

# Lysosomes et Maladies de Surcharge Lysosomale

par Dominique P. Germain

Correspondance et tirés-à-part : Docteur Dominique P. Germain, Département de Génétique, Hôpital Européen Georges Pompidou, 20, rue Leblanc, 75015 Paris, France

Fax : + 33 1 56 09 24 80 – dominique.germain@hop.egp.ap-hop-paris.fr

Reçu le 11 mars 2002

## RÉSUMÉ

Les maladies de surcharge lysosomales sont des erreurs innées du métabolisme. Différents sous-groupes ont été définis en fonction de la voie métabolique touchée et du substrat accumulé, tandis que de nouvelles entités continuent d'être décrites. Ce sont des pathologies graves avec un spectre clinique hétérogène, comprenant des atteintes viscérales, osseuses et neurologiques, et une morbi-mortalité très élevée. Les gènes codant pour la plupart des enzymes lysosomales ont été identifiés et de nombreux modèles animaux ont été obtenus. Ces dernières décennies, les maladies de surcharge lysosomale ont été des modèles pour le développement de nouvelles thérapies cellu-

lares et moléculaires des erreurs innées du métabolisme. Les études précliniques sur des systèmes *in vitro* et des modèles animaux ont permis le développement de la greffe de moelle osseuse, la déplétion en substrat, l'enzymothérapie substitutive et la thérapie génique comme possibles options thérapeutiques pour certaines maladies lysosomales. Le but de cette revue est de présenter la biologie des hydrolases acides et des protéines membranaires lysosomales, de décrire la classification en intégrant les entités récemment décrites et de brièvement présenter les progrès thérapeutiques majeurs pour deux lipidoses : la maladie de Gaucher et la maladie de Fabry.

## SUMMARY

Lysosomal storage disorders (LSDs) are monogenic inborn errors of metabolism. Various groups have been delineated according to the affected pathway and the accumulated substrate, and new entities are still being identified. They are severe disorders with a heterogeneous clinical spectrum encompassing visceral, skeletal and neurologic involvement, and high morbidity and mortality. Most of the genes encoding the lysosomal enzymes have been cloned, and animal models have been obtained for almost each disease. In the last decades, LSDs have been models for the development of molecular and cellular therapies for inhe-

rited metabolic diseases. Studies in preclinical *in vitro* systems and animal models have allowed the successful development of bone marrow transplantation, substrate deprivation, enzyme replacement therapy and gene transfer methods as therapeutic options for several LSDs. The aim of this paper is to review the biology of acid hydrolases and lysosomal membrane proteins, to describe the systematic classification of LSDs and the most recently identified entities, and to briefly review novel therapeutic approaches for two lipidoses: Gaucher disease and Fabry disease.

## LES LYSOSOMES

### A. Données générales

Les lysosomes sont des organites subcellulaires délimités par une membrane, essentiels à la dégradation des macromolécules en monomères par la cellule. Les lysosomes sont également impliqués dans une série d'autres processus cellulaires tels que la protéolyse des protéines immunogéniques (Marks *et al.*, 1995), le remodelage

osseux (Saftig *et al.*, 2000) et la régulation de facteurs de croissance et d'hormones (Renfrew *et al.*, 1991). Les lysosomes sont présents à différents niveaux selon les tissus et les types cellulaires (Olsen *et al.*, 1993). La biogenèse de ces organites est un processus complexe nécessitant l'expression coordonnée de nombreuses protéines solubles et membranaires (Karageorgos *et al.*, 1997).

Les lysosomes contiennent un grand nombre d'enzymes servant à la digestion intracellulaire contrôlée des macromolécules (De Duve *et al.*, 1966). Une qua-

rantaine d'enzymes hydrolytiques ont été identifiées, parmi lesquelles des protéases, des nucléases, des glycosidases, des lipases, des phospholipases, des phosphatases et des sulfatases (de Duve, 1983). Toutes sont des hydrolases acides ayant une activité optimale pour un pH voisin de 5, maintenu dans la lumière des lysosomes grâce à une pompe à protons ATP-dépendante, localisée dans la membrane lysosomale (Winchester, 2001). Les hydrolases acides sont capables de dégrader diverses macromolécules telles que des glycoprotéines, des glycosaminoglycane et des lipides complexes en leurs constituants de base : acides aminés, monosaccharides, acides gras et acides inorganiques. Les constituants de bas poids moléculaire diffusent ensuite à travers la membrane lysosomale vers le cytosol, soit par diffusion passive soit par l'intermédiaire de protéines de transport de la membrane lysosomale (Verheijen *et al.*, 1999) (Kalatzis *et al.*, 2001). Les produits finaux de la digestion peuvent alors être relargués par la cellule ou être réutilisés pour la production d'énergie ou la synthèse de macromolécules (Gieselmann, 1995).

La plupart des gènes codant pour les protéines lysosomales ont été caractérisés comme possédant des promoteurs de type « gènes de ménage » (Dyan, 1986), relativement peu régulés, dont l'expression ubiquitaire assure un niveau de base à leurs activités enzymatiques respectives (Karageorgos *et al.*, 1997). Les enzymes lysosomales sont synthétisées dans toutes les cellules de l'organisme (à l'exception des globules rouges). Leur déficit est également ubiquitaire.

## B. Protéines lysosomales solubles

Les hydrolases solubles destinées aux lysosomes sont synthétisées au niveau des polyribosomes accolés au versant cytosolique de la membrane du réticulum endoplasmique (Fig. 1). Leur translocation à travers la membrane du réticulum endoplasmique vers sa lumière lors de la traduction est médiée par un peptide signal hydrophobe aminoterminal (von Heijne, 1985). L'addition covalente de sucres aux protéines est l'une des principales fonctions de biosynthèse du réticulum. Dans la lumière du réticulum endoplasmique, les polypeptides sont glyco-

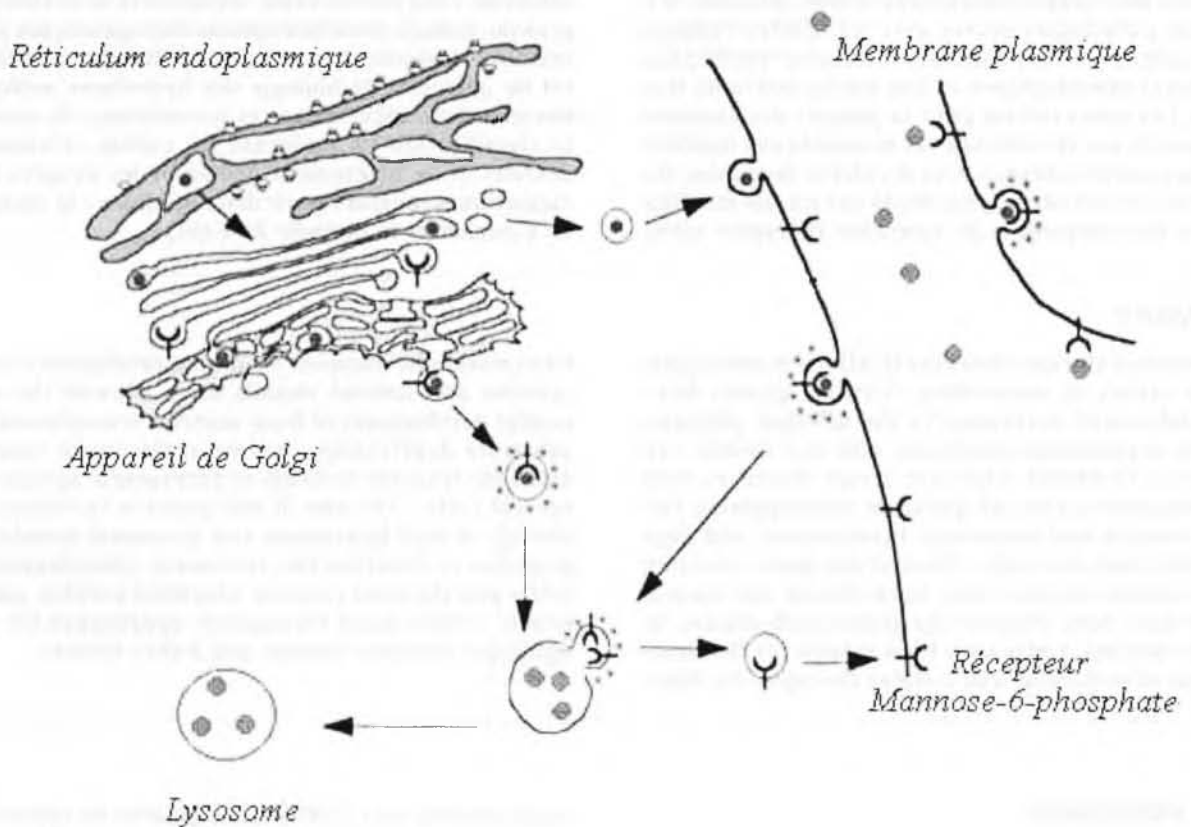


FIG. 1. – Biosynthèse des hydrolases acides lysosomales. Les enzymes sont synthétisées au niveau des polyribosomes accolés au réticulum endoplasmique. Leur translocation à travers la membrane du réticulum est médiée par un peptide signal. Dans la lumière du réticulum endoplasmique, les polypeptides sont glycosylés de manière co-traductionnelle, le peptide signal est clivé et les chaînes latérales oligosaccharidiques subissent des modifications. Les enzymes sont ensuite transportées dans des vésicules vers l'appareil de Golgi où elles subissent une série de modifications post-traductionnelles sur leurs chaînes latérales oligosaccharidiques, laissant exposés des résidus mannose-6-phosphate. Ce monoester est essentiel pour la liaison aux récepteurs mannose-6-phosphate (R-M6P) médiant la suite du transport vésiculaire des enzymes, dans des vésicules recouvertes de clathrine bourgeonnant à partir du compartiment trans de l'appareil de Golgi, qui fusionnent rapidement avec un endolysosome. Les enzymes lysosomales se dissocient de leurs récepteurs après acidification dans le compartiment pré-lysosomal et sont délivrées aux lysosomes, tandis que les récepteurs mannose-6-phosphate sont recyclés vers la membrane de l'appareil de Golgi mais aussi vers la membrane plasmique cellulaire. D'après L. Poenaru, modifié.

sylés de manière co-traductionnelle par transfert en bloc à partir d'un dolichol, d'oligosaccharides préassemblés (composés de N-acétylglucosamine, de mannose et de glucose, et contenant au total 14 résidus glucidiques, exemple :  $\text{Glc}_3\text{Man}_6\text{GlcNac}_2$ ). Le transfert est catalysé par une enzyme membranaire, dont le site actif est exposé sur la face luminale de la membrane du réticulum endoplasmique. L'oligosaccharide est dit N-glycosylant puisqu'il est toujours transféré au groupement  $\text{NH}_2$  de la chaîne latérale d'un résidu asparagine (Asn) de la protéine. Les résidus Asn cibles sont ceux des *sequons* ou sites consensus de N-glycosylation : Asn-Xaa-Ser ou Asn-Xaa-Thr (où Xaa représente un acide aminé quelconque, excepté la proline ou l'acide aspartique) (Gavel *et al.*, 1990). Deux types d'oligosaccharides N-glycosylants, les oligosaccharides complexes et les oligosaccharides riches en mannose, sont présents sur les glycoprotéines matures. Dans la lumière du réticulum endoplasmique, le peptide signal est clivé et les chaînes latérales oligosaccharidiques subissent une première modification, avant la fin de la traduction, par élimination d'un résidu glucose par l'enzyme glycosidase I puis d'un autre glucose par la glycosidase II. Une molécule *chaperone* liée à la membrane, la calnexine, se lie alors aux hydrolases solubles jusqu'à leur repliement correct, après lequel les hydrolases sont libérées de la calnexine par hydrolyse du troisième résidu glucose par la glycosidase II. Enfin, de un à trois résidus mannose sont éliminés des chaînes oligosaccharidiques, par les mannosidases du réticulum endoplasmique (Brulke, 1996).

Les premières étapes de cette biosynthèse sont communes à celles des glycoprotéines sécrétées et les deux classes de protéines sont transportées ensemble dans des vésicules vers l'appareil de Golgi où elles subissent une série de modifications post-traductionnelles.

Dans la partie *cis* de l'appareil de Golgi, les hydrolases lysosomales sont reconnues par une UDP-N-acétylglucosamine-1-phosphotransférase (ou phosphotransférase) qui transfère un N-acétylglucosamine-1-phosphate sur les résidus mannose des chaînes latérales oligosaccharidiques. Dans une deuxième étape, le résidu N-acétylglucosamine est éliminé par une enzyme phosphodiester glycosidase (N-acétylglucosamine-1-phosphodiester-N-acétyl-glucosaminidase) laissant alors exposé un résidu mannose-6-phosphate. Ce monoester est essentiel pour la liaison de haute affinité aux récepteurs mannose-6-phosphate (R-M6P) médiant la suite du transport vésiculaire jusqu'aux lysosomes. Deux récepteurs mannose-6-phosphate, ayant des affinités et des poids moléculaires (46 et 300 kDa) distincts, sont connus.

Les enzymes liées aux récepteurs mannose 6-phosphate se concentrent dans des vésicules recouvertes de clathrine bourgeonnant à partir du compartiment tardif (*trans*) de l'appareil de Golgi. Les vésicules fusionnent rapidement avec un endolysosome. Les enzymes lysosomales se dissocient de leurs récepteurs après acidification dans ce compartiment pré-lysosomal et sont ainsi délivrées aux lysosomes, tandis que les récepteurs mannose-6-phosphate sont recyclés vers la membrane de l'appareil de Golgi mais aussi vers la membrane plas-

mique cellulaire. Après avoir atteint le lysosome, la plupart des enzymes subissent une protéolyse limitée qui aboutit à l'enzyme mature.

Les bases moléculaires de l'adressage sélectif vers les endolysosomes reposent sur le fait que les groupements Mannose-6-Phosphate ne sont ajoutés qu'aux seules hydrolases lysosomales dans l'appareil de Golgi. L'étape critique pour un tri correct des enzymes lysosomales nouvellement synthétisées est la reconnaissance par la phosphotransférase. Comme il n'y a pas de similitude apparente entre les enzymes lysosomales, on ne sait toujours pas quelle structure commune est reconnue par cette enzyme. Le domaine d'interaction moléculaire pourrait dépendre de la structure tridimensionnelle.

Une fraction des hydrolases synthétisées est par ailleurs sécrétée. Ces enzymes pourront être secondairement recaptées par des cellules à distance, par l'intermédiaire des récepteurs mannose-6-phosphate présents à la membrane plasmique, et adressées dans des vésicules recouvertes de clathrine vers les lysosomes (Fig. 1).

### C. Protéines membranaires lysosomales

Les protéines membranaires associées aux lysosomes (*Lysosome-associated membrane proteins*, LAMP), LAMP-1 et LAMP-2 sont des constituants majeurs de la membrane lysosomale. Ces deux glycoprotéines membranaires de type I sont constituées d'un domaine luminal, séparé d'un court domaine cytoplasmique (de 10 à 11 acides aminés) par un seul domaine transmembranaire. La majorité de ces protéines est associée aux lysosomes, mais une petite fraction (< 5 %) des molécules LAMP-1 et LAMP-2 est aussi exprimée à la surface cellulaire (Furuta *et al.*, 1999).

Le déficit en protéine LAMP-2 est responsable de la maladie de Danon (surcharge lysosomale en glycogène avec activité maltase acide normale), caractérisée par une cardiomyopathie, une myopathie et un retard mental variable. Le marqueur histopathologique de la maladie est l'existence de vacuoles intracytoplasmiques contenant un matériel autophagique et du glycogène dans les cellules des muscles squelettiques et cardiaque (Nishino *et al.*, 2000). Les souris déficitaires en protéines lamp-2 ont une myopathie vacuolaire proche de la maladie humaine avec, en outre, une vacuolisation pancréatique, hépatocytaire, endothéliale et leucocytaire. Ces souris représentent un modèle valable d'étude de la maladie de Danon et permettront l'étude du rôle de LAMP-2 dans les processus d'autophagie (Saftig *et al.*, 2001).

Les protéines intégrales de la membrane lysosomale (*lysosomal integral membrane proteins*) LIMP-I et LIMP-II sont des glycoprotéines membranaires de type III contenant 4 et 2 domaines transmembranaires respectivement (Winchester, 2001).

Si les premières étapes de biosynthèse sont communes avec les protéines lysosomales solubles, aucune des protéines membranaires LAMP ou LIMP ne va acquérir le marqueur de reconnaissance mannose-6-phosphate. Elles sont donc transportées aux lysosomes par une voie indépendante des récepteurs mannose-6-phosphate.

Un transport direct du réseau *trans* de l'appareil de Golgi vers les lysosomes a été démontré pour les protéines LAMP-1. Il a été montré qu'un motif tyrosine (YQT1) du domaine cytoplasmique de la protéine LAMP-1 est essentiel pour l'adressage direct aux lysosomes via les endosomes sans passage par la membrane plasmique (Obermuller *et al.*, 2002). Les protéines LAMP ne sont pas converties en formes solubles, une fois dans le lysosome.

Les protéines LAMP-1 (Meikle *et al.*, 1997) et LAMP-2 (Hua *et al.*, 1998) font l'objet d'études pour un dépistage diagnostique des différentes maladies de surcharge lysosomale.

La phosphatase acide lysosomale (EC 3.1.3.2.), est une protéine membranaire lysosomale. Un motif tyrosine (YRHV) de son court domaine cytoplasmique est nécessaire pour son transport aux lysosomes via la membrane plasmique (Obermuller *et al.*, 2002). Dans le lysosome, le domaine carboxy-terminal d'ancrage à la membrane est clivé par protéolyse pour donner la phosphatase acide mature.

La  $\beta$ -glucosidase acide (E.C. 3.2.1.45), hydrolase lysosomale déficiente dans la maladie de Gaucher, présente la particularité d'être associée à la membrane lysosomale. Elle n'est pas phosphorylée sur ses résidus manose et est donc triée indépendamment de la voie des récepteurs du mannose-6-phosphate (Aerts *et al.*, 1988; van Weely *et al.*, 1990). La  $\beta$ -glucosidase acide ne subit pas de protéolyse dans le lysosome.

## II. MALADIES DE SURCHARGE LYSOSOMALE

Les maladies de surcharge lysosomale sont un groupe de pathologies héréditaires du métabolisme, regroupant une cinquantaine d'affections génétiques distinctes, de transmission généralement autosomique récessive. Chaque maladie prise individuellement est rare, en dehors de certains groupes ethniques (prévalence élevée de la maladie de Gaucher et de la maladie de Tay-Sachs dans la population juive ashkénaze...) mais, considérées dans leur ensemble, ces affections ont une prévalence importante, estimée à un cas pour 7 000 naissances (Meikle *et al.*, 1999).

Les maladies lysosomales sont souvent dévastatrices pour les patients et leurs familles. Elles représentent en outre un problème de santé important, avec un coût considérable pour la communauté en raison des nécessaires hospitalisations, interventions médico-chirurgicales et prises en charge paramédicales visant à améliorer la qualité et l'espérance de vie des malades (Meikle *et al.*, 1999) (Germain, 1999).

Si un diagnostic prénatal est possible pour la plupart des maladies lysosomales (Brady *et al.*, 1971), aucun test global de dépistage prénatal n'est actuellement disponible en routine (Chen *et al.*, 1999). Un diagnostic précoce favorisant la mise en place d'interventions thérapeutiques, des efforts ont été récemment accomplis pour le développement de méthodes de criblage de ces maladies en période néonatale (Chen *et al.*, 1999), et

plusieurs programmes sont actuellement en développement, étudiant l'intérêt du dosage des protéines structurales de la membrane lysosomale ou des saposines pour un criblage néonatal (Meikle *et al.*, 1997; Hua *et al.*, 1998) (Chang *et al.*, 2000) (Winchester, 2001).

Le trait commun à toutes ces maladies est le déficit en une protéine lysosomale intervenant dans le catabolisme de molécules complexes : glycolipides, glycoprotéines, mucopolysaccharides. L'absence de dégradation de ces molécules entraîne leur accumulation et déclenche une cascade d'anomalies métaboliques se répercutant sur le fonctionnement des cellules. La plupart des enzymes lysosomales sont des exohydrolases agissant de façon séquentielle, en dégradant les substrats par élimination successive de leurs résidus terminaux. Le déficit d'une seule enzyme entraîne ainsi un blocage de la voie métabolique, puisque le résidu terminal non éliminé rend le substrat inaccessible à l'hydrolyse par d'autres enzymes lysosomales.

L'accumulation du substrat non dégradé conduit à l'engorgement des lysosomes (Fig. 2), des cellules et des tissus, aboutissant à une maladie de surcharge (Gieselmann, 1995). Il est admis que la surcharge métabolique peut résulter en une augmentation de la taille et du nombre des lysosomes de 1 % jusqu'à 50 % du volume cellulaire total (Fig. 2) (Karageorgos *et al.*, 1997; Meikle *et al.*, 1997).



FIG. 2. – Observation en microscopie électronique d'une biopsie rénale d'un patient atteint de maladie de Fabry. Surcharge glycolipidique majeure dans les lysosomes d'un podocyte avec nombreuses inclusions lamellaires pseudo-myéliniques. (X 20000). Document : Pr Patrick Bruneval (Anatomopathologie, HEGP, Paris).

La complexité de la biogénèse lysosomale est reflétée par le nombre important d'états pathologiques attribués à un dysfonctionnement lysosomal. Les protéines déficitaires peuvent être les enzymes lysosomales (hydrolases acides), leurs activateurs protéiques (cofacteurs) ou encore les systèmes de transport de ces enzymes à travers différents compartiments subcellulaires. Les maladies lysosomales sont très hétérogènes. Si la plupart d'entre elles se manifestent par des symptômes sévères dès la petite enfance, d'autres ont des manifestations cliniques plus tardives, dues à la persistance d'une faible activité enzymatique résiduelle. Les maladies lysosomales sont habituellement classées selon la voie métabolique affectée et la nature du substrat accumulé (Tableau I).

### III. DONNÉES RÉCENTES

#### A. Nouvelles entités

Le nombre des maladies lysosomales est en expansion constante, au fur et à mesure que l'origine lysosomale de différentes pathologies est découverte. Ainsi a-t-il été montré récemment que les mutations du gène de la cathepsine K, une cystéine protéase lysosomale localisée exclusivement dans les ostéoclastes, étaient responsables de la pycnodysostose, une variété de dysplasie osseuse avec petite taille, ostéosclérose et déformation du crâne (Gelb *et al.*, 1996). La cystinose, néphropathie héréditaire de transmission autosomique récessive caractérisée cliniquement par un syndrome de Fanconi, est due à des mutations du gène *CTNS* (Town *et al.*, 1998) codant pour la cystinosine, une protéine à sept domaines transmembranaires de la membrane lysosomale. La cystinosine porte une séquence GYDQL à sa partie carboxy-terminale, responsable, avec un motif YFPQA localisé au niveau de sa troisième boucle cytoplasmique, de l'adressage de la protéine vers la membrane lysosomale. Les mutations du gène *CTNS* entraînent un défaut de transport avec accumulation intralysosomale de cystine. Le syndrome de Papillon-Lefèvre et le syndrome de Haim-Munk, génodermatoses caractérisées par une kératodermie palmo-plantaire et une maladie parodontale, sont des affections alléliques dues à des mutations du gène de la cathepsine C (Hart *et al.*, 1999), une protéase lysosomale. Les céroïdes lipofuchsinoses sont un groupe de maladies neurodégénératives, caractérisées cliniquement par une cécité, une épilepsie et un retard psychomoteur et, sur le plan histopathologique, par une perte neuronale et l'accumulation d'un matériel de surcharge autofluorescent dans les lysosomes des neurones. Huit localisations génétiques ont été isolées (*CLN1-8*) et cinq gènes (*CLN1*, *CLN2*, *CLN3*, *CLN5*, *CLN8*) ont été clonés et leurs produits caractérisés. La protéine *CLN1* est une palmitoyl protéine thioestérase lysosomale (Vesa *et al.*, 1995), et *CLN2* est une tripeptidyl-peptidase I lysosomale (Sleat *et al.*, 1997). La fonction des protéines codées par les gènes *CLN3*, *CLN5* et *CLN8* reste incon-

Maladie	Déficit enzymatique
<b>1- Sphingolipidoses</b>	
Maladie d'Austin	Déficit multiple en sulfatases
Maladie de Fabry	α-galactosidase A
Maladie de Farber	Céramidase acide
Maladie de Gaucher	β-glucosidase acide
Maladie de Krabbe	Cérébrosidase β-galactosidase
Maladie de Landing	β-galactosidase
Leucodystrophie métachromatique	Arylsulfatase A
Maladie de Niemann-Pick A et B	Sphingomyélinase
Maladie de Schindler	α-N-acetyl-galactosaminidase
Maladie de Tay-Sachs	β-Hexosaminidase A
Maladie de Sandhoff	β-Hexosaminidase A + B
Maladie de Wolman	Lipase acide
<b>2- Mucopolysaccharidoses</b>	
Maladie de Hurler (type IH)	α-L-iduronidase
Maladie de Scheie (type IS)	α-L-iduronidase
Maladie de Hunter (type II)	L-iduronide sulfatase
Maladie de Sanfilippo A (type IIIA)	Sulphamidase
Maladie de Sanfilippo B (type IIIB)	α-N-acetylglucosaminidase
Maladie de Sanfilippo C (type IIIC)	Acétyl CoA : aglucosaminide-N-acétyltransférase
Maladie de Sanfilippo D (type IIID)	N-acétylglucosamine-6-sulfate sulfatase
Maladie de Morquio A	6 sulfate-sulfatase
Maladie de Morquio B	β-galactosidase
Maladie de Maroteaux-Lamy (type VI)	Arylsulfatase B
Maladie de Sly (type VII)	β-glucuronidase
<b>3- Glycoprotéinoses</b>	
α-Mannosidose	α-mannosidase
β-Mannosidose	β-mannosidase
Fucosidose	α-fucosidase
Sialidose	Neuraminidase
Galactosialidose	β-galactosidase et neuraminidase
<b>4- Glycogénoses</b>	
Maladie de Pompe	α-glucosidase
<b>5- Maladies du transport lysosomal</b>	
Mucopolipidose II et III	Phosphotransférase
<b>6- Entités récemment décrites</b>	
Pycnodysostose	Cathepsine K
Maladie de Batten	Palmitoyl protéine thioestérase
Céroïde lipofuscinose classique	Tripeptidyl-peptidase I
Cystinose	Cystinosine
Syndrome de Papillon-Lefèvre	Cathepsine C
Niemann-Pick C1	
Niemann-Pick C2	HE1
Maladie de Danon	LAMP-2

TABLEAU I. – Classification des maladies lysosomales.

nue même si la prédiction de leur séquence suggère une topologie transmembranaire (Wisniewski, 2001).

#### B. Corrélations génotype/phénotype

Les maladies lysosomales présentent une variabilité clinique importante (Beck, 2001). Des sous-types ont été définis en fonction de l'âge de début et de la progression



des symptômes. Trois formes sont généralement distinguées : infantile (sévère), juvénile (intermédiaire) et adulte (mineure). Si une telle classification est utile, il importe de comprendre qu'il existe un large *continuum* dans la sévérité clinique et l'âge de début des symptômes (Germain, 2001).

Le phénotype clinique peut, en partie, être relié aux mutations des différents gènes et à l'activité enzymatique résiduelle qui en résulte. Le clonage et la caractérisation de l'organisation génique de la majorité des gènes responsables des maladies lysosomales (Horowitz *et al.*, 1989) (Kornreich *et al.*, 1989) ont permis l'analyse moléculaire de leurs mutations (Beutler *et al.*, 1996). Ces études peuvent permettre de comprendre les relations entre la structure de l'enzyme et sa fonction, et d'améliorer l'étude des corrélations génotype/phénotype (Germain, 1999).

Les symptômes et la gravité des maladies lysosomales varient depuis des formes débutant en période néonatale, létales dès les premières années de vie jusqu'à des formes chroniques diagnostiquées à l'âge adulte (Cox *et al.*, 1997). Le phénotype peut, en partie, être relié aux différentes mutations des gènes et aux activités enzymatiques résiduelles résultantes (Germain *et al.*, 1996). La détection des mutations et polymorphismes de l'ADN est donc un aspect important de l'investigation de la structure des gènes et de leur fonction, à travers l'identification des régions du gène et de la protéine dont l'atteinte est critique (Durand *et al.*, 1997). La caractérisation de la (des) mutation(s) permet de préciser les corrélations génotype/phénotype, variables selon la maladie et le groupe ethnique étudié, pour améliorer la qualité du conseil génétique. Dans le cas de la maladie de Fabry, l'identification de la mutation en cause permet le dépistage précis des femmes hétérozygotes, conductrices de l'affection (Germain *et al.*, 1996). Ces études moléculaires sont susceptibles d'apporter des données sur l'origine (effet fondateur ou événement mutationnel récurrent) et la fréquence des mutations dans les différents groupes ethniques (Germain, 1999).

### C. Modèles animaux

Les gènes de la plupart des protéines impliquées dans la dégradation des sphingolipides ont été clonés au cours de ces dernières années, permettant ainsi l'amélioration des méthodes de diagnostic et l'étude des corrélations génotype/phénotype.

De nombreux modèles animaux de maladies lysosomales ont été créés à partir de l'invalidation de gènes chez la souris (Suzuki *et al.*, 1998). Ces modèles sont et seront des outils précieux pour l'étude du métabolisme des sphingolipides, de la physiopathologie des sphingolipidoses et des approches thérapeutiques parmi lesquelles l'enzymothérapie substitutive (Barton *et al.*, 1993), la greffe de moelle osseuse (Takenaka *et al.*, 1999) (Takenaka *et al.*, 2000), la thérapie génique (Sugimoto *et al.*, 1995) (Takiyama *et al.*, 1999) (Ziegler *et al.*, 1999) et la déprivation en substrat (Platt *et al.*, 1997).

### D. La maladie de Gaucher et la maladie de Fabry : paradigmes de développement d'interventions thérapeutiques en génétique

Les glycosphingolipides sont des constituants ubiquitaires des membranes des cellules eucaryotes. Ils participent à différents événements de signalisation cellulaire et peuvent contrôler l'activité d'enzymes et de récepteurs des membranes plasmiques (Kolter *et al.*, 1998). La dégradation des glycosphingolipides des membranes plasmiques exige leur transport vésiculaire vers les lysosomes (Sandhoff *et al.*, 1997). Les glycosphingolipides sont dégradés sous l'action d'exohydrolases qui, dans le cas des glycosphingolipides à chaîne oligosaccharidique courte, exigent l'action de protéines activatrices. Cinq protéines activatrices sont connues : l'activateur du GM2 et les quatre saposines ou protéines SAP (*Sphingolipid activator proteins*, SAP-A à D) (Dewji *et al.*, 1987) (Conzelman *et al.*, 1987) (Chang *et al.*, 2000). Les sphingolipidoses sont dues à un défaut de la digestion lysosomale de ces substances (Sandhoff *et al.*, 1997).

La recherche est très active pour le développement de nouvelles thérapies pour deux sphingolipidoses lysosomales. Un traitement spécifique de la maladie de Gaucher, due au déficit en  $\beta$ -glucosidase acide (Brady *et al.*, 1965), basé sur l'administration en perfusions d'une enzyme ciblée aux récepteurs mannose a été développé (Barton *et al.*, 1993) (Hollak *et al.*, 1995) (Belmatoug *et al.*, 1995). L'enzyme, initialement d'origine extractive (alglucérase), a été remplacée en 1996 par une enzyme recombinante (imiglucérase) produite en cellules d'ovaires de hamster chinois (cellules CHO).

Plus récemment est apparue une thérapie enzymatique substitutive ciblée vers les récepteurs mannose-6-phosphate pour les patients atteints de maladie de Fabry, ou déficit en  $\alpha$ -galactosidase A (Tableau I). Des études pré-cliniques *in vitro* (Ioannou *et al.*, 1992) et sur des modèles animaux (Wang *et al.*, 1996) (Ohshima *et al.*, 1997) (Ioannou *et al.*, 2001) ont conduit au développement d'essais cliniques chez l'Homme (Schiffmann *et al.*, 2000) (Eng *et al.*, 2001a).

L'enzymothérapie substitutive représente un progrès thérapeutique majeur pour les patients atteints de maladie de Fabry (Desnick *et al.*, 2001) (Eng *et al.*, 2001b) (Schiffmann *et al.*, 2001), mais soulève dans le même temps de nombreuses questions. L'identification de marqueurs pertinents (cliniques et/ou biologiques), permettant d'apprécier l'efficacité clinique et la sécurité au long cours de ces thérapeutiques, reste un challenge majeur. La question des indications thérapeutiques pour différentes sous-populations de patients, telles que les enfants, en particulier en période présymptomatique, les femmes hétérozygotes et les patients dialysés ou transplantés nous semble également particulièrement pertinente, de même que l'âge idéal d'instauration du traitement, la posologie, et l'intervalle optimal entre deux perfusions (Germain, 2001).

Ces questions soulignent l'intérêt de la poursuite d'études cliniques contrôlées (Desnick, 2001) (Wraith, 2001), et du maintien d'une recherche active dans le



domaine des inhibiteurs enzymatiques (Platt et al., 1997) (Abe et al., 2000) (Platt et al., 2001), des molécules chaperones (Asano et al., 2000) et de la thérapie génique (Ziegler et al., 1999) (Qin et al., 2001) (Barranger et al., 2001).

## BIBLIOGRAPHIE

- Abe A., Arend L. J., Lee L., Lingwood C., Brady R. O. & Shayman J. A., Glycosphingolipid depletion in Fabry disease lymphoblasts with potent inhibitors of glucosylceramide synthase. *Kidney Int.*, 2000, 57, 446-454.
- Aerts J. M. F. G., Schram A. W., Strijland A., van Weely S., Jonsen L.M., Tager J. M. et al. Glucocerebrosidase a lysosomal enzyme that does not undergo oligosaccharide phosphorylation. *Biochem Biophys Acta* 1988, 964, 303-308.
- Asano N., Ishii S., Kizu H., Ikeda K., Yasuda K., Kato A. et al. *In vitro* inhibition and intracellular enhancement of lysosomal alpha-galactosidase A activity in Fabry lymphoblasts by 1-deoxygalactonojirimycin and its derivatives. *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267, 4179-4186.
- Barranger J. M. & Novelli E. A., Gene therapy for lysosomal storage disorders. *Expert. Opin. Biol. Ther.*, 2001, 1, 857-867.
- Barton N. W., Brady R. O. & Dambrosia J. M., Treatment of Gaucher's disease. *N. Engl. J. Med.*, 1993, 328, 1564-1565.
- Beck M., Variable clinical presentation in lysosomal storage disorders. *J. Inher. Metab. Dis.*, 2001, 24, 47-51; discussion 45-46.
- Belmatoug N. & Billette de Villemeur T., Skeletal response to enzyme replacement therapy for type 1 Gaucher disease: a preliminary report of the French experience. *Sem. Hematol.*, 1995, 32, 33-38.
- Beutler E. & Gelbart T., Glucocerebrosidase (Gaucher disease). *Hum. Mutat.*, 1996, 8, 207-213.
- Brady R. O., Kanfer J. N. & Shapiro D., Metabolism of glucocerebrosidase II. Evidence of an enzymatic deficiency in Gaucher's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1965, 18, 221-225.
- Brady R. O., Uhlenendorf B. W. & Jacobson C. B., Fabry's disease: antenatal detection. *Science*, 1971, 172, 174-175.
- Braulke T., Origin of lysosomal proteins. *Subcell. Biochem.*, 1996, 29, 15-49.
- Chang M. H., Bindloss C. A., Grabowski G. A., Qi X., Winchester B., Hopwood J. J., et al. Saposins A, B, C, and D in plasma of patients with lysosomal storage disorders. *Clin. Chem.*, 2000, 46, 167-174.
- Chen C. S., Patterson M. C., Wheatley C. L., O'Brien J. F. & Pagano R. E., Broad screening test for sphingolipid-storage diseases. *Lancet*, 1999, 354, 901-905.
- Conzelman E. & Sandhoff K., Activator proteins for lysosomal glycolipid hydrolysis. *Methods Enzymol* 1987; 138: 792-815.
- Cox T. M. & Schofield J. P., Gaucher's disease: clinical features and natural history. *Baillière's Clinic Haematology*, 1997, 10, 659-687.
- de Duve C., Lysosomes revisited. *Eur. J. Biochem.*, 1983, 137, 391-397.
- de Duve C. & Wattiaux R., Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.*, 1966, 28, 435-92.
- Desnick R., Enzyme replacement and beyond. *J. Inher. Metab. Dis.*, 2001, 24, 251-265.
- Desnick R. J., Wasserstein M. P. & Banikazemi M., Fabry disease ( $\alpha$ -galactosidase A deficiency): renal involvement and enzyme replacement therapy. *Contrib. Nephrol.*, 2001, 136, 174-192.
- Dewji N. N., Wenger D. A. & O'Brien J. S., Nucleotide sequence of cloned cDNA for human sphingolipid activator protein 1 precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 8652-8656.
- Durand P., Lehn P., Callebaut I., Fabrega S., Henriessat B. & Mornon J. P., Active-site motifs of lysosomal acid hydrolases: invariant features of clan GH-A glycosyl hydrolases deduced from hydrophobic cluster analysis. *Glycobiology*, 1997, 7, 277-284.
- Dynan W. S., Promoters for housekeeping genes. *Trends Genet.*, 1986, 2, 196-197.
- Eng C. M., Banikazemi M., Gordon R. E., Goldman M., Phelps R., Kim L. et al. A phase 1/2 clinical trial of enzyme replacement in Fabry disease: pharmacokinetic, substrate clearance, and safety studies. *Am. J. Hum. Genet.*, 2001a; 68: 711-722.
- Eng C. M., Guffon N., Wilcox W. R., Germain D. P., Lee P., Waldeck S. et al. Safety and efficacy of recombinant human  $\alpha$ -galactosidase replacement therapy in Fabry's disease. *N. Engl. J. Med.*, 2001b, 345, 9-16.
- Furuta K., Yang X. L., Chen J. S., Hamilton S. R. & August J. T., Differential expression of the lysosome-associated membrane proteins in normal human tissues. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, 365, 75-82.
- Gavel Y. & von Heijne G., Sequences differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng.*, 1990, 3, 433-442.
- Gelb B. D., Shi G. P., Chapman H. A. & Desnick R. J., Pknydostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science*, 1996, 273, 1236-1238.
- Germain D., Biasotto M., Tosi M., Meo T., Kahn A. & Poenaru L., Fluorescence-assisted mismatch analysis (FAMA) for exhaustive screening of the alpha-galactosidase A gene and detection of carriers in Fabry disease. *Hum. Genet.*, 1996, 98, 719-726.
- Germain D. P., Fabry disease and Gaucher disease : Molecular characterization, genotype/phenotype correlations and therapeutic perspectives. PhD Thesis, Paris, 1999.
- Germain D. P., Maladie de Fabry. *STV*, 2001, 13, 503-512.
- Germain D. P., A new phenotype of Fabry disease with intermediate severity between the classical form and the cardiac variant. *Contrib. Nephrol.*, 2001, 136, 234-240.
- Gieselmann V., Lysosomal storage diseases. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1270, 103-136.
- Hart T. C., Hart P. S., Bowden D. W., Michalec M. D., Callison S. A., Walker S. J. et al. Mutations of the cathepsin C gene are responsible for Papillon-Lefevre syndrome. *J. Med. Genet.*, 1999, 36, 881-887.
- Hollak C. E. M., Aerts J. M., Goudsmit R., Phoa S. S., Ek M., van Weely S. et al., Individualised low-dose  $\alpha$ -glucuronidase therapy for type 1 Gaucher's disease. *Lancet*, 1995, 345, 1474-1478.
- Horowitz M., Wilder S., Horowitz Z., Reiner O., Gelbart T. & Beutler E., The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. *Genomics*, 198, 4, 87-96.
- Hua CT, Hopwood JJ, Carlsson SR, Harris RJ and Meikle PJ. Evaluation of the lysosome-associated membrane protein LAMP-2 as a marker for lysosomal storage disorders. *Clin Chem* 1998; 44: 2094-2102.
- Ioannou YA, Bishop DF and Desnick RJ. Overexpression of human  $\alpha$ -galactosidase A results in its intracellular aggregation, crystallisation in lysosomes, and selective secretion. *J Cell Biol* 1992; 119: 1137-1150.
- Ioannou YA, Zeidner KM, Gordon RE and Desnick RJ. Fabry disease: preclinical studies demonstrate the effectiveness of alpha-galactosidase A replacement in enzyme-deficient mice. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 14-25.
- Kalatzis V, Cherqui S, Antignac C and Gasnier B. Cystinosin, the protein defective in cystinosis, is a H(+)-driven lysosomal cystine transporter. *EMBO J* 2001; 20: 5940-5949.
- Karagorgos L. E., Isaac E. L., Brooks D. A., Ravenscroft E. M., Davey R., Hopwood J. J. et al., Lysosomal biogenesis in

- lysosomal storage disorders. *Exp. Cell Res.*, 1997, 234, 85-97.
- Kolter T. & Sandhoff K., Recent advances in the biochemistry of sphingolipidoses. *Brain Pathol.*, 1998, 8, 79-100.
- Kornreich R., Desnick R. J. & Bishop D. F., Nucleotide sequence of the human alpha-galactosidase A gene. *Nucl. Acids Res.*, 1989, 17, 3301-3302.
- Marks M. S., Roche A., van Donselaar E., Woodruff L., Peters P. J. & Bonifacio J. S., A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the beta chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J. Cell Biol.*, 1995, 131, 351-369.
- Meikle P. J., Brooks D. A., Ravenscroft E. M., Yan M., Williams R. E., Jaunzems A. E. *et al.* Diagnosis of lysosomal storage disorders: evaluation of lysosome-associated membrane protein LAMP-1 as a diagnostic marker. *Clin. Chem.*, 1997, 43, 1325-1335.
- Meikle P. J., Hopwood J. J., Clague A. E. & Carrey W. F., Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*, 1999, 281, 249-254.
- Nishino I., Fu J., Tanji K., Yamada T., Shimojo S., Koori T. *et al.*, Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* 2000, 406, 906-910.
- Obermuller S., Kiecke C., von Figura K. & Honing S., tyrosine motifs of Lamp 1 and LAP determine their direct and indirect targeting to lysosomes. *J. Cell Sci.*, 2002, 115, 185-194.
- Ohshima T., Murray G. J., Swaim W. D., Longenecker G., Quirk J. M., Cardarelli C. O. *et al.*,  $\alpha$ -galactosidase A deficient mice: a model of Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 2540-2544.
- Olsen I., Adams G., Watson G., Chain B. & Abraham D., Multi-level regulation of lysosomal gene expression in lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, 195, 327-335.
- Platt F., Neises G., Reinkensmeier G., Townsend M., Perry V. H., Proia R. *et al.* Prevention of lysosomal storage in Tay-Sachs mice treated with N-butyldeoxynojirimycin. *Science*, 1997, 276, 428-431.
- Platt F. M., Jeyakumar M., Andersson U., Priestman D. A., Dwek R. A., Butters T. D. *et al.* Inhibition of substrate synthesis as a strategy for glycolipid lysosomal storage disease therapy. *J. Inher. Metab. Dis.*, 2001, 24, 275-290.
- Qin G., Takenaka T., Telsch K., Kelley L., Howard T., Levade T. *et al.* Preslective gene therapy for Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98, 3428-3433.
- Renfrew C. A. & Hubbard A. L., Degradation of epidermal growth factor receptor in rat liver. Membrane topology through the lysosomal pathway. *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 21265-21273.
- Saftig P., Hunziker E., Everts V., Jones S., Boyde A., Weh-meyer O. *et al.*, Functions of cathepsin K in bone resorption. Lessons from cathepsin K deficient mice. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2000, 477, 293-303.
- Saftig P., Tanaka Y., Lullmann-Rauch R. & von Figura K., Disease model: LAMP-2 enlightens Danon disease. *Trends Mol. Med.*, 2001, 7: 37-39.
- Sandhoff K. & Kolter T., Biochemistry of glycosphingolipid degradation. *Clin. Chim. Acta*, 1997, 266, 51-61.
- Schiffmann R., Kopp J. B., Austin H. A., Sabnis S., Moore D. F., Weibel T. *et al.* Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2001, 285, 2743-2749.
- Schiffmann R., Murray G. J., Treco D., Daniel P., Selloso-Moura M., Myers M. *et al.* Infusion of alpha-galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 365-370.
- Sleat D. E., Donnelly R. J., Lackland H., Liu C. G., Sohar I., Pulkarkat R. K. *et al.* Association of mutations in a lysosomal protein with classical late-infantile ceroid lipofuscinosis. *Science*, 1997, 277, 1802-1805.
- Sugimoto Y., Aksentjevich I., Murray G. J., Brady R. O., Pastan I. & Gottesman M., Retroviral coexpression of a multidrug resistance gene (MDR1) and human  $\alpha$ -galactosidase A for gene therapy of Fabry disease. *Hum Gene Ther* 1995; 6: 905-915.
- Suzuki K. & Mansson J. E., Animal models of lysosomal diseases: an overview. *J. Inher. Metab. Dis.*, 1998, 21, 540-547.
- Takenaka T., Murray G. J., Qin G., Quirk J. M., Ohshima T., Qasba P. *et al.* Long-term enzyme correction and lipid reduction in multiple organs of primary and secondary transplanted Fabry mice receiving transduced bone marrow cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 7515-7520.
- Takenaka T., Qin G., Brady R. O. & Medin J. A., Circulating alpha-galactosidase A derived from transduced bone marrow cells: relevance for corrective gene transfer for Fabry disease. *Hum. Gene Ther.*, 1999, 10, 1931-1939.
- Takiyama N., Dunigan J. T., Vallor M. J., Kasc R., Sakuraba H. & Barranger J. A., Retrovirus-mediated transfer of human alpha-galactosidase A gene to human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Hum. Gene Ther.*, 1999, 10, 2881-2889.
- Town M., Jean G., Cherqui S., Attard M., Forestier L., Whitmore S. A. *et al.*, A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat. Genet.*, 1998, 18, 319-324.
- van Weely S., Aerts J. M. F. G., van Lecuwen M. B., Heikoop J. C., Donke-Koopman W. E., Barranger J. A. *et al.*, Function of oligosaccharide modification in glucocerebrosidase, a membrane associated lysosomal hydrolase. *Eur. J. Biochem.*, 1990, 191, 669-677.
- Verheijen F. W., Verbeek E., Aula N., Beerens C. E., Havelaar A. C., Joosse M. *et al.*, A new gene, encoding an anion transporter, is mutated in sialic acid storage diseases. *Nat. Genet.*, 1999, 23, 462-465.
- Vcsa J., Hellsten E., Verkruyse L. A., Camp L. A., Rapola J., Santavuori P. *et al.*, Mutations in the palmitoyl protein thioesterase gene causing infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Nature*, 1995, 376, 584-587.
- von Heijne G., Signal sequences: the limit of variation. *J. Mol. Biol.*, 1985, 184, 99-105.
- Wang A. M., Ioannou Y. A., Zeidner K. M., Gotlib R. W., Dikman S., Stewart C. L. *et al.* Fabry disease: generation of a mouse model with  $\alpha$ -galactosidase A deficiency. *Am. J. Hum. Genet.*, 1996, 59, A208.
- Winchester B. G., Lysosomal membrane proteins. *Europ. J. Paediatr. Neurol.*, 2001, 5, 11-9.
- Wisniewski K. E., Phenotypic correlations of neuronal ceroid lipofuscinoses. *Neurology*, 2001, 57, 576-581.
- Wraith J. E., Advances in the treatment of lysosomal storage disease. *Dev. Med. Child. Neurol.*, 2001, 43, 639-646.
- Ziegler R. J., Yew NS, Li C., Cherry M., Berthelette P., Romanczuk H. *et al.* Correction of enzymatic and lysosomal storage defects in Fabry mice by adenovirus-mediated gene transfer. *Hum. Gene Ther.*, 1999, 10, 1667-1682.