

KAPLER Luca

PERSONNAZ Carla

***Impact de la variation du pH sur la glycosylation
de la bikunine et
Évaluation de l'antithrombine comme biomarqueur
potentiel des CDG***

Présentation dans le cadre du stage de recherche PHBMR

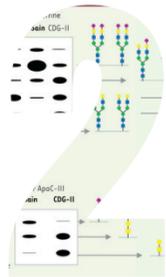
5A Pharmacie

28 mars 2025

Sommaire



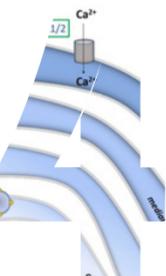
La glycosylation



Les désordres congénitaux de la glycosylation (CDG)



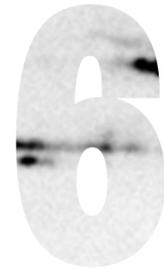
La bikunine



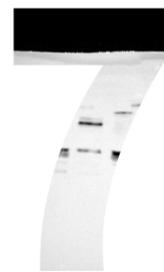
Homéostasie de l'appareil de Golgi et biosynthèse de la bikunine



L'Antithrombine



Antithrombine : biomarqueur des CDG ?



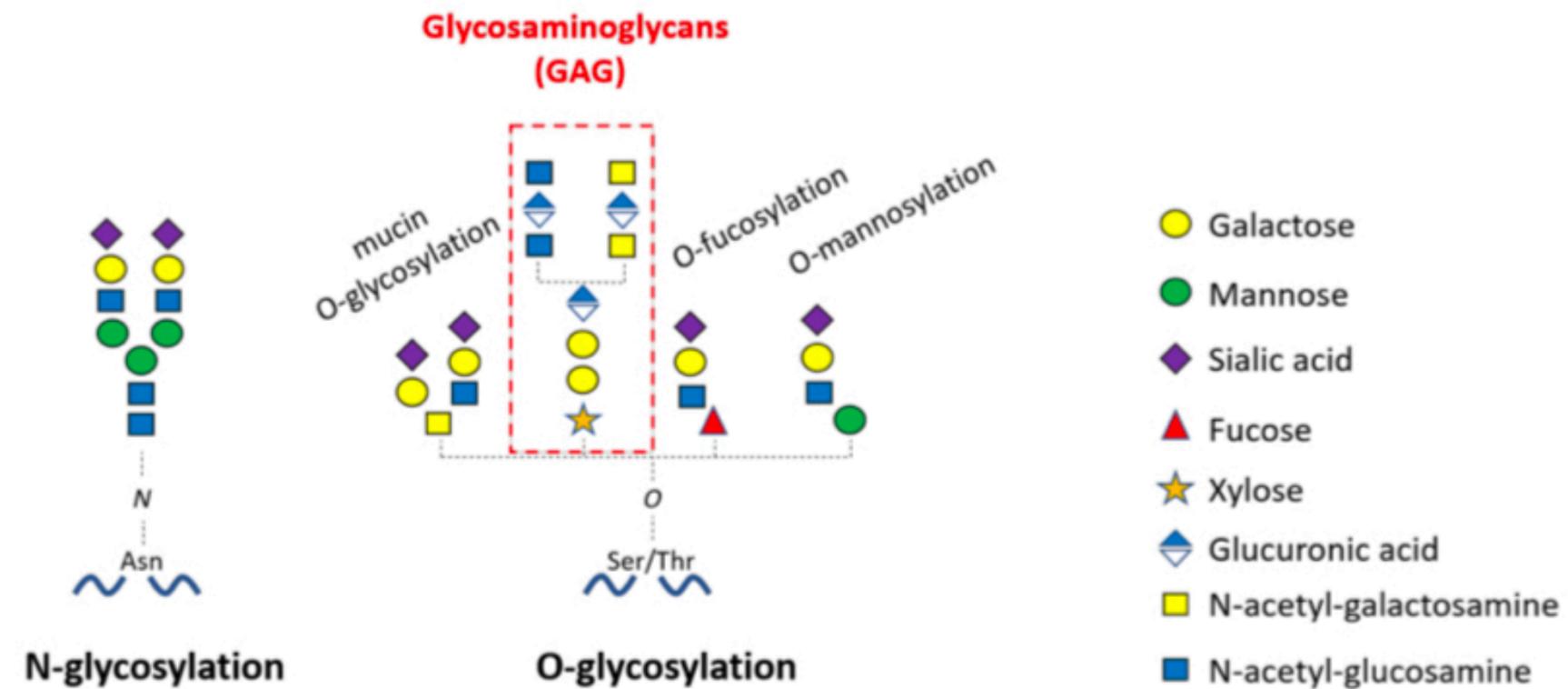
Conclusion

La glycosylation

Modification consistant en l'**ajout de monosaccharides** sur des protéines, lipides et ARN non codants.

Lieux : réticulum endoplasmique, appareil de Golgi

- **N-glycosylation** (Asparagine)
- **O-glycosylation** (Sérine ou thréonine)
- ➔ **GAG** (Glycosaminoglycans)



Glycosaminoglycans

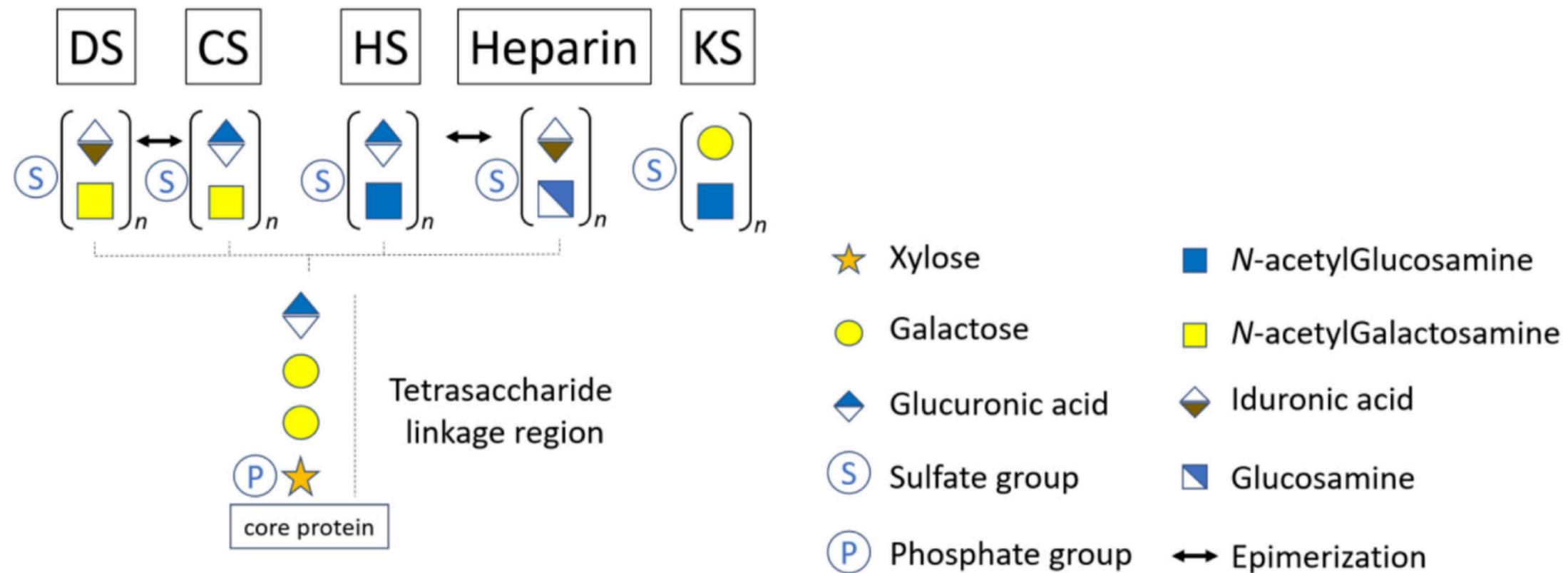


Figure 2: Glycosaminoglycan chain types and corresponding disaccharides

Rôle : **MEC, réponse inflammatoire, prolifération cellulaire**

Lieu : **Golgi**

Exemple : Chondroïtines-sulfate, dermatanes-sulfate, héparanes-sulfate, kératanes-sulfate...

CDG

Congenital Disorders of Glycosylation



Troubles congénitaux de la glycosylation

Majoritairement autosomiques récessives
Plus de 160 types



CDG de type 1

Perturbation N-glycosylation en **amont**
du transfert de l'oligosaccharide sur la
chaîne peptidique

Hétérogénéité clinique

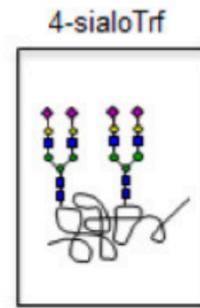
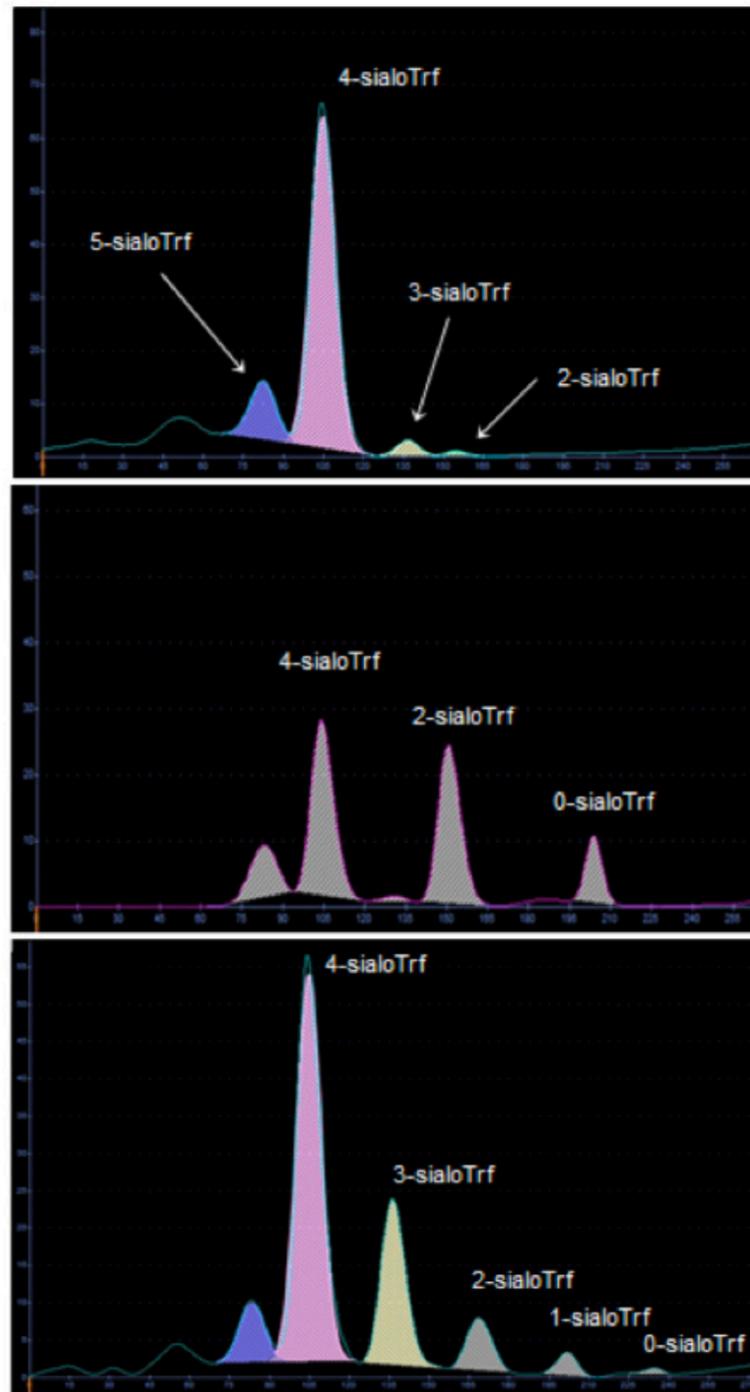
Atteintes neurologiques, retard psychomoteur,
signes hépato-digestifs (cytolyse, fibrose)...



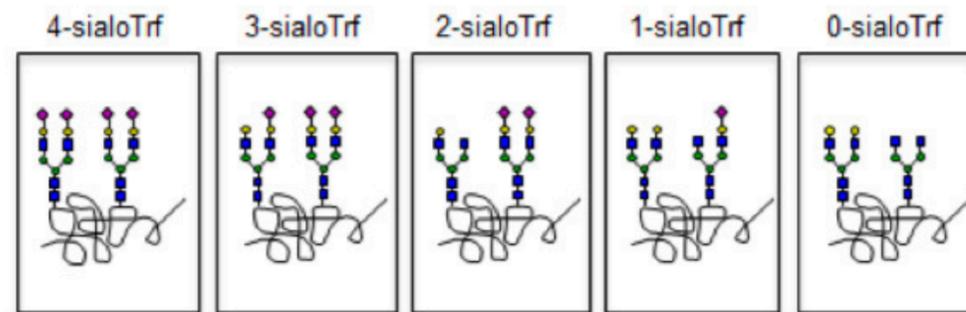
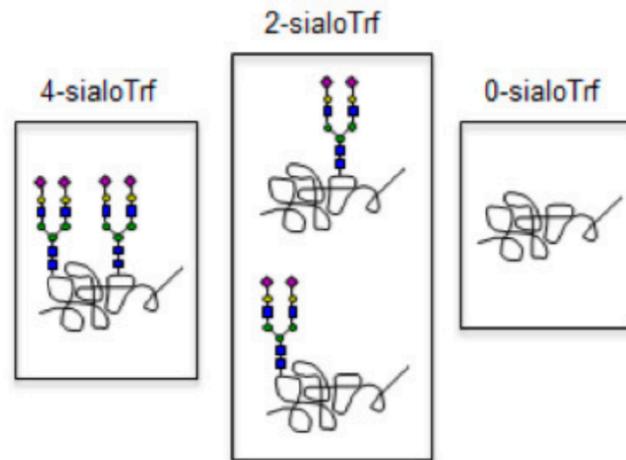
CDG de type 2

Perturbation N-glycosylation en **aval**
du transfert de l'oligosaccharide sur
la chaîne peptidique

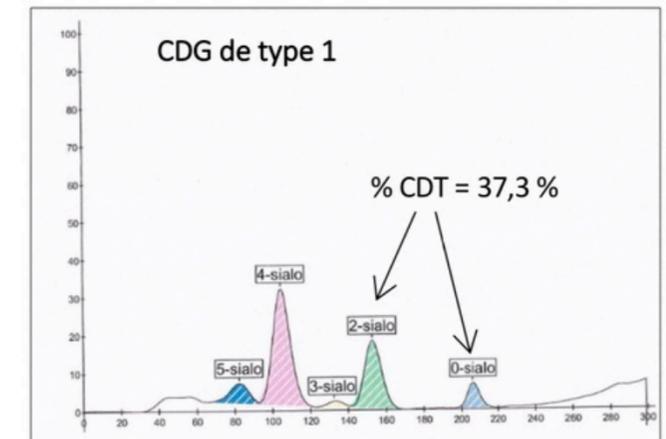
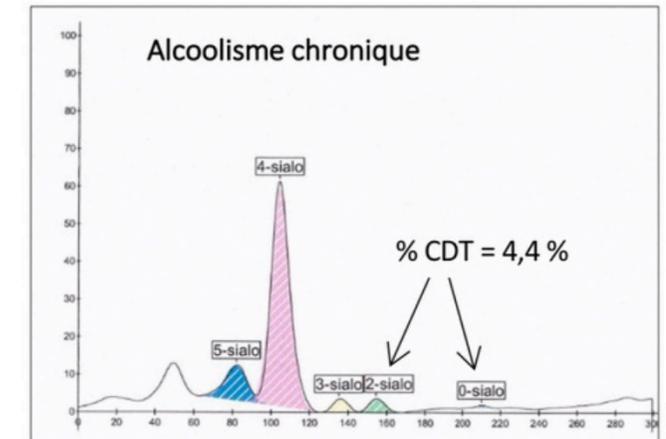
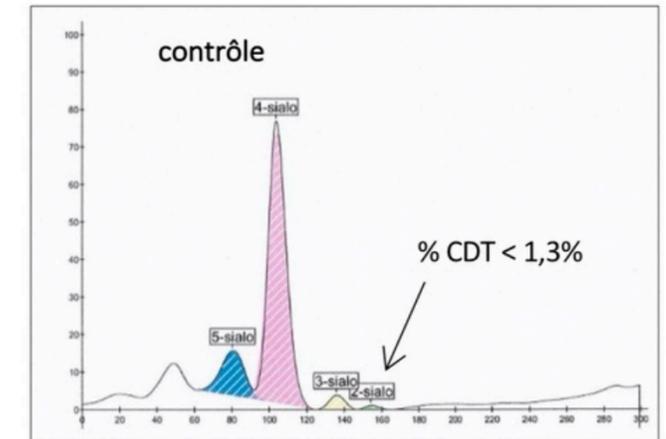
Types de CDG



Dépistage : étude de la sialylation de la transferrine par Western-Blot, électrophorèse capillaire et/ou isoélectrofocalisation (IEF)

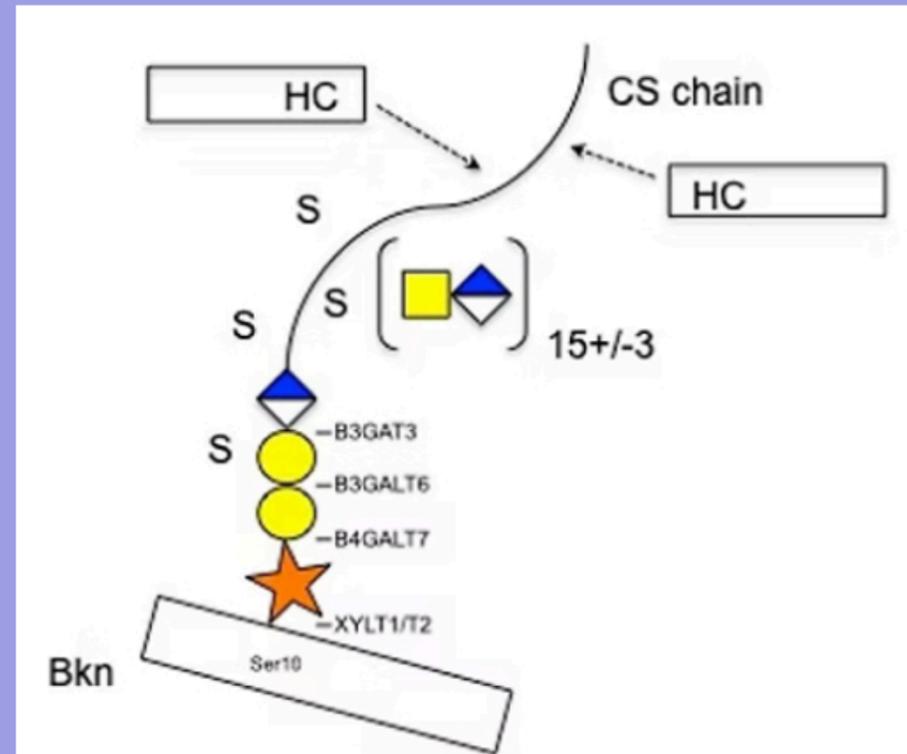


Dans le dépistage de l'alcoolisme chronique



Électrophorèse capillaire des isoformes de la transferrine

La bikunine



- ★ Xylose
- Galactose
- ◄ Glucuronic acid
- N-Acetylgalactosamine

Protéoglycane (PGP : protéine - GAG - Protéine) circulant

Lieu de synthèse : Foie

Structure :

- Protéine = bikunine
- O-xylosylation
- Chaîne GAG unique de type **chondroïtine sulfate** (CS)
- Estérification par une ou deux protéines HC



Biomarqueur des linkeropathies (synthèse du tétrasaccharide) et marqueur additionnel de certains autres CDG

L'homéostasie de l'appareil de Golgi

La biosynthèse des PG dépend de l'homéostasie de l'appareil de Golgi

- pH golgien
- Ca^{2+}
- Mn^{2+} : co-facteur des glycosyltransferases (galactosyltransférases)

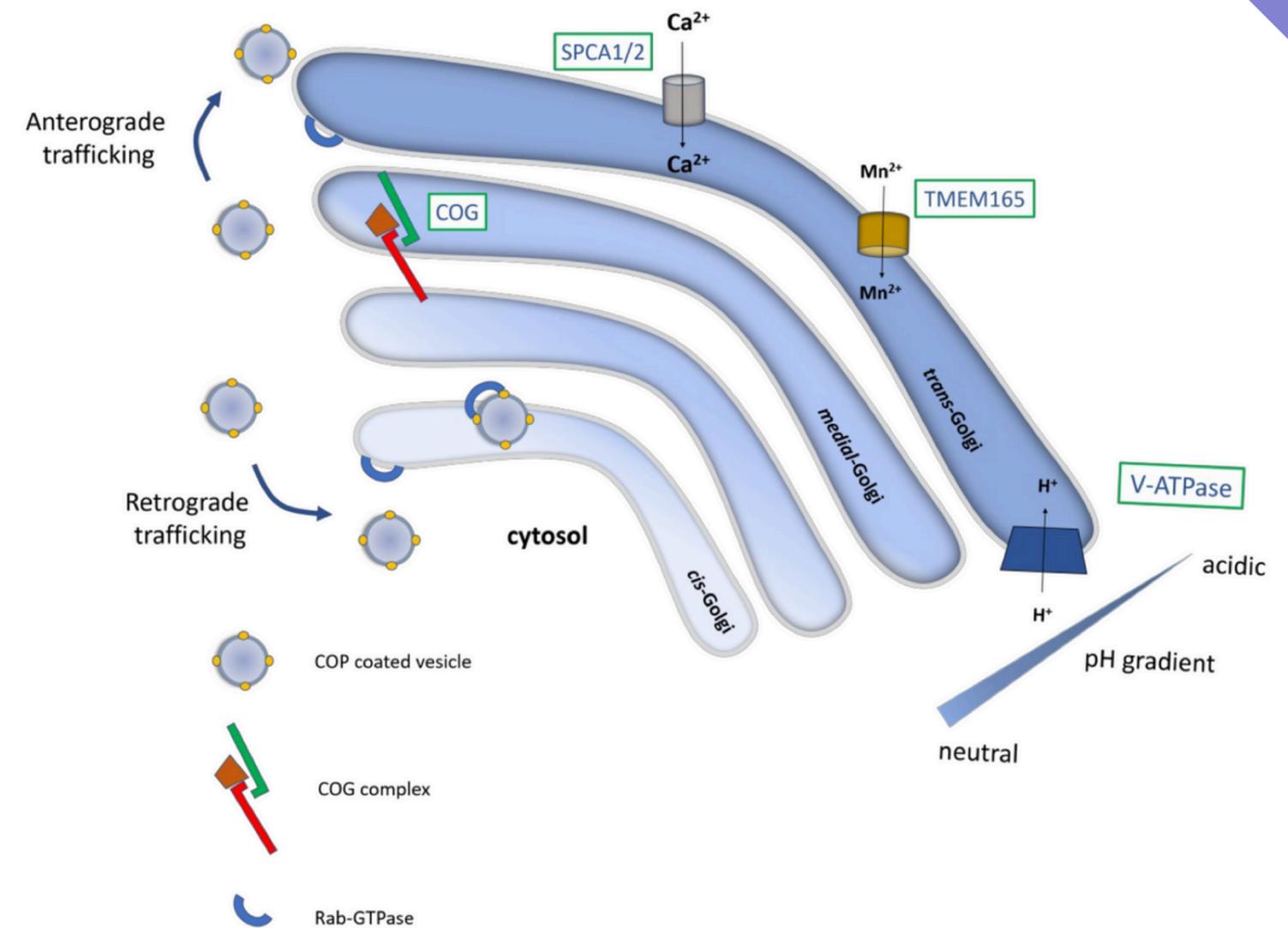
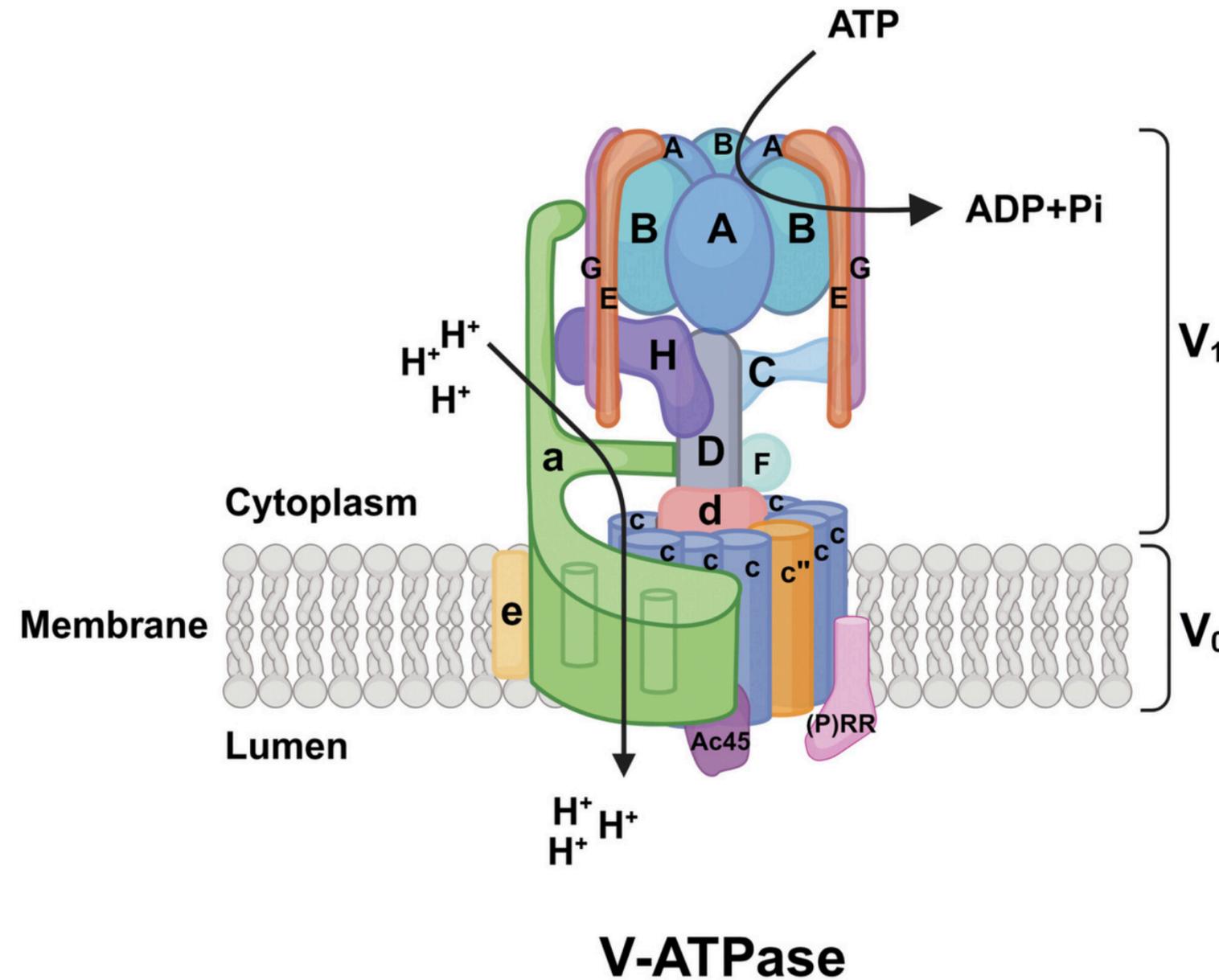


Figure 6: Molecular actors involved in Golgi homeostasis

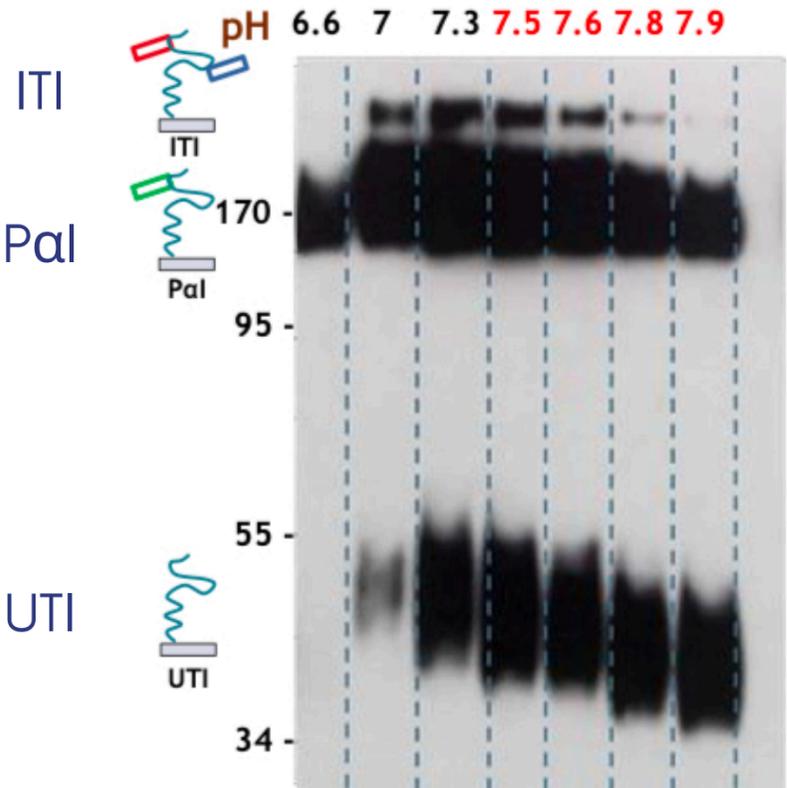
La pompe à protons



ATP6V0A2-CDG
ATP6AP2-CDG
ATP6AP1-CDG
CCDC115-CDG
TMEM199-CDG
ATP6V1F-CDG

Effet de la variation du pH golgien sur la synthèse de bikunine

Alcalinisation pH EXTRA CELLULAIRE (acidification de l'intra golgi ?)



(Ajout de concentrations croissantes de NaHCO₃)

➔ Diminution du poids moléculaire par acidification du pH golgien

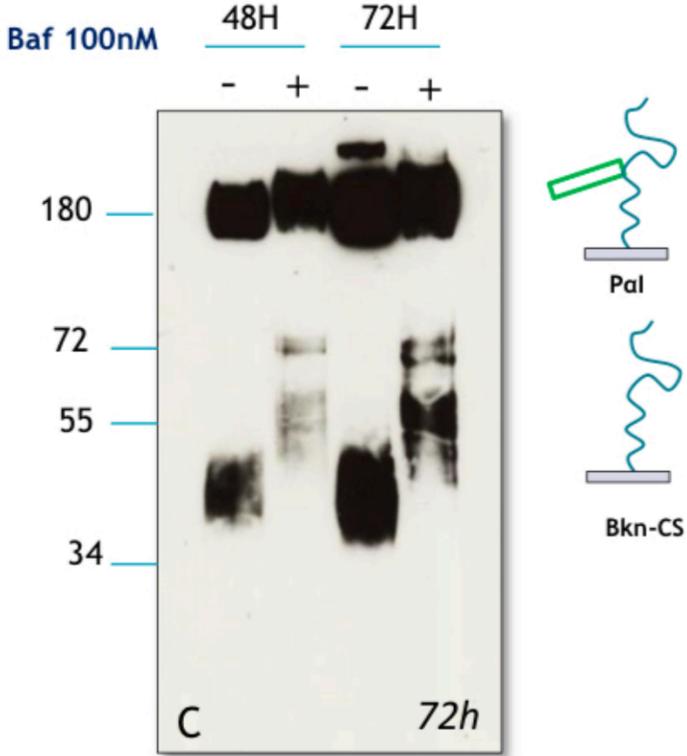
N=4

HepG2

Human hepatocellular carcinoma cells

Alcalinisation de l'intra GOLGI par traitement avec de la bafilomycine

HepG2 (cellular supernatant)

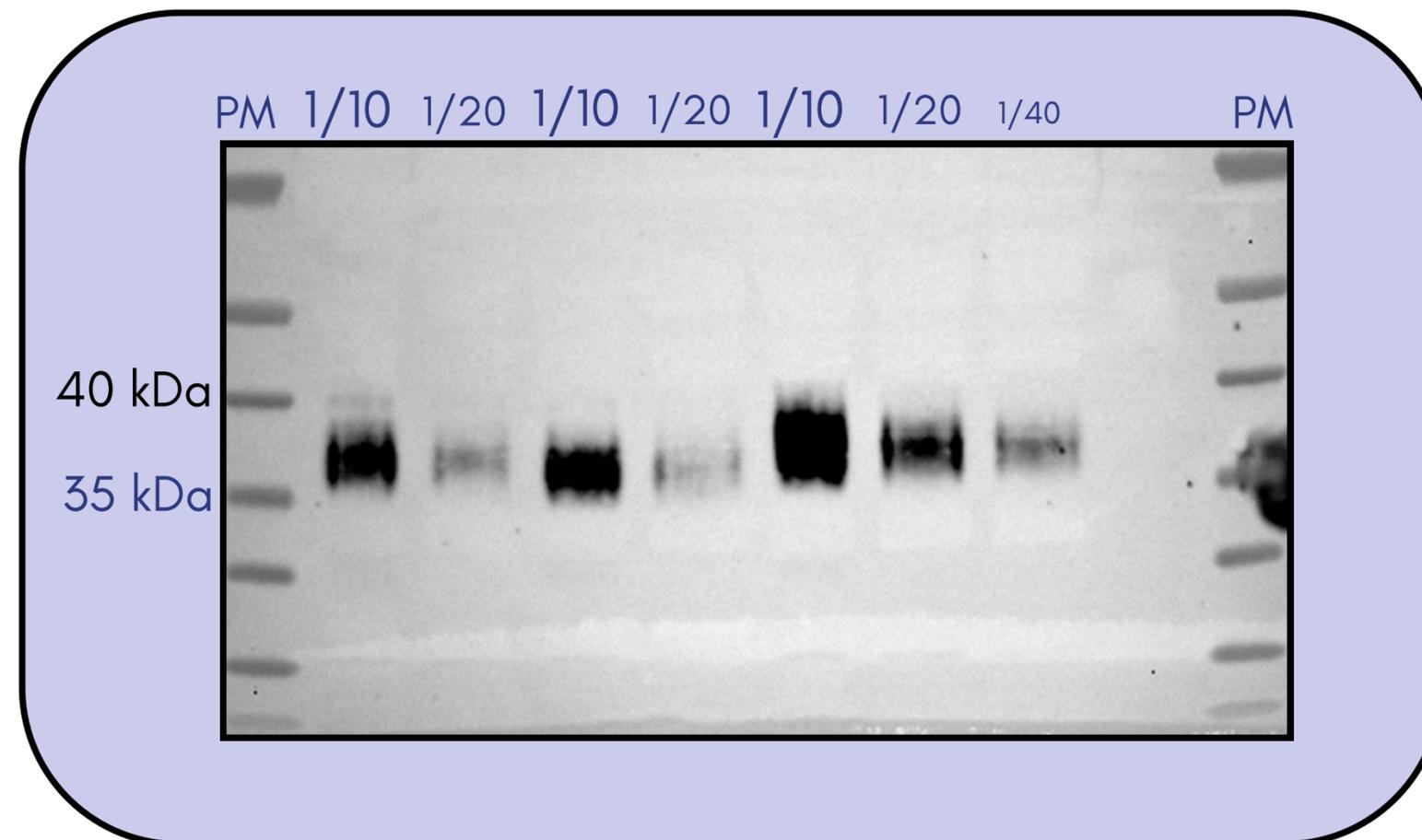


Bafilomycine :
• V-ATPase inhibiteur

➔ Augmentation du PM de la bikunine avec alcalinisation du pH golgien

Variation du PM de la bikunine

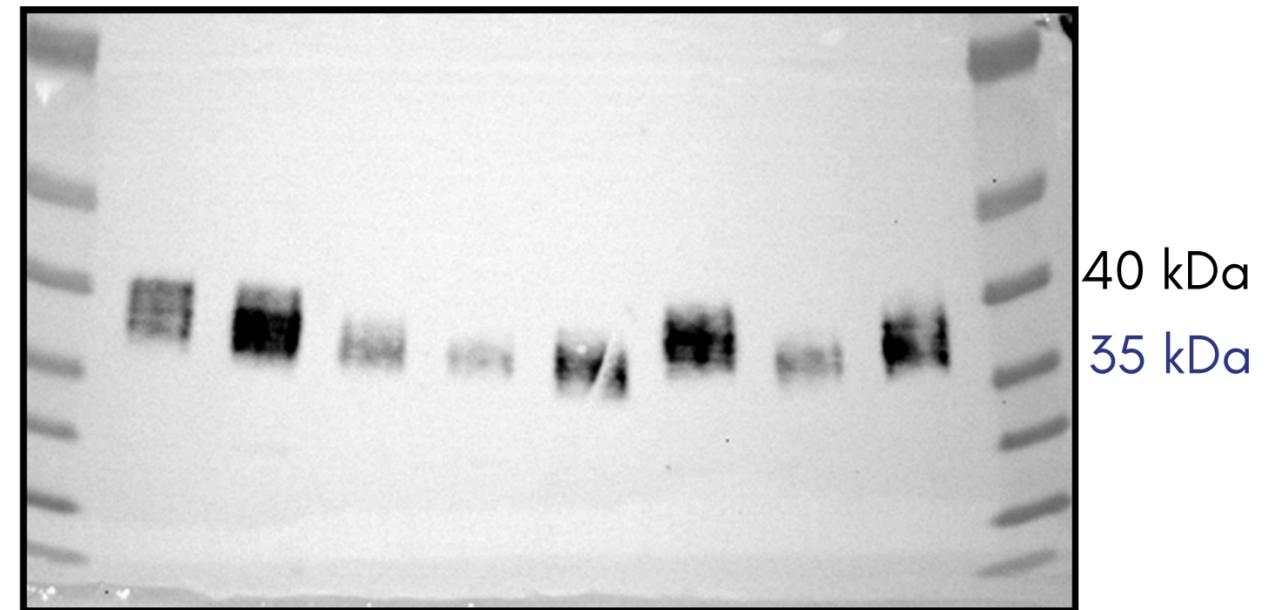
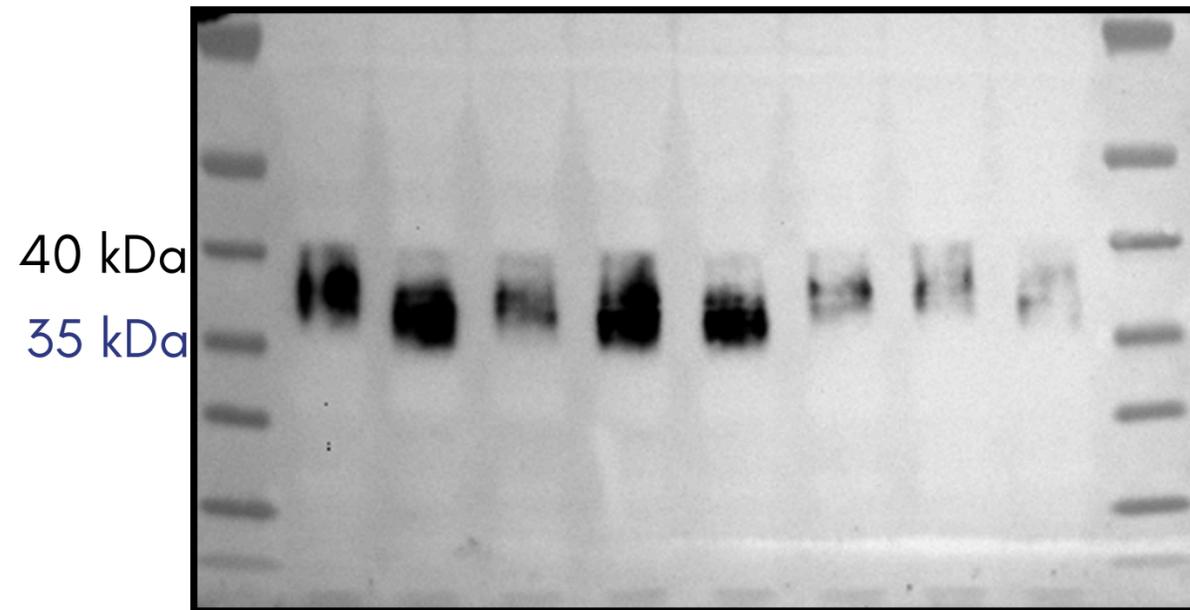
1. Réalisation d'un WB de 3 sérums de patients contrôles à différentes dilutions pour déterminer la dilution optimale



Étude du poids moléculaire de la bikunine

2. Détermination des PM de 19 contrôles pour obtenir un PM moyen des individus sains

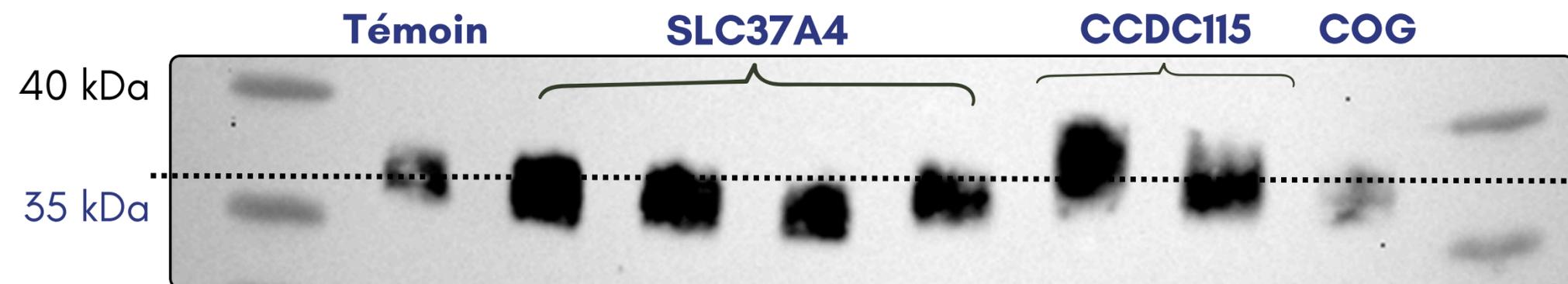
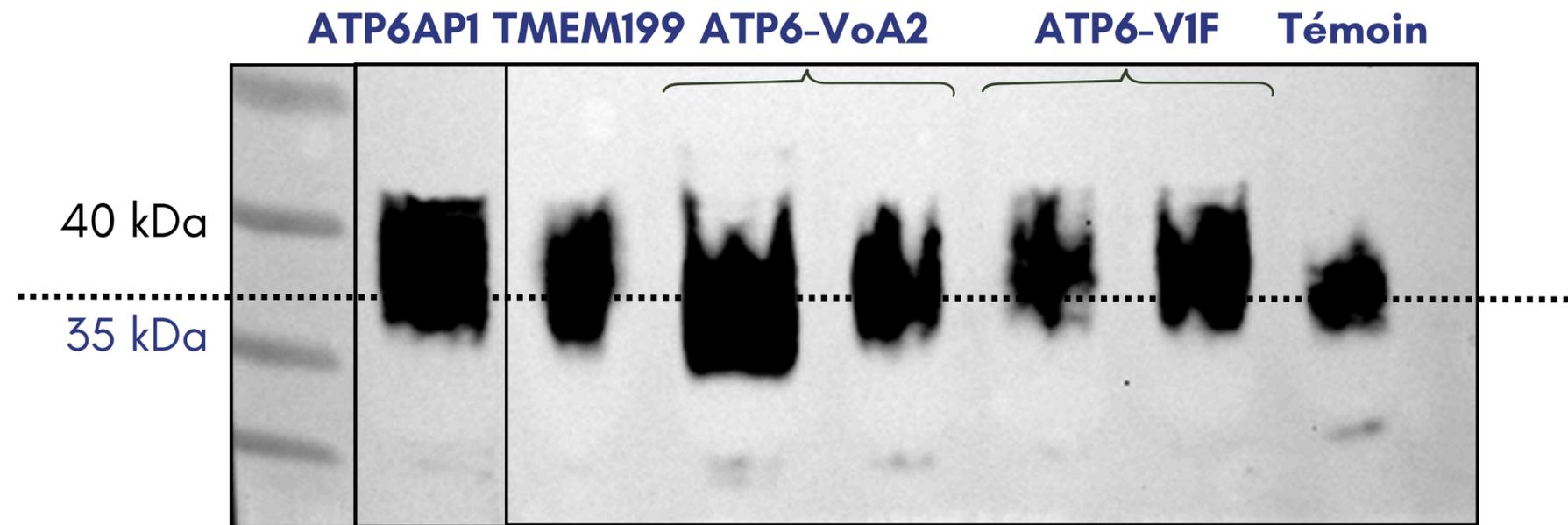
Dilution : 1/10



Moyenne (kDa)	Intervalle de confiance (kDa)
36,629	[36,611 ; 37,081]

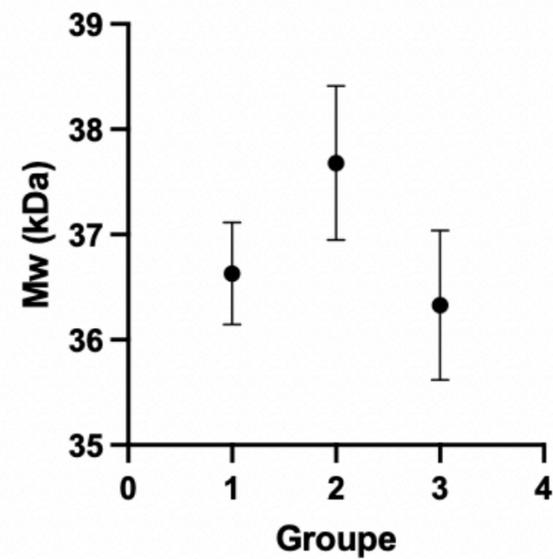
Étude du poids moléculaire de la bikunine

3. Chez les patients...



Résultats statistiques

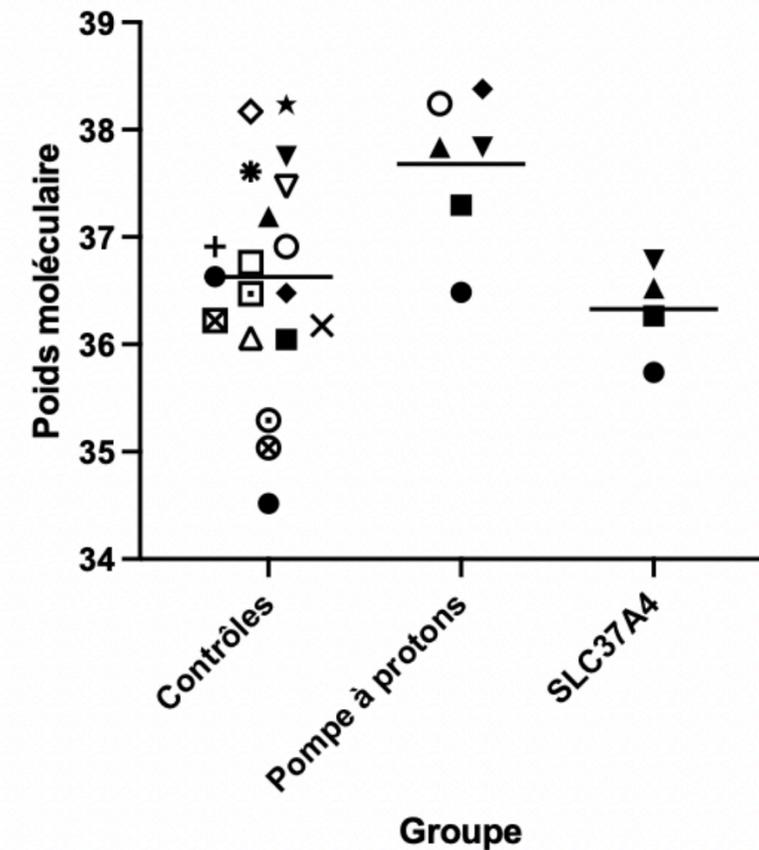
Row statistics of bikunine moyenne IC



Moyenne des PM avec IC pour chaque groupe

- 1 = Contrôles
- 2 = Pompe à protons
- 3 = SLC37A4

PM par groupe



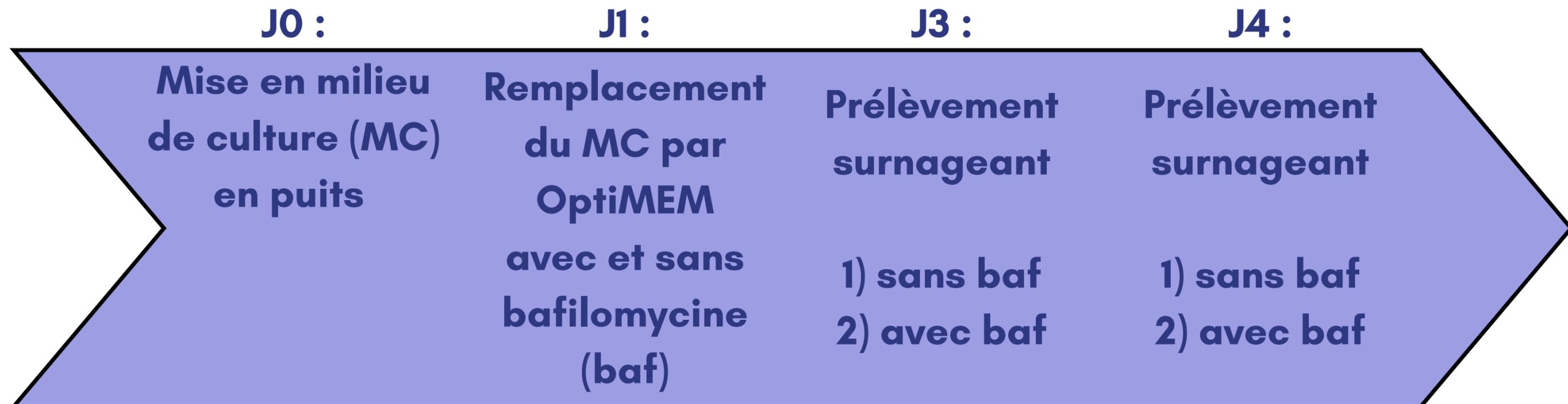
Distribution des PM de la bikunine sérique triés par groupe

Culture cellulaire des HepG2

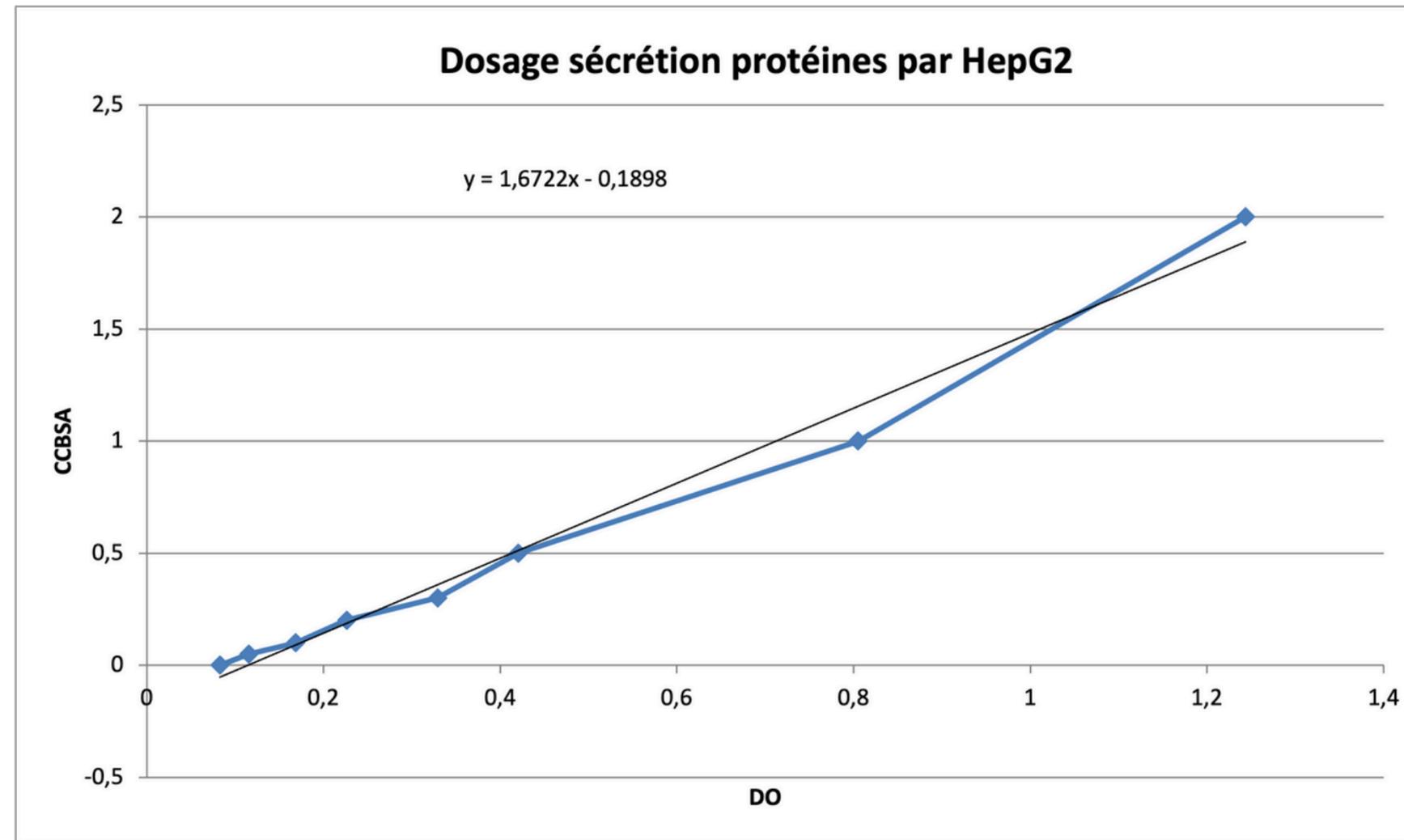
Lignée cellulaire d'hépatoblastome : cellules dérivées d'un carcinome hépatocellulaire humain

Utilisation : modèle in vitro pour les
hépatocytes humains.

Permet ici l'étude de la bikunine
sécrétée dans différentes conditions.



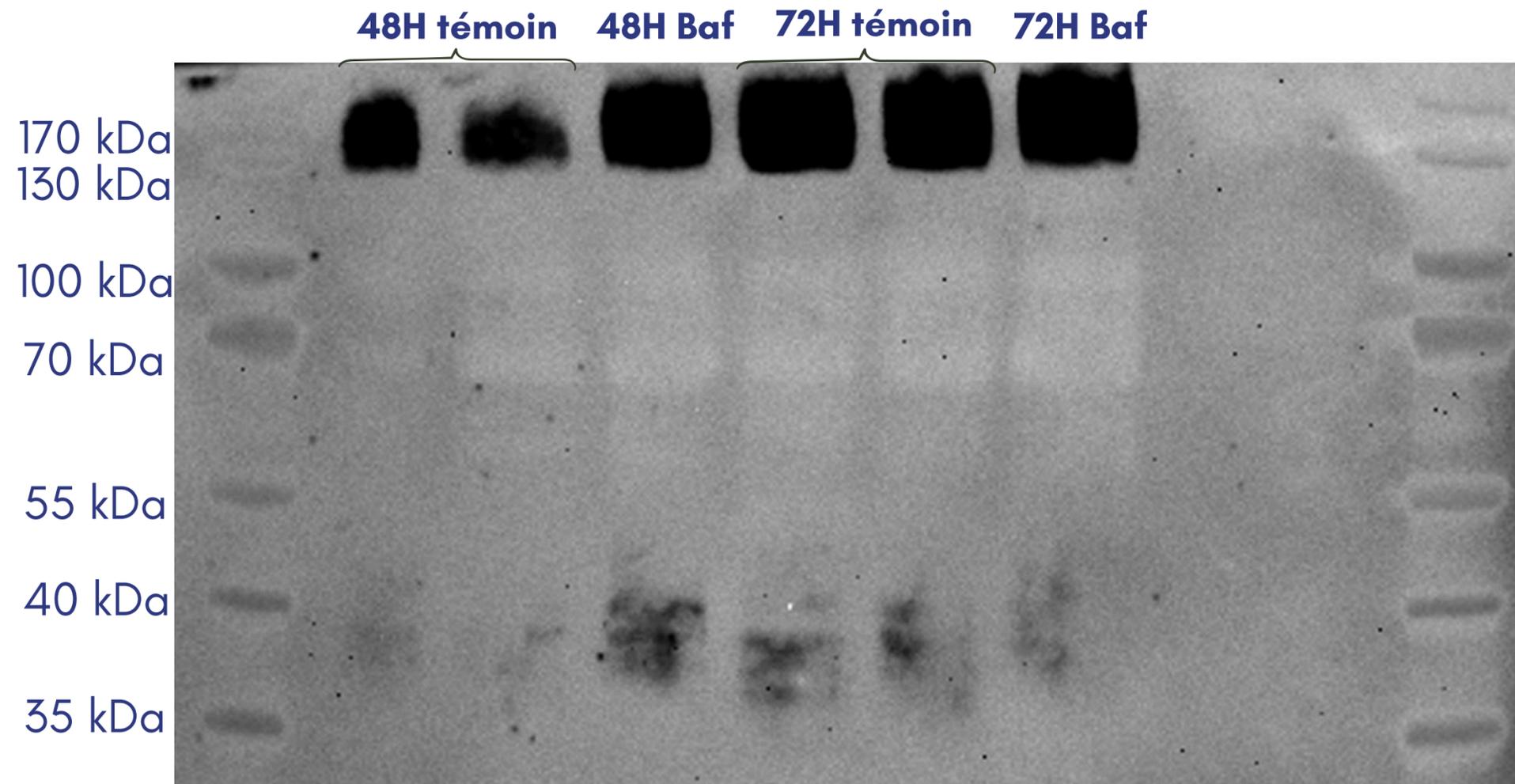
Dosage protéique des surnageants



Après spectrophotométrie, détermination de l'équation de la droite et calcul des concentrations en protéines de nos échantillons.
Puis, détermination des volumes à prélever pour déposer 10 μ g.

Expérience bafilomycine A1

Dépôt de 10µg de protéines par puits

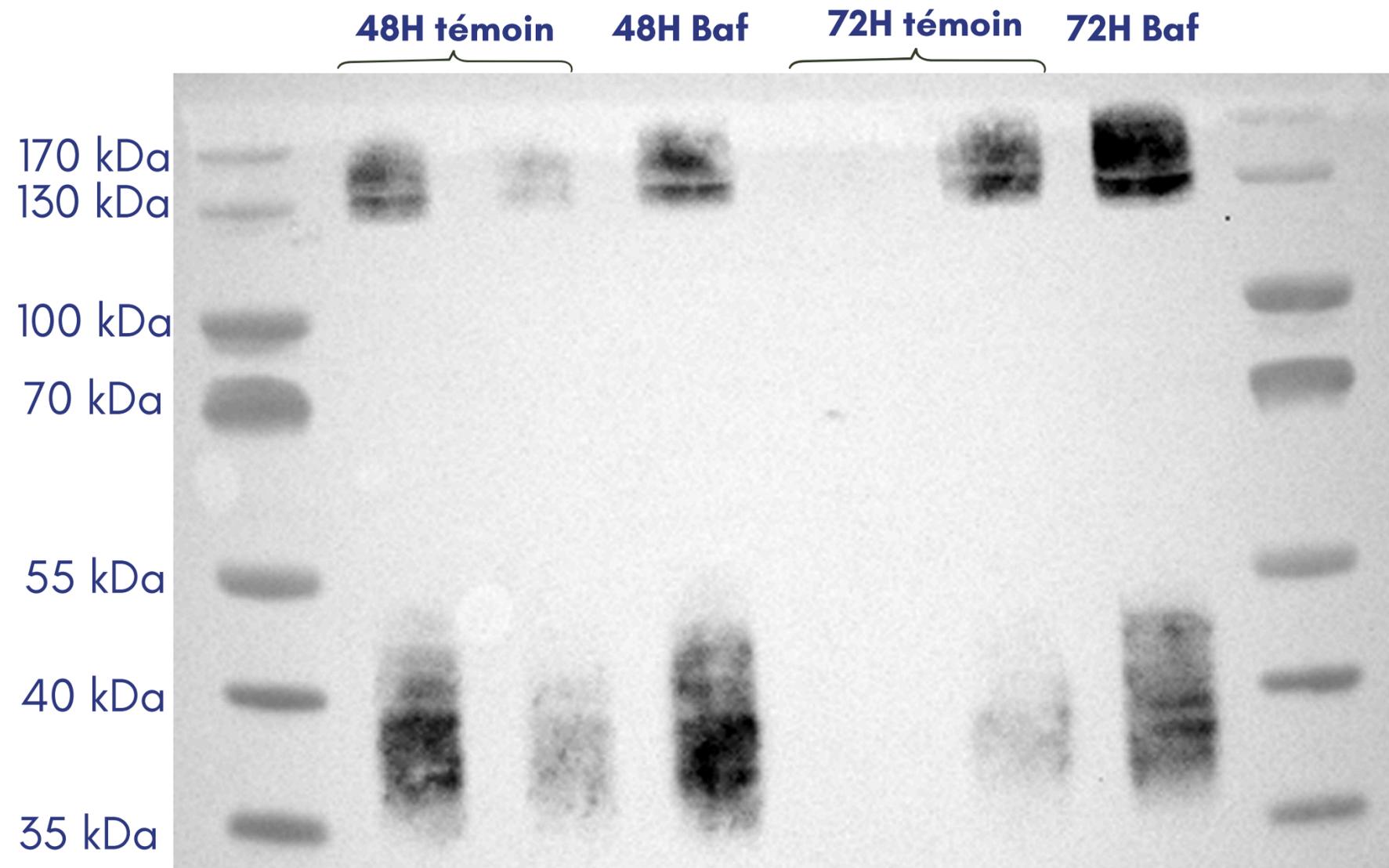


Baf = Bafilomycine A1

Western-Blot de la bikunine

Expérience bafilomycine A1

Dépôt de 50µg de protéines par puits



Western-Blot de la bikunine

Baf = Bafilomycine A1

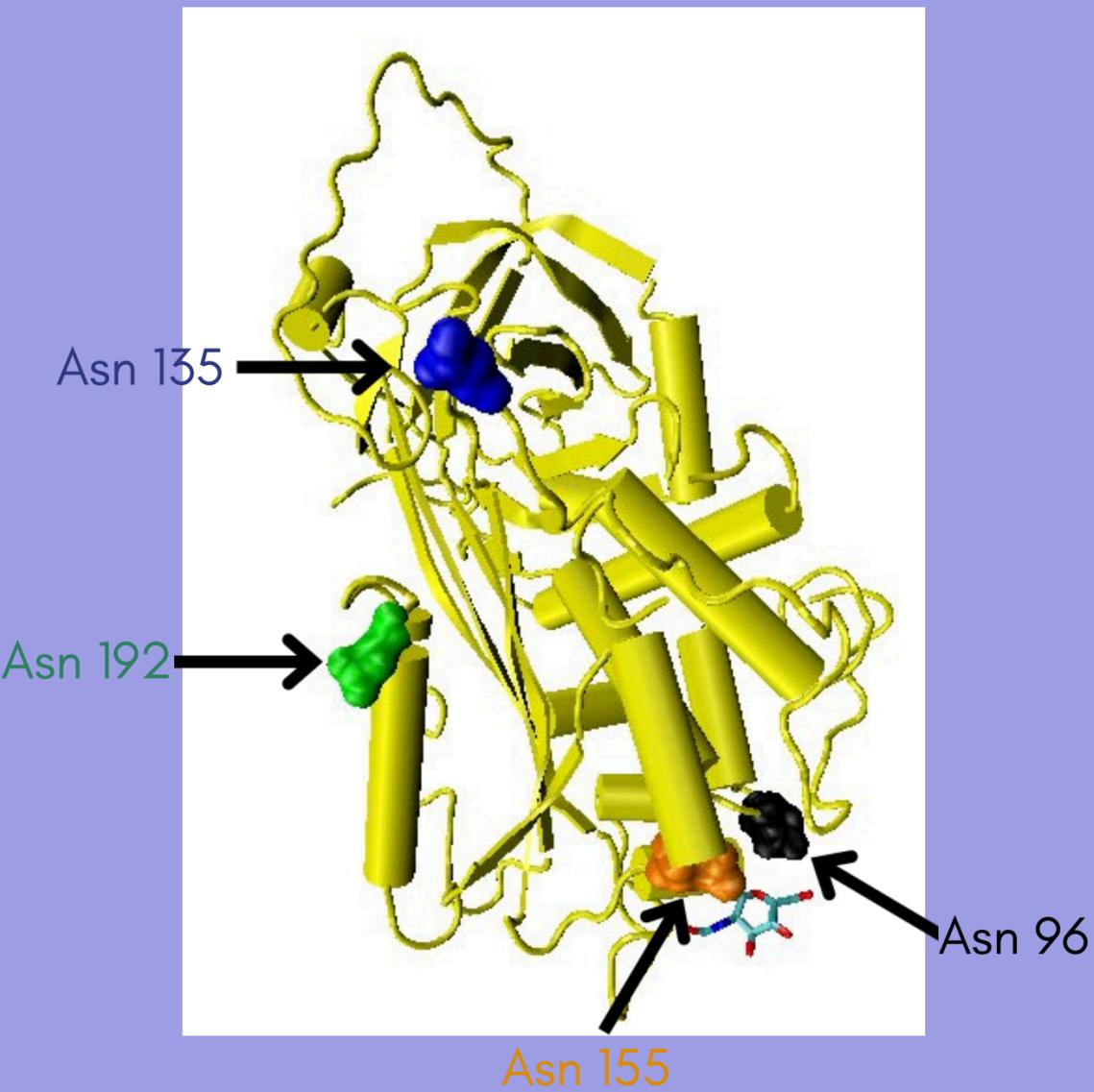
L'Antithrombine

Glycoprotéine circulante inhibitrice de la coagulation (inhibe la thrombine et les facteurs Xa, IXa et XIa)

Lieu de synthèse : Foie

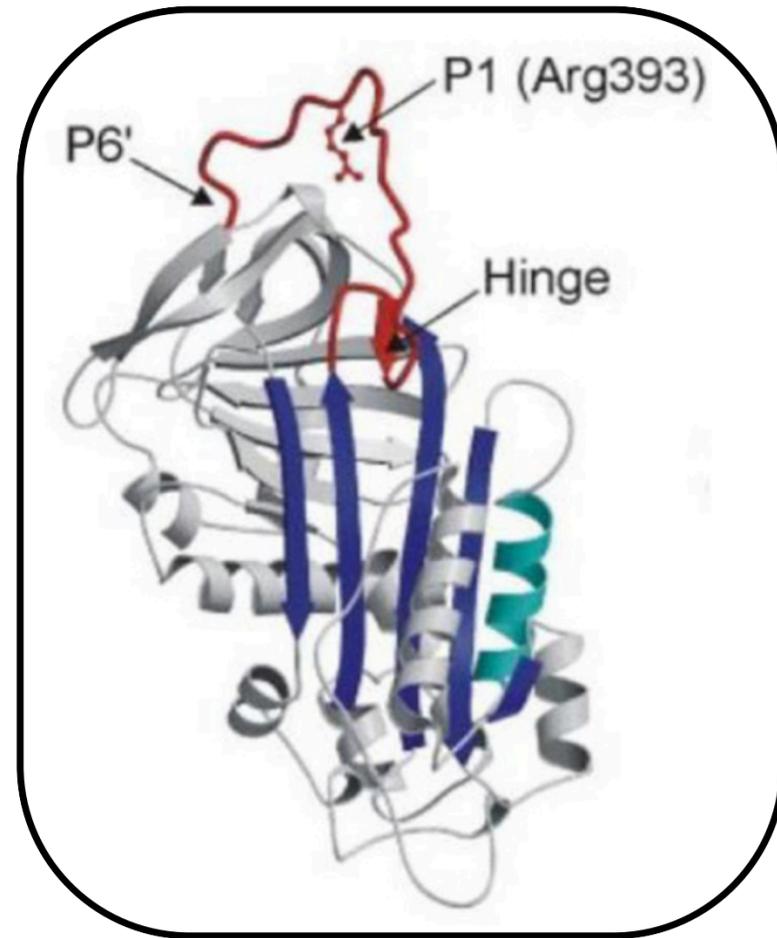
Structure :

- Monomère d'environ 58 kDa (432 acides aminés)
- 4 sites de N-glycosylations
- 3 formes (native, latente et clivée)
- 2 glycoformes : α et β (représentés à 90/10%), avec :
 - α : 4 sites occupés
 - β : 3 sites occupés (pas l'Asn 135)

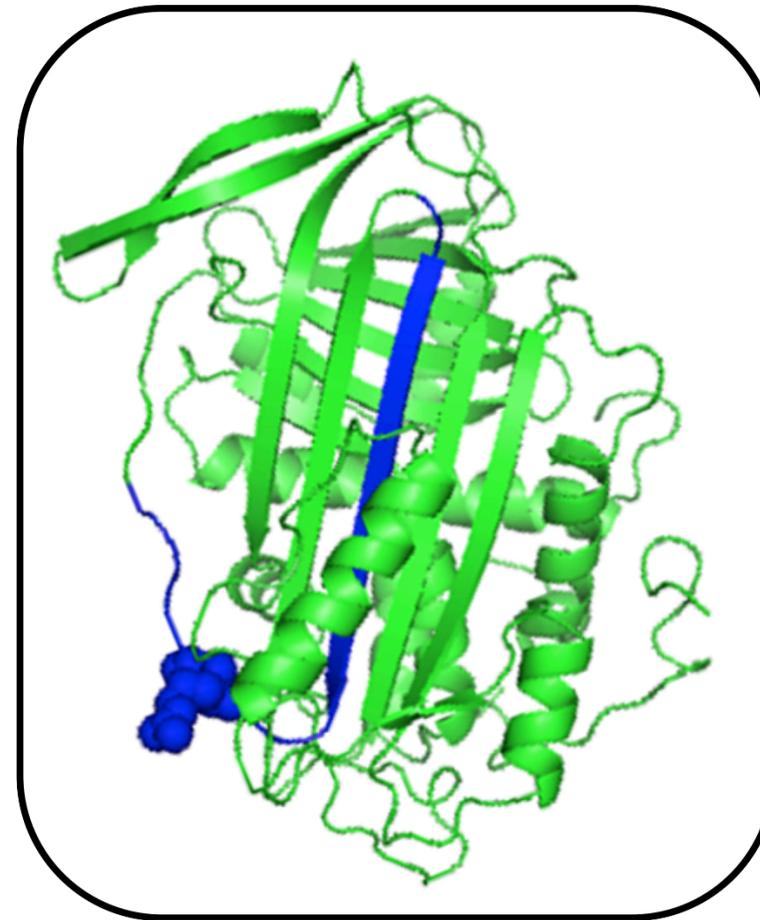


Potentiel marqueur des CDG de tous types, permettant de les différencier, avec une activité très souvent diminuée dans les CDG

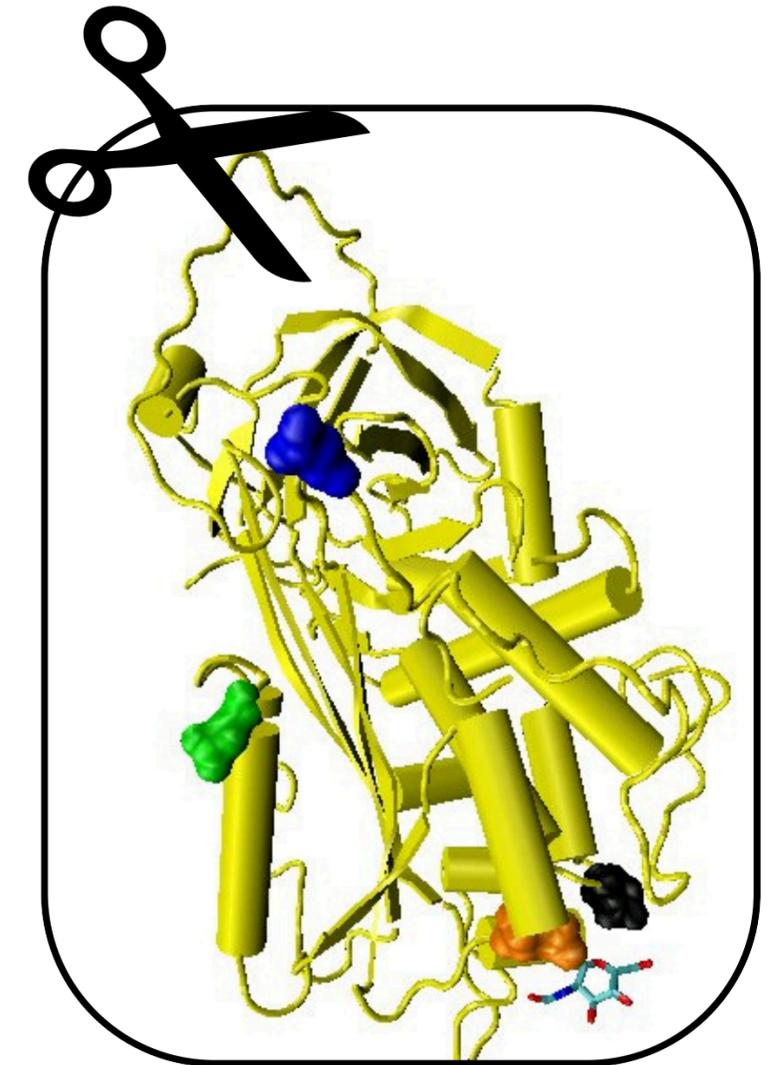
Antithrombine



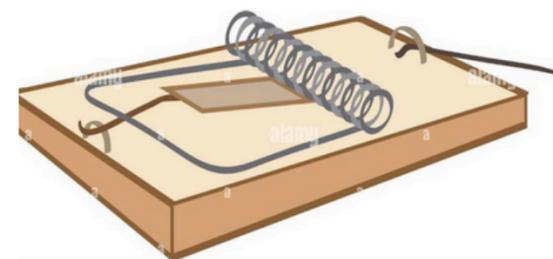
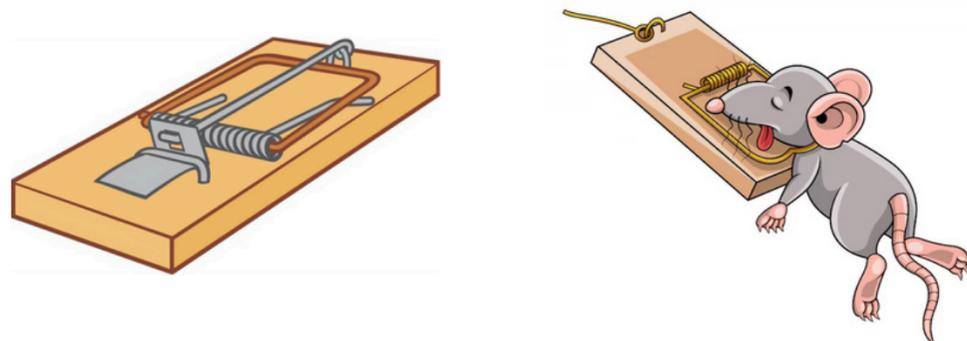
AT native
Forme tendue/stressée



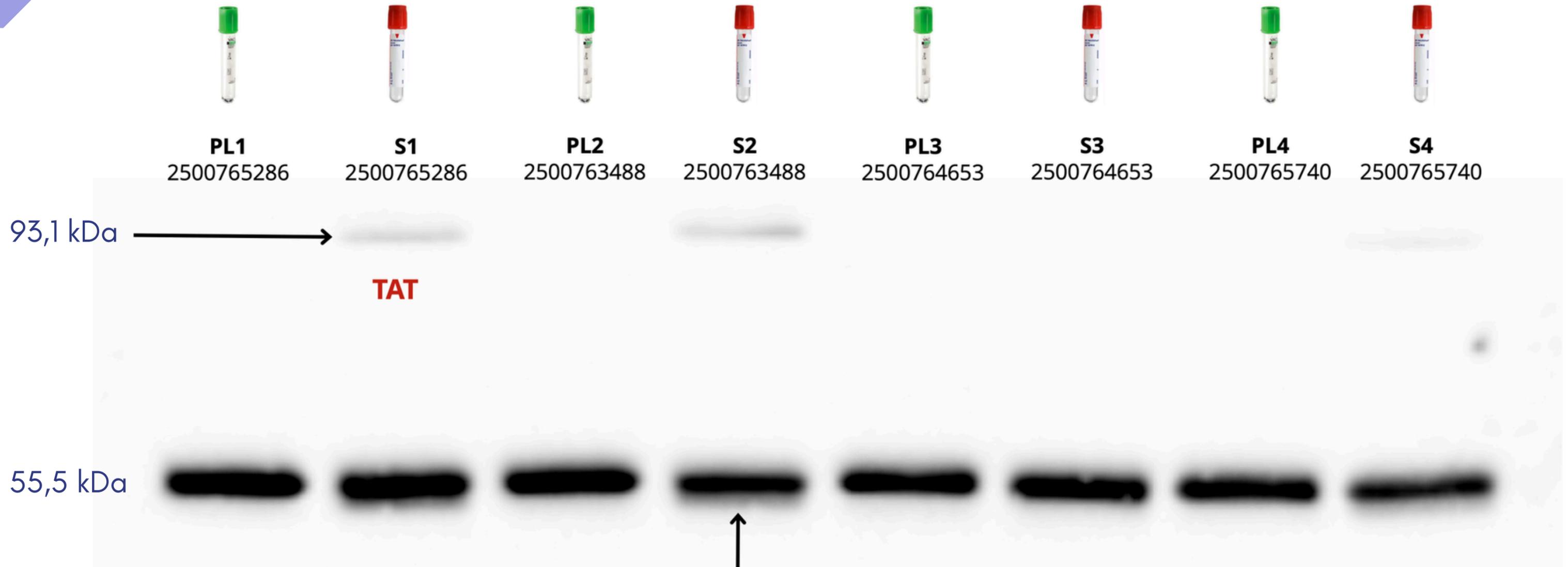
AT latente
Forme relâchée



AT clivée
Forme inactivée



Différence plasma/sérum



Masse moléculaire
Thrombine 37 kDa

Bande plus basse que plasma
Présence smear (ombre)

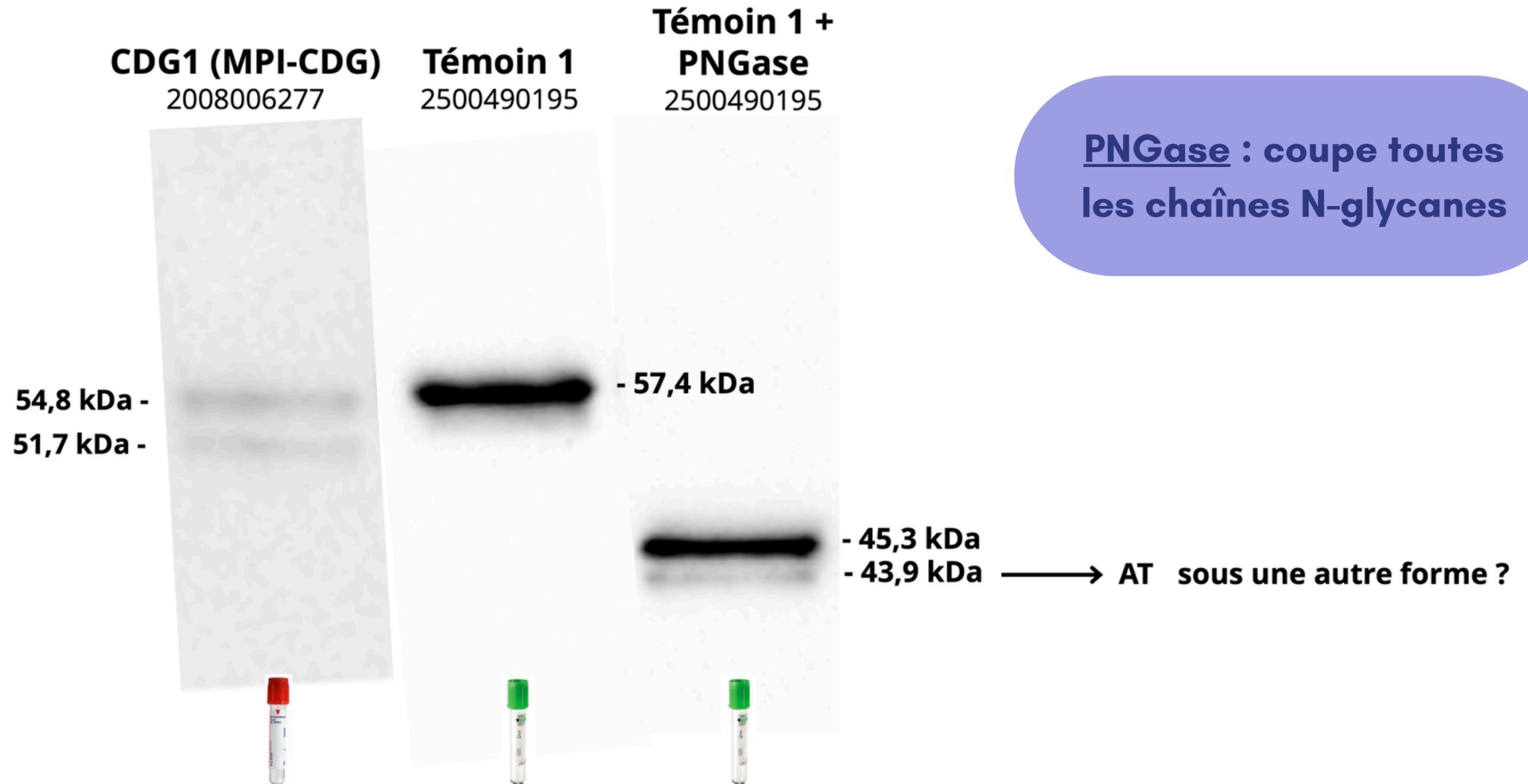


Sérum



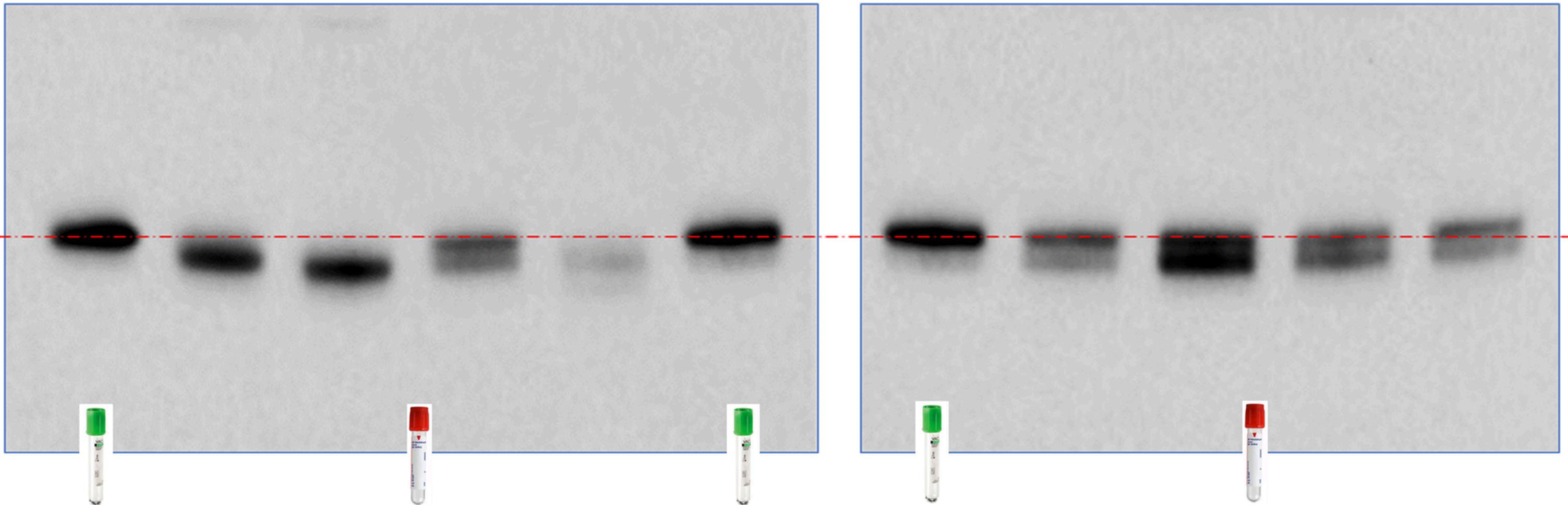
Plasma

Peptide N-glycanase



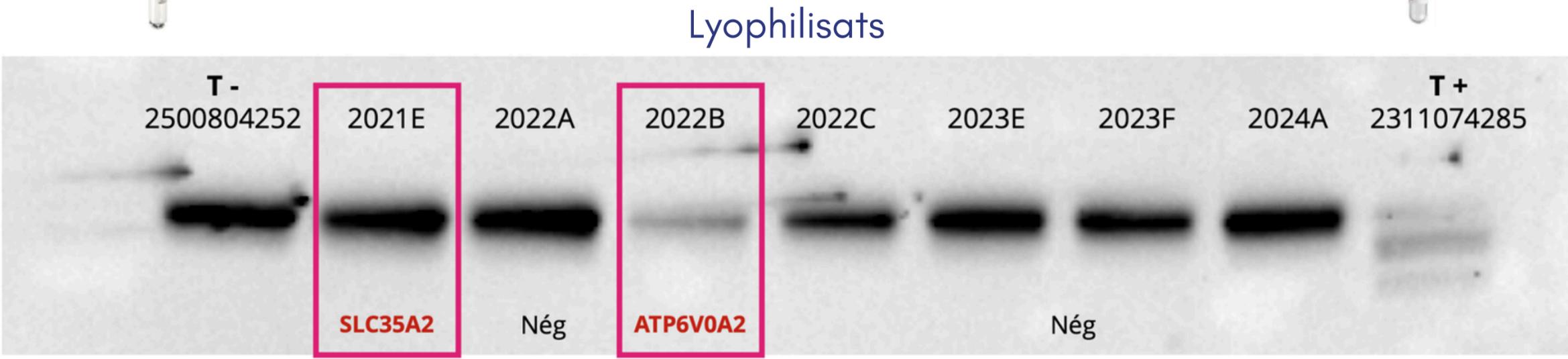
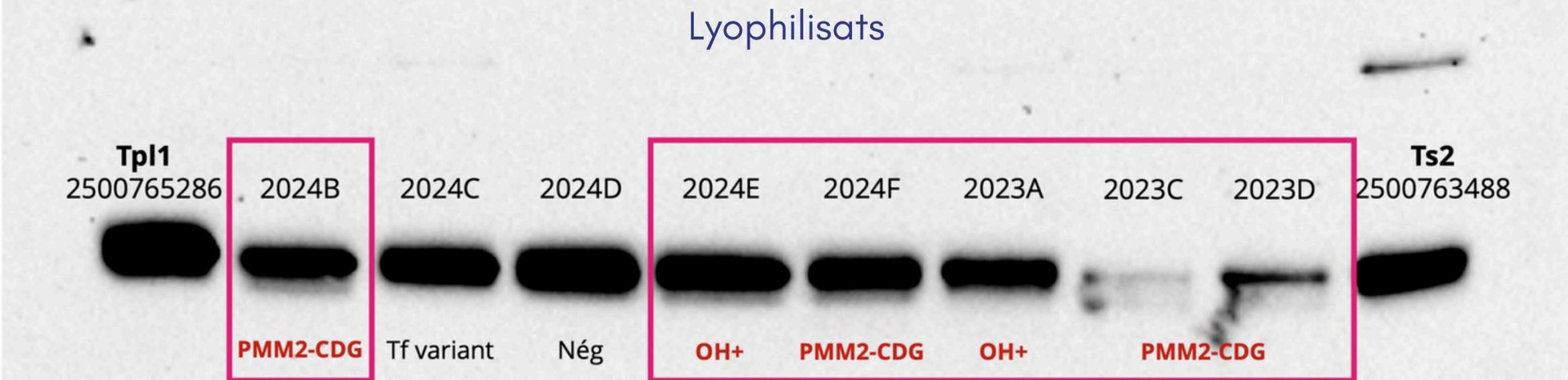
CDG type II

T1 2500652193 ATP6AP1 MAN1B1 2403127648 TMEM199 2402052836 CCDC115 1701043021 T2 T2 2500651794 ATP6V1F 2310009535 ATP6VOA2 2106118432 TMEM199 2402052885 ATP6V1F 1711045063

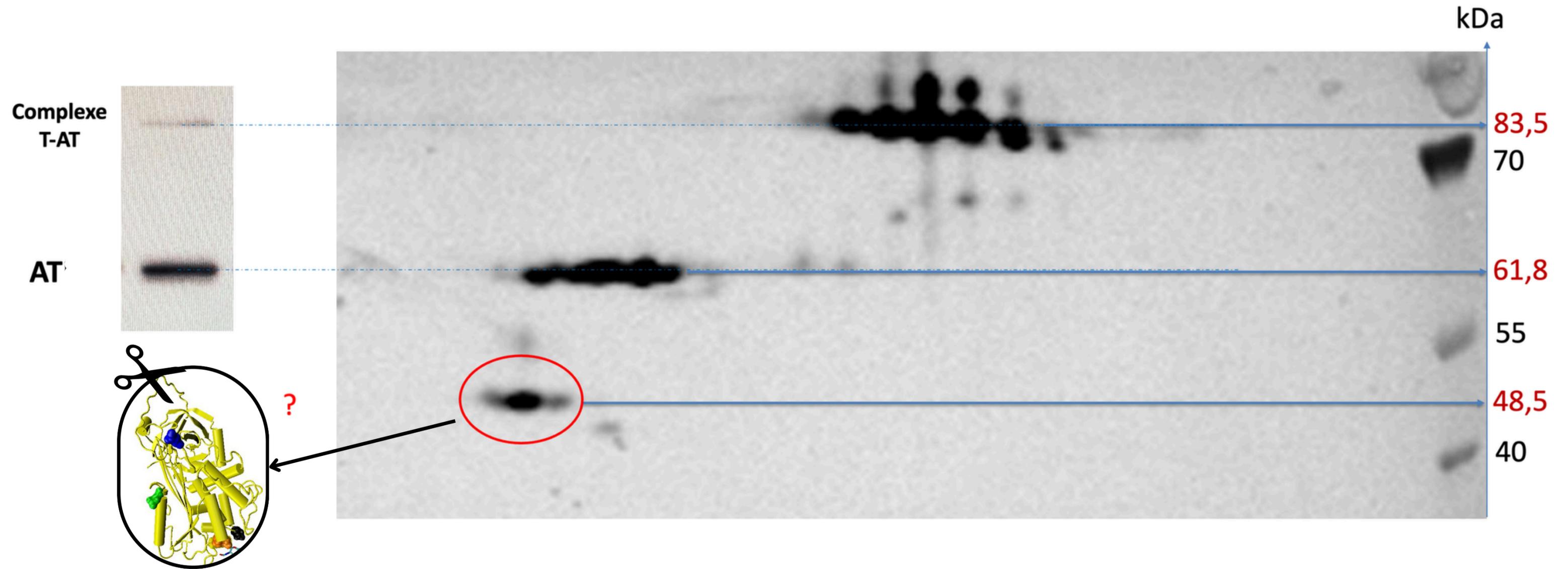


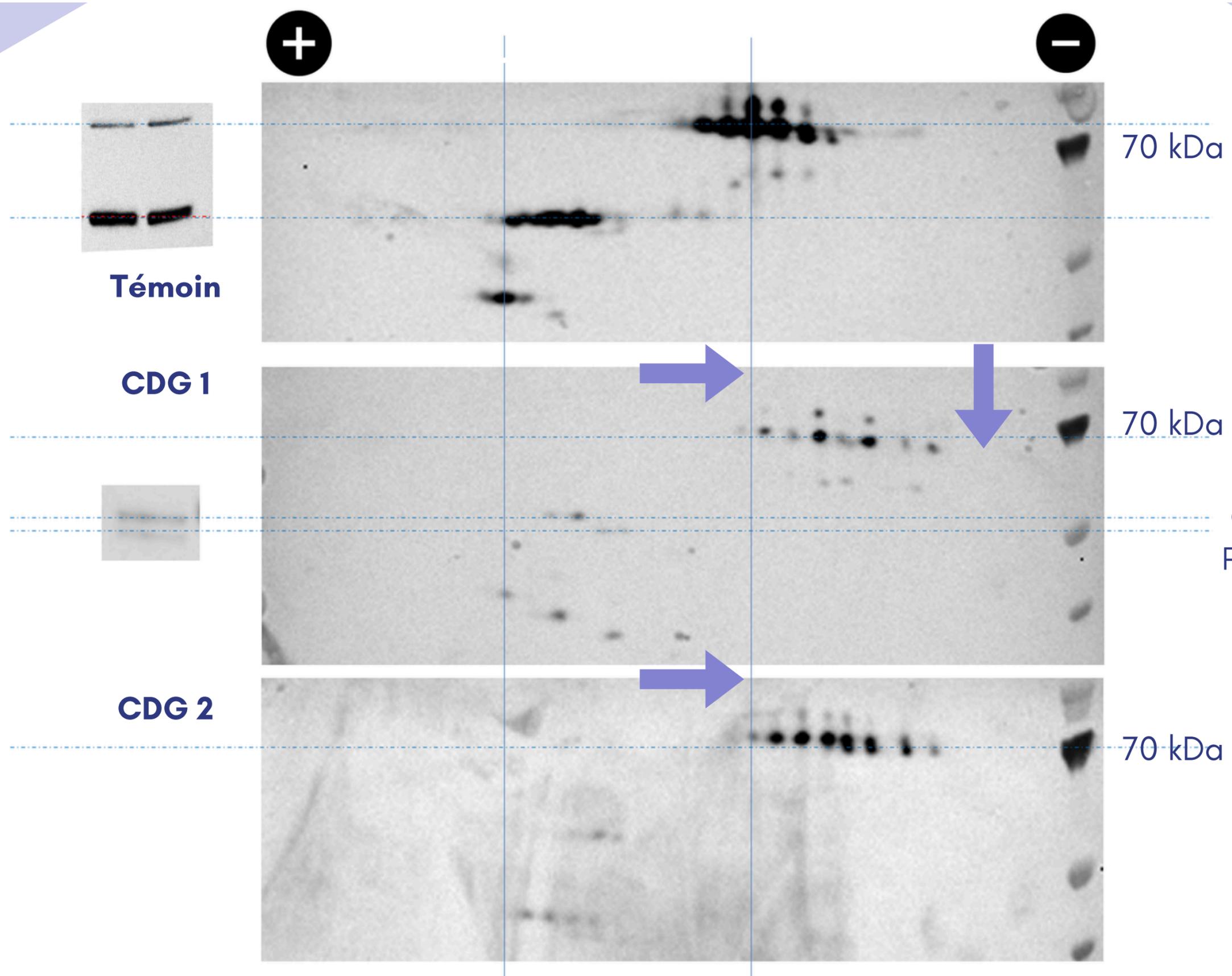
**Chaînes présentes, mais immatures
(absence acides sialiques terminaux)**

Résultats EEQ



Étude de l'AT en 2D





70 kDa

Témoin

CDG 1

70 kDa

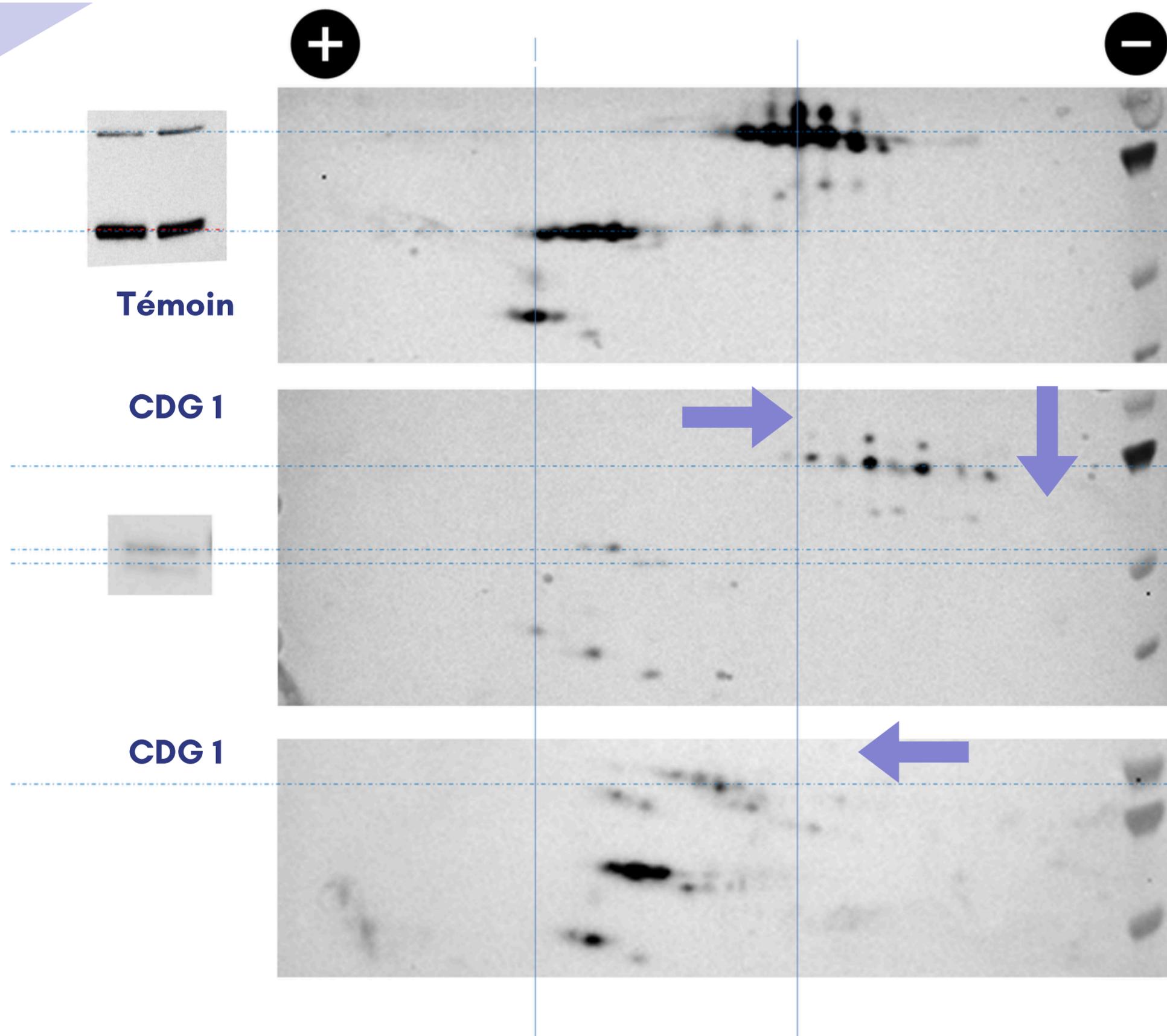
Shift vers la droite (perte acides sialiques) et baisse PM (perte chaines entières)

CDG 2

70 kDa

Shift vers la droite (perte acides sialiques)





70 kDa

Témoin

CDG 1

70 kDa

Shift vers la droite (perte acides sialiques) et baisse PM (perte chaines entières)

CDG 1

70 kDa

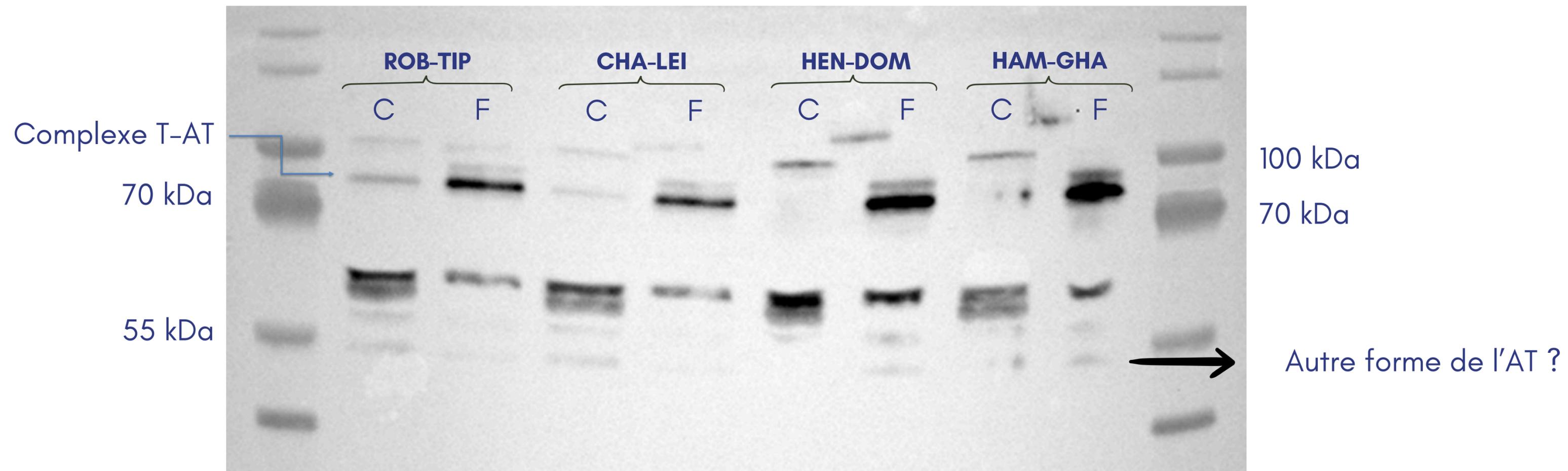
Shift vers la gauche de l'AT (**variant protéique ?**)



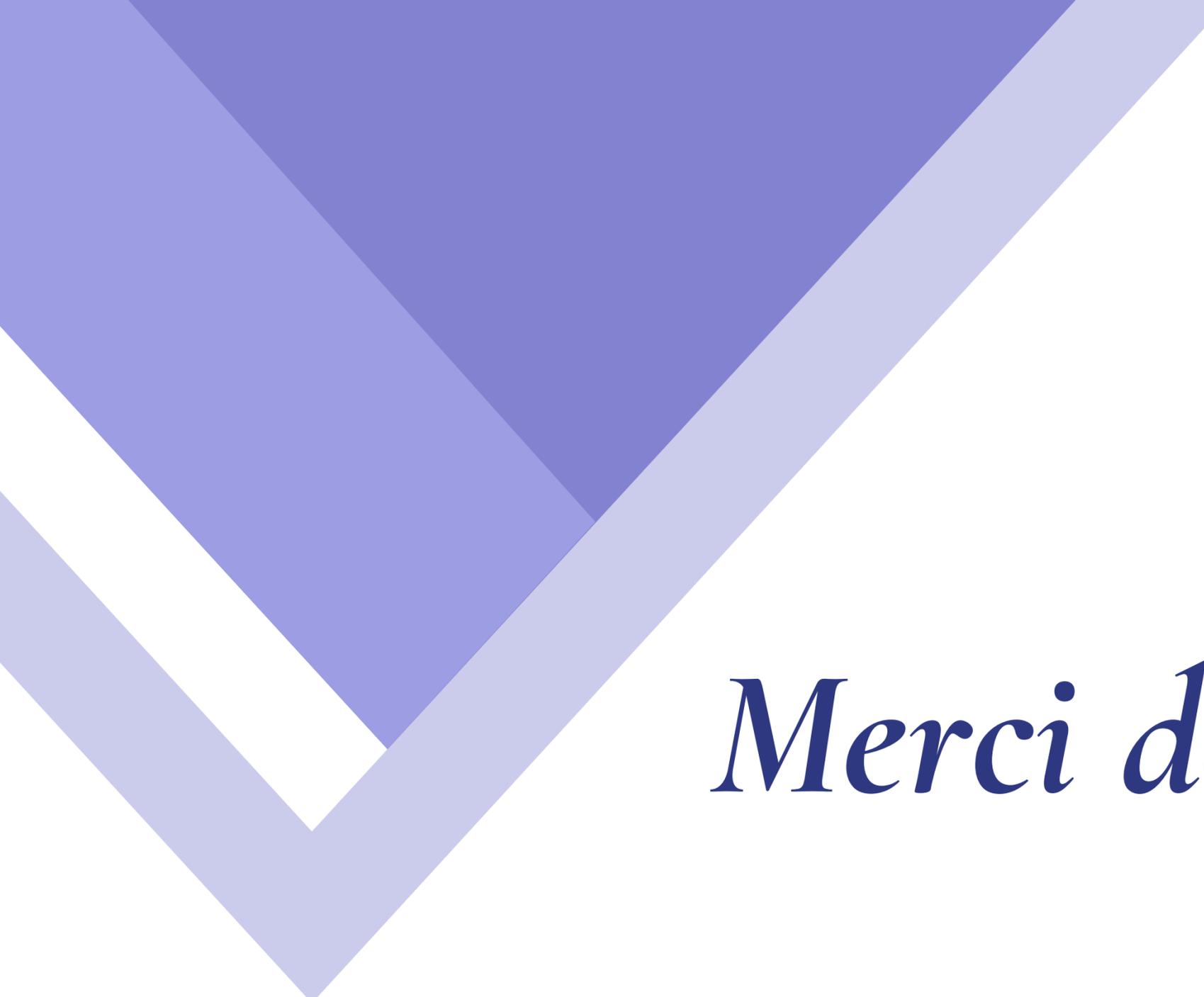
Experience avec et sans chauffage

WB ATIII (1/50ème) : 4 contrôles, chacun chauffés et non chauffés

Vérifier l'impact du chauffage sur la présence : du complexe T-AT, de l'AT et de la forme clivée de l'AT



C = Chaud
F = Froid



Merci de votre attention

Carla & Luca

28 mars 2025

Bibliographie

- <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2467516/>
- https://www.cdg-bichat.com/_files/ugd/2b8384_64a25d6bce4d44d3a9f53bfb2c898966.pdf
- https://www.cdg-bichat.com/_files/ugd/2b8384_b4d66d9f930c46768bd5dc8bc6964b3b.pdf
- https://www.cdg-bichat.com/_files/ugd/2b8384_ea71dc8bd8be47019ad22a8f89ef8a19.pdf
- https://www.cdg-bichat.com/_files/ugd/2b8384_fc2a4c7674cd4a77853ff3bcbb0cbe86.pdf
- https://www.cdg-bichat.com/_files/ugd/2b8384_912f7e0d7f9147ddb89216951c11c6e6.pdf
- <https://www.orpha.net/pdfs/data/patho/FR/fr-CDG.pdf>
- https://www.medecinesciences.org/en/articles/medsci/full_html/2020/07/msc200090/msc200090.html