises, d'où la motivation à créer de nouveaux modèles *in-vitro* permettant de les étudier dans le détail.

Notre travail a consisté à essayer de reproduire de manière originale les conséquences métaboliques de la mutation TMEM165-CDG *in-vitro*. En effet, en obtenant des conditions biochimiques similaires au sein de la cellule, on pourrait alors en étudier plus précisément les conséquences moléculaires par études enzymatiques, spectrométrie de masse...

Nous avons choisi de recourir pour cela au Mn²⁺, élément peu coûteux et facile d'utilisation, garantissant une bonne reproductibilité des manipulations.

Nous avons montré qu'en ajoutant de fortes concentrations de Mn²⁺ dans le milieu de culture de cellules hépatiques, le profil en Western blot de la bikunine, protéoglycane étudié comme biomarqueur des CDG, était similaire à celui observé *in-vivo* chez les patients TMEM165-CDG, corroborant l'idée que nous avons pu parvenir à reproduire des conditions biochimiques similaires *in-vitro*.

Par la suite, si d'autres études permettaient de vérifier cette hypothèse, ce modèle pourrait être utilisé pour la compréhension fine de TMEM165-CDG et, à terme, servir à la recherche d'un traitement pour une maladie à ce jour incurable.

VII. Références bibliographiques

- (1) Ly M, Leach FE, Laremore TN, Toida T, Amster IJ, Linhardt RJ. The proteoglycan bikunin has a defined sequence. *Nat Chem Biol.* 2011;7(11):827-33.
- (2) Enghild JJ, Thøgersen IB, Pizzo SV, Salvesen G. Analysis of inter-alpha-trypsin inhibitor and a novel trypsin inhibitor, pre-alpha-trypsin inhibitor, from human plasma. Polypeptide chain stoichiometry and assembly by glycan. *J Biol Chem.* 1989;264(27):15975-81.
- (3) Thøgersen IB, Enghild JJ. Biosynthesis of bikunin proteins in the human carcinoma cell line HepG2 and in primary human hepatocytes. Polypeptide assembly by glycosaminoglycan. *J Biol Chem.* 1995;270(31):18700-9.
- (4) Tyagi S, Salier JP, Lal SK. The liver-specific human alpha(1)-microglobulin/bikunin precursor (AMBP) is capable of self-association. *Arch Biochem Biophys.* 2002;399(1):66-72.
- (5) Szántó S, Bárdos T, Gál I, Glant TT, Mikecz K. Enhanced neutrophil extravasation and rapid progression of proteoglycan-induced arthritis in TSG-6-knockout mice. *Arthritis Rheum.* 2004;50(9):3012-22.
- (6) Lauer ME, Glant TT, Mikecz K, et al. Irreversible heavy chain transfer to hyaluronan oligosaccharides by tumor necrosis factor-stimulated gene-6. *J Biol Chem.* 2013;288(1):205-14.
- (7) Jaeken J, Matthijs G. Congenital disorders of glycosylation. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2001;2:129-51.
- (8) Jaeken J, Péanne R. What is new in CDG?. *J Inherit Metab Dis.* 2017;40(4):569-586.
- (9) Jaeken J, Matthijs G. Congenital disorders of glycosylation: a rapidly expanding disease family

- (10) De Ionlay P, Seta N, Barrot S, et al. A broad spectrum of clinical presentations in congenital disorders of glycosylation I: a series of 26 cases. *J Med Genet.* 2001;38(1):14-9.
- (11) Anders Helander, Jonas Bergström, Hudson H Freeze, Testing for Congenital Disorders of Glycosylation by HPLC Measurement of Serum Transferrin Glycoforms, *Clinical Chemistry*, Volume 50, Issue 5, 1 May 2004, Pages 954–958.
- (12) Foulquier F, Amyere M, Jaeken J, et al. TMEM165 deficiency causes a congenital disorder of glycosylation. *Am J Hum Genet.* 2012;91(1):15-26.
- (13) Stribny J, Thines L, Deschamps A, Goffin P, Morsomme P. The human Golgi protein TMEM165 transports calcium and manganese in yeast and bacterial cells. *J Biol Chem.* 2020;295(12):3865-3874.
- (14) Elodie Lebretonchel, Marine Houdou, Sven Potelle, Geoffroy de Bettignies, Céline Schulz, et al.. Dissection of TMEM165 function in Golgi glycosylation and its Mn²⁺ sensitivity. *Biochimie*, Elsevier, 2019, 165, pp.123-130.
- (15) Haouari W, et al. La bikunine : un biomarqueur circulant des troubles innés et acquis de l'appareil de Golgi ?, Université Bordeaux Segalen, Bordeaux.
- (16) Potelle S, Dulary E, Climer L, et al. Manganese-induced turnover of TMEM165. *Biochem J.* 2017;474(9):1481-1493.
- (17) Mikami T, Kitagawa H. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(10):4719-33.
- (18) Rovetta F, Catalani S, Steimberg N, Boniotti J, et al. Organ-specific manganese toxicity: a comparative in vitro study on five cellular models exposed to MnCl₂. *Toxicology in Vitro.* 2007;21(2):284-292.