

Les maladies lysosomales de l'homme et des animaux domestiques

S. BELLIER

Unité Pédagogique de Biochimie, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du général De Gaulle, F-94704 Maisons-Alfort

RÉSUMÉ

Les lysosomes sont des organites hétérogènes renfermant une grande variété d'enzymes hydrolytiques impliquées dans le catabolisme de macromolécules complexes (glycolipides, glycoprotéines, mucopolysaccharides, mucolipides, etc.). Les maladies lysosomales sont dues essentiellement à des déficits héréditaires (exemples des maladies de Sandhoff et de Tay-Sachs), rarement à des déficits acquis (intoxications alimentaires), des activités enzymatiques intervenant directement dans le catabolisme de ces macromolécules. Certaines maladies lysosomales sont la conséquence d'anomalies héréditaires des protéines de routage intracellulaire (exemples des maladies de Batten et de Niemann Pick, syndrome de Chediak Higashi). L'absence de dégradation, ainsi que l'accumulation des macromolécules conduisent à une surcharge lysosomale. Cette surcharge cellulaire est à l'origine des signes cliniques et lésionnels observés, notamment de l'hypertrophie de différents organes. Le tableau clinique de ces maladies en est très varié. Cependant, la plupart du temps, les signes sont précoces (durant les premières semaines de vie) et consistent en des symptômes nerveux, des anomalies du squelette et une hypertrophie de la rate et du foie, évoluant progressivement vers une issue fatale.

Bien que le diagnostic génétique, histologique ou biochimique de ces maladies soit délicat, il existe à l'heure actuelle de nouvelles approches thérapeutiques visant à substituer, de façon durable dans l'organisme, la protéine déficiente par la protéine active, notamment par thérapie génique.

MOTS-CLÉS : lysosome - surcharge - mutation - modèle animal - thérapie génique.

SUMMARY

Lysosomal diseases of man and domestic animals. By S. BELLIER.

Lysosomes constitute a group of heterogeneous cellular organelles, which contain various enzymes. These enzymes are required for degradation of complex macromolecules such as glycolipids, glycoproteins, mucopolysaccharids, mucolipids, etc. Lysosomal diseases mostly result from a genetic defect of lysosomal enzymes (Sandhoff and Tay-Sachs diseases), rarely from xenobiotics. Mutations in genes controlling intracellular trafficking have also been involved in the pathogenesis of lysosomal diseases (Batten disease, Niemann Pick type C disease, Chediak Higashi syndrome). The limited degradation of macromolecules and their accumulation leading to lysosomal overloading contribute to clinical injury, especially to organ hypertrophy. Lysosomal diseases have various clinical features but they precociously affect the nervous system, the skeleton, the spleen and the liver, and progressively result in death. The diagnosis, based on genetic, histological and biochemical criteria, is difficult. However, new therapeutic approaches, as gene therapy, emerge that aim to introduce the active protein into the organism with sufficient stability.

KEY-WORDS : lysosome - storage diseases - mutation - animal model - gene therapy.

Introduction

Il y a plus d'un siècle que les maladies lysosomales ont été isolées comme syndromes cliniques. En 1882 à Paris, GAUCHER décrit dans sa thèse de médecine le premier cas d'hépatosplénomégalie accompagnée d'une surcharge réticulo-endothéliale, mais il faudra attendre ces dernières décennies pour comprendre les mécanismes étiopathogéniques des maladies lysosomales.

La plupart des maladies lysosomales sont des affections génétiques rares, récessives et autosomiques. Chez l'homme, on en dénombre une quarantaine (sur les 4 000 maladies héréditaires identifiées à l'heure actuelle) dont l'incidence, dans l'ensemble, représente 1 naissance sur 10 000. Les ani-

maux, en particulier les Mammifères domestiques, sont également touchés. Ainsi, une vingtaine de maladies lysosomales ont été enregistrées chez le chat et le chien.

Les maladies de surcharge (aussi appelées thésaurismoses) sont des entités pathologiques caractérisées par la mise en réserve anormale, dans les tissus de l'organisme, de lipides, glucides, ou de protides. Les maladies lysosomales sont un type de thésaurismoses pour lesquelles la surcharge est secondaire à une anomalie du fonctionnement des lysosomes. Ainsi, il ne faut pas confondre les maladies lysosomales avec les maladies de surcharge du glycogène (glycogénoses) pour lesquelles le défaut concerne une enzyme du métabolisme glucidique (par exemple, absence de l' α 1-4 glucosidase dans la maladie de Pompe).

Nous commencerons cette revue par une présentation des lysosomes avant d'envisager l'étude des maladies lysosomales.

1. Les lysosomes

Contrairement aux autres organites intracellulaires, la caractérisation des lysosomes n'a pas débuté par une identification morphologique [5, 16, 2]. Ce sont des anomalies dans le dosage de la phosphatase acide à partir d'homogénats de foie qui ont amené de DUVE (Prix Nobel en 1974) à Louvain (Belgique), dans les années 1950, à proposer l'existence d'une nouvelle famille d'organites. L'activité de cette hydrolase acide était plus élevée dans les extraits préparés avec de l'eau distillée que dans ceux qui étaient préparés avec une solution de saccharose (de façon à maintenir la pression osmotique). En outre, l'activité enzymatique était moins élevée dans les préparations fraîches que dans les préparations anciennes et, dans ces dernières, elle n'était plus associée à des particules sédimentables. Des résultats analogues furent décrits pour d'autres enzymes hydrolytiques ; elles devaient être contenues dans des sacs membraneux, appelés lysosomes, et servir à la digestion contrôlée de macromolécules intracellulaires. Une détérioration des membranes lysosomales dans des extraits cellulaires, induites par lyse osmotique ou par l'âge, devait libérer ces enzymes sous une forme non sédimentable.

Les lysosomes furent identifiés en microscopie électronique une décade après leur première description. D'une extraordinaire diversité de forme et de taille, les lysosomes peuvent néanmoins être identifiés comme une famille unique d'organites par immuno-histochimie (révélation de la phosphatase acide). On a ainsi trouvé des lysosomes dans toutes les cellules eucaryotes à l'exception des globules rouges.

Schématiquement, les lysosomes sont regroupés en deux ensembles, les lysosomes primaires et les lysosomes secondaires. Les lysosomes primaires sont des vésicules de petite taille et d'aspect relativement homogène; les hydrolases acides qu'elles renferment n'ont pas encore eu de contacts avec leurs substrats respectifs. Les lysosomes secondaires, plus volumineux mais aussi plus polymorphes, ont un contenu dans lequel on reconnaît diverses structures en cours de digestion et dont l'évolution ultime constitue les corps résiduels (ou corps d'inclusions). La diversité morphologique des lysosomes secondaires reflète la grande variété des fonctions de dégradation catalysées par les hydrolases acides : digestion de débris intra- et extracellulaires, digestion de micro-organismes phagocytés et même nutrition cellulaire (les lysosomes sont le site principal de l'assimilation du cholestérol à partir des lipoprotéines sériques endocytées).

Au moins trois voies permettent d'approvisionner les lysosomes selon la source des matériaux à dégrader (Figure 1). La voie la mieux étudiée correspond à l'**endocytose** qui conduit à la formation d'endosomes [69]. Les matériaux qui

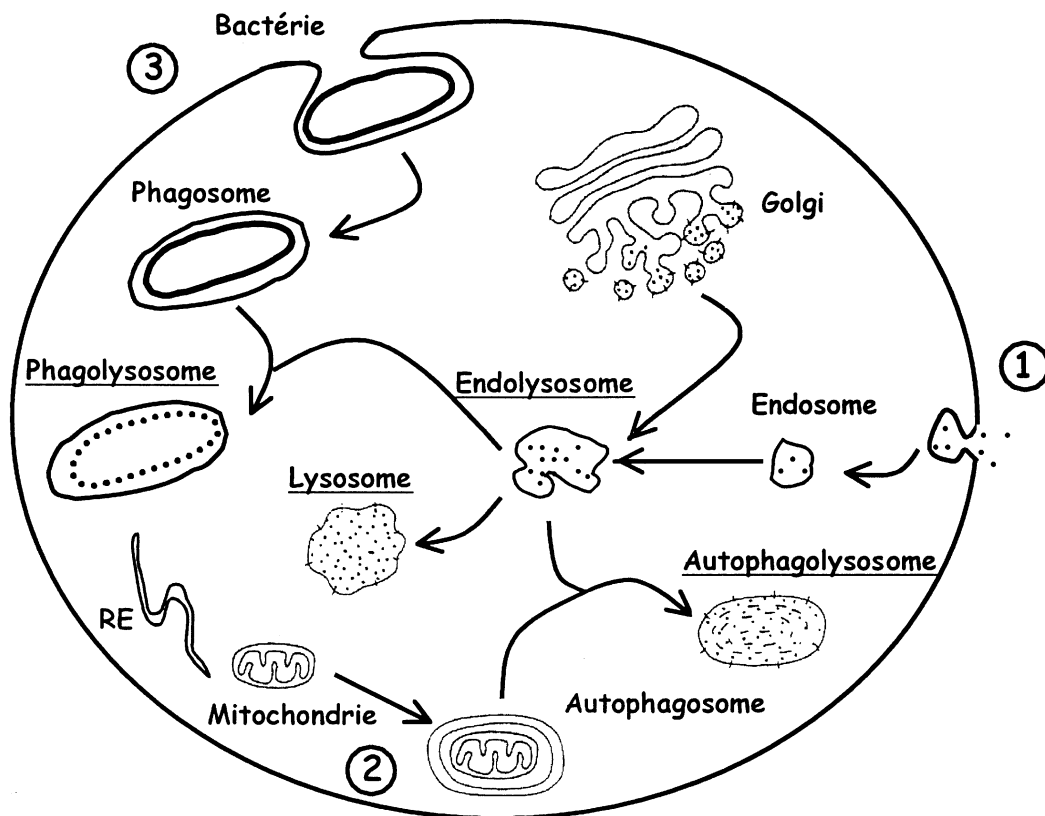


FIGURE 1. — Les trois voies d'approvisionnement des lysosomes. 1 : Endocytose ; 2 : Autophagie ; 3 : Phagocytose. (RE : Réticulum Endoplasmique).

n'ont pas été récupérés à partir de ces endosomes pénètrent dans un compartiment intermédiaire, l'endolysosome, qui reçoit des hydrolases et des protéines membranaires lysosomales néosynthétisées dans l'appareil de Golgi [21]. La conversion en lysosome mature nécessite la perte des composants membranaires endosomaux et un abaissement du pH interne [38]. Prenons l'exemple des LDL (low density lipoproteins): ces particules, qui véhiculent le cholestérol, sont reconnues par des récepteurs spécifiques qui sont les médiateurs principaux de leur internalisation. Après avoir libéré le cholestérol, ces récepteurs sont renvoyés vers la membrane plasmique par l'intermédiaire de vésicules qui bourgeonnent à partir du compartiment endosomal. Un tel recyclage est vrai pour l'ensemble des récepteurs membranaires. Le mécanisme d'endocytose intervient également dans la formation de thyroxine, qui résulte de la digestion intralysosomale de la thyroglobuline dans les cellules du follicule thyroïdien.

La seconde voie correspond au processus d'**autophagie** et permet de détruire les fractions cellulaires hors d'usage. Ainsi, dans une cellule hépatique la durée de vie d'une mitochondrie est d'environ 10 jours. Les organites à digérer sont enveloppés par des membranes dérivées du réticulum endoplasmique, ce qui donne naissance à un autophagosome. Après fusion avec un lysosome, les composants cellulaires sont détruits dans ce qui est devenu un autophagolysosome. Le rôle de l'autophagie est spectaculaire lors des remaniements tissulaires, en particulier au cours de la vie fœtale des Mammifères (perçement des paupières, disparition de la palmure des doigts) et de la métamorphose des Amphibiens (involution des branchies, du tube digestif de type herbivore, de la nageoire caudale) et des Insectes.

La troisième et dernière voie se présente dans les cellules spécialisées dans la **phagocytose** de grosses particules et de micro-organismes (macrophages, neutrophiles). Les phagosomes formés sont convertis en phagolysosomes. Chez certains poissons où la nutrition ne met pas en jeu une digestion complète préalable dans le tube digestif, celle-ci s'achève à l'intérieur des lysosomes entérocytaires.

La première et la troisième voie concernent l'approvisionnement en substrats exogènes: on parle d'hétérophagie, par opposition à l'autophagie. Il convient de préciser que la digestion extracellulaire par les enzymes lysosomales est plutôt exceptionnelle. Par exemple, au cours du développement de l'os, les ostéoclastes détruisent la matrice organominérale par libération d'hydrolases lysosomales, suivie d'une digestion intralysosomale.

On connaît une quarantaine d'enzymes hydrolytiques: des protéases, des nucléases, des glycosidases, des lipases, des phospholipases, des phosphatases et des sulfatases. Ce sont toutes des hydrolases acides dont l'activité est optimale à un pH voisin de 5. Dans le cytosol (pH voisin de 7), ces enzymes ne sont en général pas actives (ce qui protège la cellule en cas de fuite).

Le lysosome est entouré d'une membrane unique qui contient des protéines de transport permettant aux produits de digestion des macromolécules de s'échapper (ils sont alors sécrétés ou réutilisés par la cellule). Cette membrane contient

également une pompe à protons ATP-dépendante qui fait entrer les ions H^+ dans la lumière des lysosomes.

Les hydrolases lysosomales et les protéines membranaires sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique et transportées à travers l'appareil de Golgi (Figure 2). Les vésicules de transport, qui transmettent ces protéines à l'endolysosome, bourgeonnent à partir du réseau *trans* du GOLGI. Le mécanisme moléculaire du tri des protéines lysosomales, par l'intermédiaire de vésicules, est le premier à avoir été identifié [34]. Ces protéines, qui sont *N*-glycosylées, portent un marqueur unique sous forme de groupements phosphates qui sont exclusivement ajoutés aux mannoses des extrémités des motifs oligosaccharidiques (groupement Mannose 6-Phosphate ou M6P). Cette réaction se produit dans la lumière du Golgi *cis*. Elle nécessite deux enzymes agissant séquentiellement: la *N*-acétylglucosamine phosphotransférase (qui ajoute en moyenne un résidu *N*-acétylglucosamine phosphate à un ou deux des mannoses de chaque chaîne oligosaccharidique portée par l'hydrolase) et une phosphoglycosidase (qui retire le *N*-acétylglucosamine, exposant le phosphate pour former le marqueur M6P final). Il semble que le site de reconnaissance par ces deux enzymes dépende de la conformation d'une région spécifique des hydrolases.

Des récepteurs protéiques du M6P se concentrent dans la membrane des vésicules recouvertes de clathrine qui bourgeonnent à partir du réseau *trans* du Golgi. Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires qui fixent les enzymes lysosomales et les concentrent dans les vésicules recouvertes [57]. Ces vésicules perdent rapidement leur enveloppe de clathrine et fusionnent avec un endolysosome. Néanmoins, environ 10 % des enzymes lysosomales sont partiellement excrétées et peuvent être reprises par les cellules avoisinantes. Cette endocytose est réalisée par l'intermédiaire de plusieurs systèmes de récepteurs [63] à double spécificité enzymatique et cellulaire. Un système direct de transfert enzymatique de cellule à cellule par contact dans le contexte d'adhérence cellulaire a également été décrit [48]. Son efficacité semble supérieure au transfert réalisé par l'intermédiaire des récepteurs.

Les enzymes lysosomales se dissocient du récepteur du M6P lorsque le pH environnant atteint 6, pH interne de l'endolysosome. Les récepteurs sont recyclés vers la membrane du réseau *trans* du Golgi, probablement grâce à un transport par des vésicules recouvertes [10, 15, 20, 64]. Ce recyclage membranaire est analogue à celui des récepteurs de molécules extracellulaires qui a lieu entre les endosomes et la membrane plasmique. Dans les deux processus, les récepteurs se regroupent dans les régions recouvertes de clathrine de la membrane (appelées "puits recouverts"). Ces régions vont former les vésicules recouvertes de clathrine.

2. Étiologie des maladies lysosomales

En 1971 Elisabeth NEUFELD et ses collaborateurs au NIH (USA) découvrent, en cocultivant des fibroblastes provenant de sujets atteints de maladies de surcharge distinctes, des "facteurs de correction" qui compensent réciproquement les ano-

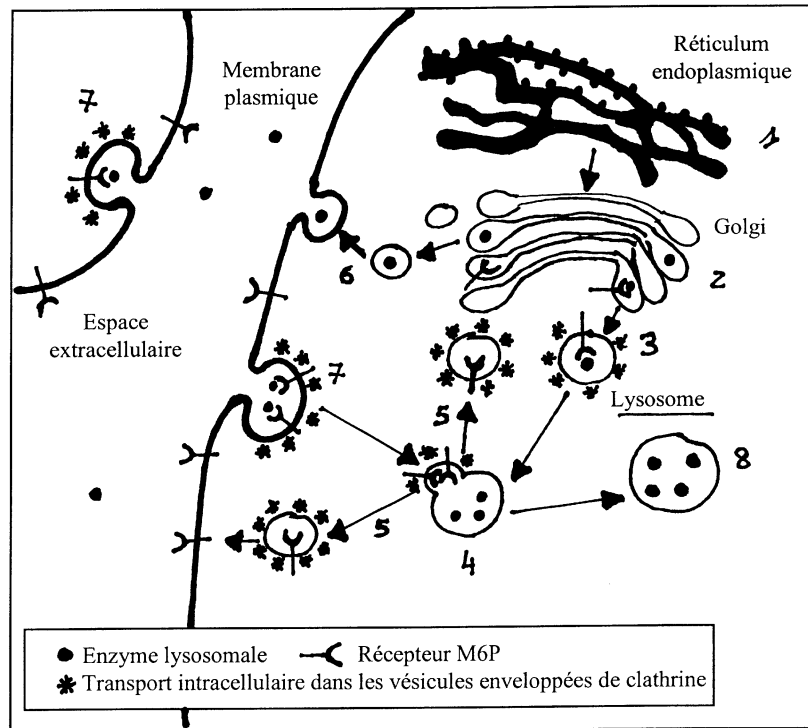


FIGURE 2. — Transport des enzymes lysosomales et recyclage des récepteurs du M6P. 1 : Traduction puis glycosylation dans le réticulum endoplasmique ; 2 : Synthèse du M6P dans l'appareil de Golgi ; 3 : Transfert vers le lysosome par l'intermédiaire des récepteurs du M6P ; 4 : En milieu acide, les enzymes sont libérées de leur récepteur ; 5 : Les récepteurs sont recyclés vers l'appareil de Golgi ou vers la membrane plasmique ; 6 : 10 % des enzymes lysosomales sont excrétées et peuvent être internalisées par les cellules environnantes grâce à la présence... ; 7 : ... de récepteurs du M6P sur la membrane plasmique ; 8 : Maturation des enzymes par protéolyse limitée, dans le lysosome.

malies des cellules en culture [7, 42]. Ces facteurs de correction furent identifiés ultérieurement comme étant des enzymes lysosomales déficientes dans chaque type de maladie.

La plupart des maladies lysosomales ont donc pour origine un déficit enzymatique constitutif dû à des mutations dans les gènes codant pour ces enzymes. Nous verrons néanmoins que dans certains cas, des intoxications par ingestion de plantes peuvent provoquer une baisse de l'activité d'hydrolases lysosomales.

Nous considérerons également un dernier groupe de maladies lysosomales, n'affectant pas les activités d'hydrolases, mais impliquant un dysfonctionnement dans le trafic intracellulaire entre les différents organites.

A) LES MALADIES LYSOSOMALES LIÉES À UNE BAISSÉ D'ACTIVITÉ DES HYDROLASES

1) Les mutations à l'origine d'un déficit d'activité enzymatique

a) Généralités

Rappelons que chaque enzyme, dont la synthèse dépend en premier lieu de l'expression transcriptionnelle d'un seul gène, peut voir son activité diminuée lors de mutation :

- dans le promoteur du gène : on observe une diminution de l'activité transcriptionnelle du gène ou bien une absence d'expression dans tel ou tel tissu (mutation de sites tissu-spécifiques) ;

- dans les séquences non-promotrices, non-codantes du gène : l'activité transcriptionnelle du gène est alors normale. On peut observer néanmoins une baisse de l'efficacité de maturation de l'ARN pré-messager (avec maintien éventuel d'une séquence intronique pouvant conduire à une baisse d'activité de l'enzyme correspondante) ou bien une baisse de l'efficacité de traduction de l'ARN messager (conduisant à une baisse de synthèse de l'enzyme) ;

- dans les séquences codantes (exoniques) du gène : l'enzyme synthétisée possède une structure différente de l'enzyme normale (sauvage). Là encore, il faut considérer différents effets à l'origine d'une baisse de l'activité enzymatique : (1) l'affinité de l'enzyme pour le substrat est altérée (K_m altéré), (2) la stabilité de l'enzyme est altérée ce qui conduit à une diminution de sa concentration dans la cellule, (3) l'enzyme n'est pas localisée correctement dans la cellule (dans le lysosome pour les enzymes qui nous intéressent), (4) le site actif est touché ce qui diminue l'activité catalytique. Les cas (2), (3) et (4) conduisent à une diminution de l'affinité apparente de l'enzyme pour le substrat (K_m apparent).

Les enzymes lysosomales sont normalement en excès par rapport aux besoins physiologiques. Leur activité doit donc être particulièrement basse pour observer un effet pathologique. La majorité de ces enzymes est codée par des gènes des chromosomes autosomaux. Les hétérozygotes pour un gène muté ne présentent pas de signes cliniques. Les deux allèles de chaque gène s'expriment (ils sont co-dominants) et

l'activité enzymatique est le résultat du produit des deux gènes homologues. Les maladies lysosomales d'origine génétique sont donc autosomales et récessives. Un mâle et une femelle non-malades mais porteur chacun d'un allèle muté peuvent avoir une descendance avec des individus malades (statistiquement le risque d'être malade est de 25 %, indépendamment du sexe). Les chances de survie des homozygotes malades étant faibles (ils atteignent rarement l'âge adulte et ont peu de chance de se reproduire) les allèles mutés ne sont maintenus qu'à une faible fréquence dans la population générale. Cette fréquence est plus élevée dans les populations consanguines, particulièrement celles qui sont constituées à partir d'un petit groupe fondateur. Cet effet lié aux petites populations et associé à des pratiques d'élevage utilisant des mâles sélectionnés expliquent une fréquence de maladies lysosomales relativement élevée chez certaines races de chiens et de chats (chien springer spaniel, chien cairn terrier, chat siamois, chat korat, etc.). On peut retrouver une fréquence élevée dans une population plus large (par exemple le chat domestique short-hair) lorsque des portées ne sont pas suffisamment dispersées ce qui apporte une probabilité plus forte de croisements consanguins.

b) Exemple des maladies de Tay-Sachs et de Sandhoff (pour revue [14])

Ces maladies, qui correspondent à des déficits en β -hexosaminidases (HEX), ont fait l'objet d'une intense analyse moléculaire ; nous allons les détailler comme modèles de maladies lysosomales d'origine génétique.

Les premières descriptions cliniques de ces maladies ont été rapportées par TAY (1881) et SACHS (1887) mais il faut attendre encore neuf décennies pour que l'enzyme déficiente soit identifiée comme étant la β -hexosaminidase A [65].

Les hexosaminidases (pour revue, [43]) ont pour rôle de dégrader le ganglioside GM2 (les gangliosides sont des glycolipides complexes que l'on trouve surtout dans la membrane plasmique des cellules nerveuses ; ils pourraient servir de récepteur pour une communication intercellulaire). Elles sont formées de deux sous-unités : α et β dont, chez l'homme, les gènes sont portés par les chromosomes 15 et 5. Les gènes des chaînes α et β se ressemblent : ils ont une taille de 35-40 kb, sont constitués de 14 exons et possèdent 60 % de nucléotides identiques. On pense qu'ils dérivent d'un ancêtre commun. Les sous-unités α et β s'unissent pour former des dimères actifs : $\alpha\beta$ pour l'HEX A, $\beta\beta$ forme l'HEX B. Seule l'HEX A est active sur GM2 ; pour fonctionner elle réclame en outre la présence d'un activateur dont le gène est sur le chromosome 5. On connaît ainsi trois types de déficit : la maladie de Tay-Sachs, où l'HEX A est déficiente à cause de l'absence de la sous-unité α ; la maladie de Sandhoff, où manque la sous-unité β ; et un type AB, où les deux sous-unités sont présentes mais l'activateur est absent. Nous ne parlerons pas de ce dernier type dont l'interprétation moléculaire est moins avancée.

Le diagnostic se fonde d'abord sur le dosage de l'enzyme. Si l'activité totale est effondrée dans la maladie de Sandhoff (où l'on ne trouve ni HEX A ni HEX B), dans la maladie de Tay-Sachs il peut y avoir une augmentation compensatrice de la sous-unité β qui masque le déficit en HEX A secondaire à

l'absence de sous-unité α . Le diagnostic est alors réalisé par électrophorèse qui permet de séparer l'HEX A de l'HEX B.

Les déficits en HEX A sont les mieux connus et les plus fréquents. Leur fréquence est élevée (environ 3 % de porteurs et un malade sur 2000 naissances) chez les Juifs Ashkénazes et chez les Franco-Canadiens, mais on les rencontre également à une fréquence moindre dans d'autres populations. Selon une idée reçue, dans une ethnie réservoir, la mutation doit provenir d'un effet fondateur et ne peut être qu'unique. Or, chez les Ashkénazes existent deux mutations principales : la plus fréquente est une insertion de 4 pb dans l'exon 11 créant un décalage de phase aboutissant à un codon stop, 9 nucléotides en aval. L'autre mutation commune est un changement ponctuel G \rightarrow C à la limite 5' de l'intron 12. L'épissage ne peut se faire et la quantité d'ARNm est très basse. Une troisième forme, moins grave car se manifestant à l'âge adulte, remplace une Gly par une Ser au codon 269.

La mutation commune des Franco-Canadiens est une délétion de 7,6 kb qui enlève le premier exon du gène ; elle est probablement due à une recombinaison entre des séquences Alu (il s'agit de courtes séquences répétitives dont on ignore complètement le rôle).

On connaît aujourd'hui, dans le gène codant pour la sous-unité α , environ une cinquantaine de lésions moléculaires différentes [1, 3, 2, 4, 40, 76]. Sans les décrire en détail, on peut les caractériser sous l'angle des mécanismes moléculaires, de la fréquence et de la distribution, de la gravité clinique et de l'homogénéité génétique [41].

Dans la grande majorité des cas, sauf consanguinité, les deux allèles portent des mutations différentes, rendant d'autant plus difficile l'évaluation de la sévérité pour chaque allèle.

Les mutations les plus nombreuses sont des mutations faux-sens, un acide aminé étant remplacé par un autre. On a également trouvé des mutations d'épissage, des mutations non-sens (apparition d'un codon stop), des mutations avec décalage de phase (telles qu'insertion de 4 pb ou délétion de 2 pb) et une délétion d'un codon (Δ Phe 304-305). Beaucoup de ces anomalies n'ont été retrouvées qu'une seule fois. Certaines sont plus fréquentes, comme la délétion Phe et surtout l'anomalie d'épissage de l'intron 9. Celle-ci conduit à l'activation d'un site d'épissage cryptique situé 17 pb en aval du site normal. Il en résulte un transcrit avec 17 nucléotides supplémentaires, conduisant à un décalage de la phase de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré [3].

Un intérêt particulier est attaché à une mutation d'épissage trouvée à l'état homozygote dans une seule famille [1]. Il s'agit d'une transition G \rightarrow A de la dernière base de l'exon 5 ne changeant pas la séquence protéique, mais modifiant l'épissage de façon telle que seuls 3 % des ARNm sont correctement épissés, alors que la grande majorité subit une délétion de l'exon 5. Il en résulte une activité enzymatique résiduelle qui explique la forme atténuée de la maladie dans cette famille.

La question de la récurrence des mutations dans la maladie de Tay-Sachs est importante en génétique des populations : si l'on trouve la même mutation en plusieurs endroits du globe, cela est-il dû à des migrations, des filiations méconnues ou à des récurrences des mêmes lésions moléculaires ? La muta-

tion la plus fréquente chez les Ashkénazes, l'insertion de 4 pb dans l'exon 11, a été retrouvée, à l'état homozygote ou hétérozygote, par plusieurs auteurs dans des familles non-Juives, notamment en France, au Canada et aux Etats-Unis. La fréquence de cet allèle était d'environ 70 % chez les Juifs et de 20 % chez les non-Juifs. L'explication la plus simple est qu'il existait en Europe un ancêtre commun porteur de cette mutation. Pour l'affirmer, il faudrait connaître les haplotypes des malades, c'est-à-dire l'enchaînement de plusieurs marqueurs polymorphes de l'ADN, voisin du gène HEX A, permettant de déterminer si deux mutations similaires sont portées par des fragments d'ADN provenant d'un ancêtre commun ou de deux ancêtres différents.

2) Les intoxications à l'origine d'une maladie lysosomale

Des maladies lysosomales provoquées par l'ingestion de plantes toxiques ont été décrites pour le bétail. En particulier, les troupeaux australiens sont touchés par une forme d'intoxication due à une plante (*Swainsona sp.*) [25, 26, 27]. La molécule toxique est un alcaloïde appelé swainsonine. C'est un puissant inhibiteur de l' α -D-mannosidase lysosomale (de foie et de rein) et de la mannosidase II du Golgi [79]. L'inhibition de cette dernière enzyme provoque des anomalies de glycosylation des protéines. Des intoxications expérimentales par la swainsonine ont été provoquées chez le rat [45, 78], le porc [77] et le mouton [79] comme modèles des mannosidoses humaines. Les résultats obtenus montrent qu'en dépit de l'absence d'expression de mannosidase II dans le cerveau, les glycoprotéines (dans cet organe) sont modifiées et pourraient expliquer les signes neurologiques associés aux mannosidoses. En outre, on observe une vacuolisation importante, d'origine lysosomale, dans le foie (hépatocytes, cellules de Kupffer) et dans le rein (tube contourné proximal), mais curieusement seul ce dernier présente une accumulation de glycoprotéines.

L'intoxication par *Solanum fastigiatum var. fastigiatum* de bovins (élevés dans l'état du Rio Grande do Sul au Brésil) provoque également une maladie lysosomale évocatrice d'une gangliosidose [62]. Les animaux atteints présentent un syndrome cérébelleux avec une vacuolisation, une dégénérescence et finalement une perte des neurones piriformes anciennement appelés cellules de Purkinje dans le cervelet.

Il existe aussi des cas d'intoxications entraînant un dysfonctionnement des lysosomes sans que l'on puisse parler *sensu stricto* de maladies lysosomales. C'est le cas de la silicose (maladie professionnelle des mineurs). Les particules de silice inhalées sont phagocytées dans les poumons par des macrophages et piégées dans leurs lysosomes. Une fois la membrane rompue, la libération des hydrolases stimule les fibroblastes. La synthèse excessive de collagène entraîne une fibrose du tissu pulmonaire et des difficultés respiratoires graves.

Des médicaments peuvent également être à l'origine de maladies lysosomales. Un tel effet a été décrit pour la chloroquine (utilisée comme anti-paludéen, anti-amibien et comme agent suppresseur du lupus érythémateux disséminé -ou LED-). En 1979 un cas clinique tout à fait surprenant est cité dans la littérature [44]. Il s'agit d'une femme présentant un LED et traitée pendant quatre ans à la chloroquine. Neuf

années après l'arrêt du traitement cette patiente a développé une faiblesse musculaire attribuée à son LED. Néanmoins une biopsie musculaire montre des modifications morphologiques des lysosomes tout à fait comparable à celles qui sont observées dans le cas d'une affection neurodégénérative de l'enfant, la maladie de Batten (il s'agit d'une lipofuscinose ainsi que nous le verrons plus loin). Depuis, l'intoxication expérimentale à la chloroquine a été utilisée comme modèle de gangliosidose humaine [33]. Ces études montrent que le degré de stockage des gangliosides dans les cellules nerveuses de type ganglionnaire dépend de l'intensité et de la fréquence de l'activité de neurotransmission. L'origine de cette corrélation proviendrait de la participation (encore hypothétique) des gangliosides dans le relargage synaptique des neurotransmetteurs. L'effet précis de la chloroquine sur le catabolisme des gangliosides demeure éluif.

B) LES MALADIES LYSOSOMALES LIÉES À UN DYS-FONCTIONNEMENT DU ROUTAGE INTRACELLULAIRE

Dans ce groupe de maladies, on observe une surcharge des lysosomes secondaire à des anomalies du trafic intracellulaire de métabolites. Cinq maladies seront détaillées: la céroïdo-lipofuscinose (maladie de Batten), la maladie de Niemann-Pick de type C ou NPC (il existe un type A et un type B, bien moins caractérisés, que nous n'aborderons pas), le syndrome de Chediak-Higashi (CHS), le syndrome d'Hermansky-Pudlak (HPS) et la mucopolysaccharidose de type II.

1) La maladie de Batten

Les céroïdo-lipofuscinoses neuronales sont un groupe de maladies neurodégénératives, héréditaires, avec différentes formes cliniques (on distingue une forme infantile, une forme infantile tardive et une forme juvénile) associées à des mutations dans des gènes différents [24]. Elles se caractérisent par une surcharge lipidique par un pigment rappelant la lipofuscine. Elles sont relativement communes parmi les populations d'Europe du Nord (environ une naissance sur 12 500) et d'Amérique du Nord (on estime à 440 000 le nombre de porteurs aux Etats-Unis). La prévalence dans les populations asiatiques n'est pas bien connue. Une étude récente [47] relate un certain nombre de cas cliniques similaires au Japon et suggère que les mutations, dans le gène responsable de la forme juvénile de la maladie, sont différentes des mutations rencontrées chez les Caucasiens. Les symptômes les plus communs sont un retard mental et un défaut de vision. Dans tous les cas, on observe une accumulation d'une protéine dans des corps autofluorescents (correspondant à des lysosomes modifiés). Cette protéine est la sous-unité c de l'ATP-synthase mitochondriale. Très hydrophobe, elle forme des complexes paracrystallins résistant à la protéolyse dans les lysosomes [29]. L'accumulation de cette protéine serait responsable de la neurodégénérescence observée communément, par un mécanisme tout à fait original [37]. La sous-unité c serait capable de former des pores ioniques dans la membrane plasmique rendant la cellule constitutivement excitée électriquement et provoquant secondairement sa mort.

Néanmoins la fonction des gènes responsables des différentes formes de la maladie de Batten reste incertaine.

Concernant le gène CLN3 responsable de la forme juvénile, des études du gène orthologue (gène d'une autre espèce, partageant une origine commune, présentant une forte homologie de séquence, et dont le produit remplit la même fonction) chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* suggèrent un rôle dans l'homéostasie du pH [52, 53, 54]. La protéine codée par le gène orthologue présente une localisation lysosomale, et les souches de levure délétées pour ce gène présentent un pH lysosomal trop acide. Cette anomalie du pH serait à l'origine de l'accumulation de la sous-unité c. La maladie de Batten correspondrait donc à une anomalie de routage intracellulaire des protons.

Il existe plusieurs modèles animaux pour la maladie de Batten. La maladie du mouton est la plus ressemblante avec la forme juvénile humaine [24, 28, 29]. Le chien serait également un bon modèle [35, 50, 67, 73, 70].

2) La maladie de Niemann-Pick de type C

La NPC est une maladie humaine provoquant des détériorations neurologiques; elle est compliquée par la présence d'une surcharge lipidique des cellules des principaux organes (pour une revue voir [39]). Les lysosomes présentent une surcharge en cholestérol provenant des LDL. Des analyses biochimiques suggèrent un dysfonctionnement du transport intracellulaire du cholestérol vers des destinations post-lysosomales. Le gène responsable de la maladie, appelé NPC1, code pour une protéine de 165 kDa impliquée d'une façon générale dans le métabolisme intracellulaire du cholestérol [80]. Une étude récente montre que cette protéine est présente au niveau de la membrane de lysosomes situés à proximité de la synapse de la terminaison nerveuse des astrocytes [51]. Elle jouerait un rôle dans le trafic rétrograde du cholestérol et d'autres molécules; une détérioration de ce trafic conduirait à une dégénérescence neuronale. Il existe une maladie assez similaire chez le chat, mais les données actuelles ne permettent pas d'affirmer qu'il s'agisse d'un modèle valide de la NPC humaine [11, 12, 36, 72].

3) Le syndrome de Chediak-Higashi (CHS) et le syndrome d'Hermansky-Pudlak (HPS)

La maladie de Chediak-Higashi et la maladie d'Hermansky-Pudlak sont deux affections héréditaires transmises selon un mode autosomique récessif. Ces deux maladies se caractérisent par de l'albinisme et des anomalies de l'hémostasie.

L'hypopigmentation découle d'un défaut d'accumulation des pigments de mélanine, synthétisés par les mélanocytes, dans des organelles analogues aux lysosomes, les mélanosomes. Quant aux plaquettes, leur fonction dépend entre autres de granules denses intraplaquettaires, compartiments ressemblant également aux lysosomes.

Le gène responsable du CHS est une protéine cytosolique de taille importante, appelée LYST (lysosomal trafficking regulator). LYST jouerait un rôle en régulant la fusion avec les lysosomes [6, 55] puisqu'une caractéristique de la maladie, la présence de lysosomes géants, serait la conséquence d'une dérégulation de cette fusion lors de la formation des mélanosomes [49]. Chez certains patients souffrant de CHS, on observe un déficit immunitaire qui pourrait s'expliquer par

une diminution de la capacité de présentation antigénique des macrophages. Ce déficit fonctionnel résulte d'un défaut de transport des molécules du CMH de classe II par les lysosomes, ce qui rend impossible leur association avec les peptides antigéniques. Cette association est normalement nécessaire à la présentation des peptides antigéniques aux cellules T. Il existe un modèle murin de cette maladie qui correspond à une mutation du pelage appelée *beige*.

Le gène du HPS code pour une protéine membranaire intégrale (protéine HPS) dont la fonction est inconnue [19, 18]. Néanmoins, une publication récente suggère que cette protéine joue un rôle dans l'homéostasie du calcium. La concentration intracellulaire en calcium influence l'activité de la phénylalanine hydroxylase et donc la synthèse de la tyrosine qui est le précurseur des mélanines [66]. Une anomalie des mouvements calciques entraînerait une carence en pigments. Il existe également pour cette maladie un modèle murin appelé *pale-ear*.

D'autres gènes responsables d'altération de la couleur du pelage et de l'hémostasie ont été clonés et leur rôle dans le transport vésiculaire mis en évidence. C'est le cas de la souris *mocha* qui est déficiente pour la protéine δ -adaptine [31]. Cette protéine fait partie du complexe AP-3 (adaptator protein) qui s'associe aux molécules de clathrine et permet un transport sélectif entre le golgi et les lysosomes.

4) La mucopolipidose de type II

La mucopolipidose de type II est une variété de mucopolipidoses, maladies héréditaires à transmission autosomique récessive qui, chez l'homme, rappellent cliniquement la maladie de Hurler (Mucopolysaccharidose de type I, cf. infra). Elles se caractérisent chez l'homme par des troubles du développement du squelette, une hypertrophie du foie et de la rate, une importante arriération mentale, une surdité, des opacités cornéennes, des anomalies hématologiques et parfois une atteinte cardiaque.

Les anglo-saxons appellent également la mucopolipidose de type II "I-cell disease" du fait des inclusions mises en évidence dans les fibroblastes cultivés [75]. Dans cette mucopolipidose existe un défaut de phosphorylation du mannose dans le compartiment cis-golgien [61, 22]. De fait, on peut montrer une déficience en *N*-acétylglycosamine phosphotransférase chez les animaux atteints [23]. En dépit de la présence normale des récepteurs du M6P, certaines enzymes lysosomales ne peuvent plus être ciblées vers leur destination habituelle; ces enzymes sont sécrétées en continu et leur absence dans les lysosomes se traduit par une accumulation de glycolipides et de mucopolysaccharides.

3. Pathogénie des maladies lysosomales

Ainsi que nous l'avons déjà évoqué, toutes les espèces domestiques sont touchées par les maladies lysosomales, à l'exception semble-t-il du cheval chez lequel de telles maladies n'ont jamais été décrites. Certains éléments de la pathogénie des maladies lysosomales sont fréquemment rencon-

trés. D'autres sont plus spécifiques de certains syndromes. Nous évoquerons successivement ces deux aspects.

Dans les maladies lysosomales de surcharge, on observe une accumulation primaire du substrat dont l'enzyme est déficiente. Cette accumulation interfère souvent avec la distribution d'autres hydrolases provoquant une accumulation secondaire d'autres substrats [32]. Les lysosomes continuent de grossir et occupent de plus en plus de cytoplasme, allant jusqu'à écraser les autres organelles (dont le noyau). La cellule, dans son ensemble, se met alors à grossir, conduisant à une organomégalie.

A l'exception du tissu nerveux, de l'os et du cartilage, la physiopathologie de ces affections est dominée par une augmentation de la taille des cellules, des tissus, des organes. Ainsi dans les mucopolysaccharidoses (MPS), le stockage de glycosaminoglycane dans les cellules des valves mitrales conduit à une modification profonde de la morphologie valvulaire : de fusiformes, les valves deviennent arrondies. Cet épaissement des feuillets et cordages mitraux entraîne secondairement une insuffisance mitrale. Les lésions squelettiques sont une caractéristique des MPS dans la mesure où elles sont consécutives à des défauts dans le métabolisme des glycosaminoglycane, constituants essentiels de l'os. Lorsque les cellules de la cornée sont touchées (avec accumulation de glycosaminoglycane), la réfraction de la lumière conduit à l'observation, par ophtalmoscopie, d'une image floue de la rétine avec des vaisseaux et un disque optique moins facilement distinguables.

Le système nerveux central est très souvent atteint. Les neurones gonflent et leurs lysosomes présentent des inclusions lamellaires dues à l'accumulation de glycolipides (secondairement à l'accumulation de glycosaminoglycane). Le métabolisme des gangliosides est souvent altéré (de façon primaire dans les gangliosidoses ou secondaire dans les mucopolysaccharidoses). Cette altération coïncide avec un bourgeonnement des neurones [59, 60, 68]. Il semble que la présence de dendrites ectopiques joue un rôle dans le dysfonctionnement du SNC.

Un des aspects les plus surprenants dans l'étude des maladies lysosomales réside dans la variété des types cellulaires, des tissus et des organes atteints. La pathogénie est souvent différente d'une maladie à l'autre et l'on observe rarement, pour une maladie donnée, une atteinte de tous les organes. Pourtant, les lysosomes sont présents dans toutes les cellules (exception faite des hématies) et les hydrolases lysosomales peuvent être considérées comme des protéines ubiquitaires. Dans le paragraphe précédent, nous avons vu que les organes préférentiellement atteints sont ceux où le turn-over cellulaire est faible (le SNC, l'os, le foie) mais cette explication n'est pas suffisante. Prenons l'exemple de la mucopolysaccharidose de type II. Le phénotype pathologique devrait être une combinaison de toutes les maladies lysosomales puisque c'est le transport de la plupart des hydrolases vers les lysosomes qui est affecté. Or, dans cette maladie ce sont surtout les cellules qui dérivent du mésenchyme qui sont atteintes. La plupart des organes, dont le foie et le cerveau, ont des activités enzymatiques lysosomales normales. Cette observation suggère qu'il existe une voie d'adressage des hydrolases indépendante

du mannose-6-P et (ou) que les enzymes sécrétées sont internalisées par des récepteurs membranaires qui reconnaissent les résidus mannose même non phosphorylés. Une voie d'adressage indépendante du mannose-6-P a bien été démontrée pour certaines hydrolases [81, 56]. Il peut donc se produire des mécanismes de compensation d'un organe à l'autre.

4. Signes cliniques

Les maladies lysosomales sont le plus souvent des affections chroniques, d'évolution lente, avec une variation importante de l'intensité des signes cliniques au sein d'une même maladie. Cette variabilité peut se manifester dans une colonie de chats ou de chiens présentant la même mutation, dans un même environnement. La variation d'expressivité s'explique alors par la différence de fonds génétique d'un individu à l'autre.

Les signes cliniques prédominants reflètent l'atteinte du SNC, du squelette, de l'œil, du système cardiovasculaire, ou de tout autre organe hypertrophié (Tableau I).

Cliniquement on sépare les maladies lysosomales selon qu'elles impliquent ou non le SNC. Les atteintes les plus graves du SNC apparaissent dans la fucosidose, la galactosylcéramide lipidose (maladie de Krabbe), les gangliosidoses GM₁ et GM₂ (maladies de Sandhoff et de Tay-Sachs), les mannosidoses α et β les mucopolysaccharidoses (MPS) III A et III D (syndromes de Sanfilippo). On observe des tremblements de la tête et des membres et une progression vers des anomalies de la locomotion, des tétraplégies spasmodiques, des crises épileptiformes et une évolution vers la mort.

Les autres anomalies sont associées à des retards de croissance, des troubles de la vision, une hépatosplénomégalie, des souffles cardiaques, des déformations du squelette (face, colonne vertébrale, côtes, os longs). Les MPS touchent, en général, plus d'organes que les autres maladies.

Les troubles de la vision peuvent intervenir dans les gangliosidoses et les lipofuscinoses par atrophie rétinienne et surcharge dans les cellules ganglionnaires restantes. Dans certains cas de cécité, on observe une accumulation de lipopigment sans altération de la structure rétinienne [73]. Dans le HPS, on observe parfois une cécité nocturne.

La plupart des maladies lysosomales se manifestent pendant les quatre mois après la naissance, certaines avant le sevrage et peu à l'âge adulte (la MPS III A et la fucosidose du chien). Les formes cliniques très graves aboutissent à une létalité néonatale. Chez l'homme, on peut associer le degré de gravité avec le type de mutation : les allèles nuls sont souvent les plus dramatiques dans leur expression clinique. Chez l'animal, ce type d'information est loin d'être complètement connu.

5. Diagnostic des maladies lysosomales (pour Revue [17])

Le seul diagnostic de certitude est le diagnostic moléculaire. Ainsi que nous l'avons vu, les mutations responsables de maladies lysosomales chez les animaux ne sont connues que pour un très petit nombre d'entre elles.

Éléments de Sémiologie	Commentaires
affections chroniques et progressives	souvent fatales, atteintes organiques très variables
gravité inversement proportionnelle à l'âge d'apparition	létalité postnatale importante
atteintes du SNC	tremblements, anomalies de la locomotion, crises épileptiformes
atteintes du squelette	déformations, associées à des retards de croissance
organomégalies	le plus souvent foie, rate
atteintes oculaires	cécité nocturne ou totale
atteintes cardiaques	souffles d'insuffisance valvulaire

TABLEAU I. — Sémiologie des maladies lysosomales.

Il existe pourtant au moins une maladie pour laquelle on dispose d'un tel outil diagnostic. Il s'agit de la fucosidose, maladie humaine grave, dont il existe un modèle canin représenté par une colonie de English springer spaniel. Comme chez l'homme, il s'agit d'une affection neurologique progressive et fatale. Après clonage de l'ADNc de l' α L-fucosidase canin, un test PCR a été mis au point afin de détecter rapidement les porteurs sains et les malades dans une portée [46].

Il existe un certain nombre de méthodes, plus ou moins expérimentales, pour le diagnostic de maladies lysosomales chez l'homme et les animaux modèles qu'on ne peut envisager en médecine vétérinaire courante. Citons par exemple la spectroscopie par RMN du cerveau [74] pour le diagnostic de la maladie de NPC, ou l'étude de l'autofluorescence dans des fibroblastes cutanés [13] pour le diagnostic de maladies lysosomales neurodégénératives.

Actuellement, le diagnostic de maladie lysosomale repose sur un certain nombre de critères : familiaux, cyto-histologiques, fonctionnels enzymatiques.

A) LES CRITÈRES FAMILIAUX.

On peut suspecter une maladie neurodégénérative héréditaire si l'historique de la lignée rapporte des cas de portées réduites avec des individus morts-nés, s'il existe des individus de la lignée avec des signes cliniques identiques.

Statistiquement on devrait trouver, dans une portée issue de parents hétérozygotes : un quart de malades (homozygotes pour le gène muté), une moitié de porteurs sains (eux-mêmes hétérozygotes) et un quart d'individus sains (homozygotes pour l'allèle sauvage).

B) LES CRITÈRES CYTO-HISTOLOGIQUES

Un frottis sanguin peut permettre la mise en évidence d'une vacuolisation dans les granulocytes et dans les lymphocytes. La vacuolisation cellulaire pourra être révélée également lors de biopsie (nœuds lymphatiques, muscles, foie). L'examen *post-mortem* s'avère très utile pour préciser le diagnostic. On s'intéresse alors au cerveau et aux organes hypertrophiés. Ainsi, les lésions rencontrées lors de la leucodystrophie à cellules globoïdes (maladie de Krabbe) sont caractéristiques et permettent un diagnostic de certitude. Cette maladie correspond à un déficit en β -galactocérébrosidase. Les principaux symptômes sont de type motoneurone central avec une parésie/paralysie ascendante, associée à un syndrome cérébelleux. L'examen *post-mortem* du SNC montre, dans la substance blanche, des macrophages géants (appelés cellules globoïdes) avec d'énormes inclusions que l'on peut marquer à l'APS (Acide Périodique Schiff). En outre, la substance blanche est démyélinisée.

Lorsque le matériel stocké est éliminé (par excrétion ou par mort cellulaire) on peut le retrouver dans les urines. Il existe des tests analytiques simples (spot-tests, chromatographie sur couche mince) ou plus évolués (HPLC) pour détecter un certain nombre d'oligosaccharides dans l'urine. Ils sont utiles pour identifier une mannosidose. Le spot-test à la toluidine permet de suspecter une mucopolysaccharidose ou une gangliosidose. Dans tous les cas, il ne s'agit que de tests d'orientation vers une voie métabolique défectueuse. La confirmation doit provenir de la dernière étape du diagnostic.

C) LES CRITÈRES FONCTIONNELS ENZYMATIQUES

On peut réaliser des essais d'activité enzymatique à partir de cellules prélevées sur l'animal vivant (leucocytes, fibroblastes cutanés, cellules hépatiques) ou mort [71]. On peut utiliser des cellules témoins prélevées sur des animaux sains. La baisse d'activité enzymatique doit être importante pour confirmer le diagnostic. Très souvent on observera une augmentation de l'activité des autres enzymes lysosomales. Ces tests ne permettent pas d'identifier les individus hétérozygotes car il existe une zone de recouvrement avec les valeurs d'activité enzymatique observées chez les individus homozygotes sains.

6. Thérapie des maladies lysosomales

Il n'existe actuellement aucun traitement curatif. Seule la maladie de Gaucher de type I bénéficie d'une thérapie enzymatique substitutive. Il existe également deux autres approches thérapeutiques qui en sont encore au stade expérimental : la greffe de moelle osseuse et la thérapie génique.

A) LA THÉRAPIE ENZYMATIQUE SUBSTITUTIVE

Le principe consiste à administrer au malade l'enzyme active dont le déficit est à l'origine de la maladie. Concrètement, seule la maladie de Gaucher de type I (forme non neurologique), considérée comme moins grave que d'autres maladies lysosomales, bénéficie d'un tel traitement. Dans le type I, les lipides non dégradés s'accumulent dans les macrophages, la moelle osseuse, la rate et le foie (ainsi que dans le SNC pour les formes II et III). En 1973, Roscoe BRADY essaya de traiter des patients par de la glucocérébrosidase (l'enzyme déficiente dans cette affection) purifiée à partir de placenta humain [10]. Cependant, les protéines avaient du mal à atteindre leur destination (les macrophages). Il fallut modifier leur structure glucidique afin d'exposer les mannoses pour faciliter la capture de l'enzyme par les macrophages. La molécule modifiée (appelée aglucérase) fut approuvée par la FDA américaine en 1991 sous le nom de Ceredase®. La méthode d'extraction se révélant extrêmement coûteuse (il fallait 10 à 12 tonnes de placenta humain, soit le fruit d'environ 50 000 accouchements, pour traiter pendant un an un malade sévèrement atteint) ce médicament fut le plus cher au monde (un million de francs environ pour un an de traitement). En 1994, la protéine fut produite par des cellules modifiées génétiquement et commercialisée sous le nom de Cerezyme®. Près de 2000 patients dans le monde bénéficient de ce traitement qui permet de faire disparaître les symptômes.

B) LA GREFFE DE MOELLE OSSEUSE (GMO)

La GMO vise à reconstituer le système hématopoïétique d'un malade à l'aide de cellules souches d'un donneur sain et immunocompatible. Les nouvelles cellules sanguines circulantes et les histiocytes qui peuplent les organes deviendront une source d'enzyme à vie. L'enzyme sécrétée dans la circulation pourra être internalisée par endocytose dans des cellules à distance [8]. Les résultats expérimentaux et cliniques sont variables et parfois contradictoires (pour revue [58]). Si la GMO a donné quelques résultats positifs dans les maladies lysosomales, des problèmes et des risques majeurs persistent : la difficulté de trouver un donneur immunocompatible, l'exigence de pratiquer une immunosuppression, l'échec de 10 à 15 % des greffes et la mortalité qui est encore de 10 à 20 %. Ces difficultés pourraient être en principe contournées par la thérapie génique.

C) LA THÉRAPIE GÉNIQUE (pour revue [58])

Dans le cas des maladies génétiques, la thérapie génique consiste, le plus souvent, à introduire dans l'organisme atteint la version normale du gène défectueux responsable de la maladie. Dans le cadre des maladies lysosomales, deux stratégies (éventuellement complémentaires) sont envisagées : le transfert du gène thérapeutique dans les cellules des organes les plus atteints et/ou la production périphérique et l'excrétion de l'enzyme dans le milieu extracellulaire. En outre, plusieurs voies d'accès sont possibles et de nombreux vecteurs géniques sont à l'étude. Les succès obtenus dans la thérapie génique de modèles animaux des maladies lysosomales (en

l'occurrence des modèles de rats et de souris) permettent de fonder un espoir d'application chez l'homme. Il existe à l'heure actuelle quelques essais cliniques autorisés chez l'homme ; tous n'en sont qu'au stade I. Nous en citerons quatre.

L'étude la plus ancienne (lancée en septembre 1993), placée sous la responsabilité de J. BARRANGER à l'université de Pittsburgh, vise à transférer *ex vivo* à l'aide d'un vecteur rétroviral le gène de la glucocérébrosidase dans les cellules souches hématopoïétiques qui, différenciées notamment en macrophages, pourront agir dans divers tissus pour traiter la maladie de Gaucher. Ce traitement passe donc par une auto-GMO. Une stratégie similaire est utilisée, sous la responsabilité de L.S. LASHFORD (Paterson Institute for Cancer Research, Manchester, UK) pour le traitement de la maladie de Hurler (MPS de type I) avec un transgène codant pour l' α -L-iduronidase. En France, A. FISHER (Hôpital Necker) et J.-M. HEARD (Institut Pasteur) sont responsables d'un essai de thérapie génique de la maladie de Hurler, par implantation de fibroblastes infectés *ex vivo* à l'aide d'un rétrovirus. Ici l'approche est celle d'un organoïde créé *in vitro* et implanté en intrapéritonéal. Ce néo-organe, comprenant les fibroblastes corrigés du malade introduits dans un gel de collagène en présence de fibres synthétiques et de facteurs de croissance, est vascularisé au bout de quelques jours et devient un implant autonome relié à la circulation mésentérique. Le dernier essai que nous citerons est réalisé à l'université du Minnesota sous la responsabilité de C.B. WHITLEY et vise à traiter des patients atteints de la maladie d'Hunter (MPS de type II). Des cellules souches circulantes sont infectées *ex vivo* par un vecteur rétroviral portant le gène de l'iduronate-2-sulfatase, puis réinjectées par voie intraveineuse.

Il est important de saluer les efforts déployés par ces équipes et celles que nous n'avons pas citées, pour trouver des traitements à des maladies qui n'ont peut-être pas l'incidence suffisante pour susciter un effort financier important.

Conclusion

L'étude des maladies lysosomales est importante : elle permet de mieux comprendre les mécanismes fins du routage intracellulaire, d'appréhender le métabolisme et la fonction de biomolécules complexes. Elle pose également un certain nombre de questions : pourquoi seuls certains types cellulaires sont touchés ? Quels sont les composants du fonds génétique qui permettent de moduler la gravité des signes cliniques ?

Mais cette étude est surtout importante du fait de la précocité et du caractère fatal de ces maladies pour lesquelles la médecine ne peut que proposer un diagnostic prénatal. Il reste donc un travail d'étude important à réaliser pour imaginer des traitements adaptés à chacune de ces maladies.

Pour le praticien vétérinaire se pose le problème du diagnostic (difficile) de maladies dont on suppose qu'elles sont fréquentes chez les animaux domestiques du fait d'un fort taux de consanguinité. Son travail peut s'avérer décisif dans la découverte et l'étude de nouveaux modèles animaux.

Références bibliographiques

1. — AKLI S., CHELLY J., MEZARD C., GANDY S., KAHN A. et POENARU L. : A "G" to "A" mutation at position -1 of a 5' splice site in a late infantile form of Tay-Sachs disease. *J Biol Chem*, 1990, **265**, 7324-30.
2. — AKLI S., CHELLY J., LACORTE J.M., POENARU L. et KAHN A. : Seven novel Tay-Sachs mutations detected by chemical mismatch cleavage of PCR-amplified cDNA fragments. *Genomics*, 1991, **11**, 124-34.
3. — AKLI S., CHELLY J., KAHN A. et POENARU L. : A null allele frequent in non-Jewish Tay-Sachs patients. *Hum Genet*, 1993, **90**, 614-20.
4. — AKLI S., CHOMEL J.C., LACORTE J.M., BACHNER L., KAHN A. et POENARU L. : Ten novel mutations in the HEXA gene in non-Jewish Tay-Sachs patients [published erratum appears in *Hum Mol Genet* 1993 Apr ; 2 (4) : 496]. *Hum Mol Genet*, 1993, **2**, 61-7.
5. — BAINTON D.F. : The discovery of lysosomes. *J Cell Biol*, 1981, **91**, 66s-76s.
6. — BARBOSA M.D., NGUYEN Q.A., TCHERNEV V.T., ASHLEY J.A., DETTER J.C., BLAYDES S.M., BRANDT S.J., CHOTAI D., HODGMAN C., SOLARI R.C., LOVETT M. et KINGSMORE S.F. : Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes [published erratum appears in *Nature* 1997 Jan 2 ; 385 (6611) : 97]. *Nature*, 1996, **382**, 262-5.
7. — BARTON R.W. et NEUFELD E.F. : The Hurler corrective factor. Purification and some properties. *J Biol Chem*, 1971, **246**, 7773-9.
8. — BOU-GHARIOS G., ABRAHAM D. et OLSEN I. : Lysosomal storage diseases : mechanisms of enzyme replacement therapy. *Histochem J*, 1993, **25**, 593-605.
9. — BRADY R.O. : Gaucher's disease : past, present and future. *Baillieres Clin Haematol*, 1997, **10**, 621-34.
10. — BROWN W. J., GOODHOUSE J. et FARQUHAR M.G. : Mannose-6-phosphate receptors for lysosomal enzymes cycle between the Golgi complex and endosomes. *J Cell Biol*, 1986, **103**, 1235-47.
11. — BROWN L., WALL D., MARCHANT C. et SERNIA C. : Tissue-specific changes in angiotensin II receptors in streptozotocin-diabetic rats. *J Endocrinol*, 1997, **154**, 355-62.
12. — BROWN D.E., THRALL M.A., WALKLEY S.U., WURZELMANN S., WENGER D.A., ALLISON R.W. et JUST C.A. : Metabolic abnormalities in feline Niemann-Pick type C heterozygotes. *J Inher Metab Dis*, 1996, **19**, 319-30.
13. — CONNOLLY G.P. : Fibroblast models of neurological disorders : fluorescence measurement studies [In Process Citation]. *Trends Pharmacol Sci*, 1998, **19**, 171-7.
14. — DREYFUS J.-C., AKLI S. et POENARU L. : Maladies de Tay-Sachs et de Sandhoff : les déficits en β -hexosaminidases, modèles de maladies des lysosomes. *m/s*, 1992, **8**, 797-804.
15. — DUNCAN J.R. et KORNFELD S. : Intracellular movement of two mannose 6-phosphate receptors : return to the Golgi apparatus. *J Cell Biol*, 1988, **106**, 617-28.
16. — DUVE C. : Exploring cells with a centrifuge. *Science*, 1975, **189**, 186-94.
17. — EVANS R.J. : Lysosomal storage diseases in dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*, 1989, **30**, 144-150.
18. — FENG G.H., BAILIN T., OH J. et SPRITZ R.A. : Mouse pale ear (ep) is homologous to human Hermansky-Pudlak syndrome and contains a rare 'AT-AC' intron. *Hum Mol Genet*, 1997, **6**, 793-7.
19. — GARDNER J.M., WILDENBERG S.C., KEIPER N.M., NOVAK E.K., RUSINIAK M.E., SWANK R.T., PURI N., FINGER J.N., HAGIWARA N., LEHMAN A.L., GALES T.L., BAYER M.E., KING R.A. et BRILLIANT M.H. : The mouse pale ear (ep) mutation is the homologue of human Hermansky-Pudlak syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, **94**, 9238-43.
20. — GEUZE H.J., SLOT J.W., STROUS G.J., HASILIK A. et VON FIGURA K. : Possible pathways for lysosomal enzyme delivery. *J Cell Biol*, 1985, **101**, 2253-62.
21. — GRIFFITHS G., HOFACK B., SIMONS K., MELLMAN I. et KORNFELD S. : The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell*, 1988, **52**, 329-41.
22. — HASILIK A., WAHEED A. et VON FIGURA K. : Enzymatic phosphorylation of lysosomal enzymes in the presence of UDP-N-acetylglucosamine. Absence of the activity in I-cell fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981, **98**, 761-7.
23. — HUBLER M., HASKINS M.E., ARNOLD S., KASER-HOTZ B., BOSSHARD N.U., BRINER J., SPYCHER M.A., GITZELMANN R., SOMMERLADE H.J. et VON FIGURA K. : Mucopolipidosis type II in a domestic shorthair cat. *J Small Anim Pract*, 1996, **37**, 435-41.
24. — HUGHES S.M., KAY G.W., JORDAN T.W., RICKARDS G.K. et PALMER. D.N. : Disease-specific pathology in neurons cultured from sheep affected with ceroid lipofuscinosis [In Process Citation]. *Mol Genet Metab*, 1999, **66**, 381-6.
25. — HUXTABLE C.R. et DORLING P.R. : Poisoning of livestock by Swainsona spp. : current status. *Aust Vet J*, 1982, **59**, 50-3.
26. — HUXTABLE C.R. et DORLING P.R. : Animal model of human disease. Mannosidosis. Swainsonine-induced mannosidosis. *Am J Pathol*, 1982, **107**, 124-6.
27. — HUXTABLE C.R., DORLING P.R. et WALKLEY S.U. : Onset and regression of neuroaxonal lesions in sheep with mannosidosis induced experimentally with swainsonine. *Acta Neuropathol*, 1982, **58**, 27-33.
28. — JOLLY R.D., MARTINUS R.D. et PALMER. D.N. : Sheep and other animals with ceroid-lipofuscinoses : their relevance to Batten disease. *Am J Med Genet*, 1992, **42**, 609-14.
29. — JOLLY R.D. : The mannosidoses and ceroid-lipofuscinoses : experimental studies on two types of storage disease. *Pathology*, 1997, **29**, 51-6.
30. — JOLLY R.D. : The ovine model of neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL) : its contribution to understanding the pathogenesis of Batten disease. *Neuropediatrics*, 1997, **28**, 60-2.
31. — KANTHETI P., QIAO X., DIAZ M.E., PEDEN A.A., MEYER G.E., CARSKADON S.L., KAPFHAMER D., SUFALCO D., ROBINSON M.S., NOEBELS J.L. et BURMEISTER M. : Mutation in AP-3 delta in the mocha mouse links endosomal transport to storage deficiency in platelets, melanosomes, and synaptic vesicles. *Neuron*, 1998, **21**, 111-22.
32. — KINT J.A., DACREMONT G., CARTON D., ORYE E. et HOOFT C. : Mucopolysaccharidosis : secondarily induced abnormal distribution of lysosomal isoenzymes. *Science*, 1973, **181**, 352-4.
33. — KLINGHARDT G.W. : Correlations between ganglioside storage degree and physiological characteristics of neuronal systems-experimental chloroquine intoxication in miniature pig [published erratum appears in *J Hirnforsch* 1996 ; 37 (3) : 455]. *J Hirnforsch*, 1996, **37**, 181-94.
34. — KORNFELD S. : Trafficking of lysosomal enzymes. *Faseb J*, 1987, **1**, 462-8.
35. — LINGAAS F., AARSKAUG T., SLETTEN M., BJERKAS I., GRIMHOLT U., MOE L., JUNEJA R.K., WILTON A.N., GALIBERT F., HOLMES N.G. et DOLF G. : Genetic markers linked to neuronal ceroid lipofuscinosis in English setter dogs. *Anim Genet*, 1998, **29**, 371-6.
36. — LOWENTHAL A.C., CUMMINGS J.F., WENGER D.A., THRALL M.A., WOOD P.A. et LAHUNTA A. de : Feline sphingolipidosis resembling Niemann-Pick disease type C. *Acta Neuropathol*, 1990, **81**, 189-97.
37. — McGEOCH J.E. et PALMER. D.N. : Ion pores made of mitochondrial ATP synthase subunit c in the neuronal plasma membrane and batten disease [In Process Citation]. *Mol Genet Metab*, 1999, **66**, 387-92.
38. — MELLMAN I., FUCHS R. et HELENIUS A. : Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem*, 1986, **55**, 663-700.
39. — MORRIS J.A. et CARSTEA E.D. : Niemann-Pick C disease : cholesterol handling gone awry. *Mol Med Today*, 1998, **4**, 525-31.
40. — MULES E.H., HAYFLICK S., MILLER C.S., REYNOLDS L.W. et THOMAS G.H. : Six novel deleterious and three neutral mutations in the gene encoding the alpha-subunit of hexosaminidase A in non-Jewish individuals. *Am J Hum Genet*, 1992, **50**, 834-41.
41. — NAVON R. : Molecular and clinical heterogeneity of adult GM2 gangliosidosis. *Dev Neurosci*, 1991, **13**, 295-8.
42. — NEUFELD E.F. et CANTZ M. J. : Corrective factors for inborn errors of mucopolysaccharide metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, 1971, **179**, 580-7.
43. — NEUFELD E.F. : Natural history and inherited disorders of a lysosomal enzyme, beta-hexosaminidase. *J Biol Chem*, 1989, **264**, 10927-30.
44. — NEVILLE H.E., MAUNDER-SEWRY C.A., McDOUGALL J., SEWELL J.R. et DUBOWITZ V. : Chloroquine-induced cytosomes with curvilinear profiles in muscle. *Muscle Nerve*, 1979, **2**, 376-81.
45. — NOVIKOFF P.M., TOUSTER O., NOVIKOFF A.B. et TULSIANI D.P. : Effects of swainsonine on rat liver and kidney : biochemical and morphological studies. *J Cell Biol*, 1985, **101**, 339-49.
46. — OCCHIODORO T. et ANSON D.S. : Isolation of the canine alpha-L-fucosidase cDNA and definition of the fucosidosis mutation in English Springer Spaniels. *Mamm Genome*, 1996, **7**, 271-4.
47. — OISHI K., IDA H., KUROSAWA K. et ETO Y. : Clinical and molecular analysis of Japanese patients with neuronal ceroid lipofuscinosis [In Process Citation]. *Mol Genet Metab*, 1999, **66**, 344-8.
48. — OLSEN I., MUIR H., SMITH R., FENSOM A. et WATT D.J. : Direct enzyme transfer from lymphocytes is specific. *Nature*, 1983, **306**, 75-7.

49. — ORLOW S.J. : Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J Invest Dermatol*, 1995, **105**, 3-7.
50. — PALMER D.N., TYYNELÄ J., VAN MIL H.C., WESTLAKE V.J. et JOLLY R.D. : Accumulation of sphingolipid activator proteins (SAPs) A and D in granular osmiophilic deposits in miniature Schnauzer dogs with ceroid-lipofuscinosis. *J Inher Metab Dis*, 1997, **20**, 74-84.
51. — PATEL S.C., SURESH S., KUMAR U., HU C.Y., COONEY A., BLANCHETTE-MACKIE E.J., NEUFELD E.B., PATEL R.C., BRADY R.O., PATEL Y.C., PENTCHEV P.G. et ONG W.Y. : Localization of Niemann-Pick C1 protein in astrocytes : implications for neuronal degeneration in Niemann-Pick type C disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, **96**, 1657-62.
52. — PEARCE D.A., FEREA T., NOSEL S.A., DAS B. et SHERMAN F. : Action of BTN1, the yeast orthologue of the gene mutated in Batten disease [In Process Citation]. *Nat Genet*, 1999, **22**, 55-8.
53. — PEARCE D.A., NOSEL S.A. et SHERMAN F. : Studies of pH regulation by btn1p, the yeast homolog of human ctn3p [In Process Citation]. *Mol Genet Metab*, 1999, **66**, 320-3.
54. — PEARCE D.A. et SHERMAN F. : Investigation of batten disease with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [In Process Citation]. *Mol Genet Metab*, 1999, **66**, 314-9.
55. — PEROU C.M., MOORE K.J., NAGLE D.L., MISUMI D.J., WOOLF E.A., MCGRAIL S.H., HOLMGREN L., BRODY T.H., DUS-SAULT B.J., Jr, MONROE C.A., DUYK G.M., PRYOR R.J., LI L., JUSTICE M.J. et KAPLAN J. : Identification of the murine beige gene by YAC complementation and positional cloning. *Nat Genet*, 1996, **13**, 303-8.
56. — PETERS C., BRAUN M., WEBER B., WENDLAND M., SCHMIDT B., POHLMANN R., WAHEED A. et VON FIGURA K. : Targeting of a lysosomal membrane protein : a tyrosine-containing endocytosis signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase is necessary and sufficient for targeting to lysosomes. *Embo J*, 1990, **9**, 3497-506.
57. — PFEFFER S.R. : Mannose 6-phosphate receptors and their role in targeting proteins to lysosomes. *J Membr Biol*, 1988, **103**, 7-16.
58. — POENARU L. : Thérapie génique des maladies lysosomales. *m/s*, 1996, **12**, 35-46.
59. — PURPURA D.P., PAPPAS G.D. et BAKER. H.J. : Fine structure of meganeurites and secondary growth processes in feline GM1-gangliosidosis. *Brain Res*, 1978, **143**, 1-12.
60. — PURPURA D.P. et BAKER H.J. : Meganeurites and other aberrant processes of neurons in feline GM1-gangliosidosis : a Golgi study. *Brain Res*, 1978, **143**, 13-26.
61. — REITMAN M.L., VARKI A. et KORNFELD S. : Fibroblasts from patients with I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy are deficient in uridine 5'-diphosphate-N-acetylglucosamine : glycoprotein N-acetylglucosaminylphosphotransferase activity. *J Clin Invest*, 1981, **67**, 1574-9.
62. — RIET-CORREA F., MENDEZ M.D., SCHILD A.L., SUMMERS B.A. et OLIVEIRA J.A. : Intoxication by *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* as a cause of cerebellar degeneration in cattle. *Cornell Vet*, 1983, **73**, 240-56.
63. — RODMAN J.S., MERCER R.W. et STAHL P.D. : Endocytosis and transcytosis. *Curr Opin Cell Biol*, 1990, **2**, 664-72.
64. — ROTHMAN J.E. et SCHMID S.L. : Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles. *Cell*, 1986, **46**, 5-9.
65. — SANDHOFF K., JATZKEWITZ H. et PETERS G. : [Infantile amaurotic idiocy and related forms as ganglioside storage diseases]. *Naturwissenschaften*, 1969, **56**, 356-62.
66. — SCHALLREUTER K.U., BEAZLEY W.D., HIBBERTS N.A., SWANSON N.N. et PITTELKOW M.R. : Perturbed epidermal pterin metabolism in Hermansky-Pudlak syndrome. *J Invest Dermatol*, 1998, **111**, 511-6.
67. — SIAKOTOS A.N., SCHNIPPEL K., LIN R.C. et VAN KUIJK F.J. : Biosynthesis and metabolism of 4-hydroxynonenal in canine ceroid-lipofuscinosis. *Am J Med Genet*, 1995, **57**, 290-3.
68. — SIEGEL D.A. et WALKLEY S.U. : Growth of ectopic dendrites on cortical pyramidal neurons in neuronal storage diseases correlates with abnormal accumulation of GM2 ganglioside. *J Neurochem*, 1994, **62**, 1852-62.
69. — SILVERSTEIN S.C., STEINMAN R.M. et COHN Z.A. : Endocytosis. *Annu Rev Biochem*, 1977, **46**, 669-722.
70. — SISK D.B., LEVESQUE D.C., WOOD P.A. et STYER E.L. : Clinical and pathologic features of ceroid lipofuscinosis in two Australian cattle dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 1990, **197**, 361-4.
71. — SNYDER R.A. et BRADY R.O. : The use of white cells as a source of diagnostic material for lipid storage diseases. *Clin Chim Acta*, 1969, **25**, 331-8.
72. — SOMERS K.L., WENGER D.A., ROYALS M.A., CARSTEAD E.D., CONNALLY H.E., KELLY T., KIMBALL R. et THRALL M.A. : Complementation studies in human and feline Niemann-Pick type C disease. *Mol Genet Metab*, 1999, **66**, 117-21.
73. — TAYLOR R.M. et FARROW B.R. : Ceroid lipofuscinosis in the border collie dog : retinal lesions in an animal model of juvenile Batten disease. *Am J Med Genet*, 1992, **42**, 622-7.
74. — TEDESCHI G., BONAVITA S., BARTON N.W., BETOLINO A., FRANK J.A., PATRONAS N.J., ALGER J.R. et SCHIFFMANN R. : Proton magnetic resonance spectroscopic imaging in the clinical evaluation of patients with Niemann-Pick type C disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1998, **65**, 72-9.
75. — TONDEUR M., VAMOS-HURWITZ E., MOCKEL-POHL S., DEREUME J.P., CREMER N. et LOEB H. : Clinical, biochemical, and ultrastructural studies in a case of chondrodystrophy presenting the I-cell phenotype in tissue culture. *J Pediatr*, 1971, **79**, 366-78.
76. — TRIGGS-RAINE B.L., AKERMAN B.R., CLARKE J.T. et GRAVEL R.A. : Sequence of DNA flanking the exons of the HEXA gene, and identification of mutations in Tay-Sachs disease. *Am J Hum Genet*, 1991, **49**, 1041-54.
77. — TULSIANI D.R., BROQUIST H.P., JAMES L.F. et TOUSTER O. : The similar effects of swainsonine and locoweed on tissue glycosidases and oligosaccharides of the pig indicate that the alkaloid is the principal toxin responsible for the induction of locoism. *Arch Biochem Biophys*, 1984, **232**, 76-85.
78. — TULSIANI D.R., BROQUIST H.P. et TOUSTER O. : Marked differences in the swainsonine inhibition of rat liver lysosomal alpha-D-mannosidase, rat liver Golgi mannosidase II, and jack bean alpha-D-mannosidase. *Arch Biochem Biophys*, 1985, **236**, 427-34.
79. — TULSIANI D.R., BROQUIST H.P., JAMES L.F. et TOUSTER O. : Production of hybrid glycoproteins and accumulation of oligosaccharides in the brain of sheep and pigs administered swainsonine or locoweed. *Arch Biochem Biophys*, 1988, **264**, 607-17.
80. — XIE C., TURLEY S.D., PENTCHEV P.G. et DIETSCHY J.M. : Cholesterol balance and metabolism in mice with loss of function of Niemann-Pick C protein. *Am J Physiol*, 1999, **276**, E336-44.
81. — WILLIAMS M.A. et FUKUDA M. : Accumulation of membrane glycoproteins in lysosomes requires a tyrosine residue at a particular position in the cytoplasmic tail. *J Cell Biol*, 1990, **111**, 955-66.