

Exercice d'analyse de documents scientifiques

La mucopolysaccharidose (MPS), une maladie génétique lysosomale

1) Approche par microscopie à épifluorescence

Question 1 – Quelle est ici l'utilité du marquage au DAPI ?

Le DAPI se fixe de façon spécifique aux noyaux des cellules : il permet ainsi de localiser les cellules. Un champ observé en noir, sans fluorescence du LysoTracker, aurait pu être interprété comme l'absence de lysosomes actifs ou bien l'absence de cellules dans le secteur observé sous le microscope. En s'assurant que le champ analysé contient des cellules, il est alors possible d'interpréter l'absence de coloration rouge comme des cellules aux lysosomes non actifs ou absents.

Question 2 – Justifiez l'emploi du LysoTracker pour détecter en particulier les lysosomes de la cellule.

Le LysoTracker diffuse dans tout le volume cellulaire. Cependant, il ne fluoresce que lorsqu'il est en milieu acide. Or un lysosome, lorsqu'il entre en activité, active une pompe à protons qui diminue son pH interne. Les autres organites de la cellule ont un pH autour de 7, voire 8 : même contenant du LysoTracker, le fluorochrome n'émettra pas de fluorescence rouge. Seul les lysosomes en activité seront donc fluorescents (en rouge).

Question 3 – Analysez les résultats. Proposez 2 hypothèses expliquant l'augmentation de fluorescence des MPS.

Dans l'image du témoin, peu de fluorescence rouge est visible bien qu'il y ait de nombreuses cellules (une trentaine environ). La mesure de fluorescence totale des fibroblastes du document 1B montre une valeur de 8 000 AU, qui nous sert de référence.

Dans le cas des cellules MPS, l'image au microscope à épifluorescence montre une forte émission rouge, sous la forme de nombreux petits grains. La fluorescence totale mesurée est plus de 5 fois supérieure au témoin, atteignant 42 000 AU. Cette fluorescence indique une forte activité des lysosomes dans le cas des fibroblastes MPS.

Cette forte fluorescence pourrait être due :

- hypothèse 1 : à une hausse du nombre de lysosomes en activité
- hypothèse 2 : à un volume plus important des lysosomes en activité.

Notons que les 2 hypothèses ne sont pas incompatibles.

2) Approche par cytométrie 2D

Question 4 – Analysez et interprétez rigoureusement les résultats.

Analyse

L'analyse conduite par l'équipe italienne repose sur un échantillon de $2 \cdot 10^5$ fibroblastes, ce qui représente un nombre satisfaisant pour l'analyse statistique.

Le diamètre moyen des lysosomes est proche de $0,5 \mu\text{m}$ dans les deux situations (témoin ou atteint de MPS) : il n'y a pas de différence significative entre les 2 populations de fibroblastes car l'indice statistique p du test de Student est supérieur à 0,05.

Concernant le nombre de lysosomes par fibroblaste, la valeur médiane obtenue chez le témoin est située en-dehors de la « box » de la médiane des MPS et il en est de même pour la médiane des MPS qui sont de la « box » témoin : il y a donc une différence significative entre les 2 situations.

La culture témoin présente environ 15 lysosomes par fibroblaste contre 24, soit 60 % de plus, pour les fibroblastes des patients atteints par la maladie MPS.

Interprétation

La déficience dans la digestion des GAG induit une accumulation des lysosomes ayant fusionné avec des vésicules d'endocytose de GAG. Ces lysosomes devenus saturés ne sont sans doute plus fonctionnels et de nouveaux lysosomes sont produits par les cellules.

Cela conduit ainsi à une accumulation de lysosomes saturés en GAG non digérés : le nombre de lysosomes augmente alors, mais cela ne touche pas leur volume moyen.

Question 5 – Indiquez si ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec le LysoTracker.

Oui, ces résultats concordent avec ceux du LysoTracker et permettent de valider l'hypothèse 1.