

## Maladie de Fabry (déficit en $\alpha$ -galactosidase A) : innovations thérapeutiques récentes

par Dominique P. Germain

Unité de Génétique Clinique. Hôpital Européen Georges Pompidou, 20, rue Leblanc, 75015 Paris

Reçu le 11 mars 2002

### RÉSUMÉ

La maladie de Fabry (MF, OMIM 301500) est une maladie héréditaire du métabolisme, de transmission liée au chromosome X, due au déficit en  $\alpha$ -galactosidase A, une enzyme lysosomale. L'impossibilité de prévenir les dépôts progressifs de glycosphingolipides dans les tissus et le plasma entraîne une morbi-mortalité importante avec cardiomyopathie, accidents vasculaires cérébraux et insuffisance rénale chronique. La prise en charge médicale était jusqu'à présent symptomatique, basée sur l'atténuation partielle des douleurs (carbamazépine, diphénylhydantoïne et gabapentine), la néphroprotection par la prescription d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine en cas de macroalbuminurie, le contrôle d'une

éventuelle hypertension artérielle ou dyslipidémie. La maladie de Fabry répond par ailleurs aux indications habituelles de dialyse et de transplantation chez les patients en insuffisance rénale terminale. La survie du greffon rénal est comparable à celles des autres néphropathies, la récurrence de dépôts de glycosphingolipides étant très rare. La thérapie enzymatique substitutive par  $\alpha$ -galactosidase A a été récemment validée par des essais cliniques contrôlés et semble un traitement sûr et efficace chez les patients atteints de maladie de Fabry. La déplétion en substrats glycosphingolipidiques par de petites molécules inhibitrices et la thérapie génique pourraient représenter des alternatives thérapeutiques pour l'avenir.

### SUMMARY Fabry disease ( $\alpha$ -galactosidase A deficiency): new therapeutic prospects

Fabry disease (FD, OMIM 301500) is an X-linked inherited disorder of metabolism due to mutations in the gene encoding  $\alpha$ -galactosidase A, a lysosomal enzyme. The enzymatic defect leads to the accumulation of neutral glycosphingolipids throughout the body, particularly within endothelial cells. Resulting narrowing and tortuosity of small blood vessels with endothelial dysfunction lead to tissue ischaemia and infarction. Inability to prevent the progression of glycosphingolipid deposition causes significant morbidity and mortality from early onset strokes, cardiomyopathy and renal failure in adulthood. Medical management is symptomatic and consists of partial pain relief with analgesic drugs (gabapentin, carba-

mazepin), antihypertensive drugs, whereas renal transplantation or dialysis is available for patients experiencing end-stage renal failure. However, the ability to produce high doses of  $\alpha$ -galactosidase A *in vitro* has opened the way to preclinical studies in the mouse model, and to the development of the first clinical trials in patients with Fabry disease. Enzyme replacement therapy has recently been validated as a therapeutic agent for Fabry disease patients. Long term safety and efficacy of replacement therapy are currently being investigated. Substrate deprivation and gene therapy may also prove future alternative therapeutic options.

La maladie de Fabry (MF, OMIM 301500) est une maladie héréditaire du métabolisme, de transmission liée au chromosome X, due au déficit en  $\alpha$ -galactosidase A, une enzyme lysosomale. L'impossibilité de prévenir les dépôts progressifs de glycosphingolipides dans les tissus et le plasma entraîne une morbi-mortalité importante avec

cardiomyopathie, accidents vasculaires cérébraux et insuffisance rénale chronique. La prise en charge médicale était jusqu'à peu uniquement symptomatique, mais des progrès importants viennent d'être accomplis dans la mise au point d'une thérapie enzymatique substitutive et des approches de thérapie génique sont envisagées dans le futur.

## I. TRAITEMENTS SYMPTOMATIQUES

### 1. Traitement de la douleur

Les mesures préventives consistent en l'éviction des circonstances favorisant l'apparition des douleurs, telles que l'exercice physique, l'exposition à la chaleur ou au froid, ou les épisodes fébriles.

Le traitement symptomatique de la douleur par la carbamazépine (Filling-Katz *et al.*, 1989) administrée préférentiellement de manière prophylactique à la posologie de 200 à 600 mg par jour, en utilisant ou non la forme à libération prolongée. Certains patients préfèrent se traiter lorsqu'ils ressentent les prémisses d'une crise algique aigue. La diphénylhydantoïne est une alternative intéressante à la carbamazépine en cas de contre-indication ou d'intolérance à cette molécule (Lockman *et al.*, 1973). Très récemment, nous avons souligné l'intérêt potentiel de la gabapentine, administrée à la posologie de 400 à 800 mg par jour, sur les douleurs neuropathiques (Germain, 2001).

### 2. Néphroprotection

La néphroprotection par les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine nous semble indiquée en cas de protéinurie supérieure à 300 mg par jour (Germain, 2001). Les antagonistes du récepteur AT1 de l'angiotensine 2 (classe des *artans*) pourraient de la même façon être intéressants, mais les études contrôlées pour les néphropathies avec protéinurie glomérulaire autres que la néphropathie diabétique font encore défaut (Susic, 2000).

### 3. Diététique, métabolisme

L'origine des glycosphingolipides neutres étant endogène (synthèse hépatique et *turn-over* à partir des membranes plasmiques des hématies sénescents), il n'existe pas à notre connaissance de recommandations particulières concernant l'alimentation en dehors des mesures diététiques habituellement prescrites en cas d'insuffisance rénale débutante à modérée (Sessa *et al.*, 2001). Certains patients se plaignent toutefois d'une intolérance à certains aliments et de diarrhées fréquentes, qu'il importe de ne pas aggraver par des régimes mal adaptés. L'exploration de la fonction pancréatique exocrine nous semble intéressante. Une anémie hyposidérémique, d'étiologie imprécise, est fréquente (D. P. Germain, données non publiées) pouvant faire prescrire un traitement martial.

### 4. Contrôle des facteurs de risque vasculaire

En dehors de la maladie microvasculaire, une atteinte des artères de plus gros calibre (Boutouyrie *et al.*, 2001) et des modifications des fonctions endothéliales (DeGraba *et al.*, 2000) (K. Demuth et D. P. Germain, manuscrit en préparation) ont été récemment démontrées dans la maladie de Fabry. Il apparaît donc logique de ne

pas ajouter d'autres facteurs de risque vasculaire à la surcharge endothéliale et à l'état prothrombotique documentés. L'éviction du tabac, le contrôle d'une éventuelle hypertension artérielle ou d'une dyslipidémie, et une supplémentation vitaminique en cas d'hyperhomocystéinémie acquise sont à recommander.

### 5. Prise en charge de l'insuffisance rénale terminale

La prise en charge en hémodialyse ou dialyse péritonéale suit les indications habituelles pour les patients au stade d'insuffisance rénale terminale (Tsakiris *et al.*, 1996). Les résultats de la dialyse semblent inférieurs à ceux de la transplantation rénale, qui peut être réalisée après exploration d'une éventuelle atteinte coronarienne (Donati *et al.*, 1987) (Ojo *et al.*, 2000). La survie du greffon rénal semble comparable à celles des autres néphropathies (Ojo *et al.*, 2000). La récurrence des dépôts de glycosphingolipides est exceptionnelle. Lorsqu'une surcharge est observée en histopathologie, il s'agit en fait probablement de cellules de l'hôte (cellules endothéliales des vaisseaux et macrophages) ayant migré vers le greffon plutôt que d'une récurrence vraie.

Le greffon rénal n'est pas à même de produire suffisamment d'enzyme pour servir d'« usine métabolique » et corriger l'atteinte d'autres organes à distance dont les atteintes continuent d'évoluer pour leur propre compte (Germain, 1999). En raison de cette morbidité cardio- et cérébrovasculaire persistante, l'espérance de vie n'a donc qu'assez peu augmentée depuis les procédures d'épuration extra-rénale, faisant des patients dialysés et transplantés rénaux des candidats à l'enzymothérapie substitutive.

## II. APPROCHES PHARMACOLOGIQUES SPÉCIFIQUES

### 1. Le galactose

*In vitro*, l'utilisation de galactose a pu, en partie, stabiliser des mutants thermolabiles (Q279E) de l' $\alpha$ -galactosidase A (Okumiyama *et al.*, 1995). Une administration à l'Homme a été récemment expérimentée dans le cas du variant cardiaque de la maladie de Fabry (Frustraci *et al.*, 2001). Cette alternative thérapeutique reste anecdotique et ne concernera au mieux que les patients atteints de formes atténuées (« variant cardiaque ») de la maladie de Fabry avec activité enzymatique résiduelle (environ 5 % des patients). Elle ne devrait pas s'appliquer à la forme classique de la maladie (Gahl, 2001).

### 2. Molécules chaperones

Le déficit enzymatique semble dû, dans le cas de certains mutants, à une dégradation excessive de l'enzyme au niveau du réticulum endoplasmique. Des molécules comme la 1-desoxy-galactonojirimycin (DGJ) protège l'enzyme pendant sa maturation et son transfert vers les lysosomes. L'administration orale de DGJ à des souris

transgéniques, surexprimant le mutant R301Q de l' $\alpha$ -galactosidase A, a pu élever de façon substantielle l'activité enzymatique dans plusieurs organes. La 1-déoxygalactonojirimycin sert de chaperone spécifique pour les mutants enzymatiques qui ne parviennent pas à maintenir leur conformation propre pour éviter une dégradation excessive (Fan *et al.*, 1999). Une série de dérivés de la 1-déoxygalactonojirimycin a été testée récemment. L'addition de 100  $\mu$ M de 1-déoxygalactonojirimycine, d' $\alpha$ -galacto-homonojirimycine, d' $\alpha$ -allo-homonojirimycine et de  $\beta$ -1-C-butyl-déoxygalactonojirimycin dans le milieu de culture de lymphoblastes de patients atteints de maladie de Fabry augmenta l'activité  $\alpha$ -galactosidase A intracellulaire d'un facteur 14 ; 5 ; 2,4 et 2 respectivement (Asano *et al.*, 2000).

### 3. Inhibiteurs de la biosynthèse

Plus récemment, deux inhibiteurs de la glucosylcéramide synthase, le 4'-hydroxy-P4 et l'éthylenedioxy-P4, ont pu, *in vitro*, induire une déplétion en GL3 dans des lymphocytes de patients atteints de maladie de Fabry (Abe *et al.*, 2000). Cette stratégie pourrait aussi être appliquée à d'autres maladies lysosomales telles que la maladie de Gaucher ou la maladie de Tay-Sachs (Platt *et al.*, 2001).

## III. DÉVELOPPEMENT DE MODÈLES ANIMAUX

L'absence d'un modèle animal spontané de la maladie de Fabry, essentiel au développement d'études pré-cliniques *in vivo* visant à explorer les différentes stratégies thérapeutiques, était un frein à la progression des recherches.

Deux équipes se sont donc employées avec succès au développement de modèles murins de la maladie de Fabry. Les modèles obtenus reproduisent de manière imparfaite la maladie humaine, en particulier du fait de l'absence, chez la souris, de transport à la surface des globules rouges du globotriaosylcéramide (GL3), accumulé de façon anormale dans la maladie de Fabry, et surtout de la durée de vie limitée d'une souris (environ 24 mois) qui ne permet pas une accumulation à long terme du globotriaosylcéramide comme chez l'Homme.

Ainsi, les souris mâles hémizygotés et les souris femelles homozygotes, produites par l'équipe de R. J. Desnick par invalidation du gène *gla*, codant pour l' $\alpha$ -galactosidase A murine, sont phénotypiquement saines, ont une espérance de vie normale (de 18 à 24 mois) et sont fertiles (Wang *et al.*, 1996). Ce modèle murin présente toutefois un intérêt pour la recherche puisque les études en microscopie électronique révélèrent les inclusions lamellaires caractéristiques semblables à celles observées chez les sujets atteints de maladie de Fabry, dans les lysosomes du cœur, du foie, des reins et de la peau des animaux. L'analyse des concentrations de globotriaosylcéramide par méthode ELISA montra par ailleurs une accumulation progressive de ce dernier avec

l'âge. Ces souris déficitaires en  $\alpha$ -galactosidase A ont donc permis l'évaluation préclinique de diverses stratégies thérapeutiques parmi lesquelles l'enzymothérapie recombinante substitutive (Ioannou *et al.*, 2001).

Un second modèle murin fut créé par le groupe de R. O. Brady. Les souris invalidées (*knock-out*) pour le gène *gla* (Ohshima *et al.*, 1995) présentaient un déficit complet en  $\alpha$ -galactosidase A (Ohshima *et al.*, 1997). Les animaux apparaissaient toutefois phénotypiquement normaux à 10 semaines de vie. Les analyses ultrastructurales révélèrent des inclusions lamellaires concentriques dans les reins, et la microscopie confocale montra l'accumulation de substrat dans les reins et les fibroblastes en culture (Ohshima *et al.*, 1997). Ces données indiquaient des similitudes physiopathologiques entre les souris mutantes et les patients atteints de maladie de Fabry. La progression de la maladie avec l'âge fut étudiée pour ce modèle : de façon intéressante les analyses histopathologiques des souris hémizygotés  $\alpha$ -galactosidase A (-/0) révélèrent des lésions infracliniques dans les cellules de Kupffer du foie et les macrophages de la peau, mais l'absence d'atteinte majeure des cellules endothéliales. L'accumulation de glycosphingolipides et les lésions pathologiques des organes touchés augmentaient avec l'âge (Ohshima *et al.*, 1999).

## IV. THÉRAPIE ENZYMATIQUE

### 1. Les concepts de base et les essais historiques

Deux concepts ont apporté des arguments rationnels pour une thérapie enzymatique des maladies de surcharge lysosomale. D'une part, l'identification de pseudo-déficits, dans lesquels la persistance de 10 % d'activité enzymatique résiduelle d'une enzyme lysosomale donnée, suffit à assurer un phénotype clinique normal et l'absence de maladie de surcharge (Bach *et al.*, 1982). D'autre part, il a été démontré que les enzymes lysosomales sécrétées par les cellules pouvaient être recaptées à distance par d'autres cellules dans lesquelles elles étaient internalisées par la voie des récepteurs mannose-6-phosphate présents à la membrane plasmique (Mayes *et al.*, 1982). Cette coopération métabolique laissait envisager qu'il n'est pas nécessaire de restaurer la totalité de l'activité enzymatique ni de corriger chaque cellule cible pour obtenir un effet thérapeutique.

De fait, des études préliminaires de traitement substitutif *in vivo*, basées sur l'administration de plasma humain normal (Mapes *et al.*, 1970) ou de préparations partiellement purifiées d' $\alpha$ -galactosidase A plasmatisque ou tissulaire (Brady *et al.*, 1973) (Desnick *et al.*, 1979), avaient montré une correction transitoire de l'activité enzymatique.

### 2. Production des enzymes

De nouvelles approches ont été développées grâce aux enzymes produites par génie génétique en lignée continue humaine, ou en cellules d'ovaires de hamster chinois

(cellules CHO) (Ioannou *et al.*, 1992). L' $\alpha$ -galactosidase A est obtenue à partir du surnageant de culture, après diverses étapes de purification. Les progrès des biotechnologies ont ainsi permis la production de grandes quantités d'enzyme purifiée, laissant présager la possibilité d'un traitement enzymatique substitutif chez l'Homme.

### 3. Essais précliniques

Des études furent conduites sur un modèle murin de MF pour déterminer la pharmacocinétique et la biodistribution de 4 glycoformes d' $\alpha$ -galactosidase A recombinante, différant par leur contenu en acide sialique et en mannose-6-phosphate (Ioannou *et al.*, 2001). La demi-vie plasmatique était de 2 à 5 minutes, les formes les plus sialylées restant plus longtemps dans la circulation. Une heure après injection de doses de 1 mg/kg ou 10 mg/kg, l' $\alpha$ -galactosidase A recombinante était essentiellement retrouvée dans le foie, avec une activité enzymatique détectable dans d'autres tissus à l'exclusion du cerveau. Une restauration plus importante de l'activité enzymatique fut obtenue après injections répétées de la glycoforme la plus sialylée d' $\alpha$ -galactosidase A recombinante après injections répétées (8 injections de 10 mg/kg espacées de 48 heures), l'activité enzymatique présente dans le foie et la rate étant de 30 % et 10 % de celle retrouvée 1 heure après injection. Une déplétion dose-dépendante du GL3 plasmatique et tissulaire fut observée. Les études ultrastructurales montrèrent une clairance du GL3 après traitement, indiquant que l'enzyme administrée avait atteint et hydrolysé le substrat accumulé (Ioannou *et al.*, 2001).

Ces études précliniques ont fourni des arguments rationnels pour une thérapie de remplacement enzymatique chez les patients atteints de MF, ainsi que les données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques clés pour l'élaboration d'essais cliniques.

### 4. Essais cliniques de phase 1/2

Deux essais cliniques de phase 1/2 distincts ont été entrepris pour évaluer la sécurité et déterminer les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques après injection intraveineuse d' $\alpha$ -galactosidase A.

Une étude a évalué les effets de l'administration d'une dose unique d' $\alpha$ -galactosidase A produite par activation de gène (agalsidase  $\alpha$ ) sur les taux de substrats (GL3) accumulés dans le plasma, le foie (biopsie avant et 44 heures après injection d'une dose unique de l'enzyme), et le sédiment urinaire (urines des 24 heures évaluées à J1, J7 et J28). Cette étude monocentrique, multidosée (0,007 à 0,11 mg/kg), ouverte, non randomisée, a porté sur 10 patients ayant tous un diagnostic confirmé de MF. Cet essai a démontré qu'une injection unique d' $\alpha$ -galactosidase A humaine entraînait une clairance partielle du GL3 accumulé dans le foie (- 31 %) et le sédiment urinaire à 28 jours (- 38 %). Il ne fut pas constaté de clairance du GL3 urinaire à J1 ni à J7 après l'injection unique de l'enzyme. Aucun effet sur le GL3 plasmatique ne fut démontré (Schiffmann *et al.*, 2000).

Une deuxième étude a évalué les effets de l'administration d' $\alpha$ -galactosidase A humaine recombinante (r-h $\alpha$ Gal, agalsidase  $\beta$ ) sur les taux de substrats accumulés dans le plasma, le foie, le coeur et les reins. Cette étude monocentrique, multidosée (0,3-1,0 et 3,0 mg/kg), non randomisée, a porté sur 15 patients ayant tous un diagnostic confirmé de MF classique (Eng *et al.*, 2001a). Cet essai, portant sur un nombre limité d'injections, a démontré que la thérapie substitutive par  $\alpha$ -galactosidase A recombinante (agalsidase  $\alpha$ ) entraînait une clairance du GL-3, accumulé dans le plasma, et l'endothélium vasculaire des reins, de la peau, du foie et du coeur, et a démontré l'importance de la dose d'enzyme administrée sur la rapidité et l'importance de la clairance du substrat. Pour 0,3 mg/kg la clairance était incomplète, à 1 mg/kg la clairance était complète et les effets secondaires liés aux perfusions modérés, à 3 mg/kg la clairance était complète mais les effets indésirables liés aux perfusions plus fréquents. Une clairance totale était obtenue pour un nombre moindre d'injections en cas d'administrations espacées de 14 jours par rapport aux administrations espacées de 48 heures (Eng *et al.*, 2001a).

Ces deux essais de phase 1/2 ont conduit au développement d'essais cliniques de phase 3. Les essais de phase 3 sont effectués sous forme comparative, soit par rapport à un placebo, soit par rapport à un produit actif de référence, et portent sur un plus grand nombre de malades, permettant de juger de l'efficacité et de la sécurité du principe actif.

### 5. Essais cliniques de phase 3

Un premier essai de phase 3, monocentrique, a porté sur 26 patients qui ont reçu 0,2 mg/kg de poids corporel d' $\alpha$ -galactosidase A produite en lignée humaine continue, en perfusion intraveineuse chaque 15 jours, pour un total de 12 injections. L'objectif primaire était l'effet de la thérapie sur la douleur neuropathique appréciée, en l'absence de médicaments antalgiques, par l'item n° 3 du questionnaire de douleur « Brief Pain Inventory » (BPI). Le score moyen de douleur à son maximum (BPI) s'abaissa de 6,2 à 4,3 dans le groupe des patients traités par  $\alpha$ -galactosidase A, tandis qu'aucun changement significatif ne fut observé dans le groupe placebo ( $P = 0,02$ ). L'histologie et la fonction rénale furent aussi évaluées. Le nombre de glomérules avec expansion mésangiale diminua de 12,5 % chez les patients traités mais augmenta de 16,5 % pour le placebo ( $P = 0,01$ ). La clairance moyenne de l'inuline décrut de 6,2 mL/min pour les patients recevant l' $\alpha$ -galactosidase A contre 19,5 mL/min pour le placebo ( $P = 0,19$ ). Une diminution de 50 % du taux de GL3 plasmatique fut constatée chez les patients traités par l' $\alpha$ -galactosidase A produite en lignée humaine continue (Schiffmann *et al.*, 2001).

La sécurité et l'efficacité de l' $\alpha$ -galactosidase recombinante (agalsidase  $\beta$ , Genzyme) furent évaluées dans un essai international multicentrique, randomisé en double aveugle contre placebo (4 pays : USA, Royaume-Uni, Pays-Bas et France, 8 centres : New York, Boston, Los Angeles, Londres, Manchester, Amsterdam, Lyon et

Paris) chez 58 patients qui furent traités pendant 20 semaines à raison d'une perfusion intraveineuse chaque 14 jours de l'enzyme  $\alpha$ -galactosidase recombinante ou du placebo (11 injections). Tous les patients furent ensuite enrôlés dans une étude d'extension de 18 mois, au cours de laquelle ils furent traités par  $\alpha$ -galactosidase A recombinante en ouvert. L'objectif primaire était la clairance complète du GL3 de l'endothélium capillaire rénal (soit plus de 50 % des capillaires avec un score de 0 sur l'échelle allant de 0 à 3 : 0 (absence), + (simples traces), 1 (dépôts mineurs), 2 (dépôts modérés) et 3 (dépôts sévères de GL3), et moins de 5 % de capillaires avec un score supérieur ou égal à 1. Les résultats publiés sont ceux de l'étude en double aveugle (Juin 1999-Novembre 1999) d'une part, et des 6 premiers mois de l'étude d'extension en ouvert (18 mois : Décembre 1999-Juin 2001) d'autre part (Eng *et al.*, 2001b). Dans l'essai en double aveugle, 20 des 29 patients (69%) initialement traités par  $\alpha$ -galactosidase recombinante n'avaient plus de dépôts de globotriaosylcéramide (GL3) dans l'endothélium microvasculaire rénal après 20 semaines (11 perfusions). Les 9 autres patients avaient soit de simples traces de GL3 (score entre 0 et 1) soit un score de 1, avec, dans tous les cas, une amélioration par rapport au score lu sur les biopsies initiales. Aucun patient sous placebo n'a eu d'amélioration (Fig. 1). L'objectif primaire de cet essai a donc été atteint avec une significativité statistique remarquable ( $P < 0,001$ ) (Eng *et al.*, 2001b).

Un score composite étudiant la clairance des dépôts histologiques de globotriaosylcéramide (GL3) dans l'endothélium vasculaire des capillaires du cœur, de la

peau et des reins fut aussi évalué comme l'un des objectifs secondaires de l'essai. Les patients du groupe traité par  $\alpha$ -galactosidase A recombinante eurent une réduction majeure des dépôts endothéliaux de globotriaosylcéramide (GL3) dans les capillaires de la peau ( $P = 0,001$ ) et du cœur ( $P = 0,001$ ). Les patients sous placebo ne démontrèrent aucune clairance du GL3 (Fig. 1).

Une diminution de la quantité de GL3 accumulé dans les reins, autre objectif secondaire de l'étude, fut également démontrée par méthode ELISA dans le groupe traité.

La clairance des dépôts de GL3 de l'endothélium microvasculaire était directement corrélée avec la réduction des taux plasmatiques de globotriaosylcéramide (GL3).

Après 6 mois de traitement en ouvert, tous les patients initialement sous placebo et 98 % des patients initialement traités  $\alpha$ -galactosidase A recombinante avaient une clairance complète des dépôts glycolipidiques de l'endothélium microvasculaire.

La tolérance de l'agalsidase  $\beta$  fut bonne. Aucun décès n'est survenu. Les effets indésirables ont consisté essentiellement en des réactions pendant les perfusions. Vingt quatre patients sur 29 ont développés des anticorps de type IgG apparaissant vers la quatrième perfusion. Leur titre est maximal aux alentours de la septième perfusion, pour ensuite diminuer graduellement. Les IgG ne sont pas neutralisants, n'affectant pas l'efficacité de l'enzyme recombinante.

Lors de l'étude d'extension, le GL3 a aussi été éliminé d'autres types cellulaires comme les podocytes ou les cellules musculaires lisses des artérioles rénales (Fig. 2).

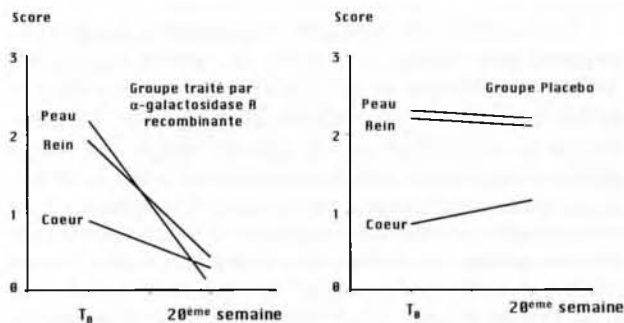


FIG. 1. – Résultats de l'étude multicentrique contrôlée en double aveugle contre placebo évaluant la sécurité et l'efficacité de l' $\alpha$ -galactosidase A recombinante (agalsidase  $\beta$ ) chez les patients atteints de maladie de Fabry.

Vingt des 29 patients (69 %) initialement traités par  $\alpha$ -galactosidase recombinante n'avaient plus aucun dépôt de globotriaosylcéramide (GL3) dans l'endothélium microvasculaire rénal après 20 semaines (11 perfusions). Aucun patient sous placebo n'eut d'amélioration. L'objectif primaire de cet essai a donc été atteint avec une haute significativité statistique ( $P < 0,001$ ). Un score composite étudiant la clairance des dépôts histologiques de GL3 dans l'endothélium des capillaires du cœur, de la peau et des reins fut aussi évalué comme objectif secondaire. Les patients traités par  $\alpha$ -galactosidase A recombinante eurent une réduction majeure des dépôts dans les capillaires de la peau ( $P = 0,001$ ) et du cœur ( $P = 0,001$ ). Les patients sous placebo ne démontrèrent aucune clairance du GL3 (Eng *et al.*, 2001b).

## V. THÉRAPIE GÉNIQUE

### 1. Vecteurs rétroviraux

Dans des fibroblastes embryonnaires du modèle murin (Ohshima *et al.*, 1997), le déficit de l'activité  $\alpha$ -galactosidase A et l'accumulation de métabolites ont pu être corrigés, en transduisant les cellules avec un rétrovirus bicistronique contenant l'ADNc de l' $\alpha$ -galactosidase A humaine (Sugimoto *et al.*, 1995).

*In vitro*, la correction du déficit en  $\alpha$ -galactosidase A a pu être réalisée dans des fibroblastes et lymphocytes B de patients atteints de MF, grâce à un rétrovirus recombinant produit à un titre élevé. Les cellules corrigées sécrétaient l' $\alpha$ -galactosidase A qui était recaptée par les cellules voisines non transduites *via* les récepteurs mannose-6-phosphate de la membrane plasmique, démontrant une coopération métabolique (Medin *et al.*, 1996).

Dans des études ayant pour but d'amener cette stratégie vers des applications cliniques, il fut établi que des cellules CD34+, issues de la moelle osseuse de plusieurs patients atteints de MF et de volontaires, pouvaient être transduites efficacement, avec augmentation de l'activité  $\alpha$ -galactosidase A intracellulaire, sécrétion de l'enzyme et coopération métabolique. Ces résultats suggèrent qu'une approche de transfert de gène aux cellules de la



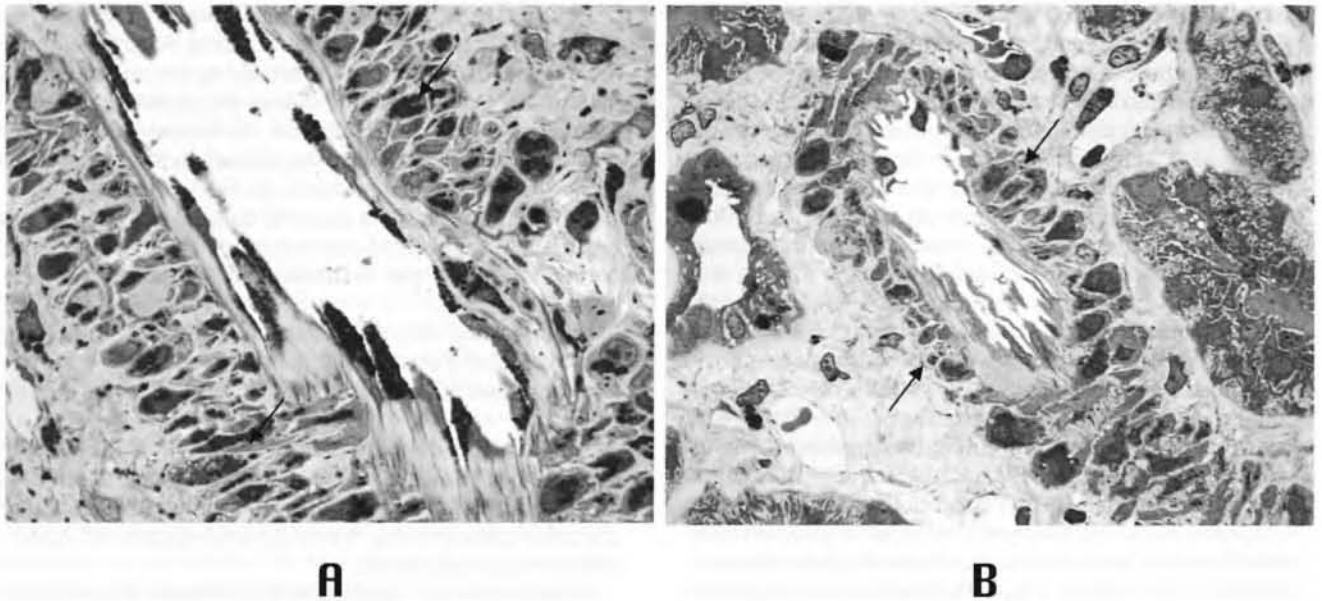


FIG. 2. – Clairance du GL3 des cellules musculaires lisses des artérioles rénales. Lors d'une étude d'extension multicentrique ouverte évaluant la sécurité et l'efficacité de l' $\alpha$ -galactosidase A recombinante (agalsidase  $\beta$ ) au long cours, le GL-3 fut éliminé d'autres types cellulaires, notamment les podocytes et les cellules musculaires lisses artériolaires. La réduction des dépôts de GL3 observés dans les cellules musculaires lisses artériolaires de deux biopsies rénales obtenues, l'une avant traitement (Fig. 2A) et l'autre après traitement (Fig. 2B), est patente.

moelle osseuse par rétrovirus peut avoir un bénéfice thérapeutique pour les patients atteints de MF (Takenaka *et al.*, 1999) (Takenaka *et al.*, 2000) (Qin *et al.*, 2001).

## 2. Vecteurs adénoviraux

Dans une étude récente, un vecteur adénoviral recombinant, codant pour l' $\alpha$ -galactosidase humaine, fut construit et injecté par voie intraveineuse chez le modèle murin, résultant en l'élévation de l'activité  $\alpha$ -galactosidase A dans tous les tissus notamment le foie, les poumons, les reins, le coeur, la rate et les muscles à des taux supérieurs à ceux observés chez les animaux normaux. L'activité enzymatique décrivait cependant rapidement et, après 12 semaines, seuls 10 % de l'activité observée à J3 persistait. Une réduction significative du contenu en GL-3 à des taux proches de la normale, fut observée dans tous les tissus jusqu'à 6 mois après traitement. Cependant, au fur et à mesure que l'expression de l' $\alpha$ -galactosidase A déclinait, de faibles taux de GL-3 étaient réaccumulés dans plusieurs tissus. Ces données démontrent que le déficit enzymatique en  $\alpha$ -galactosidase A et l'accumulation de GL-3 peuvent être corrigés par transfert de gène médié par un adénovirus chez la souris. Ceci suggère que la thérapie génique représente une approche plausible pour le traitement de la MF et d'autres maladies de surcharge lysosomales (Ziegler *et al.*, 1999).

## VI. CONCLUSION

L'enzymothérapie substitutive représente un progrès thérapeutique majeur (Desnick *et al.*, 2001) (Eng *et al.*, 2001b) (Schiffmann *et al.*, 2001) mais soulève dans le même temps de très nombreuses interrogations. La question de la réversibilité de la maladie grâce aux traitements enzymatiques substitutifs reste ouverte. L'identification de marqueurs pertinents (cliniques et/ou biologiques), permettant d'apprécier l'efficacité clinique et la sécurité au long cours de ces thérapeutiques, est un challenge scientifique 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 des études cliniques contrôlées (Desnick, 2001) et du maintien d'une recherche active dans les domaines des molécules chaperones ou inhibitrices de l'accumulation de substrats enzymatiques (Abe *et al.*, 2000) (Asano *et al.*, 2000) (Platt *et al.*, 2001) et de la thérapie génique (Sugimoto *et al.*, 1995) (Ziegler *et al.*, 1999) (Qin *et al.*, 2001).

## BIBLIOGRAPHIE

- Abe A., Arend L. J., Lee L., Lingwood C., Brady R. O. & Shyaman J. A., Glycosphingolipid depletion in Fabry disease lymphoblasts with potent inhibitors of glucosylceramide synthase. *Kidney International*, 2000, 57, 446-454.
- 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, 4179-86.
- Bach G., Rosenmann E., Karni A. & Cohen T., Pseudodeficiency of  $\alpha$ -galactosidase A. *Clinical Genetics*, 1982, 21, 59-64.
- Boutouyrie P., Laurent S., Laloux B., Lidove O., Grunfeld J. P. & Germain D. P., Non-invasive evaluation of arterial involvement in patients affected with Fabry disease. *J. Med. Genet.*, 2001, 38, 629-31.
- Brady R. O., Tallman J. F., Johnson W. G., Gal A. E., Leahy W. R., Quirk J. M., *et al.*, Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified ceramidetrihexosidase in Fabry's disease. *The New England Journal of Medicine*, 1973, 289, 9-14.
- DeGraba T., Azhar S., Dignat-George F., Brown E., Boutiere B., Altarescu G. *et al.*, Profile of endothelial and leukocyte activation in Fabry patients. *Ann. Neurol.*, 2000, 47, 229-33.
- Desnick R., Enzyme replacement and beyond. *Journal of Inherited Metabolic Diseases* 2001, 24, 251-265.
- Desnick R. J., Kean K. J., Grabowski G., Bishop D. F. & Sweeley C. C., Enzyme therapy in Fabry disease: differential in vivo plasma clearance and metabolic effectiveness of plasma and splenic alpha-galactosidase A isozymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1979, 76, 5326-5330.
- Desnick R. J., Wasserstein MP and Banikazemi M. Fabry disease ( $\alpha$ -galactosidase A deficiency): renal involvement and enzyme replacement therapy. *Contributions in Nephrology*, 2001, 136, 174-192.
- Donati D., Novario R. & Gastaldi L., Natural history and treatment of uremia secondary to Fabry's disease: an European experience. *Nephron.*, 1987, 46, 353-9.
- 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, 711-22.
- 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. *The New England Journal of Medicine*, 2001b, 345, 9-16.
- Fan J. Q., Ishii S., Asano N. & Suzuki Y., Accelerated transport and maturation of lysosomal  $\alpha$ -galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nature Medicine*, 1999, 5, 112-115.
- Filling-Katz M. R., Merrick H. F., Fink J. K., Miles R. B., Sokol J. & Barton N. W., Carbamazepine in Fabry's disease: effective analgesia with dose-dependent exacerbation of autonomic dysfunction. *Neurology*, 1989, 39, 598-600.
- Frustaci A., Chimenti C., Ricci R., Natale L., Russo M. A., Pironi M. *et al.*, Improvement in cardiac function in the cardiac variant of Fabry's disease with galactose-infusion therapy. *N. Engl. J. Med.*, 200, 345, 25-32.
- Gahl W. A., New therapies for Fabry's disease. *N. Engl. J. Med.*, 2001, 345, 55-57.
- Germain D. P., Maladie de Fabry et Maladie de Gaucher : caractérisation moléculaire, corrélations génotype/phénotype et perspectives thérapeutiques. Paris, Paris VIII, 999, 229.
- Germain D. P., Maladie de Fabry. *Sang Thrombose Vaisseaux*, 2001, 13, 503-512.
- Ioannou Y. A., Bishop D. F. & Desnick R. J., Overexpression of human  $\alpha$ -galactosidase A results in its intracellular aggregation, crystallisation in lysosomes, and selective secretion. *The Journal of Cell Biology*, 1992, 119, 1137-1150.
- Ioannou Y. A., Zeidner K. M., Gordon R. E. & Desnick R. J., Fabry disease: preclinical studies demonstrate the effectiveness of alpha-galactosidase A replacement in enzyme-deficient mice. *Am. J. Hum. Genet.*, 2001, 68, 14-25.
- Lockman L. A., Hunninghake D. B., Krivit W. & Desnick R. J., Relief of pain of Fabry's disease by diphenylhydantoin. *Neurology*, 1973, 23, 871-875.
- Mapes C. A., Anderson R. L., Sweeley C. C., Desnick R. J. & Krivit W., Enzyme replacement in Fabry's disease, an inborn error of metabolism. *Science*, 1970, 169, 987-989.
- Mayes J. S., Cray E. L., Dell V. A., Scheerer J. B. & Sifers R. N., Endocytosis of lysosomal alpha-galactosidase A by cultured fibroblasts from patients with Fabry disease. *Am. J. Hum. Genet.*, 1982, 34, 602-610.
- Medin J. A., Tudor M., Simovitch R., Quirk J. M., Jacobson S., Murray G. J. *et al.*, Correction in trans for Fabry disease: expression, secretion and uptake of alpha-galactosidase A in patient-derived cells driven by a high-titer recombinant retroviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 7917-7922.
- Ohshima T., Murray G. J., Nagle J. W., Quirk J. M., Kraus M. H., Barton N. W. *et al.*, Structural organization and expression of the mouse gene encoding  $\alpha$ -galactosidase A. *Gene*, 1995, 166, 277-280.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1997, 94.
- Ohshima T., Schiffmann R., Murray GJ, Kopp J., Quirk JM, Stahl S. *et al.*, Aging accentuates and bone marrow transplantation ameliorates metabolic defects in Fabry disease mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 6423-6427.
- Ojo A., Meier-Kriesche H. U., Friedman G., Hanson J., Cibrik D., Leichtman A. *et al.*, Excellent outcome of renal transplantation in patients with Fabry's disease. *Transplantation*, 2000, 69, 2337-2339.
- Okumiya T., Ishii S., Takenaka T., Kase R., Kamei S., Sakuraba H. *et al.*, Galactose stabilizes various missense mutants of  $\alpha$ -galactosidase in Fabry disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 199, 214, 1219-1224.
- 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.*, Preselective gene therapy for Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98, 3428-3433.
- 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., Sellos-Moura M., Myers M. *et al.*, Infusion of alpha-galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2000, 97, 365-370.
- Sessa A., Meroni M., Battini G., Maglio A., Brambilla P. L., Bertella M. *et al.*, Renal pathological changes in Fabry disease. *J. Inher. Metab. Dis.*, 2001, 24, 66-70, discussion 65.
- Sugimoto Y., Akentijevich 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. *Human Gene Therapy*, 1995, 6, 905-915.
- Susic D., Renal protective potential of antihypertensive drugs. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2000, 9, 2593-600.

- 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.
- Tsakiris D., Simpson H. K., Jones E. H., Briggs J. D., Elinder C. G., Mendel S. *et al.*, Report on management of renale failure in Europe, XXVI, 1995. Rare diseases in renal replacement therapy in the ERA-EDTA Registry. *Nephrol. Dial. Transplant*, 1996, 11, 4-20.
- Wang A. M., Ioannou Y. A., Zeidner K. M., Gotlib R. W., Dikman S, Stewart CL, *et al.* Fabry disease: generation of a mouse model with a-galactosidase A deficiency. *American Journal of Human Genetics*, 1996, 59, A208.
- Ziegler R. J., Yew N. S., 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.
-