



HAL
open science

Cascades physiopathologiques dans la maladie de Sanfilippo B

Julie Bruyère Bruyere

► **To cite this version:**

Julie Bruyère Bruyere. Cascades physiopathologiques dans la maladie de Sanfilippo B. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05T020 . tel-00755417

HAL Id: tel-00755417

<https://theses.hal.science/tel-00755417>

Submitted on 21 Nov 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE
pour obtenir le grade de
Docteur
spécialité : Neurosciences

Ecole doctorale
GC2ID

Présentée et soutenue publiquement par
Julie BRUYERE

Le 22 octobre 2012

Cascades physiopathologiques dans la maladie de Sanfilippo B

Thèse dirigée par
Jean-Michel HEARD

Jury :

Marc TARDIEU
Jean-Michel HEARD
Odile BOESPFLUG-TANGUY
René-Marc MEGE
Sandrine ETIENNE-MANNEVILLE
Michel BORNENS
Hugues LORTAT-JACOB

Président du jury
Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

Remerciements

Ma curiosité et mon intérêt pour la recherche m'ont incitée à réaliser une thèse de science. J'arrive, au bout de ces quatre années, à la fin de mon travail. J'en retire une grande expérience professionnelle et humaine. Maintenant que l'aventure touche à sa fin, je tiens à adresser mes remerciements à celles et ceux qui m'ont permis de réaliser ce travail et qui m'ont accompagnée.

Le travail de recherche présenté dans ce mémoire a été effectué à l'Institut Pasteur de Paris, au sein de l'unité de Rétrovirus et Transfert Génétique.

Je remercie **Jean-Michel Heard**, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et financée au cours de mes années de thèse, pour les discussions scientifiques et parfois éthiques. Je voudrais le remercier de m'avoir encouragée, et soutenue, tout au long de ma thèse, mais aussi pour toutes ses critiques, qui m'ont permis d'avancer.

Je remercie les membres de mon jury de thèse pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ma thèse et pour l'intérêt qu'ils portent à mon travail. Je tiens à exprimer ma gratitude à **Odile Boesflug-Tanguy** et à **René-Marc Mège** d'avoir accepté le rôle de rapporteur. Je remercie également **Sandrine Etienne-Manneville**, **Michel Bornens** et **Hugues Lortat-Jacob** d'avoir accepté d'examiner ma thèse. J'exprime ma sincère reconnaissance à **Marc Tardieu**, qui a accepté de présider ce jury.

Merci à **Sandrine Vitry**, pour avoir rigolé à mes blagues (plus ou moins drôles) et pour m'avoir faire rire en retour, mais surtout parce qu'elle m'a enseigné des valeurs indispensables à la recherche, que sont la précision, la rigueur et la persévérance.

Merci à **Delphine Bohl**, pour les discussions d'après 20h, mais surtout pour avoir trouvé le meilleur des techniciens : John Hill.

Merci à **Jérôme Ausseil**, qui m'a donné le relais en biochimie au laboratoire et qui a laissé de bonnes habitudes après son (pot de) départ.

Merci aux étudiants du labo : à **Elise Roy**, qui a bien voulu partager avec moi un directeur de thèse, un bureau, des idées, des expériences (de la vie), des potins et même un lit ! A **Thom**, pour avoir toujours (ou pas !) réponse à toutes mes questions, et à **Diana**, pour sa flexibilité, sa gentillesse et son franc-parler, avec l'accent grec. Merci à **Mickaël**, pour ses

encouragements, et pour avoir noté, quelque part dans sa thèse, que la protéine GM130 était impliquée dans l'organisation du centrosome !

Je ne veux pas oublier de remercier **Stéphane Blanchard**, avec qui les journées au laboratoire ne sont jamais moroses. Grâce à lui, la biologie moléculaire est devenue un jeu d'enfant (comme le badminton !), et les opérateurs téléphoniques n'ont plus de secret pour moi.

Merci à **Stéphanie, Françoise, Guillaume et Patricia** pour leurs coups de main, leur soutien et leurs aides techniques. A **Grégoire**, pour son dynamisme, son envie de travailler, et la motivation qu'il nous a donné, par exemple, au ping-pong. A **Pflam**, pour les gourmandises qui réconfortent et les fous rires qui font toujours du bien. A **Dania, Judith et Guillaume** pour avoir amené de la jeunesse dans nos discussions.

Merci à l'équipe de **Sandrine Etienne-Manneville**, notamment **Emeline et Batiste** pour leurs conseils et leurs réponses.

Merci aux filles de l'équipe de **Claire Legay, Laure Strochlic, Séverine Sigoillot, Francine Bourgeois et Emmanuelle Girard**, pour m'avoir mis le pied à l'étrier, et pour leur soutien dans ce projet qu'est ma thèse.

Je voudrais remercier toute **ma famille** et plus précisément **mes parents**, qui ont beaucoup donné pour que tout cela soit possible. Merci à mes sœurs, **Karine et Amandine**, qui ont bien voulu se sacrifier pour des week-ends en Bourgogne ou à Paris ! Merci au petit nouveau **Chris** et à **Karine** pour la prochaine fête de famille Bruyère qu'ils organisent l'année prochaine ! Je remercie toute la **famille Serre/Pelloux-Gervais** pour leur soutien et leurs encouragements.

Je remercie tous **mes amis** pour leurs passages à Paris. Merci à **Mag et David** d'être venu habiter à Tours et merci à **Cath** d'avoir vaincu sa peur des transports en commun pour venir nous voir.

And the last but not the least, merci à toi, **Damien**, pour ces 10 années, et surtout pour les 10 prochaines qui s'annoncent encore plus folles !

Table des matières

Table des figures	7
Introduction	9
Etat de l'art	12
1 Les héparanes sulfates et la communication de la cellule avec son environnement.....	12
1.1 Les protéoglycanes d'héparanes sulfates au sein de la matrice extracellulaire.....	12
1.1.1 Les protéoglycanes d'héparanes sulfates	12
1.1.2 La matrice extracellulaire.....	27
1.2 Interaction de la cellule avec son environnement	32
1.2.1 Récepteurs des facteurs solubles	33
1.2.2 Intégrines, récepteurs des protéines matricielles.....	37
1.3 Les composants intracellulaires	52
1.3.1 Le cytosquelette.....	52
1.3.2 L'appareil de Golgi	66
1.4 La polarisation des cellules en migration.....	77
1.4.1 Les mécanismes.....	77
1.4.2 La migration et la polarisation des cellules dans le système nerveux central..	82
2 La mucopolysaccharidose de type III B, ou maladie de Sanfilippo de type B	87
2.1 Les mucopolysaccharidoses	87
2.1.1 Classification et bases génétiques des mucopolysaccharidoses.....	87
2.1.2 Nature des saccharides d'HS accumulés.....	89
2.1.3 Diagnostic des mucopolysaccharidoses	91
2.1.4 Les signes cliniques des mucopolysaccharidoses de type III.....	93
2.1.5 Les espoirs thérapeutiques des mucopolysaccharidoses de type III	95
2.2 La physiopathologie des mucopolysaccharidoses de type III	98
2.2.1 Modèles d'études de la physiopathologie	99
2.2.2 Pathologie du SNC	101
2.2.3 Caractéristiques cellulaires.....	106
Résultats	113

Partie I. Les saccharides d’HS extracellulaires activent les composants des plaques d’adhérence et perturbent la polarisation et la migration des cellules neurales MPSIIIB	113
Partie II. Les saccharides d’HS affectent la neuritogenèse des neurones corticaux MPSIIIB	147
Partie III. Nature des vésicules distendues des neurones corticaux MPSIIIB	160
Partie IV. Nature des vésicules distendues et phénotypes golgiens dans des cellules humaines déficientes en NAGLU	181
Partie V. Résultats complémentaires.....	202
Discussion.....	204
1 Activation de la formation des plaques d’adhérence et des voies de signalisation par les héparanes sulfates solubles.....	204
2 Les saccharides d’HS extracellulaires dans la MPSIIIB.....	205
3 Activation de la formation des plaques d’adhérence et des voies de signalisation par les héparanes sulfates accumulés dans la MPSIIIB.....	207
4 L’activation constitutive de la signalisation intégrine/FAK fige les cellules délétées en NAGLU.....	208
5 Défauts de plasticité des cellules neurales et neuronales affectées par la MPSIIIB	210
6 La MPSIIIB : maladie neurodégénérative et/ou maladie du développement ?.....	211
Conclusion.....	213
Perspectives.....	215
Bibliographie.....	217

Table des figures

Figure 1 : Structure des unités disaccharidiques des différents GAG.	13
Figure 2 : Synthèse des héparanes sulfates.	14
Figure 3 : Exemples de protéines de liaison aux HS et des séquences saccharidiques mises en jeu dans ces interactions.	16
Figure 4 : Les principaux protéoglycanes d'héparanes sulfates.	17
Figure 5 : Structure du protéoglycane agrine.	19
Figure 6 : Les différents types de syndécans exprimés chez les mammifères.	21
Figure 7 : Les structures des différents types de glypicans exprimés chez l'homme.	23
Figure 8 : Voie de dégradation des protéoglycanes d'héparanes sulfates.	25
Figure 9 : Dégradation séquentielle des GAG d'HS par les exoglycanases lysosomales.	26
Figure 10 : Structure modulaire et site d'interaction de la fibronectine.	28
Figure 11 : Exemples d'organisation de la MEC du SNC, en lame basale (A) ou en réseau périneural (B).	31
Figure 12 : Structure générale des récepteurs du FGF2.	33
Figure 13 : Exemples des voies de signalisation induites par la fixation du FGF2 à son récepteur.	34
Figure 14 : Structure et interactions du dystroglycan.	36
Figure 15 : Expression des sous-unités d'intégrines chez les vertébrés.	38
Figure 16 : L'interaction des intégrines avec leurs ligands extracellulaires.	39
Figure 17 : Liaisons intracellulaires des intégrines.	40
Figure 18 : Architecture moléculaire des plaques d'adhérence ou points de contact focal.	41
Figure 19 : Modèles de formation des plaques d'adhérence.	43
Figure 20 : Maturation des plaques d'adhérence.	45
Figure 21 : Conséquences en cascade de l'activation des intégrines.	46
Figure 22 : Cycle d'activation des Rho GTPase.	48
Figure 23 : Voies de signalisation contrôlée par Cdc42.	49
Figure 24 : Synergie entre le syndécan-4 et les intégrines au niveau des plaques d'adhérence.	51
Figure 25 : Actine G et protéines de liaison à l'actine.	53
Figure 26 : Dynamique des microfilaments d'actine.	54
Figure 27 : Exemples de protéines de liaison à l'actine et de leurs activités.	55
Figure 28 Types d'arrangements des filaments d'actine.	55
Figure 29 : Principe de la contraction actomyosine.	56
Figure 30 : Structure du cône de croissance.	57

Figure 31 : Polymérisation des microtubules.	58
Figure 32 : Exemples de rôles joués par les moteurs moléculaires.	60
Figure 33 : Modulation de la dynamique des microtubules, par modifications post-traductionnelles des tubulines (A) ou par les protéines de liaisons aux microtubules (B).	61
Figure 34 : Régulation de la dynamique des microtubules par les CLASP.	64
Figure 35 : Structure polarisée de l'appareil de Golgi.	66
Figure 36 : Maintenance de la structure de l'appareil de Golgi par GM130 (A) et par les microtubules (B).	68
Figure 37 : Organisation des centres de nucléation des microtubules, au centrosome et à la membrane golgienne.	70
Figure 38 : Exemple de modifications des chaînes N-glycosylées des glycoprotéines dans le RE et l'appareil de Golgi.	72
Figure 39 : La voie de biosynthèse des gangliosides.	73
Figure 40 : Adressage des protéines solubles du RE.	75
Figure 41 : Adressage des enzymes lysosomales par le récepteur au mannose-6-phosphate.	76
Figure 42 : Organisation d'une cellule polarisée en migration.	78
Figure 43 : Polarisation d'une cellule en migration par l'action du cytosquelette.	80
Figure 44 : Etapes de la polarisation des neurones corticaux en culture.	82
Figure 45 : Projections des neurones corticaux chez la souris.	84
Figure 46 : Types de migration neuronale dans le cortex en développement.	85
Figure 47 : Les mucopolysaccharidoses.	88
Figure 48 : GAG urinaires et cellulaires des MPS analysés par électrophorèse sur polyacrylamide.	90
Figure 49 : Sulfatation des HS dans le cerveau des souris modèles des MPS.	91
Figure 50 : Analyse par électrophorèse d'agarose des GAG purifiés d'urines de patients MPSIII.	92
Figure 51 : Utilisation des vecteurs viraux pour la thérapie génique.	96
Figure 52 : Caractérisation des neurones humains dérivés d'iPS.	101
Figure 53 : IRM cérébrale d'un patient MPSIIIB.	102
Figure 54 : Localisation des HS dans les cellules MPSIII.	107
Figure 55 : Morphologie des vacuoles accumulées dans les maladies lysosomales.	110
Figure 56 : Polarization defects due to loss of Golgi dynamic in MPSIIIB astrocytes.	202
Figure 57 : Schéma de la cascade physiopathologique dans la maladie de Sanfilippo B.	214

Introduction

Les dysfonctionnements du cerveau sont l'une des premières causes de maladie ou de handicap dans le monde. Un rapport de 2007 de l'Organisation Mondiale de la Santé révèle que les **troubles neurologiques** affectent près d'un milliard d'habitants. L'importance et la fréquence de ces troubles sont progressivement reconnues à mesure que leur sémiologie et leur étiologie se précisent. Parmi les affections neurologiques, les maladies **neurodégénératives** occupent une place prépondérante en raison de leur gravité et de leur fréquence croissante du fait du vieillissement de la population. Les plus jeunes sont touchés par les troubles liés au **développement du système nerveux**, comme la dyslexie, les troubles de l'attention ou la dyspraxie. Et les **maladies rares**, telles que le syndrome de l'X fragile ou le syndrome de Gilles de la Tourette, se comptent par centaines.

L'élucidation des **bases génétiques et moléculaires** de nombreuses affections du système nerveux permet de créer une nosologie plus précise fondée sur les processus pathogènes et de développer des **modèles animaux** de plus en plus proches de la pathologie humaine. Mais il reste aujourd'hui à traduire les découvertes fondamentales en **traitements** applicables à l'homme. Cet objectif exige notamment de renforcer la recherche **physiopathologique**, afin (1) de mieux **comprendre les dysfonctionnements** à l'origine des symptômes observés dans les maladies neurologiques et leurs mécanismes cellulaires, (2) de **développer des approches thérapeutiques** et des stratégies efficaces de ciblage des médicaments vers et dans le système nerveux, afin de **diminuer les effets secondaires** des stratégies thérapeutiques développées, trop souvent à l'origine des échecs cliniques et (3) d'identifier et de **valider de nouveaux marqueurs** pertinents des maladies neurologiques.

La **communication des cellules neurales avec leur environnement** est primordiale pour le développement, le fonctionnement et la plasticité du système nerveux. Les espaces extracellulaires du système nerveux central sont remplis de **matrice extracellulaire**. Cette matrice contient peu de protéines fibreuses mais de grandes quantités de protéoglycanes de type chondroïtine sulfate ou **héparanes sulfates**.

Les protéoglycanes d'héparanes sulfates assurent différents rôles dans la prolifération cellulaire, la différenciation neurale, la migration neuronale, la pousse axonale et la

synaptogenèse grâce, notamment, à leurs interactions avec les facteurs impliqués dans l'adhérence cellulaire tels que les composants de la matrice extracellulaire et les **intégrines**.

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires des protéines matricielles et sont impliquées dans la formation des **plaques d'adhérence**, structure sous-membranaire où sont recrutées les protéines de liaison au **cytosquelette** et des protéines de **signalisation**. Les voies de signalisation engagées au niveau des plaques d'adhérence par les intégrines sont indispensables à la dynamique, à la polarisation, à la migration et à la différenciation des cellules neurales.

La maladie neurologique appelée **Sanfilippo de type B**, ou mucopolysaccharidose de type IIIB, est une maladie monogénique rare. Le gène déficient dans cette pathologie code pour une enzyme de dégradation des héparanes sulfates. Cette déficience génère une **accumulation d'héparanes sulfates** partiellement dégradés. Mais la pathogénicité des héparanes sulfates sur le **système nerveux** n'est pas connue.

Dans l'optique de connaître la cascade physiopathologique induite par l'interruption d'expression de l'enzyme lysosomale, à l'origine des manifestations neurologiques dans la maladie de Sanfilippo B, nous avons étudié l'hypothèse selon laquelle **les défauts de communication de la cellule avec son environnement, causés par l'accumulation des héparanes sulfates partiellement dégradés, entraînent des comportements cellulaires inadaptés pour la mise en place et pour la plasticité des structures cérébrales.**

Pour cela, différents modèles cellulaires ont été utilisés :

- des cultures primaires de neurones, de précurseurs neuraux et d'astrocytes de la souris modèle de la maladie ;
- des cellules humaines HeLa dont l'expression de l'enzyme est inhibée de façon inducible ;
- des cultures de fibroblastes de patients ;
- des cultures de précurseurs neuraux humains, dérivés de cellules pluripotentes induites créées à partir des fibroblastes de patients.

Dans ce mémoire, un **état de l'art** est tout d'abord réalisé. Nous nous intéressons aux mécanismes de communication entre la cellule et son environnement. Puis, nous synthétisons les connaissances actuelles sur la physiopathologie de la maladie de Sanfilippo B. Nous présentons ensuite les **résultats** obtenus dans le cadre de cette thèse : (1) le rôle des

saccharides d'héparanes sulfates sur la formation de plaques d'adhérence et leurs impacts sur la polarisation cellulaire, sur la migration des cellules neurales et sur la neuritogenèse des neurones corticaux en culture ; (2) les conséquences intracellulaires de l'accumulation des saccharides d'héparanes sulfates au niveau du cytosquelette, de l'appareil de Golgi et des vésicules accumulées dans le cytoplasme des cellules atteintes par la maladie de Sanfilippo B. Enfin, les résultats sont **discutés** et mis en **perspectives**.

Etat de l'art

1 Les héparanes sulfates et la communication de la cellule avec son environnement

1.1 *Les protéoglycanes d'héparanes sulfates au sein de la matrice extracellulaire*

1.1.1 Les protéoglycanes d'héparanes sulfates

La matrice extracellulaire (MEC) du système nerveux central est principalement composée de protéoglycanes (Bonneh-Barkay & Wiley, 2009). Les protéoglycanes sont des macromolécules hydrophiles constituées d'un cœur protéique sur laquelle se greffent de façon covalente des mucopolysaccharides ou glycosaminoglycanes (GAG). Les GAG sont classés en fonction de la nature des oses et des liaisons de ces disaccharides. Les GAG composant les protéoglycanes sont les chondroïtines sulfates (CS), les dermatanes sulfates (DS), les kératanes sulfates (KS) ou les héparanes sulfates (HS). La MEC contient également un GAG non relié à un corps protéique : l'acide hyaluronique ou hyaluronane.

L'acide hyaluronique est constitué de milliers de répétition de disaccharides d'acide D-glucuronique et de N-acétyl-D-glucosamine non sulfatés (Figure 1). Sa synthèse est effectuée par des hyaluronate synthétases à la face interne de la membrane plasmique. Le polymère est extrudé au travers de la membrane plasmique dans l'espace extracellulaire, au fur et à mesure qu'il s'allonge. L'acide hyaluronique est reconnu par la cellule grâce à la présence de récepteurs membranaires. L'interaction avec ces récepteurs active plusieurs cascades de signalisation intracellulaire régulant la prolifération, la migration et la différenciation. L'acide hyaluronique sert de matrice sur laquelle se fixent des chaînes de protéoglycanes sulfatés. Ces structures supramoléculaires peuvent capter de larges quantités d'eau et d'ions pour maintenir l'hydratation et la turgescence des tissus.

Les GAG sont des polysaccharides non ramifiés constitués d'unités disaccharidiques en répétition. La longueur des chaînes saccharidiques est variable, comprise entre 40 et 300 résidus saccharidiques (de 20nm à 150nm). Ces oses peuvent être acétylés ou sulfatés, ce qui augmente considérablement le nombre de combinaisons de structures possibles, fournissant ainsi une importante hétérogénéité de GAG. Chaque unité disaccharidique des GAG est composée d'une hexosamine (galactosamine ou glucosamine) et d'un acide hexuronique (acide glucuronique ou iduronique) ou d'un hexose (galactose) pour le kératane sulfate (Figure 1).

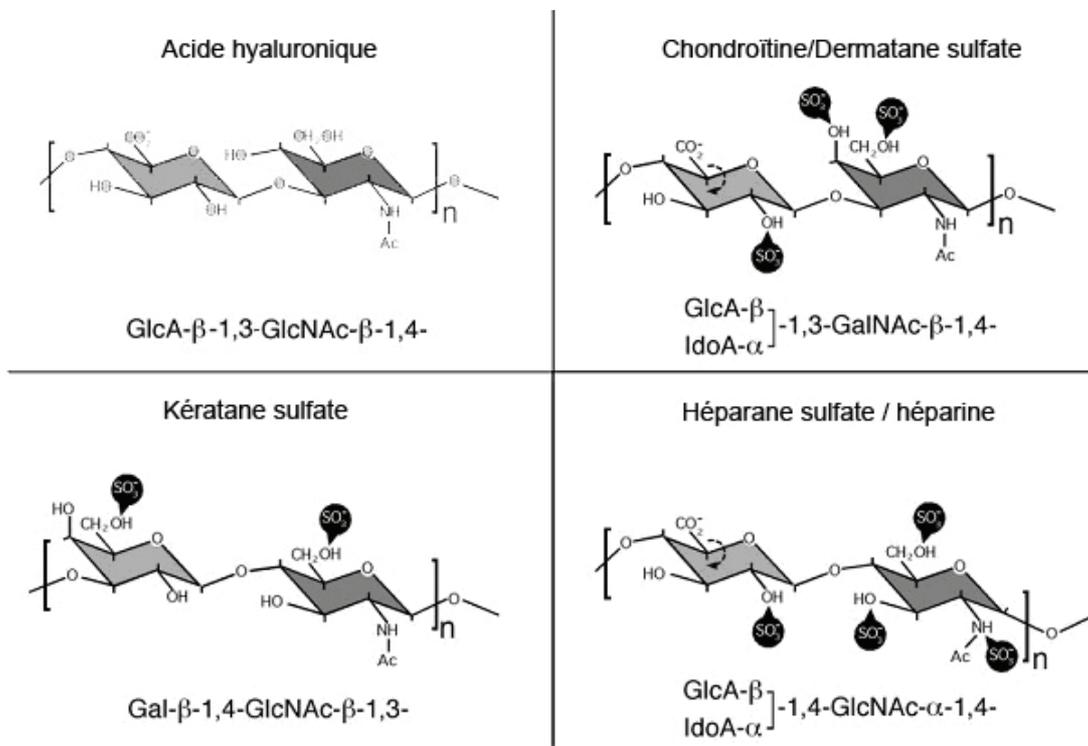


Figure 1 : Structure des unités disaccharidiques des différents GAG.

Adapté de (Bandtlow & Zimmermann, 2000; Sasisekharan et al, 2006; Vynios et al, 2002). GlcA= acide D-glucuronique ; IdoA = acide L-iduronique ; GlcNAc = N-acétylglucosamine ; GalNAc = N-acétylgalactosamine ; Gal = galactose ; SO₃⁻ = site de sulfatation

1.1.1.1 Les glycosaminoglycane d'héparanes sulfates

Les GAG d'HS sont des répétitions de disaccharides composés d'une N-acétyl-D-glucosamine et d'un acide glucuronique ou de son épimère en C5, l'acide iduronique (Figure 1) (Sarrazin et al, 2011). La liaison entre l'acide glucuronique et la glucosamine est de type $\beta(1,4)$, alors que les autres liaisons sont de type $\alpha(1,4)$.

Synthèse

La synthèse des chaînes d'HS s'effectue en trois phases : l'initiation de la chaîne, l'élongation et les modifications postsynthétiques.

La biosynthèse des HS commence dans le cytoplasme avec la synthèse des monosaccharides. Les monosaccharides sont ensuite transportés dans l'appareil de Golgi. L'attachement d'un résidu xylose (Xyl) à un résidu sérine du cœur protéique du protéoglycane initie la formation de la chaîne d'HS (Figure 2).

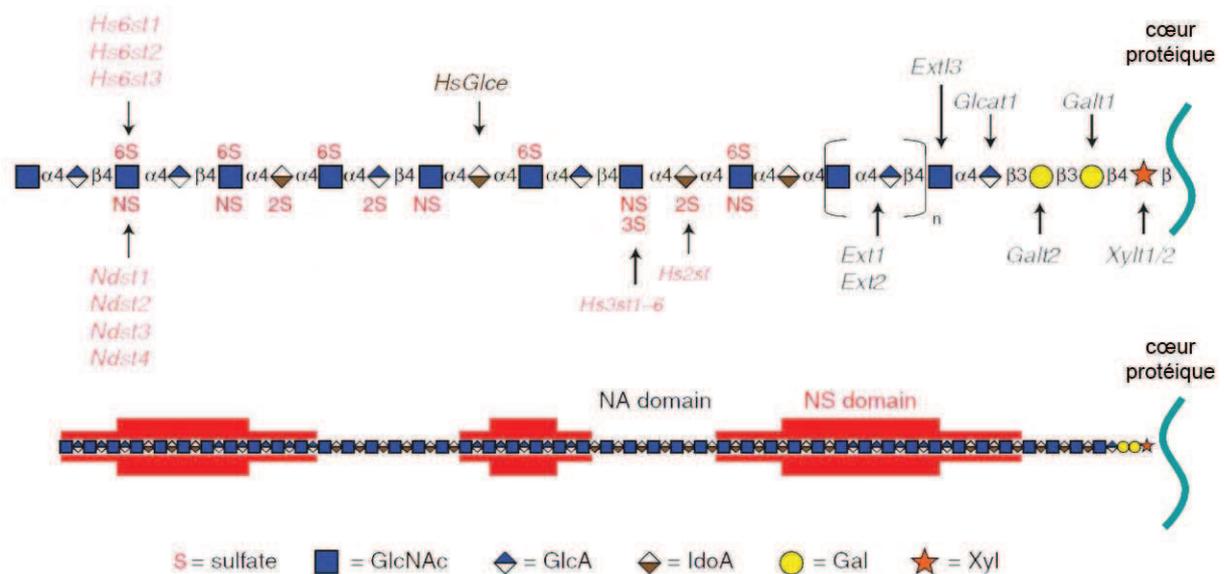


Figure 2 : Synthèse des héparanes sulfates.

Adapté de (Sarrazin et al, 2011). GlcNAc = N-acétylglucosamine ; GlcA= acide D-glucuronique ; IdoA = acide L-iduronique ; Gal = galactose ; Xyl = xylose ; NA domain = domaine pauvre en sulfate ; NS domain = domaine riche en sulfate ; en noir = les enzymes de synthèse, en rouge = les enzymes de modification.

Puis se forme une séquence consensus de liaison, appelée tétrasaccharide d'ancrage, composée de deux résidus de galactose (Gal) et d'un acide glucuronique (GlcA-Gal-Gal-Xyl). Chaque réaction est catalysée par des glycosyltransférases spécifiques. Ces glycosyltransférases sont respectivement la xylosyltransférase (Xylt), la galactosyltransférase I (Galt1), la galactosyltransférase II (Galt2) et enfin la glucuronyltransférase I (GlcA1). L'enzyme Ext13 attache le premier résidu de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) et le complexe enzymatique constitué d'Ext1 et d'Ext2 permet la fixation alternative d'acide glucuronique (GlcA) et de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) et ainsi l'élongation des chaînes (Figure 2).

Simultanément, les chaînes subissent dans l'appareil de Golgi une série de modifications qui commence par la déacétylation et la sulfatation des groupes aminés par les enzymes Ndst, pour N-déacétylase-N-sulfotransférases. Le carbone C5 de l'acide glucuronique (GlcA) peut subir une épimérisation par la C5 épimérase (HsGlce) qui le convertit en acide iduronique (IdoA). La présence d'IdoA favorise alors la 2-O sulfatation de l'IdoA par la 2-O-sulfotransférase (Hs2st) et bloque l'épimérisation. D'autres O- et N- sulfatations des saccharides sont effectués par d'autres sulfotransférases telles que l'Hs3st et les Hs6st. Ces mécanismes créent, au sein d'une même chaîne d'HS, des régions très sulfatées appelées les domaines NS (NS-domain) et des régions non modifiées, non sulfatées, appelées domaines NA (NA-domain). Les chaînes d'HS peuvent encore être modifiées une fois à la membrane plasmique ou dans le MEC, par deux endosulfatases (Sulf1 et Sulf2) qui suppriment spécifiquement des sulfatations en C6 des glucosamines (Ai et al, 2006). Les 6-O-sulfatations le long des chaînes d'HS sont spécifiques à chaque tissu et régulées de façon dynamique pour moduler la signalisation extracellulaire dépendante des protéoglycanes d'héparanes sulfates (HSPG).

Toutes ces modifications permettent d'offrir à cette succession de disaccharides une grande hétérogénéité structurale. Il existe ainsi, en théorie, 48 disaccharides d'HS différents. Mais pour l'instant, seulement 23 structures différentes ont été identifiées (Esko & Selleck, 2002).

Les structures variées des GAG d'HS leur confèrent de multiples rôles dans des mécanismes biologiques divers tels que le développement embryonnaire, l'angiogenèse, l'inflammation, la différenciation cellulaire, etc. Ces fonctions sont relayées par des partenaires protéiques avec lesquels les HS interagissent.

Interactions GAG d'HS-protéines

Les interactions entre les saccharides d'héparanes sulfates et les protéines sont multiples. Elles ont été étudiées grâce à l'utilisation de l'héparine. L'héparine est plus sulfatée que les HS. En moyenne, l'héparine contient 2,3 groupes sulfates par disaccharides, alors que les HS n'en contiennent que 0,8 (Sarrazin et al, 2011). Les ligands des HS/héparines sont des facteurs de croissance, des cytokines, des enzymes ou des protéines de la matrice extracellulaire. Il est maintenant avéré que la liaison des chaînes saccharidiques sur des protéines ne résulte pas uniquement d'interactions électrostatiques entre les sulfates et les résidus protéiques basiques, mais qu'elle engage des motifs saccharidiques plus ou moins spécifiques. L'étude de ces

interactions a permis de définir des séquences consensus fondées sur la taille et la charge des séquences linéaires d'HS (Figure 3).

Protéines de liaison aux HS/héparine	Oligosaccharides mis en jeu dans l'interaction
Antithrombine III	<p>pentasaccharide</p> <p>-GlcNAc-GlcA-GlcNAc-IdoA-GlcNAc-</p> <p>6S 3S NS 2S 6S</p>
Annexine	<p>répétition de disaccharides</p> <p>(-IdoA-GlcNAc-) n≥2</p> <p>6S 2S 6S</p>
FGF2	<p>pentasaccharide</p> <p>-GlcA-GlcNAc-GlcA-GlcNAc-IdoA-</p> <p>6S 6S 2S 6S</p>
Lipoprotéine lipase	<p>hexasaccharide</p> <p>-GlcNAc-IdoA-GlcNAc-IdoA-GlcNAc-IdoA-</p> <p>6S 2S 6S 2S 6S 2S</p>

Figure 3 : Exemples de protéines de liaison aux HS et des séquences saccharidiques mises en jeu dans ces interactions.

D'après (Esko & Linhardt, 2009; Sarrazin et al, 2011; Sasisekharan et al, 2006). GlcNAc = N-acétylglucosamine ; GlcA= acide D-glucuronique ; IdoA = acide L-iduronique ; 6S = sulfatation en C6 ; 2S = sulfatation en C2 ; 3S = sulfatation en C3 ; NS = sulfatation du groupe amine ; FGF2 = *fibroblast growth factor type 2*.

Le fragment minimum varie d'un tétrasaccharide, décrit pour l'interaction des HS avec l'annexine V, jusqu'à un dodécasaccharides, pour l'interaction avec le récepteur au FGF (pour *fibroblast growth factor*). L'interaction la mieux décrite dans la littérature est celle avec l'antithrombine III. Cette interaction confère à l'héparine ses propriétés anticoagulantes. Cette interaction met en jeu une séquence très spécifique de saccharides, un pentamère possédant des sulfatations essentielles à l'activité biologique : une 6-O-sulfatation sur la glucosamine du côté non réducteur et une 3-O-sulfatation sur la glucosamine interne (Esko & Linhardt, 2009). Par ailleurs, une autre interaction HS-protéines a été largement décrite, celle entre les HS, les FGF et leur récepteurs. Les motifs des chaînes d'HS fixant les FGF sont constitués d'unités saccharidiques IdoA2S-GlcNS répétées deux à six fois, le taux de fixation de FGF augmentant avec le nombre de répétitions. De façon générale, des tétrasaccharides ou des hexasaccharides sont suffisants pour fixer le FGF avec une bonne affinité. Cependant, seuls des motifs de 8 à 12 saccharides permettent la formation d'un complexe ternaire FGF/FGFR/HS.

Les caractéristiques structurales des saccharides d'HS mis en jeu dans les interactions HS-ligands ne sont pas toutes aussi bien détaillées. Par exemple, la taille minimum de la chaîne saccharidique d'HS nécessaire à l'interaction, de faible affinité, des HS avec la fibronectine

n'est pas connue. Par contre, une longue chaîne oligosaccharidique est nécessaire pour une liaison de haute affinité (Ingham et al, 1990) et cette liaison nécessite absolument une N-sulfatation des HS (Lyon et al, 2000; Mahalingam et al, 2007).

Enfin, une analyse récente a également permis de mettre en évidence l'interaction in vitro entre des saccharides d'HS, ou d'héparine, avec des intégrines ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, et $\alpha v\beta 5$). Cette étude révèle une structure minimum de huit saccharides d'HS pour inhiber cette interaction (Faye et al, 2009).

La diversité des protéines susceptibles d'interagir avec les GAG d'héparanes sulfates confère aux HSPG des rôles multiples au cours du développement, de l'angiogenèse, de la pousse axonale, la pathogenèse microbienne et l'anticoagulation (de Wit & Verhaagen, 2007; Sasisekharan et al, 2006). S'ajoutent à ces multiples rôles des fonctions propres à chaque type de cœur protéique portant les GAG d'HS.

1.1.1.2 Le cœur protéique des HSPG

Le cœur protéique des HSPG détermine leur localisation et donc leurs fonctions. La serglycine est le seul protéoglycane intracellulaire connu. Il existe deux grandes familles d'HSPG membranaires, les syndécans et les glypicans, deux HSPG solubles dans la MEC, le perlécan et l'agrine et des HSPG minoritaires telles que le collagène XVIII, le CD44, le bétaglycan ou le testican (Figure 4).

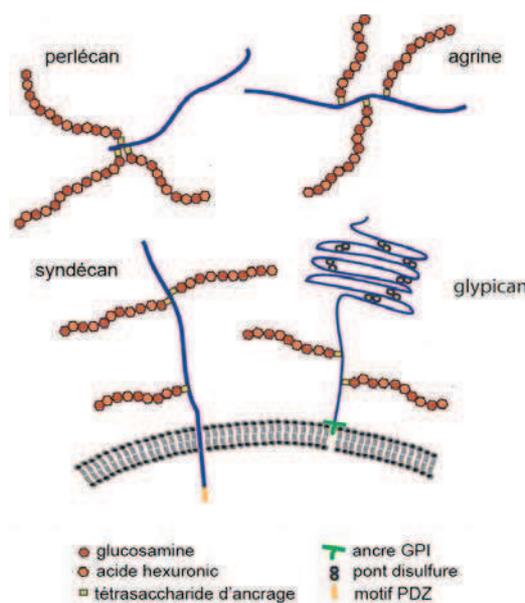


Figure 4 : Les principaux protéoglycanes d'héparanes sulfates.

D'après (Rhiner & Hengartner, 2006).

1.1.1.2.1 Le perlécan

Le perlécan tient son nom de sa ressemblance avec un collier de perles lorsqu'il est observé en microscopie électronique. La partie protéique du perlécan est l'une des plus grandes protéines, chez les vertébrés (800 kDa) et les invertébrés (470 kDa) (Iozzo, 2005). Cette protéine modulaire possède cinq domaines. Trois chaînes d'HS sont liées à l'extrémité N-terminale et une autre potentiellement liée sur la partie C-terminale. Sa composition modulaire lui permet d'interagir avec de nombreux partenaires protéiques. Par exemple, la partie C-terminale peut interagir avec le dystroglycan ou l'intégrine $\beta 1$ (Whitelock et al, 2008).

Le perlécan est présent dans la membrane basale de la plupart des cellules endothéliales et épithéliales. Il peut également être associé à la surface cellulaire grâce à ses interactions avec les intégrines. Le perlécan interagit notamment avec l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ à la surface des cellules endothéliales (Bix & Iozzo, 2005) et l'intégrine $\beta 3$ (Hayashi et al, 1992). Ces interactions sont sensibles à la présence des GAG. Ces GAG agissent comme des régulateurs (Hayashi et al, 1992).

Le perlécan est un protéoglycane ubiquitaire. Il assure un rôle important dans la voie de signalisation des facteurs de croissance et notamment des FGFs. Il contrôle ainsi de multiples processus biologiques tels que la chondrogenèse et la formation de l'os, le développement des vaisseaux sanguins normaux et tumoraux (Whitelock et al, 2008) et également la mise en place de la jonction neuromusculaire, où il permet l'ancrage de l'acétylcholinestérase (Arikawa-Hirasawa et al, 2002). Environ 50% des embryons de souris déficients pour le perlécan (KO) meurent entre le dixième et le douzième jour du développement embryonnaire. L'autre moitié possède de sévères défauts au niveau du cartilage et du cerveau et décède de troubles respiratoires assez rapidement après leur naissance.

Plus récemment, le perlécan a été impliqué dans le développement du système nerveux central. Les embryons des souris déficientes pour le perlécan développent un télencéphale de petite taille en conséquence d'une réduction de la neurogenèse ventriculaire (Giros et al, 2007).

1.1.1.2.2 L'agrine

L'agrine est un protéoglycane avec une protéine cœur de 220kDa. Au moins 3 chaînes d'HS sont fixées sur la partie protéique, d'où une masse moléculaire apparente de 600 kDa (Figure 5).

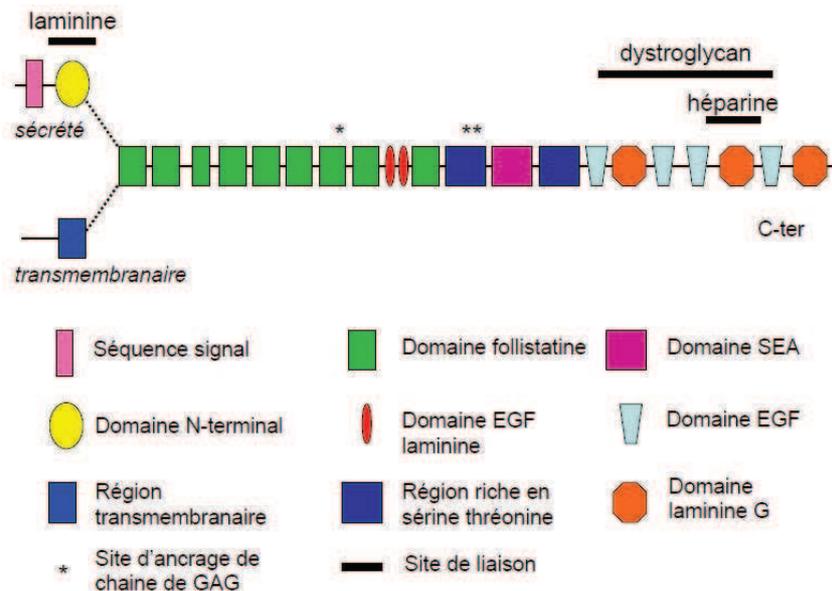


Figure 5 : Structure du protéoglycane agrine.

Adapté de (Kroger & Schroder, 2002). SEA = *sea urchin sperm protein, enterokinase, agrin* ; EGF = *epidermal growth factor*.

Des sites de liaison aux laminines, à l'héparine et à l' α -dystroglycan se retrouvent sur la partie C terminale de l'agrine. Du côté N-terminal du protéoglycane, un épissage alternatif permet de donner naissance à deux isoformes d'agrine : un HSPG soluble abondant dans la matrice extracellulaire des membranes basales et une forme transmembranaire de type II enrichie à la membrane des neurones en maturation du système nerveux central embryonnaire (Kroger & Schroder, 2002) (Figure 5).

L'agrine a été largement décrite pour ses fonctions au niveau de la jonction neuromusculaire. Sécrété par le motoneurone, ce protéoglycane stabilise l'agrégation du récepteur de l'acétylcholine de la fibre musculaire et maintient la différenciation postsynaptique via son récepteur MuSK couplé à Lrp4 (Wu et al, 2010). Cette formation d'agrégats de récepteur

dépendant de l'agrine est modulée par les intégrines, notamment par l'intégrine $\alpha\beta 1$ (Martin & Sanes, 1997).

Dans le cerveau murin, l'agrine est exprimée au cours de la synaptogenèse (Stone & Nikolics, 1995) et chez l'adulte au niveau de régions de forte plasticité synaptique : l'hippocampe et le cortex (O'Connor et al, 1994). In vitro, l'agrine module la pousse neuritique dépendant du FGF2 et du FGFR (Kim et al, 2003) et est impliqué dans la formation des filopodes dendritiques et la formation des synapses (Annies et al, 2006; McCroskery et al, 2009). Les chaînes de GAG de la partie N-terminale de l'isoforme transmembranaire de l'agrine assurent un rôle important dans la formation des filopodes des cellules neuronales, formation dépendante des voies de signalisation de Rac1 et Cdc42 (Lin et al, 2010).

Enfin, l'agrine et l'amyloïde β sont colocalisées dans les cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer. In vitro, l'agrine lie l'amyloïde β fibrillaire, de façon dépendante des chaînes de GAG de l'agrine. Cette liaison accélère la formation de fibrilles et protège l'amyloïde β de la dégradation. Ces observations suggèrent que l'agrine peut avoir un impact sur le dépôt d'amyloïde β , son agrégation et sa persistance, et donc être un acteur de la pathologie observée chez les patients atteints par la maladie d'Alzheimer (Cotman et al, 2000).

1.1.1.2.3 Les syndécans

Structure des syndécans

Chez les mammifères, la famille des syndécans est composée de quatre protéines issues de quatre gènes distincts : le syndécan-1 ou syndécan, le syndécan-2 ou fibroglycan, le syndécan-3 ou N-syndécan et le syndécan-4 ou amphiglycan/ryudocan (Figure 6).

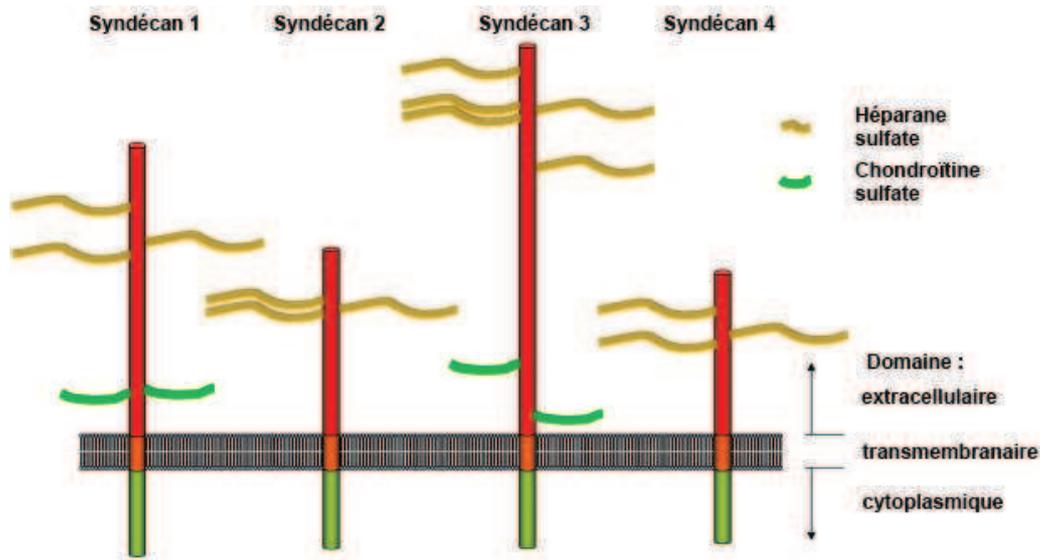


Figure 6 : Les différents types de syndécans exprimés chez les mammifères.
Adapté de (Okina et al, 2009)

Toutes les cellules expriment au moins une forme de syndécan, la plupart plusieurs. Le profil d'expression varie en fonction du type cellulaire, du tissu, ainsi qu'au cours du développement et de la différenciation cellulaire. Par exemple, le syndécan-3 s'exprime principalement dans le système nerveux central, le syndécan-1 se retrouve sur les cellules épithéliales et les cellules circulantes malignes. Le syndécan-2 est présent sur les cellules endothéliales et les fibroblastes. Enfin le syndécan-4, moins sélectif, est exprimé sur la plupart des cellules (Okina et al, 2009).

Le cœur protéique des syndécans est composé de quatre domaines :

- (1)- d'un peptide signal N-terminal, qui permet la sécrétion des syndécans à la membrane.
- (2)- d'un domaine extracellulaire.

Ce domaine possède 3 à 5 séquences consensus pour l'attachement de chaînes de GAG. Ces sites sont situés aux 2 extrémités du domaine extracellulaire pour les syndécan-1 et syndécan-3, alors que les syndécan-2 et syndécan-4 portent des chaînes uniquement sur la partie distale du domaine extracellulaire.

- (3)- d'un domaine transmembranaire, de 24 ou 25 acides aminés fortement conservés dans l'évolution. Ce domaine semble être impliqué dans la dimérisation des syndécans.

- (4)- d'un domaine C-terminal cytoplasmique de 28 à 34 acides aminés. Le domaine cytoplasmique comprend une région variable (V) et deux régions constantes (C1 et C2). La région C1 permet l'interaction avec des protéines contenant un domaine FERM (pour *4.1*, *ezrin*, *radixin* and *moesin*). La région C2 contient une séquence EFYA qui permet

l'interaction des syndécans avec des protéines à domaine PDZ (pour *post-synaptic density 95*, *PSD-95*; *discs large*, *Dlg*; *zonula occludens-1*, *ZO-1*). La région variable a été principalement décrite pour le syndécan-4. Cette région cytoplasmique du syndécan-4 est capable de fixer le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) et d'activer la protéine kinase C α (PKC α). Cette région peut également interagir avec des protéines de signalisation ou de structures telles que CASK (pour *Calcium/calmodulin dependent serine protein kinase*), la syndesmose et la paxilline (Couchman, 2010).

Rôles des syndécans

Les syndécans agissent généralement en tant que corécepteurs, afin de localiser, réguler, et activer les facteurs de croissance, les cytokines et les chimiokines. Par exemple, le syndécan-1 soluble inhibe la voie de signalisation de FGF-2 alors que, fixé à la surface cellulaire, il l'active (Bernfield et al, 1999). Les syndécans modulent également la transduction des signaux extracellulaires à la cellule. Par exemple, chez les invertébrés et les vertébrés, les syndécans sont impliqués dans la guidance axonale et agissent notamment comme corécepteur du système Slit-Robo (Chanana et al, 2009; de Wit & Verhaagen, 2007). Les syndécans ont un rôle important au cours du développement du système nerveux (Xian et al, 2010). Des déficits neuronaux ont été observés chez la souris KO pour le syndécan-3. Le syndécan-3 est nécessaire à la migration des précurseurs neuronaux au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte (Hienola et al, 2006).

En tant que corécepteur, le syndécan-1 coopère avec les intégrines $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$ and $\alpha 6 \beta 4$ et participe à la régulation de la cascade de signalisation induite par l'intégrine $\alpha v \beta 3$, responsable du contrôle de la prolifération et la migration dans le cancer du sein (Beauvais & Rapraeger, 2004). Le site actif du syndécan-1, permettant l'activation de l'intégrine, est un peptide situé sur la partie extracellulaire du cœur protéique, indépendant des sites d'ancrage des chaînes de GAG. Ce peptide connu sous le nom de synstatin peut rentrer en compétition avec le syndécan-1 pour activer l'intégrine et donc agir comme un inhibiteur (Beauvais et al, 2009).

Dans les cellules 3T3, la surexpression du syndécan-2 induit l'extension de filopodes dépendante de l'activation de la Rho GTPase Cdc42 (Granes et al, 1999). Le domaine actif du syndécan-2 requis pour la pousse du filopode a été identifié dans la partie extracellulaire, bien

que le domaine cytoplasmique soit requis pour le recrutement des microfilaments d'actine (Granes et al, 2000).

Le syndécan-4 est le seul membre des syndécans impliqué dans la formation des plaques d'adhérence. Une surexpression de syndécan-4 cause un excès de formation des plaques et réduit drastiquement la migration cellulaire. De plus, le cytosquelette d'actine des fibroblastes délétes de leur syndécan-4 est altéré. Cette fonction du syndécan-4 est dépendante de son oligomérisation à la membrane, rendue possible par la présence des chaînes d'HS. Le domaine cytoplasmique recrute le PIP2 qui initie un changement conformationnel fournissant un site de liaison pour la protéine PKC α (Lim et al, 2003). PKC α active la voie de signalisation de RhoA permettant la formation des fibres de stress et des plaques d'adhérence par phosphorylation de la myosine II et de sa phosphatase (Xian et al, 2010). PKC active également la voie Rac (Bass et al, 2007) et peut activer FAK (pour *focal adhesion kinase*) (Wilcox-Adelman et al, 2002) responsable du réarrangement des microfilaments.

1.1.1.2.4 Les glypicans

Les glypicans sont des protéoglycanes liés à la face externe de la membrane plasmique par une ancre lipidique de type glycosyl phosphatidyl inositol ou ancre GPI (Figure 7).

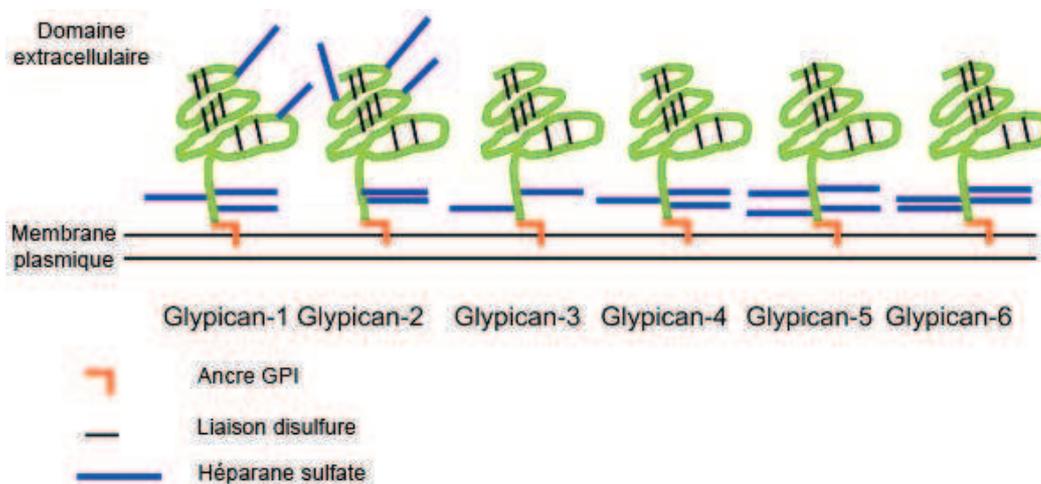


Figure 7 : Les structures des différents types de glypicans exprimés chez l'homme. D'après (Yoneda et al, 2012).

Ils forment une famille de six membres, chacun codé par un gène dans les génomes humain et murin. Le cœur protéique des glypicans contient entre 555 acides aminés et 580 acides aminés (60-70 kDa). Il se compose d'une extrémité N-terminale avec une séquence signal permettant la sécrétion, puis d'un domaine extracellulaire riche en cystéines. Dans les 50 derniers acides aminés de la partie C-terminale, à proximité de la membrane cellulaire, il existe 2 à 4 sites d'attachement de chaînes d'HS et une extrémité hydrophobe impliquée dans la liaison à l'ancre GPI (Filmus et al, 2008).

Les glypicans sont exprimés préférentiellement durant les phases de développement embryonnaire, et leurs niveaux d'expression varient en fonction du stade de développement et du type cellulaire. Une mutation sur le gène codant pour le glypican-3 est responsable du syndrome de Simpson-Golabi-Behmel, une maladie liée au chromosome X caractérisée par des anomalies du squelette, qui se manifeste par une croissance excessive dès la naissance (grosse langue, faciès grossier, anomalies rénales) (Pilia et al, 1996).

Au niveau du système nerveux central, les glypicans interagissent avec les protéines Slit pour réguler la guidance axonale et le développement du tissu nerveux (Ronca et al, 2001). Plus récemment, il a été montré que le glypican-1 modulait la taille du cerveau en régulant la voie de signalisation du FGF au cours de la neurogenèse (Jen et al, 2009).

Rapidement après leur passage postmitotique, les neurones expriment de façon transitoire le glypican-2 ou cerebroglycan. Ce protéoglycane est exprimé pendant la pousse axonale jusqu'au moment où l'axone atteint sa cible. Contrairement aux autres glypicans, le glypican-2 n'est plus exprimé dans le cerveau à l'âge adulte (Bandtlow & Zimmermann, 2000).

Comme l'agrine et le syndécan-3, le glypican-1 se retrouve dans les plaques amyloïdes qui s'accumulent dans les tissus atteints par la maladie d'Alzheimer, ce qui suggère une absence de spécificité des protéoglycanes accumulés (O'Callaghan et al, 2008; Watanabe et al, 2004).

La caractéristique essentielle qui définit les glypicans est l'ancre GPI. L'ancre GPI se révèle très importante pour le catabolisme des glypicans. Grâce à elle, la dégradation complète du protéoglycane se fait en moins de trente minutes (Yanagishita & Hascall, 1992).

1.1.1.3 La dégradation des HSPG

La durée de demi-vie des héparanes sulfates à la surface cellulaire est de 3 à 8 heures (Yanagishita & Hascall, 1992). Ils sont ensuite recyclés. Pour cela, ils sont, soit clivés, soit endocytés dans la cellule. Dans les endosomes, ils subissent une première digestion par des endoglycanases, les héparanases (Bame, 2001) (Figure 8).

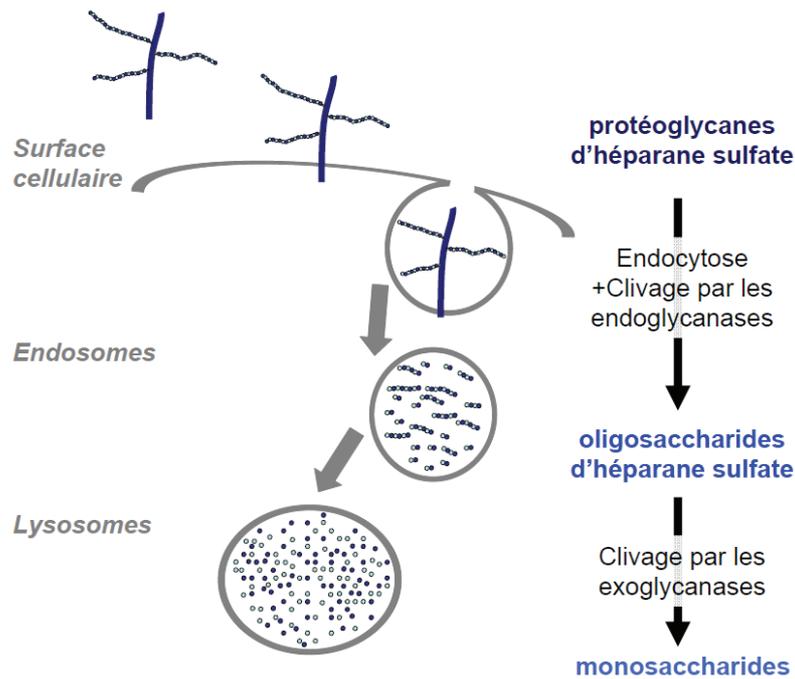


Figure 8 : Voie de dégradation des protéoglycanes d'héparanes sulfates.

Ces enzymes fragmentent les chaînes saccharidiques en oligosaccharides de 5kDa à 10kDa (de 10 saccharides à 20 saccharides) pour faciliter la dépolymérisation et supprimer les GAGs des cœurs protéiques (Stringer & Gallagher, 1997)(Figure 8).

Les parties protéiques sont alors recyclés dans l'appareil de Golgi afin d'être ornés de nouveaux profils oligosaccharidiques (Edgren et al, 1997).

Les endosomes fusionnent ensuite avec les lysosomes au sein desquels la dépolymérisation complète des GAGs sera achevée grâce à une variété d'exoglycanases. Ces exoglycanases agissent sur l'extrémité non-réductrice des fragments oligosaccharidiques. Les exoglycanases lysosomales se composent de trois glycosidases (α -L-iduronidase, β -glucuronidase et α -N-acétylglucosaminidase ou NAGLU), cinq sulfatases (iduronate sulfatase, glucosamine-6-

sulfatase, sulfaminidase, glucuronate-2-sulfatase et glucosamine-3-sulfatase) et une N-acétyltransférase qui agissent de façon séquentielle dans le lysosome (Figure 9).

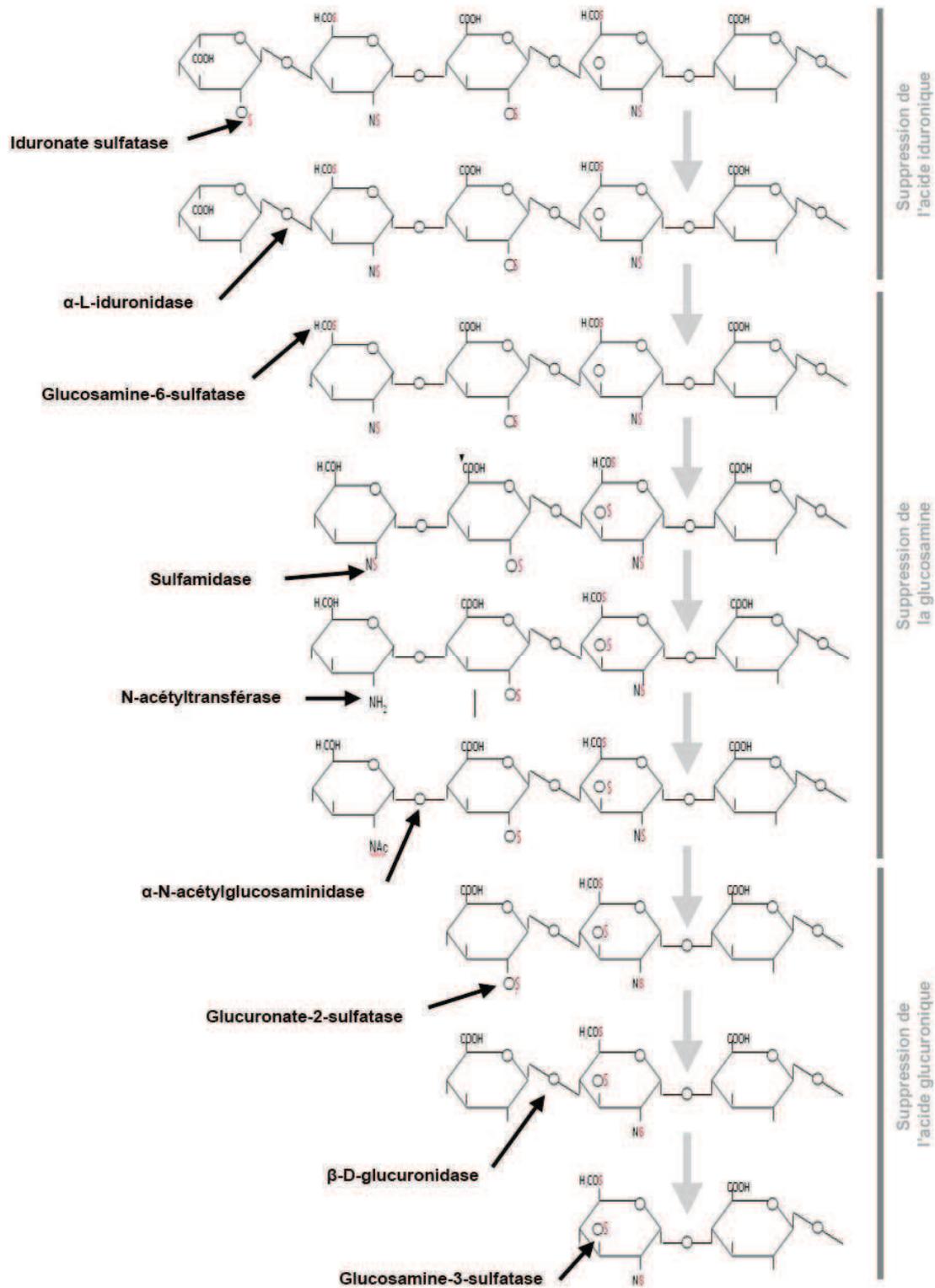


Figure 9 : Dégradation séquentielle des GAG d'HS par les exoglycanases lysosomales. D'après (Hopwood & Morris, 1990).

L'absence d'une seule de ces enzymes lysosomales, chez l'Homme, peut être à l'origine de pathologies graves telles que les mucopolysaccharidoses. La cause de ces maladies neurologiques souligne l'importance du recyclage des HS dans la physiologie normale de la cellule et suggère la toxicité d'un déséquilibre dans la composition de l'environnement cellulaire.

1.1.2 La matrice extracellulaire

1.1.2.1 Composition de la matrices extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau de macromolécules qui remplit l'espace extracellulaire. Les molécules matricielles sont sécrétées par les cellules et chaque MEC est spécifique du tissu et des cellules qui l'entourent. La communication intercellulaire s'organise dans ce réseau par interaction de ces macromolécules avec des récepteurs transmembranaires liés au cytosquelette. L'organisation en réseau permet le maintien de l'intégrité du tissu et lui donne ses propriétés biomécaniques. D'une manière générale, on peut distinguer deux types de composants de la MEC : les éléments fibrillaires, comme les collagènes et la fibronectine, et les éléments non fibrillaires, tels que l'acide hyaluronique et les protéoglycanes (Tanzer, 2006). Nous nous intéresserons ici plus particulièrement à la MEC du cerveau.

1.1.2.1.1 Les protéines fibreuses structurelles

Les protéines fibreuses structurelles de la MEC sont les collagènes et l'élastine. Le collagène est une protéine constituée de 3 chaînes polypeptidiques associées qui peuvent se combiner en une triple hélice caractéristique. Il existe 28 collagènes différents. Chaque type de collagène possède une structure propre et se trouve dans des organes particuliers. Par exemple, le collagène de type I intervient dans la formation de la peau, des tendons, des os et de la cornée, tandis que le collagène de type III se trouve au niveau du système cardiovasculaire. Dans le système nerveux central, les collagènes sont rarement en périphérie des neurones mais

occupent le plus souvent une position marginale, par exemple dans les méninges. Cependant, au cours du développement, les collagènes participent à la guidance axonale ou à la synaptogenèse (Hubert et al, 2009).

L'élastine est une protéine fibreuse sécrétée dans l'espace extracellulaire par les fibroblastes, essentiellement durant la croissance. L'élastine est présente dans la peau, les poumons, les vaisseaux sanguins, les tissus conjonctifs, mais pas dans le système nerveux central.

1.1.2.1.2 Les protéines fibreuses adhésives

Les protéines adhésives permettent l'adhérence de la cellule à la matrice extracellulaire. Parmi les protéines les plus ubiquitaires, on trouve la fibronectine et les laminines. Il existe d'autres protéines adhésives plus ou moins spécifiques des tissus dans lesquelles elles se retrouvent. Par exemple, la vitronectine, la thrombospondine, les ténascines sont principalement retrouvées dans le cerveau.

Fibronectine

La fibronectine joue un rôle important dans l'adhérence des cellules. Au moins 20 chaînes de fibronectine ont été identifiées et proviennent toutes de l'épissage alternatif d'un gène commun de fibronectine (Pankov & Yamada, 2002). La fibronectine est constituée de deux sous-unités de 220 à 250 kDa, liées entre elles à leur extrémité C-terminale par un pont disulfure, formant ainsi un dimère (Figure 10).

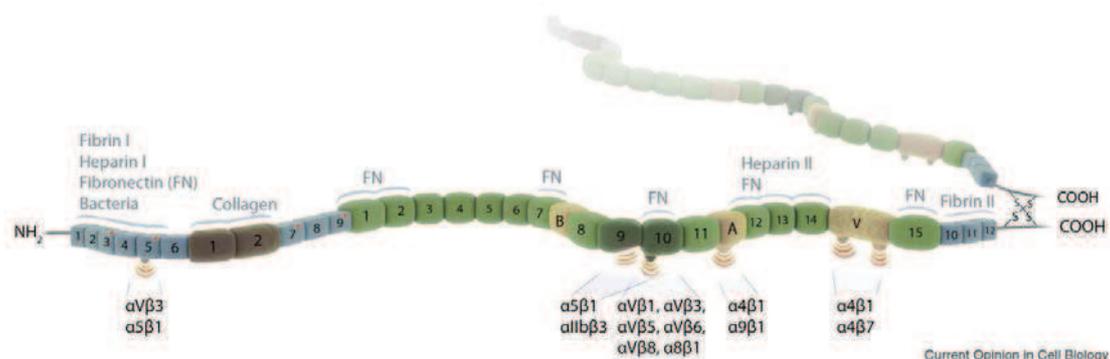


Figure 10 : Structure modulaire et site d'interaction de la fibronectine.
D'après (Leiss et al, 2008).

La fibronectine est sécrétée par la cellule sous forme d'une glycoprotéine dimérique. Les dimères sécrétés ont la capacité de s'assembler en une matrice fibrillaire multimérique par un processus appelé fibrillogenèse (Schwarzbauer & DeSimone, 2011). Les fibrilles multimériques de fibronectine sont les principales formes fonctionnelles de la protéine.

La fibrillogenèse nécessite l'interaction des fibronectines avec la cellule. La fibronectine contient des domaines de fixation pour de nombreuses protéines (Leiss et al, 2008). Les intégrines interagissent avec les molécules de fibronectine grâce, notamment, à leur séquence de type RGD reconnue par les intégrines. Les intégrines sont suffisantes pour induire la fibrillogenèse. A faible concentration, l'assemblage de la matrice fibrillaire nécessite l'interaction avec certains protéoglycane. La fibronectine contient trois domaines de fixation à l'héparine ou aux HS. La liaison entre la fibronectine et les HS est une liaison de faible affinité, mais de grande avidité grâce à l'agrégation des fibronectines en fibrilles par les HS (Stepp et al, 2010).

Laminines

Les laminines sont abondantes dans les membranes basales. Ce sont des hétérotrimères, en forme de croix, composés de trois chaînes α , β et γ . Il existe 5 chaînes α , 3 chaînes β et 3 chaînes γ , connues à ce jour, chez la souris et chez l'homme. Chacune des chaînes est codée par un gène. Il existe ainsi 16 laminines distinctes (Aumailley et al, 2005). Les laminines interagissent avec les protéoglycane d'héparanes sulfates, le dystroglycan et les intégrines (Carulli et al, 2012; Miner & Yurchenco, 2004; Timpl et al, 2000).

Des mutations des gènes codant pour les laminines chez les humains et les souris ont démontré un rôle crucial pour les laminines dans divers tissus, y compris les muscles, les reins, les poumons, la peau et le placenta (Miner & Yurchenco, 2004). Les laminines peuvent moduler certaines fonctions cellulaires comme la différenciation des cellules épithéliales. L'implication des laminines dans le développement du système nerveux central est récente. En 2002, il a été montré que des mutations du site de liaison au nidogen de la chaîne $\gamma 1$ entraînent une migration neuronale aberrante et désorganise la lamination corticale (Halfter et al, 2002). De plus, la présence des chaînes $\beta 2$ et $\gamma 3$ a effet dose-réponse sur le développement cortical et le KO $\beta 2/\gamma 3$ provoque la fracture de la lame basale sous la pie-mère (Radner et al, 2012). Des études *in vitro* et *in vivo* ont également montré que le contact des neurones avec la laminine est responsable de l'activation polarisée de l'intégrine $\beta 1$, de la stabilisation polarisée des microtubules et de l'initiation de l'axone (Lei et al, 2012)

1.1.2.2 Structures de la matrice extracellulaire

Les matrices extracellulaires sont de composition différente en fonction des tissus. Nous prendrons ici exemple des différentes structures de la MEC retrouvées dans le système nerveux central (SNC).

D'un point de vue historique, le SNC a d'abord été considéré comme un tissu dépourvu de MEC. En effet, la matrice extracellulaire, définie comme « la structure extracellulaire observable en microscopie électronique » n'était pas observable. Les techniques classiques de fixation pour la microscopie électronique provoquaient l'absorption du liquide extracellulaire par les cellules et la disparition de l'espace extracellulaire (Cragg, 1980). S'il était juste de dire que le SNC apparaissait comme un tissu dépourvu d'une MEC directement observable, l'existence de celle-ci n'était pas contestable. Effectivement, des extractions du SNC montraient la présence d'acide hyaluronique et de protéoglycanes, molécules typiques des MEC (Margolis et al, 1975). Seules des techniques de fixation spécifiques, par un prétraitement au sucrose, ont permis d'observer un espace extracellulaire dans le SNC (Cragg, 1980). Cet espace extracellulaire représente un compartiment qui rétrécit au cours du développement et certains auteurs estiment qu'il représente 20% du volume total du cerveau adulte (Nicholson & Sykova, 1998). En comparaison, la matrice osseuse occupe 95 % du volume de ce tissu. L'espace extracellulaire du SNC est occupé par une matrice quasiment unique avec une organisation structurale fondée sur l'acide hyaluronique qui agrège les protéoglycanes (Rauch, 2004). Dans le SNC, la matrice extracellulaire s'organise en structures spécialisées. Ces structures sont les lames basales ou les matrices péricellulaires.

Structure en lame basale

Présente dans tous les tissus épithéliaux, la lame basale est une structure bien définie de la MEC, permettant le soutien et l'adhérence de l'épithélium. La lame basale est composée essentiellement par des protéoglycanes, du collagène de type IV, des molécules de fibronectine et de laminine. Avec la lame réticulaire sécrétée par le tissu conjonctif, la lame basale forme la membrane basale. La membrane basale des méninges et la lame basale des vaisseaux sanguins sont des matrices extracellulaires spécialisées, composées d'un réseau moléculaire organisé et relativement bien connu (Engelhardt & Sorokin, 2009).

Au cours du développement embryonnaire, la MEC s'organise en lame basale dans le néocortex formé de différentes couches.

La couche la plus superficielle est la lame basale à la face interne de la pie-mère et se constitue principalement de laminine. Le perlécan compose également cette structure spécialisée de MEC. Puis, une zone marginale sécrète la reeline, indispensable à la mise en place des couches corticales. Les protéoglycanes de chondroïtines sulfates se concentrent dans la zone intermédiaire. Enfin la zone ventriculaire repose sur une couche de laminine (Figure 11A).

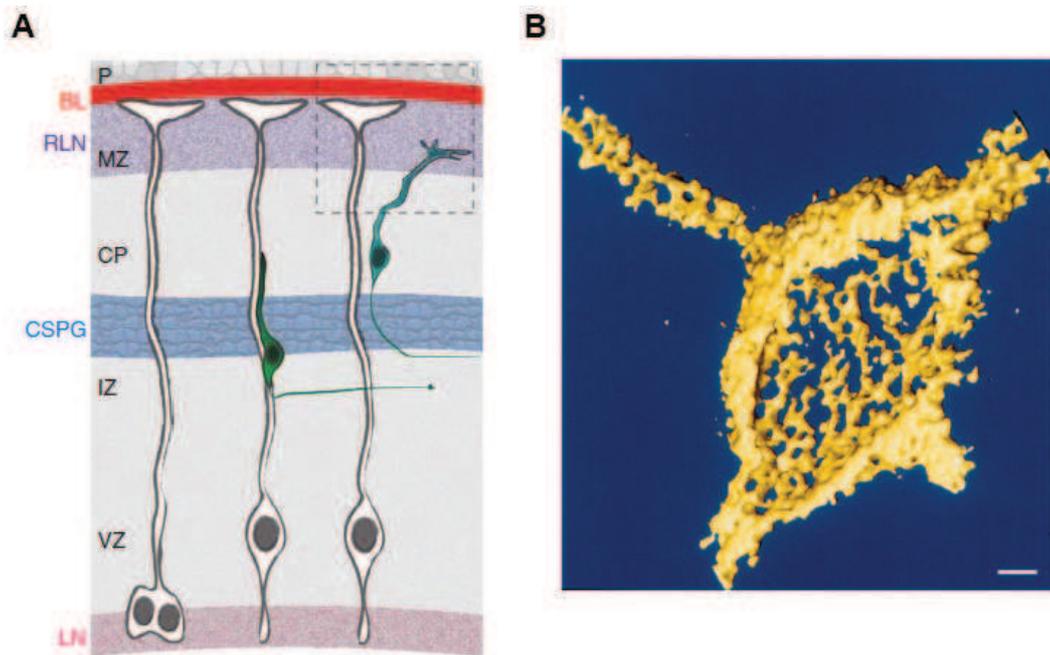


Figure 11 : Exemples d'organisation de la MEC du SNC, en lame basale (A) ou en réseau périneural (B).
A : schéma du néocortex en développement. Pie-mère (P) ; lame basale (BL) ; zone marginale (MZ) ; plaque corticale (CP) ; protéoglycanes (PG) ; zone intermédiaire (IZ) ; zone ventriculaire (VZ), laminine (LN). D'après (Barros et al, 2011).
B : reconstitution 3D du réseau périneuronal d'un neurone du cortex somatosensoriel de rat (barre=1µm). D'après (Celio et al, 1998).

Structure en matrice péricellulaire

La MEC entourant les cellules est qualifiée de matrice péricellulaire. Les astrocytes en culture produisent une matrice péricellulaire constituée principalement d'acide hyaluronique et de protéoglycanes, mais aussi de tenascine et versican (Dityatev et al, 2010). Les réseaux périneuronaux (ou PNN pour *perineuronal nets*) sont un exemple particulier de matrice péricellulaire dans le SNC (Figure 11B). Observés par Camillo Golgi et Santiago Ramon y Cajal en 1890, les PNN sont des matrices péricellulaires très épaisses entourant les corps cellulaires et dendrites proximales des neurones laissant des « trous » pour les contacts synaptiques. Les PNN contiennent principalement de l'acide hyaluronique, des tenascines R

et des protéoglycanes de chondroïtine sulfate et d'héparanes sulfates (Celio et al, 1998). Les PNN n'apparaissent qu'à la fin du développement postnatal, lorsque les synapses matures sont établies et stabilisées. Ces structures spécialisées de la MEC ont été récemment impliquées dans des mécanismes de neuroprotection, de stabilisation synaptique et de plasticité synaptique (Wang & Fawcett, 2012).

1.1.2.3 Rôles de la matrice extracellulaire

Les matrices extracellulaires assurent de nombreux rôles différents d'un tissu à l'autre. Le premier rôle décrit était celui de remplissage des espaces intercellulaires. Mais la variété de molécules de la MEC ne pouvait être simplement limitée à un rôle de remplissage et des fonctions sont maintenant décrites pour la MEC. Le principal rôle de la matrice extracellulaire est un rôle de support mécanique. En effet, dans des tissus tels que le tendon, l'organisation des protéines fibreuses permet la résistance à l'étirement. Dans l'os, la matrice confère une résistance à la compression.

La fonction mécanique de la MEC n'est pas la seule. La MEC prend part également aux fonctions cellulaires telles que le maintien de l'homéostasie, le contrôle de la prolifération cellulaire, la migration cellulaire et donc la constitution, la consolidation, le maintien et le remodelage de l'architecture tissulaire. Ces fonctions peuvent être assurées par les protéines matricielles ou des facteurs solubles. Ces facteurs sont sécrétés dans la matrice et leur diffusion est modulée par les molécules matricielles.

Le comportement d'une cellule dépend de l'environnement dans lequel elle évolue. La communication entre la cellule et son environnement est rendue possible par les interactions de la cellule avec sa matrice.

1.2 Interaction de la cellule avec son environnement

La cellule interagit avec son environnement matriciel grâce aux récepteurs situés à la membrane plasmique qui permettent la transduction des signaux extracellulaires à la cellule. Ces signaux peuvent être des molécules composants la MEC ou les facteurs solubles qui

diffusent dans cette matrice (hormones, facteurs de croissance, chimiokines, neurotransmetteurs...).

1.2.1 Récepteurs des facteurs solubles

Il existe de nombreux facteurs solubles, nous allons nous intéresser ici aux facteurs impliqués ou susceptibles d'être impliqués dans la physiopathologie des mucopolysaccharidoses : le FGF2, le TLR4 (pour *Toll-like receptor 4*) et le dystroglycan, récepteur de l'agrine et du perlécan.

1.2.1.1 Récepteurs du facteur de croissance FGF2

Le FGF2 ou bFGF (pour *basic FGF*) appartient à la famille des FGFs qui contient 23 membres chez les mammifères. Les FGFs lient de façon spécifique 5 récepteurs de surface dont 4 ont une activité tyrosine kinase intrinsèque. Le FGF2 lie ces 4 récepteurs appelés FGFR-1, 2, 3 et 4 (Mohammadi et al, 2005).

Structure des récepteurs au FGF2

Les récepteurs du FGF2 présentent une structure générale commune. La protéine se compose d'un domaine transmembranaire en hélice (Figure 12).

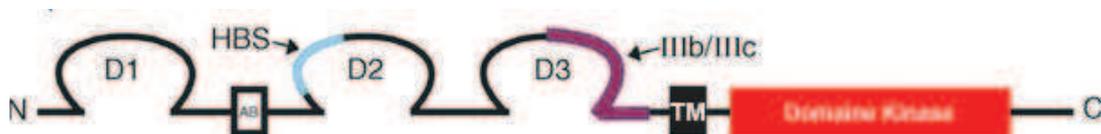


Figure 12 : Structure générale des récepteurs du FGF2.

D'après (Mohammadi et al, 2005). D1, D2, D3 = domaines Ig ; HBS = site de liaison à l'héparine ; AB = séquence riche en acides aminés ; TM = domaine transmembranaire.

La partie N-terminale de ces récepteurs contient une région extracellulaire avec trois domaines « Ig » (pour *immunoglobulin-like*) appelés D1, D2 et D3. Le domaine D2 interagit avec les HS (HBS pour *heparin binding site*). Tous les membres de la famille FGF ont une affinité pour les HSPG de surface qui participent à la formation des complexes FGF/FGFR et

à l'activation des récepteurs. Les domaines D2 et D3 forment le site d'interaction avec le FGF2. Le domaine D3 des FGFR1 et FGFR3 subit un épissage. Cet épissage crée deux exons alternatifs (IIIb et IIIc). Cet événement est spécifique du tissu dans lequel il se produit. L'isoforme « c » est mésenchymateuse alors que l'isoforme « b » est épithéliale. La partie C-terminale du récepteur contient un domaine kinase permettant l'autophosphorylation (Figure 12).

La dimérisation du FGFR, favorisée par les HSPG, est requise pour la trans-phosphorylation du récepteur et l'activation des molécules de signalisation en aval. Une classe importante de protéines de signalisation connue pour lier le complexe FGFR appartient au groupe des protéines à domaine SH2 (pour *src-homology 2*). Ces protéines sont notamment PLC γ , Grb2 ou Crk et agissent comme des adaptateurs (Figure 13). De façon générale, ces protéines sont impliquées dans les signalisations permettant la régulation du cytosquelette, du calcium, de la survie cellulaire ou bien de l'expression génique.

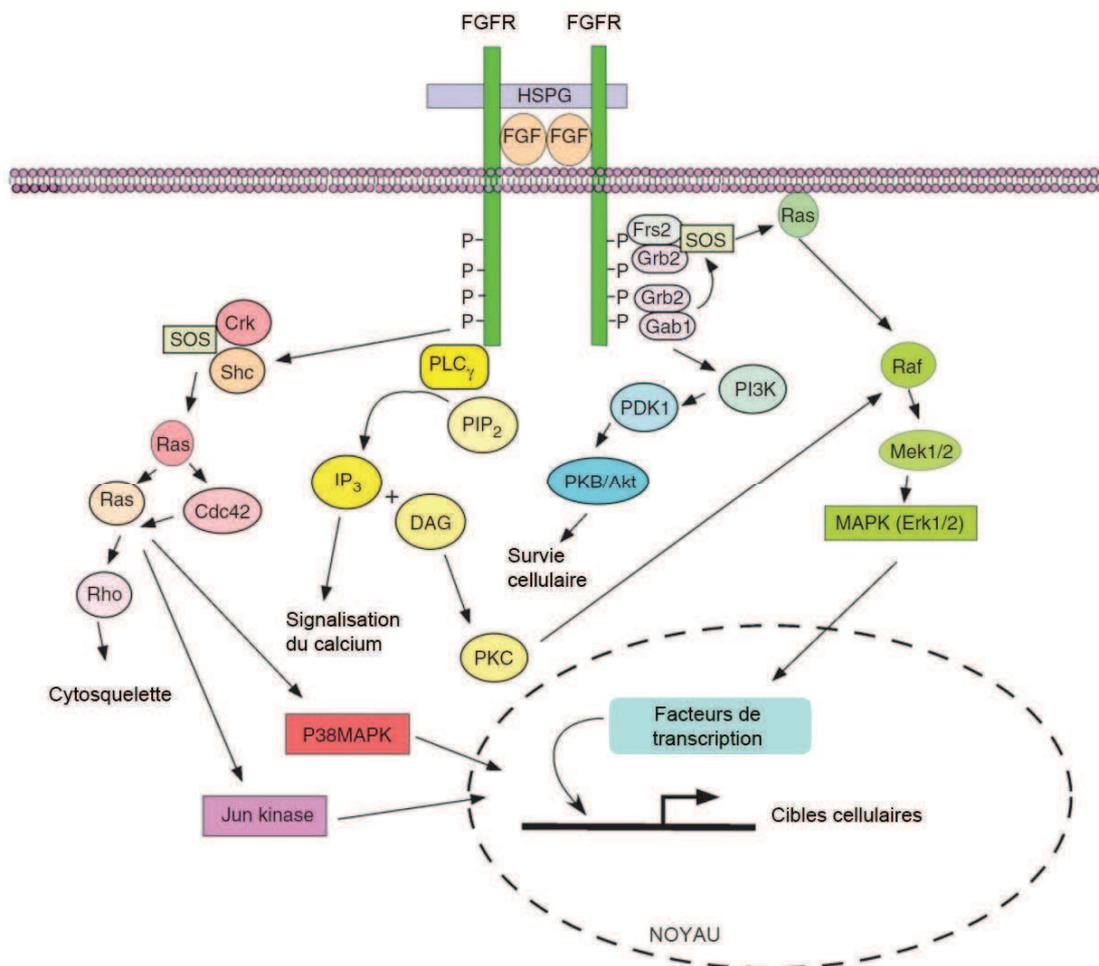


Figure 13 : Exemples des voies de signalisation induites par la fixation du FGF2 à son récepteur. D'après (Dailey et al, 2005; Eswarakumar et al, 2005).

Rôle du FGF2 dans le système nerveux central

L'expression du FGF2 est quasiment ubiquitaire. Cependant, la souris déficiente pour le FGF2 est viable (Dono et al, 1998). Les défauts observés chez cette souris sont très modérés. Le faible impact du KO FGF2 n'est pas dû à une compensation par le FGF de type 1 (Miller et al, 2000). Les phénotypes sont principalement des malformations cérébrales, notamment une désorganisation des couches corticales (Dono et al, 1998). Ces défauts soulèvent l'importance du FGF2 dans le développement du système nerveux central. Par la suite, le FGF2 a été impliqué dans la neurogenèse et la prolifération des précurseurs neuronaux, la différenciation des neurones dopaminergiques et GABAergiques, la pousse axonale et de l'arbre neuritique des neurones corticaux et hippocampaux, et dans les mécanismes de mémorisation (Reuss & von Bohlen und Halbach, 2003).

1.2.1.2 Récepteur TLR4

TLR4 est un récepteur de la réponse immunitaire innée. Ce récepteur permet la transduction du signal des agents du non-soi, via son adaptateur protéique MyD88, pour induire l'expression de chimiokines proinflammatoires. TLR4 interagit avec des composants du non-soi tels que les lipopolysaccharides présents à la surface des bactéries à gram négatif (Gay & Gangloff, 2007). Plus récemment, il a été montré que le TLR4 pouvait également être activé par des molécules endogènes, notamment par des oligosaccharides d'acide hyaluronique et des polysaccharides d'héparanes sulfates, pour réguler des voies de signalisation (Johnson et al, 2002).

Les effets de la présence d'oligosaccharides d'héparanes sulfates sur l'activation du récepteur TLR4 a été étudié récemment (Ausseil et al, 2008). Les auteurs ont montré que l'ajout de fragments d'héparanes sulfates, comme de LPS, pouvait activer les voies de signalisation induites par le récepteur TLR4 et son adaptateur MyD88 provoquant l'expression de chimiokines proinflammatoires. Cette activation participe à l'inflammation du système nerveux central observé dans la mucopolysaccharidose de type IIIB et des défauts de morphologie osseuse dans la mucopolysaccharidose de type VII (Simonaro, 2010; Smith et al, 2012).

1.2.1.3 Dystroglycan, récepteur de l'agrine et du perlécan

Les protéoglycanes solubles, l'agrine et le perlécan, interagissent à la surface de la membrane plasmique avec le dystroglycan. Le dystroglycan est un hétérodimère α et β provenant du même gène. Le clivage post-traductionnel de la glycoprotéine génère une sous-unité β transmembranaire et une sous-unité α extracellulaire. Le β -dystroglycan est reliée à l'extrémité C-terminale de l' α -dystroglycan, mais peut également agir individuellement. L' α -dystroglycan interagit avec les domaines LG (pour *Laminin globular domain*) des composants de la matrice extracellulaire : les sous-unités de laminine $\alpha1$ et $\alpha2$, l'agrine et le perlécan. La partie C-terminale du β -dystroglycan interagit indirectement avec les microfilaments d'actine, par l'intermédiaire de la dystrophine et l'utrophine (Figure 14).

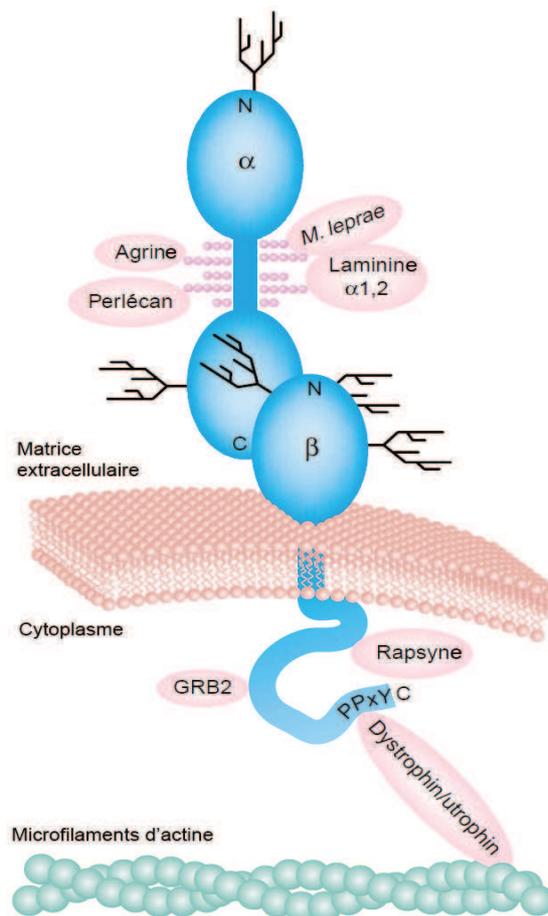


Figure 14 : Structure et interactions du dystroglycan.
D'après (Winder, 2001).

Plusieurs voies de signalisation en aval du dystroglycan ont été décrites, mais les preuves de leurs effets physiologiques sont minces (Langenbach & Rando, 2002; Zhou et al, 2006). Principalement étudié pour son rôle dans la mise en place de la jonction neuromusculaire, le dystroglycan a d'abord été découvert comme récepteur de la laminine dans le système

nerveux central. Son rôle au niveau du système nerveux est très peu détaillé dans la littérature. Il semble que le dystroglycan permette la réorganisation de la MEC, via ses interactions avec les laminines et les protéoglycanes d'héparanes sulfates. Il permet, comme les intégrines, de relier le cytosquelette d'actine à la MEC (Moore & Winder, 2010; Waite et al, 2009).

Plus récemment, il a été montré que le dystroglycan conduit localement l'activation de Cdc42 (Batchelor et al, 2007). Au même titre que l'intégrine $\beta 1$, le dystroglycan est impliqué dans la polarisation et la migration dirigée des astrocytes en culture (Peng et al, 2008). Toutefois, son effet semble être limité au regard de l'importance de l'intégrine dans ces mécanismes.

1.2.2 Intégrines, récepteurs des protéines matricielles

Les principaux récepteurs des protéines matricielles sont les intégrines. Ces protéines permettent à la cellule de communiquer avec son environnement matriciel et de s'adapter à son environnement. Le nom « intégrine » a été donné à ces récepteurs pour souligner leur importance dans la maintenance de l'intégrité du lien entre la matrice et le cytosquelette.

1.2.2.1 Intégrines

Structure

Les intégrines fonctionnelles sont constituées de deux types de sous-unités, α et β , associées de façon non covalente. Chez les vertébrés, la famille est composée de 18 sous-unités α et 8 sous-unités β qui peuvent s'assembler en 24 hétérodimères connus (Takada et al, 2007). L'expression des sous-unités des intégrines dépend du tissu ou du type cellulaire dans lequel elles s'expriment. Par exemple, les astrocytes murins expriment une grande variété d'intégrines à leur surface, mais n'expriment pas ou peu les sous-unités $\alpha 10$ et $\alpha 11$ (Figure 15).

A

Intégrines	Neurones	Cellules gliales
$\alpha 1\beta 1$	+	+
$\alpha 2\beta 1$	+	+
$\alpha 3\beta 1$	+	+
$\alpha 4\beta 1$	+	+
$\alpha 5\beta 1$	+	+
$\alpha 6\beta 1$	+	+
$\alpha 7\beta 1$	+	+
$\alpha 8\beta 1$	+	+
$\alpha 9\beta 1$	+	+
$\alpha 10\beta 1$		
$\alpha 11\beta 1$		
$\alpha v\beta 1$	+	+
$\alpha v\beta 3$	+	+
$\alpha 6\beta 4$		+
$\alpha v\beta 5$		+
$\alpha v\beta 6$	+	
$\alpha 6\beta 8$	+	+
$\alpha 4\beta 7$	+	
$\alpha D\beta 2$		
$\alpha L\beta 2$		+
$\alpha M\beta 2$		+

B

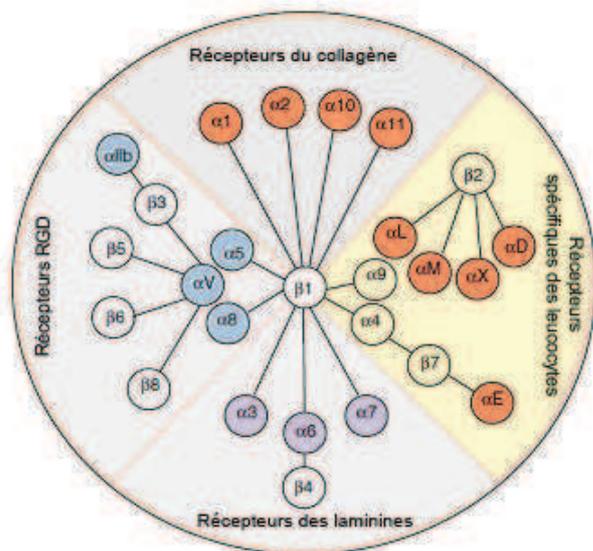


Figure 15 : Expression des sous-unités d'intégrines chez les vertébrés.

D'après (Barczyk et al, 2010; Wu & Reddy, 2012). (A) Intégrines exprimées dans les neurones ou les cellules gliales. (B) Intégrines classées en sous-groupes en fonction des propriétés de leur ligand et de leurs sous-unités

La spécificité cellulaire d'expression des intégrines dicte le type de protéines de la MEC que la cellule peut lier et détermine la signalisation en aval, le comportement et le destin de la cellule. En effet, les deux sous-unités des intégrines sont transmembranaires. La partie extracellulaire interagit avec les protéines de la MEC. La partie intracellulaire interagit avec des protéines du cytosquelette et de signalisation.

Interactions extracellulaires

La liste des ligands des intégrines est longue et comprend la plupart des composants de la MEC (Humphries et al, 2006). Un hétérodimère d'intégrine peut interagir avec plusieurs ligands et vice-versa. Par exemple, le dimère $\alpha 3\beta 1$ peut lier les collagènes, la fibronectine et la laminine, alors qu'au moins quatre hétérodimères contenant la sous-unité $\beta 1$ ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 1$) sont des récepteurs à la fibronectine.

Les intégrines reconnaissent des séquences spécifiques des protéines matricielles. Par exemple, la séquence RGD est présente dans des ligands tels que la fibronectine ou la

vitronectine. La séquence minimale des collagènes reconnue par les intégrines est une séquence GFOGER (O=hydroxyproline) avec une conformation en triple hélice (Barczyk et al, 2010).

Activation des intégrines

L'activation des intégrines entraîne la transduction d'un signal extracellulaire au cytoplasme. La force du signal transduit est dépendante de plusieurs paramètres : l'activation des intégrines, l'affinité du contact intégrine/ligand, le maintien du contact intégrine/ligand et la valence des contacts intégrine/ligand.

L'interaction des intégrines avec leurs ligands engendre un changement de conformation des intégrines et participe à leur activation (Figure 16). La conformation « repliée », identifiée par cristallographie, correspond à la forme inactive de l'intégrine, sauf si le ligand est petit (Askari et al, 2009; Nishida et al, 2006; Xiong et al, 2002).

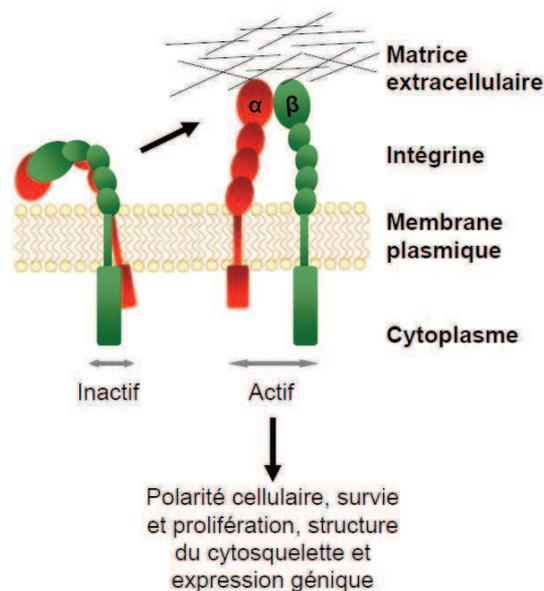


Figure 16 : L'interaction des intégrines avec leurs ligands extracellulaires.

Cette interaction change la conformation du dimère d'intégrine, contribue à l'agrégation des intégrines et déclenche des signaux intracellulaires qui contrôlent l'adhérence, la polarité cellulaire, l'architecture du cytosquelette, la survie et l'expression génique.

Par ailleurs, les tensions mécaniques permettent de consolider les contacts entre les intégrines et la MEC, stabilisent la forme active des intégrines et augmentent l'affinité des intégrines pour leurs ligands (Askari et al, 2009; Friedland et al, 2009). En culture, la rigidité du substrat contrôle la force de liaison entre l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ et la fibronectine, l'activation de l'intégrine et de la signalisation en aval (Friedland et al, 2009).

Enfin, l'avidité de la liaison entre les intégrines et leurs ligands est dépendante de l'affinité intégrine/ligand mais également du nombre d'interactions (la valence). L'aggrégation des intégrines par les ligands multivalents, et/ou le changement de fluidité de la membrane plasmique, entraînent donc des changements d'avidité des contacts intégrine/ligand (Carman & Springer, 2003)

Interactions intracellulaires

La partie intracellulaire C-terminale de l'intégrine (en grande majorité la sous-unité β) interagit avec une grande variété de protéines du cytosquelette et de signalisation (Figure 17).

	Intégrine	Partenaire cytoplasmique
<i>Cytosquelette</i>		
	$\beta 1, \beta 2, \beta 3$	Taline
	$\beta 1, \beta 2$	α -actinine
	$\beta 3$	Myosine
	$\beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 7$	Filamine
<i>Signalisation</i>		
	$\beta 1, \beta 3$	ILK (pour <i>integrin like kinase</i>)
	$\beta 1, \beta 2, \beta 3$	FAK (pour <i>focal adhesion kinase</i>)
	$\beta 2$	Cytohésines 1/3
<i>Autres protéines</i>		
	$\beta 1, \beta 3, \alpha 4$	Paxilline
	$\beta 3$	SHC (pour <i>Src homology 2 domain-containing protein</i>)
	α	Cavéoline-1
	$\alpha 5$	Nischarine
	$\beta 3$	Grb2
	α	Calréticuline
	$\beta 1, \beta 2, \beta 5$	Rack1
	$\beta 1$	Mélusine
	$\beta 1$	ICAP-1 (pour <i>Integrin $\beta 1$-binding protein 1</i>)
	$\beta 3$	Endonexine- $\beta 3$
	$\beta 1$	MIBP (pour <i>muscle integrin-binding protein</i>)

Figure 17 : Liaisons intracellulaires des intégrines.

D'après (Liu et al, 2000).

Le complexe entre les intégrines et leurs ligands intracellulaires forme une structure compacte appelée plaque d'adhérence ou point de contact focal.

1.2.2.2 Plaques d'adhérence

Architecture des plaques d'adhérence

Une plaque d'adhérence est un complexe protéique liant la MEC au cytosquelette d'actine formé d'intégrines, à la membrane plasmique, et de protéines cytoplasmiques. Les intégrines sont séparées verticalement de l'actine par environ 40nm composant le « cœur » de la plaque d'adhérence (Figure 18).

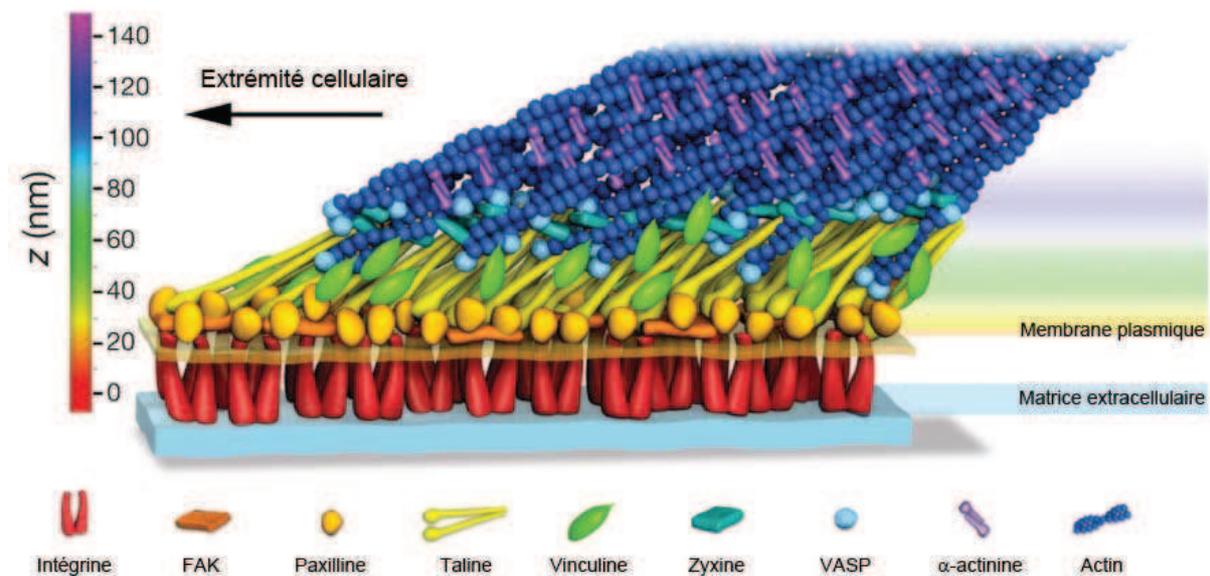


Figure 18 : Architecture moléculaire des plaques d'adhérence ou points de contact focal.

D'après (Kanchanawong et al, 2010). Les intégrines interagissent avec la matrice extracellulaire et composent avec les protéines FAK et paxilline, la première couche de la plaque d'adhérence. Une deuxième couche est composée des protéines taline et vinculine. Enfin, la couche contenant les protéines de liaison à l'actine, zyxine et α -actinine, finit de compléter la plaque d'adhérence.

Ce cœur de plaque d'adhérence est formé de plusieurs couches : (1) une couche à la membrane plasmique contenant les domaines cytoplasmiques des intégrines, la protéine FAK (pour *Focal Adhesion Kinase*) et la protéine paxilline, (2) une couche intermédiaire avec la protéine taline et la protéine vinculine, (3) une couche régulatrice de l'actine contenant la protéine zyxine et la protéine α -actinine (Kanchanawong et al, 2010).

La protéine majeure de la signalisation des plaques d'adhérence est la kinase **FAK**. In vitro, elle lie la sous-unité β de l'intégrine via son domaine FERM (pour *four-point-one, ezrin, radixin, moesin domain*) situé dans la partie N-terminale (Frame et al, 2010; Schaller et al, 1995). Mais l'association de FAK avec les intégrines in vivo est maintenant connue pour être

indirecte et semble s'établir par l'intermédiaire de la protéine paxilline (Hayashi et al, 2002; Liu et al, 2002). Le domaine FERM de FAK permet également le recrutement du complexe Arp2/3 qui contrôle la polymérisation de l'actine (Serrels et al, 2007). La protéine FAK, activée par les intégrines, va subir des phosphorylations en cascade de résidus tyrosine. Tout d'abord, l'autophosphorylation du résidu tyrosine 397 (Y397) est le témoin de son activation. Une mutation au niveau de ce résidu bloque les activités biologiques de FAK (Schaller et al, 1995). La phosphorylation de la tyrosine 397 déstabilise le complexe FAK-Arp2/3 et détache Arp2/3 du site de la plaque d'adhérence pour être recruté au niveau du lamellipode en formation (Serrels et al, 2007). Cette phosphorylation libère également un site de liaison de forte affinité pour des protéines contenant un domaine SH2 tel que c-Src, recruté et activé sur ce site. Src phosphoryle d'autres résidus tyrosine dans le domaine catalytique de FAK (Y407, Y576 et Y577) ainsi que dans sa région C-terminale (Y861 et Y925). Les phosphorylations des tyrosines Y576 et 577 par c-Src augmentent l'activité enzymatique de FAK et permettent la création de nouveaux sites de liaison pour d'autres effecteurs. En effet, la région FAT (pour *focal adhesion targeting*) de FAK, située dans son domaine C-terminal, est nécessaire pour sa localisation dans la plaque d'adhérence par l'intermédiaire de liaisons avec la taline et la paxilline.

La protéine **paxilline** est présente dans les plaques d'adhérence en formation. Sa structure permet des interactions multiples et simultanées. Ces interactions peuvent être modifiées par phosphorylation, facilitant le rôle de la paxilline comme plateforme moléculaire de la liaison actine-intégrine (Digman et al, 2008; Laukaitis et al, 2001). Paxilline interagit aussi avec la protéine **taline** et augmente ainsi la stabilité du complexe intégrine-taline-actine (Alon et al, 1995). La taline forme un homodimère antiparallèle qui permet la liaison à l'actine et à la sous-unité β de l'intégrine, via son domaine FERM. Le domaine C-terminal de la taline interagit avec la protéine vinculine. La **vinculine** est présente aux plaques d'adhérence et également au niveau des contacts cellule-cellule. Le renouvellement de la vinculine est beaucoup plus rapide que celui des plaques d'adhérence, avec un temps de demi-vie de l'ordre de la minute (Ziegler et al, 2006). La vinculine peut fixer la paxilline, la taline et l'actine filamenteuse, mais une interaction intramoléculaire entre la tête et la queue de la protéine masque les sites de liaison. La protéine se retrouve sous une conformation active uniquement au sein de la plaque d'adhérence (Chen et al, 2005a).

Le **syndécan-4** est le seul HSPG enrichi au niveau des plaques d'adhérence. Une surexpression de syndécan-4 cause un excès de formation des plaques d'adhérence et réduit drastiquement la migration cellulaire (Couchman, 2003). Cet effet est probablement dû à

l'action du syndécan-4 sur la phosphorylation et donc l'activation de la protéine FAK (Wilcox-Adelman et al, 2002).

Formation des plaques d'adhérence

Il existe deux modèles de formation des plaques d'adhérence (Figure 19).

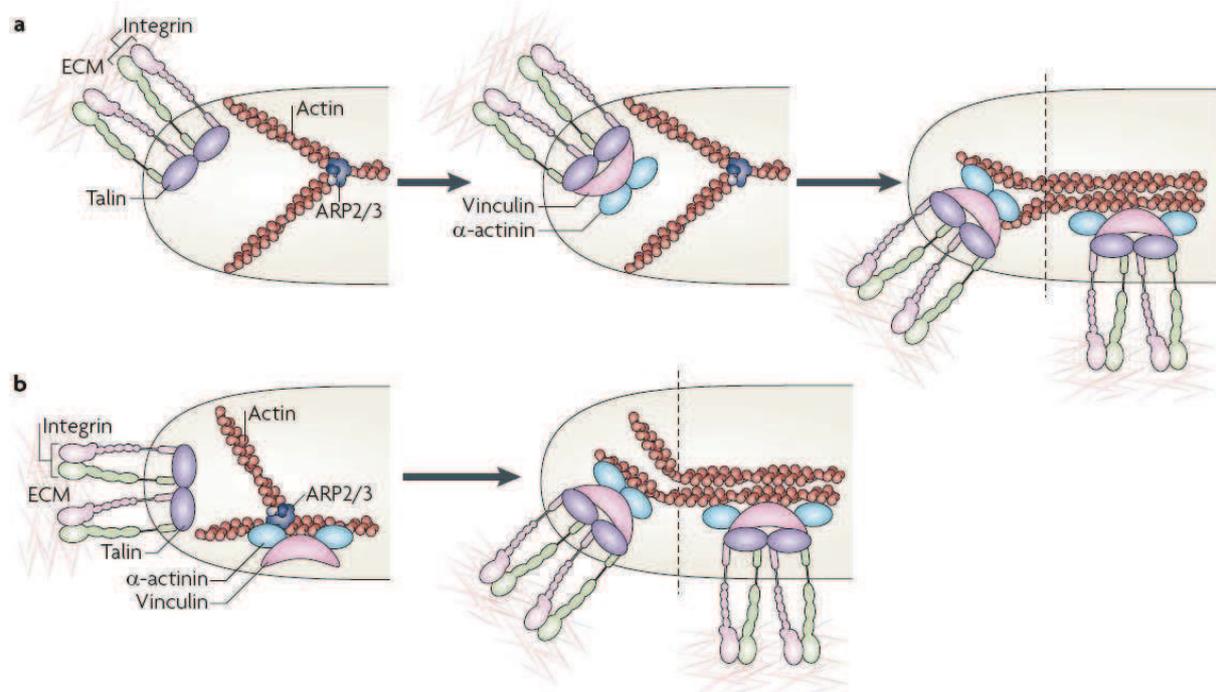


Figure 19 : Modèles de formation des plaques d'adhérence.
D'après (Parsons et al, 2010).

Selon le premier modèle, la nucléation est initiée par la liaison des intégrines avec les protéines de la matrice extracellulaire. Le regroupement des intégrines en agrégats active le recrutement de nouveaux complexes protéiques (taline, vinculine et α actinine) aux domaines cytoplasmiques des intégrines. La maturation de la plaque d'adhérence est acquise lorsque les microfilaments d'actine se regroupent pour former un « pont » entre agrégats d'intégrines. Selon le deuxième modèle, la formation de la plaque d'adhérence est couplée à la polymérisation de l'actine et la vinculine interagit directement avec la protéine de liaison à l'actine ARP2/3, pour ensuite former la plaque d'adhérence par liaison aux intégrines.

Maturation des plaques d'adhérence

Le premier complexe protéique formé à la membrane, suite à l'interaction des intégrines avec la MEC, est appelé **point de contact focal** « naissant » ou *nascent adhesions*. Ces complexes peuvent soit être recyclés rapidement avec un temps de demi-vie de l'ordre de la minute, soit s'élargir et devenir des **complexes focaux** ou *focal complexes* plus matures (Parsons et al,

2010). Ces complexes sont légèrement plus larges, d'environ 1µm de diamètre et persistent plusieurs minutes. Ils s'élargissent et continuent leur maturation jusqu'à devenir des **plaques d'adhérence** ou *focal adhesion* d'environ 2µm de large et de 3µm à 10µm de long et résident au niveau des extrémités des câbles d'actine ou fibres de stress (Zimmerman et al, 2004). Un cas particulier de complexe est observé sur des fibroblastes en culture sur une matrice de fibronectine. Après plusieurs jours sur cet environnement riche en fibronectine, les fibroblastes forment des plaques d'adhérence dites fibrillaires, qui se caractérisent par une durée de vie longue et une structure très allongée (Dubash et al, 2009). Cette structure spécialisée est impliquée dans l'organisation de la matrice de fibronectine mais n'est pas prédominante dans des cellules qui migrent rapidement. Les cellules ne présentent pas toutes les différentes structures de complexe d'adhérence. Les cellules contractiles, telles que les fibroblastes en migration, les cellules endothéliales ou les astrocytes, présentent plus de plaques d'adhérence stables que de contacts focaux.

La maturation des plaques d'adhérence est corrélée aux événements de contraction dépendant de la myosine II (Alexandrova, 2008). La myosine II permet le regroupement des filaments d'actine nécessaire à la maturation de la plaque d'adhérence (Choi et al, 2008). La phosphorylation de la chaîne légère régulatrice de la myosine II, RLC (pour *regulatory light chain*), par les effecteurs de la voie Rho, permet le regroupement des faisceaux d'actine (Vicente-Manzanares et al, 2008) (Figure 20). De plus, elle régule le recrutement de la vinculine aux plaques d'adhérence via la phosphorylation de paxilline par FAK (Pasapera et al, 2010).

Désassemblage des plaques d'adhérence

Le désassemblage des plaques d'adhérence est un processus très mal connu. Il semble que le désassemblage est dépendant d'une contrainte mécanique et du taux de calcium. En effet, une inhibition de la myosine II ou de la calpaïne, protéase dépendante du calcium, bloque cet effet (Crowley & Horwitz, 1995; Franco & Huttenlocher, 2005) (Figure 20).

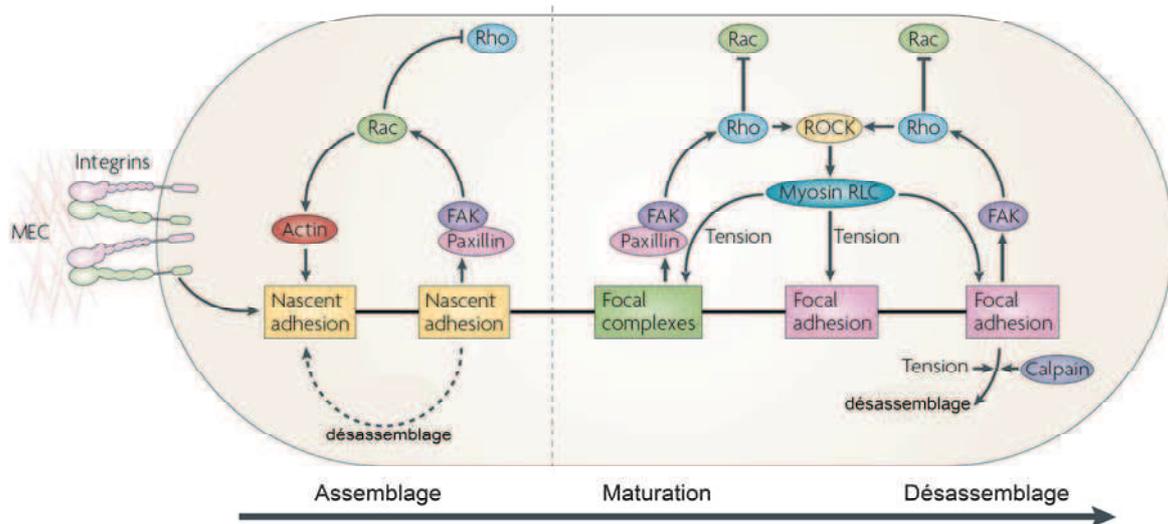


Figure 20 : Maturation des plaques d'adhérence.
D'après (Parsons et al, 2010).

La formation des plaques d'adhérence, leur maturation et leur désassemblage en continu régule la polymérisation de l'actine et la contraction de l'actomyosine (Parsons et al, 2010) (*cf. paragraphe 1.3.1.2 «Microfilaments d'actine»*). La dynamique des plaques d'adhérence est dépendante des voies de signalisation Rho. L'accrochage des intégrines aux ligands de la MEC engage également des cascades de signalisation cytoplasmique, responsables de la régulation de processus cellulaires tels que la survie, la migration, la prolifération cellulaire et l'expression génique.

1.2.2.3 Voies de signalisation

L'activation des intégrines à la surface cellulaire peut engager de multiples voies de signalisation (Figure 21). Immédiatement après leur changement conformationnel, l'activation des intégrines entraîne la phosphorylation de substrats spécifiques et la concentration locale de seconds messagers lipidiques comme le PIP₂, pour phosphatidylinositol (PtdIns)-4,5-bisphosphate (PtdIns-4,5-P₂) et le PIP₃, pour PtdIns-3,4,5-P₃ (Legate et al, 2009). La phosphorylation des molécules associées aux intégrines est caractéristique de l'activation des voies de signalisation. Cette phosphorylation est extrêmement robuste et l'utilisation d'anticorps contre les protéines phosphorylées sur tyrosine peut clairement identifier des plaques d'adhérence (Maher et al, 1985). La phosphorylation des protéines des plaques

d'adhérence crée des sites de liaison pour d'autres protéines importantes pour l'activation des voies de signalisation (Figure 21).

Voie Akt

Le recrutement de PI-3 kinase à la plaque d'adhérence élève la concentration locale de PIP3. La conséquence majeure de l'activation de la PI-3-kinase est l'activation de la serine/thréonine kinase Akt par PDK1 (Vanhaesebroeck & Alessi, 2000). Via GSK3, Akt régule la survie cellulaire.

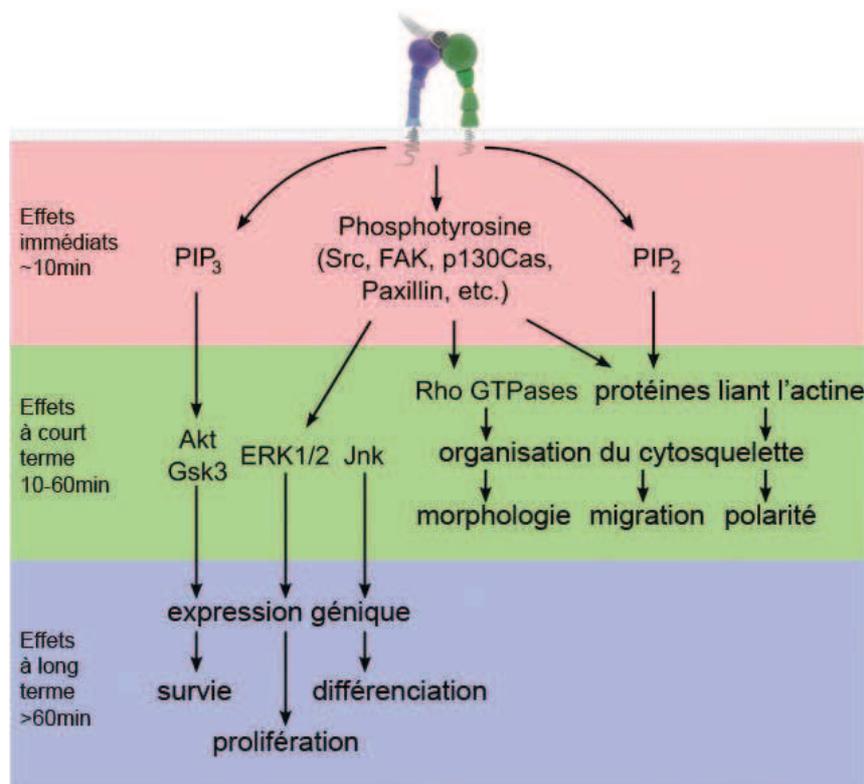


Figure 21 : Conséquences en cascade de l'activation des intégrines.
D'après (Legate et al, 2009)

Signalisation induite par FAK

La partie cytoplasmique de la sous-unité β des intégrines ($\beta 1$, $\beta 3$ et $\beta 5$) facilite l'activation de FAK par un mécanisme encore inconnu, qui peut être l'agrégation de FAK, son autophosphorylation sur tyrosine 397 ou le lien avec d'autres protéines telles que la paxilline (Shi & Boettiger, 2003; Toutant et al, 2002). La phosphorylation de la tyrosine 397 de FAK induite par les intégrines crée un site de haute affinité pour le domaine SH2 de c-Src. La liaison de c-Src à FAK induit une cascade de signalisation transitoire. Au sein de ce complexe, c-Src transphosphoryle FAK sur son domaine d'activation (Y576 et Y577) et sur

son domaine C-terminal (Y861 et Y925). Ces tyrosines phosphorylées deviennent des sites d'ancrage de protéines adaptatrices telles que la paxilline et p130Cas (pour *Crk-associated substrate 130kD protein*). Puis, la phosphorylation de ces protéines par le complexe Src-FAK crée de nouveaux sites de liaisons pour d'autres protéines adaptatrices.

Les MAPK

Les protéines de la famille des MAPK (pour *mitogen-activated protein kinases*) participent à des mécanismes cellulaires majeurs. Trois membres de la famille sont particulièrement importants : Erk (pour *extracellular signal-regulated kinase*), la protéine p38 et JNK (pour *c-jun N-terminal kinase*). Ces protéines sont impliquées dans la transcription de gènes par l'activation de protéines nucléaires, telles que c-Myc et c-Jun. Au moins 25 cibles ont été trouvées intervenant dans divers programmes cellulaires comme la division et la prolifération. La régulation de ces voies dépend essentiellement de la coopération entre les messages activateurs des facteurs de croissance et de l'adhérence (Pullikuth & Catling, 2007).

Dans différents modèles cellulaires, la voie de Ras est une voie importante pour l'activation de Erk. La phosphorylation de la tyrosine 925 de FAK forme un site de liaison pour le complexe Grb2-Sos (Schlaepfer et al, 1994). Grb2 est une protéine adaptatrice qui, en se liant à Sos, permet l'activation de Ras, enclenchant la cascade des MAPK. Le domaine C-terminal de FAK, riche en résidus proline, permet des interactions avec des protéines par leurs domaines SH3. p130Cas se lie au niveau de la première séquence riche en proline (PxxP718) (Polte & Hanks, 1995). p130Cas fait partie de la famille des protéines adaptatrices, comme Grb2. Elle se lie par une liaison SH2/SH3 avec la protéine Crk (Vuori et al, 1996). Ce complexe, renforcé par la paxilline, transmet un signal activateur pour une autre protéine de la famille de Ras, Rac1, aboutissant à une activation de PAK (pour *p21-activated serine-threonine kinase*), puis de Erk (Klemke et al, 1998).

Par ailleurs, les facteurs de croissance peuvent réguler l'activité des plaques d'adhérence. Cette régulation par les facteurs de croissance est due essentiellement à une potentialisation de la transmission des signaux intracellulaires par la voie Erk. Cet effet passe par une augmentation de l'activation de Erk, mais aussi, permet de favoriser la migration de Erk vers le noyau (Howe et al, 2002).

Les Rho GTPases

L'activation des Rho GTPases RhoA, Rac et Cdc42, est maintenue en équilibre par leurs activateurs, les GEF (pour *guanine nucleotide exchange factors*) et leurs inhibiteurs, les GAP

(pour *GTPases activating proteins*). Les voies de signalisation induites par les intégrines et FAK agissent directement sur le recrutement et l'activation de ces GEF et GAP (Figure 22). Les petites protéines G de la famille des Rho sont principalement impliquées dans la régulation de la dynamique de l'actine, la contraction actomyosine, la formation des filopodes et des lamellipodes. Elles régulent également les microtubules, notamment par recrutement de protéines de stabilisation des microtubules telles que mDia (pour *mammalian homolog of Diaphanous*) (Palazzo et al, 2004).

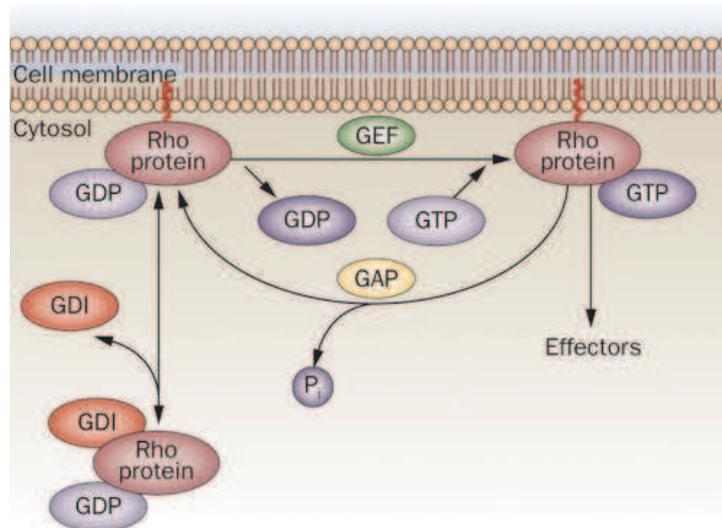


Figure 22 : Cycle d'activation des Rho GTPase.
D'après (Loirand & Pacaud, 2010)

RhoA et la contraction

FAK facilite le cycle d'activation de RhoA par une association, en alternance, avec p190RhoGAP et p190RhoGEF (Tomar & Schlaepfer, 2009). Au cours de la mise en place d'interaction intégrine-MEC, FAK semble interagir d'abord avec p190RhoGAP, pour inhiber RhoA (15-45min), puis avec p190RhoGEF pour l'activer (>60min). L'activation de RhoA favorise la contraction actomyosine, la tension exercée sur la plaque d'adhérence et donc sa stabilisation. RhoA a plusieurs effecteurs dont ROCK (pour *Rho-associated protein kinase*), une sérine-thréonine kinase, qui régule l'activité de la myosine. Il est responsable de la formation des fibres de stress (Nobes & Hall, 1995). La voie de signalisation de RhoA est également importante dans le processus de rétraction neuritique (Nakayama et al, 2000).

Rac et la formation des lamellipodes

FAK peut activer Rac et le recruter à la membrane par phosphorylation des protéines adaptatrices p130Cas et le GEF PIX (pour *PAK interacting protein X*) par deux voies de

signalisation : FAK-p130Cas-Crk ou paxillin-PIX (Legate et al, 2009). L'activation de Rac permet la formation des lamellipodes.

Cdc42 et la polarité cellulaire

L'interaction des intégrines avec leurs ligands extracellulaires active Cdc42 par la voie ILK (pour *integrin-linked kinase*) - α PIX (Filipenko et al, 2005) ou la voie Scrib - β PIX (Osmani et al, 2006). Plus récemment, FAK a été impliqué dans la régulation de l'activité de Cdc42 dans les neurones en réponse aux facteurs de guidance axonale. Une inhibition de FAK réduit l'activité de Cdc42 en quelques minutes (Myers et al, 2012). Cdc42 régule la polarité cellulaire. Pour cela, Cdc42 est à l'origine de plusieurs voies de signalisation qui contrôlent la polarisation de l'actine, des microtubules, du centrosome et de l'appareil de Golgi. (Figure 23).

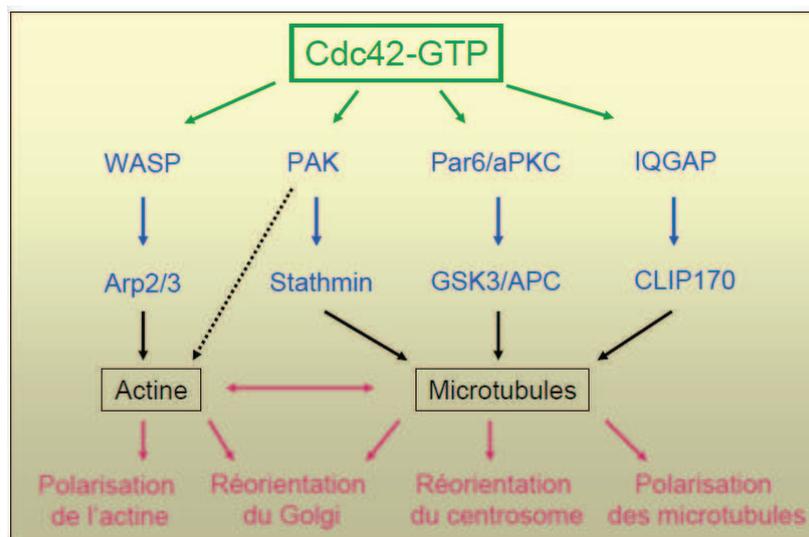


Figure 23 : Voies de signalisation contrôlée par Cdc42.
D'après (Etienne-Manneville, 2004).

Tout d'abord, Cdc42 régule la **polymérisation de l'actine** au niveau des plaques d'adhérence. Cdc42 active Arp2/3 via WASP (pour *Wiskott-Aldrich syndrome protein*) et induit la polymérisation de l'actine et la formation d'un filopode (Pollard & Borisy, 2003). Cdc42 peut intensifier l'interaction de PAK (pour *p21-activated serine-threonine kinase*) à LIM kinase et augmente la phosphorylation de la protéine régulatrice de l'actine, la cofiline (Edwards et al, 1999). Cdc42 agit également indirectement sur l'actine en activant Rac1 (Nobes & Hall, 1995).

Par ailleurs, la **stabilité des microtubules** au niveau des plaques d'adhérence peut être régulée par Cdc42. En effet, l'activation de PAK phosphoryle et inhibe la stathmine, protéine déstabilisatrice des microtubules (Daub et al, 2001). Cdc42 interagit avec Par6 et l'active. Cette interaction induit un changement conformationnel de Par6 permettant l'activation de PKC atypique (aPKC) (Garrard et al, 2003). Les effecteurs de la voie Par6-aPKC sont GSK3 (pour *Glycogen synthase kinase 3*) et Dlg1. GSK3 catalyse la liaison de la protéine APC (pour *adenomatous polyposis coli*) à l'extrémité (+) des microtubules. Dlg1, en interagissant avec APC et la dynéine, recrute localement et stabilise les microtubules (Manneville et al, 2010). De plus, Cdc42 lie et recrute IQGAP1 (pour *IQ motif-containing GTPase-activating protein 1*). IQGAP1 interagit avec CLIP170 pour réguler la dynamique des microtubules, via les protéines CLASP (pour *CLIP-associated proteins*) (Fukata et al, 2002). La stabilité des microtubules est également régulée par les Rho, via APC, qui recrutent mDia (pour *mammalian homolog of Diaphanous*) au niveau des microtubules (Palazzo et al, 2004; Wen et al, 2004).

Enfin, Cdc42 active, associée à la sous-unité γ COP, régule le trafic entre le RE et le cis-Golgi dépendant de la dynéine (Chen et al, 2005b).

Synergie entre les voies des intégrines et des syndécans

Décrypter les rôles spécifiques des intégrines et syndécans dans la formation des plaques d'adhérence est compliqué par le fait que ces différents récepteurs n'activent pas de façon linéaire et mutuellement exclusive des voies de signalisation. En effet, il existe des communications entre ces deux signalisations.

Bien que les chaînes d'héparanes sulfates soient importantes pour la liaison de la fibronectine et l'intégrine (Mahalingam et al, 2007), une surexpression du cœur protéique du syndécan-4 semble être suffisant pour former des plaques d'adhérence (Echtermeyer et al, 1999; Echtermeyer et al, 2001). Le syndécan-4 active plusieurs kinases impliquées dans la formation des plaques d'adhérence. Une étude montre que l'activation du syndécan-4 mène à la phosphorylation de FAK (Wilcox-Adelman et al, 2002). La PKC α est également activée par le syndécan-4 (Lim et al, 2003) qui active, à son tour, la voie RhoA (Dubash et al, 2009), ou la voie Rac1 (Bass et al, 2007) (Figure 24).

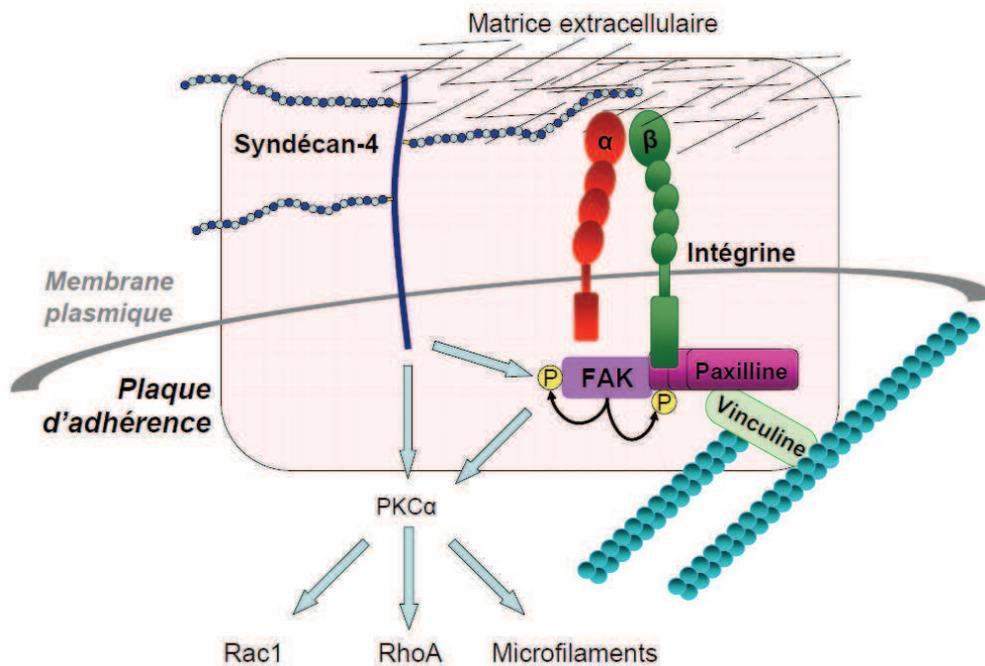


Figure 24 : Synergie entre le syndécan-4 et les intégrines au niveau des plaques d'adhérence.

Des études montrent que la nécessité du syndécan-4 pour la formation des plaques d'adhérence dépend du type d'intégrine engagé dans la plaque d'adhérence. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$, mais pas l'intégrine $\alpha \nu\beta 3$, nécessite l'HBD (pour *heparan sulfate binding domain*) de la fibronectine pour former une plaque d'adhérence (Danen et al, 2002). Le syndécan-2 semble également assurer un rôle dans la formation des plaques d'adhérence, de concert avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (Kusano et al, 2000). En tant que corécepteur, le syndécan-1 coopère avec les intégrines $\alpha \nu\beta 3$, $\alpha \nu\beta 5$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 6\beta 4$ et participe à la régulation de la cascade de signalisation induite par l'intégrine $\alpha \nu\beta 3$, responsable du contrôle de la prolifération et la migration dans le cancer du sein (Beauvais & Rapraeger, 2004).

De plus, l'effet des syndécans sur la formation des plaques d'adhérence est dépendant du niveau d'activation des intégrines. En effet, la signalisation du syndécan-4 n'est pas requise pour former des plaques d'adhérence si l'activation des intégrines a déjà atteint un certain seuil. En absence de fibronectine, et donc de HBD, les cellules forment des plaques d'adhérence si elles sont cultivées en présence d'une forte concentration de peptides contenant le domaine de liaison aux intégrines (Wang et al, 2005). Inversement, l'HBD de la fibronectine est nécessaire à la formation de plaques d'adhérence si les concentrations de peptides liant les intégrines sont basses (Dubash et al, 2009).

Il semblerait donc que les syndécans participent aux voies de signalisation menant à la formation des plaques d'adhérence de façon synergique avec les intégrines (Dubash et al, 2009).

1.3 Les composants intracellulaires

1.3.1 Le cytosquelette

Le cytosquelette est composé de structures fibreuses : les microtubules, les microfilaments et les filaments intermédiaires. Ces fibres cytosquelettiques sont composées de plusieurs sous-unités protéiques, les monomères et de protéines associées.

1.3.1.1 Filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires, de diamètre compris entre 8nm et 11 nm, sont ubiquitaires. Ces polymères sont composés de monomères différents suivant les cellules et les compartiments cellulaires. Ils sont largement utilisés comme marqueur de type cellulaire. Il existe plus de 65 monomères différents et de protéines associées aux filaments intermédiaires. Les monomères sont des protéines fibreuses et peuvent être les lamines (noyaux des cellules), les kératines (cellules épithéliales), les desmines (cellules musculaires), la paranemine (cellules musculaires), les vimentines (cellules mésenchymateuses), la transitine (glie radiale), la GFAP (pour *glial fibrillary acidic protein*, cellules astrogliales), les nestines (cellules souches neuroépithéliales) ou les neurofilaments NF-L, NF-M et NF-H (neurones). Les filaments intermédiaires sont très stables mais dynamiques. Ils servent de support mécanique et assurent également un rôle dans la cytoarchitecture ou la migration cellulaire des cellules immunitaires (Goldman et al, 2012). Contrairement aux microfilaments et aux microtubules, les filaments intermédiaires ne sont pas polarisés.

1.3.1.2 Microfilaments d'actine

Actine monomérique ou globulaire (actine-G)

L'actine est une protéine globulaire ubiquitaire, de 374 ou 375 aminoacides, dont la séquence est très conservée au cours de l'évolution. Son poids moléculaire est égal à 42,3 kilodaltons. L'actine possède un site de fixation pour les nucléotides ATP/ADP et plusieurs sites de fixation pour les cations (calcium et magnésium) (Figure 25).

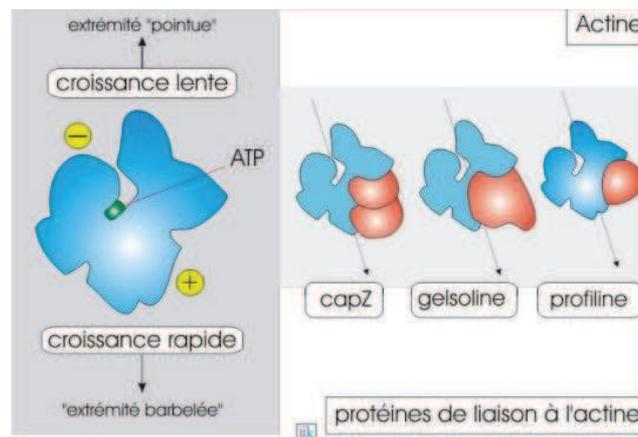


Figure 25 : Actine G et protéines de liaison à l'actine.

D'après (http://www.ulysse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion)

Il existe trois isoformes d'actine mais seulement deux isoformes β et γ sont présentes dans les cellules non-musculaires (Kabsch & Vandekerckhove, 1992). L'isoforme γ est ubiquitaire. L'expression de l'isoforme β est induite pendant le développement puis diminue avec l'âge. Elle se restreint aux régions subissant de profonds remaniements morphologiques, comme les épines dendritiques et les cônes de croissance.

Polymérisation de l'actine in vitro

L'association des monomères d'actine forment des microfilaments de 5nm à 9nm de diamètre. La réaction de polymérisation se déroule en trois étapes successives :

(1) Tout d'abord, l'activation du monomère d'actine G implique une liaison avec un cation et avec l'ATP qui change sa conformation. L'interaction entre deux monomères est alors favorisée. (2) Puis, la nucléation correspond à l'association de 3 monomères d'actine pour former un « noyau » stable. La nucléation est une étape lente qui dépend de la concentration monomérique d'actine et également de protéines de nucléation telles que la profiline ou

Arp2/3 (pour *Actin related protein 2/3 complex*) (Figure 26). (3) Enfin, l'élongation bidirectionnelle du filament d'actine : Elle résulte de l'ensemble des réactions d'association et de dissociation des monomères d'actines aux deux extrémités du filament. C'est une étape beaucoup plus rapide accompagnée d'une hydrolyse de l'ATP fixée au monomère. Le filament s'enrichit ainsi en sous-unités d'actine-ADP, au fur et à mesure de l'élongation.

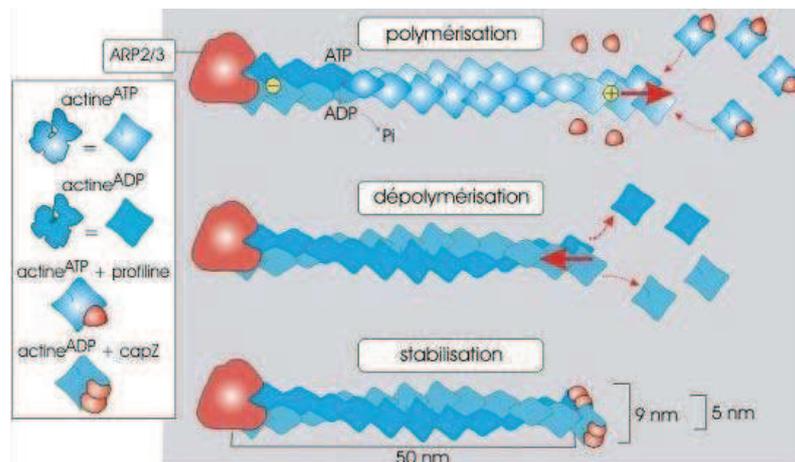


Figure 26 : Dynamique des microfilaments d'actine.

D'après (http://www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion)

Actine filamenteuse ou microfilament (actine-F)

L'actine-F est formée de chapelets d'actines-G torsadés en double hélice. Le microfilament représente un état structural important de l'actine car de nombreuses fonctions physiologiques des cellules reposent sur l'existence de cette forme polymérisée. Cet état est en perpétuel changement et l'actine continue de se polymériser et de se dépolymériser sans cesse (Welch et al, 1997). Les deux extrémités du polymère ne sont pas équivalentes. Il existe une extrémité pointue (-) où l'association des monomères est plus lente que leur dissociation et une extrémité barbée (+) où l'inverse se produit, permettant à l'actine de se polymériser. L'instabilité dynamique des filaments d'actine, à l'état stationnaire, est une conséquence de l'hydrolyse tardive du nucléotide ATP en ADP + Pi.

Les microfilaments se composent de plusieurs isoformes d'actine, de tropomyosine et de protéines associées. Selon les tissus, les types cellulaires et les compartiments subcellulaires, ces différentes protéines et leurs isoformes ne sont pas exprimées ni distribuées de la même façon (Herman, 1993). La dynamique de l'actine est dépendante des protéines de liaison à l'actine (Figure 27). Ces protéines sont régulées par les voies de signalisation des petites protéines G de la famille Rho.

Protéine de liaison à l'actine	Activités
α -actinine	permet la formation du réseau d'actine
Spectines	permet la formation du réseau d'actine
Arp2/3	permet la nucléation de l'actine, forme un réseau branché d'actine
Cap α/β	coiffe les filaments d'actine
Cofiline	accélère la dépolymérisation à l'extrémité (-) et rompt les filaments d'actine
Dystrophine	permet la formation du réseau d'actine
Fascine	permet la formation de faisceau d'actine
Filamine	permet la formation du réseau d'actine
Formine mDia	permet la nucléation de l'actine
Gelsoline	rompt les filaments d'actine, reste associée de façon stable à l'extrémité (+) et coiffe cette extrémité
Myosine	moteur moléculaire
Profiline	séquestre les monomères d'actine, ajoute les monomères à l'extrémité (+), accélère l'échange d' ADP en ATP sur le monomère
Spire	permet la nucléation de l'actine
Taline	assemble les filaments d'actine au niveau des plaques d'adhérence
Tropomoduline	stabilise les filaments d'actine, lie l'extrémité (-)
Tropomyosine	stabilise les filaments d'actine, lie le long du filament
VASP (pour <i>Vasodilator stimulated phosphoprotein</i>)	permet la nucléation de l'actine en faisceau, bloque le coiffage des filaments
Vinculine	assemble les filaments d'actine au niveau des plaques d'adhérence
WASP (pour <i>Wiskott Aldrich syndrome protein</i>)	active le complexe Arp2/3

Figure 27 : Exemples de protéines de liaison à l'actine et de leurs activités.
D'après (Tondeleir et al, 2011)

Les types d'arrangements des filaments d'actine (Figure 28)

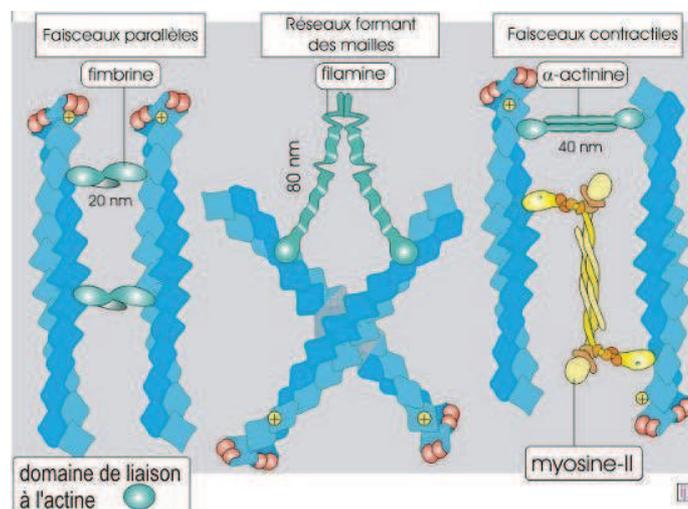


Figure 28 Types d'arrangements des filaments d'actine
D'après (http://www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion)

1- Les faisceaux parallèles d'actine

On trouve les faisceaux parallèles dans les microvillosités et les filopodes. Les filaments qui les composent sont orientés avec la même polarité. L'espace d'environ 20 nm entre les filaments est déterminé par leur liaison à la fimbrine (protéine intercalaire de 20 nm, 68 kDa).

2- Les réseaux

On trouve l'actine en réseau dans les lamellipodes et le réseau sous-membranaire d'actine corticale. Les filaments y sont organisés en un arrangement relativement lâche, avec de nombreuses interconnexions orthogonales formées par la filamine (protéine de 80 nm, 260 kDa). Le lamellipode est une large protrusion branchée formée à l'avant des cellules. La polymérisation des filaments s'effectue à la surface interne de la membrane aux extrémités barbées des filaments par activation du complexe Arp2/3. À l'arrière du front branché, les extrémités pointues dépolymérisent et la structure adopte un mouvement d'ensemble de « tapis roulant » (Pollard & Borisy, 2003).

3- Les faisceaux contractiles ou actomyosine

On trouve l'actomyosine dans les sarcomères, les ceintures d'adhérence, l'anneau contractile mitotique et les fibres de stress. Les filaments sont arrangés avec des polarités opposées et sont espacés de 40 nm grâce à une liaison à un dimère d' α -actinine (100 kDa). Un complexe bipolaire de plusieurs molécules de myosine-II est inséré entre les filaments et engendre la force de contraction. La myosine II est composée d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère. La chaîne légère s'active par phosphorylation puis liaison aux filaments d'actine. Le mécanisme de contraction des faisceaux d'actine repose sur le glissement, entraîné par l'hydrolyse de l'ATP, des filaments d'actine imbriqués avec la myosine-II (Figure 29). L'interaction actine-myosine engage la contraction de la fibre de stress et permet à la cellule de se contracter.

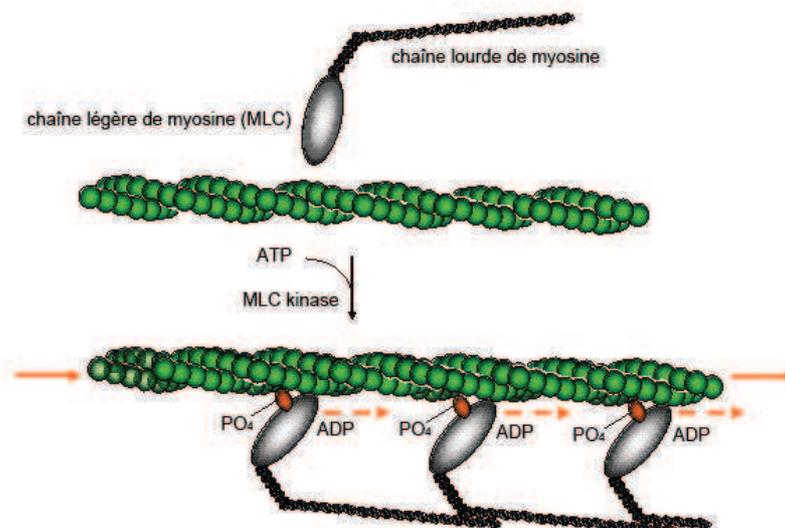


Figure 29 : Principe de la contraction actomyosine.
D'après (Parsons et al, 2010) ;

L'organisation de l'actine en réseau, en faisceaux parallèles ou en faisceaux contractiles permet la formation des lamellipodes, des filopodes et des fibres de stress respectivement. Ces structures sont indispensables pour la dynamique et la plasticité cellulaire, notamment au cours de la migration cellulaire ou au cours de la neuritogenèse au niveau du cône de croissance (Figure 30) (Ishikawa & Kohama, 2007).

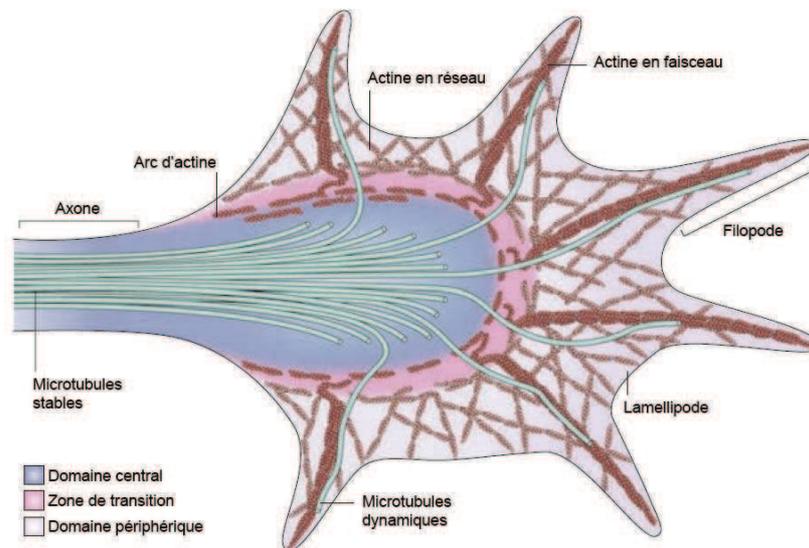


Figure 30 : Structure du cône de croissance.
D'après (Lowery & Van Vactor, 2009).

Dans l'exemple du cône de croissance, les filopodes contenant des microfilaments en faisceau sont les « têtes chercheuses » de la structure. Le réseau d'actine contenu dans les lamellipodes permet l'étalement du cône de croissance. Pour rendre la structure stable, le cytosquelette d'actine agit en collaboration avec le cytosquelette de tubuline ou microtubules.

1.3.1.3 Microtubules

1.3.1.3.1 Structure des microtubules

Les microtubules sont des polymères cylindriques constitués d'hétérodimères de tubuline. Chaque dimère est constitué d' α -tubuline et de β -tubuline. Il existe 6 formes d' α -tubulines et 7 formes de β -tubulines (McKean et al, 2001). Il existe également des tubulines γ , δ et ϵ localisées principalement au niveau du centrosome.

Les hétérodimères de tubuline s'assemblent pour former des protofilaments polarisés. Le polymère de tubuline est polarisé avec une extrémité (-), coiffée et ancrée au centrosome, et une extrémité (+) par laquelle le protofilament se polymérise. Les microtubules sont composés de 13 protofilaments associés latéralement pour donner un cylindre rigide de 25nm de diamètre (Figure 31).

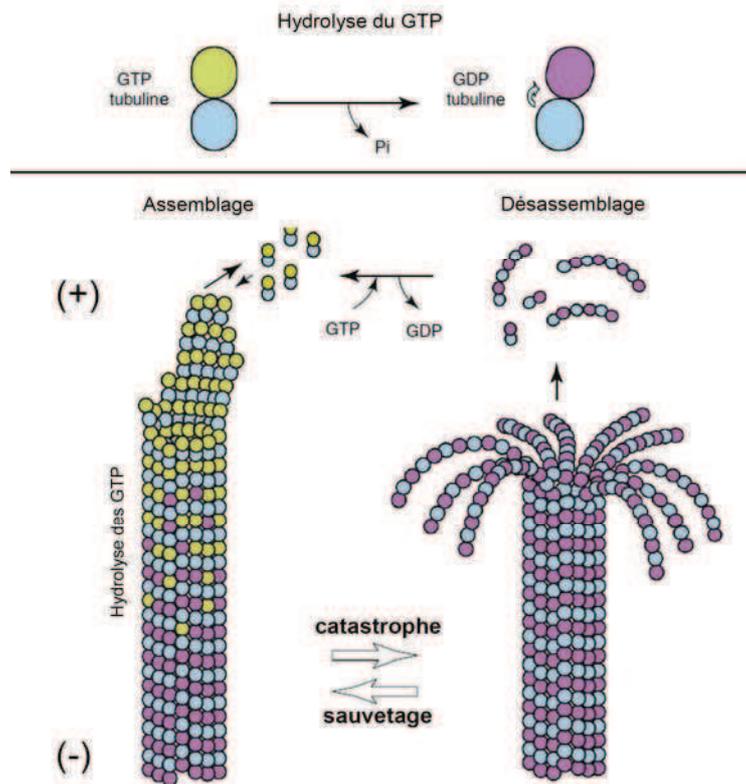


Figure 31 : Polymérisation des microtubules.
D'après (Al-Bassam & Chang, 2011).

La vitesse de polymérisation des microtubules est sensible à la concentration locale de dimères solubles à l'extrémité (+). L'hydrolyse du GTP au sein du microtubule n'est pas nécessaire à la polymérisation mais permet de créer un réseau de microtubules très instable (Caplow et al, 1994). Les microtubules ont une caractéristique unique de pouvoir passer rapidement d'un état conformationnel à un autre, mécanisme appelé l'instabilité dynamique des microtubules (Mitchison & Kirschner, 1984). Par exemple, le phénomène de « catastrophe » est un changement brusque de l'assemblage vers le désassemblage des microtubules, l'inverse est appelé « sauvetage » ou *rescue* (Figure 31).

1.3.1.3.2 Rôles des microtubules

La diversité fonctionnelle des tubulines permet aux microtubules d'assurer des rôles essentiels dans la morphogenèse, la polarité, la migration, la signalisation et la division cellulaire. Les microtubules ont été largement décrits pour leur rôle au cours de la ségrégation des chromosomes à la mitose (Tanaka, 2010). Comme les microtubules remplissent l'espace cytoplasmique et interagissent avec plusieurs protéines de signalisation et plusieurs organelles, ils peuvent conduire les cascades de signalisation et maintenir un réseau de protéines de signalisation. Les microtubules servent principalement de pistes pour les moteurs moléculaires et de routes pour le trafic intracellulaire.

Les microtubules assurent un rôle central dans le positionnement et la fonction des organelles impliquées dans le trafic intracellulaire : le noyau, le réticulum endoplasmique (RE), l'appareil de Golgi, les vésicules, les endosomes ou les lysosomes. Ces fonctions sont particulièrement importantes pour l'établissement et le maintien de la polarité cellulaire (de Forges et al, 2012).

Moteurs moléculaires

Ce rôle est rendu possible par la présence à la surface des microtubules de protéines appelées « moteurs moléculaires ». Ces protéines utilisent principalement l'énergie dérivée de l'hydrolyse de l'ATP pour « marcher » le long des microtubules. Les deux grandes familles de moteurs moléculaires associés aux microtubules sont les kinésines et les dynéines. Les kinésines ont une organisation simple avec un domaine moteur orienté vers le microtubule et une variété de domaines « queues » permettant le transport de différents cargo. La plupart des kinésines dirigent le transport vers l'extrémité (+) des microtubules. Elles sont importantes pour la ségrégation des chromosomes au cours de la mitose, mais peuvent également être impliquées dans le transport intracellulaire (Figure 32).

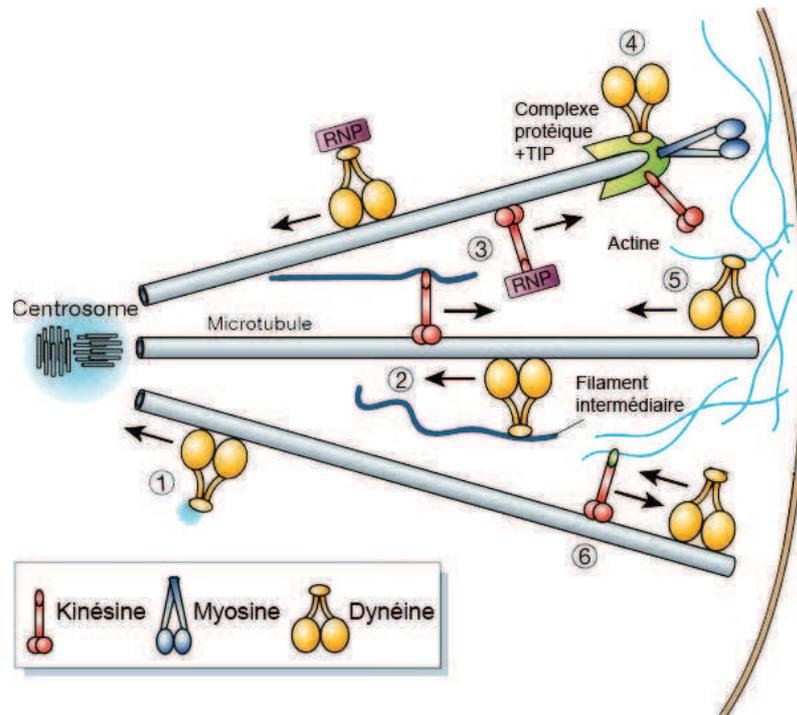


Figure 32 : Exemples de rôles joués par les moteurs moléculaires.

D'après (Schliwa & Woehlke, 2003). ① transport rétrograde ② transport antérograde et rétrograde des filaments intermédiaires ③ transport antérograde et rétrograde des complexes ribonucléoprotéiques ou RNP ④ interaction des moteurs moléculaires avec les +TIP ⑤ ancrage des dynéines au cortex cellulaire riche en actine ⑥ interaction des protéines de la famille des kinésines avec l'actine.

Les dynéines sont des moteurs moléculaires permettant le transport dirigé vers l'extrémité (-) des microtubules. Elles sont moins diverses, mais plus larges, que les kinésines. En général, les kinésines et les dynéines ont des mouvements de direction opposée le long des microtubules et gèrent ainsi le transport vésiculaire bidirectionnel (Gennerich & Vale, 2009).

Le positionnement du RE est notamment dépendant de l'activité de la kinésine-1 (Wozniak et al, 2009), mais les mécanismes régulant l'organisation du réticulum restent peu étudiés. Par contre, le rôle des microtubules sur l'organisation et le positionnement de l'appareil de Golgi est relativement bien décrit. Il repose principalement sur les fonctions des dynéines et de leurs protéines régulatrices. En effet, une délétion de la dynéine-1, ou une perturbation de son complexe régulateur avec la dynactine, cause la délocalisation de l'appareil de Golgi et du lysosome (Harada et al, 1998). Les kinésines sont aussi impliquées dans le positionnement et l'organisation de l'appareil de Golgi. Par exemple, la déplétion en KIF5/kinésine-1 compacte l'appareil de Golgi (Allan et al, 2002).

Des protéines, autres que les moteurs moléculaires, sont également impliquées dans le positionnement des organelles. Par exemple, les protéines CLASP (pour *CLIP associated proteins*) et AKAP450 (pour *A kinase anchoring protein 450kD*) participent à la maintenance du complexe golgien à proximité du centrosome (Hurtado et al, 2011; Miller et al, 2009; Rivero et al, 2009). Cet effet est probablement dû à leur fonction de régulateur de la dynamique des microtubules.

1.3.1.3.3 Dynamique et stabilisation des microtubules

La dynamique des microtubules est régulée non seulement par la présence ou l'hydrolyse de GTP, mais également par des processus de modifications post-traductionnelles des tubulines et par l'attachement des protéines de liaison aux microtubules (Figure 33).

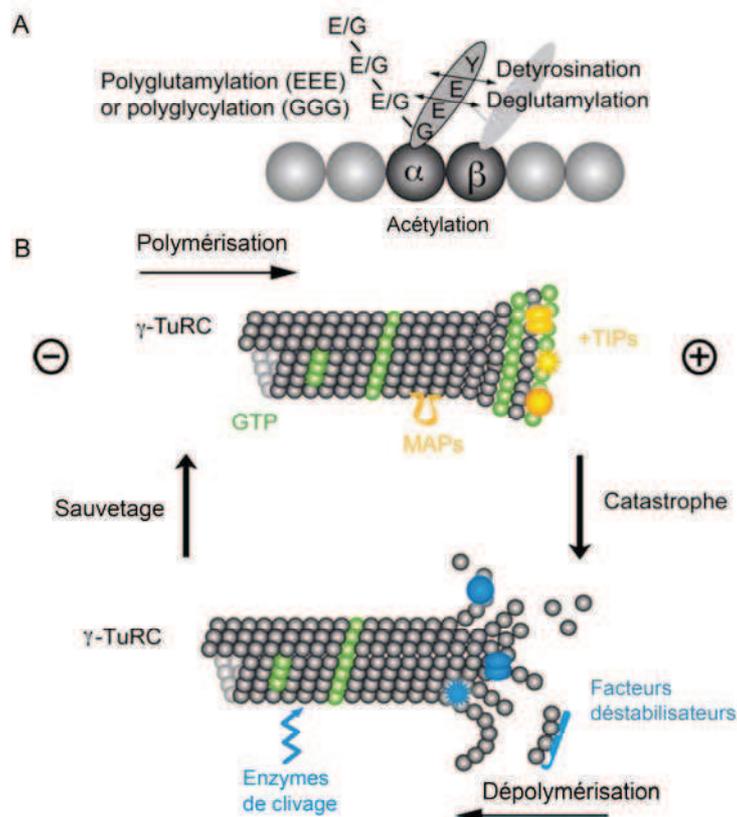


Figure 33 : Modulation de la dynamique des microtubules, par modifications post-traductionnelles des tubulines (A) ou par les protéines de liaisons aux microtubules (B).

D'après (de Forges et al, 2012).

Les modifications post-traductionnelles des tubulines

Les tubulines subissent, entre autre, des cycles de tyrosination et détyrosination, des suppressions de glutamate, des polyglutamylations, des polyglycylations, des acétylations, des phosphorylations et des palmitoylations. A l'exception de l'acétylation, ces modifications s'effectuent sur la partie C-terminale de la tubuline, donc à la face externe des microtubules. Ces modifications modifient la surface des microtubules et modulent ainsi les liaisons aux moteurs moléculaires ou aux protéines régulatrices de la dynamique.

La glutamylation consiste en l'ajout de chaînes de résidus glutamate au niveau d'un résidu glutamate présent dans la partie C terminale des tubulines (Redeker et al, 1991). La longueur des chaînes est très variable, permettant ainsi de générer, sur un seul site de modification, toute une gamme de signaux diversifiés. La polyglutamylation de la tubuline est une des modifications post-traductionnelles prépondérantes au niveau des microtubules axonaux. Cette réaction est réversible par une déglutamylase (Janke & Kneussel, 2010).

Une modification plus répandue est l'acétylation de résidu lysine de la tubuline α (Perdiz et al, 2011). Cette acétylation s'effectue sur l'ensemble du microtubule, à l'intérieur du cylindre. Cette modification est modulée par plusieurs enzymes telles que les acétyltransférases ou les HDAC (pour *histone deacetylase*). Dans les neurones, par exemple, l'acétylation est inhibée par l'HDAC6 en conséquence de sa phosphorylation par GSK3 β (Chen et al, 2010). L'acétylation des microtubules a tout d'abord été associée à leur stabilisation. En effet, il a été montré, *in vivo*, que les microtubules désacétylés par HDAC6 étaient moins dynamiques (Matsuyama et al, 2002). Mais ce lien entre acétylation et stabilisation n'est pas généralisable (Perdiz et al, 2011). En fait, l'acétylation est une réaction très lente, beaucoup plus lente que la vitesse d'assemblage des microtubules. Par conséquent, l'acétylation survient sur des microtubules dans un état stable, et non pas sur des microtubules dans une dynamique de polymérisation/dépolymérisation rapide.

Dans la plupart des cellules eucaryotes, la partie C-terminale de la tubuline α subit des cycles de détyrosination-tyrosination. La tyrosine est séquentiellement clivée par une tubuline carboxypeptidase, puis liée à nouveau par la tubuline tyrosine ligase. La tyrosination permet le recrutement spécifique de protéines de liaison à l'extrémité (+) des microtubules qui permettent notamment l'établissement du fuseau mitotique (Peris et al, 2006). L'extrémité avec une tubuline détyrosinée, appelée également Glu car le dernier résidu devient le glutamate, correspond à des polymères peu dynamiques.

Les modifications post-traductionnelles des tubulines représentent donc un code de lecture pour les protéines d'interaction aux microtubules (Janke & Kneussel, 2010). Ces

modifications régulent ainsi la dynamique des microtubules par l'intermédiaire des protéines de liaison aux polymères.

Les protéines régulatrices des microtubules

Les protéines associées aux microtubules ou MAP (pour *microtubules associated proteins*) permettent de réguler la dynamique des microtubules. Il existe plus d'une centaine de MAP. Les plus connues sont Tau et MAP2, exprimées principalement dans les neurones.

Les MAP peuvent agir sur la polymérisation des microtubules. C'est le cas de la stathmine qui, en se fixant au dimère de tubuline, favorise l'hydrolyse du GTP (Howell et al, 1999), ou la kinésine 13 qui induit un changement conformationnel du dimère (Ems-McClung & Walczak, 2010).

Les microtubules peuvent également être découpés par des protéines telles que la spastine. Cette lyse crée des fragments, de 50% à 2% de la taille initiale du microtubule (Lacroix et al, 2010). Les sous-populations de microtubules peuvent ensuite être déplacées dans le cytoplasme par la dynéine (Yvon & Wadsworth, 2000).

D'autres MAP agissent directement sur la nucléation des microtubules. C'est le cas des protéines, comme AKAP450, du complexe gamma TURC au niveau du centre organisateur des microtubules. XMAP215 permet également l'assemblage des microtubules (Al-Bassam & Chang, 2011)

Les MAP stabilisatrices des microtubules sont spécialement celles qui interagissent avec l'extrémité (+) appelées protéines +TIP (pour *plus end tracking proteins*). Par exemple, APC (pour *Adenomatous Polyposis Coli*) se lie à l'extrémité (+) des microtubules via son domaine C terminal. Le domaine C-terminal seul est capable d'induire l'assemblage des microtubules. Plus précisément, APC permet d'induire la formation de faisceaux (Mimori-Kiyosue et al, 2000a; Mimori-Kiyosue et al, 2000b; Mogensen et al, 2002). APC recrute les microtubules proches de la membrane plasmique de cellules en migration (Manneville et al, 2010; Nathke et al, 1996). En outre, APC est capable de stabiliser les microtubules, car, en présence de nocodazole, des microtubules associés à APC se dépolymérisent moins (Zumbrunn et al, 2001). Dans les neurones, la protéine APC est retrouvée associée aux microtubules dans le cône de croissance et dans les neurites (Morrison et al, 1997a; Morrison et al, 1997b).

CLIP170 a été la première MAP identifiée comme une +TIP (Perez et al, 1999). En s'associant aux microtubules, CLIP170 favorise la polymérisation des microtubules. CLIP170

est régulée par des kinases, notamment PKA qui inhibe sa liaison aux microtubules. Les protéines EB (pour *end-binding*) sont considérées comme les protéines +TIP les plus importantes. EB1 supprime la dépolymérisation rapide des microtubules (Komarova et al, 2009). Les protéines EB peuvent se lier à CLIP170 et également aux protéines CLASP (pour *CLIP-associated proteins*). Les CLASP fixent les dimères de tubuline et créent des zones de forte concentration en CLASP le long du microtubule. Au cours d'un phénomène de « catastrophe », le microtubule se dépolymérise jusqu'au site de forte concentration en CLASP. Ensuite, la dépolymérisation s'arrête et les CLASP induisent localement la repolymérisation du microtubule (Figure 34) (Al-Bassam & Chang, 2011). Ces protéines permettent donc la polymérisation et bloquent la dépolymérisation complète. Comme les CLIP, les CLASP sont régulées par phosphorylation, notamment par GSK3 β dans la voie de signalisation de Cdc42 (Kumar et al, 2009). La phosphorylation des CLASP diminue leur affinité pour EB1 et les microtubules.

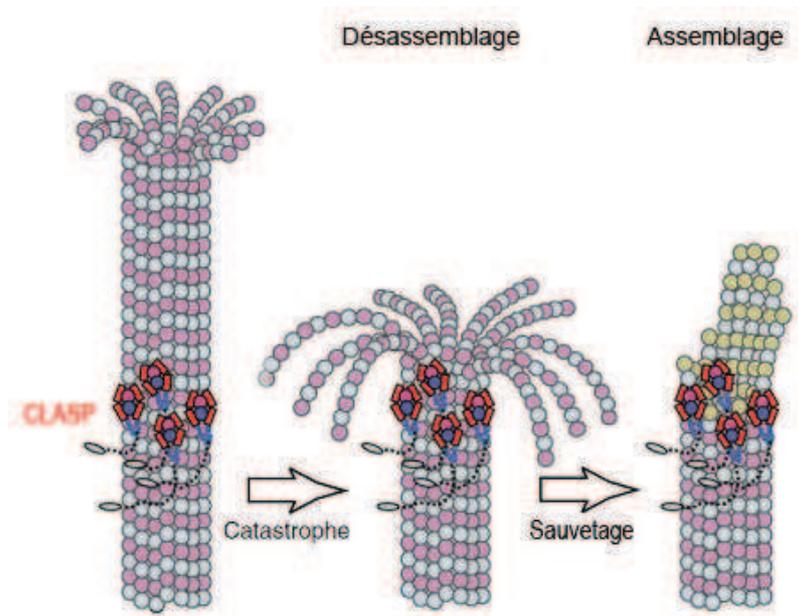


Figure 34 : Régulation de la dynamique des microtubules par les CLASP.
D'après (Al-Bassam & Chang, 2011)

Les protéines formines mDia, connues pour stabiliser les microfilaments d'actine, peuvent également stabiliser les microtubules en aval de la signalisation des Rho GTPases (DeWard & Alberts, 2008). Les protéines EB, les CLASP, ainsi que la protéine APC, permettent également l'attachement des microtubules à la membrane plasmique au niveau du cortex de la cellule. Les microtubules peuvent interagir avec les plaques d'adhérence via la spectraplakine

ACF7 ou le senseur de PIP3 LL5 β (Drabek et al, 2006; Lansbergen et al, 2006; Wu et al, 2008). Les CLASP sont également associées à la surface de l'appareil de Golgi (Akhmanova et al, 2001). Les CLASP permettent la nucléation d'un réseau asymétrique de microtubules golgiens (Efimov et al, 2007).

1.3.1.3.4 La nucléation des microtubules

Dans la plupart des cellules, les microtubules sont nucléés dans la région périnucléaire au niveau du **centrosome**, le centre organisateur des microtubules ou MTOC (pour *microtubules organizing center*). Le centrosome est constitué de deux centrioles composés chacun de neuf triplets de microtubules. Il est entouré de protéines péricentriolaires permettant la nucléation et l'organisation des microtubules. Parmi ces protéines, la tubuline γ associée à AKAP450 et d'autres protéines péricentriolaires forment un complexe en anneau, le γ -TURC (pour *γ -tubulin ring complex*), où les dimères sont ajoutés pour former un microtubule, avec l'extrémité (-) ancrée au centrosome, et l'extrémité (+) qui s'étend vers la périphérie (Takahashi et al, 2002). La nucléation au centrosome permet la mise en place d'un réseau symétrique de microtubules (Salaycik et al, 2005).

Depuis longtemps, d'autres centres de nucléation ont été identifiés dans des types cellulaires très spécialisés. Plus récemment, il a été mis en évidence que les microtubules pouvaient également être nucléés à la surface de **l'appareil de Golgi** (Chabin-Brion et al, 2001; Efimov et al, 2007). La tubuline γ est recrutée à la membrane golgienne par GMAP210 (Rios et al, 2004) et AKAP450 interagit avec GM130 (pour *golgi matrix protein 130kD*) à la face cis de l'appareil de Golgi (Rivero et al, 2009). Cette sous-population de microtubules golgiens est stabilisée par les CLASP à la face trans de l'appareil de Golgi et est asymétrique (Efimov et al, 2007). Les microtubules au niveau golgien sont excessivement acétylés et détyrosinés (Thyberg & Moskalewski, 1993) et stabilisés par la protéine centrosomale CAP350 (Hoppeler-Lebel et al, 2007).

1.3.2 L'appareil de Golgi

1.3.2.1 Structure de l'appareil de Golgi

L'appareil de Golgi est une organelle péricentriolaire composée de membranes tubulo-vésiculaires en saccules, appelées « citernes » golgiennes. L'empilement de 3 à 8 saccules forment un dictyosome, ou ribbon, en trois principales régions : la région cis, la région médiale et la région trans. Ces citernes sont entourées de réseaux tubulaires en cis (CGN pour *cis golgi network*) et en trans (TGN pour *trans golgi network*) (Figure 35).

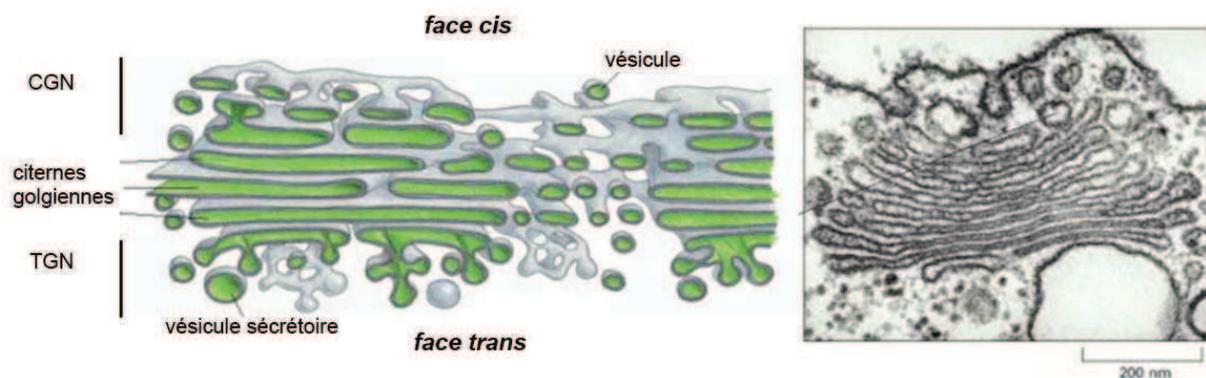


Figure 35 : Structure polarisée de l'appareil de Golgi.

Les ribbons sont interconnectés latéralement par des tubules membranaires entre les saccules. Des vésicules à manteau permettent le transport des protéines et des lipides entre les saccules dans le sens antérograde, du cis au trans, et dans le sens rétrograde, du trans au cis. Cette structure typique de l'appareil de Golgi est très dynamique et nécessite le concours de protéines de la matrice golgienne et du cytosquelette pour son maintien.

Matrice golgienne

La matrice golgienne est un réseau dense de protéines entourant les citernes de l'appareil de Golgi. Les protéines matricielles, impliquées dans le maintien de la structure, appartiennent à la famille des golgines et à la famille des GRASP (pour *Golgi Reassembly And Stacking Protein*). Les golgines sont localisées à la face externe des membranes de l'appareil de Golgi. Grâce à leur domaine dit « coiled-coil », elles engagent et facilitent le rapprochement et la fusion des membranes, phénomènes essentiels pour l'assemblage et le maintien de la structure

des ribbons (Ramirez & Lowe, 2009). Elles interagissent avec les protéines GRASP, elles-mêmes attachées à la membrane golgienne par une ancre lipidique (Barr et al, 1998). Les protéines GRASP55 et GRASP65 régulent l'empilement des saccules golgiennes et l'interconnection des ribbons. On observe une réduction du nombre de citernes par ribbon lorsque l'expression de ces protéines est affaiblie (Sutterlin et al, 2005; Xiang & Wang, 2010). Inversement, l'empilement des citernes en interphase est augmenté en présence de mutants constitutivement actifs de GRASP55 et GRASP65 (Tang et al, 2010; Xiang & Wang, 2010). De plus, l'oligomérisation des protéines GRASP de deux membranes adjacentes engage la fusion latérale des citernes pendant la formation des ribbons (Feinstein & Linstedt, 2008) (Puthenveedu et al, 2006). GRASP65 interagit avec la golgine GM130 au niveau de la face cis de l'appareil de Golgi (Yoshimura et al, 2001).

GM130 est particulièrement impliquée dans le maintien de la structure de l'appareil de Golgi, soit en participant au trafic entre le RE et l'appareil de Golgi, soit en régulant les fusions de membranes golgiennes. GM130 interagit avec la protéine p115 au sein d'un complexe participant au transport, entre le RE et la face cis de l'appareil de Golgi (cis-Golgi). La translocation des membranes du compartiment intermédiaire entre le RE et l'appareil de Golgi (ERGIC pour *ER-to-Golgi intermediate compartment*) vers le cis-Golgi est dépendante de l'interaction entre p115 et GM130 (Alvarez et al, 2001). De plus, l'expression de GM130, délété de son domaine d'interaction pour p115, induit l'accumulation des vésicules à manteau COPI et inhibe le transport de la protéine sécrétée VSV-G (pour *vesicular stomatis virus membrane glycoprotein*) à la membrane plasmique (Seemann et al, 2000). Une réduction globale de GM130 bloque la formation de citernes matures en saccule et affaiblit les quantités de membranes délivrées au cis-Golgi, induisant un rétrécissement des citernes et une fragmentation des ribbons (Marra et al, 2007; Puthenveedu et al, 2006) (Figure 36).

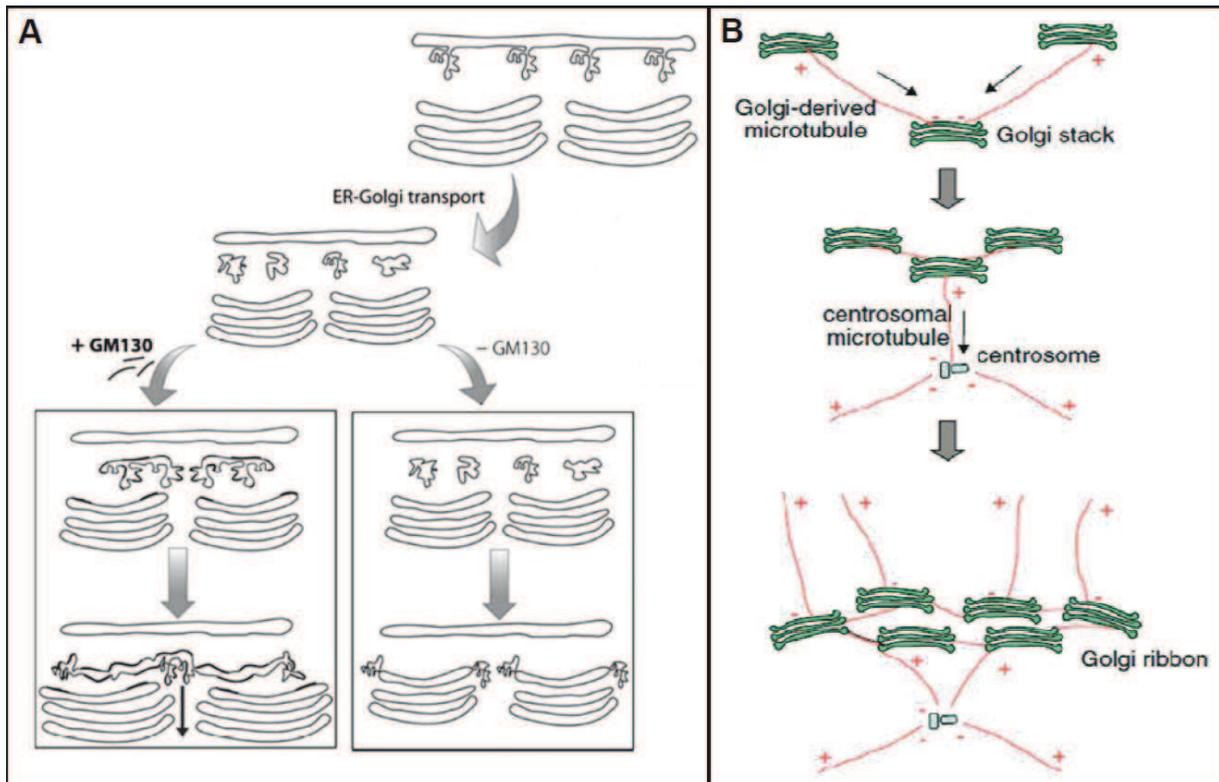


Figure 36 : Maintenance de la structure de l'appareil de Golgi par GM130 (A) et par les microtubules (B). D'après (Lowe, 2011; Marra et al, 2007).

Enfin, GM130 est également impliquée dans le maintien de la structure de l'appareil de Golgi de façon indirecte puisqu'elle coopère avec AKAP450. AKAP450 assure la continuité des ribbons (Hurtado et al, 2011), probablement via son rôle dans la nucléation des microtubules (Rivero et al, 2009).

Microtubules golgiens

Le centre organisateur des microtubules le plus largement étudié est le centrosome. Récemment, un autre sous ensemble de microtubules a été identifié, et leur nucléation se fait à la surface de l'appareil de Golgi (Chabin-Brion et al, 2001). Comme au centrosome, cette nucléation nécessite le complexe protéique γ -TURC. Le complexe est recruté à la surface du cis-Golgi par la protéine AKAP450 ou la protéine golgienne GMAP210 (Rios et al, 2004; Rivero et al, 2009; Takahashi et al, 2002 {Takahashi, 1999 #4800}). AKAP450 est une protéine localisée à la surface du Golgi et également au centrosome (Takahashi et al, 1999; Witczak et al, 1999). La surexpression de GMAP210 induit la formation de microtubules raccourcis au niveau des membranes golgiennes et la diminution de GMAP210 induit une fragmentation de l'appareil de Golgi (Infante et al, 1999; Rios et al, 2004).

Les microtubules nucléés à la surface golgienne possèdent des caractéristiques particulières : ils sont associés à des protéines CLASP. Les CLASP permettent l'élongation des microtubules au cis-Golgi et leur stabilisation (Efimov et al, 2007). Les microtubules « golgiens » associés aux CLASP sont rapidement acétylés. Ces microtubules sont plus stables et résistants à un traitement dépolymérisant au nocodazole (Chabin-Brion et al, 2001). Ces microtubules sont nécessaires à l'intégrité des ribbons golgiens. En effet, une réduction d'expression des CLASP augmente la fragmentation de l'appareil de Golgi, suggérant un défaut de fusion membranaire entre les ribbons (Miller et al, 2009). De même, une dissociation spécifique de AKAP450 à la surface de l'appareil de Golgi, sans affecter la fraction centrosomale, fragmente les ribbons golgiens en petites structures autour du centrosome (Hurtado et al, 2011) (Figure 36).

Les microtubules golgiens participent ainsi au maintien de la structure de l'appareil de Golgi. Néanmoins, grâce à leur implantation stratégique à la surface des ribbons golgiens, ils permettent également la dynamique et le positionnement de l'appareil de Golgi lors de modifications structurales de la cellule telles que la polarisation cellulaire.

1.3.2.2 Dynamique et positionnement de l'appareil de Golgi

Les microtubules centrosomaux sont nécessaires au positionnement de l'appareil de Golgi. Cependant, la position de l'appareil de Golgi est maintenue après ablation du centrosome, indiquant que les microtubules golgiens stabilisent la position de l'appareil de Golgi (Efimov et al, 2007). Contrairement aux microtubules centrosomaux, les microtubules golgiens ne s'étendent pas de façon radiaire, mais sont orientés et donc asymétriques (Efimov et al, 2007). Notamment au cours de la migration cellulaire, les microtubules golgiens se positionnent face au front de migration de la cellule (Kodani & Sutterlin, 2009) (Figure 37).

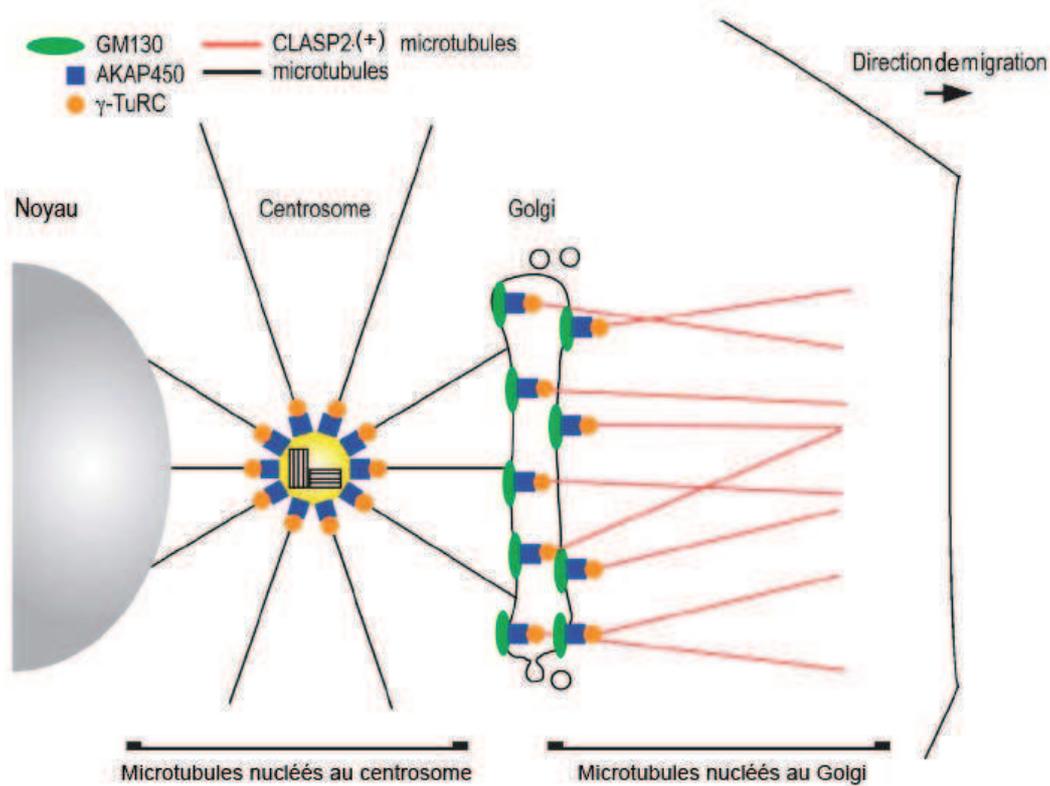


Figure 37 : Organisation des centres de nucléation des microtubules, au centrosome et à la membrane golgienne.
D'après (Kodani & Sutterlin, 2009)

Les moteurs moléculaires des microtubules transportent les membranes comme sur des routes. Le mouvement centripète des membranes est conduit par des forces générées principalement par la dynéine (Kardon & Vale, 2009). Ce moteur moléculaire transporte le long des microtubules des cargos tels que les membranes golgiennes, grâce à des changements conformationnels. L'inhibition de l'isoforme dynéine I cause la fragmentation de l'appareil de Golgi qui se disperse et reste immobile (Harada et al, 1998; Palmer et al, 2009). Le blocage spécifique de l'isoforme dynéine 2, localisé au niveau des membranes golgiennes, génère une perte de positionnement de l'appareil de Golgi (Vaisberg et al, 1996). La dynéine permet donc le positionnement péricentrosomal des ribbons. Cette position est perdue notamment au cours de la division cellulaire et de l'apoptose (Yadav & Linstedt, 2011).

1.3.2.3 Rôles de l'appareil de Golgi

1.3.2.3.1 Régulation des voies de signalisation

De nombreuses molécules de signalisation sont associées aux membranes golgiennes, conférant ainsi à l'appareil de Golgi des fonctions de régulateur de voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, la mobilité cellulaire ou le trafic intracellulaire. Nous nous intéressons ici plus particulièrement aux voies de signalisation impliquant les interactions de la cellule avec son environnement.

Voie de signalisation Ras/Erk

La petite protéine G Ras contrôle la prolifération et la différenciation cellulaire, en réponse aux facteurs de croissance tels que le FGF ou l'EGF. Généralement, la GTPase Ras est activée par la protéine SOS liée à Grb2 à la membrane plasmique, suite à l'activation des récepteurs à l'EGF ou au FGF (*cf. schéma paragraphe 1.2.1 Récepteurs aux facteurs solubles*). Cependant, une partie des protéines Ras est localisée au niveau de l'appareil de Golgi et est activée par une kinase de la famille Src via la phospholipase C γ . Un des effecteurs de Ras est la protéine Erk. Il existe une protéine Sef qui agit comme un régulateur spatial de la voie Ras/Erk (Torii et al, 2004). L'activation de la kinase Erk au niveau de l'appareil de Golgi induit notamment la phosphorylation de GRASP65, le remodelage et l'orientation des ribbons, et permet la migration dirigée des cellules en culture (Bisel et al, 2008; Wei & Seemann, 2009; Yoshimura et al, 2005).

Voie de signalisation Cdc42

A l'exception des cellules neuronales, Cdc42 est la seule Rho GTPase recrutée et activée au niveau golgien. Cdc42 est présente à tous les niveaux de l'appareil de Golgi, mais est enrichie au niveau des citernes du cis-Golgi (Matas et al, 2004). De nombreux composants de la voie de signalisation de Cdc42 sont présents à la surface de l'appareil de Golgi : des protéines GAP (pour *GTPase-activating protein*) et des GEF (pour *guanine nucleotide exchange factor*), telles que ARHGAP4 (Foletta et al, 2002), ARHGAP10 aussi appelé ARHGAP21 (Dubois et al, 2005; Hehnlly et al, 2010), Fgd1 (Estrada et al, 2001) et TUBA (Kodani et al, 2009).

Cdc42 régule la sortie des protéines apicales et basolatérales du TGN de cellules épithéliales participant ainsi à leur polarisation (Musch et al, 2001). Cdc42 recrute au niveau de l'appareil de Golgi des régulateurs de l'actine, comme N-WASP (pour *neural Wiskott-Aldrich syndrome protein*), nécessaires au transport de protéines et à l'assemblage local du réseau d'actine (Luna et al, 2002). De plus, Cdc42 active, associée à la sous-unité γ -COP, régule le trafic entre le RE et le cis-Golgi dépendant de la dynéine (Chen et al, 2005b). Cdc42 régule le positionnement de l'appareil de Golgi, via ARHGAP10 et le recrutement de la dynéine au cytosquelette (Hehnlly et al, 2010). Enfin, GM130 a été récemment impliqué dans la régulation de l'activité de Cdc42. En effet, GM130 interagit avec la protéine GEF de Cdc42 appelée TUBA et contrôle la morphologie du centrosome (Kodani et al, 2009).

1.3.2.3.2 Maturation des glycoprotéines, des lipides et des protéoglycanes

Glycosylation des protéines

Les protéines sont synthétisées à la surface du RE rugueux, puis transportées dans la lumière de l'appareil de Golgi pour être glycosylées. Il existe deux types de glycosylation de protéine : la N-glycosylation et O-glycosylation. La N-glycosylation d'un résidu asparagine commence dans le RE et le remodelage des sucres se fait au niveau golgien (Figure 38).

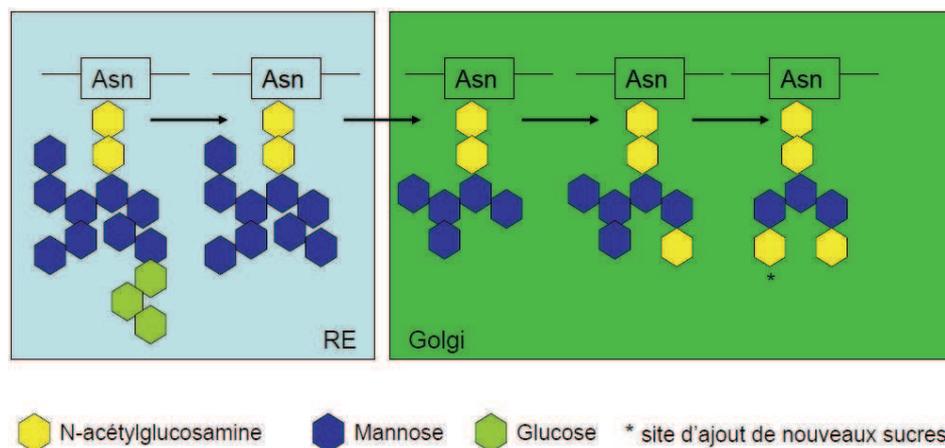


Figure 38 : Exemple de modifications des chaînes N-glycosylées des glycoprotéines dans le RE et l'appareil de Golgi.

Les O-glycosylations de résidus serine ou thréonine se font directement dans l'appareil de Golgi. Pour cela, l'appareil de Golgi héberge des glycosyltransférases telles que les

mannosidases, les sialyltransférases, les fucosyltransférases, les galactosyltransférases ou les N-acétylglucosamine transférases et également les mannosidases ou les glucosidases (de Graffenried & Bertozzi, 2004)

Synthèse des gangliosides

Les lipides sont aussi des substrats pour les N- et O-glycosylations au niveau de l'appareil de Golgi. Les gangliosides sont des glycolipides acides dérivés de la céramide, dont les chaînes oligosaccharidiques sont terminées par des résidus d'acides sialiques ou acides N-acétylneuraminiques (Figure 39).

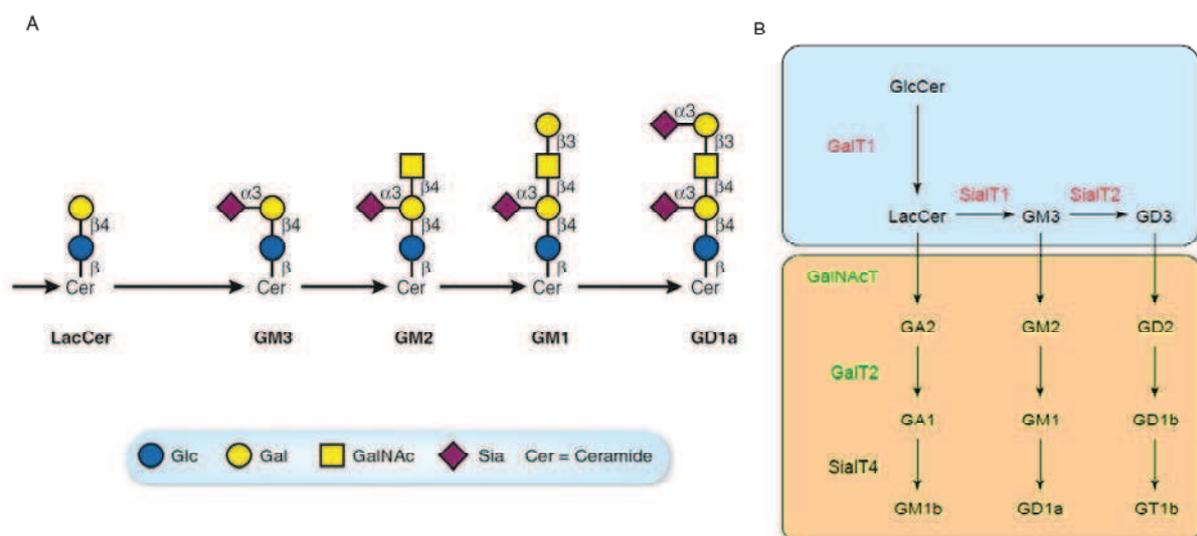


Figure 39 : La voie de biosynthèse des gangliosides.

D'après (Banda et al, 2009; de Graffenried & Bertozzi, 2004). Glc = glucose, Gal = galactose ; GalNAc = N-acétylgalactosamine ; Sia = acide sialique

Tous les gangliosides sont formés sur la base d'un précurseur lactosylcéramide (LacCer), produit par l'action de la galactosyltransférase 1 (GalT1) sur la glucosylcéramide (GlcCer). La synthèse du premier ganglioside monosialylé, GM3, s'effectue par la sialyltransférase (SialT) 1 qui ajoute un acide sialique sur LacCer. GM3 peut être de nouveau sialylé par une SialT pour devenir successivement un ganglioside disialylés, GD3 ou trisialylés (GT3). L'ajout de N-acétyl galactosamine (GalNAc) par la GalNAc transférase (GalNAcT) transforme, respectivement, les gangliosides simples, GM3, GD3 et GT3 en GM2, GD2 et GT2. Puis, la GalT2 ajoute un résidu galactose sur la chaîne saccharidique pour former les GM1, GD1 et GT1. La SialT4 permet d'ajouter un nouvel acide sialique à ces composés.

Les enzymes nécessaires pour la formation des GM3, GD3 ou GT3 sont présentes au niveau de cis-Golgi ou de la partie médiale de l'appareil de Golgi, alors que les enzymes nécessaires à la formation des gangliosides dérivés des GM3, GD3 et GT3 sont présents au niveau du trans-Golgi (van Echten et al, 1990; Young et al, 1990). Ce gradient de distribution d'enzyme génère une ségrégation des gangliosides au sein de l'appareil de Golgi (Bretscher & Munro, 1993).

Modifications post-traductionnelles

Des modifications post-traductionnelles telles que les phosphorylations, les méthylations ou les sulfatations sont effectuées dans l'appareil de Golgi. Certaines modifications sont essentielles à l'adressage des protéines dans la cellule. Par exemple, la phosphorylation de certains résidus mannose au niveau du cis-Golgi forme une séquence d'adressage au lysosome appelée mannose-6-phosphate.

1.3.2.3.3 Centre d'aiguillage du trafic vésiculaire

L'appareil de Golgi assure un contrôle précis sur les protéines, en fonction de leur destination : réticulum endoplasmique, lysosome, membrane plasmique...

Vers le réticulum endoplasmique

D'abord, l'appareil de Golgi s'assure que les protéines destinées au fonctionnement du RE seront retournées par un flux rétrograde vers ce dernier. Ces protéines contiennent une séquence d'adressage : KDEL pour les protéines solubles, KKXX pour les protéines membranaires. Certaines protéines comportant la séquence KKXX servent de récepteurs au KDEL et assurent ainsi le flux rétrograde des protéines à KDEL de l'appareil de Golgi vers le RE (Figure 40).

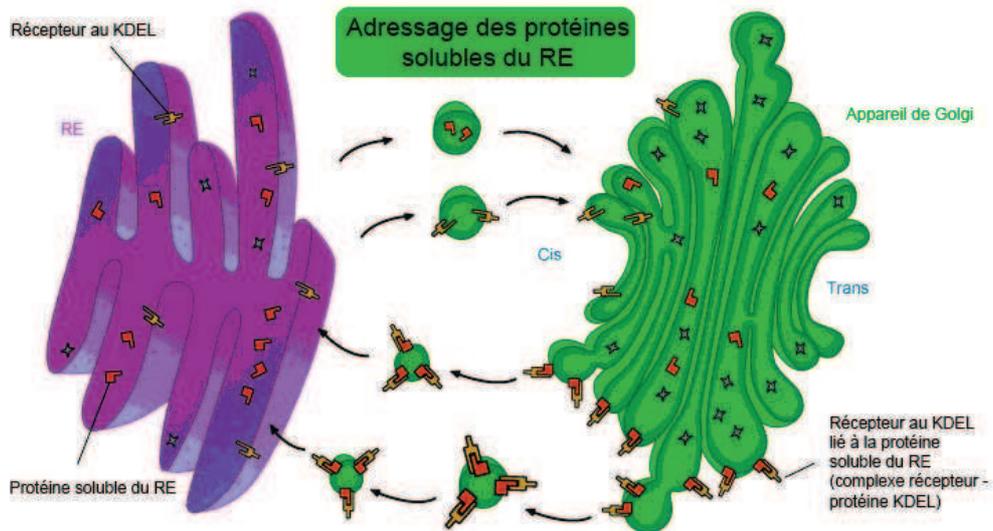


Figure 40 : Adressage des protéines solubles du RE.

Vers la membrane plasmique

Il existe deux types de sécrétions dans l'appareil de Golgi. La sécrétion constitutive est généralement dirigée vers la membrane plasmique. Cette sécrétion ne nécessite aucun signal. Elle implique des vésicules initialement recouverte d'un revêtement non formé de clathrine. Ces vésicules de petites tailles fusionnent directement avec la membrane plasmique (exocytose). Cette voie apporte à la membrane plasmique des constituants qui lui sont propres tels que les glycoprotéines (récepteurs, transporteurs, lipides) pour compenser l'endocytose. La sécrétion constitutive permet également la sécrétion continue de protéines matricielles, comme, par exemple, du collagène par les fibroblastes.

La sécrétion contrôlée nécessite un signal. Ce principe permet de contrôler l'exportation des protéines. Elle a lieu dans les cellules spécialisées. Ces cellules mettent en réserve des produits de sécrétion au sein de vésicules recouvertes initialement de clathrine. Ces vésicules sont sécrétées sous l'effet d'un stimulus, nerveux ou hormonal. Ces signaux proviennent de la cellule elle-même (potentiel d'action des neurones moteurs) ou ont des origines extracellulaires, comme les facteurs de croissance. Les granules de sécrétion sont situées dans les régions périphériques du cytoplasme.

Vers le lysosome

Il existe plusieurs voies par lesquelles les protéines lysosomales peuvent être adressées aux lysosomes. La plus connue est le transport par les récepteurs au mannose-6-phosphate (M6P).

Dans le trans-Golgi, des récepteurs au M6P concentrent les protéines à mannose-6-phosphate dans des vésicules spécifiques qui sont ensuite adressées aux lysosomes (Figure 41).

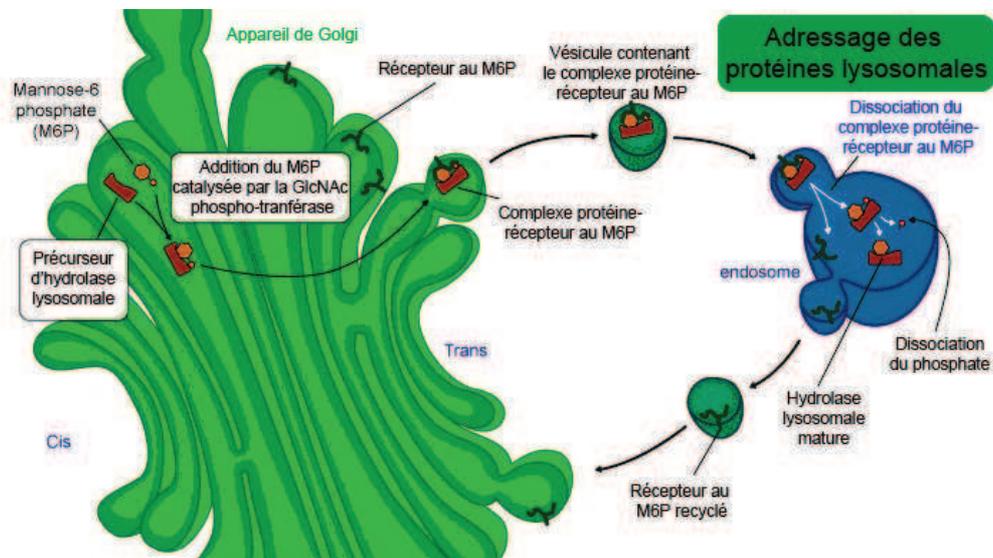


Figure 41 : Adressage des enzymes lysosomales par le récepteur au mannose-6-phosphate.

La marque M6P est nécessaire pour le ciblage vers le lysosome des hydrolases solubles, mais les protéines membranaires du lysosome ne contiennent pas de motif M6P. A la place, les protéines membranaires affichent un signal d'adressage vers la voie endolysosomale au niveau de leur extrémité cytosolique (van Meel & Klumperman, 2008). Ce signal peut être de deux types : $YXX\Phi$ ou $[DE]XXXL[LI]$. L'adressage des protéines lysosomales se fait de deux façons. Les protéines de la membrane lysosomale sont soit transportées directement, du TGN vers le système endo-lysosomal, soit indirectement. La voie indirecte implique le transport depuis le TGN jusqu'à la membrane plasmique, le long de la voie sécrétoire constitutive, puis l'endocytose. La plupart des protéines LAMP (pour *lysosome-associated-membrane proteins*) et LIMP (pour *lysosomal integral membrane protein*) sont transportées par la voie directe (Fukuda, 1991).

1.4 La polarisation des cellules en migration

1.4.1 Les mécanismes

La migration est un processus biologique primordial dans le règne animal. In vivo, les cellules migrent au cours du développement embryonnaire, chez l'adulte, les leucocytes migrent pendant l'inflammation et les fibroblastes pendant la cicatrisation, et également en situation pathologique telle que la migration des cellules cancéreuses. Les stimuli de la migration sont divers mais la plupart sont des signaux moléculaires comme les chimiokines, les facteurs de croissance ou les protéines de la matrice extracellulaire. La migration est dirigée par les facteurs environnementaux. Dans un modèle classique de migration dirigée dans un environnement en deux dimensions, la motilité cellulaire peut être divisée en quatre étapes séquentielles (Ridley et al, 2003) : (1) l'expansion d'une protrusion à l'avant de la cellule en migration, cette protrusion est appelée « leading edge », (2) l'établissement de nouveaux contacts entre la cellule et la MEC, (3) la contraction de l'arrière de la cellule pour déplacer le corps cellulaire en avant, (4) le détachement de l'arrière de la cellule, appelé « trailing edge ». Le mouvement vers l'avant est donc dépendant de l'interaction entre la cellule et sa matrice extracellulaire et de la dynamique intracellulaire générée par le cytosquelette.

Au cours de la migration, la cellule se polarise sur un axe avant-arrière. Même sans signalisation externe, une cellule peut se polariser avec les mêmes processus intracellulaires que pour une migration dirigée. La polarisation est l'acquisition d'une asymétrie structurelle et fonctionnelle, dans laquelle la position de chaque organelle n'est pas aléatoire car leur fonction contribue à l'établissement de la polarité (Bornens, 2008). Dans le cas particulier de la polarisation de cellules en migration, les organelles telles que le centrosome et l'appareil de Golgi se positionnent en avant du noyau dans le sens de migration (Figure 42).

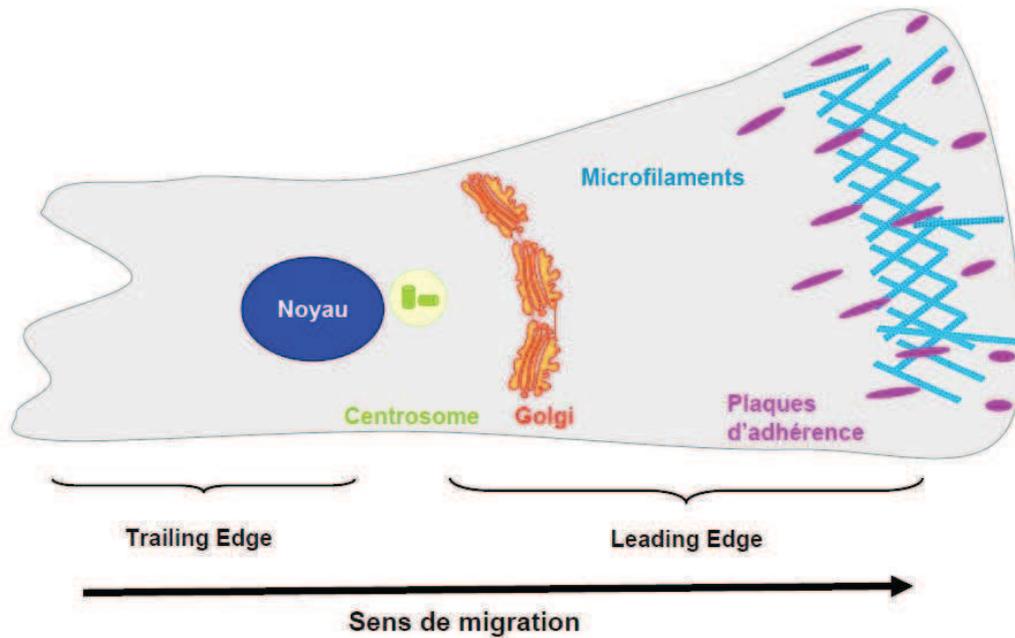


Figure 42 : Organisation d'une cellule polarisée en migration.

Le positionnement du centrosome est un mécanisme essentiel pour la polarisation, notamment pour les neurones en différenciation (de Anda et al, 2005). En interphase, le centrosome est généralement à côté du noyau. L'axe noyau-centrosome et l'axe avant-arrière se confondent dans une cellule en migration. La position relative du centrosome par rapport au noyau indique la direction de migration (Figure 42).

L'appareil de Golgi se positionne autour du centrosome en interphase. Son repositionnement au cours de la migration en avant du noyau est probablement une conséquence du repositionnement du centrosome. Cependant, l'importance du positionnement et de la morphologie de l'appareil de Golgi dans la polarisation a été mise en évidence plus récemment (Hehnly et al, 2010; Yadav & Linstedt, 2011). Il semble aujourd'hui évident que le positionnement de ces deux organelles est dépendant du cytosquelette de microtubule et des voies de signalisation de la famille Rho.

1.4.1.1 La signalisation des intégrines au cours de la polarisation cellulaire

Nous avons vu précédemment que les intégrines au sein des plaques d'adhérence génèrent de multiples voies de signalisation (*cf. paragraphe 1.2.2.3 Voies de signalisation*). Les voies de signalisation des intégrines sont largement impliquées dans l'établissement de la polarité. Principalement, la Rho GTPase Cdc42 régule la réorientation du centrosome, et donc la polarisation, des cellules en migration telles que les fibroblastes et les astrocytes, mais également des lymphocytes T ou des cellules épithéliales (Etienne-Manneville, 2004). Dans les cellules en migration, l'activation de Rac1 par Cdc42 permet la coordination entre la polarisation et la formation de la protrusion au leading edge. L'engagement des intégrines avec les protéines de la MEC et la voie de signalisation Cdc42 qui en découle, sont nécessaires à la réorientation du centrosome en avant des cellules en migration (Gomes et al, 2005; Manneville et al, 2010; Palazzo et al, 2001b).

Pour cela, Cdc42 stabilise localement les microtubules en recrutant CLIP170, via la voie IQGAP (Fukata et al, 2002). Cdc42 active également le complexe Par6/aPKC qui polarise les microtubules en inactivant GSK3 β (Etienne-Manneville & Hall, 2003). En effet, l'inhibition de GSK3 β permet aux protéines CLASP de stabiliser les microtubules au leading edge (Kumar et al, 2009) et permet également l'association d'APC aux extrémités (+) des microtubules (Etienne-Manneville, 2009). La voie Par6-aPKC promeut le recrutement de la protéine de polarité Dlg1 au niveau du leading edge et son interaction avec APC (Etienne-Manneville et al, 2005; Manneville et al, 2010). Par ailleurs, la signalisation de RhoA, induite par FAK, permet le recrutement de mDia et la stabilisation des microtubules au leading edge (Gundersen et al, 2005; Palazzo et al, 2001a; Palazzo et al, 2004; Wen et al, 2004). Les microtubules sont ainsi polarisés au sein de la cellule en migration puisque leurs extrémités (+) sont ancrées (par APC/Dlg1) et stabilisées (par CLASP) au leading edge. Cdc42 régule la réorientation du centrosome grâce aux moteurs moléculaires des microtubules, les dynéines (Palazzo et al, 2001b; Schmoranzler et al, 2009). Dlg1 lie GKAP pour contrôler l'association de la dynéine aux microtubules, responsable de la réorientation du centrosome (Manneville et al, 2010). Pour générer un réseau polarisé de microtubules, les polymères peuvent également se détacher du centrosome et être transportés par la dynéine (Ahmad et al, 1998; Yvon & Wadsworth, 2000).

La réorientation du centrosome semble donc être due à une balance entre : (1) l'action de la dynéine et des microtubules, stabilisés au leading edge, pour maintenir le centrosome au

centre de la cellule, (2) l'action de la myosine II et des microfilaments pour faire reculer le noyau derrière le centrosome (Figure 43). Ces deux actions sont contrôlées par la signalisation de Cdc42 (Gomes et al, 2005; Gundersen et al, 2005; Manneville et al, 2010).

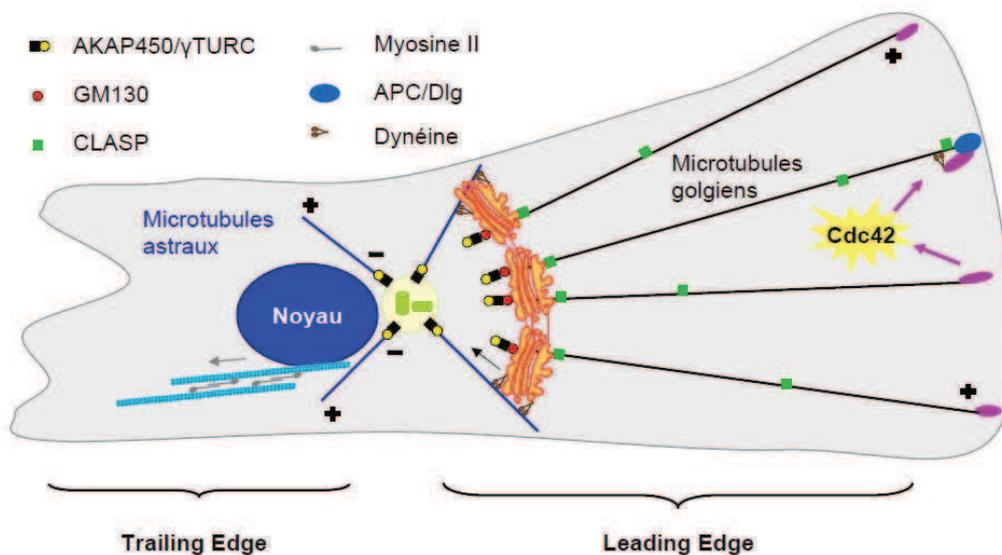


Figure 43 : Polarisation d'une cellule en migration par l'action du cytosquelette.

Les microtubules assurent donc un rôle crucial dans l'établissement de la polarité cellulaire. En effet, pour que la polarisation ait lieu, les microtubules doivent être stabilisés, orientés vers les plaques d'adhérence au leading edge, et ancrés au cortex cellulaire. De façon intéressante, les caractéristiques de ces microtubules polarisés correspondent à ceux des microtubules nucléés à la surface de l'appareil de Golgi (Efimov et al, 2007). Les microtubules golgiens semblent être indispensables pour former une sous-population de microtubules asymétriques (Vinogradova et al, 2009).

1.4.1.2 Le rôle de l'appareil de Golgi

L'appareil de Golgi peut être impliqué dans la polarisation de cellules en migration pour trois raisons : (1) l'association proche de l'appareil de Golgi avec le centrosome, (2) la polarisation du trafic sécrétoire vers le leading edge, (3) l'orientation de microtubules golgiens vers le leading edge.

Le centrosome et l'appareil de Golgi sont les deux sources de nucléation des microtubules dans une cellule en migration. Le centrosome génère un réseau de microtubules astraux avec l'extrémité (-) au centrosome et l'extrémité (+) à la périphérie (Figure 43). La fonction des microtubules astraux est de maintenir la localisation pericentrosomale de l'appareil de Golgi, par l'intermédiaire de la dynéine. Le réseau, asymétrique et stabilisé, de microtubules golgiens fournit un soutien pour le transport polarisé des protéines vers l'avant de la cellule. En l'absence de microtubules nucléés au niveau de l'appareil de Golgi, induit par déplétion des CLASP, la polarité, du trafic post-golgien et de la migration, sont perdues (Miller et al, 2009). De même, la déplétion d'AKAP450 au niveau golgien, mais pas au centrosome, perturbe la migration dirigée (Rivero et al, 2009). Enfin, des cellules délétées de GMAP210 ou de golgine160 présentent un appareil de Golgi fragmenté et dispersé, ne forment pas de réseau asymétrique de microtubules acétylés, ne polarisent pas leur sécrétion et ne réorientent pas leur centrosome (Yadav & Linstedt, 2011).

En effet, l'intégrité de l'architecture en ribbon de l'appareil de Golgi semble être requise pour la polarisation cellulaire. La protéine GRASP65, protéine de liaison des ribbons golgiens, est phosphorylée par Erk au cours de la polarisation. La phosphorylation de GRASP65 fragmente les citernes golgiennes, comme dans des cellules en mitose. L'expression d'une forme non phosphorylable de GRASP65 bloque la réorientation du centrosome et de l'appareil de Golgi. Ce blocage peut être neutralisé par fragmentation artificielle des membranes golgiennes par un traitement à la Bréfeldine A (Bisel et al, 2008).

Une étude plus récente propose que la position des ribbons golgiens soit plus importante que leur intégrité. L'inhibition spécifique d'AKAP450 de la surface de l'appareil de Golgi empêche la nucléation des microtubules golgiens, induit la fragmentation du Golgi, mais n'affecte pas sa position (Hurtado et al, 2011).

D'autre part, l'importance du Golgi pour la polarisation cellulaire a été révélée par GM130, partenaire de GRASP65, qui recrute et active la kinase YSK1. Les protéines de la famille d'YSK1 sont importantes pour l'assemblage de l'appareil de Golgi, son positionnement et la migration cellulaire (Fidalgo et al, 2010). L'expression d'un dominant négatif d'YSK1 bloque la réorientation du centrosome et de l'appareil de Golgi (Preisinger et al, 2004).

La polarisation est indispensable à la migration cellulaire. Elle est également importante à la mise en place des tissus tels que le système nerveux central.

1.4.2 La migration et la polarisation des cellules dans le système nerveux central

1.4.2.1 La polarité neuronale

La polarité neuronale se caractérise par l'asymétrie axone-dendrites (Dotti et al, 1988). Typiquement, un neurone possède un axone et plusieurs dendrites. La polarité axone-dendrites permet aux neurones d'intégrer et de transmettre les informations dans le cerveau. La plupart des connaissances sur les mécanismes de polarisation des neurones viennent d'études *in vitro*. Il existe principalement trois modèles pour rendre compte de la polarisation de neurones *in vitro* : les cellules granulaires du cervelet et les neurones pyramidaux d'hippocampe et de cortex. L'asymétrie axone-dendrites s'établit entre l'étape 2 et l'étape 3 pour des neurones corticaux en culture (Figure 44).

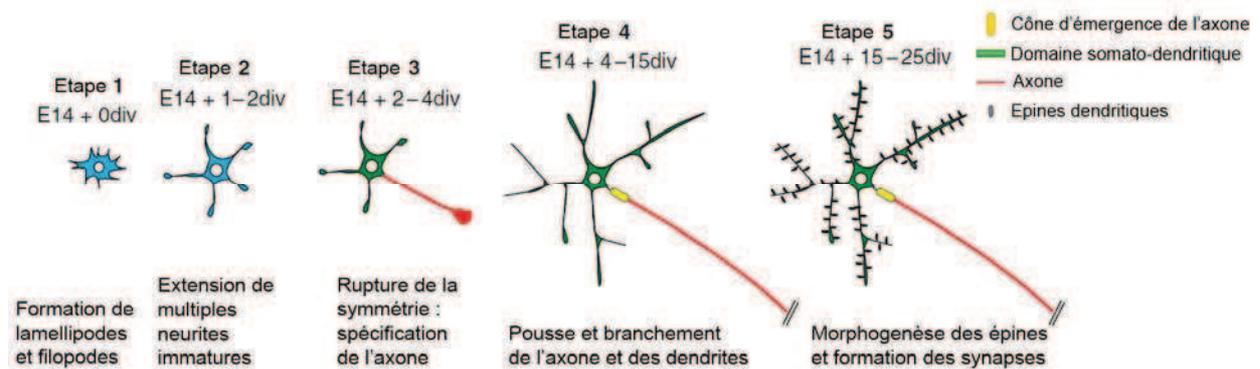


Figure 44 : Etapes de la polarisation des neurones corticaux en culture.,
D'après (Polleux & Snider, 2010)

Les études de ces neurones en culture ont permis de mettre en évidence l'induction de la polarisation par l'activation asymétrique de voies de signalisation intracellulaires. Ces signalisations résultent d'interactions complexes entre les signaux extracellulaires et les signaux de polarité intrinsèques à la cellule.

Les signaux responsables de la polarisation neuronale

Les signaux extracellulaires peuvent être des facteurs de croissance tels que le BDNF (Shelly et al, 2007), le TGF β (Yi et al, 2010), ou des molécules de guidance comme la nétrine (Poon et al, 2008), la sémaphorine Sema3A (Polleux et al, 1998), la reeline (Matsuki et al, 2010), la NgCAM (pour *Neuron-glia cell adhesion molecule*) (Esch et al, 1999) ou Slit (Higginbotham et al, 2006). La matrice extracellulaire et les protéoglycanes influencent également la

polarisation. En effet, les HSPG semblent déstabiliser la morphologie des neurones, alors que les protéoglycanes de CS favorisent la pousse axonale. Ces effets ne semblent pas être dépendants du cœur protéique des protéoglycanes, mais plutôt des saccharides d'HS ou de CS (Lafont et al, 1994; Lafont et al, 1992; Nishimura et al, 2010).

La laminine assure également un rôle dans la détermination de l'axone in vitro et in vivo. Le contact avec la laminine est corrélé avec l'émergence de l'axone (Dertinger et al, 2002; Esch et al, 1999; Lei et al, 2012; Randlett et al, 2011). Ces observations suggèrent l'implication des intégrines dans la détermination axonale. Les intégrines, notamment l'intégrine $\beta 1$, ont été récemment impliquées dans la polarisation des neurones in vitro et in vivo (Gupta et al, 2010; Lei et al, 2012).

Les facteurs intrinsèques qui influencent la polarisation sont multiples. Des études suggèrent que le site d'émergence du premier neurite est défini, de façon intrinsèque, par le positionnement du centrosome et de l'appareil de Golgi (de Anda et al, 2010; de Anda et al, 2005; Zmuda & Rivas, 1998). Toutefois, de nouvelles recherches ont remis en cause ce concept (Distel et al, 2010; Gartner et al, 2012). L'absence de centrosome dans des cultures de neurones hippocampaux n'interfère pas avec la genèse de l'axone (Stiess et al, 2010). L'appareil de Golgi se polarise également, mais le rôle du Golgi dans la mise en place de la polarité neuronale n'est pas bien connu. Outre sa fonction dans la sécrétion, quelques travaux ont montré que des signalisations intrinsèques pouvaient être générées au Golgi. C'est le cas de Stk25, ou YSK1, partenaire de GM130 au cis-Golgi, qui contrebalance l'effet de la reeline (Matsuki et al, 2010). Même si l'importance des microtubules nucléés au centrosome a été minimisée ces dernières années, le rôle des microtubules golgiens sur la polarisation neuronale, qui n'a pas encore été étudié, pourrait peut-être expliquer la réorientation de l'appareil de Golgi et du centrosome au site d'émergence du premier neurite.

Signalisation de la polarisation neuronale

Comme pour les cellules en migration, les neurones se polarisent sous les effets de la signalisation Cdc42 (Etienne-Manneville & Hall, 2003; Nishimura et al, 2005; Schwamborn & Puschel, 2004). Il existe également de multiples voies de signalisation déterminantes pour la polarisation neuronale via PI3K, PTEN, AKT, GSK3, Ras, et Rho (Barnes & Polleux, 2009). Ces signalisations agissent sur les flux cytoplasmiques, le trafic membranaire dirigé et sur la dynamique du cytosquelette pour instaurer l'asymétrie axone-dendrites.

Dynamique du cytosquelette

Une étape importante de la régulation de la polarité neuronale est le remodelage du cytosquelette. En particulier, la dépolymérisation locale de l'actine, par des agents déstabilisateurs de type latrunculine B ou cytochalasine D, permet à un neurone à l'étape 2 d'émettre un axone (Bradke & Dotti, 1999). Inversement, la stabilisation des microtubules, par un traitement au taxol par exemple, est capable d'initier un axone (Hammond et al, 2010; Witte et al, 2008). Mais les mécanismes de stabilisation des microtubules ne sont pas connus. Une étude récente suggère que cette stabilisation, et donc l'axonogenèse, requière l'activation de l'intégrine $\beta 1$ par la laminine in vitro et in vivo (Lei et al, 2012).

In vivo

In vivo, les neurones postmitotiques acquièrent leur polarité au cours de leur migration. En migrant, les neurones forment un prolongement à l'avant et un prolongement à l'arrière qui deviendra l'axone. Cette polarité est elle-même héritée de la polarité apico-basale des progéniteurs neuronaux (Barnes & Polleux, 2009). Cette morphologie va permettre aux neurones corticaux d'effectuer leurs projections indispensables à la physiologie du système nerveux central (Figure 45).

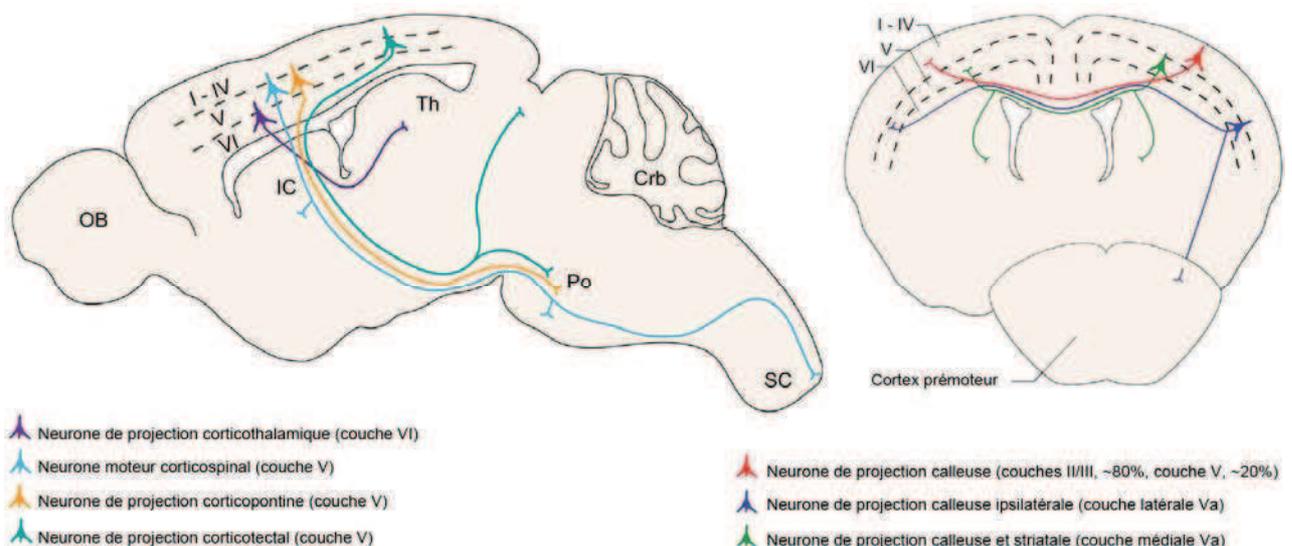


Figure 45 : Projections des neurones corticaux chez la souris.

D'après (Fame et al, 2011). OB, bulbe olfactif ; IC, Striatum ; Th, thalamus ; Po, pont ; Crb, cervelet ; SC, moelle épinière

1.4.2.2 Migration neuronale dans le cortex cérébral

Il existe principalement deux types de migration neuronale au cours du développement cérébral : la migration radiaire et la migration tangentielle (Figure 46). La génération d'un cortex fonctionnel à 6 couches implique le déroulement coordonné de ces deux types de migration.

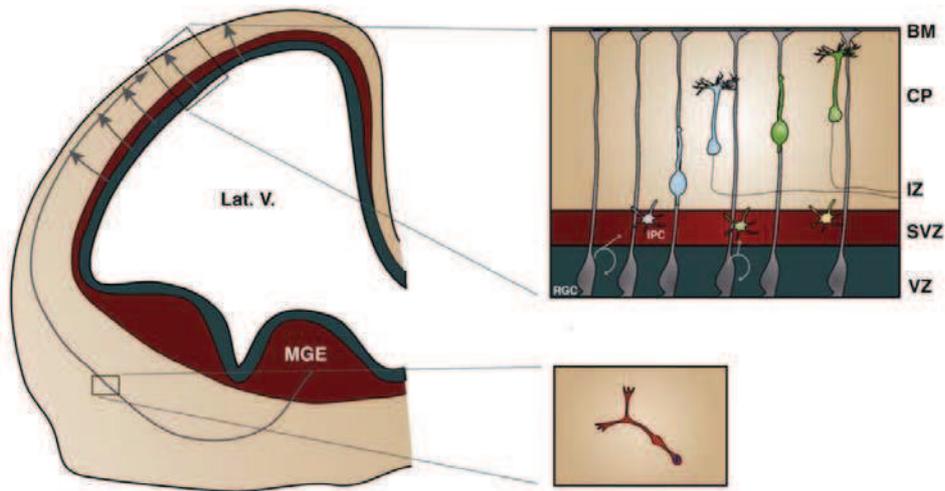


Figure 46 : Types de migration neuronale dans le cortex en développement.

D'après (Jaglin & Chelly, 2009). En haut, migration radiaire des neurones glutamatergiques à partir de la surface des ventricules latéraux (Lat.V.). En bas, migration tangentielle des neurones GABAergiques à partir des éminences ganglionnaires médianes (MGE pour *median ganglionic eminences*). BM, membrane basale ; CP, plaque corticale ; IZ, zone intermédiaire ; SVZ, zone subventriculaire ; VZ, zone ventriculaire ; RGC, cellules de la glie radiaire ; IPC, cellules progénitrices intermédiaires.

La migration tangentielle

Contrairement aux cellules pyramidales, la majorité des cellules non pyramidales dérive des éminences ganglionnaires médianes et ventrales et suivent une voie de migration tangentielle vers le cortex.

Les mécanismes responsables de la migration tangentielle des neurones issus des éminences ganglionnaires jusqu'au cortex cérébral font actuellement l'objet de nombreuses investigations (Nakajima, 2007). Ces neurones suivraient différentes voies, en empruntant notamment les fibres corticofuges. Ils atteindraient initialement la couche marginale, puis ultérieurement la zone intermédiaire et la plaque corticale. Il est possible que les interneurons reliant la plaque corticale utilisent la glie radiaire pour migrer de façon radiaire, mais « descendante ». Il en résulterait une migration neuronale bidirectionnelle avec les neurones en provenance de la zone ventriculaire.

La migration radiaire

Au début du développement embryonnaire, la paroi des vésicules télencéphaliques ne comporte que deux couches, la zone ventriculaire et la zone marginale, située immédiatement en dessous de la future pie-mère. Les cellules de la zone ventriculaire subissent des divisions produisant initialement des neuroblastes postmitotiques (et plus tard des cellules gliales). Ces neuroblastes vont migrer pour constituer une nouvelle couche, la zone du manteau ou zone intermédiaire. C'est vers la fin de la période embryonnaire que les neurones vont migrer le long des prolongements spécialisés des cellules de la glie radiaire, au-delà de la zone intermédiaire, à la face interne de la zone marginale, où ils forment une couche cellulaire dense : la plaque corticale, qui est une structure transitoire.

Par la suite, tous les neuroblastes nouvellement formés vont migrer à travers les couches de neurones différenciés pour se déposer sur le versant externe de la plaque corticale. Ce phénomène est communément appelé le « inside out layering ».

Puis la zone ventriculaire diminue sa production de neuroblastes qui sera reprise par une couche de cellules prolifératives située entre la zone ventriculaire et intermédiaire, la zone subventriculaire. Les neurones de cette zone prolifèrent (jusqu'à la naissance) et migrent en périphérie dans la sous plaque, qui va former, avec la plaque corticale, le futur cortex cérébral. Le nombre de couches cellulaires de ce dernier va varier en fonction de son origine phylogénique et sa maturité ne sera atteinte chez l'homme qu'à la fin de l'enfance (Valiente & Marin, 2010)

La protéine reeline, sécrétée dans la matrice extracellulaire par les cellules Cajal-Retzius localisées dans la zone marginale, sert de signal d'arrêt à la migration neuronale. Chez les souris mutantes reeler (dépourvues de la reeline) ou chez celles qui ont subi l'ablation des cellules Cajal-Retzius, on observe de graves troubles de la lamination corticale.

Des anomalies de la migration radiaire des neurones, causées par des mutations dans les protéines associées au cytosquelette, sont impliquées dans l'apparition de cellules neuronales dites "hétérotopiques", c'est à dire positionnées de façon aberrante. La lissencéphalie représente une forme sévère de ce type de malformation. Cette pathologie se caractérise par une surface cérébrale lisse et une cytoarchitecture anormale du néocortex, avec une épaisse bande sous-corticale de neurones hétérotopiques. Des mutations dans trois gènes, DCX, LIS1 et TUBA1A, ont été impliquées dans la lissencéphalie. Chacune des protéines codées par ces gènes participe au fonctionnement du cytosquelette de microtubules (Reiner & Sapir, 2009).

2 La mucopolysaccharidose de type III B, ou maladie de Sanfilippo de type B

2.1 Les mucopolysaccharidoses

2.1.1 Classification et bases génétiques des mucopolysaccharidoses

Les mucopolysaccharidoses ou MPS sont des maladies métaboliques héréditaires rares. Elles touchent environ une naissance sur 25 000 (Figure 47). Ces pathologies monogéniques sont transmises selon un mode autosomal récessif, à l'exception de la maladie de Hunter (MPS de type II) qui a une hérédité liée au chromosome X. Chacune de ces pathologies résulte de mutations génétiques responsables d'un déficit enzymatique. Plusieurs mutations, telles que les délétions, les insertions, les duplications, les mutations non-sens, faux-sens, ou touchant un site d'épissage, affectent parfois le même gène. Certaines mutations causent la perte complète de la fonction de l'enzyme, alors que d'autres réduisent simplement l'activité enzymatique. Mais les activités enzymatiques résiduelles peuvent être abolies par des défauts conformationnels. En conséquence, ces enzymes sont retenues dans le RE au cours de leur synthèse, puis dégradées par le système catalytique du protéasome. L'activité résiduelle restante ne dépasse généralement pas 5% de l'activité de l'enzyme.

Les MPS appartiennent à la grande famille des maladies de surcharge lysosomale. Les enzymes déficientes dans les MPS sont impliquées dans le catabolisme lysosomal des mucopolysaccharides ou glycoaminoglycanes (GAG). L'absence d'activité enzymatique conduit à l'accumulation des intermédiaires cataboliques de GAG (Figure 47).

Pathologie (nom du syndrome)	Incidence pour 100 000 naissances	Enzyme déficiente	GAG accumulés	symptômes neurologiques
MPS I (Hurler, Hurler-Scheie, Scheie)	0,69 - 1,66	α -L-iduronidase	dermatane sulfate, héparane sulfate	oui
MPS II (Hunter)	0,30 - 0,71	iduronate-2- sulfatase	dermatane sulfate, héparane sulfate	oui
MPS III A (Sanfilippo A)	0,29 - 1,89	héparane N-sulfatase	héparane sulfate	oui
MPS III B (Sanfilippo B)	0,42 - 0,72	α -N-acétylglucosaminidase	héparane sulfate	oui
MPS III C (Sanfilippo C)	0,07 - 0,21	acétyl-CoA- α -glucosaminide acétyltransférase	héparane sulfate	oui
MPS III D (Sanfilippo D)	0,10 -	N-acétylglucosamine-6-sulfatase	héparane sulfate	oui
MPS IV A (Morquio A)	0,22 - 1,30	galactose-6-sulfatase	kératane sulfate, chondroïtine sulfate	non
MPS IV B (Morquio B)	0,02 - 0,14	β -galactosidase	kératane sulfate	non
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	0,36 - 1,30	arylsulfatase B	dermatane sulfate, chondroïtine sulfate	non
MPS VII (Sly)	0,42 - 0,78	β -glucuronidase	dermatane sulfate, héparane sulfate, chondroïtine sulfate	oui
MPS IX	4 patients	hyaluronidase	acide hyaluronique	non

Figure 47 : Les mucopolysaccharidoses.

D'après (Heron et al, 2011; Muenzer, 2011; Wegrzyn et al, 2010).

Parmi les onze MPS connues, sept MPS accumulent des héparanes sulfates, les MPSI, MPSII, MPSIII et MPSVII. Les sept MPS accumulant des saccharides d'HS sont caractérisées par des atteintes neurologiques plus ou moins sévères (Figure 47). Parmi ces sept MPS, les MPS de type III (MPSIII), ou maladie de Sanfilippo, sont les seules MPS à n'accumuler que des héparanes sulfates. Elles sont les plus fréquentes des MPS, soit environ 1 cas pour 100 000 naissances (Heron et al, 2011; Muenzer, 2011; Valstar et al, 2008; Wegrzyn et al, 2010). Les MPSIII comprennent 4 sous-types désignés par les lettres A, B, C et D. Les MPS sont causés par plus de 100 mutations dans 4 gènes différents, respectivement : l'héparane N-sulfatase, α -N-acétylglucosaminidase, l'acétyl-CoA- α -glucosaminide acétyltransférase et la N-acétylglucosamine-6-sulfatase (Figure 47). Ces gènes codent pour des enzymes lysosomales, toutes impliquées dans le catabolisme des glucosamines terminales des chaînes saccharidiques d'HS (*cf. paragraphe 1.1.1.3 Dégradation des HS*). L'absence d'accumulation des HS dans les MPSIV, MPSVI et MPSIX, dans lesquelles les symptômes sont périphériques, suggère que la présence excessive des saccharides d'HS soit liée aux manifestations neurologiques observées dans les MPSIII. (Figure 47).

2.1.2 Nature des saccharides d'HS accumulés

Le lien entre les HS et les manifestations neurologiques est peut-être conditionné par la nature des saccharides d'HS qui s'accumulent dans les MPSIII. Il est donc indispensable de déterminer la nature des HS accumulés afin de comprendre les mécanismes physiopathologiques des MPS à manifestations neurologiques. En théorie, les types d'HS accumulés découlent de la composition des HS synthétisés et de l'enzyme déficiente. La composition des saccharides d'HS est complexe tant au niveau de l'enchaînement des disaccharides que de ses modifications, sulfatations et/ou acétylation (*cf. chapitre 1.1.1 Protéoglycanes d'HS*). L'enzyme déficiente détermine le type d'extrémité non réductrice des fragments d'HS. Par exemple, le disaccharide [IdoA-HNAc(S)] et le tétrasaccharide [IdoA-HNAc-UA(S)] observés dans les MPSI contiennent un acide iduronique à l'extrémité non réductrice, comme prévu en cas d'absence de l' α -L-iduronidase (Fuller et al, 2004). Une étude récente a montré qu'il existait des saccharides spécifiques pour chacune des enzymes déficientes dans les MPS et que ces spécificités pourraient, à l'avenir, permettre leur diagnostic (Lawrence et al, 2012).

La composition des saccharides d'HS accumulés a été principalement étudiée sur les GAG sécrétés dans les urines des patients MPS. Des analyses sur gel d'agarose ont montré que les urines de sujet non atteint contenaient des GAG avec une proportion de 90% de chondroïtine sulfate et 10% d'HS. Cette différence s'égalise dans les urines des patients MPSIII (Coppa et al, 2011a). Cependant, des études par électrophorèse capillaire et HPLC (pour *high-performance liquid chromatography*) montrent que les chondroïtines sulfates sont présents sous forme de polymères de haut poids moléculaire alors que les HS sont principalement des oligomères (Coppa et al, 2011b).

La taille des GAG

Les GAG accumulés sont de taille variable d'un MPS à l'autre. Les urines de patients MPSII contiennent des petites tailles de GAG, alors que les urines des MPSIII contiennent principalement des GAG de plus de 4 saccharides (Figure 48).

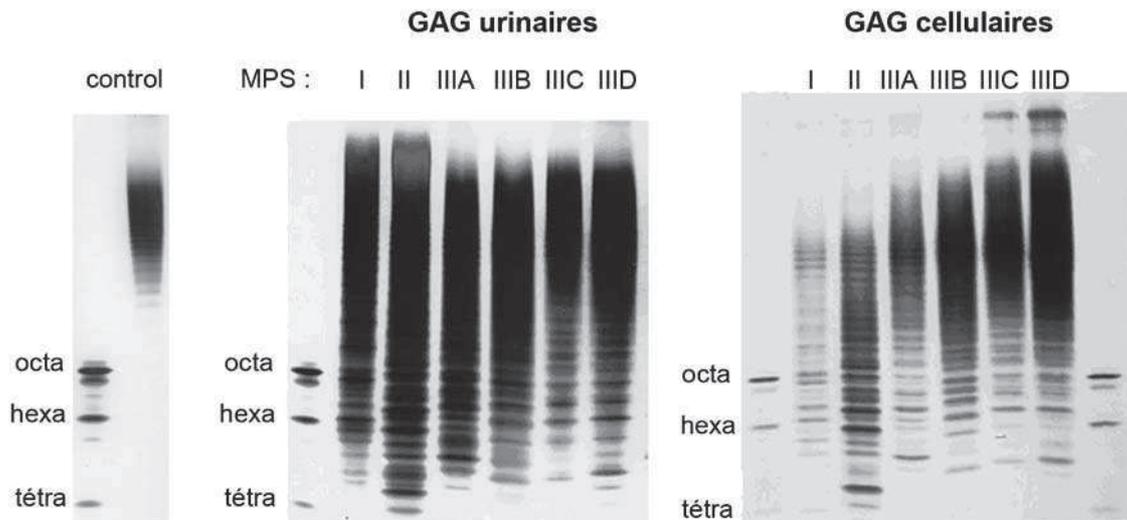


Figure 48 : GAG urinaires et cellulaires des MPS analysés par électrophorèse sur polyacrylamide.
D'après (Byers et al, 1998).

Le déficit enzymatique des MPS pourrait entraîner une accumulation d'HS plus long que les tétrasaccharides trouvés dans les urines. Le néphron pourrait filtrer préférentiellement les petites tailles de saccharides qui se retrouvent dans les urines primitives. Les analyses cellulaires faites sur des cultures de fibroblastes confirment les résultats obtenus pour les GAG urinaires : la taille des GAG varie de tétrasaccharides à de très longues chaines (Byers et al, 1998). Cette analyse électrophorétique suggère, par ailleurs, des niveaux de sulfatations très variés pour une taille de saccharide donnée (Figure 48).

La sulfatation

Les niveaux de sulfatation des HS accumulés sont hétérogènes mais globalement élevés (Figure 48). Des analyses par résonance magnétique nucléaire semblent indiquer une corrélation possible entre le taux de sulfatation des HS et la sévérité des symptômes. Alors que les patients atteints de symptômes neurologiques excrètent des HS très sulfatés, les patients avec des atteintes périphériques, telles que les MPSI ou MPSII, sécrètent différents types d'HS à bas niveau de sulfatation (Hochuli et al, 2003). Un autre lien a été proposé entre la nature du groupement chimique à l'extrémité non réductrice des oligosaccharides et la présence ou l'absence de symptômes comportementaux dans les MPS (Wegrzyn et al, 2010). La présence de groupements acétyl ou sulfate pourrait conduire à des troubles comportementaux dans les MPSIII ou MPSII (Wegrzyn et al, 2010).

Il convient de noter que l'analyse des GAGs urinaires peut ne pas être représentative de la composition des GAG qui s'accumulent dans le système nerveux central, comme dans le cas des MPSIIIB. Plus récemment, l'utilisation de l'HPLC a permis de mettre en évidence une

hausse des quantités de saccharides d'HS plurisulfatés dans le cerveau des souris modèles des MPSI, MPSIIIA et MPSIIIB, par rapport aux souris contrôles (Wilkinson et al, 2012). Typiquement, les niveaux de disaccharides trisulfatés [HexA (2S)-GlcNS(6S)] sont largement plus élevés dans les cerveaux des souris MPS (Figure 49).

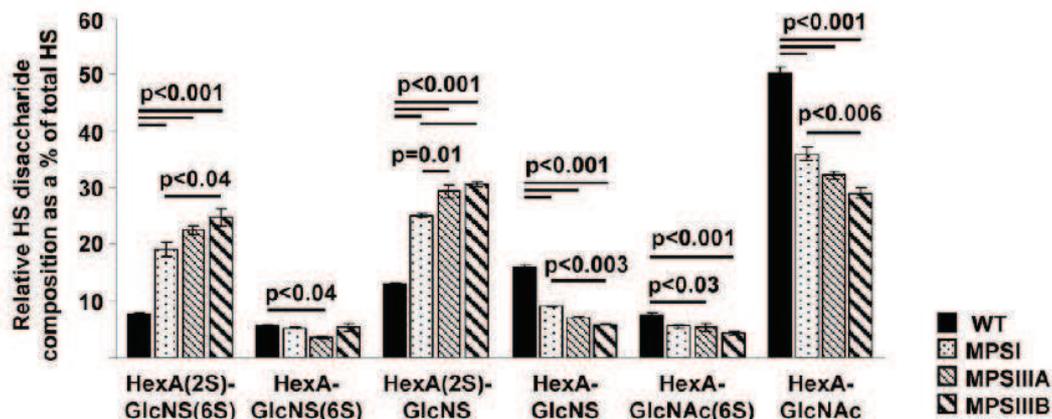


Figure 49 : Sulfatation des HS dans le cerveau des souris modèles des MPS.

D'après (Wilkinson et al, 2012). HexA, acide glucuronique ou iduronique ; GlcNS, Glucosamine N-sulfatée ; GlcNAc, Glucosamine N-acétylée ; 2S, 2-O-sulfatation ; 6S, 6-O-Sulfatation.

2.1.3 Diagnostic des mucopolysaccharidoses

Pour qu'un traitement des MPS soit efficace, il est nécessaire qu'il soit administré le plus rapidement possible. L'enjeu est donc d'identifier précocement les sujets asymptomatiques. Un diagnostic précoce, suivi de soins appropriés, joue sur la qualité de vie des patients et peut parfois ralentir ou prévenir le développement de dommages irréversibles (Harmatz, 2010; Muenzer, 2011; Tylki-Szymanska et al, 2011).

Le diagnostic prénatal peut être fait si la famille présente des antécédents. Il peut être fait sur du liquide amniotique ou des échantillons de villosités chorioniques. Si aucun antécédent familial n'est connu, l'âge moyen du diagnostic est de 4 ans et demi. L'observation clinique des premiers symptômes, puis un examen radiologique, permettent souvent de suspecter une MPS. Les MPSIII se distinguent par l'apparition de troubles cognitifs et du comportement avant les troubles articulaires et osseux (Lehman et al, 2011). En cas de suspicion clinique, le diagnostic des MPS est établi par dosage enzymatique principalement, ou par des analyses semi-quantitatives et qualitatives de GAG urinaires (Figure 50).

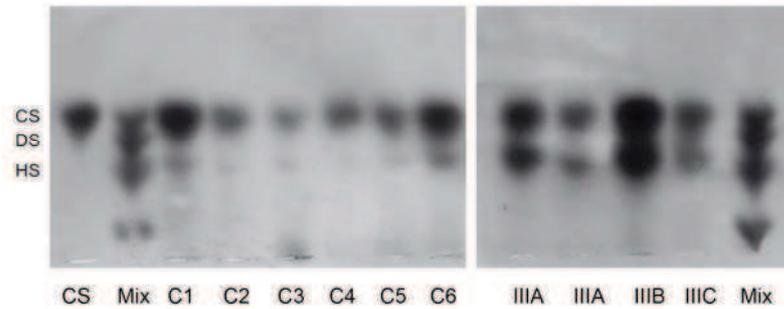


Figure 50 : Analyse par électrophorèse d'agarose des GAG purifiés d'urines de patients MPSIII.
D'après (Coppa et al, 2011a). Mix, mixte de CS, DS et HS ; C1 à C6, GAG d'urines de sujets contrôles ; IIIA, GAG d'urines de patients MPSIIIA ; IIIB, GAG d'urines de patients MPSIIIB ; IIIC, GAG d'urines de patients MPSIIIC.

Chez un sujet sain, l'excrétion de GAG urinaires varie avec l'âge. La concentration de GAG est forte la première année de la vie, puis décroît au cours du temps. Environ 90% de ces GAG sont des chondroïtines sulfates, les 10% restant sont des HS (Figure 50). Un patient MPS présente de forte concentration de GAG urinaires, comparé à un sujet sain du même âge. Toutefois, tous les patients ne présentent pas une élévation claire des excrétions urinaires de GAG. Un diagnostic précis nécessite un profil complet d'analyses quantitatives et qualitatives, faites en tandem (Mahalingam et al, 2004; Piraud et al, 1993). Les différents types de MPS diffèrent non seulement par les quantités de GAG excrétés, mais également par les proportions relatives des différents types de GAG. Par exemple, les MPSIII se caractérisent par un excès d'HS, qui équilibre les quantités d'HS et de CS urinaires (Figure 50). La présence de GAG spécifiques suggère la maladie, qui sera confirmée par des analyses métaboliques et/ou génétiques appropriées.

La confirmation métabolique se fait par quantification de l'activité enzymatique généralement mesurée sur des leucocytes ou des cultures de fibroblastes de peau. Des tests enzymatiques spécifiques utilisent des substrats fluorogéniques, chromogéniques ou radioactifs. La confirmation génétique s'effectue par recherche de mutations. L'analyse ADN n'est cependant pas une méthode de choix, à cause de la grande hétérogénéité des mutations génétiques qui caractérise tous les types de MPS. Les biomarqueurs mis en évidence récemment, notamment par des techniques de spectrométrie de masse, pourraient permettre de diagnostiquer plus rapidement les MPS sans test enzymatique (Beesley et al, 2009; Langford-Smith et al, 2010; Lawrence et al, 2012; Randall et al, 2008). La limite à leur utilisation systématique reste le coût de ces techniques. Le screening présymptomatique dans la

population générale n'est pas encore systématique car pour l'instant aucun traitement n'est disponible pour la plupart des MPS.

2.1.4 Les signes cliniques des mucopolysaccharidoses de type III

Les 4 sous-types génétiquement distincts des MPSIII ne se distinguent pas cliniquement les uns des autres. Les manifestations neurologiques, qui prédominent, semblent être liées aux HS qui s'accumulent.

2.1.4.1 Manifestations précoces

Les premiers signes cliniques surviennent généralement entre 1 an et 4 ans. Ils se caractérisent par des **retards du développement du langage** (Ozand et al, 1994). Les troubles de la parole incluent des défauts d'articulation, associés à un vocabulaire pauvre, et certains enfants n'apprennent jamais à parler. Vers 3 - 4 ans, des **comportements anormaux** commencent à apparaître. Ils se manifestent par des défauts d'attention, une hyperactivité, une irritabilité et une agressivité (Valstar et al, 2011). Ces comportements s'accompagnent d'**anxiété** accrue et de **troubles du sommeil** (Fraser et al, 2005). Au moment du diagnostic, qui est fait en moyenne entre 3 ans et 6 ans, les signes cliniques observés sont les retards du langage et les comportements anormaux, mais également parfois des **épilepsies** et dans 19% à 42% des cas, des **symptômes autistiques** (Heron et al, 2011). Cependant, les patients acquièrent la marche à un âge normal (Heron et al, 2011).

2.1.4.2 Evolution de la maladie

Au cours du temps, les compétences acquises se détériorent et les enfants ont de moins en **moins d'autonomie**. La marche et les interactions sociales sont perdues autour de l'âge de 10 ans. Les détériorations neurologiques progressent jusqu'à un **profond retard mental**. Ces observations cliniques suggèrent des atteintes du cortex frontal. Une forte macrocéphalie apparaît au début, puis disparaît. Les analyses IRM montrent une anomalie de la substance blanche et une atrophie corticale (Zafeiriou et al, 2001). Les atteintes somatiques sont, au contraire, plus modérées et se développent plus tardivement. La dysmorphie faciale est modérée. L'atteinte squelettique est discrète et relativement tardive. Une **hépatosplénomégalie** modérée est souvent présente chez les jeunes enfants, mais disparaît ensuite le plus souvent. Une **surdité** profonde, de cause périphérique et centrale, est classique, même dans les formes modérées, et les enfants sont sujets aux otites. A partir de 10 ans, les enfants développent des **troubles orthopédiques** et des **convulsions**. Les **surinfections respiratoires** sont fréquentes (Neufeld & Muenzer, 2001).

2.1.4.3 Manifestations tardives

Au stade final, les enfants rencontrent des **difficultés pour s'alimenter** à cause d'un affaiblissement des mécanismes de mastication et de déglutition. La mobilité est sévèrement atteinte par des **paralysies spasmodiques** et une **rigidité articulaire**. Les malades grabataires perdent tout contact avec leur entourage et développent une **démence profonde**. L'âge médian du décès est entre 15 ans et 20 ans. Il survient la plupart du temps suite à des complications respiratoires, mais des cas avec survie prolongée ont été rapportés (Moog et al, 2007). Même s'il n'existe pas une grande variabilité entre les types de MPSIII, les patients atteints du type C vivent en moyenne plus longtemps (Heron et al, 2011). L'âge du diagnostic est un indicateur de la sévérité de la maladie. Par rapport à un diagnostic tardif, un diagnostic fait avant 5 ans est associé à une perte d'interaction sociale plus précoce et une mort prématurée (Heron et al, 2011). Il n'existe malheureusement aucun traitement efficace pour ces 4 maladies neurologiques.

2.1.5 Les espoirs thérapeutiques des mucopolysaccharidoses de type III

Aucune thérapie n'est pour l'instant disponible pour traiter la maladie de Sanfilippo. Les seules possibilités thérapeutiques actuelles pour les MPSIII sont des traitements symptomatiques. Ils agissent sur les troubles du comportement et du sommeil, les atteintes articulaires, les épilepsies et la douleur. Un traitement étiologique peut se faire à trois niveaux : au niveau métabolique par réduction du substrat de l'enzyme déficiente, au niveau enzymatique par restauration de l'activité de l'enzyme déficiente ou au niveau génétique par apport du gène déficient. La cible de ces traitements est le système nerveux central principalement touché dans les MPSIII.

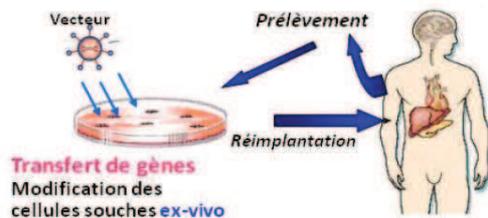
L'approche la plus directe est le transfert du gène déficient. La thérapie génique est aujourd'hui un espoir pour les MPSIII. Cette stratégie repose sur la capacité de transduction des vecteurs viraux pour permettre l'apport et l'expression d'une copie fonctionnelle du gène d'intérêt aux cellules déficientes. L'intérêt d'utiliser une telle approche pour le traitement des MPS est double. Les MPS sont des maladies monogéniques et 10% de l'activité enzymatique suffit à restaurer la fonction de l'enzyme. De plus, l'enzyme recombinante nécessaire à un traitement par restauration de l'activité de l'enzyme déficiente n'est pas disponible et la transplantation de cellules souches hématopoïétiques, utilisées pour d'autres maladies lysosomales, n'est à ce jour pas considérée comme un traitement pour des maladies neurologiques.

Vecteurs viraux

Différents types de vecteurs viraux ont été développés avec chacun des avantages et des inconvénients particuliers. Leurs différentes propriétés des vecteurs viraux déterminent leur utilisation thérapeutique. Ces propriétés peuvent être la spécificité du vecteur pour un type cellulaire donné, la taille de la séquence pouvant être transférée, la stabilité du transfert de gène en fonction de l'intégration du vecteur dans le génome de la cellule hôte, ou encore la toxicité spécifique du type de vecteur (Figure 51). A ce jour, il existe principalement trois types de vecteurs viraux utilisés pour leur capacité de transduction : les rétrovirus, les adénovirus et les AAV (pour *adeno-associated virus*).

Famille de vecteur viral	Rétrovirus	Adénovirus	AAV
Type de virus	ARN	ADN	ADN
Tropisme pour les cellules non prolifératives	non	oui	oui
Intégration dans le génome	oui	non	rare
Persistance du transgène	oui	non	oui
Limites	Insertion aléatoire risque de mutagenèse insertionnelle (Hacein-Bey-Abina 2008)	Réponse inflammatoire systémique (Raper 2003)	Réponse immunitaire possible
Caractéristique	utilisation préférentielle <i>ex vivo</i>		utilisation préférentielle <i>in vivo</i>

Thérapie génique *ex vivo*



Thérapie génique *In vivo*

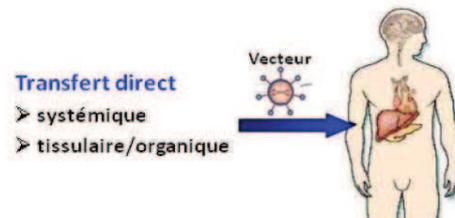


Figure 51 : Utilisation des vecteurs viraux pour la thérapie génique.

Les adénovirus ont tout d’abord été sélectionnés pour leur propriété non intégrative, mais ont ensuite été considérés trop dangereux. En effet, une réponse inflammatoire systémique a entraîné un décès au cours d’un essai thérapeutique utilisant un adénovirus (Raper et al, 2003).

Les rétrovirus sont aujourd’hui utilisés pour la thérapie génique *ex vivo*. Cette thérapie a l’avantage de pouvoir exprimer un plus fort taux d’enzyme, d’éviter les rejets et les réactions de rejet du greffon vers l’hôte. Elle consiste à prélever des cellules souches du patient. Ces cellules cultivées *in vitro* sont ensuite transduites par un vecteur rétroviral particulièrement efficace sur des cellules en prolifération. Les vecteurs rétroviraux ont la capacité d’intégrer le génome et fournissent ainsi une expression prolongée du gène. Les cellules expriment et excrètent ainsi l’enzyme d’intérêt. Les cellules modifiées sont ensuite réinjectées au patient (Figure 51). Cet outil a été envisagé pour des patients atteints de MPSI et MPSIIIB afin d’améliorer le niveau d’expression de l’enzyme (Baxter et al, 2002; Visigalli et al, 2010; Zheng et al, 2003). La principale limite de l’utilisation du vecteur rétroviral repose sur sa propriété intégrative, et donc la possibilité de mutation oncogénique. L’exemple le plus connu est celui des patients SCID (pour *severe combined immune deficiency*) qui ont développé une leucémie suite à une thérapie génique rétrovirale (Hacein-Bey-Abina et al, 2008).

L’utilisation d’AAV semble donc être un vecteur plus sûr pour la thérapie génique. En effet, le génome de l’AAV est très peu intégratif, et, lorsqu’il y a intégration, des délétions du site d’intégrations ont été trouvées (Nakai et al, 2003). De plus, dans une étude à long terme de la

génétoxicité des AAV chez la souris, aucune mutation insertionnelle ou formation de tumeur n'ont été détectées (Li et al, 2011). L'intérêt majeur d'utiliser des AAV pour traiter les MPSIII est le tropisme de ce vecteur. Les AAV transduisent principalement des cellules peu ou pas répliquatives, comme les cellules du système nerveux central. De plus, la persistance du transgène grâce à des épisomes stables permet un seul traitement. Un traitement unique rend possible une injection intracérébrale. Plusieurs essais cliniques utilisent l'injection d'AAV directement dans le cerveau pour traiter des maladies neurodégénératives, telles que la maladie de Parkinson. Ces essais ont montré la sûreté de cette approche chez l'humain (Gray, 2012; LeWitt et al, 2011; Marks et al, 2010). La technique consiste à administrer les vecteurs AAV par des injections stéréotaxiques au niveau de multiples sites, permettant la diffusion du vecteur dans l'ensemble de l'encéphale. Le nombre d'injection, le volume injecté et la concentration du vecteur doivent pour cela être rigoureusement déterminés. La limite majeure de l'utilisation des AAV est la réponse immunitaire possible. Mais cette limitation peut être contournée par un traitement immunosuppresseur (Mingozzi et al, 2007).

Utilisation des AAV pour la thérapie génique des MPSIIIB

La preuve de concept de la thérapie génique avec l'utilisation d'AAV pour traiter la MPSIIIB a été établie en préclinique chez le petit et le gros animal (Cressant et al, 2004; Ellinwood et al, 2011; Fu et al, 2011; Fu et al, 2002; Heldermon et al, 2010). Chez la souris, deux types de vecteurs AAV-NAGLU ont été injectés : l'AAV sérotype2, le plus largement utilisé, et l'AAV de sérotype5 qui est connu pour son efficacité de diffusion dans le cerveau et de transduction mixte, neuronale et gliale (Gray, 2012). Les vecteurs ont été administrés par une injection stéréotaxique unique dans le striatum des souris MPSIIIB de 6 semaines. Pour les deux vecteurs, la NAGLU est distribuée dans l'ensemble du cerveau. L'activité enzymatique restaurée permet de diminuer les lésions de stockage et réduit la neuroinflammation. Le traitement fait diminuer les comportements agressifs et hyperactifs des souris (Cressant et al, 2004). Ces résultats ont été confirmés chez le chien grâce à 8 injections intracrâniennes d'AAV2.5-hNAGLU (Ellinwood et al, 2011). L'immunosuppression empêche les cellules transduites par le vecteur, et qui donc expriment l'enzyme, d'être détruites par le système immunitaire. Ces données ont permis de mettre en place un essai thérapeutique de phase I/II pour les patients atteints de MPSIIIB.

Malheureusement, aucune donnée sur la morphologie cérébrale en préclinique n'est disponible. Or, on sait que l'atrophie cérébrale se développe progressivement chez les enfants

MPSIII. Bien que nos connaissances sur la plasticité du système nerveux central soient encore réduites, il semble probable, sur la base de données issues de la thérapie par restauration de l'activité de l'enzyme déficiente, qu'à un certain niveau la progression de la maladie soit irréversible (Brooks et al, 2002). Ces maladies nécessitent donc une intervention thérapeutique précoce, avant que des changements irréversibles dans le SNC n'aient lieu. Pour cela, en parallèle des essais thérapeutiques, la poursuite des efforts doit être accordée à l'exploration des cascades d'événements physiopathologiques au niveau cellulaire dans ces maladies neurologiques. Une meilleure connaissance des mécanismes peut avoir une incidence sur la prise en charge thérapeutique, sur la découverte de nouveaux marqueurs de la maladie et permettre ainsi une évaluation de l'efficacité du traitement. En outre, la description des mécanismes pathologiques aidera à définir les meilleures conditions pour le traitement et peut donner lieu à de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'intérêt de comprendre la physiopathologie réside également dans l'identification de biomarqueurs, lesquels sont nécessaires pour un diagnostic précoce, pour anticiper la gravité à venir de l'évolution de la maladie (pronostic) et pour suivre les effets d'un traitement.

2.2 La physiopathologie des mucopolysaccharidoses de type III

Les mécanismes cellulaires conduisant à la pathologie des MPSIII ne sont pas connus à ce jour. Les recherches menées ces vingt dernières années ont permis de décrypter l'étiologie des MPSIII. Mais le lien entre la cause primaire de la maladie et les conséquences sémiologiques n'a jamais été établi.

L'importance de connaître ces mécanismes a amené les chercheurs à développer plusieurs outils biologiques pour l'étude physiopathologique, notamment des modèles animaux et cellulaires de la maladie que nous présentons dans un premier paragraphe. Dans un second paragraphe, nous décrivons la neuropathologie observée dans la maladie de Sanfilippo. Enfin, dans un troisième paragraphe, nous développons et discutons les différentes hypothèses proposés pour expliquer la physiopathologie de la maladie de Sanfilippo.

2.2.1 Modèles d'études de la physiopathologie

Modèles animaux

La **souris** modèle de la MPSIIIB a été créée en 1999 par KO (pour *knock-out*) du gène codant la NAGLU. Ce KO a été produit par interruption de l'exon 6 du gène chez la souris C57Bl6 (Li et al, 1999). Cette mutation conduit à l'absence totale d'activité NAGLU et à une accumulation d'HS. La souris présente des troubles caractéristiques de la maladie humaine : une diminution de la réponse au stress, des défauts du comportement tels que de l'agressivité et de l'hyperactivité (Cressant et al, 2004; Langford-Smith et al, 2011b), ainsi que des troubles du cycle circadien (Canal et al, 2010). Les souris meurent prématurément, à environ 12 mois. Un modèle murin spontané de la MPSIIIA a été décrit, avec une activité enzymatique résiduelle de 3%, et des caractéristiques d'hyperactivité et d'agressivité (Bhaumik et al, 1999; Gliddon & Hopwood, 2004; Hemsley & Hopwood, 2005; Langford-Smith et al, 2011a; Lau et al, 2008).

Il existe plusieurs modèles naturels chez le gros animal de la maladie de Sanfilippo. Tout d'abord, une délétion de l'exon 6 du gène codant pour la NAGLU a été décrite chez l'émeu (Haskins et al, 2002) et une mutation ponctuelle chez le bovin (Karageorgos et al, 2007). Il existe également un modèle caprin de la MPSIID (Thompson et al, 1992) et deux modèles canins de la MPSIIIA (Fischer et al, 1998; Yogalingam et al, 2002). Mais ces modèles n'ont été que très peu étudiés. En revanche, un modèle canin de la MPSIIIB a permis les études précliniques pour les essais de thérapie génique. Ce **chien**, de race Schipperke, présente une activité enzymatique réduite à environ 5% de l'activité normale de la NAGLU. (Ellinwood et al, 2003). En conséquence, des HS s'accumulent dans le foie, la rate, les reins, et surtout le SNC de ces chiens déficients en NAGLU. Des lésions de surcharge sont observées dans les cellules cérébrales et peuvent aller jusqu'à la perte des cellules de Purkinje dans le cervelet.

Modèles cellulaires humains

Les limites de l'usage des modèles animaux pour décrire et étudier la pathologie humaine sont multiples et il semble évident, façon intuitive, qu'aucune espèce ne ressemble suffisamment aux autres pour servir de modèle parfait. Le retour à une forme d'expérimentation sur l'homme pour tenir compte des spécificités de ce dernier est nécessaire. Dans l'optique d'étudier des comportements cellulaires spécifiquement humains, des modèles cellulaires humains de la maladie ont été développés.

Tout d'abord, l'accès à des lignées cellulaires humaines, telles que les cellules HeLa, permet d'établir des modèles « immortalisés ». Un modèle de **lignée cellulaire humaine immortalisée** a été créé au laboratoire avec un shRNA spécifiquement dirigé contre l'expression de NAGLU, de manière inductible (Roy et al, 2012). Ce système inductible permet une réduction drastique des quantités d'ARNm, de protéines et de l'activité enzymatique de la NAGLU. La conséquence est une augmentation des quantités de GAG seulement trois jours après l'induction. Cette méthode permet l'étude des effets directs de l'absence de l'enzyme sur les mécanismes cellulaires et évite les mécanismes compensatoires de défense, activés au cours du temps par les cellules affectées. La limite de cet outil pour l'étude des maladies neurologiques, telles que la MPSIIIB, réside dans le fait que son comportement n'est pas celui d'une cellule neurale ou d'un neurone.

Les cellules souches pluripotentes induites, ou **iPS** (pour *induced pluripotent stem cells*), créées à partir de fibroblastes de patients, peuvent être différenciées en précurseurs neuraux et même en neurones (Brennan et al, 2011). Des iPS de patients MPSIIIB ont été générées par reprogrammation de fibroblastes de peau. Cette reprogrammation est possible grâce à un transfert de gène utilisant des vecteurs rétroviraux codant pour quatre facteurs de transcription, Sox2, Klf4, Oct4 et c-Myc. Ces iPS ont été ensuite caractérisées pour leur pluripotence *in vitro* et *in vivo*, pour l'extinction des transgènes exogènes et pour les changements épigénétiques, tels que la méthylation du promoteur d'Oct4. Une fois caractérisées et validées, les lignées d'iPS ont été différenciées en **précurseurs neuraux humains**, sous forme de neurosphères, grâce à un milieu sélectif riche en bFGF et EGF. L'adhérence et d'autres conditions de culture permettent leur différenciation complète en **neurones humains** (Lemonnier et al, 2011). Les cellules ainsi obtenues expriment des marqueurs spécifiquement neuronaux : la protéine MAP2 (pour *microtubule associated protein 2*), la sous-unité $\beta 3$ de la tubuline, les protéines vésiculaires VGAT (pour *vesicular GABA transporter*), VGLUT (pour *vesicular Glutamate transporter*) et la synaptophysine (Figure 52).

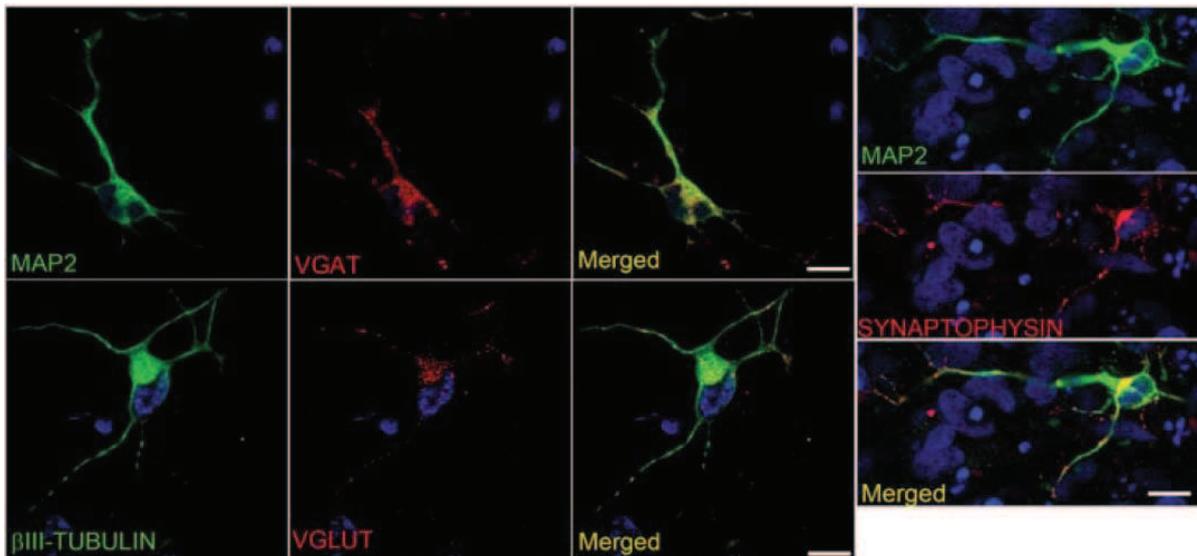


Figure 52 : Caractérisation des neurones humains dérivés d'iPS.
D'après (Lemonnier et al, 2011).

Les neurones dérivés d'iPS de patients MPSIIIB présentent des caractéristiques spécifiques de la maladie, telles que la surcharge en GAG et en LAMP1 (pour *Lysosomal-associated membrane protein 1*). Les iPS spécifiques des patients offrent ainsi une opportunité unique d'étudier la neuropathologie humaine de la MPSIIIB.

2.2.2 Pathologie du SNC

Anatomopathologie

Les symptômes observés chez les patients MPSIII suggèrent des atteintes frontales. Les autopsies pratiquées sur des patients MPSIIIB révèlent, en effet, une légère perte neuronale au niveau du cortex préfrontal et du cortex temporal (Hamano et al, 2008). Ces observations s'accompagnent de gonflements des neurones corticaux et des neurites cérébelleux, et d'une gliose. Des analyses morphométriques du cerveau, utilisant l'imagerie par résonance magnétique (IRM), d'enfants atteints de MPSIIIB montrent une atrophie diffuse et progressive du cortex (Figure 53).

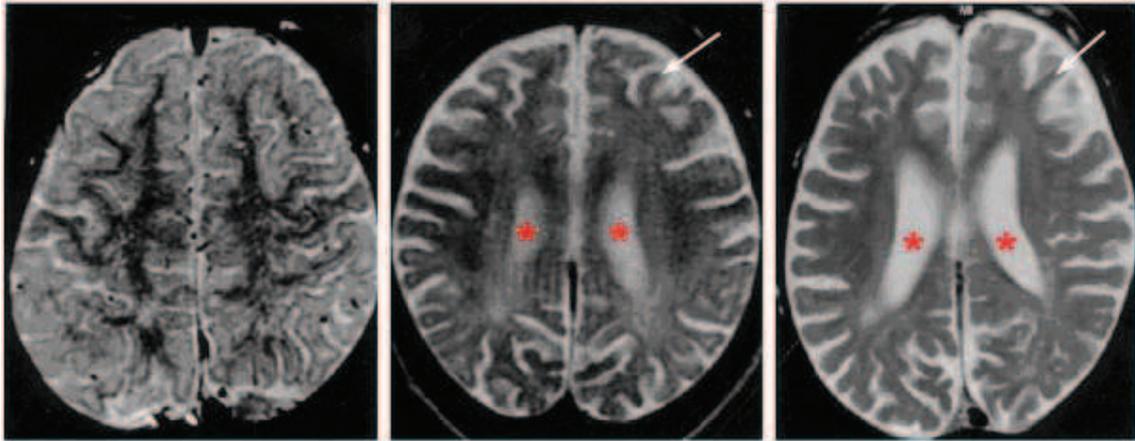


Figure 53 : IRM cérébrale d'un patient MPSIIIB.

D'après (Zafeiriou et al, 2001). IRM d'un patient à l'âge de 4 ans (gauche), 5 ans et demi (milieu) et 7 ans (droite). L'IRM montre une atrophie corticale progressive (\Rightarrow) et un élargissement progressif des ventricules (*).

Cette atrophie est parfois associée à une atrophie du corps calleux. Souvent, des défauts de morphologie de la substance blanche et un élargissement des ventricules sont visibles (Barone et al, 1999; Zafeiriou et al, 2001).

Cependant, il semble que les changements morphologiques, observés par IRM, ne soient pas liés à la sévérité du phénotype clinique. Sur cette base, l'aggravation des symptômes neurologiques pourraient ne pas refléter nécessairement les anomalies cérébrales progressives détectées par IRM (Barone et al, 1999). Cette hypothèse est corrélée avec les observations faites chez la souris. En effet, dans le cerveau de la souris MPSIIIB, aucune atrophie corticale et aucune perte neuronale ne sont observées, même chez les souris âgées (Li et al, 2002; Vitry et al, 2009; Wilkinson et al, 2012). Il semblerait donc que la perte de plasticité cellulaire, plus que la perte neuronale, soit à l'origine des dysfonctionnements du système nerveux central des MPSIIIB. En effet, les astrocytes, largement présents dans le système nerveux des souris MPSIIIB, ne sont plus capables de migrer suite à une lésion du cortex chez une souris de seulement trois mois (Li et al, 2002). Une inflammation du tissu nerveux pourrait expliquer la gliose et le défaut de plasticité astrocytaire observé chez les souris MPSIIIB.

Neuroinflammation

L'inflammation des tissus cérébraux est une caractéristique bien connue des MPS. Elle s'observe par l'accumulation de cellules microgliales, la sécrétion de cytokines et implique l'activation des microglies cérébrales (DiRosario et al, 2009; Li et al, 2002; Ohmi et al, 2003; Villani et al, 2009; Villani et al, 2007). Comme la structure et la fonction de la barrière

hématoencéphalique sont affaiblies dans la MPSIIIB, la présence des microglies activées pourraient être la conséquence d'une infiltration excessive des cellules macrophagiques périphériques vers l'encéphale (Garbuzova-Davis et al, 2011). Mais une étude de la neuroinflammation du cerveau MPSIIIB a montré que l'activation des microglies était la conséquence de l'activation du récepteur TLR4 par les saccharides d'HS, présents dans l'espace extracellulaire cérébral (Ausseil et al, 2008). De plus, un croisement entre la souris MPSIIIB et une souris déficiente pour TLR4, ou son adaptateur cytoplasmique MyD88, permet de réduire drastiquement la neuroinflammation, mais ne prévient pas la neuropathologie des MPSIIIB. Ce résultat révèle un rôle secondaire de la neuroinflammation dans le processus pathologique de la MPSIIIB. Ce travail met également en lumière le rôle direct de saccharides d'HS dans l'activation de récepteurs membranaires et l'activation de la voie de signalisation TLR4-MyD88.

Voies de signalisation affectées dans le système nerveux

Par un mécanisme encore inconnu, l'accumulation primaire des saccharides d'HS perturbe des voies de signalisation au niveau du système nerveux. Tout d'abord, des défauts d'expression des transcrits du facteur de croissance FGF2, et de son récepteur FGFR1, ont été mis en évidence dans certaines zones du cerveau des souris MPSIIIB (Li et al, 2002). Ces défauts d'expression ont ensuite été corrélés avec une surexpression des gènes de synthèse des HS dans l'ensemble du cerveau MPSIIIB murin (Li et al, 2002; McCarty et al, 2011). Ces résultats suggèrent la mise en place d'un cercle vicieux, où l'absence de dégradation des HS entraîne une signalisation menant à la surexpression des gènes de synthèse des HS, probablement pour restaurer les signaux de type FGF2. Cette surexpression conduit à augmenter les quantités d'HS, qui ne peuvent pas être dégradés, et contribue ainsi à la progression et l'exacerbation de la pathologie.

Par ailleurs, une étude directe des voies de signalisation a permis de mettre en évidence l'activation chronique des MAPK dans le cerveau MPSIIIB (Cecere et al, 2011). De nombreuses protéines de signalisation sont affectées au niveau de leur régulation génétique, comme l'indique l'analyse du transcriptôme des précurseurs neuronaux dérivés d'iPS de patients MPSIIIB (Lemonnier et al, 2011). En effet, cette analyse souligne des modifications d'expression des molécules d'interaction entre la cellule et sa matrice (intégrines, FGF, FGFR, semaphorines, éphrine, récepteurs à l'éphrine, Slit) et des voies de signalisations qui en découlent (calpaïne, PKC, PDK1, phosphatidylinositol 3 kinase, tensine, des GAP et GEF

des RhoGTPases et des effecteurs de Cdc42, PAK1, MAPK, c-fos, c-jun, phospholipase A2). Différents constituants des voies Wnt et TGF β sont également modifiés. Enfin, la protéine GSK3 β , impliquée dans la voie de signalisation Akt mais également effecteur de Cdc42, est surexprimée dans le cortex entorhinal médian (Ohmi et al, 2011).

Défauts du cortex entorhinal médian

Plusieurs études montrent que le cortex entorhinal médian est spécifiquement plus chargé que le cortex entorhinal latéral et les autres structures cérébrales en SCMAS (pour *subunit c of mitochondrial ATP synthase*), en ubiquitine, en GAP43, en glypican-1 et en glypican-5, également en GSK3 β , en β -amyloïde, en forme phosphorylée de Tau et en lysozyme (Ohmi et al, 2009; Ohmi et al, 2011; Ryazantsev et al, 2007). Ces observations suggèrent un défaut particulier au niveau du cortex entorhinal, et donc, une altération de l'apprentissage et de la mémorisation.

Altération de la composition synaptique

Des études menées sur la souris MPSIIIB montrent une réduction drastique de la quantité de synaptophysine dans les couches I et II les plus superficielles du cortex cérébral (Vitry et al, 2009). La synaptophysine est une protéine majeure des vésicules synaptiques. Cette diminution des quantités de synaptophysine dans le cortex MPSIIIB n'est pas la conséquence d'une diminution des quantités de neurones ou de synapses, mais d'un défaut d'expression de la protéine. Les modifications des voies de signalisation dans le cerveau MPSIIIB peuvent être responsables de modification d'expression de la synaptophysine. Cette hypothèse a été invalidée, puisque la réduction de synaptophysine a été identifiée comme étant la conséquence d'une dégradation accrue par le protéasome (Vitry et al, 2009). Il existe également un défaut de localisation et une réduction significative des quantités de VAMP2, une autre protéine des vésicules synaptique dans l'ensemble du cerveau et notamment dans le noyau suprachiasmatique (Canal et al, 2010; Malinowska et al, 2010; Wilkinson et al, 2012). VAMP2 est impliqué dans la transmission synaptique et une perte d'activité VAMP2 conduit à une réduction des fonctions synaptique (Schoch et al, 2001). Une autre protéine essentielle pour la stabilité des synapses excitatrices, Homer-1, est sous-exprimée dans le cortex MPSIIIB (Wilkinson et al, 2012). Une réduction d'expression de cette protéine des densités postsynaptiques peut avoir des conséquences sur l'organisation et la signalisation responsable du maintien de la synapse.

Altération du réseau neuritique

Les neurones affectés par une maladie lysosomale présentent une caractéristique morphologique commune. En effet, les neurones accumulent des vacuoles dans leur cytoplasme. Cette accumulation entraîne le gonflement neuritique appelé méganeurite (Walkley, 1998). Ces méganeurites présentent une dendritogenèse ectopique dans les neurones pyramidaux excitateurs (Walkley, 2007). Enfin, une protéine essentielle au développement neuritique, GAP43, est surexprimée dans le cortex des souris MPSIIIB (Ausseil et al, 2008; Li et al, 2002). Toutes ces observations laissent suggérer que le réseau neuritique des cerveaux MPS n'est pas correctement mis en place. Des défauts de développement neuritique pourraient donc être à l'origine de neurodégénérescence.

2.2.3 Caractéristiques cellulaires

Les cellules MPSIII présentent des caractéristiques de cellules engorgées par du matériel de stockage : une accumulation primaire de saccharides d'HS, une accumulation secondaire de gangliosides GM2 et GM3, une accumulation secondaire de protéines lysosomales et une accumulation de grosses vésicules distendues. Cette caractéristique commune des maladies lysosomales a permis d'établir l'hypothèse généralement admise selon laquelle les cellules MPSIII accumulent dans leur lysosomes des produits de stockage responsables d'un dysfonctionnement des voies endolysosomales et autolysosomales, et d'une distensions des lysosomes en vésicules de stockage. Ces dysfonctionnements seraient la cause des défauts de plasticité du système nerveux et de la neurodégénérescence rendant compte de la maladie.

Accumulation primaire des saccharides d'HS

Nous avons vu précédemment que les saccharides d'HS accumulés étaient de nature variée (*cf. paragraphe 2.1.2 Nature des saccharides d'HS accumulés*). La localisation des saccharides d'HS accumulés dans les tissus MPS est rendue difficile par le manque de moyen pour détecter spécifiquement les petites chaînes d'HS. En effet, les techniques de marquages, immunologiques ou par des colorants, ne discriminent pas les saccharides d'HS accumulés du reste des protéoglycanes d'HS. Cependant, ces techniques permettent de suggérer les localisations tissulaires, cellulaires et subcellulaires des GAG.

Les tissus affectés sont principalement le foie, les reins et le système nerveux des souris MPSIII. Dans le système nerveux des souris MPSIIIB, les excès d'HS se retrouvent dans le bulbe olfactif, le cervelet, le tronc cérébral, mais également au niveau thalamique et cortical (Li et al, 1999). La cause de cette régionalisation n'est pour l'instant pas connue. L'importance des activités enzymatiques et du renouvellement des protéoglycanes dans certaines régions du cerveau pourrait expliquer cette répartition des HS dans les MPSIII.

Au niveau cellulaire, les HS semblent s'accumuler plus dans les neurones (Hamano et al, 2008). Les neurones accumulent beaucoup d'HS pour deux raisons possibles. Soit les cellules amitotiques ne peuvent répartir leur surcharge cytoplasmique au cours des divisions cellulaires, soit les neurones n'évacuent pas ou peu l'excès de saccharides dans l'environnement par exocytose lysosomale, phénomène observable pour d'autres types cellulaires (Rodriguez et al, 1997).

A l'échelle subcellulaire, les HS se retrouvent dans les lysosomes et au niveau des membranes plasmiques des neurones de souris MPSIIIA et au niveau de la matrice extracellulaire des fibroblastes de patients MPSIIIB (Figure 54).

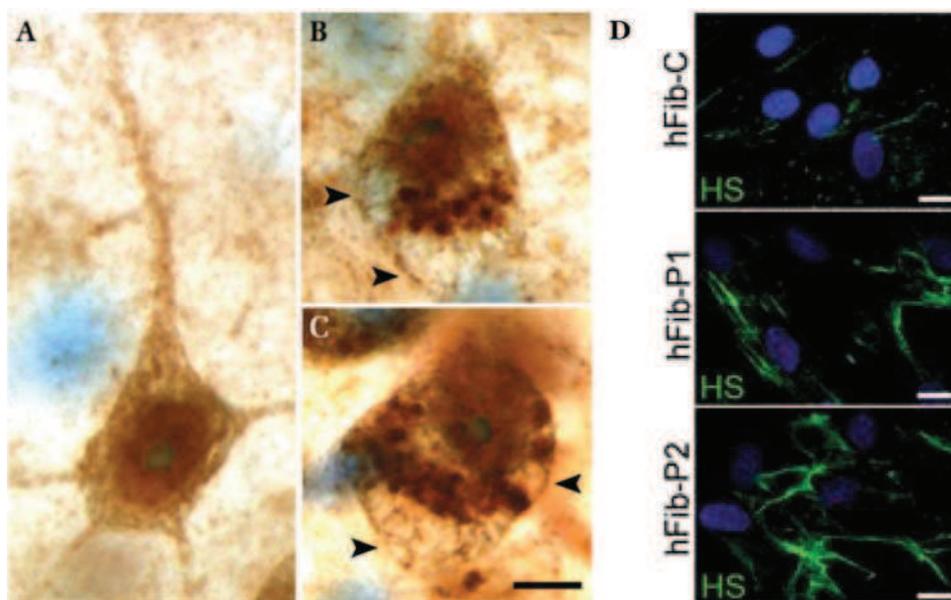


Figure 54 : Localisation des HS dans les cellules MPSIII.

D'après (Lemonnier et al, 2011; McGlynn et al, 2004). A, neurone de souris sauvage ; B et C, neurone de souris MPSIIIA ; les flèches indiquent les HS à la membrane plasmique ; D fibroblastes humains d'un sujet sain (hFib-C) et de deux patients MPSIIIB (P1 et P2).

La présence lysosomale des HS n'est pas étonnante mais l'accumulation des HS à la membrane est plus surprenante. Deux explications, non exclusives, peuvent rendre compte de la présence des HS à la membrane des neurones : (1) les protéoglycanes sont surexprimés à la membrane (2) les saccharides d'HS non dégradés se retrouvent à la surface des neurones, dans l'espace intercellulaire. En effet, le contenu des lysosomes peuvent être excrétés par exocytose lysosomale (Rodriguez et al, 1997). Les cellules MPS peuvent excréter le contenu des lysosomes, puisque les enzymes lysosomales se retrouvent dans le milieu extracellulaire de fibroblastes de patient en culture (Fratantoni et al, 1968). Dans le système nerveux, les astrocytes sont capables d'exocytose lysosomale et pourraient donc être responsables de la présence des saccharides d'HS extracellulaires. Dans le SNC, l'espace extracellulaire étant très restreint, les composants excrétés restent proches de toutes les membranes plasmiques.

Par ailleurs, l'augmentation des quantités des saccharides d'HS génère, par des mécanismes encore inconnus, d'autres surcharges, dites secondaires, qui se caractérisent pas une accumulation de gangliosides, de protéines lysosomales, et de vacuoles.

Accumulation secondaire des gangliosides

L'accumulation secondaire de gangliosides GM2 et GM3 est un aspect commun associé avec la neuropathologie de nombreuses maladies lysosomales, telles que les maladies de Niemann-Pick ou les MPS (Walkley, 2009). Ces gangliosides se retrouvent dans le cerveau humain et murin, au niveau des neurones et de la glie.

Chez la souris MPSIII^B, les accumulations secondaires de gangliosides GM2 et GM3 apparaissent aux alentours du premier mois et le ganglioside GM3 est quantitativement plus affecté que le GM2. Des études immunohistochimiques montrent que ces gangliosides sont séquestrés au sein de vésicules (McGlynn et al, 2004).

Une des hypothèses proposées pour expliquer la physiopathologie des MPSIII était que l'accumulation primaire d'HS causait l'accumulation secondaire de gangliosides toxiques (McGlynn et al, 2004). Comme les gangliosides inclus dans la membrane plasmique sont dégradés par l'action séquentielle d'enzymes lysosomales, l'hypothèse d'un engorgement lysosomal par les gangliosides accumulés a été émise.

Cependant, les analyses en microscopie confocale des tissus nerveux et des neurones en culture ne montrent qu'une colocalisation partielle entre GM3 et les HS, ou entre GM3 et le marqueur lysosomal LAMP1 (McGlynn et al, 2004; Vitry et al, 2010). De plus, une étude

récente montre que les gangliosides GM2 et GM3, en excès dans la MPSIIIA, ne sont pas localisés dans des lysosomes, mais au niveau des radeaux lipidiques, à la membrane plasmique ou au niveau des endosomes (Dawson et al, 2012).

Par ailleurs, les accumulations de gangliosides restent globalement faibles dans les MPSIII, au regard des saccharides d'HS accumulés. Un croisement de souris MPSIIIB avec une souris déficiente en GM2 ne permet pas de restaurer le comportement et la survie des souris MPSIIIB (Mohammed et al, 2012). Au contraire, l'absence de GM2 dans la souris MPSIIIB accélère la pathologie. Ce résultat indique que l'accumulation secondaire des gangliosides GM2 et GM3 n'est pas responsable de la neuropathologie des MPSIIIB.

Accumulation secondaire des protéines lysosomales

L'élévation des activités lysosomales secondaires au déficit enzymatique primaire est une caractéristique commune à de nombreuses maladies lysosomales et notamment des MPSIII (Cressant et al, 2004; Neufeld & Muenzer, 2001). La première hypothèse émise, expliquant cette hyperactivité, a été la régulation positive des enzymes causée par l'hypertrophie lysosomale, puis par les GAG accumulées (Winchester, 2001). Des études menées sur les fibroblastes montrent que le niveau d'ARNm des enzymes lysosomales est élevé dans les MPS (Karageorgos et al, 1997). De plus, cette augmentation ne se limite pas aux enzymes lysosomales, mais touche également les autres protéines lysosomales, telles que les protéines de la membrane LAMP1 et LAMP2 (Karageorgos et al, 1997; Meikle et al, 1997; Ohmi et al, 2003). Ces résultats montrent un effet indirect des GAG accumulés sur le lysosome et cet effet passe par la régulation de la stabilité des ARNm ou de l'expression génique.

Accumulation secondaire de vacuoles ou vésicules distendues

Une autre caractéristique commune de toutes les maladies lysosomales est l'accumulation intracytoplasmique de vésicules distendues ou de vacuoles dites de stockage. Ces vacuoles présentent des caractéristiques de lysosomes. En effet, certaines vacuoles expriment à leur membrane les protéines lysosomales LAMP1 et LAMP2 (Ohmi et al, 2003; Vitry et al, 2010). L'idée commune selon laquelle ces vacuoles seraient des lysosomes distendus par la surcharge n'a jamais été prouvée. Au contraire, alors que les lysosomes sont généralement petits, très mobiles et contiennent un matériel homogène dense, ces vacuoles sont larges, polymorphiques, peu mobiles et leur contenu est hétérogène (Figure 55).



Figure 55 : Morphologie des vacuoles accumulées dans les maladies lysosomales.

D'après (Parkinson-Lawrence et al, 2010). Le contenu des vacuoles peut être clair et amorphe, granulaire, avec des débris internes, des fragments de membranes, des agrégats denses ou des structures multi-lamellaires formant occasionnellement des corps zébrés.

Il est intéressant de noter que les vacuoles sont une caractéristique commune à toutes les maladies de surcharge lysosomale, alors que ces pathologies n'affectent pas toutes les mêmes voies métaboliques.

L'hypothèse la plus communément admise pour expliquer la physiopathologie des MPS est que ces vésicules distendues sont des lysosomes engorgés de produits de stockage de type HS, GM2, GM3 ou protéines lysosomales. Selon cette hypothèse, ces lysosomes distendus par la surcharge ne peuvent plus assurer leurs fonctions endolysosomales et autophagiques (Ballabio, 2009; Lieberman et al, 2012). Les maladies lysosomales sont considérées, par certains, comme des maladies autophagiques (Lieberman et al, 2012).

Nous venons de voir ici que les vésicules distendues accumulées dans les cellules MPSIII B n'ont pas des caractéristiques des lysosomes, que les lysosomes n'accumulent pas les gangliosides GM2 et GM3, et que les HS accumulés sont présents dans les lysosomes et à l'extérieure des cellules.

De plus, nous avons montré que les vésicules distendues n'étaient pas des lysosomes malgré la présence du marqueur LAMP1 à leur surface (Vitry et al, 2010). En effet, ces vésicules ne sont pas connectées au trafic endolysosomal. Par ailleurs, les fonctions autophagiques et endolysosomales sont conservés dans les neurones MPSIII B (Vitry et al, 2010).

Les lysosomes et les vésicules distendues sont donc deux structures cytoplasmiques distinctes dans les cellules MPSIII B. Les lysosomes sont petits, mobiles, fonctionnels et contiennent des saccharides d'HS non dégradés et les produits de dégradation des hydrolases surexprimées. La composition des vésicules distendues dans le cytoplasme de neurones corticaux a été étudiée

récemment (Vitry et al, 2010). De façon étonnante, il semblerait que les vésicules distendues contiennent des membranes dérivées de l'appareil de Golgi.

Morphologie de l'appareil de Golgi

Les vacuoles accumulées ne sont pas les seules anomalies morphologiques du cytoplasme des cellules MPSIII. En effet, des études morphologiques de l'appareil de Golgi dans les neurones dérivés d'iPS de patients MPSIIIB ont montré une désorganisation des ribbons golgiens et de fréquentes extensions de l'appareil de Golgi dans les neurites (Lemonnier et al, 2011). De plus, les bords des ribbons golgiens, observés en microscopie électronique, sont souvent proches, et parfois connectés, avec des vacuoles (Lemonnier et al, 2011; Vitry et al, 2010). Ces observations suggèrent une origine golgienne des membranes des vacuoles accumulées dans les cellules MPSIIIB.

La cause des défauts neurologiques observés chez les patients MPSIIIB et la souris modèle n'est toujours pas connue. L'hypothèse selon laquelle les lysosomes distendus, par les accumulations des HS et de gangliosides, bloqueraient l'autophagie et la voie endolysosomale, n'a pas été validée. De plus, les travaux menés au laboratoire semblent indiquer une origine golgienne des membranes des vésicules distendues.

Dans l'espoir de pouvoir faire le lien entre l'étiologie et la symptomologie de la maladie de Sanfilippo B, l'étude physiopathologique menée ici a pour but :

(1) d'élucider l'origine et le mode de formation des vésicules distendues.

Les vésicules ne semblent pas provenir d'une distension des lysosomes. Comme suggéré par les études menées au laboratoire, nous avons étudié ici l'hypothèse que **les vésicules distendues puissent être d'origine golgienne**.

(2) de déterminer le rôle des saccharides d'HS accumulés sur la biologie cellulaire et la physiopathologie du système nerveux central.

Au vue des fonctions assurées par les protéoglycanes d'HS, dans la formation des plaques d'adhérence, l'organisation de la MEC, la modulation des signaux extracellulaires et des signalisations des intégrines et des facteurs de croissance, au vue de la localisation des HS

accumulés dans les cellules atteintes, et au vue des défauts cellulaires au niveau des voies de signalisation, de l'expression des gènes codant pour les protéines régulant les interactions cellule-MEC, nous étudions l'hypothèse selon laquelle **les défauts de communication de la cellule avec son environnement, causés par l'accumulation des héparanes sulfates partiellement dégradés, entraîneraient des comportements cellulaires inadaptés pour la mise en place et pour la plasticité des structures cérébrales dans la MPSIIIB.**

Résultats

Partie I. Les saccharides d'HS extracellulaires activent les composants des plaques d'adhérence et perturbent la polarisation et la migration des cellules neurales MPSIIIB

Ces travaux sont en cours de publication, soumis au journal « Journal of Cell Biology ».

Soluble heparan sulfate saccharide fragments activate focal adhesions and alter cell migration

Julie Bruyère¹, Elise Roy¹, Jérôme Ausseil², Thomas Lemonnier¹, Guillaume Teyre¹, Delphine Bohl¹, Sandrine Etienne-Manneville³, Hugues Lortat-Jacob⁴, Jean Michel Heard¹ and Sandrine Vitry¹

¹ Unité Rétrovirus et Transfert Génétique, INSERM U622, Department of Neuroscience, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

² Laboratoire de Biochimie, CHU Amiens, UFR de Médecine, INSERM U1088, Avenue Laënnec, 80054 Amiens, France.

³ Cell Polarity and Migration Group and CNRS URA 2582, Institut Pasteur, 25 Rue du Dr Roux, 75724, Paris Cedex 15, France.

⁴ CNRS- Commissariat à l'Energie Atomique-Université Joseph Fourier, Grenoble 1, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 38027, Grenoble Cedex 01, France.

Corresponding author: Jean Michel Heard
Unité Rétrovirus et Transfert Génétique, INSERM U622
Département de Neuroscience
Institut Pasteur 28 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France
Phone : 33-1-45688246 ; Fax : 33-1-45688940
e-mail: jmheard@pasteur.fr

Abstract

Accumulation of soluble heparan sulfate saccharides is a characteristic feature of mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo syndrome), a genetic disease due to deficient heparan sulfate exoglycanase. Cell disorders associated with the disease suggest deficient sensing of cell environment. We addressed this issue in neural stem cells, mouse astrocytes and human fibroblasts. Deficient astrocytes showed β 1-integrin over-expression and increased focal adhesion. In migration assays, astrocyte and neural stem cell polarization were defective. Normal phenotype was restored after clearance of saccharides. Conversely, exposition of normal astrocytes or normal human neural stem cells to high extracellular concentrations of heparan sulfate octasaccharides, or longer chains, activated integrin signaling and focal adhesions. Our observations indicate that soluble heparan sulfate saccharide fragments activate focal adhesion and participate in cell sensing of the environment with consequences on polarization and migration. Continuous release of soluble heparan sulfate saccharide fragments in the environment by deficient cells presumably contributes to cell disorders and neuropathology in mucopolysaccharidosis type III.

Key words

cell polarity; extracellular matrix; glycosaminoglycans, integrins, lysosomal storage diseases

Introduction

Sensing cell environment is crucial for development, function and plasticity of the central nervous system (CNS), and defects possibly result into neurodegeneration (Bonneh-Barkay & Wiley, 2009). Extracellular spaces in the CNS are filled with extracellular matrix (ECM) components that influence neuronal communication and regulate plastic changes important to protect neurons and synapses against damage. Brain ECM is unique in composition and organization. It contains relatively small amounts of fibrous proteins but high amounts of proteoglycans, essentially chondroitin sulfate and heparan sulfate (HS) (Maeda et al, 2011).

HS proteoglycans (HSPGs) are glycoproteins bearing long chains (40–300 sugar residues) of alternating hexuronic acid and glucosamine that are made complex by various O- and N-sulfate and N-acetyl substitutions, as well as by C5-epimerization of the hexuronic acid (Sarrazin et al, 2011). HSPGs exist as membrane-bound glycoproteins, like syndecans, Gpi-anchored glycoproteins, like glypicans, or extracellular soluble glycoprotein, like agrin. Shedding releases soluble HS saccharide fragments in the ECM. HSPGs play critical roles in the proliferation and differentiation of neural progenitor cells, in neuronal migration, in axon pathfinding, in synaptogenesis, in neural plasticity and in neural regeneration (Maeda et al, 2011). HSPG half-life ranges from 3 to 8 hours (Stringer & Gallagher, 1997). Soluble or membrane-bound HSPGs are internalized in endosomes, where they are cleaved by endoglycanases to generate polysaccharides of various lengths (from 2 to more than 20 residues), then transported to lysosomes where exoglycanases release monosaccharides for recycling.

HS saccharide chains present at the cell surface or in extracellular spaces are highly charged and bind multiples molecules, accounting for the implication of HSPGs in a multitude of biological pathways (Sarrazin et al, 2011). Interactions with fibronectin, laminin, thrombospondin, tenascin, or Slit are especially important in cell adhesion, cell polarization, cell migration and in the growth of cell processes (de Wit & Verhaagen, 2007; Sarrazin et al, 2011; Xian et al, 2010). For example, engagement of syndecan-4 together with integrins is required for focal adhesion (FA) formation, and nearly all ECM molecules contain binding sites for both types of receptors (Barczyk et al, 2010; Morgan et al, 2007; Xian et al, 2010).

Integrins are heterodimeric transmembrane receptors. They are the main cell adhesion receptors involved in FA formation (Barczyk et al, 2010). Following engagement with the ECM, integrins locally recruit FA proteins including FA kinase (FAK), paxillin and vinculin, and activate signaling required for cell polarization and migration (Legate et al, 2009; Moissoglu & Schwartz, 2006). When engaged, syndecan-4 modulates this process through the

cytoplasmic domain of its core protein (Couchman, 2010). Soluble HS saccharide fragments present in the ECM affect syndecan-4 engagement and FA formation in response to fibronectin (Mahalingam et al, 2007).

Mucopolysaccharidosis type III (MPSIII, Sanfilippo syndrome) is a genetic disease caused by the deficiency in one of the four lysosomal exoglycanases required for the removal of N-acetyl-glucosamine in HS chains (Neufeld & Muenzer, 2001). In contrast to monosaccharides, soluble HS saccharide fragments produced by partial digestion of HS chains cannot be transported to the cytosol for recycling. They accumulate in the endo-lysosomal compartment, from which they can be eliminated outside the cell through exocytosis. Cognitive development delay and progressive intellectual degradation of affected children are consistent with major loss of brain plasticity. Associated cell disorders, including Golgi disorganization (Vitry et al, 2010), expansion of acetylated microtubule network (Roy et al, 2012), altered response to fibroblast growth factor 2 (Lemonnier et al, 2011), and enhanced neurite outgrowth (Hocquemiller et al, 2010), suggested that the capacity of deficient cells to correctly respond/adapt to their microenvironment is altered. We therefore asked whether deficient cells from mouse or human models of MPSIII, which produced high quantity of soluble HS saccharide fragments, sensed their environment appropriately. Our observations revealed altered integrin signaling in MPSIII mouse astrocytes and human neural stem cells. They prompted us to investigate how non-deficient cells behave when their environment is enriched with exogenous soluble HS saccharides. Our results indicate that soluble HS saccharide fragments activated FA formation, with consequences on cell polarity and oriented migration.

Results

Increased $\beta 1$ integrin levels and focal adhesion formation in MPSIIIB astrocytes

We previously examined gene expression profiles of neural cells generated from induced pluripotent stem cells (iPSc) derived from the skin fibroblasts of patients with MPSIII type B (MPSIIIB), a subtype of Sanfilippo syndrome in which the deficient enzyme is α -N-acetylglucosaminidase (NAGLU). The study revealed modified amounts of mRNAs coding for various integrin chains in patient's cells (αV , $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 8$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\alpha 1$ and $\beta 3$) (Lemonnier et al, 2011). Examination of MPSIIIB mouse astrocytes plated for 24 hours on poly-ornithin substrate revealed the presence of higher amounts of $\beta 1$ -integrin (also called CD29) mRNAs than in control mouse astrocytes (Fig. 1A), and western blot detected high amount of $\beta 1$ -integrin in total cell protein extracts using anti-CD29 antibodies (Fig. 1B). Using the antibody 9EG7, which recognizes activated $\beta 1$ -integrin in association with $\alpha 4$ chain or $\alpha 6$ chain, we also detected increased $\beta 1$ -integrin signal in MPSIIIB versus control astrocytes by immunostaining (Fig. 1C). Co-labeling of $\beta 1$ -integrin and vinculin, a FA marker, revealed an increase in $\beta 1$ -integrin containing FAs in MPSIIIB, as compared to control astrocytes (inset in Fig. 1C). Correction of the enzyme deficiency of MPSIIIB cells using a lentivirus vector inducing the expression of the missing enzyme NAGLU led to $\beta 1$ -integrin expression levels equivalent to control astrocytes (Fig. 1), suggesting that increased levels of $\beta 1$ -integrin in MPSIIIB cells were related to the accumulation of partially digested HS saccharides.

Once activated and clustered, integrins locally recruit proteins involved in the formation of FA including vinculin, phosphorylated FAK (pFAK) and phosphorylated paxillin (pPaxillin) (Legate et al, 2009). Vinculin, FAK and paxillin mRNAs levels were comparable in MPSIIIB and control astrocytes (supplemental Fig. S1A). Vinculin signal was weak in control mouse astrocytes plated for 24 hours on poly-ornithin, whereas it was intense and abundant in MPSIIIB astrocytes (Fig. 2A, supplemental Fig. S1B). Co-labeling for FAK phosphorylated on tyrosine 397 (pFAK) and vinculin detected more intense pFAK signal co-localized with vinculin in MPSIIIB than in control astrocytes (1.7 to 2 folds; Fig. 2B, supplemental Fig. S1B). FAK was immunoprecipitated and phosphorylation of FAK on tyrosine was revealed by western blot using anti-phosphotyrosine antibodies. Fig. 2C shows a 1.3 fold more intense pFAK signal in MPSIIIB than in control astrocytes. FAK phosphorylation induces the formation of FAK-Src complexes, which phosphorylate paxillin on tyrosine 118 (pPaxillin). Immunostaining of mouse astrocytes with anti-pPaxillin antibodies reveals more intense signal in MPSIIIB than in control astrocytes (Fig. 2D, supplemental Fig. S1C). Taken together, these results indicated that FA formation was intense in MPSIIIB astrocytes in culture conditions that did not stimulate FA formation in control astrocytes. Cell staining for F-actin with fluorescent phalloidin did not reveal major differences between MPSIIIB and control astrocytes at 24 hours. Noticeably, whereas FA were large and apparently mature, they were not associated with stress fibers at this stage (supplemental Fig. S2). Correction of the enzyme deficiency and subsequent clearance of HS

saccharides using a lentivirus vector inducing the expression of the missing enzyme NAGLU led to equivalent levels of vinculin, pFAK and pPaxillin in MPSIIIB and control astrocytes (Fig 2), suggesting that increased FA formation in deficient MPSIIIB cells was related to the accumulation of partially digested HS saccharides.

Impaired FA recruitment and Cdc42 activation in MPSIIIB astrocytes

Integrin signaling and FA formation control the establishment of polarity in astrocytes (Etienne-Manneville & Hall, 2001; Peng et al, 2008). The establishment of astrocyte polarity can be investigated in wound healing assays. Scratching confluent astrocyte monolayer cultures stimulates colonization of the depopulated area by wound edge cells. This process involves the formation of new FAs at the leading edge of cells bordering the wound, Cdc42 RhoGTPase activation, and subsequent cell polarization and migration toward the depopulated area (Etienne-Manneville & Hall, 2001). We examined whether these events were affected in MPSIIIB astrocytes, as compared to wild type controls and to MPSIIIB astrocytes in which the enzyme defect had been corrected.

Immediately after the scratch, the FA markers pPaxillin or pFAK appeared as small dots distributed throughout the basal surface of the cells (Fig 3A). Thirty minutes later, pPaxillin staining, or pFAK staining were concentrated in larger patches at the cell wound edge. In contrast, in MPSIIIB cells, pPaxillin staining, or pFAK staining were unaffected by the wound and remained spread throughout the cell, indicating that FA formation at the cell leading edge was impaired in MPSIIIB astrocytes. Concentration of pPaxillin and pFAK staining 30 minutes after scratch at the leading edge of MPSIIIB astrocytes that produced NAGLU after lentivirus gene transfer suggested that impaired FA recruitment was related to undigested HS saccharides accumulation.

Cdc42 bound to GTP is the activated form of Cdc42, which binds PAK. The formation of FA is associated with increased amounts of Cdc42-GTP at the leading edge (Osmani et al, 2006). We measured Cdc42-GTP amounts in astrocytes immediately, or 30 minutes after wound by pulling down Cdc42 bound to PAK using GST-PAK. Cdc42-GTP and total Cdc42 in cell extracts were revealed by western blot (Fig 3B). Whereas scratch was associated with an increased proportion of Cdc42-GTP in wild type cells after 30 minutes, this proportion did not increase in MPSIIIB astrocytes. After correction of the enzyme defect, MPSIIIB astrocytes behaved like wild type cells. These results indicated impaired Cdc42 activation in response to scratch in MPSIIIB, and suggested that this defect was related to the accumulation of partially digested HS saccharides.

Impaired polarization and migration of MPSIIIB astrocytes

In the wound healing assay, Cdc42 activation following scratch leads to re-positioning of the centrosome and the Golgi apparatus between the cell nucleus and the leading edge (Jaffe & Hall, 2005). We investigated astrocyte polarization in the insert removal assay, an equivalent of the wound healing assay in which, in order to avoid cell injury, stimulation to invade new spaces is induced by the removal of an obstacle instead of a scratch. Eight hours following insert removal, cells were

stained with Hoechst, to reveal nuclei, anti-pericentrin antibodies to highlight centrosomes, and anti-GM130 antibodies to localize the Golgi apparatus (Fig. 4A). The proportion of cells in which the centrosome was localized within the quadrant facing the expected direction of migration was 72% in normal cells, and only 51% in MPSIIIB astrocytes (compared to 25% for random orientation). This result indicates a defect in the capacity of MPSIIIB cells to become oriented in response to the insert removal stimulus. This defect was corrected in MPSIIIB cells producing NAGLU after lentivirus-mediated gene transfer, suggesting that it was related to the accumulation of partially digested HS saccharides.

Defective FA recruitment, defective Cdc42 activation and defective orientation provided series of evidence for an altered control of polarization in MPSIIIB astrocytes. We therefore examined astrocyte migration in the insert removal assay using time-lapse video-microscopy. Cell nuclei were stained with Hoechst and their trajectory tracked for 8 hours (Fig. 4B). Whereas control cell displacement was most often directed toward the open space, the trajectories of MPSIIIB astrocytes were more tortuous and shorter, with more frequent displacement in the opposite direction with respect to the open space. We concluded that oriented cell migration was altered in MPSIIIB astrocytes.

Impaired polarization of MPSIIIB human fibroblasts and MPSIIIB mouse neural stem cells

We next examined whether cell orientation defects affected other MPSIIIB cell types than mouse astrocytes. Skin fibroblast cultures derived from three patients with MPSIIIB or from three unaffected controls were investigated in the insert removal assay. As for mouse astrocytes, the proportion of cells in which the centrosome was localized inside a 90-degree quadrant facing the expected direction of migration was scored using immunolabeling of the centrosome and the Golgi apparatus. This proportion was of 49.3% in patient cells, as compared to 69.5% in controls (Fig. 5A). After correction of the enzyme defect through lentivirus-mediated gene transfer the proportion of properly oriented cells was equivalent in patient (64.5%) and control cultures.

Neural stem cell cultures were established from the brain ganglionic eminences of MPSIIIB, or control mouse embryos. Cells forming neurospheres in suspension cultures were seeded on a laminin matrix, on which they attached and spread. Cells migrated out of the sphere in a centrifuge manner. In control cells, oriented migration was associated with centrosome positioning in front of the nucleus in the direction of movement. We scored the proportion of cells distant from the sphere center in which the centrosome was located within a 90-degree quadrant in front of the nucleus in the direction of migration (Fig. 5B). Whereas 73% of wild type neural stem cells were correctly oriented, this proportion was 58% for MPSIIIB cells, indicating alteration of cell orientation. This defect was corrected in MPSIIIB neural stem cells producing NAGLU after lentivirus-mediated gene transfer.

These results indicated that, as previously observed in mouse astrocytes, the accumulation of undigested HS saccharides was also associated with cell orientation defects in human fibroblasts and mouse neural stem cells.

Exogenous HS activate integrin signaling and focal adhesion in normal astrocytes

Further experiments were designed to explore direct links between HS saccharides and FA formation. For that purpose normal mouse astrocytes were exposed to various types and various concentrations of exogenous soluble HS saccharides added to the culture medium. Exogenous soluble saccharides are rapidly degraded in normal cells by endo- and exoglycanases following internalization by endocytosis or micropinocytosis. Consistently, addition of exogenous soluble HS saccharides to control astrocytes did not result in an increase of intracellular glycosaminoglycan levels (supplemental Fig. S3A). Therefore, addition of exogenous soluble HS saccharides mimicked the disease situation in which partially digested saccharide fragments are released in the extracellular environment through exocytosis (supplemental Fig. S3B).

We first examined whether exogenous soluble HS saccharides purified from MPSIIIB patient's urine stimulated FA formation in mouse astrocytes grown on poly-ornithin substrate. Whereas urines from non-affected individuals contain almost uniquely chondroitin sulfate, urines of MPSIIIB patients contain high amounts of HS (Ausseil et al, 2008; Coppa et al, 2011a). PAGE analysis of HS saccharide fragment size in samples purified from patient's urines detected molecules ranging from dp8 to long chains, with only trace amounts of shorter species (Supplemental Fig. S4A). Normal mouse astrocyte cultures were incubated for 1 hour in the presence of increasing concentrations of HS purified from MPSIIIB patient's urine, or of dextran sulfate as negative control (Fig. 6 and Supplemental Fig. S4B). Vinculin signal increased with patient's HS concentration. Material previously digested with heparinases, in which HS saccharide long chains, dp14 and dp8 were undetectable, was inactive. Dextran sulfate did not modify vinculin signal. These results demonstrated that HS purified from patient's urine, which essentially contained HS saccharides larger than dp8, had the capacity to stimulate FA when added to control mouse astrocyte cultures.

We next examined whether HS saccharides isolated from normal porcine tissues exhibited similar activity and whether this activity was associated with specific molecular species. Commercial porcine HS was submitted to heparinase III digestion to generate saccharides of random sizes. Digested HS were fractionated by high performance liquid chromatography to isolate pure preparations of disaccharides (dp2), octasaccharides (dp8), or tetradecasaccharides (dp14). Wild type mouse astrocytes were exposed to increasing concentrations of these various HS preparations for 1 hour and vinculin signal was measured. Data shows dose-response effects to long chain HS, dp14 and dp8, but not to dp2 (Fig. 7). The proportion of tyrosine-phosphorylated FAK was measured by immunoprecipitation and quantitative western blot in lysates from cells exposed to the highest HS concentrations. Results showed that HS long chains, dp14, and dp8 stimulated FAK phosphorylation,

whereas dp2 and dextran sulfate did not (Fig. 8A). One-hour exposure to soluble HS did not modify β 1-integrin expression (Supplemental Fig. S4C). These observations demonstrated that soluble HS saccharide fragments isolated from normal porcine tissue and consisting of 8 saccharides or more activated integrin signaling and FA formation when added to control mouse astrocyte cultures.

HS saccharides activate FAK in human neuronal precursors

The stimulation of FAK phosphorylation by HS was further investigated in human neural stem cells derived from iPSc. Control or MPSIIIB iPSc were generated from skin fibroblasts of a non-affected individual, or a MPSIIIB patient, respectively (Lemonnier et al, 2011). Human neuronal precursors (hNPs) were thereafter differentiated from these cultures (see material and methods).

hNPs cultures from the non-affected individual were exposed for 1 hour to commercial porcine HS (10 μ g/ml) or dextran sulfate (10 μ g/ml). The proportion of FAK phosphorylated on tyrosine in cell lysates was then examined by immunoprecipitation and western blot. Results indicated that HS addition to culture medium stimulated FAK phosphorylation in hNPs, as previously seen for mouse astrocytes (Fig. 8B).

The proportion of tyrosine-phosphorylated FAK was also examined in cell lysates of MPSIIIB patient's hNPs not exposed to exogenous HS. The levels of phosphorylated FAK were higher than in non-affected hNPs not exposed to exogenous HS, and comparable to non-affected hNPs exposed to exogenous HS.

These results demonstrate that FAK was constitutively activated in patient's hNPs accumulating HS saccharides, and activated in response to exogenous soluble HS saccharide fragments in non-affected hNPs.

Discussion

Here, we show that soluble HS saccharide fragments activated FA formation. In MPSIIIB mouse astrocytes, partially digested soluble HS saccharides constitutively induced β 1-integrin over-expression, recruited FAK, paxillin, and vinculin at FAs, and activated FAK. Constitutive integrin activation impaired appropriate response to acute extracellular cues and affected proper polarization and oriented migration of affected cells. These functional defects may be related to cellular disorders, developmental damages, cognitive impairment and other neurological manifestations associated with MPSIIIB.

HS affect the perception of environmental cues in various cell types

Previous findings suggested possible involvement of integrins in cell disorders associated with MPSIIIB. Indeed, HS proteoglycans are co-receptors of growth factors and integrins (Kim et al, 2011), and intimate interactions exist between HS and many ECM components including laminin, vitronectin and fibronectin (Mahalingam et al, 2007; Xian et al, 2010). We also previously observed altered FGF-2 response in MPSIIIB patient's iPSc (Lemonnier et al, 2011), and the neural stem cell progeny of these cells showed altered expression of many genes encoding integrins, FGFs, FGF receptors, downstream effectors in these pathways and ECM components. Moreover, the Golgi matrix protein GM130, a multifunctional protein important for cell polarization and migration control (Nakamura, 2010), was detected at abnormally high levels in various affected cell types including mouse and human MPSIIIB neurons (Lemonnier et al, 2011; Vitry et al, 2010), and evidence was produced that this over-expression was related to the abnormal expansion and organization of the Golgi apparatus (Roy et al, 2012).

Cell polarization and oriented migration in response to environmental cues are commonly investigated in astrocyte monolayer (Etienne-Manneville, 2006). Molecular mechanisms have been almost entirely dissected (Etienne-Manneville et al, 2005; Gomes et al, 2005; Manneville et al, 2010; Palazzo et al, 2004). Our results revealed constitutive activation of FA formation in MPSIIIB astrocytes, which affected the polarization of these cells and their oriented migration in response to external stimuli. Correction of these defects following genetic correction of the enzyme deficiency suggested that they were caused by partially digested HS saccharides. This conclusion was confirmed by the activation of FA in normal mouse astrocytes exposed to exogenous soluble HS saccharides. Results obtained in mouse astrocytes were completed with evidence for related alterations in other cell types. Polarization defects were observed in human MPSIIIB fibroblasts and mouse MPSIIIB neural stem cells. Constitutive FAK activation was detected in MPSIIIB iPSc-derived human neural stem cells. It is therefore likely that HS saccharides affected the perception of environmental cues in various affected cell types, including cells participating in CNS development and functions.

Extracellular HS saccharide fragments activate focal adhesion

Heparanase present in endocytic vesicles cleaves HS proteoglycans internalized from the cell surface, producing saccharide fragments of various sizes (Stringer & Gallagher, 1997). Further digestion by exoglycanases in lysosomes is impaired in MPSIIIB. In contrast to monosaccharides that are transferred to the cytosol for recycling (Sagne & Gasnier, 2008), partially digested saccharides cannot escape the endo-lysosomal compartment except through exocytosis, including lysosomal exocytosis which remains efficient in MPSIIIB cells (supplemental Fig S3). Minimal HS storage in intra-cellular vesicles, including vesicles bearing lysosomal markers (McGlynn et al, 2004; Roy et al, 2012), suggests intense elimination of partially digested HS saccharide fragments towards the extracellular environment. By exposing control astrocytes to exogenous soluble HS saccharides, we provided evidence that high concentrations of soluble HS saccharides in the cell environment induced constitutive activation of FA. Activation of FA was not due to internalized HS molecules since the intracellular HS pool was not increased (supplemental Fig S3), presumably because internalized HS were rapidly degraded by intracellular glycanases. We therefore assume that continuous release of soluble HS saccharides in the environment of MPSIIIB cells accounts for constitutive FA activation and impairs response to extracellular polarization cues.

Mechanisms involved

It is conceivable that soluble HS saccharide fragments induced integrin engagement through direct interaction with heterodimers, as shown for heparin binding to $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, and $\alpha v\beta 5$ (Faye et al, 2009). Stimulation of integrin clustering by bound saccharide fragments may be sufficient for FA activation. However, since HS interact with multiple partners, other mechanisms may be involved. FA formation in response to cell spreading on fibrillar fibronectin requires co-engagement of integrins and syndecan-4 through binding at different sites on fibronectin (Arrington & Yost, 2009; Pompe et al, 2006; Stepp et al, 2010). However, at high local density of fibronectin, FA formation relies solely on integrins (Dubash et al, 2009) and soluble HS fragments compete with integrins for fibronectin binding (Mahalingam et al, 2007). Basal induction of FA formation by fibronectin was probably minimal in our experiments, since astrocyte adhesion was mediated by poly-ornithin, and observations were made only 24 hours after plating, thus presumably in the presence of limited amounts of fibronectin produced by plated cells. According to previous reports (Gopal et al, 2010), we assume that interaction of soluble HS with fibronectin may have resulted in sufficient local increase of fibrillar fibronectin density to induce FA formation. HS saccharides may therefore have opposite effects on the adhesion process depending on fibronectin density, acting as inhibitors at high density (Mahalingam et al, 2007) and facilitators at low density. Comparable mechanisms involving growth factors and/or growth factor receptors are conceivable. Mechanisms may be associated and possibly synergic.

Our results indicate that whatever the HS saccharide partner involved in FAK activation, integrin, fibronectin, or other molecules, effective interaction requires longer chains than disaccharides. This

finding is in agreement with structural requirement previously reported for effective interaction between HS saccharides and proteins (Sasisekharan et al, 2006). Interactions are modified by saccharide sulfation, which strongly modulates saccharide biological activity (Sarrazin et al, 2011). Our result suggest that measuring FAK activation is a rapid assay to investigating the biological activity of structurally homogeneous HS saccharide preparations and could provide a methodological approach to the “sulfation code” (Murrey & Hsieh-Wilson, 2008).

Are cell defects in MPSIIIB related to FAK activation?

Integrin and FAK activation promote localized microtubule stabilization and reorientation by Rho-mDia signaling (Palazzo et al, 2004) and Cdc42 signaling via APC/Dlg1 (Manneville et al, 2010) and CLASP recruitment (Kumar et al, 2009). Stabilization involves post-translational modifications including detyrosination and/or acetylation (Destaing et al, 2005) Destaing et al, 2005; (Goulimari et al, 2005). Acetylated microtubules are anchored at Golgi by CLASP and at cis-Golgi nucleation sites by AKAP450, a partner of GM130 (Miller et al, 2009; Rivero et al, 2009). Golgi-derived microtubules grow towards the cell leading edge in a polarized manner, leading to the constitution of a microtubule array oriented in the direction of the cell movement (Vinogradova et al, 2009). This process is essential for cell polarization, post-Golgi trafficking and oriented cell migration (Efimov et al, 2007).

Cell defects observed in MPSIIIB cells might be related to these processes. Studies in HeLa cells accumulating HS saccharides after depletion of NAGLU by specific shRNAs showed an expansion of acetylated microtubules anchored at Golgi membranes and increased amounts of GM130 and AKAP450 localized at the Golgi (Roy et al, 2012). The Golgi apparatus was enlarged and deeply disorganized in NAGLU-depleted HeLa cells and in mouse and human affected neurons (Lemonnier et al, 2011; Roy et al, 2012; Vitry et al, 2010). We assume that the constitutive enhancement of microtubule stability subsequent to permanent over-activation of the integrin pathway accounts for the increase recruitment of AKAP450 and GM130 at the Golgi surface, and for subsequent intracellular vacuolation, Golgi alterations, cell polarization and oriented migration defects.

Constitutive FAK activation and neuropathology in MPSIIIB

Observations in adult MPSIIIB mice do not reveal CNS malformation (Li et al, 1999; Vitry et al, 2010). Although affected children show severe brain atrophy at advanced stages of the disease, brain imaging does not reveal serious anomalies at presymptomatic stages. Early neuroblasts migration establishing cortical lamination and late interneurons tangential migration in cortical laminae are therefore not affected by the disease. The identification of more subtle deleterious effects possibly caused by HS saccharides accumulating in brain tissue requires further studies. Alterations may concern neuronal polarity. Genetic ablation of β 1-integrin in mouse dorsal telencephalic progenitors, which also preserves cortical development and lamination, affects neuron polarization (Lei et al, 2012). They may also concern connectivity development since HS participate in the determination of axonal identity (Lafont et al, 1992; Nishimura et al, 2010), modulate Slit2-Robo-1 interactions (Ronca

et al, 2001) and affect neuritogenesis in vitro (Hocquemiller et al, 2010). It will be crucial to identify brain damages in MPSIII and to determine at which stage of the disease they cause irreversible lesions in the perspective of a possible prevention of HS saccharide accumulation in the brain through local enzyme supply (Crawley et al, 2011; Ellinwood et al, 2010).

Materials and Methods

Antibodies and reagents

Cell culture reagents, media, normal goat serum (NGS) and buffer saline (DPBS) were from InVitrogen, fetal calf serum (FCS) was from PAA Laboratories. The following primary antibodies were used in immunofluorescence analysis: β 1 integrin (CD29), rat IgG2a, clone 9EG7 (BD biosciences) 1/50; Vinculin, mouse IgG1, clone hVIN-1 (Sigma-Aldrich) 1/150; pFAK tyr 397, rabbit (Cell signaling) 1/100; pPaxillin tyr118, rabbit (Cell signaling) 1/50; mouse pericentrin, rabbit (Covance) 1/500; human pericentrin, rabbit (AbCam) 1/1000; GM130, mouse IgG1, clone 35 (BD biosciences) 1/500; LAMP1, rat IgG2b, clone 1DB4 (BD biosciences) 1/500 and for western blot analysis: FAK, mouse IgG1, clone 4.47 (Millipore) 1/500; pTyr, mouse IgG2a, clone PY69 (BD biosciences) 1/500; β 1 integrin CD29, mouse IgG1, clone 18/CD29 (BD biosciences) 1/1000; Cdc42, mouse No 240201 (Cell biolabs) 1/500; GAPDH, rabbit (Sigma) 1/20000. TRITC-phalloidin was from Sigma.

Animals

Mouse experiments were approved by the Institut Pasteur ethical committee for animal research and performed by authorized investigators (authorization no. 75-268, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche). C57Bl/6NaGlu^{+/-} mice were obtained from Pr. E. Neufeld (Li et al, 1999) C57Bl/6NaGlu^{-/-} mutant pups were identified by PCR on DNA from tail-clipped.

Viral vectors

Lentivirus vectors coding for human NAGLU were produced as previously described (Hocquemiller et al, 2010) and stocks were used at 1:5000 dilution in astrocyte, neural stem cell and fibroblast cultures.

Mouse astrocyte cultures

Mouse astrocytes were prepared as previously described with small modifications (Etienne-Manneville, 2006). Briefly ganglionic eminences, cortex and hippocampus were dissected from wild type or MPSIIIB mouse P0 pups and mechanically dissociated. Cells were seeded on polyornithine-coated (1.5 μ g/ml) plates and some MPSIIIB cells were treated with lentivirus coding for human NAGLU. Cells are kept at 37°C and 9%CO₂ during 3 days and then washed thoroughly by flushing 15 times in PBS. After 8 days confluent cells are passaged. At this step, routinely more than 90% of cells are positive for glial fibrillary acidic protein (GFAP).

Mouse neural stem cell cultures and polarization

Neurospheres from wild type or MPSIIIB mouse E17 ganglionic eminences were prepared and grown as previously described (Vitry et al, 2010); Cell migration was induced by adhesion in the presence of 2% FCS onto coverslips previously coated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of poly-ornithine (Sigma) followed by 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of laminin (Sigma). Neurospheres were incubated 3 hours then fixed and immunolabeled for pericentrin and GM130 with Hoechst in order to determine the centrosome orientation during migration.

Human fibroblasts, human induced pluripotent stem cells and human neural precursors

Human fibroblasts and human induced pluripotent stem cells (hiPS) are cultivated as described in (Lemonnier et al, 2011). hiPS were differentiated into neural precursors as described in (Brennan et al, 2011; Kim et al, 2010). Briefly, embryoid bodies generated from hiPS are transferred to non-adherent plates. Colonies were maintained in suspension in DMEM-F12 with 20% Knockout serum replacement (KOSR), 1% non essential amino acid, 15mM HEPES and 100 μM 2-mercaptoethanol during 3 days and then transferred in medium containing DMEM-F12, 2% B27 without vitamin A, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ heparin (Sigma), 100 μM 2-mercaptoethanol, 100ng/mL bFGF (Miltenyi) and 5 μM Dorsomorphin (Sigma) during 10 days. Then, obtained spheres were plated onto poly-ornithine (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and laminin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) coated plates in hNP medium (50% DMEM-F12, 50% Neurobasal, 2% B27 without vitamin A, 1% N2, 100 μM 2-mercaptoethanol). Visible rosettes formed within 10 days were manually dissected and cultured in hNP medium at high density. hNP were dissociated in Accutase and seeded at low density 3 days in hNP medium to allow neural differentiation (nestin positive) before treatment with heparan sulfate.

Immunofluorescent labeling and quantification

β 1-integrin immunolabeling was performed in PBS on living astrocytes for 30 minutes at room temperature. After washes in DPBS, cells were fixed with DPBS 4% paraformaldehyde for 15min at room temperature and then incubated 1h at room temperature with primary antibodies diluted in DPBS, 1% BSA, 2% NGS, 0,1% saponin. Primary antibodies were revealed by 40 min incubation at room temperature with appropriate secondary antibodies conjugated to AlexaFluor® 488, 555 or 647 (Molecular Probes) and diluted in DPBS 1% BSA, 2% NGS. Coverslips were mounted in FluoromountG® (Southern Biotech).

Images were acquired with an Axioplan 2 imaging optic microscope equipped with Apotome and AxioCam TR camera controlled by the AxioVision software (Zeiss). Whatever the phenotype and/or treatment, time exposure was determined and thereafter kept constant for all markers analyzed in the experiment. Quantification was performed by measuring specific signal pixels relatively to total cell surface, using the Axiovision co-localization module. Fluorescent signal was binarised, keeping threshold constant for all acquisitions in the same experiment. High threshold allowed recording

specific signals produced by vinculin, $\beta 1$ integrin, pPaxillin and pFAK antibody immuno-staining. Low threshold produced background signal corresponding to the entire cell surface. Expression level was determined as the ratio of specific marker to whole cell surface signals.

Centrosome reorientation of mouse astrocytes and human fibroblasts

Cells were induced to migrate by silicone insert (Ibidi) removal. Cells were fixed after 8 hours. Then, centrosome and Golgi were immunolabeled with antibodies against pericentrin and GM130 respectively. Centrosome orientation was determined as previously described in (Etienne-Manneville, 2006). Centrosomes located in front of the nucleus, within the quadrant facing the wound, were scored as correctly oriented. A score of 25% represents the absolute minimum corresponding to random centrosome positioning.

Time-lapse microscopy

Confluent astrocytes seeded in plates containing insert were stained 5min with 0.5 μ g/ml of Hoechst 33342 (Sigma), then washes twice 5min in PBS and replaced with growth medium. After insert removal, images of migrating cells were acquired every 30 min during 8 with a Zeiss Observer Z1 microscope equipped with a 20x objective, a motorized turntable (Ludl), a thermostated chamber, a Colibri system and an AxioCam Mrm camera controlled by Axiovision AutoFocus (Definite Focus) software (Zeiss). Nuclei bordering the open space were tracked with the ImageJ Manual Tracking module.

Immunoprecipitation of FAK proteins

One day before treatment, serum of culture medium was reduced to 0.3%. Low density cell cultures were treated 1 hour with 10 μ g/ml of HS fragments or dextran sulfate (~5kD, Sigma) and then washed with DPBS. Cells were lysed on ice for 2min in RIPA buffer (Sigma) containing a protease inhibitor cocktail and a phosphatase inhibitor cocktail (Roche) and 1U/ μ l of a Benzonase nuclease (Merck), followed by a 5min incubation at 37°C. FAK proteins were immunoprecipitated from 250 μ g of cell lysate proteins with 5 μ g of antibody against FAK clone 4.47 (Millipore) and protein G sepharose (4 Fast Flow, GE Healthcare) at 4°C. FAK proteins were eluted by 5min at 100°C in NuPAGE LSD sample buffer (Invitrogen) and NuPAGE sample reducing agent (Invitrogen). Phosphorylation of FAK on tyrosines was analyzed on western blot.

Cdc42 pulldown

Confluent astrocytes were starved 24h with 0.3% serum and subjected to multiple parallel and perpendicular scratches. Thirty minutes later, Cdc42 extraction and pull-down were performed with a Cdc42 activation assay kit according to the manufacturer recommendations (ref STA-402).

Western blot analysis

To obtain total protein extracts, cells were washed with DPBS, and lysed on ice for 2 min in RIPA buffer (Sigma) containing a protease inhibitor cocktail and a phosphatase inhibitor cocktail (Roche). 1 U/ μ l of a Benzonase nuclease (Merck) was added to the cell lysate, followed by 5min incubation at 37°C. Protein samples (10 μ g) were resolved by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 7% Tris-acetate gels (Invitrogen). Gels were blotted onto Immobilon-FL PVDF membranes (Millipore), which were blocked with Odyssey blocking buffer (Li-Cor Biosciences). Membranes were incubated overnight at 4°C with antibodies diluted in blocking buffer containing 0.1% Tween 20, washed with PBS 0.1% Tween 20, and revealed with secondary antibodies conjugated to AlexaFluor® 680 (Molecular Probes) or to Dylight® 800 (Thermo Scientific). Membranes were washed three times with PBS and visualized with the Odyssey imaging system (Li-Cor Biosciences).

Quantitative RT-PCR

Total RNA from astrocyte monolayer were extracted using RNeasy mini kit (Qiagen). One microgram of total RNA was used to synthesize cDNA with oligo (dT)12-18 (200 ng, Roche) and M-MLV reverse transcriptase (Superscript III, Invitrogen). Quantitative PCR was performed with a 7300 Real Time PCR system (Applied Biosystems) with 50 ng of cDNA. The primers and TaqMan probes were designed by Applied Biosystems. Reaction mixtures containing the primers, the TaqMan probe, and the TaqMan Universal PCR Master Mix were prepared according to Applied Biosystems procedures. Universal cycling conditions (2min at 50°C, 10min at 95°C, 40 cycles of 15sec at 95°C, and 1min at 60°C) were used. Each sample was analyzed in triplicate. Negative controls included omission of reverse transcriptase at the cDNA synthesis step and omission of the template at the PCR step. cDNA amounts were expressed as $2^{\text{exp}(\text{Ct1}-\text{Ct2})}$, in which Ct1 is a reference Ct measured for the amplification of GAPDH, the endogenous control cDNAs, and Ct2 is the Ct measured for the amplification of the examined cDNA.

HS preparations

HS were purified from patient's urines as previously described (Ausseil et al, 2008). Porcine intestinal mucosal HS (1 g) was digested with heparinase III (25 mU/ml) in 5 ml of 0.1 mg/ml BSA, 2 mM CaCl₂, 50 mM NaCl and 5 mM Tris buffer pH 7.5 for 72 h at 30 °C. The enzymatic reaction was stopped by heating the digest at 100°C for 5 min. The digestion products were then size-separated using a Bio-Gel P-10 column (4.4 x 150 cm), equilibrated with 0.2 M NaCl and run at 1 ml/min. Eluted material, detected by absorbance at 232 nm, consisted of a graded series of size-uniform oligosaccharides resolved from disaccharides (dp2) to octadecasaccharides (dp18). To ensure homogeneity, only the top fractions of each peak were pooled, and each isolated fraction was re-

chromatographed on a gel filtration column to further eliminate possible contamination. Samples were extensively dialyzed against distilled water, freeze dried, weighted and diluted in distilled water.

Statistical analysis

Statistics were performed using the SPSS software (SPSS). The assumption that the values follow normal distribution was verified by the Shapiro-Wilk's test. Non-parametric tests were used when normal distribution was not assumed.

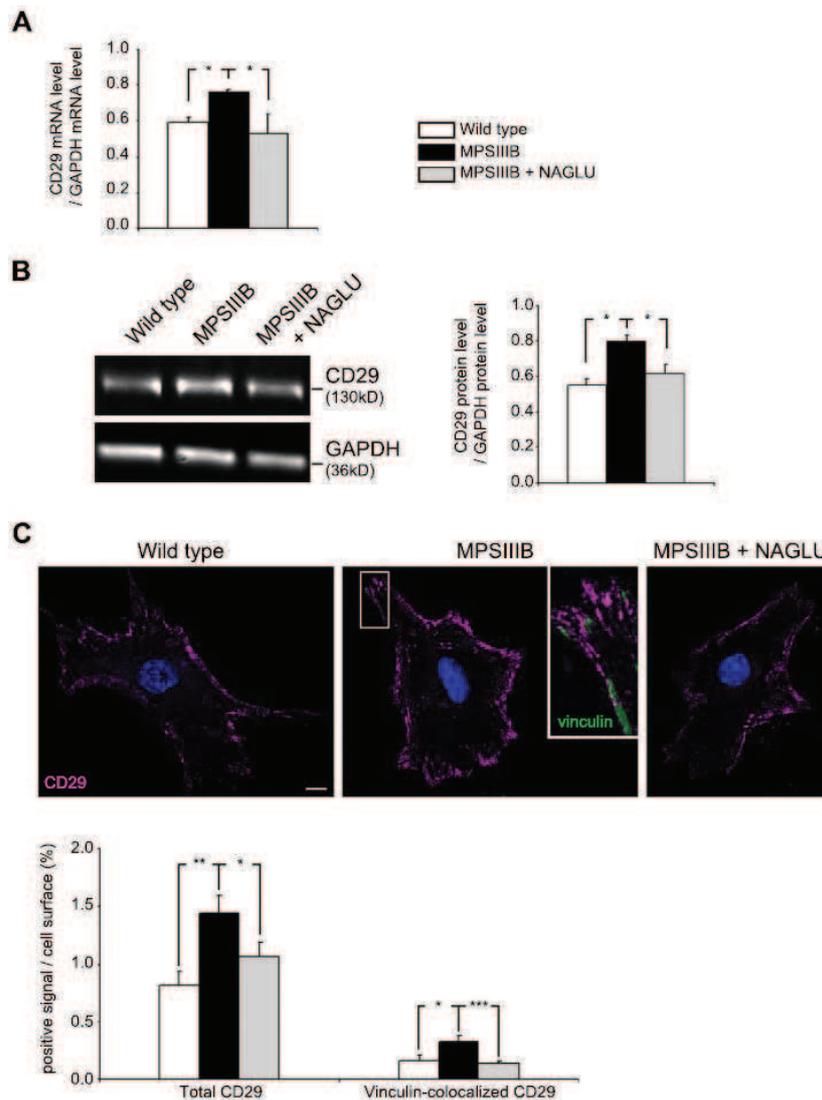


Figure 1. β 1-integrin is over-expressed in MPSIIIIB astrocytes.

Astrocyte cultures were established from wild type or MPSIIIIB mice. MPSIIIIB mouse astrocytes were either untreated (MPSIIIIB), or exposed to lentivirus vectors to induce the expression of NAGLU (MPSIIIIB+NAGLU), the missing lysosomal enzyme in MPSIIIIB. Panel A: β 1-integrin (CD29) mRNA levels detected by quantitative RT-PCR and normalized according to GAPDH mRNA levels. Panel B: western blot of total protein extracts revealed with anti- β 1-integrin (anti-CD29 clone 18, 130kD) and anti-GAPDH (36kD) antibodies. The histogram shows the relative intensity of CD29 versus GAPDH signals. Panel C: astrocytes were doubly immunolabeled with antibodies against the activated form of β 1-integrin (anti-CD29 clone 9EG7, in purple) and antibodies against vinculin (in green). Nuclei were counterstained with Hoechst (in blue). Inset in the middle panel shows partial colocalization of β 1-integrin and vinculin signals in FA. The histogram indicates fluorescent signal intensities relative to cell surface. Apotome sections, scale bars: 10 μ m. Data are from 3 independent astrocyte cultures, values are means \pm SEM, *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001, Mann-Whitney test (A, B, n=3) or Student's t-test (C, n \geq 60 scored cells per condition).

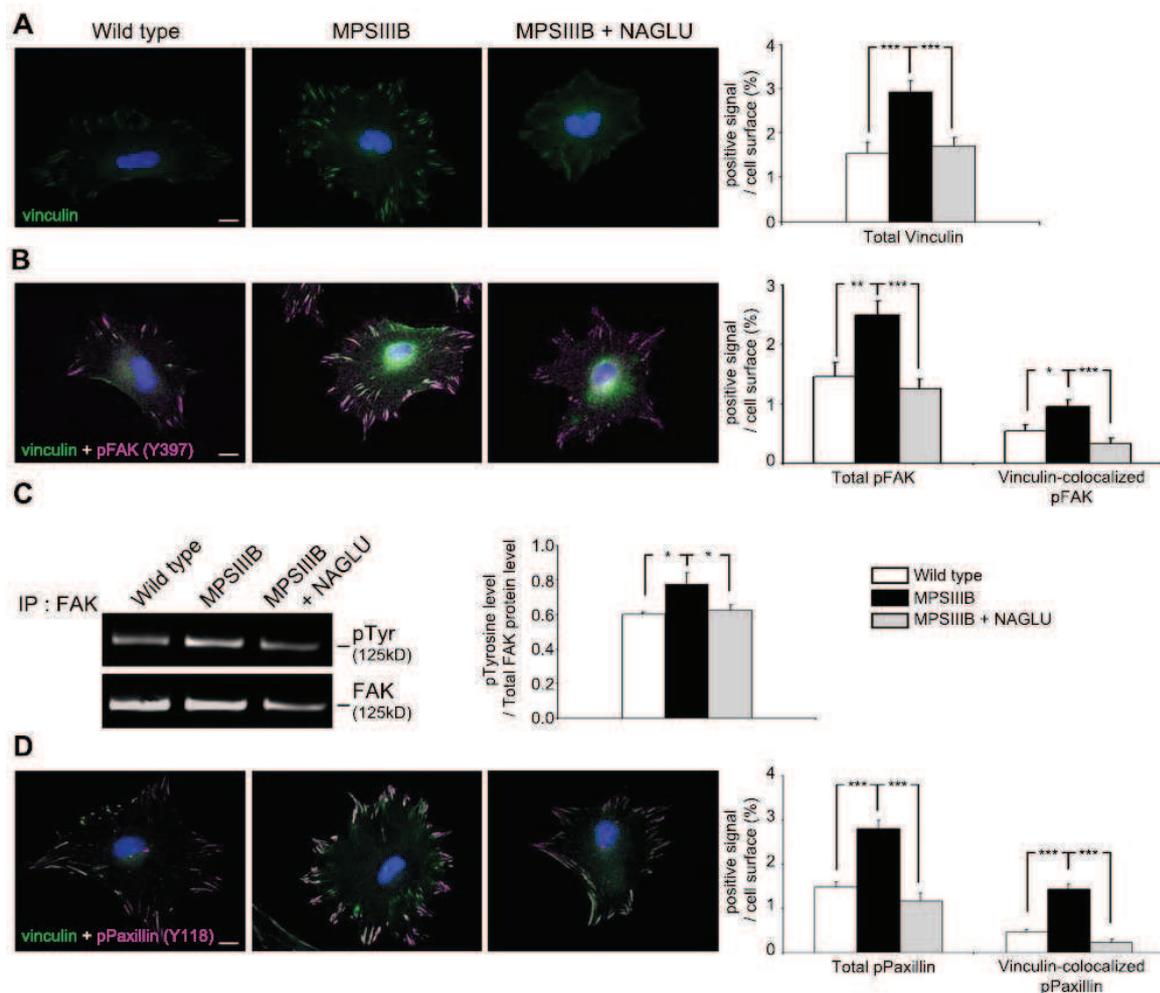


Figure 2. Focal adhesion contacts are more abundant in MPSIIIIB astrocytes.

Mouse astrocytes were prepared as for figure 1 and immunolabeled. Panel A: antibodies against vinculin (in green). Panel B: antibodies against vinculin combined with antibodies against FAK phosphorylated on tyrosine 397 (in purple). Panel C: total protein extracts were processed for immunoprecipitation of FAK and subsequent immunodetection of phosphorylated tyrosines (pTyr) by western blot. Histograms show intensity of 125kD tyrosine-phosphorylated protein signal relative to total FAK signals. Panel D: antibodies against vinculin combined with antibodies against paxillin phosphorylated on tyrosine 118 (in purple). Nuclei were counterstained in blue. Single labeling is shown in supplemental Figure S1. Apotome sections, scale bars: 10 μ m. Histograms indicate fluorescence signal intensities relative to cell surface. Data are from 3 independent astrocyte cultures, values are means \pm SEM, *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001, Student's t-test (A, B and D, n \geq 60 cells per condition), Mann-Whitney test (C, n=3).

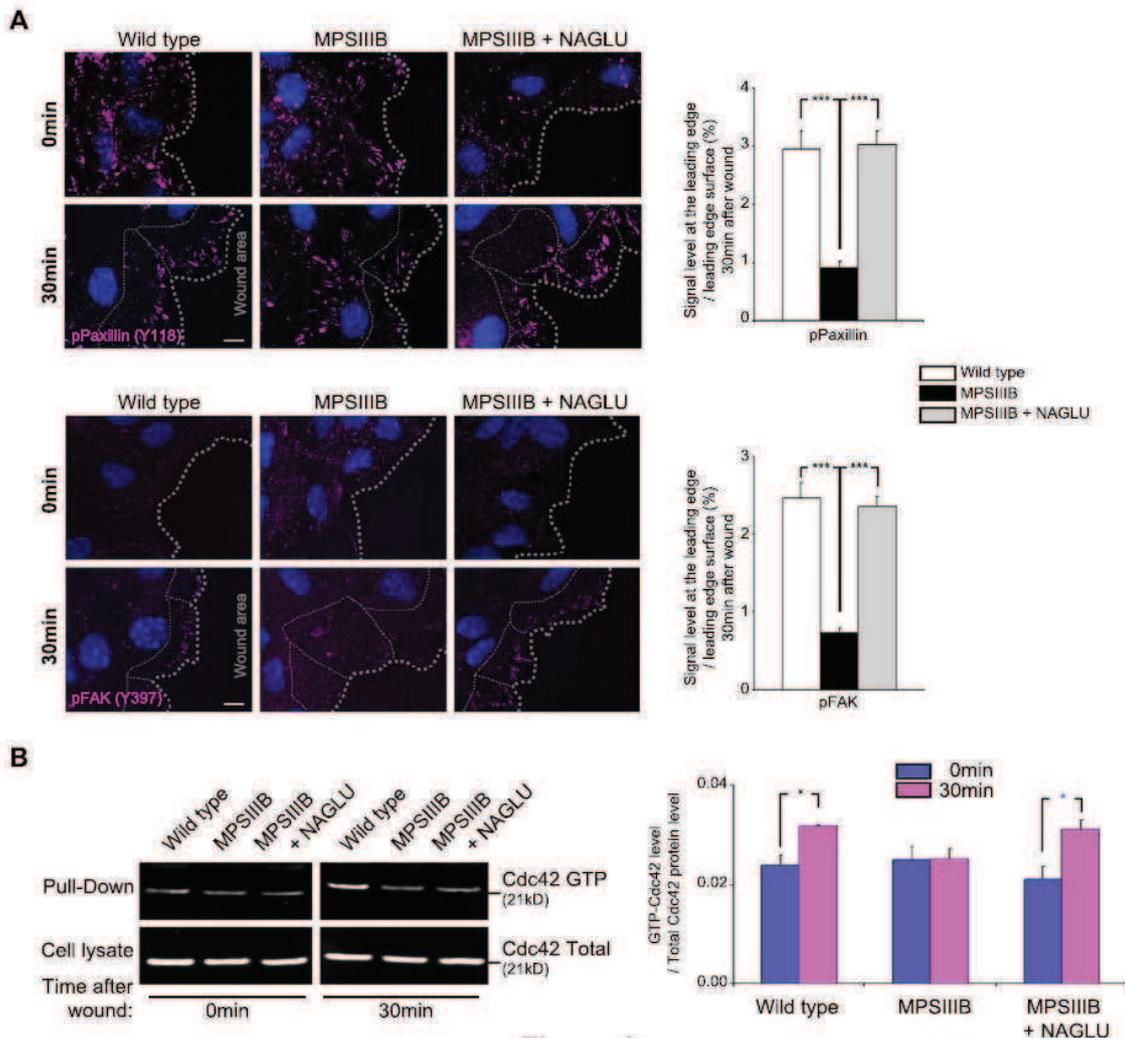


Figure 3 Integrin signaling is defective in migrating MPSIIIB astrocytes

Astrocyte monolayers were scratched and fixed immediately (0 min), or after 30 min. Panel A: cells were immunostained (in purple) for paxillin phosphorylated on tyrosine 118 (upper panel), or FAK phosphorylated on tyrosine 397 (lower panel). Nuclei were counterstained in blue. Apotome sections, scale bars: 10 μ m. Large grey dotted lines indicate the wound edge and thin dotted lines delineate the cell leading edge area in which immunofluorescence signal intensities were measured. Signal intensities relative to scored surface 30 min after scratch are shown in histograms. Panel B: total protein extracts were prepared immediately (0 min), or 30 min after scratch. Cdc42 was detected by western blot in total protein extracts, or after pull-down of the GTP-bound active form of Cdc42. Data are from 3 independent astrocyte cultures, values are means \pm SEM, *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001, Student's t-test (A, n \geq 70 cells per condition), Mann-Whitney test (B, n=3).

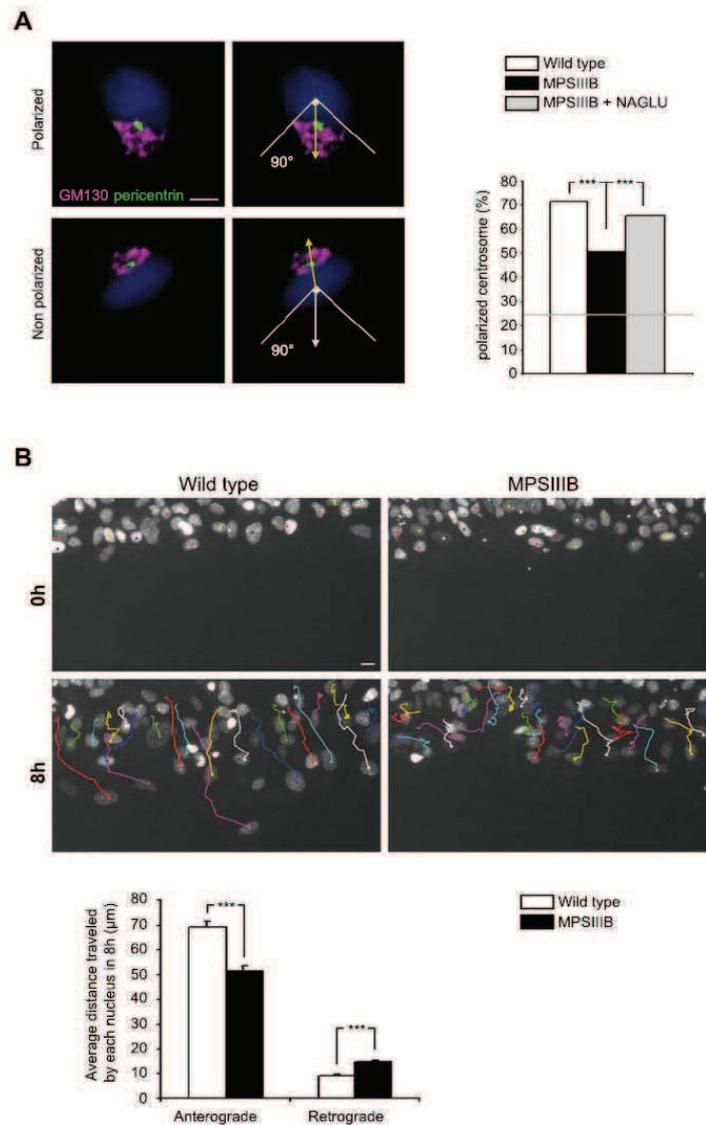


Figure 4. Centrosome polarization and migration defects in MPSIIIIB astrocytes

Astrocytes were seeded at high density in a plate containing a silicone insert. Insert removal creates an open space for colonization by migrating cells. Panel A: the expected direction of migration (toward the open space) is indicated by white arrows. The observed direction of migration was determined after eight hours of migration according to the relative position of the centrosome (pericentrin, in green), the Golgi (GM130 in purple), and the nucleus (in blue), and indicated as yellow arrows. Histogram indicates the proportion of polarized cells in which the observed direction of migration was inside a 90° quadrant centered on the nucleus and facing the open space. Panel B: migration was observed for 8 hours by time-lapse microscopy. Nuclei (stained with Hoechst) bordering the open space were pointed immediately after insert removal (0h) and tracked with the ImageJ software. Colored lines represent individual nucleus trajectories. Histogram shows mean anterograde and retrograde distances traveled within 8 hours. Scale bars: 10μm. Values are means ± SEM of three independent astrocyte cultures. ***: P<0.001, Chi-square test (A, n≥500 cells per condition), Student's t-test (B, n≥180 cells per condition).

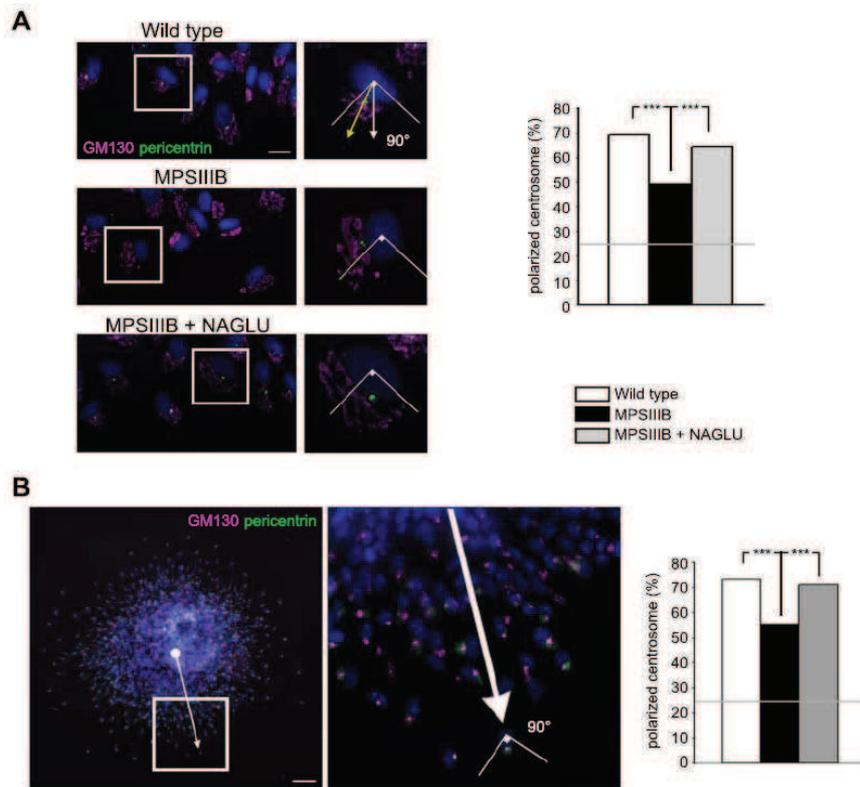


Figure 5. Centrosome polarization defects in human MPSIIIB fibroblasts and in MPSIIIB neural stem cells

Panel A: expected (white arrow) and observed (yellow arrow) migration directions of human fibroblasts were determined as described for astrocytes in figure 4. Panel B: mouse neural stem cells grown as free floating neurosphere aggregates were seeded onto laminin substrate. Adherent cells migrated in a centrifugal manner, the expected direction of migration. Cells were fixed after 3 hours and immunostained for the centrosomal protein pericentrin (in green) and the cis-Golgi marker GM130 (in purple). Nuclei were stained in blue. The observed direction of migration was determined according to the respective position of the centrosome, the Golgi and the nucleus. The proportion of cells in which the observed direction of migration was in a 90° quadrant centered on nucleus and facing the expected direction of migration was scored. Scale bars: 10µm. Values are means of total cell number of three independent cultures of patient fibroblasts, and three independent cultures of neurospheres. ***P<0.001, Chi-square test (n≥500 cells per condition).

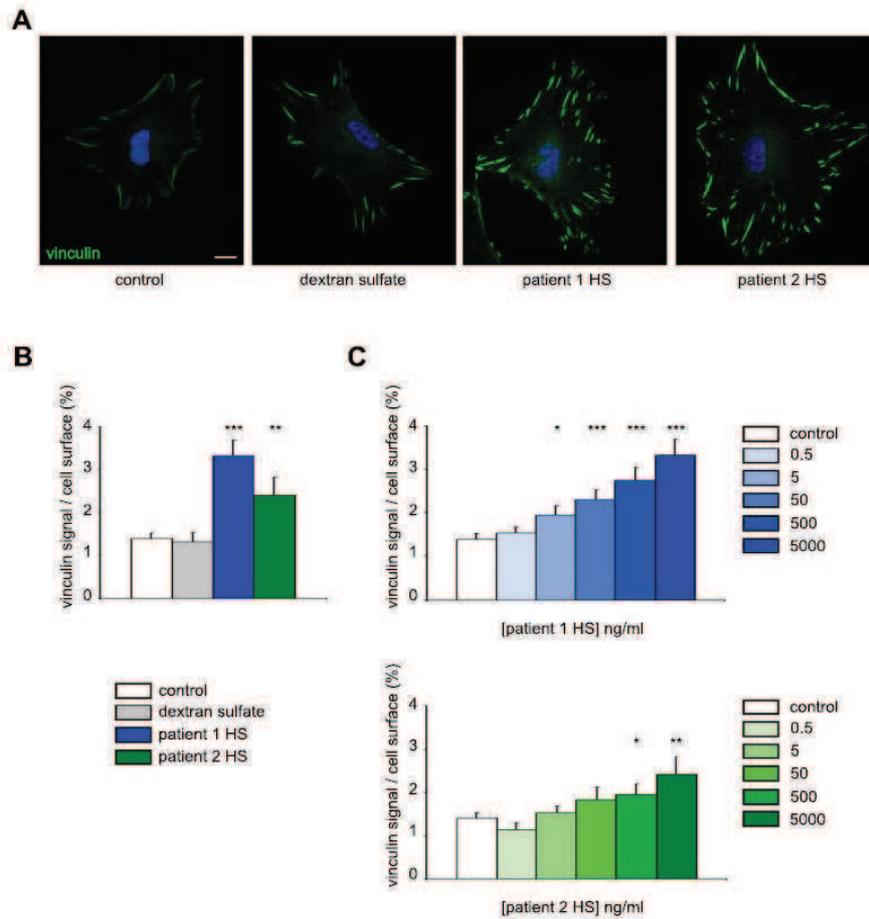


Figure 6. Induction of focal adhesion contacts by extracellular HS derived from MPSIIIB patients

Wild type mouse astrocytes were seeded at low density for 23 hours. Panel A: cells were either untreated (control), or incubated for one hour with dextran sulfate (5 μ g/ml), or heparan sulfate saccharides purified from MPSIIIB patient urines (patient 1 HS and patient 2 HS, 5 μ g/ml) before fixation and immunodetection of vinculin (in green). Panel B: histograms show the quantification of vinculin signal relative to cell surface. Panel C: cells were incubated with increasing concentrations of HS saccharides purified from MPSIIIB patient urine (patient 1 HS and patient 2 HS, 0.5 ng/ml to 5 μ g/ml). Histograms show vinculin signal relative to cell surface. Apotome sections, scale bars: 10 μ m. Values are means \pm SEM of three independent astrocyte cultures. *: P<0.05, **: P<0.01 and ***: P<0.001 as compared to control, Student's t-test (n \ge 60 cells per condition).

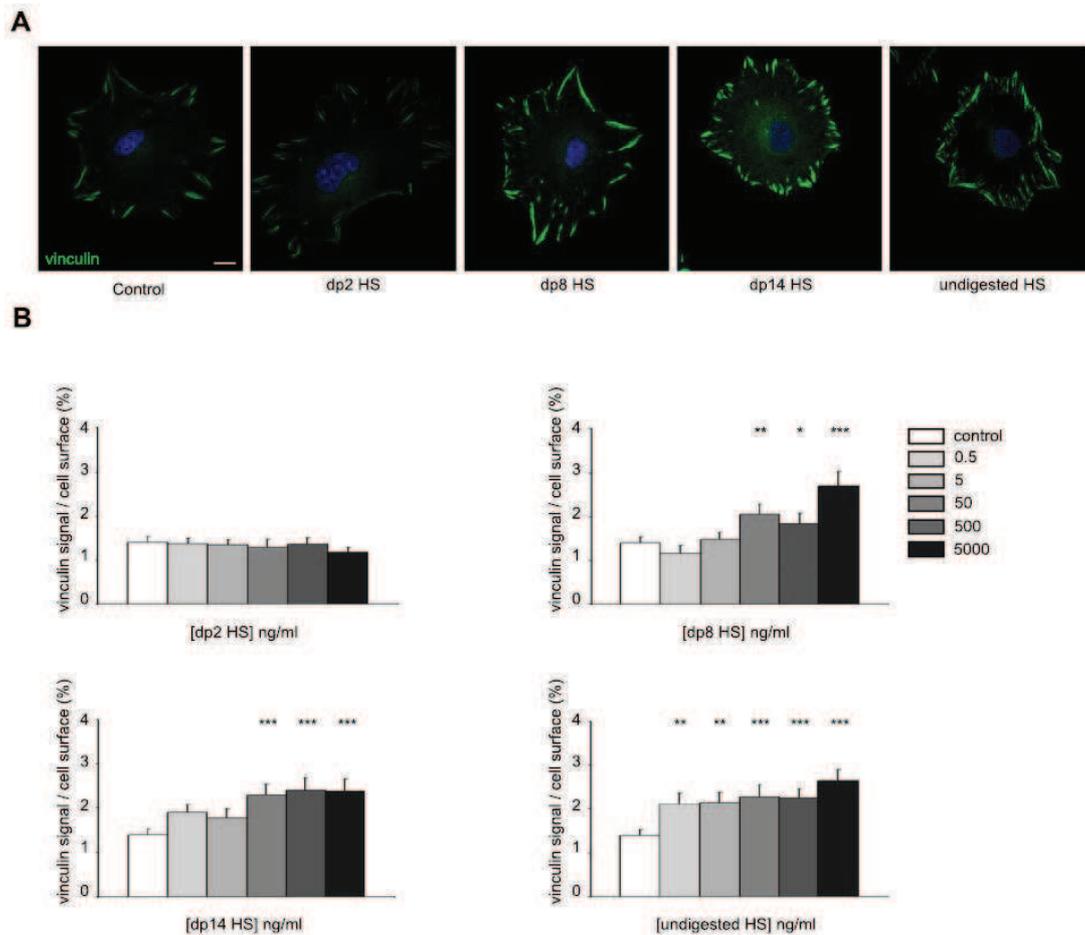


Figure 7. Induction of focal adhesion contacts by extracellular commercial HS

Wild type mouse astrocytes were seeded at low density for 23 hours. Panel A: cells were either untreated (control), or incubated for one hour with undigested and non-fractionated commercial porcine HS (undigested HS, 5 μ g/ml), or size-purified disaccharides (dp2, 5 μ g/ml), octasaccharides (dp8, 5 μ g/ml), or tetradecasaccharides (dp14, 5 μ g/ml) generated by heparinase III digestion of commercial porcine HS followed by chromatography purification. Cells were then fixed for immunodetection of vinculin (in green). Panel B: cells were incubated with increasing concentrations (0.5ng/ml to 5 μ g/ml) of dp2, dp8, dp14, or undigested and non-fractionated commercial porcine HS. Histograms show vinculin signal relative to cell surface. Apotome sections, scale bar: 10 μ m. Values are means \pm SEM of three independent astrocyte cultures. *: P<0.05, **: P<0.01 and ***: P<0.001 as compared to control, Student's t-test (n \geq 60 cells per condition).

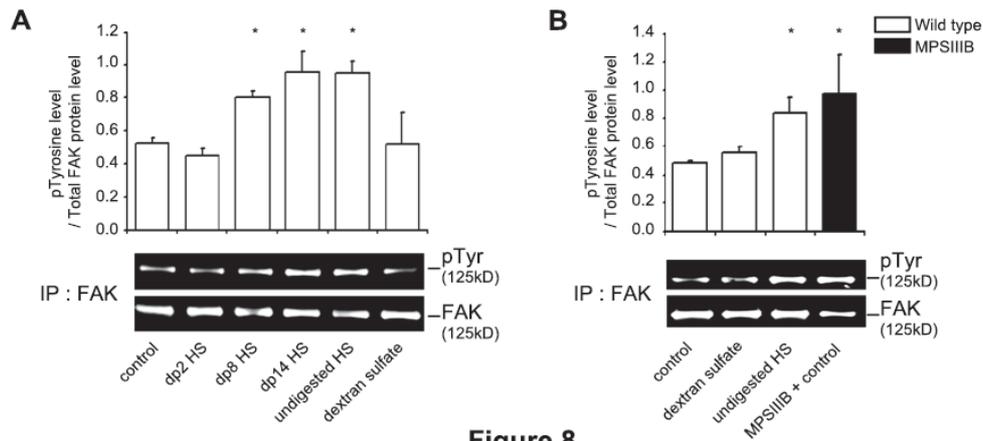
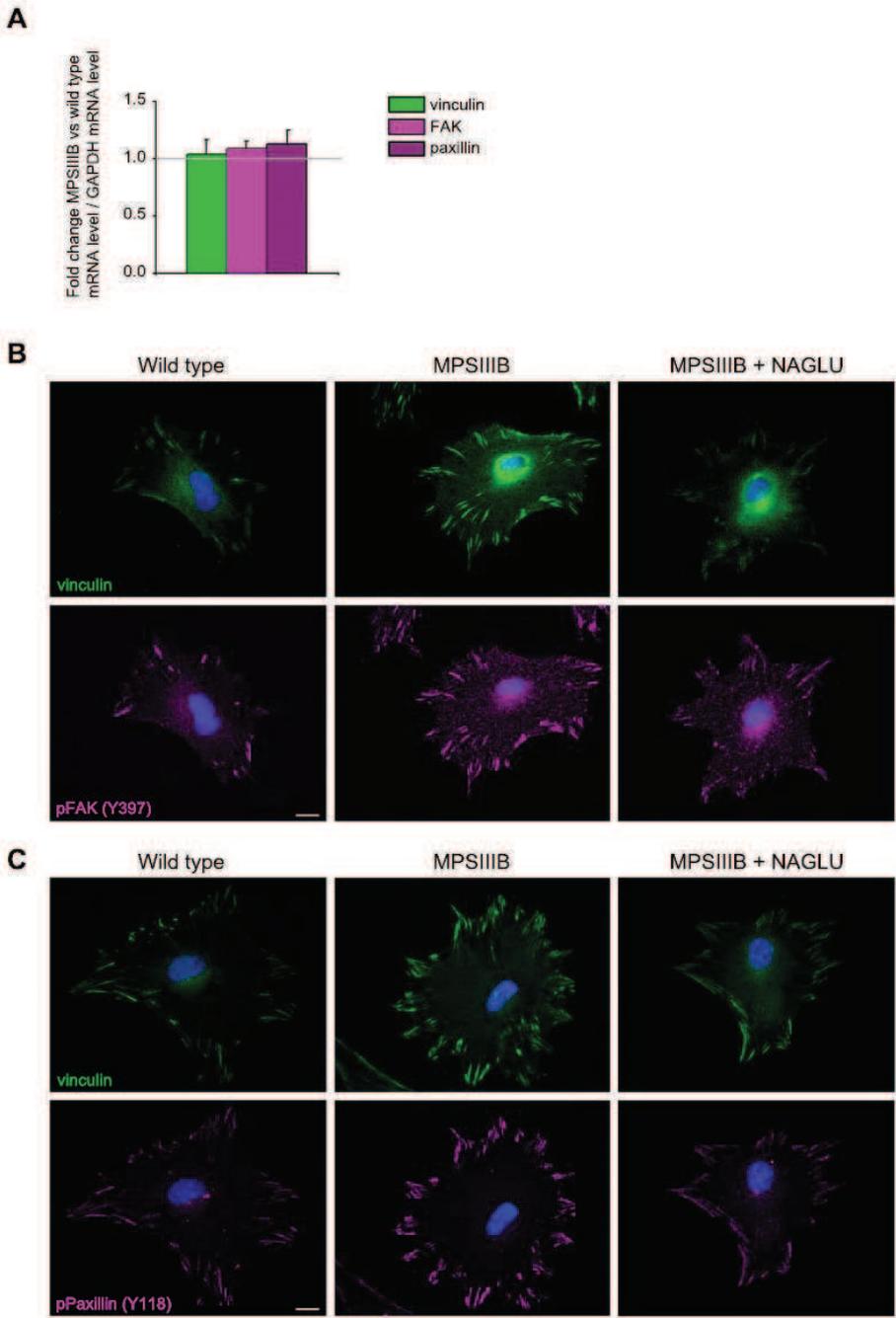


Figure 8

Figure 8. Activation of FAK phosphorylation by exogenous HS in mouse astrocytes and in human neuronal precursors

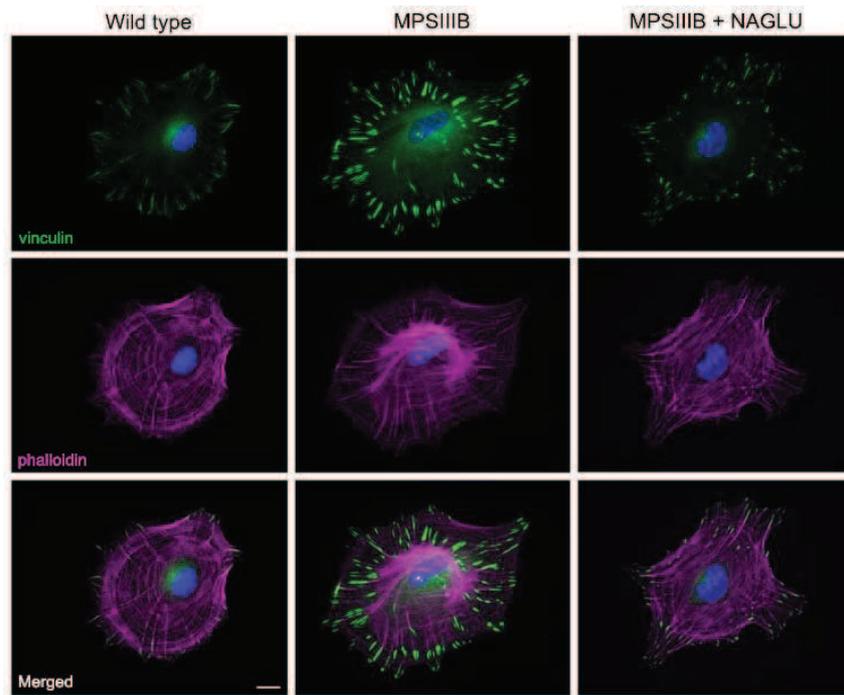
Pane A: mouse astrocytes were either untreated (control), or incubated for one hour with dextran sulfate (10µg/ml), or undigested and non-fractionated commercial porcine HS (undigested HS, 10µg/ml), or size-purified disaccharides (dp2 HS, 10µg/ml), octasaccharides (dp8 HS, 10µg/ml), or tetradecasaccharides (dp14 HS, 10µg/ml). Total protein extracts were processed for immunoprecipitation of FAK and subsequent immunodetection of phosphorylated tyrosines (pTyr) by western blot. Histograms show intensity of 125kD tyrosine-phosphorylated protein signal relative to total FAK signal. Panel B: human neural progenitor cultures were generated from iPS cells derived from a normal individual (wild type), or from patients with MPSIII B (MPSIII B). Normal cells were either untreated (control), or incubated for one hour with dextran sulfate (10µg/ml), or undigested and non-fractionated commercial porcine HS (undigested HS, 10µg/ml). Total protein extracts were processed for immunoprecipitation of FAK and subsequent immunodetection of phosphorylated tyrosines (pTyr) by western blot. Histograms show intensity of 125kD tyrosine-phosphorylated protein signal relative to total FAK signals. Values are means ± SEM of three independent cultures. *: P<0.05, **: P<0.01 and ***: P<0.001, Mann-Whitney test (A, n=3; B n=4).

Supplemental data



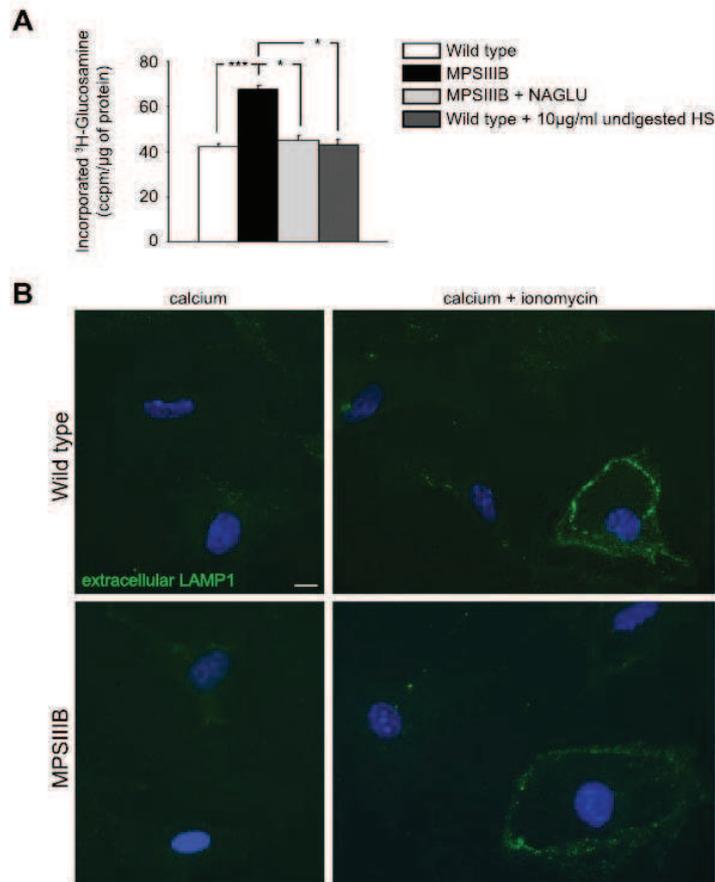
Supplemental Figure S1. Supplement to Figure 2.

Astrocyte cultures were established from wild type or MPSIIIIB mice. Panel A: mRNA levels of FAK, Paxillin and Vinculin detected by quantitative RT-PCR and normalized according to GAPDH mRNA levels. Mouse astrocytes were prepared as for figures 1 and 2 and immunolabeled. Panel B: single staining of cells doubly labeled with antibodies against vinculin (in green) and paxillin phosphorylated on tyrosine 118 (in purple). Panel C: single staining of cells doubly labeled with antibodies against vinculin (in green) and FAK phosphorylated on tyrosine 397 (in purple). Apotome sections, scale bars: 10µm.



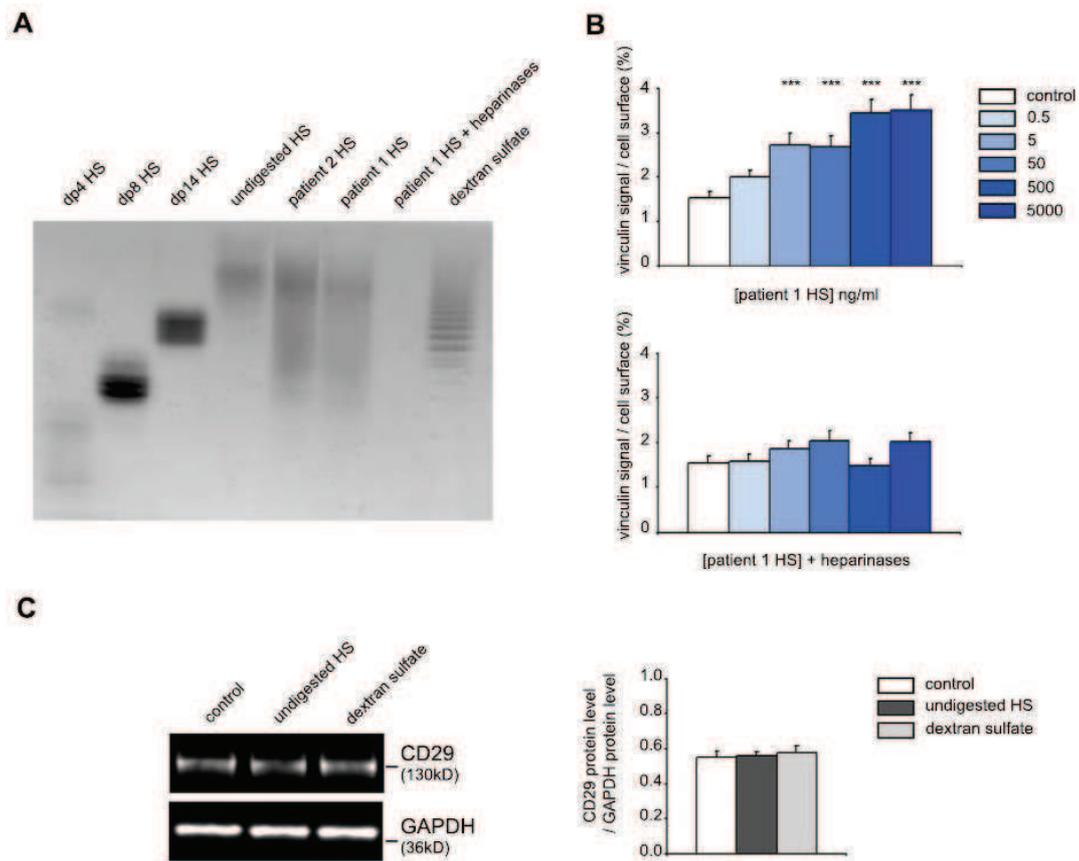
Supplemental Figure S2. Actin organization.

Astrocytes, prepared as for figures 1 and 2, were doubly labeled with antibodies against vinculin (in green) and with fluorescent TRITC-phalloidin (in purple). Nuclei were counterstained in blue. Apotome sections, scale bar: 10 μ m.



Supplemental Figure S3. Glycosaminoglycan storage and exocytosis

Panel A: Glycosaminoglycan storage. Wild type mouse astrocytes (wild type), MPSIIIIB mouse astrocytes (MPSIIIIB), or MPSIIIIB mouse astrocytes exposed to lentivirus vectors to induce the expression of NAGLU (MPSIIIIB+NAGLU) were grown for 72h in the presence of ³H-glucosamine, then washed and pelleted. Wild type mouse astrocytes grown for 72h in the presence of ³H-glucosamine were incubated for 1h in the presence of undigested and non-fractionated commercial porcine HS (10μg/ml, wild type + 10μg/ml undigested HS) were similarly washed and pelleted. Radioactivity measured in cell pellets was normalized according to protein content. Histogram shows equivalent radioactivity levels in wild type astrocytes, MPSIIIIB astrocytes producing NAGLU and wild type astrocytes incubated with HS, indicating that glycosaminoglycans did not accumulate in these cells. In contrast, higher radioactivity level in MPSIIIIB astrocytes indicates glycosaminoglycan storage in cell pellets. Data are from 3 independent astrocyte cultures, values are means ± SEM, *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001, Mann-Whitney test (n=3). Panel B: Exocytosis. Mouse astrocytes were exposed to 8mM calcium alone or in combination with 2.5μM ionomycin to stimulate lysosomal exocytosis, then stained with anti-LAMP1 antibodies and fixed. Lysosomal exocytosis stimulation resulted in increased cell surface LAMP1 signal in both control and MPSIIIIB astrocytes, indicating efficient exocytosis in affected cells. Nuclei were counterstained in blue. Apotome sections, scale bars: 10μm.



Supplemental Figure S4. Analysis of HS saccharide by PAGE, heparinase digestion and CD29 expression

Panel A: PAGE analysis. Commercial porcine HS were either undigested (undigested HS), or digested by heparinase III and fractionated according to size to obtain pure preparations of tetrasaccharides (dp4), octasaccharides (dp8) and tetradecasaccharides (dp14). HS saccharides were purified from the urines of two patients with MPSIIIB (patient 1 HS and patient 2 HS) and either not treated or treated with heparinases (patient 1 HS + heparinases). HS preparations and dextran sulfate were separated in a 30% PAGE electrophoresis. Staining of the gel with Azure A revealed well-defined bands for dp8 and dp14. dp4 consisted in two bands presumably resulting from different sulfated saccharide species. Undigested HS show a predominant high molecular weight band, with trace amounts of lower molecular weight species. HS from patient 1 and 2 show high molecular weight signals associated with a smear indicating the presence of abundant amounts of low molecular weight materials of different sizes down to dp8. Absence of signal after heparinase treatment indicates nearly complete degradation of HS saccharides. Panel B: Wild type mouse astrocytes were incubated for 1h with increasing concentrations of HS saccharides purified from patient urine (0.5ng/ml to 5µg/ml), which were either previously digested with heparinases or untreated (similar to data shown in figure 8, except that samples were incubated overnight at 37°C in heparinase buffer). Cells were fixed and immunostained for vinculin to reveal FA. Histograms show that FA were not activated when HS saccharides had been previously digested by heparinases. Panel C: Wild type mouse astrocytes were

untreated (control), or incubated for one hour with dextran sulfate (10 μ g/ml), or undigested and non-fractionated commercial porcine HS (undigested HS, 10 μ g/ml). Western blot of total protein extracts revealed with anti- β 1-integrin (anti-CD29 clone 18, 130kD) and anti-GAPDH (36kD) antibodies. The histogram shows the relative intensity of CD29 versus GAPDH signals. Data are from 3 independent astrocyte cultures, values are means \pm SEM, *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001, Student's t-test (B, n \geq 60 scored cells per condition) and Mann-Whitney test (C, n=3).

SUPPLEMENTAL MATERIEL AND METHODS

Heparinase treatment of patient HS

200µl (10µg) of patient 1 HS saccharides were completely digested using a mixture of heparinase I (5mIU), II (1mIU), and III (1mIU) diluted in heparinase solution (20mM Tris-HCl containing 0.1mg/mL bovine serum albumin (BSA) and 4mM CaCl₂, pH 7.0) at 37°C overnight. This step was repeated at 25°C overnight. Undigested control HS saccharides were incubated at 37°C overnight and at 25° overnight in enzyme buffer. The reaction was terminated, through enzyme denaturation, by heating the sample for 5 min at 100 °C. Heparinase digestion was analyzed using PAGE

HS PAGE

Glycosaminoglycan samples were electrophoresed on 30% polyacrylamide gels. Oligosaccharide samples (40 µl), containing 1.5 µg UA, and marker samples dp4 (18µg), dp8 (6µg) and dp14 (3µg) were combined with 10% glycerol and trace amounts of phenol red and bromphenol blue. Electrophoresis was performed at 30 mA until the phenol red dye front was 1 cm from the bottom of the gel. Oligosaccharides within the resolving gel were stained with Azure A (Sigma).

NAGLU enzyme assays

To determine NAGLU enzymatic activity, cells were lysated in water, submitted to 10 freeze thaw cycles, and clarified by centrifugation. Samples were diluted to a total protein concentration (determined with a Bradford protein assay kit) of 2 mg/ml, and the enzyme assay for NAGLU was carried out as previously described (Marsh and Fensom, 1985) using 4-methylumbelliferyl-N-acetyl- α -D-glucosaminide (4MU) (Merck, Nottingham, UK) as fluorogenic substrate. Hydrolysis of 1 nmol of substrate per hour per milligram of protein was defined as one catalytic unit.

Glycosaminoglycan analysis

For metabolic labeling, cells were incubated 72h before harvesting with 10 µCi/ml [3H]-glucosamine (Perkin Elmer, Waltham, MA) in medium containing 2% FBS. The cells were collected, washed with DPBS, resuspended in water and lysed using freeze thaw cycles. An aliquot was taken out for determination of the protein concentration using a Bradford protein assay kit. Lipids were extracted by addition of chloroform and methanol (chloroform-methanol-water 4:8:3, v/v/v). After a 10-min incubation at room temperature, the GAG pellet was recovered by centrifugation (1000g for 10 min) and the supernatant removed. The pellet was washed with acetone, dried, and subjected to proteolysis overnight at 65°C with 1 mg/ml papain (Sigma) in 100 mM Sodium Acetate buffer containing 5 mM EDTA and 5 mM cysteine (pH 5.5). The incorporation of [3H]-glucosamine into GAGs was measured by liquid scintillation counting.

Exocytosis

Astrocytes were seeded at high density onto coverslips coated with poly-ornithine(1.5 µg/ml) and laminin (5 µg/ml). After 24 hours, cells were washed with extracellular buffer (2.6M NaCl, 0.5M KCl, 0.1M MgCl₂, 1.8mg/ml D-glucose, 1M Hepes, 2% FCS) and incubated for 30 seconds at 37°C with the same extracellular buffer supplemented with 8mM CaCl₂ and/or 1µM ionomycin. Coverslips were then transferred on ice and washed with cold DPBS before incubation for 30 minutes at 4°C with anti-LAMP1 antibodies diluted in DPBS 1% horse serum. After 3 washes with DPBS, cells were fixed with 2% PFA, re-washed 3 times with DPBS and incubated for 1 hour at room temperature with AlexaFluor488®-conjugated secondary antibodies and Hoechst dye. Coverslips were mounted on FluoromountG.

**Partie II. Les saccharides d'HS affectent la neuritogenèse des neurones corticaux
MPSIIIB**

GAP43 Overexpression and Enhanced Neurite Outgrowth in Mucopolysaccharidosis Type IIIB Cortical Neuron Cultures

Michaël Hocquemiller,¹ Sandrine Vitry,¹ Stéphanie Bigou,² Julie Bruyère,¹ Jérôme Ausseil,¹ and Jean Michel Heard^{1*}

¹Unité Rétrovirus et Transfert Génétique, INSERM U622, Department of Neuroscience, Institut Pasteur, Paris, France

²Service de Neurologie Pédiatrique, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique/Hôpitaux de Paris, INSERM U802, le Kremlin-Bicêtre, France

Behavioral manifestations mark the onset of disease expression in children with mucopolysaccharidosis type III (MPSIII, Sanfilippo syndrome), a genetic disorder resulting from interruption of the lysosomal degradation of heparan sulfate. In the mouse model of MPSIII type B (MPSIIIB), cortical neuron pathology and dysfunction occur several months before neuronal loss and are primarily cell autonomous. The gene coding for GAP43, a neurite growth potentiator, is overexpressed in the MPSIIIB mouse cortex, and neurite dystrophy was reported in other types of lysosomal storage diseases. We therefore examined the development of the neuritic trees in pure populations of MPSIIIB mouse embryo cortical neurons grown for up to 12 days in primary culture. Dynamic observation of living neurons and quantification of neurite growth parameters indicated more frequent neurite elongation and branching and less frequent neurite retraction, resulting in a relative overgrowth of MPSIIIB neuron neuritic trees, involving both dendrites and axons, compared with normal controls. Neurite overgrowth was concomitant with more than twofold increased expression of GAP43 mRNAs and proteins. Correction of the genetic defect leads to expression of the missing lysosomal enzyme, normal GAP43 mRNA expression, and reduced neurite outgrowth. These results indicate that heparan sulfate oligosaccharide storage modifies GAP43 expression in MPSIIIB cortical neurons with potential consequences for neurite development and neuronal functions that may be relevant to clinical manifestations. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

Key words: cortical neuron culture; neuritogenesis; lysosomal storage disease; Sanfilippo syndrome; oligosaccharides

During development, each neuron has to establish the correct connections with its targets by sending out axons and dendrites to form synapses to set up a func-

tional nervous system. Maintenance of functional neuronal circuits involves plasticity in their connectivity to allow for growth, learning, and memory. Neurite outgrowth can be initiated by binding neurotrophic ligand to its receptor, resulting in the cascade of signal transduction events that coordinates adequate changes in cellular cytoskeletal component organization and membrane trafficking for elongation. Regulation of neurite pruning by retraction or degeneration is also an important aspect of neuronal plasticity. Neurons often have exuberant neurites, making more connections than are finally retained. A refinement process is then activated to remove these exuberant processes. Many neurodegenerative diseases, including Alzheimer's and Parkinson's diseases, exhibit axonal and dendritic dystrophies related to cytoskeletal alteration and/or protein aggregation (Galvin et al., 1999; Grace et al., 2002; Brendza et al., 2005; Cai et al., 2006).

Lysosomal storage diseases (LSDs) are inherited diseases characterized by intralysosomal accumulation of nonmetabolized macromolecules (Neufeld and Muenzer, 2001). Most involve pathology in the brain and cause severe mental retardation in young children. Acquisition of walking and language occurs with minimal or no delay but is subsequently followed by limited progress

Contract grant sponsor: Association Française contre les Myopathies and Agence Nationale de la Recherche; Contract grant number: 08-MNP-023; Contract grant sponsor: Vaincre les Maladies Lysosomales (to M.H.); Contract grant sponsor: Caisse Nationale du Régime Social des Indépendants (to M.H.); Contract grant sponsor: Pasteur Weizmann Council (to M.H.).

*Correspondence to: Jean Michel Heard, Unité Rétrovirus et Transfert Génétique, INSERM U622, Département Neuroscience, Institut Pasteur 28 rue du Dr. Roux, 75015 Paris, France. E-mail: jmheard@pasteur.fr

Received 25 March 2009; Revised 14 May 2009; Accepted 10 June 2009

Published online 5 August 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.22190

Droits d'auteur réservés

Partie III. Nature des vésicules distendues des neurones corticaux MPSIIIB

Molecular Pathogenesis of Genetic and Inherited Diseases

Storage Vesicles in Neurons Are Related to Golgi Complex Alterations in Mucopolysaccharidosis IIIB

Sandrine Vitry,^{*†} Julie Bruyère,^{*†}
Michaël Hocquemiller,^{*†} Stéphanie Bigou,^{*†}
Jérôme Ausseil,^{*†} Marie-Anne Colle,[‡]
Marie-Christine Prévost,[§] and Jean Michel Heard^{*†}

From the Unité Rétrovirus et Transfert Génétique, Department of Neuroscience,^{*} Institut Pasteur, INSERM U622,[†] Institut Pasteur, UMR INRA 703,[‡] Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, and Plate-Forme de Microscopie ultrastructurale,[§] Imagopole, Institut Pasteur, Paris, France

The accumulation of intracellular storage vesicles is a hallmark of lysosomal storage diseases. Neither the identity nor origin of these implicated storage vesicles have yet been established. The vesicles are often considered as lysosomes, endosomes, and/or autophagosomes that are engorged with undigested materials. Our studies in the mouse model of mucopolysaccharidosis type IIIB, a lysosomal storage disease that induces neurodegeneration, showed that large storage vesicles in cortical neurons did not receive material from either the endocytic or autophagy pathway, which functioned normally. Storage vesicles expressed GM130, a Golgi matrix protein, which mediates vesicle tethering in both pre- and cis-Golgi compartments. However, other components of the tethering/fusion complex were not associated with GM130 on storage vesicles, likely accounting for both the resistance of the vesicles to brefeldin A and the alteration of Golgi ribbon architecture, which comprised distended cisterna connected to LAMP1-positive storage vesicles. We propose that alteration in the GM130-mediated control of vesicle trafficking in pre-Golgi and Golgi compartments affects Golgi biogenesis and gives rise to a dead-end storage compartment. Vesicle accumulation, Golgi disorganization, and alterations of other GM130 functions may account for neuron dysfunction and death. (*Am J Pathol* 2010, 177:2984–2999; DOI: 10.2353/ajpath.2010.100447)

Lysosomal storage disorders (LSDs) represent the most common cause of neurodegeneration in pre-adulthood.

In these inherited metabolic diseases, a biochemical disorder interrupts the degradation of macromolecules in lysosomes or the recycling of degradation products. This primary defect triggers cascades of intricate events, which frequently results in neuronal dysfunction and death. A hallmark of LSD pathology is the intracellular accumulation of storage vesicles with characteristics of lysosomes. They predominate in specific cell types depending on the disease. Observations in animal models show progressively increasing numbers and size of storage vesicles with age in affected tissues, which is evocative of a slow and irreversible process.

Storage vesicles in cells with LSDs are commonly identified as crippled lysosomes engorged with undigested material resulting from the genetic defect.¹ The activation of a genetic program controlling lysosome proliferation could compensate deficient lysosomal functions.² Storage vesicles are however not normal lysosomes and might be distinct from lysosomes. Whereas lysosomes are usually small, highly dynamic, and contain homogeneous dense material, storage vesicles are large, polymorphic, poorly mobile,³ and contain highly heterogeneous materials, frequently consisting of internal vesicles and membranes. These morphological features are reminiscent of multivesicular bodies (MVBs), which could accumulate due to impaired capacity for lysosomal degradation. Activation of macroautophagy, or impairment of autophagosomal-lysosomal fusion, or a combination of both, were reported in several LSDs.^{4–9} Activation and/or interruption of the macroautophagy flux can increase the number and size of autophagosomes, leading to imbalance between production and elimination, and subsequent accumulation. It is therefore conceivable that storage vesicles are MVBs, autophagosomes, a combination of both, or amphisomes resulting from merging of these

Supported by Agence Nationale de la Recherche (grant ANR-08-MNP-023) and the Conny-Maeva Foundation.

Accepted for publication August 5, 2010.

Supplemental material for this article can be found on <http://ajp.amjpathol.org>.

Address reprint requests to Jean Michel Heard, M.D., Ph.D., Unité Rétrovirus et Transfert Génétique, INSERM U622, Department of Neuroscience, Institut Pasteur 28 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France. E-mail: jmheard@pasteur.fr.

Droits d'auteur réservés

Partie IV. Nature des vésicules distendues et phénotypes golgiens dans des cellules humaines déficientes en NAGLU

GM130 gain-of-function induces cell pathology in a model of lysosomal storage disease

Elise Roy, Julie Bruyère, Patricia Flamant, Stéphanie Bigou, Jérôme Ausseil, Sandrine Vitry and Jean Michel Heard*

Unité Rétrovirus et Transfert Génétique, INSERM U622, Department of Neuroscience, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris, France

Received October 11, 2011; Revised and Accepted December 6, 2011

Cell pathology in lysosomal storage diseases is characterized by the formation of distended vacuoles with characteristics of lysosomes. Our previous studies in mucopolysaccharidosis type IIIB (MPSIIIB), a disease in which a genetic defect induces the accumulation of undigested heparan sulfate (HS) fragments, led to the hypothesis that abnormal lysosome formation was related to events occurring at the Golgi level. We reproduced the enzyme defect of MPSIIIB in HeLa cells using tetracycline-inducible expression of shRNAs directed against α -N-acetylglucosaminidase (NAGLU) and addressed this hypothesis. HeLa cells deprived of NAGLU accumulated abnormal lysosomes. The Golgi matrix protein GM130 was over-expressed. The cis- and medial-Golgi compartments were distended, elongated and formed circularized ribbons. The Golgi microtubule network was enlarged with increased amounts of AKAP450, a partner of GM130 controlling this network. GM130 down-regulation prevented pathology in HeLa cells deprived of NAGLU, whereas GM130 over-expression in control HeLa cells mimicked the pathology of deprived cells. We concluded that abnormal lysosomes forming in cells accumulating HS fragments were the consequence of GM130 gain-of-function and subsequent alterations of the Golgi ribbon architecture. These results indicate that GM130 functions are modulated by HS glycosaminoglycans and therefore possibly controlled by extracellular cues.

INTRODUCTION

Lysosomal storage diseases (LSDs) are genetic defects affecting the catalytic activity of lysosomal hydrolases, or co-factors necessary for the function of these enzymes, or lysosomal membrane transporters. They result in the accumulation of incompletely digested macromolecule fragments in cells and their environment. A hallmark of LSDs is the formation of vacuoles that accumulate in the cytosol, the nature of which is unclear. Mucopolysaccharidosis type IIIB (MPSIIIB) is an LSD in which the deficiency of α -N-acetylglucosaminidase (NAGLU) results in the accumulation of undigested heparan sulfate (HS) glycosaminoglycans (1). Affected children suffer progressive and severe mental retardation and die prematurely (1). Vacuoles present in MPSIIIB-affected cells are acidic and possess characteristics of lysosomes, like the presence of the lysosomal-associated membrane protein I (LAMP1) in the limiting membrane and the presence of lysosomal hydrolases in the lumen (2). However, according to their size, deficient mobility

and highly heterogeneous content, these vacuoles are not normal lysosomes. In MPSIIIB mouse cortical neurons, vacuoles are not connected to the endocytic or macroautophagy pathways, which are normally efficient in these cells, and do not possess markers of late endosomes or autophagosomes (2). In contrast to normal lysosomes, the cis-Golgi matrix protein GM130 is present in vacuoles membranes. Abnormal lysosomes are associated with enlarged and disorganized Golgi apparatus, and increased GM130 levels (2). Similar observations were made in affected neurons derived from MPSIIIB patient induced pluripotent stem cells (iPSc) (3). These features are consistent with the hypothesis that abnormal lysosomes accumulating in MPSIIIB cells are caused by events affecting early stages of lysosome biogenesis.

GM130 is a cytosolic coiled-coil protein anchored to Golgi membranes (4). Interactions of GM130 with various partner proteins mediate multiple functions with cardinal roles in cell biology (5). In combination with p115 and GRASP65, GM130 functions as a tethering factor for pre-Golgi carriers

*To whom correspondence should be addressed at: Unité Rétrovirus et Transfert Génétique, INSERM U622, Département de Neuroscience, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France. Tel: +33 145688246; Fax: +33 145688940; Email: jmheard@pasteur.fr

Droits d'auteur réservés

Partie V. Résultats complémentaires

Nous avons vu précédemment que l'appareil de Golgi est partiellement résistant à un traitement par la Bréfeldine A (BFA) dans deux types cellulaires déficients en NAGLU (Roy et al, 2012; Vitry et al, 2010). Comparées à des cellules normales, les cellules déficientes en NAGLU répondent moins vite à un traitement BFA. Ces données indiquent que l'appareil de Golgi des cellules déficientes est stabilisé, et donc moins dynamique. Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle les défauts de polarisation des astrocytes MPSIIIB sont causés par une perte de dynamique de l'appareil de Golgi. Pour cela, les astrocytes en cours de polarisation ont été traités avec une dose de BFA suffisante pour désorganiser l'appareil de Golgi, et donc le réseau de microtubules golgiens. Après rinçage du BFA, les astrocytes migrent dans un milieu de culture normal pendant 6h, puis leur polarisation est quantifiée (Figure 56).

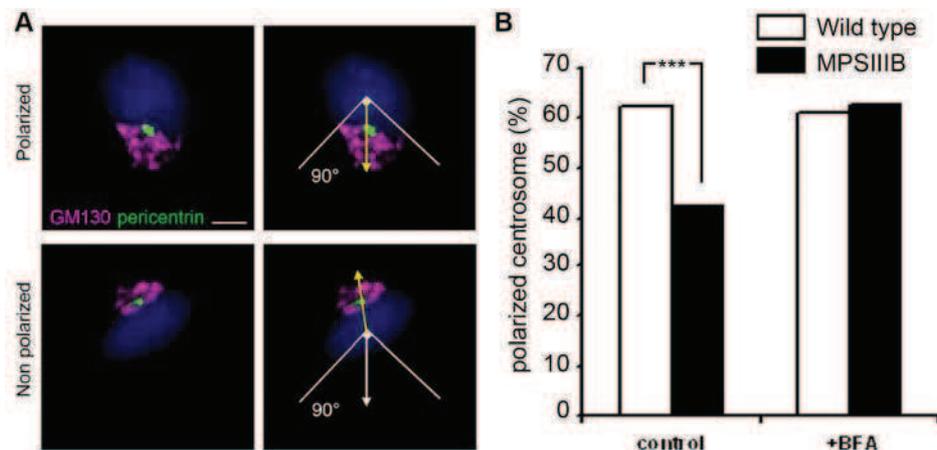


Figure 56 : Polarization defects due to loss of Golgi dynamic in MPSIIIB astrocytes.

Mouse astrocytes were seeded at high density in a plate containing a silicone insert. Insert removal creates an open space for colonization by migrating cells. Immediately after insert removal, cells were treated with 1.25µg/ml of BFA (+BFA) or the vehicle (control) during 30min and then allowed to migrate in astrocyte culture medium. Panel A: the expected direction of migration (toward the open space) is indicated by white arrows. The polarization was determined after six hours of migration according to the relative position of the centrosome (pericentrin, in green), the Golgi (GM130 in purple), and the nucleus (in blue), and indicated as yellow arrows. Panel B: histogram indicates the proportion of polarized cells in which the centrosome was inside a 90° quadrant centered on the nucleus and facing the open space. Scale bars: 10µm. Values are means of three independent astrocyte cultures. ***: P<0.001, Chi-square test (n≥250 cells per condition).

Les données indiquent que le traitement par la BFA restaure la polarisation des astrocytes MPSIIIB. Ce résultat suggère qu'une réorganisation de l'appareil de Golgi est nécessaire pour la polarisation, comme précédemment décrit (Bisel et al, 2008). La perte de dynamique de

l'appareil de Golgi semble donc être une cause des défauts de polarisation des astrocytes MPSIIIB.

Sachant que les astrocyte déficients pour NAGLU activent de façon constitutive la voie de signalisation intégrine/FAK responsable de la stabilisation des microtubules et que les cellules HeLa déficientes pour NAGLU présentent plus de microtubules golgiens acétylés, il semblerait que la stabilisation des microtubules golgiens, et de l'appareil de Golgi en aval de cette signalisation, soit responsable des défauts de polarisation des astrocytes MPSIIIB.

Discussion

1 Activation de la formation des plaques d'adhérence et des voies de signalisation par les héparanes sulfates solubles.

Le rôle des protéoglycanes d'héparanes sulfates est relativement bien connu. En effet, les syndécans agissent comme corécepteurs de nombreux facteurs de croissance et modulent l'interaction cellule-MEC. Le syndécan-4 est particulièrement impliqué dans la formation des plaques d'adhérence. Ce protéoglycane interagit avec les protéines de la MEC via ses chaînes d'HS et active une signalisation via le domaine intracellulaire de son cœur protéique.

Dans l'optique de comprendre le rôle spécifique des chaînes d'HS, des saccharides d'héparanes sulfates ont été purifiés et appliqués dans le milieu extracellulaire des astrocytes murins. Ces saccharides d'HS activent la formation des plaques d'adhérence et la protéine de signalisation FAK. L'action des saccharides d'HS sur l'activation des intégrines, et de la formation des plaques d'adhérence, a été suggérée par des recherches faites sur des fibroblastes de rongeurs (Mahalingam et al, 2007). Dans cette étude, les cellules sont ensemencées sur de fortes quantités de fibronectine capables d'engager l'agrégation et l'activation des intégrines, sans la coopération avec le syndécan-4 (Dubash et al, 2009). Lorsque des saccharides d'HS sont ajoutés dans le milieu de culture, la formation des plaques d'adhérence, déjà activée par la fibronectine concentrée, est inhibée. Cette inhibition peut être la conséquence d'un encombrement stérique, suite à la fixation des saccharides d'HS, soit sur les protéines de fibronectines, soit directement sur les intégrines. Cette action est limitée à des chaînes d'HS supérieure à 14 saccharides. Dans notre système, les astrocytes, ensemencés sur polyornithine, sécrètent elles-mêmes leur matrice à des concentrations physiologiques et n'engagent que très peu de plaques d'adhérence, grâce à la coopération des intégrines et du syndécan-4. Dans ce contexte, l'ajout de saccharides d'HS dans le milieu active la formation de plaques d'adhérence et de FAK. Cet effet est probablement lié au rôle des HS sur la formation de fibrille de fibronectine, la forme active de la protéine (Schwarzbauer & DeSimone, 2011; Stepp et al, 2010). Ces données suggèrent, qu'à faible concentration de fibronectine, les cellules forment leurs plaques d'adhérence en réponse à l'interaction des

intégrines avec des protéines de la matrice et à l'action des saccharides d'HS, probablement ceux présents sur les syndécans-4. Il est envisageable que le même mécanisme soit mis en jeu avec d'autres protéines de la matrice extracellulaire comportant un site de liaison aux héparanes sulfates et un site d'interaction avec les intégrines, notamment les laminines.

Les études ont été menées sur deux types cellulaires différents donc sur des cellules qui n'expriment pas de la même manière les protéines de la matrice et les différentes sous-unités d'intégrine. Il se peut donc qu'un autre mécanisme biologique puisse expliquer l'activation de la formation des plaques d'adhérence par les saccharides d'héparanes sulfates.

Il est intéressant de noter que les chaînes d'HS de plus de 8 saccharides sont capables d'activer la formation des plaques d'adhérence. Plusieurs interactions entre des saccharides d'HS, et des protéines, telles que l'antithrombine ou l'annexine, sont dépendantes d'un minimum de 5 saccharides. Une étude récente a montré que les saccharides d'HS et d'héparine pouvaient interagir *in vitro* avec les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$, si la chaîne d'HS était supérieure à 8 saccharides (Faye et al, 2009). Ces données semblent corroborer l'hypothèse d'une action directe des HS sur l'activation des intégrines à la surface des astrocytes.

2 Les saccharides d'HS extracellulaires dans la MPSIIIB

Les saccharides d'HS accumulés dans les urines de patients MPSIIIB sont également capables d'activer la formation des plaques d'adhérence et la protéine de signalisation FAK des astrocytes en culture. Et les astrocytes MPSIIIB présentent plus de plaques d'adhérence et de forme active de FAK. Ces résultats indiquent que les HS accumulés par les cellules MPSIIIB se retrouvent, au moins partiellement, dans l'espace extracellulaire pour activer la formation des plaques d'adhérence. Il n'existe à ce jour aucune preuve directe de l'accumulation des saccharides HS partiellement dégradés dans le milieu extracellulaire des cellules déficientes en NAGLU. Cependant, plusieurs arguments suggèrent la présence de saccharides d'HS dans l'environnement des cellules MPSIIIB.

Tout d'abord, la dégradation des HS se produit normalement dans les lysosomes. Les lysosomes sont engorgés par l'accumulation des saccharides d'HS dans les neurones déficients en NAGLU (Li et al, 1999; McCarty et al, 2011; McGlynn et al, 2004). Or, les

lysosomes ont la capacité d'évacuer leur contenu dans l'espace extracellulaire par exocytose lysosomale (Rodriguez et al, 1997). Nous avons vu que l'exocytose lysosomale peut être induite dans des astrocytes MPSIIIB. Ces données insinuent que le contenu des lysosomes engorgés peut être déversé dans l'environnement cellulaire. C'est d'ailleurs le cas pour plusieurs types de cellules affectées par une MPS, et ce système permet l'exocytose des enzymes lysosomale et la correction croisée des MPS (Fratantoni et al, 1968).

De plus, la détection d'HS accumulés à la membrane des neurones des cerveaux de souris MPSIII (McGlynn et al, 2004) et dans la matrice des cellules HeLa délétées en NAGLU (Roy et al, 2012) confirme qu'un système permet la présence d'HS à l'extérieur des cellules. La présence des HS dans le domaine extracellulaire peut être la conséquence de l'exocytose lysosomale et/ou de la surexpression de protéoglycanes. En effet, la surexpression des glypicans 1 et 5 dans le cortex entorhinal médian évoque une régulation d'expression des protéoglycanes d'HS dans le cerveau des souris MPSIIIB (Ohmi et al, 2011). Cette surexpression pourrait aggraver l'activation constitutive de FAK et des voies de signalisation en aval.

Enfin, un autre mécanisme pathologique de la MPSIIIB implique la présence des HS dans la MEC du système nerveux central. En effet, les saccharides d'HS sont responsables de l'activation des microglies et de la réponse inflammatoire innée dans le cerveau des souris MPSIIIB (Ausseil et al, 2008). Pour cela, les HS accumulés activent le récepteur TLR4 à la surface des microglies, et engage la signalisation de MyD88 pour réguler l'expression génique de cytokines proinflammatoires.

Malgré une accumulation seulement partielle des saccharides d'HS dans l'espace extracellulaire, les HS présents dans l'environnement des cellules jouent donc plusieurs rôles importants dans la physiopathologie de la MPSIIIB tels que la neuroinflammation et l'adhérence à la MEC.

3 Activation de la formation des plaques d'adhérence et des voies de signalisation par les héparanes sulfates accumulés dans la MPSIIIB

Nous avons vu que l'ajout d'HS de plus de 8 saccharides dans le milieu extracellulaire provoque la formation de plaques d'adhérence et active FAK. Par ailleurs, les saccharides d'HS accumulés dans les urines de patients MPSIIIB sont également capables d'activer la formation des plaques d'adhérence et la protéine de signalisation FAK. En effet, ces saccharides urinaires présentent un profil où la plupart des sucres accumulés sont de taille supérieure à des dp8. L'effet des saccharides urinaires sur la formation des plaques d'adhérence est annulé par une digestion des HS. Ces données confirment le rôle primordial des chaînes d'HS accumulées par les cellules de patients MPS dans le recrutement des protéines formant les plaques d'adhérence. L'effet à long terme des saccharides d'HS est observable sur les astrocytes murins MPSIIIB qui les accumulent et les sécrètent de façon constitutive. La présence chronique des saccharides extracellulaires active constitutivement la formation des plaques d'adhérence et la signalisation qui en découle.

L'activation chronique des voies de signalisation des intégrines avait déjà été suggérée par différentes études descriptives de la MPSIIIB. En effet, l'analyse du système nerveux des souris MPSIIIB a révélé des modifications des cascades de signalisation en aval des intégrines, et notamment des augmentations chroniques de l'activation des MAPK (Cecere et al, 2011). Mais, pour l'instant, cette étude reste descriptive, et le lien entre ces observations de dérèglement de la signalisation des MAPK et la cause primaire de la pathologie n'a jamais été abordé. L'hypothèse selon laquelle, l'activation de la signalisation des MAPK est la conséquence de l'accumulation extracellulaire des saccharides d'HS, reste à démontrer. Cependant, il est connu que l'activation des intégrines engendre différentes signalisations, notamment des cascades impliquant les MAPK. Les MAPK, telles que Jnk ou Erk, peuvent être activées par FAK, via la voie Grb2/Sos/Ras, ou via la voie Rac1/PAK (Legate et al, 2009). Ces données suggèrent que les saccharides d'HS affectent constitutivement différentes voies de signalisation dans les cellules MPSIIIB.

Par ailleurs, la différenciation de fibroblastes pour créer les cellules iPS est dépendante de l'action du FGF2. Le taux de clonage d'iPS de patients est faible, et les clones d'iPS de patients prolifèrent peu en présence d'HS accumulés. Inversement, après l'apport exogène de

NAGLU, grâce à la surexpression de l'enzyme par les cellules nourricières, l'apparition et la prolifération des clones sont restaurées (Lemonnier et al, 2011). Ces données sous-tendent une action des saccharides d'HS sur la signalisation du FGF2. La réponse à des facteurs de type FGF peut être altérée par des modifications de la signalisation des intégrines. En effet, la signalisation du FGF2 et des intégrines convergent à différents niveaux : à la membrane plasmique où les protéoglycanes d'HS modulent les signalisations des facteurs de croissance et des intégrines, mais également au niveau des cascades de signalisation cytoplasmique. De plus, dans les précurseurs neuronaux dérivés d'iPS, on observe une large modification d'expression des gènes impliqués dans la mise en place et le maintien des contacts cellule-MEC (Lemonnier et al, 2011).

4 L'activation constitutive de la signalisation intégrine/FAK fige les cellules délétées en NAGLU

Un des effets de l'activation des intégrines est la stabilisation locale du réseau de microtubules (Manneville et al, 2010; Palazzo et al, 2004). Dans le cas d'une cellule MPSIIIB, l'accumulation des saccharides d'HS dans le milieu extracellulaire active chroniquement la signalisation des intégrines et pourrait donc être responsable d'une stabilisation des microtubules. De plus, cette stabilisation des microtubules s'effectue normalement au voisinage de l'activation des intégrines, par exemple, en avant dans une cellule en migration. Dans une cellule délétée en NAGLU, les microtubules se stabiliseraient dans l'ensemble de la cellule, puisque les HS non polarisés activent les intégrines de toute part de la membrane plasmique. Les microtubules des cellules HeLa délétées en NAGLU sont largement acétylés, signe d'un réseau de microtubule peu dynamique. Il semblerait donc que l'activation chronique de la signalisation intégrines stabilise le réseau de microtubule dans les cellules accumulant des saccharides d'HS.

Dans une cellule normale, la stabilisation des microtubules s'effectue notamment grâce à l'association des CLASP avec le réseau de cytosquelette de tubuline. Ces CLASP sont nécessaires à la polarisation des cellules et également à la morphologie de l'appareil de Golgi (Miller et al, 2009). Une trop forte stabilisation des microtubules, et plus précisément des microtubules golgiens auxquels se fixent les CLASP, désorganiserait l'ensemble de l'appareil

de Golgi. C'est, en effet, ce que l'on peut observer dans de nombreuses cellules délétées en NAGLU : les cellules HeLa, les iPS de patients et les neurones dérivés de ces iPS, ou de cortex de souris MPSIIIB. L'architecture de l'appareil de Golgi est désorganisée avec un élargissement des citernes, une perte de l'asymétrie cis-trans, et une distension des ribbons dans ces cellules délétées en NAGLU. De plus, les ribbons golgiens ne sont pas alignés et ne se lient pas de façon tangentielle, comme lors de déplétion ou de surexpression des CLASP (Miller et al, 2009). La désorganisation de l'appareil de Golgi dans les cellules délétées en NAGLU semblent donc être la conséquence d'un défaut de dynamisme des microtubules golgiens.

La surexpression de GM130 peut également expliquer la désorganisation de l'appareil de Golgi dans les cellules délétées en NAGLU. En effet, la protéine GM130 est surexprimée dans les neurones corticaux des souris MPSIIIB, et dans les cellules HeLa délétées en NAGLU. La réduction d'expression de GM130 restaure la morphologie de l'appareil de Golgi et la surexpression de cette protéine dans une cellule HeLa normale provoque une élongation et une déformation de l'architecture golgienne.

En plus des défauts morphologiques, les appareils de Golgi des neurones corticaux des souris MPSIIIB et les cellules HeLa délétées en NAGLU sont moins dynamiques et présentent une résistance à un traitement BFA. La stabilisation de l'appareil de Golgi et des microtubules pourrait être une cause de la présence excessive de GM130 et d'AKAP450 à la surface l'appareil de Golgi (Yadav & Linstedt, 2011). En effet, ces deux protéines sont responsables de la nucléation des microtubules golgiens. Ces protéines sont surexprimées dans les cellules délétées en NAGLU. AKAP450 est délocalisée depuis le centrosome vers l'appareil de Golgi dans les cellules HeLa délétées en NAGLU. Ces données suggèrent que l'interaction entre AKAP450 et GM130 à la surface de l'appareil de Golgi est stabilisée, et leur présence excessive, à la surface golgienne, est une conséquence de la stabilisation excessive des microtubules.

L'impact de la stabilisation des microtubules, de l'appareil de Golgi et du complexe GM130/AKAP450 à la surface golgienne est observable dans le cytoplasme des cellules malades. En effet, les vésicules de stockage accumulées et visibles dans les cytoplasmes des neurones, des cellules neurales et des cellules HeLa délétées en NAGLU ne proviennent pas d'un engorgement des voies endolysosomales ou autophagiques mais semblent être la

conséquence de la déformation de l'appareil de Golgi. La seule surexpression de GM130 est suffisante pour provoquer l'apparition de vésicules de stockage, parfois observées en contact ou en continuité avec les saccules golgiennes. De plus, ces vacuoles présentent à leur surface des protéines du lysosome. Cette présence peut s'expliquer par la surexpression massive de toutes les protéines lysosomales dans les cellules atteintes de MPS. Cette surexpression est caractéristique de toutes les maladies lysosomales (Karageorgos et al, 1997; Lemonnier et al, 2011; Meikle et al, 1997; Neufeld & Muenzer, 2001). Ces données confirment une observation précédemment faite dans les neurones corticaux de souris MPSIIIB, où de grosses vacuoles étaient présentes dans le cytoplasme, sans HS à l'intérieur, donc distinctes des lysosomes (McGlynn et al, 2004). L'hypothèse d'une origine golgienne des vésicules accumulées est appuyée par la présence de déformations golgiennes dans tous les types cellulaires MPSIIIB. La restauration de la morphologie golgienne et l'élimination des vésicules de stockage par l'apport de l'enzyme par transfert de gène, démontre le lien de cause à effet entre l'accumulation des HS et ces phénotypes.

La stabilisation du réseau de microtubules, la stabilisation et la désorganisation de l'appareil de Golgi et la surexpression des protéines AKAP450 et GM130 à la surface golgienne, indiquent que la cellule délétée en NAGLU est figée par l'activation constitutive des voies de signalisation activées par les saccharides d'HS.

5 Défauts de plasticité des cellules neurales et neuronales affectées par la MPSIIIB

Au sens général, la plasticité est la faculté d'adaptation d'un corps, par modifications de la physiologie/forme, interne suite aux changements de milieu/contraintes. Un exemple de plasticité en biologie est celui de la plasticité du système nerveux central. Le cerveau peut être plastique à différents niveaux : (1) au niveau tissulaire avec remodelage global de l'architecture cérébrale, par exemple au cours du développement, (2) au niveau cellulaire avec des changements morphologiques tels que la polarisation des neurones, ou (3) au niveau synaptique notamment par modification des quantités de récepteurs présents à la membrane postsynaptique. Cette plasticité est dépendante de l'environnement tissulaire, cellulaire ou synaptique.

L'observation des cellules MPSIIIIB figées par la présence de saccharides d'HS dans l'environnement suggère une perte de plasticité cellulaire. En effet, les astrocytes MPSIIIIB en migration n'ont pas la capacité de recruter les protéines des plaques d'adhérence, d'activer la voie de signalisation Cdc42, et de repositionner leur centrosome et leur appareil de Golgi. Ces mécanismes sont nécessaires à la polarisation cellulaire. La conséquence est un défaut de polarisation, observé dans les astrocytes et également les cellules souches neurales MPSIIIIB. Les astrocytes atteints présentent un comportement migratoire désorganisé en culture. In vivo, les astrocytes ne sont pas capables de réagir à une lésion du cortex cérébral chez la souris MPSIIIIB de trois mois (Li et al, 2002).

Par ailleurs, les neurones corticaux délétés en NAGLU présentent un arbre neuritique surdéveloppé en culture. Cet excès de neuritogenèse n'est pas la conséquence d'une pousse excessive, ou plus rapide, des prolongements, mais d'un défaut de leur rétraction. La rétraction neuritique permet d'éliminer des prolongements qui ne sont pas nécessaires et permet également le recyclage des composants protéiques et membranaires. C'est un mécanisme dynamique d'adaptation du neurone à son environnement. Et ce mécanisme est quasiment absent des neurones MPSIIIIB en culture.

Toutes ces observations confirment la perte de plasticité des cellules du système nerveux central affecté par la MPSIIIIB.

6 La MPSIIIIB : maladie neurodégénérative et/ou maladie du développement ?

Les défauts de plasticité et les phénotypes observés en culture sur les cellules MPSIIIIB, tels que les défauts de neuritogenèse et de connections synaptiques, pourraient être à l'origine de la mort cellulaire responsable de la physiopathologie. Les autopsies des cerveaux de patients MPSIIIIB révèlent une légère perte neuronale au niveau du cortex préfrontal et du cortex temporal (Hamano et al, 2008). Ces observations semblent être corrélées avec les symptômes préfrontaux observés chez les enfants atteints et appuient l'hypothèse, selon laquelle, les dysfonctionnements font suite à la neurodégénérescence corticale progressive. Les analyses des cortex des patients par IRM confirment une atrophie progressive du cortex et du corps calleux (Zafeiriou et al, 2001). Cependant, les changements morphologiques du cortex observés par IRM ne sont pas corrélés avec l'aggravation des symptômes neurologiques (Barone et al, 1999). La neurodégénérescence ne serait donc peut être pas la cause du

phénotype clinique. Par ailleurs, chez la souris MPSIIIB de six mois, la mort cellulaire n'est pas observable dans le cortex cérébral. L'apoptose est détectable uniquement chez les souris de 13 mois, ce qui correspond à la fin de vie pour les souris mutantes (Li et al, 2002). A cet âge, la mort cellulaire ne peut expliquer les défauts fonctionnels apparus beaucoup plus tôt. De plus, aucune atrophie corticale n'est présente dans le cerveau des souris, même les plus âgées (Vitry et al, 2010; Wilkinson et al, 2012).

A l'inverse, des mécanismes importants pour le développement cortical sont affectés par l'accumulation des saccharides d'HS : la polarisation astrocytaire et des précurseurs neuraux, la migration astrocytaire et la neuritogenèse. Les interneurons corticaux proviennent, pour la plupart, des éminences ganglionnaires et prennent des trajectoires migratoires tangentiels dans le cortex cérébral en développement. Le système ligand-récepteur nétrine- intégrine $\beta 1$ module la migration tangentielle des interneurons dans le cortex cérébral émergent (Stanco et al, 2009). L'anatomie et l'organisation histologique du SNC sont presque normales chez les nouveaux nés et les adultes MPSIIIB, sauf au stade terminal de la maladie. La majorité des neurones dans le cortex sont des neurones de projection, la perturbation de la migration de ces neurones se traduit, généralement, par une malformation sévère du cortex (Kanekar & Gent, 2011). En revanche, les défauts de migration ou de l'arrangement définitif des interneurons corticaux peuvent conduire à des anomalies morphologiques plus subtiles, qui pourraient néanmoins entraîner une déficience grave de la fonction corticale.

La plupart des phénomènes de migration cellulaire dans le système nerveux s'effectue au cours de la période embryonnaire. Cependant, les premiers symptômes de la maladie apparaissent vers l'âge de 3 ans et aucun signe ne laisse suggérer des dysfonctionnements du système nerveux central avant cet âge. Toutefois, les migrations des interneurons peuvent également s'étendre à la période post-natale (Ghashghaei et al, 2007). De plus, d'autres processus post-nataux, tels que la neuritogenèse, la synaptogenèse et des phénomènes de maturations, conditionnent la mise en place d'un réseau neuronal fonctionnel et des aptitudes cognitives. Des perturbations du développement post-natal du cortex pourraient expliquer les désordres neuropsychiatriques de la maladie de Sanfilippo.

Conclusion

Les recherches, menées au cours de cette thèse, nous permettent de proposer un schéma de la cascade physiopathologique de la maladie de Sanfilippo B (Figure 57). Dans les cellules MPSIIIB, comme dans les cellules normales, les protéoglycanes d'HS sont internalisés dans les endosomes, où ils sont partiellement dégradés par l'action d'endoglycanases : les héparanases. Les fragments saccharidiques sont ensuite transportés vers le lysosome. Dans le cas des cellules atteintes, le défaut d'activité enzymatique de NAGLU conduit à l'accumulation de fragments saccharidiques d'HS dans la lumière du lysosome. L'exocytose lysosomale excrète partiellement les saccharides d'HS dans la MEC. La présence des HS à la surface cellulaire active la formation des plaques d'adhérence et la signalisation FAK. Il semblerait que l'activation de la signalisation des intégrines stabilise les microtubules golgiens à la membrane plasmique de façon ubiquitaire. Cette stabilisation affecterait la dynamique et la morphologie de l'appareil de Golgi et conduirait à la surexpression de GM130 et AKAP450 à la surface golgienne. L'affaiblissement de la dynamique des microtubules et de l'appareil de Golgi, et la saturation des voies de signalisation des intégrines par la présence chronique et progressive des saccharides d'HS, conduisent à la perte de plasticité des cellules MPSIIIB. Cette perte de plasticité se caractérise, dans les cellules neurales, par des défauts de polarisation et de migration cellulaire, processus nécessaires à la mise en place et à la maturation du système nerveux central.

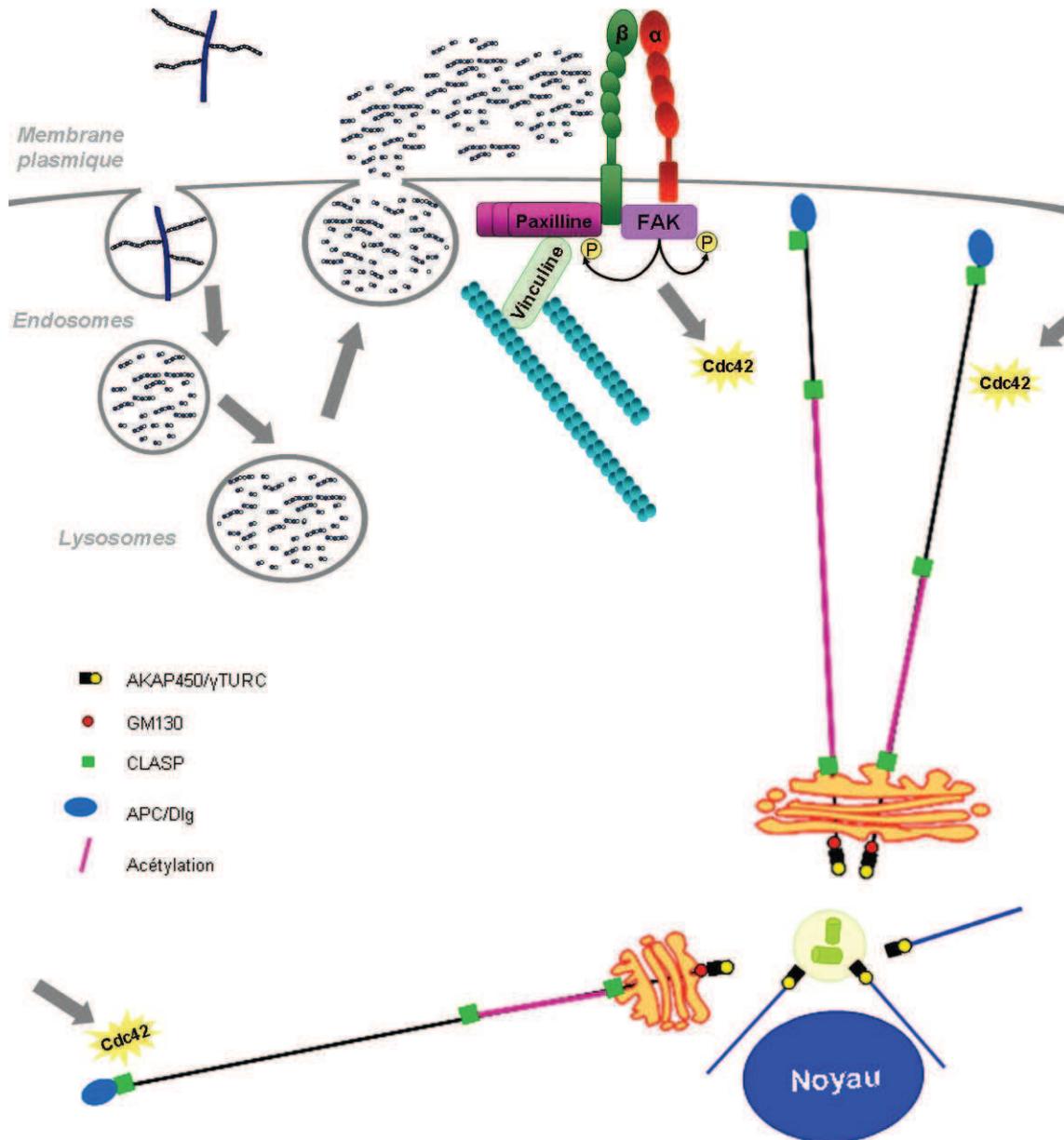


Figure 57 : Schéma de la cascade physiopathologique dans la maladie de Sanfilippo B.

Le schéma proposé ici peut rendre compte des défauts cellulaires observés dans les cellules HeLa délétés en NAGLU, dans les neurones et astrocytes du modèle murin de la MPSIIIB, et dans les neurones et les iPS des patients Sanfilippo B. De plus, la perturbation des voies de signalisation par l'accumulation des saccharides d'HS peut avoir des conséquences délétères sur d'autres mécanismes cellulaires, tels que la prolifération ou la différenciation cellulaire. Une altération de ces mécanismes pourrait également expliquer la physiopathologie de la maladie de Sanfilippo B.

Perspectives

Le modèle de la cascade physiopathologique nécessite d'être confirmé à différents niveaux. Tout d'abord, le lien entre l'altération des voies de signalisation des intégrines et la stabilisation des microtubules n'est connu, pour l'instant, que dans des cellules normales. L'étude de la stabilisation des microtubules golgiens doit être approfondie dans les cellules HeLa induites et développée dans les cellules chroniquement déficientes en NAGLU, telles que les astrocytes et les neurones des souris MPSIIIB. L'impact de l'activation de la voie de signalisation par les saccharides d'HS sur cette stabilisation pourra être testé grâce à l'ajout de fragments purifiés d'HS sur des cellules normales.

De plus, la morphologie de l'appareil de Golgi est dépendante de la dynamique des microtubules golgiens mais le lien entre la signalisation FAK/intégrine et la morphologie golgienne n'est pas connu. Le traitement transitoire à la BFA restaure la polarisation des astrocytes MPSIIIB. Ces données suggèrent que la dynamique des membranes golgiennes est indispensable à la plasticité et que le traitement permet de contourner la voie de signalisation défaillante. La surexpression des protéines CLASP ou un traitement des cellules avec des agents pharmaceutiques, tels que le taxol, permet d'analyser l'effet de la stabilisation des microtubules sur la morphologie de l'appareil de Golgi. Inversement, un traitement dépolymérisant, comme le nocodazole, permettrait de restaurer la morphologie de l'appareil de Golgi dans les cellules MPSIIIB. Et est-ce que l'inhibition transitoire des voies de signalisation des intégrines rendrait l'apparence et la dynamique de l'appareil de Golgi nécessaire à la plasticité des cellules neurales MPSIIIB ?

Enfin, les observations et la dissection des mécanismes pathologiques ont été décrites principalement dans les cellules délétées en NAGLU en culture. La validation de cette cascade physiopathologique passera par la confirmation *in vivo* des observations faites *in vitro*. L'activation constitutive de la voie de signalisation, la stabilisation des voies de signalisation et la restauration des phénotypes par ajout de l'enzyme NAGLU pourront être analysées dans le cortex des souris MPSIIIB. L'appareil de Golgi des neurones corticaux MPSIIIB présente des distensions également *in vivo*. Cette dernière observation suggère que le schéma de la cascade physiopathologique, proposé ici, pourrait également se produire dans le cortex des souris MPSIIIB.

Enfin, il sera essentiel de pouvoir discriminer les mécanismes neurodégénératifs des défauts de développement du cortex dans la MPSIIIB. En effet, même si la pathologie n'est, pour

l'instant, pas considérée comme une maladie du développement, les résultats sur les cellules animales et humaines suggèrent des défauts post-nataux du développement cortical. La neurogenèse est déjà affectées chez des souris MPSIIIB de seulement un mois. Les capacités cognitives et neurologiques des enfants MPSIIIB sont très rapidement perdues au cours de l'évolution de la maladie. A seulement 2 ans ou 3 ans, les défauts de langage sont installés pour la plupart des enfants atteints. A cet âge, le cortex subit de nombreuses modifications au niveau neuronal et synaptique. Déterminer si les dysfonctionnements sont causés par un défaut de développement permettrait de savoir si les dommages sont réversibles et permettrait d'estimer l'âge optimal d'administration du traitement. En effet, un traitement par thérapie génique vers l'âge de 4 ans mettra probablement un terme à la progression de la maladie, ou à la neurodégénérescence, comme l'indique les données précliniques faites chez le gros animal. Cependant, les défauts de développement du cortex établis avant le traitement ne seront probablement pas restaurer. La plasticité du cerveau est très importante au cours des deux premières années de la vie, le traitement par thérapie génique avant l'âge de deux ans semble donc être la meilleure solution thérapeutique.

L'efficacité de la thérapie génique est donc dépendante de l'âge du traitement. Le prochain défi sera donc de dépister le plus tôt possible la maladie, avant même les premiers symptômes, afin d'agir avant l'irréversibilité des atteintes. Le diagnostic présymptomatique n'est pour l'instant pas disponible pour des raisons éthiques, économiques et techniques, mais l'efficacité du traitement par thérapie génique et donc, l'espoir de pouvoir guérir chaque enfant diagnostiqué, pourra peut être permettre d'inclure le dépistage néonatal systématique de la maladie de Sanfilippo B.

Bibliographie

Ahmad FJ, Echeverri CJ, Vallee RB, Baas PW (1998) Cytoplasmic dynein and dynactin are required for the transport of microtubules into the axon. *J Cell Biol* **140**(2): 391-401

Ai X, Do AT, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, Lu K, Emerson CP, Jr. (2006) Substrate specificity and domain functions of extracellular heparan sulfate 6-O-endosulfatases, QSulf1 and QSulf2. *J Biol Chem* **281**(8): 4969-4976

Akhmanova A, Hoogenraad CC, Drabek K, Stepanova T, Dortland B, Verkerk T, Vermeulen W, Burgering BM, De Zeeuw CI, Grosveld F, Galjart N (2001) Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell* **104**(6): 923-935

Al-Bassam J, Chang F (2011) Regulation of microtubule dynamics by TOG-domain proteins XMAP215/Dis1 and CLASP. *Trends Cell Biol* **21**(10): 604-614

Alexandrova AY (2008) Evolution of cell interactions with extracellular matrix during carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)* **73**(7): 733-741

Allan VJ, Thompson HM, McNiven MA (2002) Motoring around the Golgi. *Nat Cell Biol* **4**(10): E236-242

Alon R, Kassner PD, Carr MW, Finger EB, Hemler ME, Springer TA (1995) The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol* **128**(6): 1243-1253

Alvarez C, Garcia-Mata R, Hauri HP, Sztul E (2001) The p115-interactive proteins GM130 and giantin participate in endoplasmic reticulum-Golgi traffic. *J Biol Chem* **276**(4): 2693-2700

Annie M, Bittcher G, Ramseger R, Loschinger J, Woll S, Porten E, Abraham C, Ruegg MA, Kroger S (2006) Clustering transmembrane-agrin induces filopodia-like processes on axons and dendrites. *Mol Cell Neurosci* **31**(3): 515-524

Arikawa-Hirasawa E, Rossi SG, Rotundo RL, Yamada Y (2002) Absence of acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions of perlecan-null mice. *Nat Neurosci* **5**(2): 119-123

Arrington CB, Yost HJ (2009) Extra-embryonic syndecan 2 regulates organ primordia migration and fibrillogenesis throughout the zebrafish embryo. *Development* **136**(18): 3143-3152

Askari JA, Buckley PA, Mould AP, Humphries MJ (2009) Linking integrin conformation to function. *J Cell Sci* **122**(Pt 2): 165-170

Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hohenester E, Jones JC, Kleinman HK, Marinkovich MP, Martin GR, Mayer U,

- Meneguzzi G, Miner JH, Miyazaki K, Patarroyo M, Paulsson M, Quaranta V, Sanes JR, Sasaki T, Sekiguchi K, Sorokin LM, Talts JF, Tryggvason K, Uitto J, Virtanen I, von der Mark K, Wewer UM, Yamada Y, Yurchenco PD (2005) A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* **24**(5): 326-332
- Ausseil J, Desmaris N, Bigou S, Attali R, Corbineau S, Vitry S, Parent M, Cheillan D, Fuller M, Maire I, Vanier MT, Heard JM (2008) Early neurodegeneration progresses independently of microglial activation by heparan sulfate in the brain of mucopolysaccharidosis IIIB mice. *PLoS One* **3**(5): e2296
- Ballabio A (2009) Disease pathogenesis explained by basic science: lysosomal storage diseases as autophagocytic disorders. *Int J Clin Pharmacol Ther* **47 Suppl 1**: S34-38
- Bame KJ (2001) Heparanases: endoglycosidases that degrade heparan sulfate proteoglycans. *Glycobiology* **11**(6): 91R-98R
- Banda K, Kang G, Varki A (2009) 'Sialidase sensitivity' of rotaviruses revisited. *Nat Chem Biol* **5**(2): 71-72
- Bandtlow CE, Zimmermann DR (2000) Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev* **80**(4): 1267-1290
- Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D (2010) Integrins. *Cell Tissue Res* **339**(1): 269-280
- Barnes AP, Polleux F (2009) Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu Rev Neurosci* **32**: 347-381
- Barone R, Nigro F, Triulzi F, Musumeci S, Fiumara A, Pavone L (1999) Clinical and neuroradiological follow-up in mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo syndrome). *Neuropediatrics* **30**(5): 270-274
- Barr FA, Nakamura N, Warren G (1998) Mapping the interaction between GRASP65 and GM130, components of a protein complex involved in the stacking of Golgi cisternae. *EMBO J* **17**(12): 3258-3268
- Barros CS, Franco SJ, Muller U (2011) Extracellular matrix: functions in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(1): a005108
- Bass MD, Roach KA, Morgan MR, Mostafavi-Pour Z, Schoen T, Muramatsu T, Mayer U, Ballestrem C, Spatz JP, Humphries MJ (2007) Syndecan-4-dependent Rac1 regulation determines directional migration in response to the extracellular matrix. *J Cell Biol* **177**(3): 527-538
- Batchelor CL, Higginson JR, Chen YJ, Vanni C, Eva A, Winder SJ (2007) Recruitment of Dbl by ezrin and dystroglycan drives membrane proximal Cdc42 activation and filopodia formation. *Cell Cycle* **6**(3): 353-363
- Baxter MA, Wynn RF, Deakin JA, Bellantuono I, Edington KG, Cooper A, Besley GT, Church HJ, Wraith JE, Carr TF, Fairbairn LJ (2002) Retrovirally mediated correction of bone

marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with mucopolysaccharidosis type I. *Blood* **99**(5): 1857-1859

Beauvais DM, Ell BJ, McWhorter AR, Rapraeger AC (2009) Syndecan-1 regulates α v β 3 and α v β 5 integrin activation during angiogenesis and is blocked by synstatin, a novel peptide inhibitor. *J Exp Med* **206**(3): 691-705

Beauvais DM, Rapraeger AC (2004) Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reprod Biol Endocrinol* **2**: 3

Beesley CE, Young EP, Finnegan N, Jackson M, Mills K, Vellodi A, Cleary M, Winchester BG (2009) Discovery of a new biomarker for the mucopolysaccharidoses (MPS), dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV; CD26), by SELDI-TOF mass spectrometry. *Mol Genet Metab* **96**(4): 218-224

Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* **68**: 729-777

Bhaumik M, Muller VJ, Rozaklis T, Johnson L, Dobrenis K, Bhattacharyya R, Wurzelmann S, Finamore P, Hopwood JJ, Walkley SU, Stanley P (1999) A mouse model for mucopolysaccharidosis type III A (Sanfilippo syndrome). *Glycobiology* **9**(12): 1389-1396

Bisel B, Wang Y, Wei JH, Xiang Y, Tang D, Miron-Mendoza M, Yoshimura S, Nakamura N, Seemann J (2008) ERK regulates Golgi and centrosome orientation towards the leading edge through GRASP65. *J Cell Biol* **182**(5): 837-843

Bix G, Iozzo RV (2005) Matrix revolutions: "tails" of basement-membrane components with angiostatic functions. *Trends Cell Biol* **15**(1): 52-60

Bonneh-Barkay D, Wiley CA (2009) Brain extracellular matrix in neurodegeneration. *Brain Pathol* **19**(4): 573-585

Bornens M (2008) Organelle positioning and cell polarity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(11): 874-886

Bradke F, Dotti CG (1999) The role of local actin instability in axon formation. *Science* **283**(5409): 1931-1934

Brennand KJ, Simone A, Jou J, Gelboin-Burkhart C, Tran N, Sangar S, Li Y, Mu Y, Chen G, Yu D, McCarthy S, Sebat J, Gage FH (2011) Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* **473**(7346): 221-225

Bretscher MS, Munro S (1993) Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science* **261**(5126): 1280-1281

Brooks AI, Stein CS, Hughes SM, Heth J, McCray PM, Jr., Sauter SL, Johnston JC, Cory-Slechta DA, Federoff HJ, Davidson BL (2002) Functional correction of established central nervous system deficits in an animal model of lysosomal storage disease with feline immunodeficiency virus-based vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(9): 6216-6221

- Byers S, Rozaklis T, Brumfield LK, Ranieri E, Hopwood JJ (1998) Glycosaminoglycan accumulation and excretion in the mucopolysaccharidoses: characterization and basis of a diagnostic test for MPS. *Mol Genet Metab* **65**(4): 282-290
- Canal MM, Wilkinson FL, Cooper JD, Wraith JE, Wynn R, Bigger BW (2010) Circadian rhythm and suprachiasmatic nucleus alterations in the mouse model of mucopolysaccharidosis IIIB. *Behav Brain Res* **209**(2): 212-220
- Caplow M, Ruhlen RL, Shanks J (1994) The free energy for hydrolysis of a microtubule-bound nucleotide triphosphate is near zero: all of the free energy for hydrolysis is stored in the microtubule lattice. *J Cell Biol* **127**(3): 779-788
- Carman CV, Springer TA (2003) Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol* **15**(5): 547-556
- Carulli S, Beck K, Dayan G, Boulesteix S, Lortat-Jacob H, Rousselle P (2012) Cell surface proteoglycans syndecan-1 and -4 bind overlapping but distinct sites in laminin alpha3 LG45 protein domain. *J Biol Chem* **287**(15): 12204-12216
- Cecere F, Di Domenico C, Di Napoli D, Boscia F, Di Natale P (2011) Activation of stress kinases in the brain of mucopolysaccharidosis IIIB mice. *J Neurosci Res* **89**(9): 1431-1438
- Celio MR, Spreafico R, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L (1998) Perineuronal nets: past and present. *Trends Neurosci* **21**(12): 510-515
- Chabin-Brion K, Marceiller J, Perez F, Settegrana C, Drechou A, Durand G, Pous C (2001) The Golgi complex is a microtubule-organizing organelle. *Mol Biol Cell* **12**(7): 2047-2060
- Chanana B, Steigemann P, Jackle H, Vorbruggen G (2009) Reception of Slit requires only the chondroitin-sulphate-modified extracellular domain of Syndecan at the target cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(29): 11984-11988
- Chen H, Cohen DM, Choudhury DM, Kioka N, Craig SW (2005a) Spatial distribution and functional significance of activated vinculin in living cells. *J Cell Biol* **169**(3): 459-470
- Chen JL, Fucini RV, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Stamnes M (2005b) Coatamer-bound Cdc42 regulates dynein recruitment to COPI vesicles. *J Cell Biol* **169**(3): 383-389
- Chen S, Owens GC, Makarenkova H, Edelman DB (2010) HDAC6 regulates mitochondrial transport in hippocampal neurons. *PLoS One* **5**(5): e10848
- Choi CK, Vicente-Manzanares M, Zareno J, Whitmore LA, Mogilner A, Horwitz AR (2008) Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat Cell Biol* **10**(9): 1039-1050
- Coppa GV, Buzzega D, Zampini L, Maccari F, Galeazzi T, Padella L, Santoro L, Gabrielli O, Volpi N (2011a) Agarose-gel electrophoresis for the diagnosis of mucopolysaccharidoses. *Clin Chem Lab Med* **50**(3): 589-592

- Coppa GV, Galeotti F, Zampini L, Maccari F, Galeazzi T, Padelia L, Santoro L, Gabrielli O, Volpi N (2011b) High-throughput determination of urinary hexosamines for diagnosis of mucopolysaccharidoses by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **411**(1): 32-42
- Cotman SL, Halfter W, Cole GJ (2000) Agrin binds to beta-amyloid (Abeta), accelerates abeta fibril formation, and is localized to Abeta deposits in Alzheimer's disease brain. *Mol Cell Neurosci* **15**(2): 183-198
- Couchman JR (2003) Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(12): 926-937
- Couchman JR (2010) Transmembrane signaling proteoglycans. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**: 89-114
- Cragg B (1980) Preservation of extracellular space during fixation of the brain for electron microscopy. *Tissue Cell* **12**(1): 63-72
- Crawley AC, Marshall N, Beard H, Hassiotis S, Walsh V, King B, Hucker N, Fuller M, Jolly RD, Hopwood JJ, Hemsley KM (2011) Enzyme replacement reduces neuropathology in MPS IIIA dogs. *Neurobiol Dis* **43**(2): 422-434
- Cressant A, Desmaris N, Verot L, Brejot T, Froissart R, Vanier MT, Maire I, Heard JM (2004) Improved behavior and neuropathology in the mouse model of Sanfilippo type IIIB disease after adeno-associated virus-mediated gene transfer in the striatum. *J Neurosci* **24**(45): 10229-10239
- Crowley E, Horwitz AF (1995) Tyrosine phosphorylation and cytoskeletal tension regulate the release of fibroblast adhesions. *J Cell Biol* **131**(2): 525-537
- Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, Basilico C (2005) Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**(2): 233-247
- Danen EH, Sonneveld P, Brakebusch C, Fassler R, Sonnenberg A (2002) The fibronectin-binding integrins alpha5beta1 and alphavbeta3 differentially modulate RhoA-GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol* **159**(6): 1071-1086
- Daub H, Gevaert K, Vandekerckhove J, Sobel A, Hall A (2001) Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. *J Biol Chem* **276**(3): 1677-1680
- Dawson G, Fuller M, Helmsley KM, Hopwood JJ (2012) Abnormal gangliosides are localized in lipid rafts in Sanfilippo (MPS3a) mouse brain. *Neurochem Res* **37**(6): 1372-1380
- de Anda FC, Meletis K, Ge X, Rei D, Tsai LH (2010) Centrosome motility is essential for initial axon formation in the neocortex. *J Neurosci* **30**(31): 10391-10406
- de Anda FC, Pollarolo G, Da Silva JS, Camoletto PG, Feiguin F, Dotti CG (2005) Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature* **436**(7051): 704-708

- de Forges H, Bouissou A, Perez F (2012) Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *Int J Biochem Cell Biol* **44**(2): 266-274
- de Graffenried CL, Bertozzi CR (2004) The roles of enzyme localisation and complex formation in glycan assembly within the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* **16**(4): 356-363
- de Wit J, Verhaagen J (2007) Proteoglycans as modulators of axon guidance cue function. *Adv Exp Med Biol* **600**: 73-89
- Dertinger SK, Jiang X, Li Z, Murthy VN, Whitesides GM (2002) Gradients of substrate-bound laminin orient axonal specification of neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(20): 12542-12547
- Destaing O, Saltel F, Gilquin B, Chabadel A, Khochbin S, Ory S, Jurdic P (2005) A novel Rho-mDia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclasts. *J Cell Sci* **118**(Pt 13): 2901-2911
- DeWard AD, Alberts AS (2008) Microtubule stabilization: formins assert their independence. *Curr Biol* **18**(14): R605-608
- Digman MA, Brown CM, Horwitz AR, Mantulin WW, Gratton E (2008) Paxillin dynamics measured during adhesion assembly and disassembly by correlation spectroscopy. *Biophys J* **94**(7): 2819-2831
- DiRosario J, Divers E, Wang C, Etter J, Charrier A, Jukkola P, Auer H, Best V, Newsom DL, McCarty DM, Fu H (2009) Innate and adaptive immune activation in the brain of MPS IIIB mouse model. *J Neurosci Res* **87**(4): 978-990
- Distel M, Hocking JC, Volkman K, Koster RW (2010) The centrosome neither persistently leads migration nor determines the site of axonogenesis in migrating neurons in vivo. *J Cell Biol* **191**(4): 875-890
- Dityatev A, Seidenbecher CI, Schachner M (2010) Compartmentalization from the outside: the extracellular matrix and functional microdomains in the brain. *Trends Neurosci* **33**(11): 503-512
- Dono R, Texido G, Dussel R, Ehmke H, Zeller R (1998) Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. *EMBO J* **17**(15): 4213-4225
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* **8**(4): 1454-1468
- Drabek K, van Ham M, Stepanova T, Draegestein K, van Horsen R, Sayas CL, Akhmanova A, Ten Hagen T, Smits R, Fodde R, Grosveld F, Galjart N (2006) Role of CLASP2 in microtubule stabilization and the regulation of persistent motility. *Curr Biol* **16**(22): 2259-2264

Dubash AD, Menold MM, Samson T, Boulter E, Garcia-Mata R, Doughman R, Burrridge K (2009) Chapter 1. Focal adhesions: new angles on an old structure. *Int Rev Cell Mol Biol* **277**: 1-65

Dubois T, Paleotti O, Mironov AA, Fraissier V, Stradal TE, De Matteis MA, Franco M, Chavrier P (2005) Golgi-localized GAP for Cdc42 functions downstream of ARF1 to control Arp2/3 complex and F-actin dynamics. *Nat Cell Biol* **7**(4): 353-364

Echtermeyer F, Baciuc PC, Saoncella S, Ge Y, Goetinck PF (1999) Syndecan-4 core protein is sufficient for the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *J Cell Sci* **112** (Pt 20): 3433-3441

Echtermeyer F, Streit M, Wilcox-Adelman S, Saoncella S, Denhez F, Detmar M, Goetinck P (2001) Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J Clin Invest* **107**(2): R9-R14

Edgren G, Havsmark B, Jonsson M, Fransson LA (1997) Glypican (heparan sulfate proteoglycan) is palmitoylated, deglycanated and reglycanated during recycling in skin fibroblasts. *Glycobiology* **7**(1): 103-112

Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN (1999) Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* **1**(5): 253-259

Efimov A, Kharitonov A, Efimova N, Loncarek J, Miller PM, Andreyeva N, Gleeson P, Galjart N, Maia AR, McLeod IX, Yates JR, 3rd, Maiato H, Khodjakov A, Akhmanova A, Kaverina I (2007) Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev Cell* **12**(6): 917-930

Ellinwood NM, Ausseil J, Desmaris N, Bigou S, Liu S, Jens JK, Snella EM, Mohammed EE, Thomson CB, Raoul S, Joussemet B, Roux F, Cherel Y, Lajat Y, Piraud M, Benchaouir R, Hermening S, Petry H, Froissart R, Tardieu M, Ciron C, Moullier P, Parkes J, Kline KL, Maire I, Vanier MT, Heard JM, Colle MA (2010) Safe, efficient, and reproducible gene therapy of the brain in the dog models of Sanfilippo and Hurler syndromes. *Mol Ther* **19**(2): 251-259

Ellinwood NM, Ausseil J, Desmaris N, Bigou S, Liu S, Jens JK, Snella EM, Mohammed EE, Thomson CB, Raoul S, Joussemet B, Roux F, Cherel Y, Lajat Y, Piraud M, Benchaouir R, Hermening S, Petry H, Froissart R, Tardieu M, Ciron C, Moullier P, Parkes J, Kline KL, Maire I, Vanier MT, Heard JM, Colle MA (2011) Safe, efficient, and reproducible gene therapy of the brain in the dog models of Sanfilippo and Hurler syndromes. *Mol Ther* **19**(2): 251-259

Ellinwood NM, Wang P, Skeen T, Sharp NJ, Cesta M, Decker S, Edwards NJ, Bublot I, Thompson JN, Bush W, Hardam E, Haskins ME, Giger U (2003) A model of mucopolysaccharidosis IIIB (Sanfilippo syndrome type IIIB): N-acetyl-alpha-D-glucosaminidase deficiency in Schipperke dogs. *J Inherit Metab Dis* **26**(5): 489-504

Ems-McClung SC, Walczak CE (2010) Kinesin-13s in mitosis: Key players in the spatial and temporal organization of spindle microtubules. *Semin Cell Dev Biol* **21**(3): 276-282

- Engelhardt B, Sorokin L (2009) The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol* **31**(4): 497-511
- Esch T, Lemmon V, Banker G (1999) Local presentation of substrate molecules directs axon specification by cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* **19**(15): 6417-6426
- Esko JD, Linhardt RJ (2009) Proteins that Bind Sulfated Glycosaminoglycans.
- Esko JD, Selleck SB (2002) Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem* **71**: 435-471
- Estrada L, Caron E, Gorski JL (2001) Fgd1, the Cdc42 guanine nucleotide exchange factor responsible for faciogenital dysplasia, is localized to the subcortical actin cytoskeleton and Golgi membrane. *Hum Mol Genet* **10**(5): 485-495
- Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J (2005) Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**(2): 139-149
- Etienne-Manneville S (2004) Cdc42--the centre of polarity. *J Cell Sci* **117**(Pt 8): 1291-1300
- Etienne-Manneville S (2006) In vitro assay of primary astrocyte migration as a tool to study Rho GTPase function in cell polarization. *Methods Enzymol* **406**: 565-578
- Etienne-Manneville S (2009) APC in cell migration. *Adv Exp Med Biol* **656**: 30-40
- Etienne-Manneville S, Hall A (2001) Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* **106**(4): 489-498
- Etienne-Manneville S, Hall A (2003) Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* **421**(6924): 753-756
- Etienne-Manneville S, Manneville JB, Nicholls S, Ferenczi MA, Hall A (2005) Cdc42 and Par6-PKCzeta regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization. *J Cell Biol* **170**(6): 895-901
- Fame RM, MacDonald JL, Macklis JD (2011) Development, specification, and diversity of callosal projection neurons. *Trends Neurosci* **34**(1): 41-50
- Faye C, Moreau C, Chautard E, Jetne R, Fukai N, Ruggiero F, Humphries MJ, Olsen BR, Ricard-Blum S (2009) Molecular interplay between endostatin, integrins, and heparan sulfate. *J Biol Chem* **284**(33): 22029-22040
- Feinstein TN, Linstedt AD (2008) GRASP55 regulates Golgi ribbon formation. *Mol Biol Cell* **19**(7): 2696-2707
- Fidalgo M, Fraile M, Pires A, Force T, Pombo C, Zalvide J (2010) CCM3/PDCD10 stabilizes GCKIII proteins to promote Golgi assembly and cell orientation. *J Cell Sci* **123**(Pt 8): 1274-1284

- Filipenko NR, Attwell S, Roskelley C, Dedhar S (2005) Integrin-linked kinase activity regulates Rac- and Cdc42-mediated actin cytoskeleton reorganization via alpha-PIX. *Oncogene* **24**(38): 5837-5849
- Filmus J, Capurro M, Rast J (2008) Glypicans. *Genome Biol* **9**(5): 224
- Fischer A, Carmichael KP, Munnell JF, Jhabvala P, Thompson JN, Matalon R, Jezyk PF, Wang P, Giger U (1998) Sulfamidase deficiency in a family of Dachshunds: a canine model of mucopolysaccharidosis IIIA (Sanfilippo A). *Pediatr Res* **44**(1): 74-82
- Foletta VC, Brown FD, Young WS, 3rd (2002) Cloning of rat ARHGAP4/C1, a RhoGAP family member expressed in the nervous system that colocalizes with the Golgi complex and microtubules. *Brain Res Mol Brain Res* **107**(1): 65-79
- Frame MC, Patel H, Serrels B, Lietha D, Eck MJ (2010) The FERM domain: organizing the structure and function of FAK. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(11): 802-814
- Franco SJ, Huttenlocher A (2005) Regulating cell migration: calpains make the cut. *J Cell Sci* **118**(Pt 17): 3829-3838
- Fraser J, Gason AA, Wraith JE, Delatycki MB (2005) Sleep disturbance in Sanfilippo syndrome: a parental questionnaire study. *Arch Dis Child* **90**(12): 1239-1242
- Fratantoni JC, Hall CW, Neufeld EF (1968) Hurler and Hunter syndromes: mutual correction of the defect in cultured fibroblasts. *Science* **162**(3853): 570-572
- Friedland JC, Lee MH, Boettiger D (2009) Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science* **323**(5914): 642-644
- Fu H, Dirosario J, Killedar S, Zaraspe K, McCarty DM (2011) Correction of neurological disease of mucopolysaccharidosis IIIB in adult mice by rAAV9 trans-blood-brain barrier gene delivery. *Mol Ther* **19**(6): 1025-1033
- Fu H, Samulski RJ, McCown TJ, Picornell YJ, Fletcher D, Muenzer J (2002) Neurological correction of lysosomal storage in a mucopolysaccharidosis IIIB mouse model by adeno-associated virus-mediated gene delivery. *Mol Ther* **5**(1): 42-49
- Fukata M, Watanabe T, Noritake J, Nakagawa M, Yamaga M, Kuroda S, Matsuura Y, Iwamatsu A, Perez F, Kaibuchi K (2002) Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell* **109**(7): 873-885
- Fukuda M (1991) Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J Biol Chem* **266**(32): 21327-21330
- Fuller M, Meikle PJ, Hopwood JJ (2004) Glycosaminoglycan degradation fragments in mucopolysaccharidosis I. *Glycobiology* **14**(5): 443-450
- Garbuzova-Davis S, Louis MK, Haller EM, Derasari HM, Rawls AE, Sanberg PR (2011) Blood-brain barrier impairment in an animal model of MPS III B. *PLoS One* **6**(3): e16601

- Garrard SM, Capaldo CT, Gao L, Rosen MK, Macara IG, Tomchick DR (2003) Structure of Cdc42 in a complex with the GTPase-binding domain of the cell polarity protein, Par6. *EMBO J* **22**(5): 1125-1133
- Gartner A, Fornasiero EF, Munck S, Vennekens K, Seuntjens E, Huttner WB, Valtorta F, Dotti CG (2012) N-cadherin specifies first asymmetry in developing neurons. *EMBO J* **31**(8): 1893-1903
- Gay NJ, Gangloff M (2007) Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem* **76**: 141-165
- Gennerich A, Vale RD (2009) Walking the walk: how kinesin and dynein coordinate their steps. *Curr Opin Cell Biol* **21**(1): 59-67
- Ghashghaei HT, Lai C, Anton ES (2007) Neuronal migration in the adult brain: are we there yet? *Nat Rev Neurosci* **8**(2): 141-151
- Giros A, Morante J, Gil-Sanz C, Fairen A, Costell M (2007) Perlecan controls neurogenesis in the developing telencephalon. *BMC Dev Biol* **7**: 29
- Gliddon BL, Hopwood JJ (2004) Enzyme-replacement therapy from birth delays the development of behavior and learning problems in mucopolysaccharidosis type IIIA mice. *Pediatr Res* **56**(1): 65-72
- Goldman RD, Cleland MM, Murthy SN, Mahammad S, Kuczmariski ER (2012) Inroads into the structure and function of intermediate filament networks. *J Struct Biol* **177**(1): 14-23
- Gomes ER, Jani S, Gundersen GG (2005) Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell* **121**(3): 451-463
- Gopal S, Bober A, Whiteford JR, Multhaupt HA, Yoneda A, Couchman JR (2010) Heparan sulfate chain valency controls syndecan-4 function in cell adhesion. *J Biol Chem* **285**(19): 14247-14258
- Goulimari P, Kitzing TM, Knieling H, Brandt DT, Offermanns S, Grosse R (2005) Galpha12/13 is essential for directed cell migration and localized Rho-Dial1 function. *J Biol Chem* **280**(51): 42242-42251
- Granes F, Garcia R, Casaroli-Marano RP, Castel S, Rocamora N, Reina M, Urena JM, Vilaro S (1999) Syndecan-2 induces filopodia by active cdc42Hs. *Exp Cell Res* **248**(2): 439-456
- Granes F, Urena JM, Rocamora N, Vilaro S (2000) Ezrin links syndecan-2 to the cytoskeleton. *J Cell Sci* **113** (Pt 7): 1267-1276
- Gray SJ (2012) Gene therapy and neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology*
- Gundersen GG, Wen Y, Eng CH, Schmoranzler J, Cabrera-Poch N, Morris EJ, Chen M, Gomes ER (2005) Regulation of microtubules by Rho GTPases in migrating cells. *Novartis Found Symp* **269**: 106-116; discussion 116-126, 223-130

- Gupta SK, Meiri KF, Mahfooz K, Bharti U, Mani S (2010) Coordination between extrinsic extracellular matrix cues and intrinsic responses to orient the centrosome in polarizing cerebellar granule neurons. *J Neurosci* **30**(7): 2755-2766
- Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, Clappier E, Caccavelli L, Delabesse E, Beldjord K, Asnafi V, MacIntyre E, Dal Cortivo L, Radford I, Brousse N, Sigaux F, Moshous D, Hauer J, Borkhardt A, Belohradsky BH, Wintergerst U, Velez MC, Leiva L, Sorensen R, Wulffraat N, Blanche S, Bushman FD, Fischer A, Cavazzana-Calvo M (2008) Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* **118**(9): 3132-3142
- Halfter W, Dong S, Yip YP, Willem M, Mayer U (2002) A critical function of the pial basement membrane in cortical histogenesis. *J Neurosci* **22**(14): 6029-6040
- Hamano K, Hayashi M, Shioda K, Fukatsu R, Mizutani S (2008) Mechanisms of neurodegeneration in mucopolysaccharidoses II and IIIB: analysis of human brain tissue. *Acta Neuropathol* **115**(5): 547-559
- Hammond JW, Huang CF, Kaech S, Jacobson C, Banker G, Verhey KJ (2010) Posttranslational modifications of tubulin and the polarized transport of kinesin-1 in neurons. *Mol Biol Cell* **21**(4): 572-583
- Harada A, Takei Y, Kanai Y, Tanaka Y, Nonaka S, Hirokawa N (1998) Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. *J Cell Biol* **141**(1): 51-59
- Harmatz P (2010) Enzyme replacement therapy with galsulfase for mucopolysaccharidosis VI: clinical facts and figures. *Turk J Pediatr* **52**(5): 443-449
- Haskins M, Casal M, Ellinwood NM, Melniczek J, Mazrier H, Giger U (2002) Animal models for mucopolysaccharidoses and their clinical relevance. *Acta Paediatr Suppl* **91**(439): 88-97
- Hayashi I, Vuori K, Liddington RC (2002) The focal adhesion targeting (FAT) region of focal adhesion kinase is a four-helix bundle that binds paxillin. *Nat Struct Biol* **9**(2): 101-106
- Hayashi K, Madri JA, Yurchenco PD (1992) Endothelial cells interact with the core protein of basement membrane perlecan through beta 1 and beta 3 integrins: an adhesion modulated by glycosaminoglycan. *J Cell Biol* **119**(4): 945-959
- Hehnly H, Xu W, Chen JL, Stamnes M (2010) Cdc42 regulates microtubule-dependent Golgi positioning. *Traffic* **11**(8): 1067-1078
- Heldermon CD, Ohlemiller KK, Herzog ED, Vogler C, Qin E, Wozniak DF, Tan Y, Orrock JL, Sands MS (2010) Therapeutic efficacy of bone marrow transplant, intracranial AAV-mediated gene therapy, or both in the mouse model of MPS IIIB. *Mol Ther* **18**(5): 873-880
- Hemsley KM, Hopwood JJ (2005) Development of motor deficits in a murine model of mucopolysaccharidosis type IIIA (MPS-IIIA). *Behav Brain Res* **158**(2): 191-199
- Herman IM (1993) Actin isoforms. *Curr Opin Cell Biol* **5**(1): 48-55

Heron B, Mikaeloff Y, Froissart R, Caridade G, Maire I, Caillaud C, Levade T, Chabrol B, Feillet F, Ogier H, Valayannopoulos V, Michelakakis H, Zafeiriou D, Lavery L, Wraith E, Danos O, Heard JM, Tardieu M (2011) Incidence and natural history of mucopolysaccharidosis type III in France and comparison with United Kingdom and Greece. *Am J Med Genet A* **155A**(1): 58-68

Hienola A, Tumova S, Kuleskiy E, Rauvala H (2006) N-syndecan deficiency impairs neural migration in brain. *J Cell Biol* **174**(4): 569-580

Higginbotham H, Tanaka T, Brinkman BC, Gleeson JG (2006) GSK3beta and PKCzeta function in centrosome localization and process stabilization during Slit-mediated neuronal repolarization. *Mol Cell Neurosci* **32**(1-2): 118-132

Hochuli M, Wuthrich K, Steinmann B (2003) Two-dimensional NMR spectroscopy of urinary glycosaminoglycans from patients with different mucopolysaccharidoses. *NMR Biomed* **16**(4): 224-236

Hocquemiller M, Vitry S, Bigou S, Bruyere J, Ausseil J, Heard JM (2010) GAP43 overexpression and enhanced neurite outgrowth in mucopolysaccharidosis type IIIB cortical neuron cultures. *J Neurosci Res* **88**(1): 202-213

Hoppeler-Lebel A, Celati C, Bellett G, Mogensen MM, Klein-Hitpass L, Bornens M, Tassin AM (2007) Centrosomal CAP350 protein stabilises microtubules associated with the Golgi complex. *J Cell Sci* **120**(Pt 18): 3299-3308

Hopwood JJ, Morris CP (1990) The mucopolysaccharidoses. Diagnosis, molecular genetics and treatment. *Mol Biol Med* **7**(5): 381-404

Howe AK, Aplin AE, Juliano RL (2002) Anchorage-dependent ERK signaling--mechanisms and consequences. *Curr Opin Genet Dev* **12**(1): 30-35

Howell B, Deacon H, Cassimeris L (1999) Decreasing oncoprotein 18/stathmin levels reduces microtubule catastrophes and increases microtubule polymer in vivo. *J Cell Sci* **112** (Pt 21): 3713-3722

Hubert T, Grimal S, Carroll P, Fichard-Carroll A (2009) Collagens in the developing and diseased nervous system. *Cell Mol Life Sci* **66**(7): 1223-1238

Humphries JD, Byron A, Humphries MJ (2006) Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* **119**(Pt 19): 3901-3903

Hurtado L, Caballero C, Gavilan MP, Cardenas J, Bornens M, Rios RM (2011) Disconnecting the Golgi ribbon from the centrosome prevents directional cell migration and ciliogenesis. *J Cell Biol* **193**(5): 917-933

Infante C, Ramos-Morales F, Fedriani C, Bornens M, Rios RM (1999) GMAP-210, A cis-Golgi network-associated protein, is a minus end microtubule-binding protein. *J Cell Biol* **145**(1): 83-98

- Ingham KC, Brew SA, Atha DH (1990) Interaction of heparin with fibronectin and isolated fibronectin domains. *Biochem J* **272**(3): 605-611
- Iozzo RV (2005) Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(8): 646-656
- Ishikawa R, Kohama K (2007) Actin-binding proteins in nerve cell growth cones. *J Pharmacol Sci* **105**(1): 6-11
- Jaffe AB, Hall A (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 247-269
- Jaglin XH, Chelly J (2009) Tubulin-related cortical dysgeneses: microtubule dysfunction underlying neuronal migration defects. *Trends Genet* **25**(12): 555-566
- Janke C, Kneussel M (2010) Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci* **33**(8): 362-372
- Jen YH, Musacchio M, Lander AD (2009) Glypican-1 controls brain size through regulation of fibroblast growth factor signaling in early neurogenesis. *Neural Dev* **4**: 33
- Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, Platt JL (2002) Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol* **168**(10): 5233-5239
- Kabsch W, Vandekerckhove J (1992) Structure and function of actin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **21**: 49-76
- Kanchanawong P, Shtengel G, Pasapera AM, Ramko EB, Davidson MW, Hess HF, Waterman CM (2010) Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* **468**(7323): 580-584
- Kanekar S, Gent M (2011) Malformations of cortical development. *Semin Ultrasound CT MR* **32**(3): 211-227
- Karageorgos L, Hill B, Bawden MJ, Hopwood JJ (2007) Bovine mucopolysaccharidosis type IIIB. *J Inherit Metab Dis* **30**(3): 358-364
- Karageorgos LE, Isaac EL, Brooks DA, Ravenscroft EM, Davey R, Hopwood JJ, Meikle PJ (1997) Lysosomal biogenesis in lysosomal storage disorders. *Exp Cell Res* **234**(1): 85-97
- Kardon JR, Vale RD (2009) Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(12): 854-865
- Kim DS, Lee JS, Leem JW, Huh YJ, Kim JY, Kim HS, Park IH, Daley GQ, Hwang DY, Kim DW (2010) Robust enhancement of neural differentiation from human ES and iPS cells regardless of their innate difference in differentiation propensity. *Stem Cell Rev* **6**(2): 270-281
- Kim MJ, Cotman SL, Halfter W, Cole GJ (2003) The heparan sulfate proteoglycan agrin modulates neurite outgrowth mediated by FGF-2. *J Neurobiol* **55**(3): 261-277

- Kim SH, Turnbull J, Guimond S (2011) Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol* **209**(2): 139-151
- Klemke RL, Leng J, Molander R, Brooks PC, Vuori K, Cheresch DA (1998) CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. *J Cell Biol* **140**(4): 961-972
- Kodani A, Kristensen I, Huang L, Sutterlin C (2009) GM130-dependent control of Cdc42 activity at the Golgi regulates centrosome organization. *Mol Biol Cell* **20**(4): 1192-1200
- Kodani A, Sutterlin C (2009) A new function for an old organelle: microtubule nucleation at the Golgi apparatus. *EMBO J* **28**(8): 995-996
- Komarova Y, De Groot CO, Grigoriev I, Gouveia SM, Munteanu EL, Schober JM, Honnappa S, Buey RM, Hoogenraad CC, Dogterom M, Borisy GG, Steinmetz MO, Akhmanova A (2009) Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *J Cell Biol* **184**(5): 691-706
- Kroger S, Schroder JE (2002) Agrin in the developing CNS: new roles for a synapse organizer. *News Physiol Sci* **17**: 207-212
- Kumar P, Lyle KS, Gierke S, Matov A, Danuser G, Wittmann T (2009) GSK3beta phosphorylation modulates CLASP-microtubule association and lamella microtubule attachment. *J Cell Biol* **184**(6): 895-908
- Kusano Y, Oguri K, Nagayasu Y, Munesue S, Ishihara M, Saiki I, Yonekura H, Yamamoto H, Okayama M (2000) Participation of syndecan 2 in the induction of stress fiber formation in cooperation with integrin alpha5beta1: structural characteristics of heparan sulfate chains with avidity to COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Exp Cell Res* **256**(2): 434-444
- Lacroix B, van Dijk J, Gold ND, Guizetti J, Aldrian-Herrada G, Rogowski K, Gerlich DW, Janke C (2010) Tubulin polyglutamylated stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J Cell Biol* **189**(6): 945-954
- Lafont F, Prochiantz A, Valenza C, Petitou M, Pascal M, Rouget M, Rousset A (1994) Defined glycosaminoglycan motifs have opposite effects on neuronal polarity in vitro. *Dev Biol* **165**(2): 453-468
- Lafont F, Rouget M, Triller A, Prochiantz A, Rousset A (1992) In vitro control of neuronal polarity by glycosaminoglycans. *Development* **114**(1): 17-29
- Langenbach KJ, Rando TA (2002) Inhibition of dystroglycan binding to laminin disrupts the PI3K/AKT pathway and survival signaling in muscle cells. *Muscle Nerve* **26**(5): 644-653
- Langford-Smith A, Langford-Smith KJ, Jones SA, Wynn RF, Wraith JE, Wilkinson FL, Bigger BW (2011a) Female mucopolysaccharidosis IIIA mice exhibit hyperactivity and a reduced sense of danger in the open field test. *PLoS One* **6**(10): e25717

Langford-Smith A, Malinowska M, Langford-Smith KJ, Wegrzyn G, Jones S, Wynn R, Wraith JE, Wilkinson FL, Bigger BW (2011b) Hyperactive behaviour in the mouse model of mucopolysaccharidosis IIIB in the open field and home cage environments. *Genes Brain Behav* **10**(6): 673-682

Langford-Smith K, Arasaradnam M, Wraith JE, Wynn R, Bigger BW (2010) Evaluation of heparin cofactor II-thrombin complex as a biomarker on blood spots from mucopolysaccharidosis I, IIIA and IIIB mice. *Mol Genet Metab* **99**(3): 269-274

Lansbergen G, Grigoriev I, Mimori-Kiyosue Y, Ohtsuka T, Higa S, Kitajima I, Demmers J, Galjart N, Houtsmuller AB, Grosveld F, Akhmanova A (2006) CLASPs attach microtubule plus ends to the cell cortex through a complex with LL5beta. *Dev Cell* **11**(1): 21-32

Lau AA, Crawley AC, Hopwood JJ, Hemsley KM (2008) Open field locomotor activity and anxiety-related behaviors in mucopolysaccharidosis type IIIA mice. *Behav Brain Res* **191**(1): 130-136

Laukaitis CM, Webb DJ, Donais K, Horwitz AF (2001) Differential dynamics of alpha 5 integrin, paxillin, and alpha-actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells. *J Cell Biol* **153**(7): 1427-1440

Lawrence R, Brown JR, Al-Mafraji K, Lamanna WC, Beitel JR, Boons GJ, Esko JD, Crawford BE (2012) Disease-specific non-reducing end carbohydrate biomarkers for mucopolysaccharidoses. *Nat Chem Biol* **8**(2): 197-204

Legate KR, Wickstrom SA, Fassler R (2009) Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev* **23**(4): 397-418

Lehman TJ, Miller N, Norquist B, Underhill L, Keutzer J (2011) Diagnosis of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology (Oxford)* **50 Suppl 5**: v41-48

Lei WL, Xing SG, Deng CY, Ju XC, Jiang XY, Luo ZG (2012) Laminin/beta1 integrin signal triggers axon formation by promoting microtubule assembly and stabilization. *Cell Res* **22**(6): 954-972

Leiss M, Beckmann K, Giros A, Costell M, Fassler R (2008) The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Curr Opin Cell Biol* **20**(5): 502-507

Lemonnier T, Blanchard S, Toli D, Roy E, Bigou S, Froissart R, Rouvet I, Vitry S, Heard JM, Bohl D (2011) Modeling neuronal defects associated with a lysosomal disorder using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet* **20**(18): 3653-3666

LeWitt PA, Rezai AR, Leehey MA, Ojemann SG, Flaherty AW, Eskandar EN, Kostyk SK, Thomas K, Sarkar A, Siddiqui MS, Tatter SB, Schwalb JM, Poston KL, Henderson JM, Kurlan RM, Richard IH, Van Meter L, Sapan CV, Durrant MJ, Kaplitt MG, Feigin A (2011) AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol* **10**(4): 309-319

- Li H, Malani N, Hamilton SR, Schlachterman A, Bussadori G, Edmonson SE, Shah R, Arruda VR, Mingozzi F, Wright JF, Bushman FD, High KA (2011) Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model. *Blood* **117**(12): 3311-3319
- Li HH, Yu WH, Rozengurt N, Zhao HZ, Lyons KM, Anagnostaras S, Fanselow MS, Suzuki K, Vanier MT, Neufeld EF (1999) Mouse model of Sanfilippo syndrome type B produced by targeted disruption of the gene encoding alpha-N-acetylglucosaminidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25): 14505-14510
- Li HH, Zhao HZ, Neufeld EF, Cai Y, Gomez-Pinilla F (2002) Attenuated plasticity in neurons and astrocytes in the mouse model of Sanfilippo syndrome type B. *J Neurosci Res* **69**(1): 30-38
- Lieberman AP, Puertollano R, Raben N, Slaugenhaupt S, Walkley SU, Ballabio A (2012) Autophagy in lysosomal storage disorders. *Autophagy* **8**(5): 719-730
- Lim ST, Longley RL, Couchman JR, Woods A (2003) Direct binding of syndecan-4 cytoplasmic domain to the catalytic domain of protein kinase C alpha (PKC alpha) increases focal adhesion localization of PKC alpha. *J Biol Chem* **278**(16): 13795-13802
- Lin L, McCroskery S, Ross JM, Chak Y, Neuhuber B, Daniels MP (2010) Induction of filopodia-like protrusions by transmembrane agrin: role of agrin glycosaminoglycan chains and Rho-family GTPases. *Exp Cell Res* **316**(14): 2260-2277
- Liu G, Guibao CD, Zheng J (2002) Structural insight into the mechanisms of targeting and signaling of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* **22**(8): 2751-2760
- Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH (2000) Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* **113** (Pt 20): 3563-3571
- Loirand G, Pacaud P (2010) The role of Rho protein signaling in hypertension. *Nat Rev Cardiol* **7**(11): 637-647
- Lowe M (2011) Structural organization of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* **23**(1): 85-93
- Lowery LA, Van Vactor D (2009) The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(5): 332-343
- Luna A, Matas OB, Martinez-Menarguez JA, Mato E, Duran JM, Ballesta J, Way M, Egea G (2002) Regulation of protein transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum by CDC42 and N-WASP. *Mol Biol Cell* **13**(3): 866-879
- Lyon M, Rushton G, Askari JA, Humphries MJ, Gallagher JT (2000) Elucidation of the structural features of heparan sulfate important for interaction with the Hep-2 domain of fibronectin. *J Biol Chem* **275**(7): 4599-4606
- Maeda N, Ishii M, Nishimura K, Kamimura K (2011) Functions of chondroitin sulfate and heparan sulfate in the developing brain. *Neurochem Res* **36**(7): 1228-1240

- Mahalingam K, Janani S, Priya S, Elango EM, Sundari RM (2004) Diagnosis of mucopolysaccharidoses: how to avoid false positives and false negatives. *Indian J Pediatr* **71**(1): 29-32
- Mahalingam Y, Gallagher JT, Couchman JR (2007) Cellular adhesion responses to the heparin-binding (HepII) domain of fibronectin require heparan sulfate with specific properties. *J Biol Chem* **282**(5): 3221-3230
- Maher PA, Pasquale EB, Wang JY, Singer SJ (1985) Phosphotyrosine-containing proteins are concentrated in focal adhesions and intercellular junctions in normal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(19): 6576-6580
- Malinowska M, Wilkinson FL, Langford-Smith KJ, Langford-Smith A, Brown JR, Crawford BE, Vanier MT, Gryniewicz G, Wynn RF, Wraith JE, Wegrzyn G, Bigger BW (2010) Genistein improves neuropathology and corrects behaviour in a mouse model of neurodegenerative metabolic disease. *PLoS One* **5**(12): e14192
- Manneville JB, Jehanno M, Etienne-Manneville S (2010) Dlg1 binds GKAP to control dynein association with microtubules, centrosome positioning, and cell polarity. *J Cell Biol* **191**(3): 585-598
- Margolis RU, Margolis RK, Chang LB, Preti C (1975) Glycosaminoglycans of brain during development. *Biochemistry* **14**(1): 85-88
- Marks WJ, Jr., Bartus RT, Siffert J, Davis CS, Lozano A, Boulis N, Vitek J, Stacy M, Turner D, Verhagen L, Bakay R, Watts R, Guthrie B, Jankovic J, Simpson R, Tagliati M, Alterman R, Stern M, Baltuch G, Starr PA, Larson PS, Ostrem JL, Nutt J, Kieburtz K, Kordower JH, Olanow CW (2010) Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol* **9**(12): 1164-1172
- Marra P, Salvatore L, Mironov A, Jr., Di Campli A, Di Tullio G, Trucco A, Beznoussenko G, Mironov A, De Matteis MA (2007) The biogenesis of the Golgi ribbon: the roles of membrane input from the ER and of GM130. *Mol Biol Cell* **18**(5): 1595-1608
- Martin PT, Sanes JR (1997) Integrins mediate adhesion to agrin and modulate agrin signaling. *Development* **124**(19): 3909-3917
- Matas OB, Martinez-Menarguez JA, Egea G (2004) Association of Cdc42/N-WASP/Arp2/3 signaling pathway with Golgi membranes. *Traffic* **5**(11): 838-846
- Matsuki T, Matthews RT, Cooper JA, van der Brug MP, Cookson MR, Hardy JA, Olson EC, Howell BW (2010) Reelin and stk25 have opposing roles in neuronal polarization and dendritic Golgi deployment. *Cell* **143**(5): 826-836
- Matsuyama A, Shimazu T, Sumida Y, Saito A, Yoshimatsu Y, Seigneurin-Berny D, Osada H, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, Horinouchi S, Yoshida M (2002) In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J* **21**(24): 6820-6831
- McCarty DM, DiRosario J, Gulaid K, Killedar S, Oosterhof A, van Kuppevelt TH, Martin PT, Fu H (2011) Differential distribution of heparan sulfate glycoforms and elevated expression

of heparan sulfate biosynthetic enzyme genes in the brain of mucopolysaccharidosis IIIB mice. *Metab Brain Dis* **26**(1): 9-19

McCroskery S, Bailey A, Lin L, Daniels MP (2009) Transmembrane agrin regulates dendritic filopodia and synapse formation in mature hippocampal neuron cultures. *Neuroscience* **163**(1): 168-179

McGlynn R, Dobrenis K, Walkley SU (2004) Differential subcellular localization of cholesterol, gangliosides, and glycosaminoglycans in murine models of mucopolysaccharide storage disorders. *J Comp Neurol* **480**(4): 415-426

McKean PG, Vaughan S, Gull K (2001) The extended tubulin superfamily. *J Cell Sci* **114**(Pt 15): 2723-2733

Meikle PJ, Brooks DA, Ravenscroft EM, Yan M, Williams RE, Jaunzems AE, Chataway TK, Karageorgos LE, Davey RC, Boulter CD, Carlsson SR, Hopwood JJ (1997) Diagnosis of lysosomal storage disorders: evaluation of lysosome-associated membrane protein LAMP-1 as a diagnostic marker. *Clin Chem* **43**(8 Pt 1): 1325-1335

Miller DL, Ortega S, Bashayan O, Basch R, Basilico C (2000) Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol Cell Biol* **20**(6): 2260-2268

Miller PM, Folkmann AW, Maia AR, Efimova N, Efimov A, Kaverina I (2009) Golgi-derived CLASP-dependent microtubules control Golgi organization and polarized trafficking in motile cells. *Nat Cell Biol* **11**(9): 1069-1080

Mimori-Kiyosue Y, Shiina N, Tsukita S (2000a) Adenomatous polyposis coli (APC) protein moves along microtubules and concentrates at their growing ends in epithelial cells. *J Cell Biol* **148**(3): 505-518

Mimori-Kiyosue Y, Shiina N, Tsukita S (2000b) The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr Biol* **10**(14): 865-868

Miner JH, Yurchenco PD (2004) Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 255-284

Mingozzi F, Hasbrouck NC, Basner-Tschakarjan E, Edmonson SA, Hui DJ, Sabatino DE, Zhou S, Wright JF, Jiang H, Pierce GF, Arruda VR, High KA (2007) Modulation of tolerance to the transgene product in a nonhuman primate model of AAV-mediated gene transfer to liver. *Blood* **110**(7): 2334-2341

Mitchison T, Kirschner M (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**(5991): 237-242

Mogensen MM, Tucker JB, Mackie JB, Prescott AR, Nathke IS (2002) The adenomatous polyposis coli protein unambiguously localizes to microtubule plus ends and is involved in establishing parallel arrays of microtubule bundles in highly polarized epithelial cells. *J Cell Biol* **157**(6): 1041-1048

- Mohammadi M, Olsen SK, Ibrahimi OA (2005) Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**(2): 107-137
- Mohammed EE, Snella EM, Rutz-Mendicino MM, Echevarria FD, Awedikian R, Whitley EM, Ellinwood NM (2012) Accelerated clinical disease and pathology in mucopolysaccharidosis type IIIB and GalNAc transferase double knockout mice. *Mol Genet Metab* **107**(1-2): 129-135
- Moissoglu K, Schwartz MA (2006) Integrin signalling in directed cell migration. *Biol Cell* **98**(9): 547-555
- Moog U, van Mierlo I, van Schrojenstein Lantman-de Valk HM, Spaapen L, Maaskant MA, Curfs LM (2007) Is Sanfilippo type B in your mind when you see adults with mental retardation and behavioral problems? *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **145C**(3): 293-301
- Moore CJ, Winder SJ (2010) Dystroglycan versatility in cell adhesion: a tale of multiple motifs. *Cell Commun Signal* **8**: 3
- Morgan MR, Humphries MJ, Bass MD (2007) Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(12): 957-969
- Morrison EE, Askham J, Clissold P, Markham AF, Meredith DM (1997a) Expression of beta-catenin and the adenomatous polyposis coli tumour suppressor protein in mouse neocortical cells in vitro. *Neurosci Lett* **235**(3): 129-132
- Morrison EE, Askham JM, Clissold P, Markham AF, Meredith DM (1997b) The cellular distribution of the adenomatous polyposis coli tumour suppressor protein in neuroblastoma cells is regulated by microtubule dynamics. *Neuroscience* **81**(2): 553-563
- Muenzer J (2011) Overview of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology (Oxford)* **50 Suppl 5**: v4-12
- Murrey HE, Hsieh-Wilson LC (2008) The chemical neurobiology of carbohydrates. *Chem Rev* **108**(5): 1708-1731
- Musch A, Cohen D, Kreitzer G, Rodriguez-Boulan E (2001) cdc42 regulates the exit of apical and basolateral proteins from the trans-Golgi network. *EMBO J* **20**(9): 2171-2179
- Myers JP, Robles E, Ducharme-Smith A, Gomez TM (2012) Focal adhesion kinase modulates Cdc42 activity downstream of positive and negative axon guidance cues. *J Cell Sci* **125**(Pt 12): 2918-2929
- Nakai H, Montini E, Fuess S, Storm TA, Meuse L, Finegold M, Grompe M, Kay MA (2003) Helper-independent and AAV-ITR-independent chromosomal integration of double-stranded linear DNA vectors in mice. *Mol Ther* **7**(1): 101-111
- Nakajima K (2007) Control of tangential/non-radial migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Neurochem Int* **51**(2-4): 121-131

- Nakamura N (2010) Emerging new roles of GM130, a cis-Golgi matrix protein, in higher order cell functions. *J Pharmacol Sci* **112**(3): 255-264
- Nakayama AY, Harms MB, Luo L (2000) Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* **20**(14): 5329-5338
- Nathke IS, Adams CL, Polakis P, Sellin JH, Nelson WJ (1996) The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration. *J Cell Biol* **134**(1): 165-179
- Neufeld EF, Muenzer J (2001) The mucopolysaccharidoses. In *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds), McGraw-Hill edn, 136, pp 3421-3452. New York: SSIEM and Kluwer Academic Publishers
- Nicholson C, Sykova E (1998) Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci* **21**(5): 207-215
- Nishida N, Xie C, Shimaoka M, Cheng Y, Walz T, Springer TA (2006) Activation of leukocyte beta2 integrins by conversion from bent to extended conformations. *Immunity* **25**(4): 583-594
- Nishimura K, Ishii M, Kuraoka M, Kamimura K, Maeda N (2010) Opposing functions of chondroitin sulfate and heparan sulfate during early neuronal polarization. *Neuroscience* **169**(4): 1535-1547
- Nishimura T, Yamaguchi T, Kato K, Yoshizawa M, Nabeshima Y, Ohno S, Hoshino M, Kaibuchi K (2005) PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nat Cell Biol* **7**(3): 270-277
- Nobes CD, Hall A (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**(1): 53-62
- O'Callaghan P, Sandwall E, Li JP, Yu H, Ravid R, Guan ZZ, van Kuppevelt TH, Nilsson LN, Ingelsson M, Hyman BT, Kalimo H, Lindahl U, Lannfelt L, Zhang X (2008) Heparan sulfate accumulation with Abeta deposits in Alzheimer's disease and Tg2576 mice is contributed by glial cells. *Brain Pathol* **18**(4): 548-561
- O'Connor LT, Lauterborn JC, Gall CM, Smith MA (1994) Localization and alternative splicing of agrin mRNA in adult rat brain: transcripts encoding isoforms that aggregate acetylcholine receptors are not restricted to cholinergic regions. *J Neurosci* **14**(3 Pt 1): 1141-1152
- Ohmi K, Greenberg DS, Rajavel KS, Ryazantsev S, Li HH, Neufeld EF (2003) Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4): 1902-1907

- Ohmi K, Kudo LC, Ryazantsev S, Zhao HZ, Karsten SL, Neufeld EF (2009) Sanfilippo syndrome type B, a lysosomal storage disease, is also a tauopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(20): 8332-8337
- Ohmi K, Zhao HZ, Neufeld EF (2011) Defects in the medial entorhinal cortex and dentate gyrus in the mouse model of Sanfilippo syndrome type B. *PLoS One* **6**(11): e27461
- Okina E, Manon-Jensen T, Whiteford JR, Couchman JR (2009) Syndecan proteoglycan contributions to cytoskeletal organization and contractility. *Scand J Med Sci Sports* **19**(4): 479-489
- Osmani N, Vitale N, Borg JP, Etienne-Manneville S (2006) Scrib controls Cdc42 localization and activity to promote cell polarization during astrocyte migration. *Curr Biol* **16**(24): 2395-2405
- Ozand PT, Thompson JN, Gascon GG, Sarvepalli SB, Rahbeeni Z, Nester MJ, Brismar J (1994) Sanfilippo type D presenting with acquired language disorder but without features of mucopolysaccharidosis. *J Child Neurol* **9**(4): 408-411
- Palazzo AF, Cook TA, Alberts AS, Gunderson GG (2001a) mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol* **3**(8): 723-729
- Palazzo AF, Eng CH, Schlaepfer DD, Marcantonio EE, Gunderson GG (2004) Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science* **303**(5659): 836-839
- Palazzo AF, Joseph HL, Chen YJ, Dujardin DL, Alberts AS, Pfister KK, Vallee RB, Gunderson GG (2001b) Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Curr Biol* **11**(19): 1536-1541
- Palmer KJ, Hughes H, Stephens DJ (2009) Specificity of cytoplasmic dynein subunits in discrete membrane-trafficking steps. *Mol Biol Cell* **20**(12): 2885-2899
- Pankov R, Yamada KM (2002) Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* **115**(Pt 20): 3861-3863
- Parkinson-Lawrence EJ, Shandala T, Prodoehl M, Plew R, Borlace GN, Brooks DA (2010) Lysosomal storage disease: revealing lysosomal function and physiology. *Physiology (Bethesda)* **25**(2): 102-115
- Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA (2010) Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(9): 633-643
- Pasapera AM, Schneider IC, Rericha E, Schlaepfer DD, Waterman CM (2010) Myosin II activity regulates vinculin recruitment to focal adhesions through FAK-mediated paxillin phosphorylation. *J Cell Biol* **188**(6): 877-890
- Peng H, Shah W, Holland P, Carbonetto S (2008) Integrins and dystroglycan regulate astrocyte wound healing: the integrin beta1 subunit is necessary for process extension and orienting the microtubular network. *Dev Neurobiol* **68**(5): 559-574

- Perdiz D, Mackeh R, Pous C, Baillet A (2011) The ins and outs of tubulin acetylation: more than just a post-translational modification? *Cell Signal* **23**(5): 763-771
- Peris L, Thery M, Faure J, Saoudi Y, Lafanechere L, Chilton JK, Gordon-Weeks P, Galjart N, Bornens M, Wordeman L, Wehland J, Andrieux A, Job D (2006) Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J Cell Biol* **174**(6): 839-849
- Pilia G, Hughes-Benzie RM, MacKenzie A, Baybayan P, Chen EY, Huber R, Neri G, Cao A, Forabosco A, Schlessinger D (1996) Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nat Genet* **12**(3): 241-247
- Piraud M, Boyer S, Mathieu M, Maire I (1993) Diagnosis of mucopolysaccharidoses in a clinically selected population by urinary glycosaminoglycan analysis: a study of 2,000 urine samples. *Clin Chim Acta* **221**(1-2): 171-181
- Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**(4): 453-465
- Polleux F, Giger RJ, Ginty DD, Kolodkin AL, Ghosh A (1998) Patterning of cortical efferent projections by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* **282**(5395): 1904-1906
- Polleux F, Snider W (2010) Initiating and growing an axon. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(4): a001925
- Polte TR, Hanks SK (1995) Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(23): 10678-10682
- Pompe T, Starruss J, Bobeth M, Pompe W (2006) Modeling of pattern development during fibronectin nanofibril formation. *Biointerphases* **1**(3): 93-97
- Poon VY, Klassen MP, Shen K (2008) UNC-6/netrin and its receptor UNC-5 locally exclude presynaptic components from dendrites. *Nature* **455**(7213): 669-673
- Preisinger C, Short B, De Corte V, Bruyneel E, Haas A, Kopajtich R, Gettemans J, Barr FA (2004) YSK1 is activated by the Golgi matrix protein GM130 and plays a role in cell migration through its substrate 14-3-3zeta. *J Cell Biol* **164**(7): 1009-1020
- Pullikuth AK, Catling AD (2007) Scaffold mediated regulation of MAPK signaling and cytoskeletal dynamics: a perspective. *Cell Signal* **19**(8): 1621-1632
- Puthenveedu MA, Bachert C, Puri S, Lanni F, Linstedt AD (2006) GM130 and GRASP65-dependent lateral cisternal fusion allows uniform Golgi-enzyme distribution. *Nat Cell Biol* **8**(3): 238-248
- Radner S, Banos C, Bachay G, Li YN, Hunter DD, Brunken WJ, Yee KT (2012) beta2 and gamma3 laminins are critical cortical basement membrane components: Ablation of Lamb2 and Lamc3 genes disrupts cortical lamination and produces dysplasia. *Dev Neurobiol*

- Ramirez IB, Lowe M (2009) Golgins and GRASPs: holding the Golgi together. *Semin Cell Dev Biol* **20**(7): 770-779
- Randall DR, Colobong KE, Hemmelgarn H, Sinclair GB, Hetty E, Thomas A, Bodamer OA, Volkmar B, Fernhoff PM, Casey R, Chan AK, Mitchell G, Stockler S, Melancon S, Rupar T, Clarke LA (2008) Heparin cofactor II-thrombin complex: a biomarker of MPS disease. *Mol Genet Metab* **94**(4): 456-461
- Randlett O, Poggi L, Zolessi FR, Harris WA (2011) The oriented emergence of axons from retinal ganglion cells is directed by laminin contact in vivo. *Neuron* **70**(2): 266-280
- Rauch U (2004) Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain. *Cell Mol Life Sci* **61**(16): 2031-2045
- Redeker V, Le Caer JP, Rossier J, Prome JC (1991) Structure of the polyglutamyl side chain posttranslationally added to alpha-tubulin. *J Biol Chem* **266**(34): 23461-23466
- Reiner O, Sapir T (2009) Polarity regulation in migrating neurons in the cortex. *Mol Neurobiol* **40**(1): 1-14
- Reuss B, von Bohlen und Halbach O (2003) Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res* **313**(2): 139-157
- Rhiner C, Hengartner MO (2006) Sugar antennae for guidance signals: syndecans and glypicans integrate directional cues for navigating neurons. *ScientificWorldJournal* **6**: 1024-1036
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**(5651): 1704-1709
- Rios RM, Sanchis A, Tassin AM, Fedriani C, Bornens M (2004) GMAP-210 recruits gamma-tubulin complexes to cis-Golgi membranes and is required for Golgi ribbon formation. *Cell* **118**(3): 323-335
- Rivero S, Cardenas J, Bornens M, Rios RM (2009) Microtubule nucleation at the cis-side of the Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. *EMBO J* **28**(8): 1016-1028
- Rodriguez A, Webster P, Ortego J, Andrews NW (1997) Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol* **137**(1): 93-104
- Ronca F, Andersen JS, Paech V, Margolis RU (2001) Characterization of Slit protein interactions with glypican-1. *J Biol Chem* **276**(31): 29141-29147
- Roy E, Bruyere J, Flamant P, Bigou S, Ausseil J, Vitry S, Heard JM (2012) GM130 gain-of-function induces cell pathology in a model of lysosomal storage disease. *Hum Mol Genet* **21**(7): 1481-1495

- Ryazantsev S, Yu WH, Zhao HZ, Neufeld EF, Ohmi K (2007) Lysosomal accumulation of SCMAS (subunit c of mitochondrial ATP synthase) in neurons of the mouse model of mucopolysaccharidosis III B. *Mol Genet Metab* **90**(4): 393-401
- Sagne C, Gasnier B (2008) Molecular physiology and pathophysiology of lysosomal membrane transporters. *J Inherit Metab Dis*
- Salaycik KJ, Fagerstrom CJ, Murthy K, Tulu US, Wadsworth P (2005) Quantification of microtubule nucleation, growth and dynamics in wound-edge cells. *J Cell Sci* **118**(Pt 18): 4113-4122
- Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD (2011) Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(7)
- Sasisekharan R, Raman R, Prabhakar V (2006) Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans. *Annu Rev Biomed Eng* **8**: 181-231
- Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT (1995) Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol* **130**(5): 1181-1187
- Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P (1994) Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* **372**(6508): 786-791
- Schliwa M, Woehlke G (2003) Molecular motors. *Nature* **422**(6933): 759-765
- Schmoranzer J, Fawcett JP, Segura M, Tan S, Vallee RB, Pawson T, Gundersen GG (2009) Par3 and dynein associate to regulate local microtubule dynamics and centrosome orientation during migration. *Curr Biol* **19**(13): 1065-1074
- Schoch S, Deak F, Konigstorfer A, Mozhayeva M, Sara Y, Sudhof TC, Kavalali ET (2001) SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science* **294**(5544): 1117-1122
- Schwamborn JC, Puschel AW (2004) The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat Neurosci* **7**(9): 923-929
- Schwarzbauer JE, DeSimone DW (2011) Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(7)
- Seemann J, Jokitalo EJ, Warren G (2000) The role of the tethering proteins p115 and GM130 in transport through the Golgi apparatus in vivo. *Mol Biol Cell* **11**(2): 635-645
- Serrels B, Serrels A, Brunton VG, Holt M, McLean GW, Gray CH, Jones GE, Frame MC (2007) Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol* **9**(9): 1046-1056
- Shelly M, Cancedda L, Heilshorn S, Sumbre G, Poo MM (2007) LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell* **129**(3): 565-577

- Shi Q, Boettiger D (2003) A novel mode for integrin-mediated signaling: tethering is required for phosphorylation of FAK Y397. *Mol Biol Cell* **14**(10): 4306-4315
- Simonaro CM (2010) Cartilage and chondrocyte pathology in the mucopolysaccharidoses: The role of glycosaminoglycan-mediated inflammation. *J Pediatr Rehabil Med* **3**(2): 85-88
- Smith LJ, Baldo G, Wu S, Liu Y, Whyte MP, Giugliani R, Elliott DM, Haskins ME, Ponder KP (2012) Pathogenesis of lumbar spine disease in mucopolysaccharidosis VII. *Mol Genet Metab*
- Stanco A, Szekeres C, Patel N, Rao S, Campbell K, Kreidberg JA, Polleux F, Anton ES (2009) Netrin-1-alpha3beta1 integrin interactions regulate the migration of interneurons through the cortical marginal zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(18): 7595-7600
- Stapp MA, Daley WP, Bernstein AM, Pal-Ghosh S, Tadvalkar G, Shashurin A, Palsen S, Jurjus RA, Larsen M (2010) Syndecan-1 regulates cell migration and fibronectin fibril assembly. *Exp Cell Res* **316**(14): 2322-2339
- Stiess M, Maghelli N, Kapitein LC, Gomis-Ruth S, Wilsch-Brauninger M, Hoogenraad CC, Tolic-Norrelykke IM, Bradke F (2010) Axon extension occurs independently of centrosomal microtubule nucleation. *Science* **327**(5966): 704-707
- Stone DM, Nikolics K (1995) Tissue- and age-specific expression patterns of alternatively spliced agrin mRNA transcripts in embryonic rat suggest novel developmental roles. *J Neurosci* **15**(10): 6767-6778
- Stringer SE, Gallagher JT (1997) Heparan sulphate. *Int J Biochem Cell Biol* **29**(5): 709-714
- Sutterlin C, Polishchuk R, Pecot M, Malhotra V (2005) The Golgi-associated protein GRASP65 regulates spindle dynamics and is essential for cell division. *Mol Biol Cell* **16**(7): 3211-3222
- Takada Y, Ye X, Simon S (2007) The integrins. *Genome Biol* **8**(5): 215
- Takahashi M, Shibata H, Shimakawa M, Miyamoto M, Mukai H, Ono Y (1999) Characterization of a novel giant scaffolding protein, CG-NAP, that anchors multiple signaling enzymes to centrosome and the golgi apparatus. *J Biol Chem* **274**(24): 17267-17274
- Takahashi M, Yamagiwa A, Nishimura T, Mukai H, Ono Y (2002) Centrosomal proteins CG-NAP and kendrin provide microtubule nucleation sites by anchoring gamma-tubulin ring complex. *Mol Biol Cell* **13**(9): 3235-3245
- Tanaka TU (2010) Kinetochore-microtubule interactions: steps towards bi-orientation. *EMBO J* **29**(24): 4070-4082
- Tang D, Yuan H, Wang Y (2010) The role of GRASP65 in Golgi cisternal stacking and cell cycle progression. *Traffic* **11**(6): 827-842
- Tanzer ML (2006) Current concepts of extracellular matrix. *J Orthop Sci* **11**(3): 326-331

- Thompson JN, Jones MZ, Dawson G, Huffman PS (1992) N-acetylglucosamine 6-sulphatase deficiency in a Nubian goat: a model of Sanfilippo syndrome type D (mucopolysaccharidosis IIID). *J Inherit Metab Dis* **15**(5): 760-768
- Thyberg J, Moskalewski S (1993) Relationship between the Golgi complex and microtubules enriched in detyrosinated or acetylated alpha-tubulin: studies on cells recovering from nocodazole and cells in the terminal phase of cytokinesis. *Cell Tissue Res* **273**(3): 457-466
- Timpl R, Tisi D, Talts JF, Andac Z, Sasaki T, Hohenester E (2000) Structure and function of laminin LG modules. *Matrix Biol* **19**(4): 309-317
- Tomar A, Schlaepfer DD (2009) Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility. *Curr Opin Cell Biol* **21**(5): 676-683
- Tondeleir D, Vandekerckhove J, Ampe C (2011) Actin and actin filaments. *eLS John Wiley & Sons, Ltd: Chichester*
- Torii S, Kusakabe M, Yamamoto T, Maekawa M, Nishida E (2004) Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev Cell* **7**(1): 33-44
- Toutant M, Costa A, Studler JM, Kadare G, Carnaud M, Girault JA (2002) Alternative splicing controls the mechanisms of FAK autophosphorylation. *Mol Cell Biol* **22**(22): 7731-7743
- Tylki-Szymanska A, Jurecka A, Zuber Z, Rozdzynska A, Marucha J, Czartoryska B (2011) Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis II from 3 months of age: a 3-year follow-up. *Acta Paediatr* **101**(1): e42-47
- Vaisberg EA, Grissom PM, McIntosh JR (1996) Mammalian cells express three distinct dynein heavy chains that are localized to different cytoplasmic organelles. *J Cell Biol* **133**(4): 831-842
- Valiente M, Marin O (2010) Neuronal migration mechanisms in development and disease. *Curr Opin Neurobiol* **20**(1): 68-78
- Valstar MJ, Marchal JP, Grootenhuis M, Colland V, Wijburg FA (2011) Cognitive development in patients with Mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo syndrome). *Orphanet J Rare Dis* **6**: 43
- Valstar MJ, Ruijter GJ, van Diggelen OP, Poorthuis BJ, Wijburg FA (2008) Sanfilippo syndrome: A mini-review. *J Inherit Metab Dis* **31**(2): 240-252
- van Echten G, Iber H, Stotz H, Takatsuki A, Sandhoff K (1990) Uncoupling of ganglioside biosynthesis by Brefeldin A. *Eur J Cell Biol* **51**(1): 135-139
- van Meel E, Klumperman J (2008) Imaging and imagination: understanding the endo-lysosomal system. *Histochem Cell Biol* **129**(3): 253-266
- Vanhaesebroeck B, Alessi DR (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* **346 Pt 3**: 561-576

- Vicente-Manzanares M, Koach MA, Whitmore L, Lamers ML, Horwitz AF (2008) Segregation and activation of myosin IIB creates a rear in migrating cells. *J Cell Biol* **183**(3): 543-554
- Villani GR, Di Domenico C, Musella A, Cecere F, Di Napoli D, Di Natale P (2009) Mucopolysaccharidosis IIIB: oxidative damage and cytotoxic cell involvement in the neuronal pathogenesis. *Brain Res* **1279**: 99-108
- Villani GR, Gargiulo N, Faraonio R, Castaldo S, Gonzalez YRE, Di Natale P (2007) Cytokines, neurotrophins, and oxidative stress in brain disease from mucopolysaccharidosis IIIB. *J Neurosci Res* **85**(3): 612-622
- Vinogradova T, Miller PM, Kaverina I (2009) Microtubule network asymmetry in motile cells: role of Golgi-derived array. *Cell Cycle* **8**(14): 2168-2174
- Visigalli I, Delai S, Politi LS, Di Domenico C, Cerri F, Mrak E, D'Isa R, Ungaro D, Stok M, Sanvito F, Mariani E, Staszewsky L, Godi C, Russo I, Cecere F, Del Carro U, Rubinacci A, Brambilla R, Quattrini A, Di Natale P, Ponder K, Naldini L, Biffi A (2010) Gene therapy augments the efficacy of hematopoietic cell transplantation and fully corrects mucopolysaccharidosis type I phenotype in the mouse model. *Blood* **116**(24): 5130-5139
- Vitry S, Ausseil J, Hocquemiller M, Bigou S, Dos Santos Coura R, Heard JM (2009) Enhanced degradation of synaptophysin by the proteasome in mucopolysaccharidosis type IIIB. *Mol Cell Neurosci* **41**(1): 8-18
- Vitry S, Bruyere J, Hocquemiller M, Bigou S, Ausseil J, Colle MA, Prevost MC, Heard JM (2010) Storage vesicles in neurons are related to Golgi complex alterations in mucopolysaccharidosis IIIB. *Am J Pathol* **177**(6): 2984-2999
- Vuori K, Hirai H, Aizawa S, Ruoslahti E (1996) Introduction of p130cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol* **16**(6): 2606-2613
- Vynios DH, Karamanos NK, Tsiganos CP (2002) Advances in analysis of glycosaminoglycans: its application for the assessment of physiological and pathological states of connective tissues. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **781**(1-2): 21-38
- Waite A, Tinsley CL, Locke M, Blake DJ (2009) The neurobiology of the dystrophin-associated glycoprotein complex. *Ann Med* **41**(5): 344-359
- Walkley SU (1998) Cellular pathology of lysosomal storage disorders. *Brain Pathol* **8**(1): 175-193
- Walkley SU (2007) Pathogenic mechanisms in lysosomal disease: a reappraisal of the role of the lysosome. *Acta Paediatr Suppl* **96**(455): 26-32
- Walkley SU (2009) Pathogenic cascades in lysosomal disease-Why so complex? *J Inherit Metab Dis* **32**(2): 181-189

- Wang D, Fawcett J (2012) The perineuronal net and the control of CNS plasticity. *Cell Tissue Res* **349**(1): 147-160
- Wang R, Clark RA, Mosher DF, Ren XD (2005) Fibronectin's central cell-binding domain supports focal adhesion formation and Rho signal transduction. *J Biol Chem* **280**(31): 28803-28810
- Watanabe N, Araki W, Chui DH, Makifuchi T, Ihara Y, Tabira T (2004) Glypican-1 as an Abeta binding HSPG in the human brain: its localization in DIG domains and possible roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *FASEB J* **18**(9): 1013-1015
- Wegrzyn G, Jakobkiewicz-Banecka J, Narajczyk M, Wisniewski A, Piotrowska E, Gabig-Ciminska M, Kloska A, Slominska-Wojewodzka M, Korzon-Burakowska A, Wegrzyn A (2010) Why are behaviors of children suffering from various neuronopathic types of mucopolysaccharidoses different? *Med Hypotheses* **75**(6): 605-609
- Wei JH, Seemann J (2009) Remodeling of the Golgi structure by ERK signaling. *Commun Integr Biol* **2**(1): 35-36
- Welch MD, Mallavarapu A, Rosenblatt J, Mitchison TJ (1997) Actin dynamics in vivo. *Curr Opin Cell Biol* **9**(1): 54-61
- Wen Y, Eng CH, Schmoranzler J, Cabrera-Poch N, Morris EJ, Chen M, Wallar BJ, Alberts AS, Gundersen GG (2004) EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat Cell Biol* **6**(9): 820-830
- Whitelock JM, Melrose J, Iozzo RV (2008) Diverse cell signaling events modulated by perlecan. *Biochemistry* **47**(43): 11174-11183
- Wilcox-Adelman SA, Denhez F, Goetinck PF (2002) Syndecan-4 modulates focal adhesion kinase phosphorylation. *J Biol Chem* **277**(36): 32970-32977
- Wilkinson FL, Holley RJ, Langford-Smith KJ, Badrinath S, Liao A, Langford-Smith A, Cooper JD, Jones SA, Wraith JE, Wynn RF, Merry CL, Bigger BW (2012) Neuropathology in mouse models of mucopolysaccharidosis type I, IIIA and IIIB. *PLoS One* **7**(4): e35787
- Winchester B (2001) Are there useful biochemical markers of disease activity in lysosomal storage diseases? *J Inherit Metab Dis* **24 Suppl 2**: 52-56; discussion 45-56
- Winder SJ (2001) The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem Sci* **26**(2): 118-124
- Witczak O, Skalhegg BS, Keryer G, Bornens M, Tasken K, Jahnsen T, Orstavik S (1999) Cloning and characterization of a cDNA encoding an A-kinase anchoring protein located in the centrosome, AKAP450. *EMBO J* **18**(7): 1858-1868
- Witte H, Neukirchen D, Bradke F (2008) Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol* **180**(3): 619-632

- Wozniak MJ, Bola B, Brownhill K, Yang YC, Levakova V, Allan VJ (2009) Role of kinesin-1 and cytoplasmic dynein in endoplasmic reticulum movement in VERO cells. *J Cell Sci* **122**(Pt 12): 1979-1989
- Wu H, Xiong WC, Mei L (2010) To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development* **137**(7): 1017-1033
- Wu X, Kodama A, Fuchs E (2008) ACF7 regulates cytoskeletal-focal adhesion dynamics and migration and has ATPase activity. *Cell* **135**(1): 137-148
- Wu X, Reddy DS (2012) Integrins as receptor targets for neurological disorders. *Pharmacol Ther* **134**(1): 68-81
- Xian X, Gopal S, Couchman JR (2010) Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. *Cell Tissue Res* **339**(1): 31-46
- Xiang Y, Wang Y (2010) GRASP55 and GRASP65 play complementary and essential roles in Golgi cisternal stacking. *J Cell Biol* **188**(2): 237-251
- Xiong JP, Stehle T, Zhang R, Joachimiak A, Frech M, Goodman SL, Arnaout MA (2002) Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* **296**(5565): 151-155
- Yadav S, Linstedt AD (2011) Golgi positioning. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(5)
- Yanagishita M, Hascall VC (1992) Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* **267**(14): 9451-9454
- Yi JJ, Barnes AP, Hand R, Polleux F, Ehlers MD (2010) TGF-beta signaling specifies axons during brain development. *Cell* **142**(1): 144-157
- Yogalingam G, Pollard T, Gliddon B, Jolly RD, Hopwood JJ (2002) Identification of a mutation causing mucopolysaccharidosis type IIIA in New Zealand Huntaway dogs. *Genomics* **79**(2): 150-153
- Yoneda A, Lendorf ME, Couchman JR, Multhaupt HA (2012) Breast and ovarian cancers: a survey and possible roles for the cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Histochem Cytochem* **60**(1): 9-21
- Yoshimura S, Yoshioka K, Barr FA, Lowe M, Nakayama K, Ohkuma S, Nakamura N (2005) Convergence of cell cycle regulation and growth factor signals on GRASP65. *J Biol Chem* **280**(24): 23048-23056
- Yoshimura SI, Nakamura N, Barr FA, Misumi Y, Ikehara Y, Ohno H, Sakaguchi M, Mihara K (2001) Direct targeting of cis-Golgi matrix proteins to the Golgi apparatus. *J Cell Sci* **114**(Pt 22): 4105-4115
- Young WW, Jr., Lutz MS, Mills SE, Lechler-Osborn S (1990) Use of brefeldin A to define sites of glycosphingolipid synthesis: GA2/GM2/GD2 synthase is trans to the brefeldin A block. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(17): 6838-6842

- Yvon AM, Wadsworth P (2000) Region-specific microtubule transport in motile cells. *J Cell Biol* **151**(5): 1003-1012
- Zafeiriou DI, Savvopoulou-Augoustidou PA, Sewell A, Papadopoulou F, Badouraki M, Vargiami E, Gombakis NP, Katzos GS (2001) Serial magnetic resonance imaging findings in mucopolysaccharidosis IIIB (Sanfilippo's syndrome B). *Brain Dev* **23**(6): 385-389
- Zheng Y, Rozengurt N, Ryazantsev S, Kohn DB, Satake N, Neufeld EF (2003) Treatment of the mouse model of mucopolysaccharidosis I with retrovirally transduced bone marrow. *Mol Genet Metab* **79**(4): 233-244
- Zhou YW, Thomason DB, Gullberg D, Jarrett HW (2006) Binding of laminin alpha1-chain LG4-5 domain to alpha-dystroglycan causes tyrosine phosphorylation of syntrophin to initiate Rac1 signaling. *Biochemistry* **45**(7): 2042-2052
- Ziegler WH, Liddington RC, Critchley DR (2006) The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol* **16**(9): 453-460
- Zimmerman B, Volberg T, Geiger B (2004) Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading. *Cell Motil Cytoskeleton* **58**(3): 143-159
- Zmuda JF, Rivas RJ (1998) The Golgi apparatus and the centrosome are localized to the sites of newly emerging axons in cerebellar granule neurons in vitro. *Cell Motil Cytoskeleton* **41**(1): 18-38
- Zumbrunn J, Kinoshita K, Hyman AA, Nathke IS (2001) Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation. *Curr Biol* **11**(1): 44-49