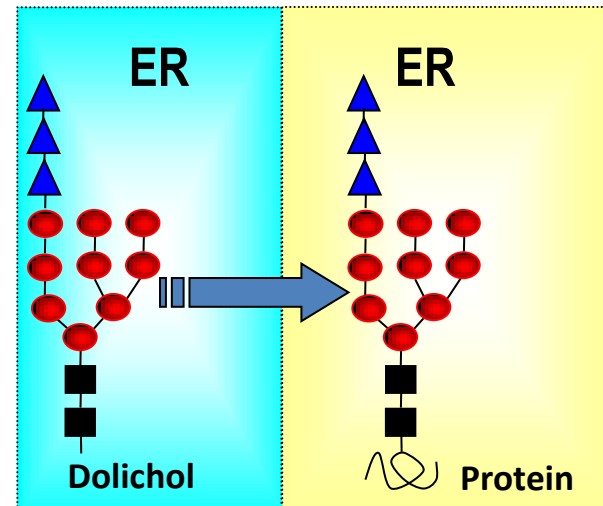
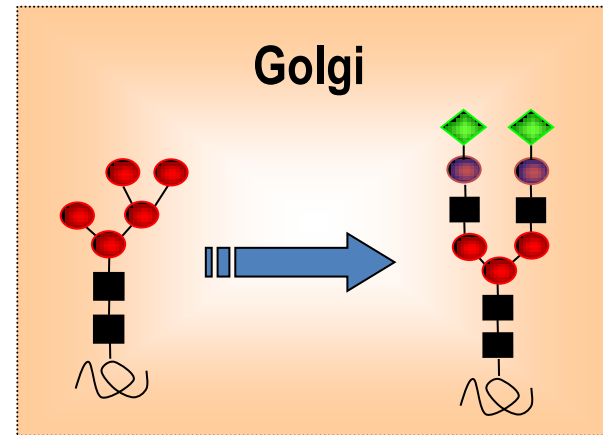
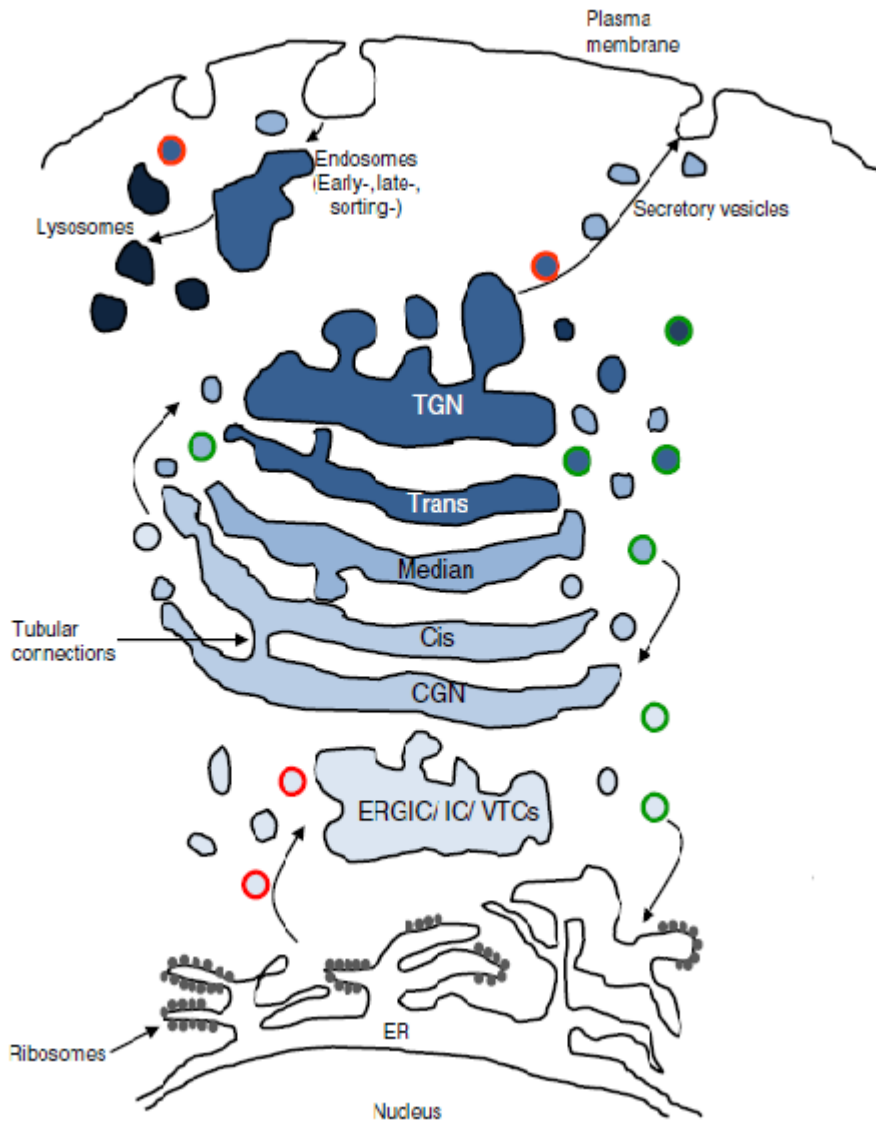


Les maladies Congénitales de Glycosylation (CDG); leçons du passé et perspectives d'avenir

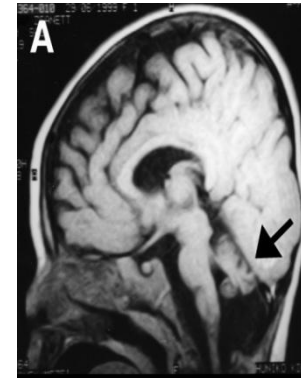
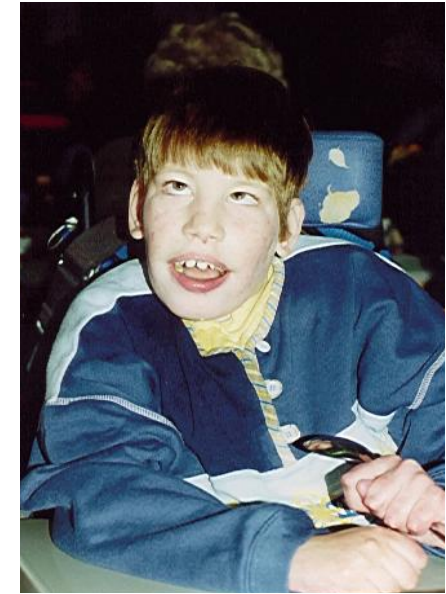
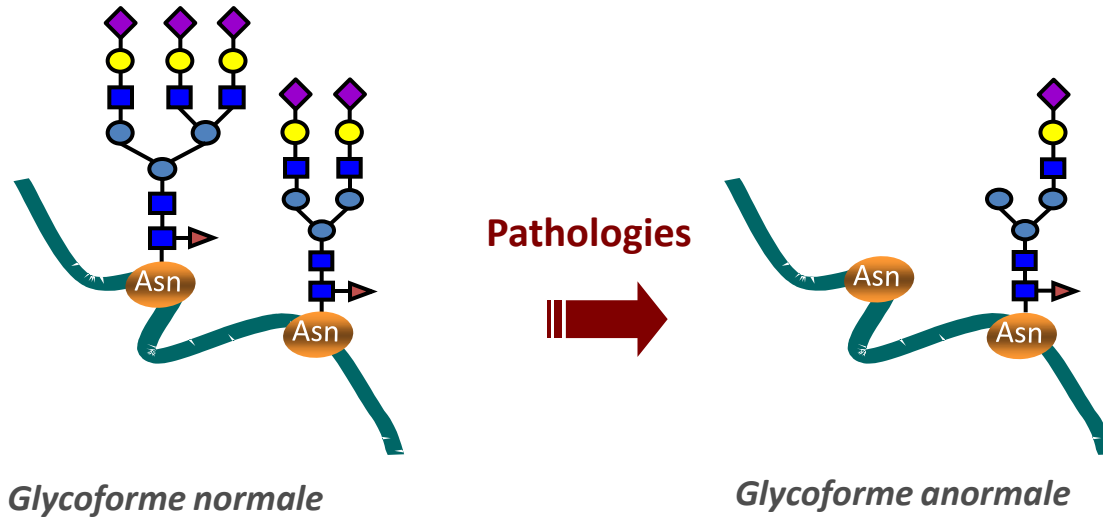
F. Foulquier



N-Glycosylation

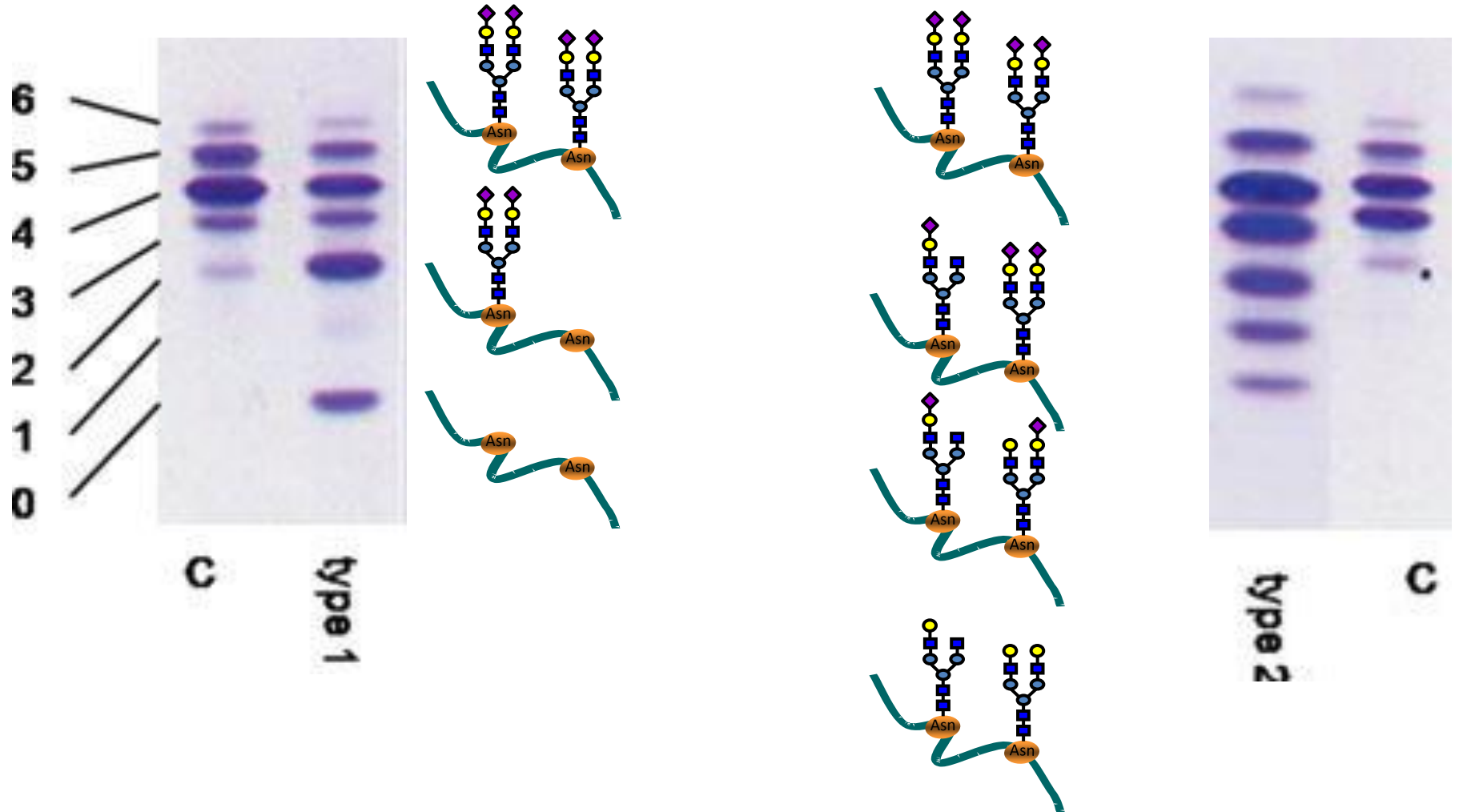


CDG (Congenital Disorders of Glycosylation)

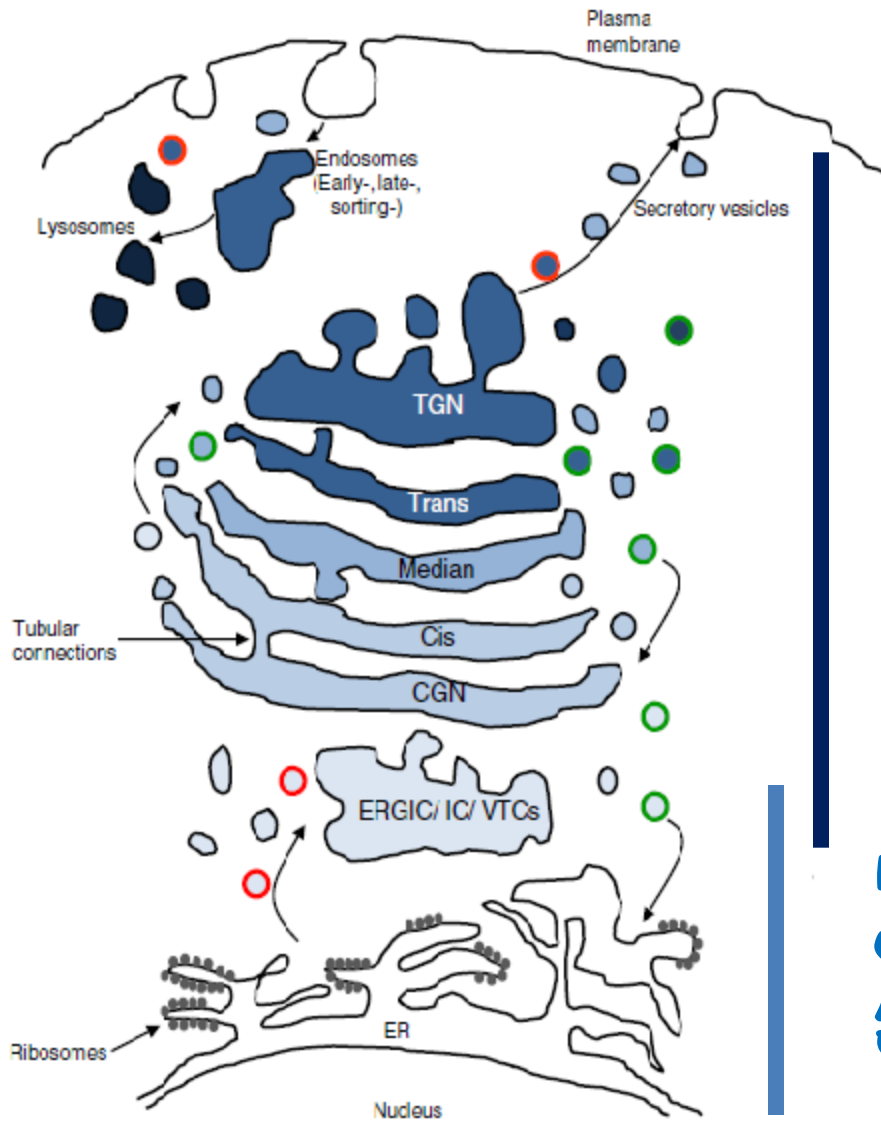


- ❖ Maladie génétique rare sur le mode d'hérédité autosomal récessif
- ❖ Prevalence de 1/20000
- ❖ Phenotype clinique très sévère (pathologie multisystémique)

Identification et discrimination



Thématique de recherche



CDG-I

CDG-II

❖ Identifier la déficience chez des patients CDG non résolus

❖ Comprendre l'impact des mutations identifiées dans le processus de glycosylation

Les CDG, un exemple de fusion entre recherche fondamentale et recherche médicale

Outil protéomique



Recherche
Fondamentale

Recherche
de populations

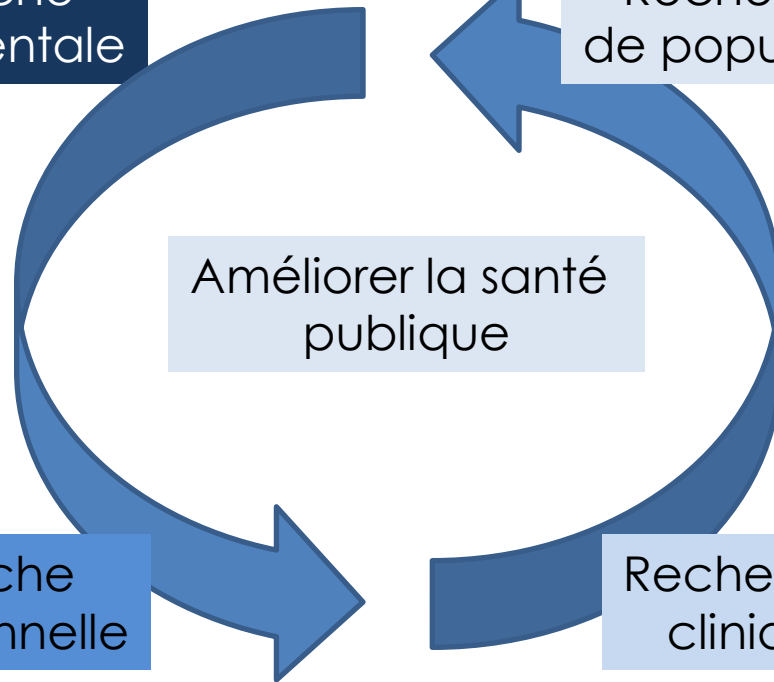
Améliorer la santé
publique

Recherche
translationnelle

Recherche
clinique



Outil protéomique



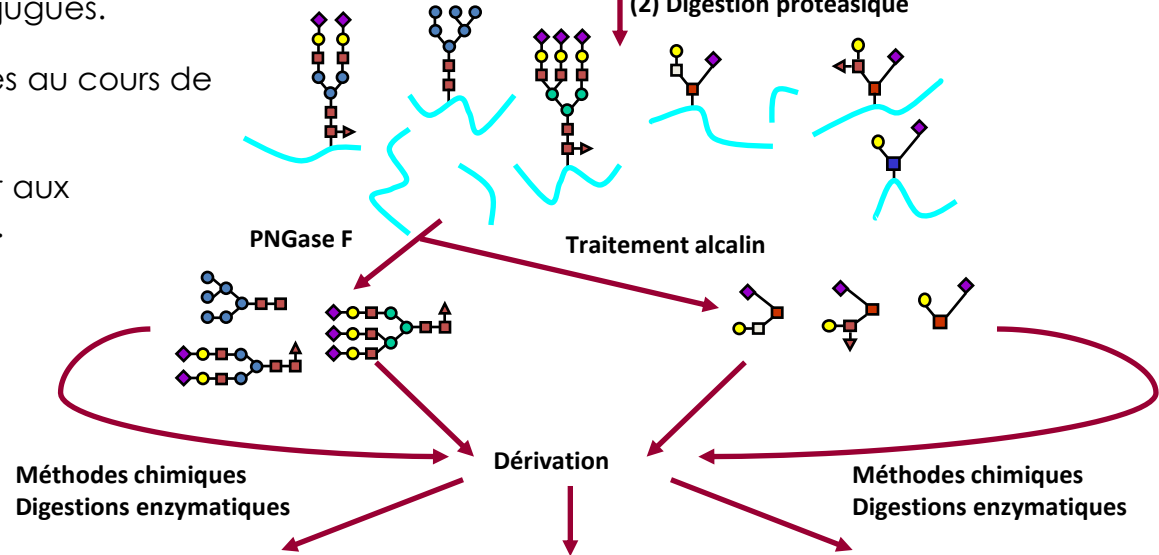
Glycoprotéomique

Approche glycomique pour l'analyse de N- et O-glycannes



Tissus, cellules

- (1) Réduction / Alkylation
- (2) Digestion protéasique



Méthodes chimiques
Digestions enzymatiques

Dérivation

Méthodes chimiques
Digestions enzymatiques



Profil de glycosylation
par MALDI-TOF



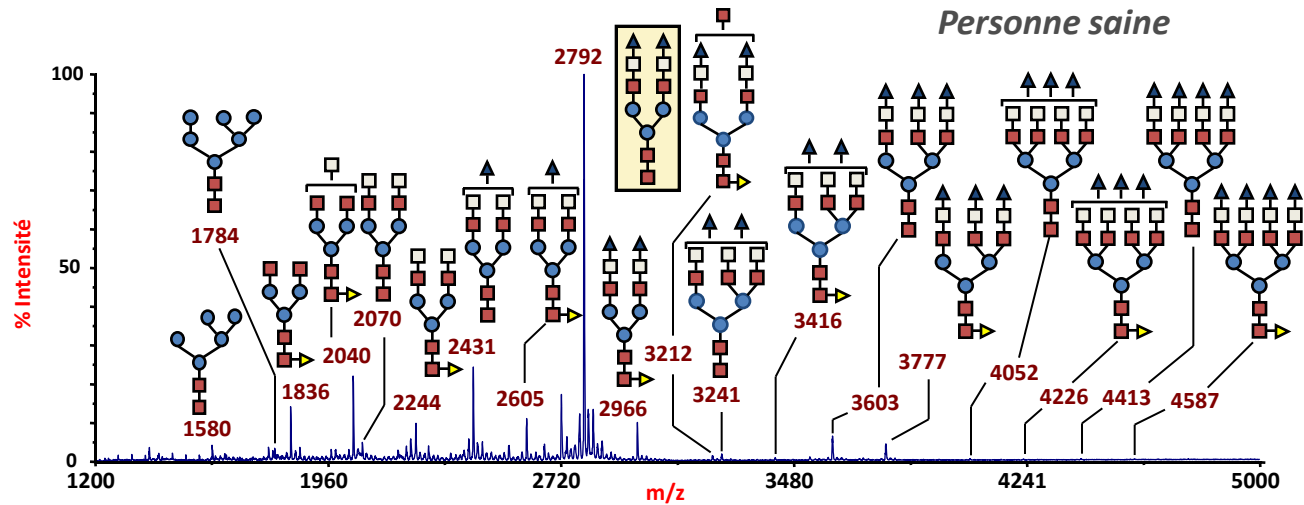
Séquençage
par MS-MS



Liaisons glycosidiques
par GC-MS

- Développer des méthodologies permettant la caractérisation structurale de glycoconjugués.
- Implication de la glycosylation de protéines au cours de différentes situations pathologiques.
- Utiliser l'acquis structural pour le confronter aux fonctions biologiques des glycoconjugués.

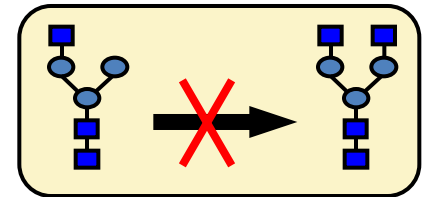
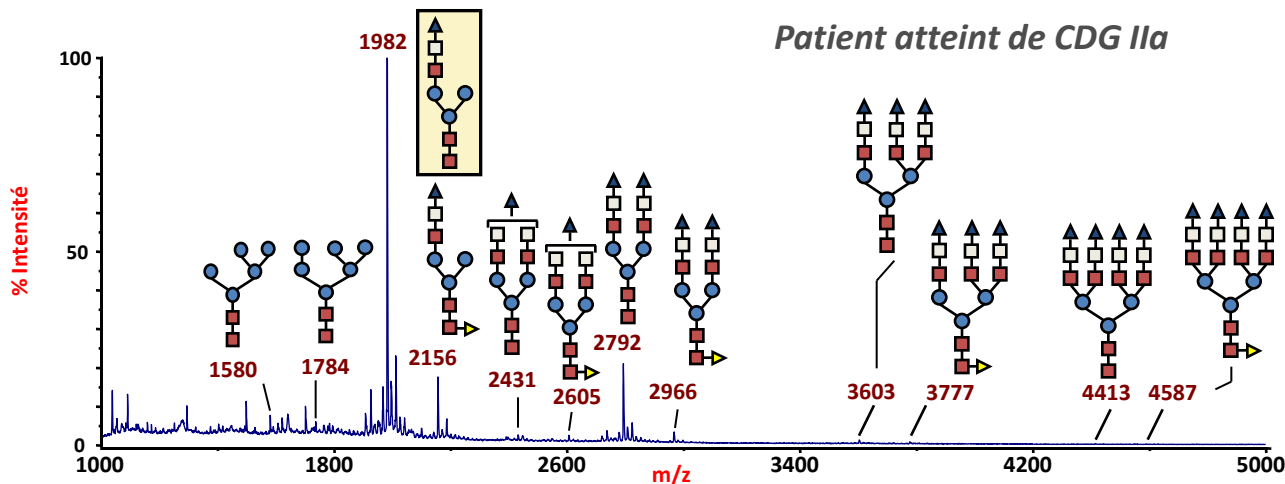
Apport de la glycoprotéomique dans l'identification de la déficience



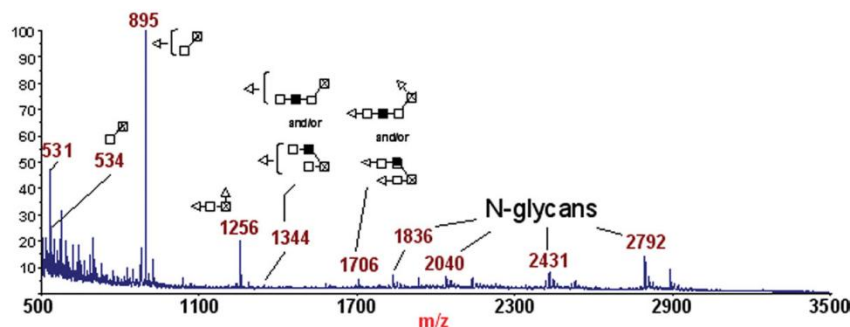
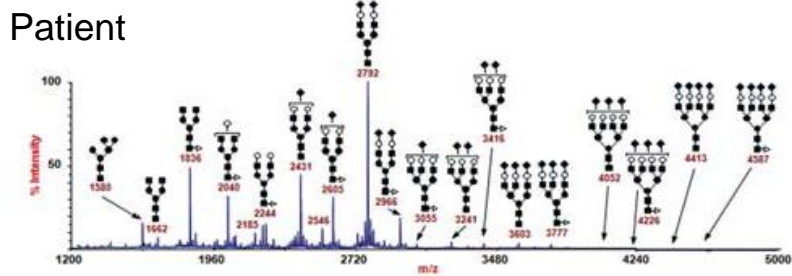
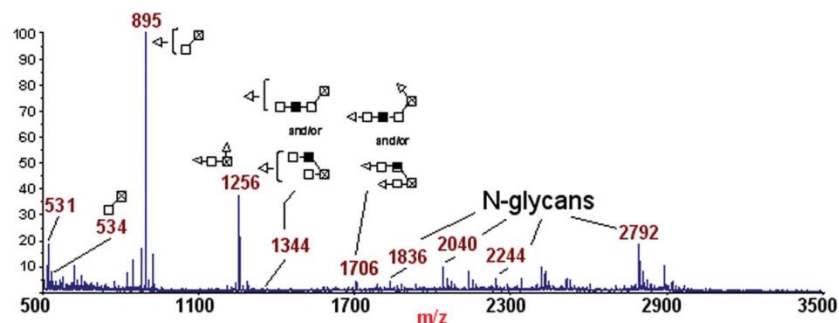
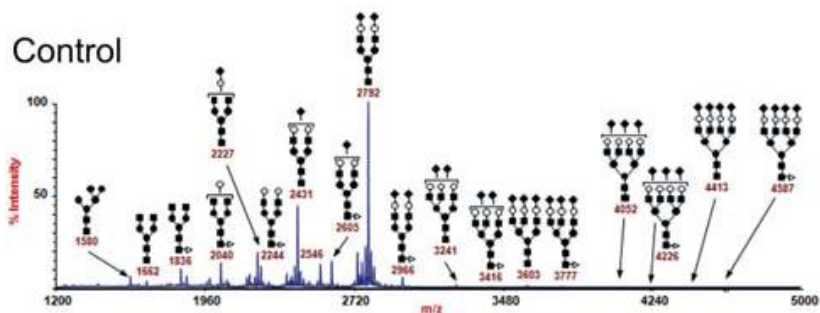
20 μ L de sérum

Vue générale
de la glycosylation des
glycoprotéines sériques

➔ Développement d'outils diagnostiques et pronostiques utilisables en biochimie clinique
Meilleure compréhension de l'implication des glycannes au cours de ces maladies



Apport de la glycoprotéomique pour approcher la déficience



N-glycosylation

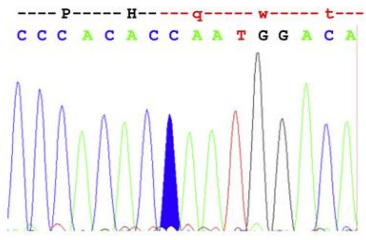
O-glycosylation

Défaut d'ordre général

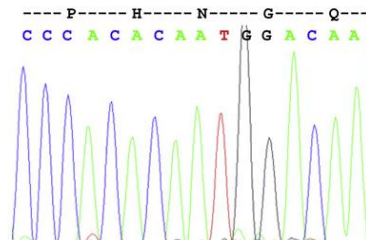
Lien entre retard mental et N-glycosylation

Concept de glycosylation
spécifique de glycoprotéines
neuronales

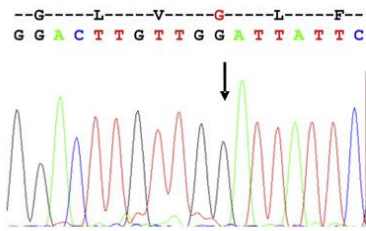
Identification de deux patients déficients en N33 et IAP



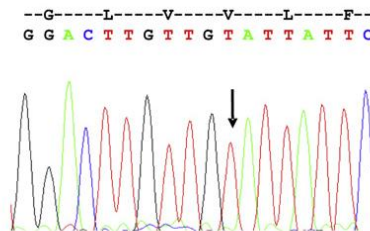
N33/TUSC3 – Exon 6 – Patient V.1
c.787_788insC p.N263fsX300



N33/TUSC3 – Exon 6
Control



IAP – Exon 9 – Patient III.5
c.932T>G p.V311G

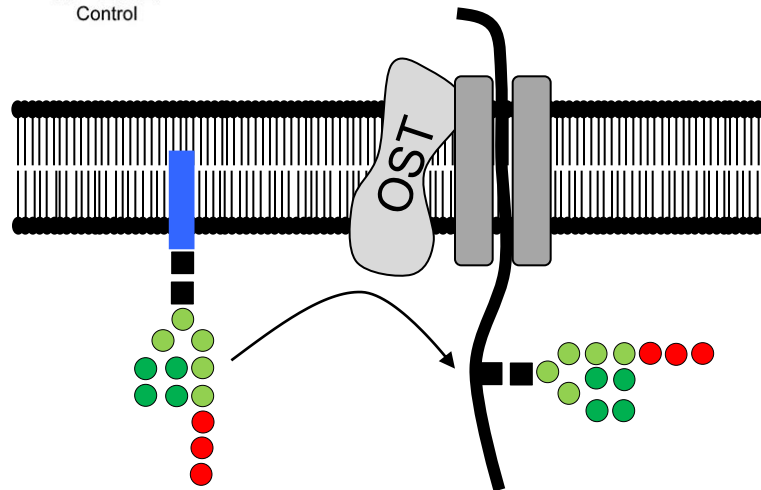


IAP – Exon 9
Control

Oligosaccharyltransferase
(OST):

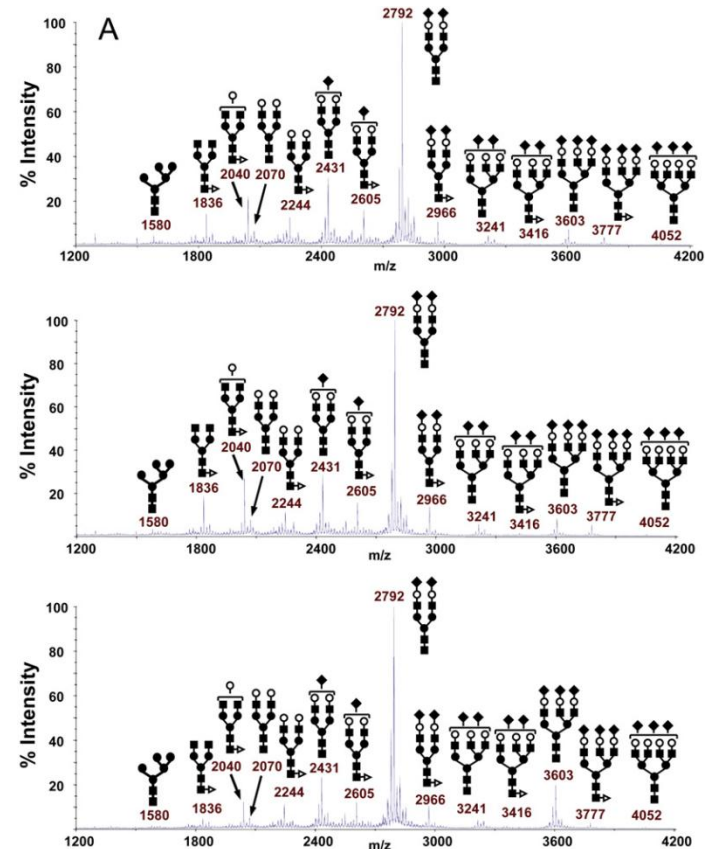
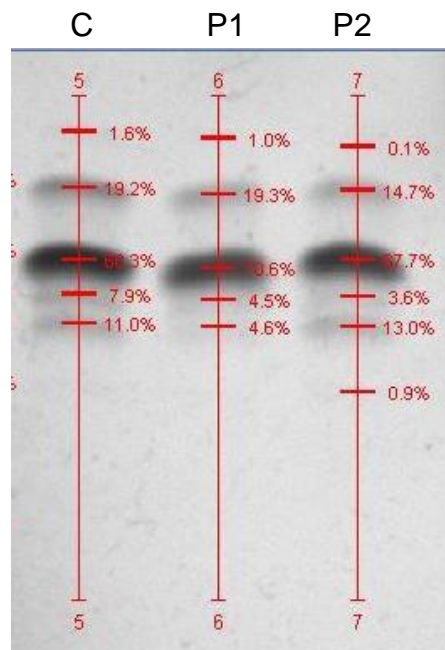
7 subunits:

Ribophorine I,
DAD1, **N33/IAP**,
OST4,
SST3A/STT3B,
Ost48, Ribophorine II



Etude de la glycosylation

IEF Transferrine



Aucune déficience de glycosylation n'est observée:

Concept de glycosylation spécifique de glycoprotéines neuronales

Stratégie

❖ Utilisation de la Drosophile

❖ CG7830, unique orthologue de N33 chez la drosophile

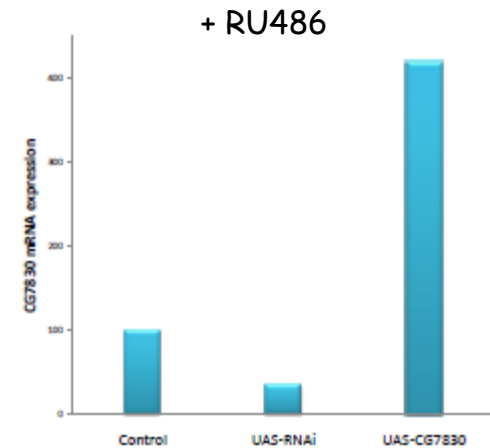
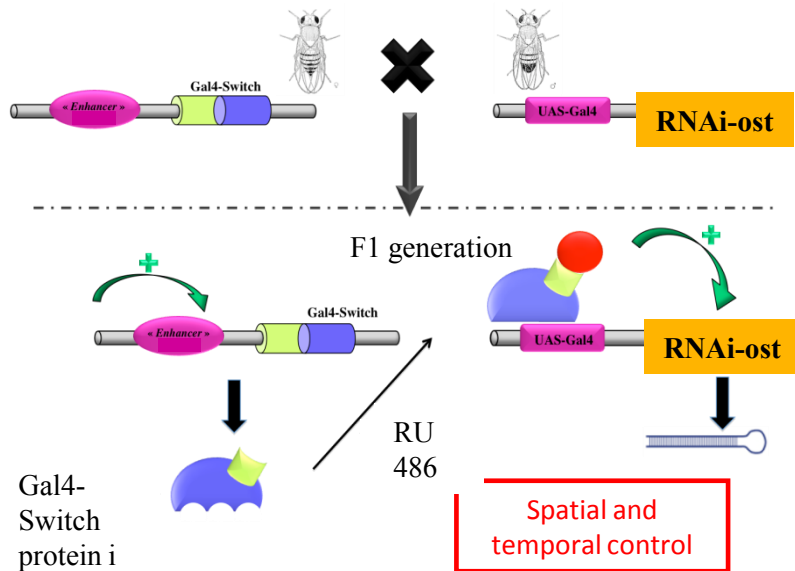


❖ RU486 dependant GAL4 (GeneSwitch) chez la Drosophile

1- Insertion du gène codant pour la protéine GAL4 dont l'expression est contrôlée par l'enhancer spécifique ou non d'un tissu donné.

2- Seconde lignée transgénique, le gène *CG7380* ou le *RNAi* dont l'expression est contrôlée par la séquence cible de GAL4

3- Croisement des deux lignées, descendants qui possèdent dans leur génome à la fois le gène codant pour GAL4 et le complexe UAS-*CG7380* (*RNAi*).



1- Approche protéomique par 2D-DIGE pour analyser les conséquences d'une sous ou surexpression de N33

Heads of Drosophila (control, OST-, OST+)

Protein extraction in 2D- lysis buffer

Cye-Dye Labeling

Mixed samples and 2-DE separation

INTERNAL STANDARD (SI) : Cy2

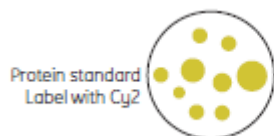
$C_{(1)} + C_{(2)} + OST^-_{(3)} + OST^-_{(4)} + OST^+_{(5)} + OST^+_{(6)}$

Cy3 labeling

$C_{(1)}, OST^-_{(4)}, OST^+_{(5)}$

Cy5 labeling

$C_{(2)}, OST^-_{(3)}, OST^+_{(6)}$



Mix labeled extracts

Protein separation



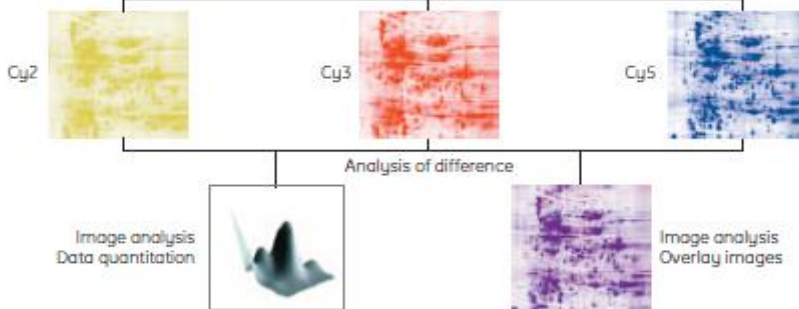
GEL 1: $C_{(1)} + OST^+_{(6)} + SI$ (50 µg /each sample)

GEL 2: $OST^-_{(4)} + C_{(2)} + SI$

GEL 3: $OST^+_{(5)} + OST^-_{(3)} + SI$



Fluorescence scanner and Image analysis (*SameSpots software*)

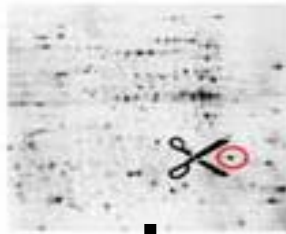


The same gel is read at 3 different λ

Differentially expressed proteins between Control, OST-, OST+ Drosophila

STEP2: Identification of proteins of interest

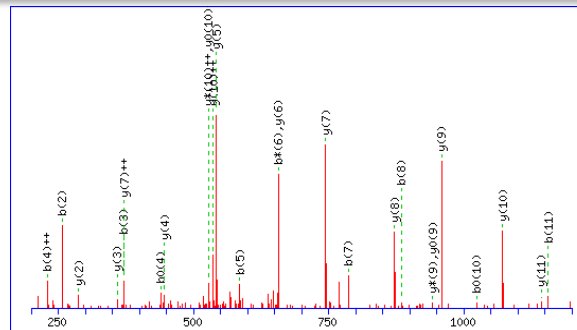
IEF/SDS-PAGE



trypsin In-gel digestion



nanoLC-MS/MS (tandem MS) of peptides



Searching AAs sequences in databases
(Mascot, NCBI nr DB, *Drosophila*)

Identification of protein candidates
regulated by OST expression level

Résultats

- 543 spots détectés

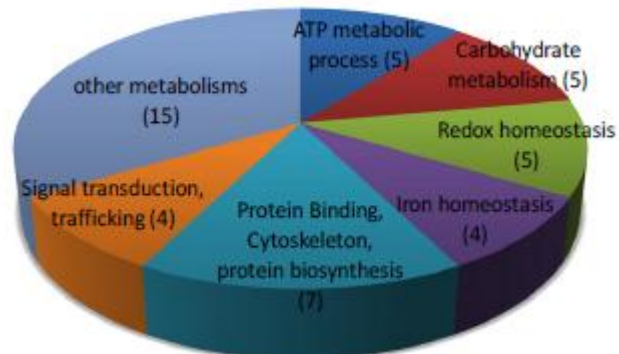
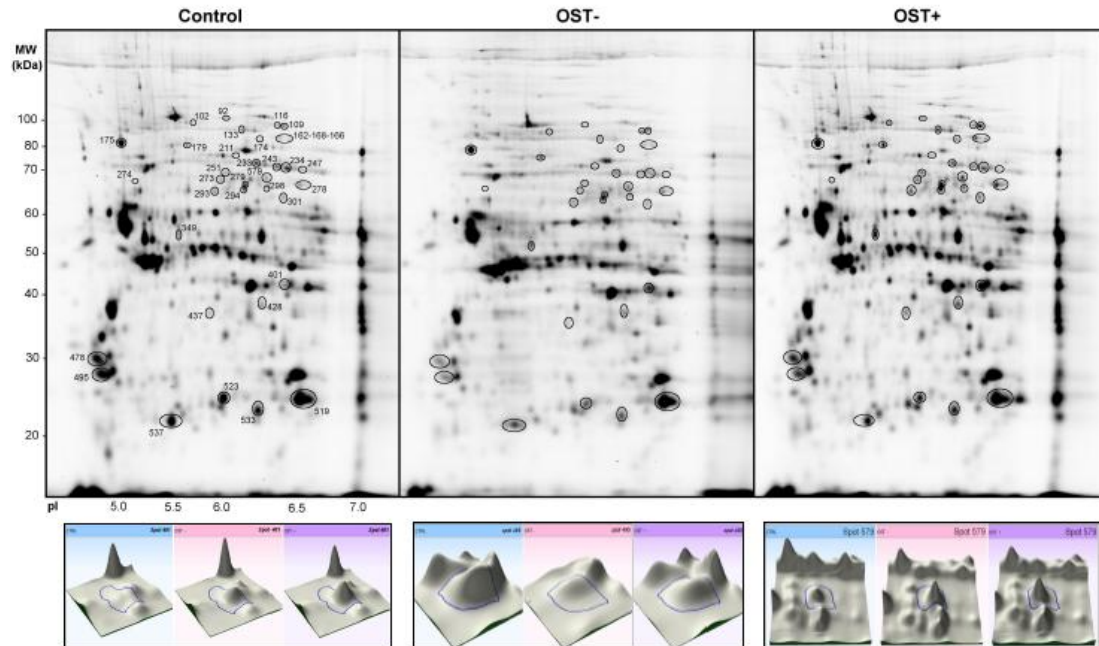
- 43 spots (7.9%) sont différentiellement exprimés

- 10 spots (23%) sont plus exprimés dans le control

- 28 spots (65%) le sont moins

- 1 spot (2%) est exprimé en fonction

- 4 spots (10%) sont sur(+) ou mois (-) exprimés dans OST+



2- Approche protéomique pour identifier les cibles
glycoprotéiques de N33

Stratégie

Heads of *Drosophila*
(control, OST-, OST+)

Protein extraction in lysis buffer
(50 heads in 200 μ l)

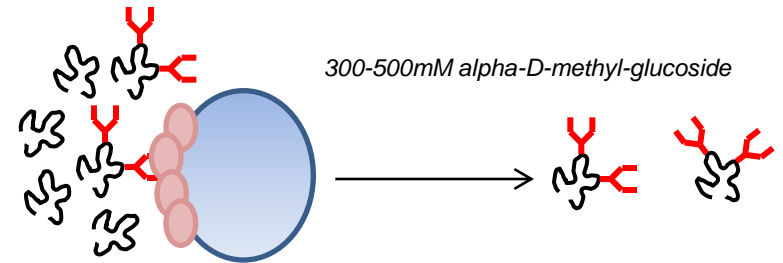
ConA- Affinity chromatography
(150 μ g/200 μ l beads
Elution: 300 mM-500 mM CH₃Glc)

SDS-PAGE

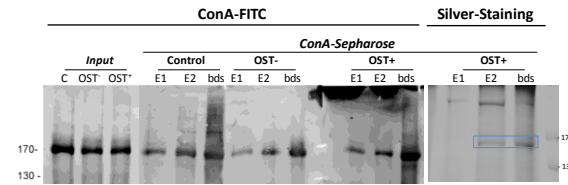
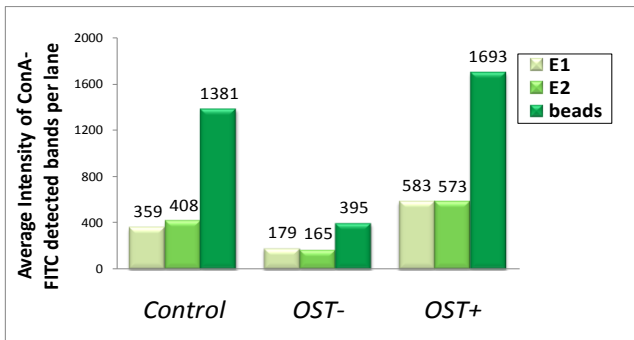
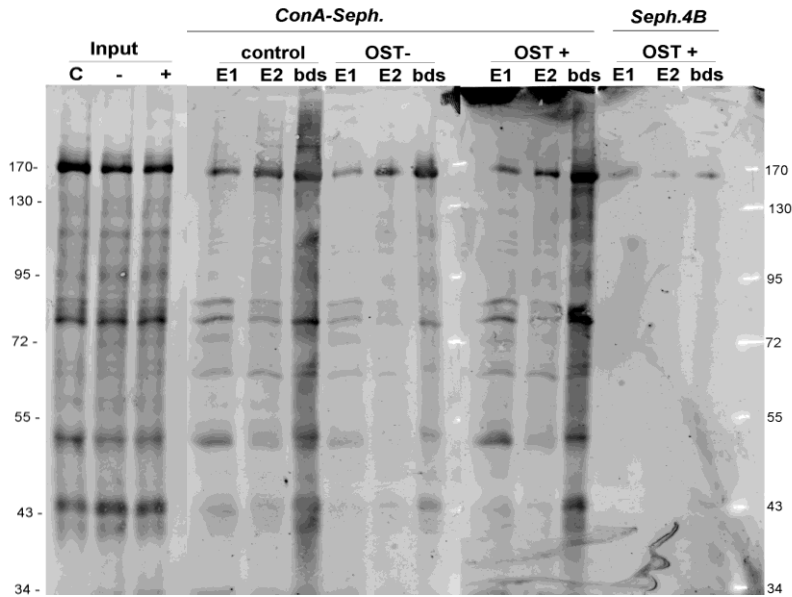
W-Blot
ConA-FITC

Silver Staining

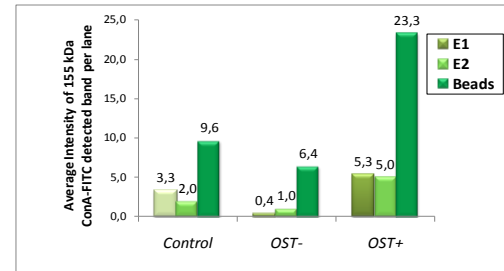
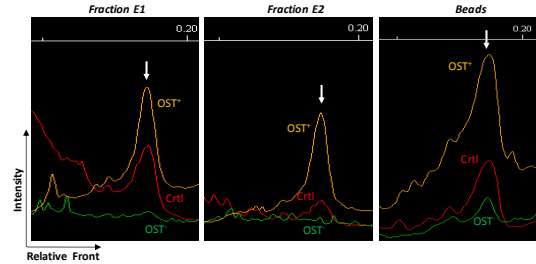
❖ Concanavalline A est une lectine reconnaissant les résidus de D-mannose et D-glucose



Résultats



In gel Trypsin Digestion
NanoLC-MS/MS Analysis



Identification of neural glycoproteins for which the level of glycos-ylation is affected in UAS-RNAi and UAS-CG7830 flies

Remerciements

Notre groupe (UGSF, CNRS, France)

Dr. JC Michalski

Dr. Anne-Sophie Vercoutter

Marlène Mortuaire

Dr. Sandrine Duvet

Dr. Dominique Legrand

Dr. Marie-ange Krzewinski-Recchi

Anne-marie Mir

Cindy Borredo

Dr. Laurence Colleaux
(Hôpital Necker, Paris)

Dr. Thomas Preat
(ESCPI, Paris)

Dr Guillaume Isabelle

