

50376
1975
53
N° d'Ordre : 540

50376
1975
53

Université des Sciences et Techniques de Lille I

MEMOIRE PRESENTE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE I
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR 3^e CYCLE
SPÉCIALITÉ BIOCHIMIE

PAR

Théophile Hondi-Assah

BIOCHIMIE DES GLUCIDES ET LEUR METABOLISME NORMAL ET PATHOLOGIQUE

ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES ET DES OLIGOSACCHARIDES ACIDES DANS
QUELQUES MALADIES LYSOSOMIALES CONGÉNITALES

1° - AU COURS D'UNE MUCOPOLYSACCHARIDOSE DE TYPE III_A OU "SANFILIPPO A"

2° - AU COURS D'UNE MUCOLIPIDOSE DE TYPE II OU "I CELL DISEASE"



SOUTENU LE 1^{er} JUILLET 1975 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MEMBRES DU JURY : MM. J. MONTREUIL, *Président*

G. BISERTE, *Examineur*

G. STRECKER, *Rapporteur*

J.P. FARRIAUX, *Examineur*

MLLE G. SPIK, *Examineur*

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORS,
DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF,
LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET,
MICHEL, NORMANT, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, SAVART, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENTS HONORAIRES DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. J. LOMBARD.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. DECUYPER Marcel	Géométrie
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Michel	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie

Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. POUZET Pierre	Analyse Numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SCHILTZ René	Physique Atomique et Moléculaire
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DEPRez Gilbert	Physique Théorique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. MAES Serge	Physique Atomique et Moléculaire
Mle MARQUET Simone	Probabilités
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. PANET Marius	Electrotechnique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. SLIWA Henri	Chimie Organique

MAITRES DE CONFERENCES (et Chargés d'Enseignement)

M. ADAM Michel	Sciences Economiques
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques
M. ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale

M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
M. COULON Jean	Electrotechnique
Mlle DACCHARI Monique	Géographie
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DRIEUX Baudouin	Informatique
M. DUEE Gérard	Géologie Appliquée
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FONTAINE Jacques-Marie	Electronique
M. FOURNET Bernard	Biochimie
M. FROELICH Daniel	Chimie Physique
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GUIGOU Jean-Louis	Sciences Economiques
M. GUILLAUME Henri	Sciences Economiques
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Mlle KOSMANN Yvette	Géométrie
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités
M. LAURENT François	Automatique
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
M. LEROY Yves	Electronique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. MACKE Bruno	Physique
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
M. NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PECQUE Marcel	Chimie Physique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. POVY Lucien	Automatique
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques

M. THERY Pierre
M. TOULOTTE Jean-Marc
M. TREANTON Jean-René
M. VANDORPE Bernard
M. VILLETTE Michel
M. WERNIER Georges
M. WATERLOT Michel
M. YVON Jean-Pierre
Mme ZINN-JUSTIN Nicole

Electronique
Automatique
Sociologie
Chimie Minérale
Mécanique
Informatique
Géologie Générale
Analyse Numérique
Algèbre

A mes Parents

A ma Femme

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL

*Professeur de Chimie Biologique à
l'Université des Sciences et Techniques de Lille I
Chef du Service de Biochimie Cellulaire à
l'Institut de Recherches sur le Cancer*

Je vous remercie très sincèrement de m'avoir
accueilli dans votre Service et de m'avoir confié un sujet
si exaltant.

Qu'il me soit permis de remercier aussi tout
ceux qui, à vos côtés, assurèrent ma formation dans cette
discipline, en particulier, Monsieur G. STRECKER (Chargé
de Recherche au C.N.R.S.) et Melle G. SPIK (Maître de Conférences).

A Monsieur le Professeur G. BISERTE

*Professeur de Biochimie Pathologique
à la Faculté de Médecine de Lille*

*Directeur de l'Institut de Recherches sur le Cancer
de Lille et de l'Unité n° 124 de l'I.N.S.E.R.M.*

J'ai eu le privilège d'être accueilli dans votre Institut depuis près de deux ans et je dois ma formation, non pas à ma persévérance, mais au contraire, à vos encouragements, et je suis heureux de pouvoir ici vous exprimer toute ma gratitude et mon attachement à l'Université de Lille et principalement à l'Institut de Recherches sur le Cancer.

Je remercie Monsieur le Professeur FARRIAUX, du Service de Pédiatrie au Centre Hospitalier de Lille, de nous avoir fourni le matériel d'étude, dans un cas comme dans l'autre.

Je remercie également tous les chercheurs et le Personnel Technique, et tout particulièrement, Mademoiselle Anick POITAU, de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, pour l'ambiance sympathique et confiante que j'ai connue durant mon court séjour.

Je remercie très sincèrement le Personnel Administratif et particulièrement les secrétaires, Mademoiselle Muriel DEMAY, Madame Anne LEVEL et Mademoiselle Arlette MOSTAERT.

Enfin, je remercie Monsieur Bernard FOURNET pour sa collaboration dans l'étude de la structure des sialo-oligosaccharides.

Ces travaux ont été réalisés sous la direction de Monsieur Gérard STRECKER, Chargé de Recherches au C. N. R. S., dans les laboratoires de Chimie Biologique du Professeur Jean MONTREUIL, à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (Institut Jules DRIESSENS et Unité I. N. S. E. R. M. n° 124 de Recherches Ultrastructurales et Biochimiques sur les Cellules Normales et Cancéreuses ; Directeur : Professeur Gérard BISERTE) et à la Faculté des Sciences de Lille (Laboratoire Associé du C. N. R. S. n° 217 "Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués").

TABLE DES MATIERES

	Pages
GENERALITES	
CONCEPT DE MALADIE LYSOSOMIALE	1
I - LES LYSOSOMES	1
1 - PROPRIETES DES LYSOSOMES DANS LES CELLULES NORMALES	1
2 - FACTEURS LABILISANT LA MEMBRANE LYSOSOMIALE	5
3 - ROLE DES LYSOSOMES DANS LA PATHOLOGIE	6
II - ABSENCE CONGÉNITALE D'UNE ENZYME LYSOSOMIALE ET SES CONSÉQUENCES	6
1 - DEFICIT ET HYPERACTIVITE ENZYMATIQUE	6
2 - LES DIFFERENTES MALADIES LYSOSOMIALES ACTUELLEMENT CONNUES	9
III - LES MUCOPOLYSACCHARIDOSES	9
1 - GENERALITES	9
2 - CLASSIFICATION	16
2.1. Mucopolysaccharidoses avec mucopolysaccharidurie	16
2.1.1. <i>Le Type I ou maladie de HURLER</i>	18
2.1.2. <i>Le Type II ou maladie de HUNTER</i>	18
2.1.3. <i>Le Type III ou maladie de "SANFILIPPO"</i>	18
2.1.4. <i>Le Type IV ou syndrome de MORQUIO</i>	19
2.1.5. <i>Le Type V ou syndrome de SCHEIE</i>	19
2.1.6. <i>Le Type VI ou nanisme polydystrophique de MAROTEAUX et LAMY</i>	19
2.2. Mucopolysaccharidoses sans mucopolysaccharidurie : Mucolipidoses	21
2.2.1. <i>Mucolipidose de type I</i>	21
2.2.2. <i>Mucolipidose de type II</i>	21
2.2.3. <i>Mucolipidose de type III ou syndrome de MAROTEAUX et HORS-CAYLA</i>	22

	Pages
2.3. Les autres maladies apparentées au mucopolysaccharidose	22
2.3.1. <i>La GM₁-Gangliosidose</i>	22
2.3.2. <i>La fucosidose</i>	24
2.3.3. <i>La mannosidose</i>	24
2.3.4. <i>La mucosulfatidose ou leucodystrophie métachromatique</i>	26
2.4. Les études biochimiques	26
2.4.1. <i>Les mucopolysaccharides</i>	27
2.4.2. <i>Les glycolipides</i>	31
2.4.3. <i>Les glycoprotéines</i>	34

TRAVAUX PERSONNELS

MUCOPOLYSACCHARIDOSE AVEC MUCOPOLYSACCHARIDURIE	36
I - MATERIEL ET METHODES	36
1 - FRACTIONNEMENT ET METHODES	36
2 - ANALYSE DES FRACTIONS	37
3 - ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES ET DES OLIGOSACCHARIDES ACIDES	38
3.1. Fractionnement de l'extrait urinaire	38
3.2. Isolement des M. P. S,	38
3.3. Isolement des glycopeptides et des oligosaccharides	39
3.3.1. <i>Isolement des glycopeptides basiques</i>	39
3.3.2. <i>Isolement des oligosaccharides acides</i>	39
3.3.3. <i>Isolement des oligosaccharides neutres et des glycopeptides</i>	41

	Pages
MUCOPOLYSACCHARIDOSE AVEC MUCOPOLYSACCHARIDURIE "SANFILIPPO A"	43
II - RESULTATS	43
1 - DOSAGE DES GLUCIDES URINAIRES	43
2 - FRACTIONNEMENT DES GLUCIDES URINAIRES	46
3 - TENTATIVE D'IDENTIFICATION DE LA GALACTOSAMINE- SULFATE	46
3.1. Hydrolyse acide par l'acide trifluoroacétique	46
3.2. Cinétique d'hydrolyse du groupement sulfate	51
3.3. Identification de la galactosamine par desami- nation oxydative de GARDELL et coll.	51
3.4. Dosage du sulfate	54
4 - CARACTERISATION DES GLYCOPEPTIDES URINAIRES	55
5 - CONCLUSION	56
MUCOPOLYSACCHARIDOSE SANS MUCOPOLYSACCHARIDURIE OU MUCOLIPIDOSE	60
I - MATERIEL ET METHODES	60
1 - FRACTIONNEMENT DES URINES	60
2 - ANALYSE DES FRACTIONS	61
3 - ETUDE DE LA FRACTION ADIALYSABLE DU PRECIPITE ETHANOLIQUE	61
4 - ISOLEMENT DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES	61
5 - ETUDE DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES	62
6 - METHYLATION	63
II - RESULTATS	64
I - DOSAGE DES GLUCIDES URINAIRES	64

	Pages
II - ETUDE DES OLIGOSACCHARIDES	67
III - METHYLATION	70
III - DISCUSSION	77
CONCLUSIONS GENERALES	81
BIBLIOGRAPHIE	82

GENERALITES

I N T R O D U C T I O N

Les maladies lysosomiales sont caractérisées, d'un point de vue biochimique, par des déficits de l'activité des hydrolases acides du lysosome, et par l'accumulation, dans certains tissus ou dans l'urine, des produits incomplètement dégradés, provenant le plus souvent du catabolisme de glycoconjugués.

Nous avons appliqué à l'étude de l'urine de patients atteints de maladie de Sanfilippo et de mucopolidose II les procédés antérieurement mis au point dans le laboratoire pour le dosage et l'isolement des constituants glucidiques de l'urine. Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence une accumulation de glycopeptides riches en acide sialique, dans le cas de la maladie de Sanfilippo de type A et d'oligosaccharides riches en acide sialique, dans le cas de la mucopolidose II. Ce dernier résultat nous a permis de poser en hypothèse que le déficit enzymatique primaire dans la mucopolidose II était un déficit en sialidase, susceptible par ailleurs d'expliquer les nombreuses autres anomalies enzymatiques observées.

CONCEPT DE MALADIE LYSOSOMIALE

I - LES LYSOSOMES

1 - PROPRIETES DES LYSOSOMES DANS LES CELLULES NORMALES

Depuis les travaux de DE DUVE (1) et de NOVIKOFF (2) sur les propriétés des lysosomes dans les cellules normales, nos connaissances, dans ce domaine, n'ont jamais cessé de s'accroître.

Les lysosomes sont des organites cytoplasmiques délimités par un système membranaire à l'intérieur duquel se trouve un ensemble d'enzymes très complexe. Ces enzymes sont synthétisées par les ribosomes attachés au réticulum endoplasmique, et sont ensuite emmagasinées dans les vésicules issues de l'appareil de golgi. Ces dernières constituent les lysosomes primaires. Elles sont capables de fusionner entre elles ou avec des vacuoles digestives pour donner naissance aux lysosomes secondaires.

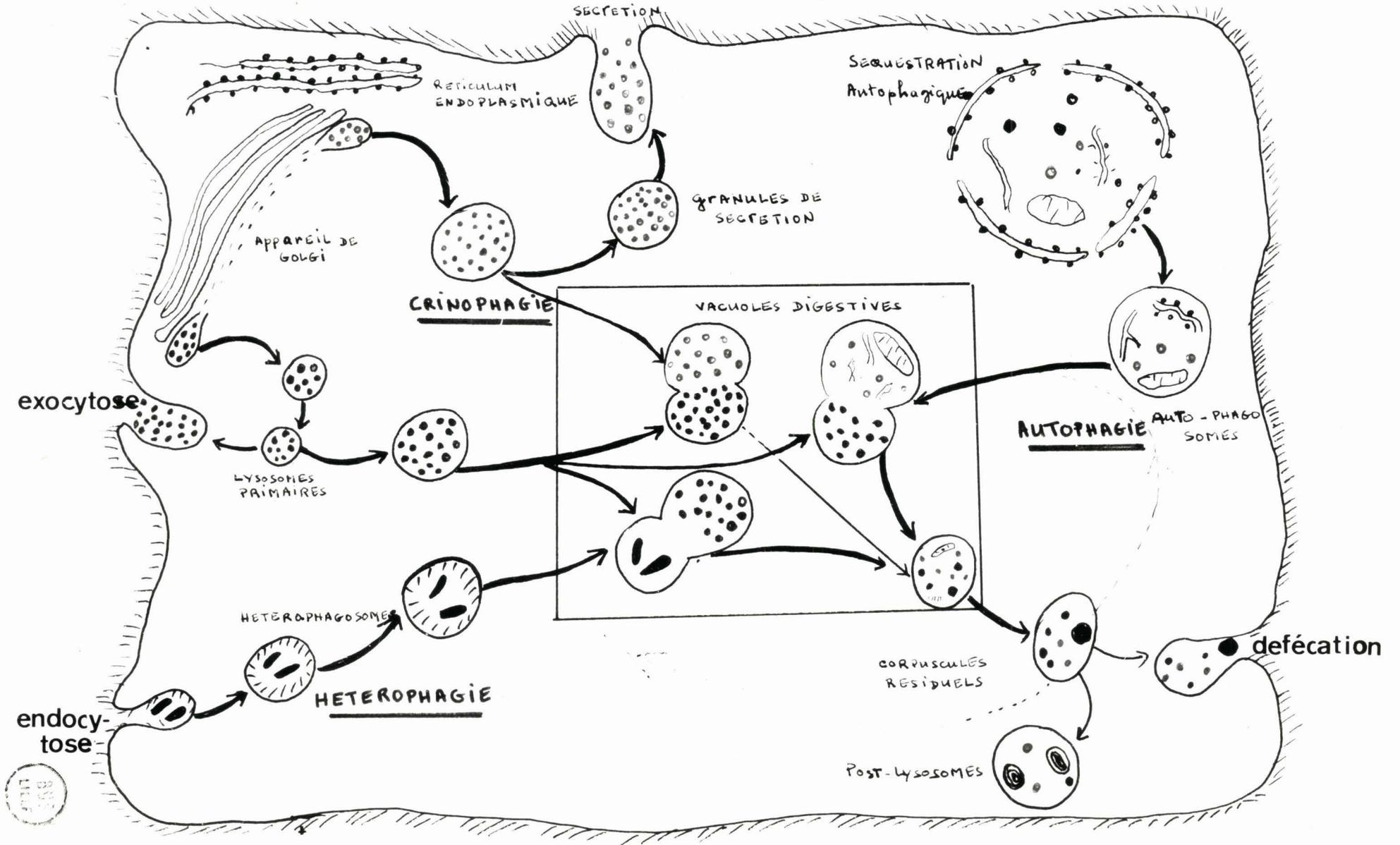
Au sein des lysosomes, les enzymes accomplissent leur fonction digestive aidées par un milieu acide dont le pH optimum se situe généralement aux environs du pH 5. Trois fonctions digestives se dégagent du rôle des lysosomes, selon DE DUVE (3) :

L'hétérophagie

L'hétérophagie intéresse surtout des objets et des matériaux extracellulaires puisés dans le milieu extérieur ; c'est un processus digestif par lequel, grâce aux hydrolases lysosomiales, la cellule dégrade les substances qui ont pénétré dans le cytoplasme par endocytose (voir schéma ; p. 2 et 3).

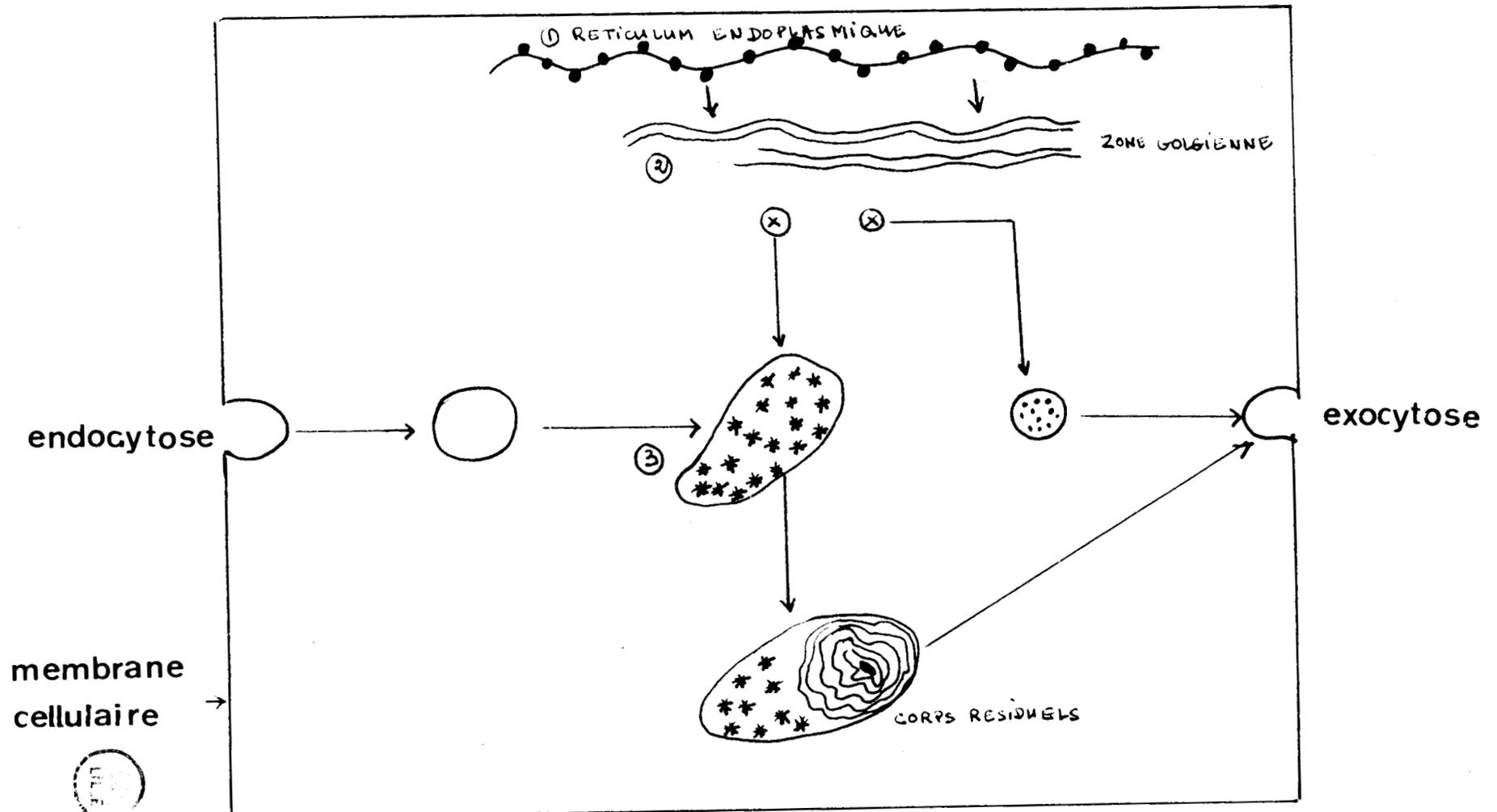
SCHEMA REPRESENTATIF DE LA DIGESTION LYSOSOMIALE

d'après JACQUES (4) et VAN HOOFF (5)



SCHEMA DU MECANISME DE SYNTHÈSE DES LYSOSOMES

D'APRES VERITY (6)



L'importance du phénomène fut illustrée par de nombreuses expériences consistant à injecter à l'animal des substances telles que le dextran (DAEMS) (7), le Triton WR 1339 (WATTIAUX) (8), le saccharose (BREWER et HEATH (9) ; WATTIAUX (10)) ou le polyvinyl pyrrolidone (MEIJER et WILLIGHAGEN) (11) dont la digestion par les hydrolases acides est très lente, voir même nulle. Ces produits s'accumulent dès lors dans le système lysosomal qu'ils surchargent considérablement.

L'autophagie

L'autophagie porte sur des constituants endocellulaires. Ce concept d'autophagie a été introduit par ASHFORD et POTER (12) ainsi que par NOVIKOFF et ESSNER (13). Par ce mécanisme, les lysosomes sont capables de prélever et de digérer les constituants propres de la cellule ; il apparaît dès lors que l'autophagie est un phénomène très important dans le renouvellement normal des structures cellulaires.

La crinophagie

La crinophagie est une forme particulière d'autophagie, ayant pour objet le contenu des grains de sécrétion. Dans les conditions normales, elle apparaît comme un mécanisme régulateur de la sécrétion. Ce terme de crinophagie a été proposé par DE DUVE (14) pour expliquer ce phénomène pouvant jouer un rôle important dans la régulation des fonctions sécrétrices.

La fusion directe du grain de sécrétion avec un lysosome individualise ce mode de digestion de l'autophagie. Il faut souligner que, dans ce cas, le matériel qui doit être digéré n'entre jamais en contact direct avec le cytosol.

2 - FACTEURS LABILISANT LA MEMBRANE LYSOSOMIALE

Parmi les facteurs labilisants de la membrane lysosomiale, figurent notamment les vitamines liposolubles (A, K, D, E) des hormones sexuelles stéroïdes et les rayons ultra-violet. D'autres facteurs sont dits "stabilisants", tels que la cortisone, l'hydrocortisone et quelques drogues anti-inflammatoires.

L'action d'un facteur labilisant provoque la rupture de la membrane lysosomiale, entraînant ainsi, d'une part :

- Une décharge des enzymes lysosomiales vers l'extérieur et dans ce cas ce sont les structures conjonctives environnantes qui deviennent les victimes de l'érosion enzymatique. En effet, le déversement accidentel d'hydrolases lysosomiales dans les interstices cellulaires joue un rôle important dans de nombreuses affections dégénératives caractérisées par des délabrements de structures conjonctives, et des éléments de soutien. Le plus souvent, la libération d'enzymes est le résultat d'un accident de phagocytose.

- Et d'autre part, un encombrement des lysosomes qui est souvent à l'origine de nombreuses maladies caractérisées par un déséquilibre qualitatif ou quantitatif entre les substrats qui pénètrent dans les lysosomes et les hydrolases chargées de les digérer. Selon certains cas, l'anomalie se situe du côté des substrats, ou encore de celui des hydrolases. Le groupe des maladies congénitales ou thésaurismoses illustre parfaitement l'encombrement des lysosomes par anomalie enzymatique. Ces anomalies sont généralement désignées par les cliniciens sous les noms de maladies de GAUCHER, de NIEMAN-PICK, de TAY-SACH, d'HURLER, de FABRY et de SANFILIPPO etc...

3 - ROLE DES LYSOSOMES DANS LA PATHOLOGIE

Depuis que HERS (15) a reconnu qu'une glycoséose II ou maladie de POMPE était due à l'absence d'une hydrolase acide, l' α -glucosidase, plus d'une vingtaine de maladies lysosomiales ont été identifiées. Pour chacune d'elles, le mécanisme pathogénique serait essentiellement le même : la perte de l'activité enzymatique d'une hydrolase par suite d'une anomalie héréditaire. Par conséquent, toutes les substances qui auraient été digérées par les enzymes manquantes s'accumulent dans les lysosomes et provoquent un étouffement irréversible des cellules.

L'encombrement lysosomal peut s'expliquer par un déséquilibre du rapport enzyme-substrat. Ce phénomène devient inévitable pour les cellules à longue durée de vie, comme les cellules cérébrales et cardiaques.

II - ABSENCE CONGÉNITALE D'UNE ENZYME LYSOSOMIALE ET SES CONSÉQUENCES

1 - DEFICIT ET HYPERACTIVITE ENZYMATIQUE

Les maladies lysosomiales se définissent par un ensemble de signes cliniques et biochimiques actuellement assez bien établis. Ces maladies se caractérisent généralement par un déficit primaire d'une enzyme lysosomiale. Jusqu'à nos jours, une quarantaine d'hydrolases acides sont parfaitement identifiées, une liste des hydrolases acides participant au catabolisme des glycoconjugués est donnée dans le tableau I (p. 7). Les maladies lysosomiales sont dues à des erreurs métaboliques dans lesquelles le catabolisme de la digestion intracellulaire est bloqué par suite d'un déséquilibre enzymatique, avec accumulation dans les tissus et dans les milieux d'excrétion des constituants chimiques incomplètement dégradés (HERS) (16).

TABEAU I

LES HYDROLASES ACIDES POUVANT ENTRER DANS LA DIGESTION DES COMPLEXES POLYSACCHARIDIQUES

EXOGLYCOSIDASES

ENDOGLYCOSIDASES

- 1° - α -Glucosidase
- 2° - β -Glucosidase
 β -Xylosidase
- 3° - α -Galactosidase
- 4° - β -Galactosidase
 β -Fucosidase
- 5° - α -L-Fucosidase
- 6° - α -Mannosidase
- 7° - β -Glucuronidase
- 8° - α -L-Iduronidase
- 9° - N-acétyl- β -Hexosaminidase
- 10° - N-acétyl- α -Glucosaminidase
- 11° - N-acétyl- α -Galactosaminidase
O-Séryl-N-acétyl- α -Galactosaminidase
- 12° - Neuraminidase (Sialidase)

- 1° - β -endo-glucosaminidase
- 2° - Hyaluronidase
- 3° - Lysozyme ou (Muramidase)

SULFATASES

- 1° - Arylsulfatase A
- 2° - Arylsulfatase B
- 3° - Chondrosulfatase

AMIDASES

β -Aspartylglucosylamine amidohydrolase

PEPTIDASES

- 1° - Cathepsine A (ou Carbopeptidase)
- 2° - Cathepsine B (endopeptidase)
- 3° - Cathepsine C (ou dipeptidylaminopeptidase)
- 4° - Cathepsine D



Toutes ces activités peuvent être mises en évidence dans les lysosomes, sauf α -L-Iduronidase, dont la localisation intracellulaire demeure inconnue.

Trois types de déficience enzymatique peuvent être définis :

- Dans un premier groupe de maladies, on constate une complète déficience enzymatique parmi lesquelles on distingue une déficience en sphingomyélinase, dans la maladie de NIEMAN-PICK (BRADY *et al.*) (17) ; une déficience en α -galactosidase dans la maladie de FABRY (BRADY *et al.*) (18) ; une déficience en estérase acide dans la maladie de WOLMAN (WALLIS *et al.*) (19) ; enfin, une déficience en céramidase dans la maladie de FARBER (PRENSKY *et al.*) (20).

- Un deuxième groupe de maladies métaboliques se caractérise surtout par une perte d'activité enzymatique incomplète ; l'activité résiduelle serait de l'ordre de 5 à 30 p. 100 de la normale. Parmi ce groupe de maladies, on distingue la mannosidose décrite par OCKERMAN (21) dans laquelle il semble que l'enzyme ait une affinité plus faible pour les substrats naturels.

- Dans un troisième groupe de maladies, l'absence d'enzyme est susceptible d'être masquée par la présence d'isoenzymes qui sont incapables de compenser un déficit enzymatique parce que leurs substrats spécifiques sont de nature légèrement différente. Néanmoins, ce défaut peut être mis en évidence au moyen de substrats naturels après isolement des isoenzymes. Les travaux de ROBINSON et STIRLING (22), sur les deux isoenzymes A et B de la N-acétyl- β -hexosaminidase, en sont une illustration.

Le déficit en isoenzyme A spécifique de la maladie de TAY-SACH a été démontré par OKADA et O'BRIEN (23) qui ont utilisé une séparation électrophorétique de deux isoenzymes, puis par KOLODNY *et al.* (24) qui utilisent le GM₂ ganglioside comme substrat.

Dans la majorité des maladies lysosomiales, où l'activité des hydrolases acides a été systématiquement recherchée, on remarque que la plupart des activités enzymatiques sont augmentées et peuvent atteindre parfois 20 fois la valeur normale. Dans certains cas pathologiques, on distingue cependant une exception à cette règle dans la maladie de KRABBE.

Le mécanisme de l'hyperactivité enzymatique est inconnu, pour la simple raison que l'augmentation de l'activité de toutes ces enzymes lysosomiales ne se fait pas dans les mêmes proportions. Une explication satisfaisante serait que le matériel accumulé possède une affinité pour quelques-unes des hydrolases acides, ce qui le protège contre la dénaturation thermique ou contre la digestion par la cathepsine. Les résultats en faveur de cette interprétation ont été rapportés par VAN HOOFF et HERS (25).

2 - LES DIFFERENTES MALADIES LYSOSOMIALES ACTUELLEMENT CONNUES

Le Tableau II (p. 10 à 15) donne un résumé des différentes maladies lysosomiales, et n'a d'autre ambition que de permettre une bonne compréhension en rappelant, d'une manière aussi brève que possible, ce que nous savons déjà des déficiences enzymatiques et du matériel accumulé dans les tissus et dans les urines des sujets atteints de ces maladies congénitales.

III - LES MUCOPOLYSACCHARIDOSES

1 - GENERALITES

On distingue dans la pathologie humaine trois grands groupes de maladies métaboliques : les lipidoses, les glyco-génoses et les mucopolysaccharidoses.

Dans chaque grand groupe de maladies congénitales, plusieurs maladies ont été définies sur des bases biochimiques bien précises ; il s'agit presque chaque fois d'une altération d'enzymes dont la présence serait nécessaire pour dégrader des substances qui s'accumulent au cours de chaque maladie lysosomiale.

TABLEAU II

LISTE DES MALADIES LYSOSOMIALES ACTUELLEMENT CONNUES ET NATURE DU MATERIEL ACCUMULE

MALADIES	DEFICIENCE ENZYMATIQUE	NATURE DU MATERIEL ACCUMULE
Glycogénose de type II	<ul style="list-style-type: none"> - Déficience complète d'α-glucosidase - Hyperactivité d'α-galactosidase et d'acétyl-β-hexosaminidase 	<ul style="list-style-type: none"> - Accumulation de glycogène dans les tissus (HERS et VAN HOOF) (26) - Hétérosaccharides dans les muscles (HUDGSON <i>et al.</i>) (27)
Fucosidose	<ul style="list-style-type: none"> - Absence d'α-L-fucosidase - Hyperactivité en α-galactosidase, en α-glucosidase et de β-xylosidase 	<ul style="list-style-type: none"> - Glycolipides riches en fucose et possédant une activité (DAWSON et SPRANGER (28) ; VAN HOOF et HERS (29) ; LOEB <i>et al.</i> (30) ; VAN HOOF <i>et al.</i> (31)) - Glycopeptides et oligosaccharides à potentiel antigénique Le^a (PHILIPPART) (32) - Mucopolysaccharides (chondroïtine-4 sulfate et 6-sulfate) dans les urines (LOEB <i>et al.</i>) (33) - Substances glycoprotéïniques (urines) (DURAND <i>et al.</i>) (34)



TABLEAU II (suite)

MALADIES	DEFICIENCE ENZYMATIQUE	NATURE DU MATERIEL ACCUMULE
Mannosidose	<ul style="list-style-type: none"> - Absence d'α-mannosidase <ul style="list-style-type: none"> . dans le cerveau . dans le foie . dans les leucocytes - Hyperactivité des β-glucuronidases d'α-fucosidase d'α-glucosidase 	<ul style="list-style-type: none"> - Oligosaccharides riches en mannose dans le cerveau (OCKERMAN <i>et al.</i>) (35) et dans l'urine (NORDEN et LUNDBLAD (36) ; AUTIO <i>et al.</i> (37))
Gangliosidose GM ₁	<ul style="list-style-type: none"> - Déficience complète de β-galactosidase - Hyperactivité en α-galactosidase, en N-acétyl-β-hexosaminidase, en α-glucosidase, en α-fucosidase, en α-mannosidase dans le foie 	<ul style="list-style-type: none"> - Gangliosides GM₁ et asialogangliosides dans la rate, le cerveau, le foie (SUZUKI <i>et al.</i>) (38) - Glycopeptides dans le foie (TSAY et DAWSON) (39) - Oligosaccharides dans le foie (WOLFE et SENIOR) (40) - Kératan -sulfate dans les tissus viscéraux (CALLAHAN et WOLFE (41) ; SUZUKI (42)) - Glycoprotéines (BRUNNGRABER <i>et al.</i>) (43)
 <p>Gangliosidose GM₂ type B ou Tay-Sach</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Diminution de la N-acétyl-β-hexosaminidase A jusqu'à 10 % de la normale - Hexosaminidase B est inactivée - Hyperactivité de β-glucosidase dans le cerveau 	<ul style="list-style-type: none"> - Oligosaccharides riches en hexosamines dans le cerveau et dans les tissus viscéraux (SUZUKI <i>et al.</i>) (44) - Oligosaccharides dans les urines (STRECKER et MONTREUIL) (45) - Oligosaccharides dans le foie (KIN et WOLFE) (46) - Glycoprotéines dans le cerveau (BRUNNGRABER, BROWN et ARO) (47)

TABLEAU II (suite)

MALADIES	DEFICIENCE ENZYMATIQUE	NATURE DU MATERIEL ACCUMULE
Maladie de FABRY	<ul style="list-style-type: none"> - Déficience complète d' α-galactosidase dans le foie, dans les reins, dans le cerveau, dans les leucocytes et dans les tissus - Les activités résiduelles sont dues aux isoenzymes 	<ul style="list-style-type: none"> - Trihexosyl céramide et digalactosyl céramide dans les tissus et dans les muscles (SWEeley et KLIONSKY) (48) - Glycolipides dans le pancréas (WHERRETT et HAKOMORI) (49)
Maladie de GAUCHER	<ul style="list-style-type: none"> - Déficience complète du glucocéréboxidase (ou β-glucosidase) dans les maladies infantiles - Importante activité résiduelle chez les jeunes et les adultes - Hyperactivité de β-galactosidase d'α-glucosidase de N-acétyl-β-hexosaminidase dans le foie et de phosphatases acides dans le sérum 	<ul style="list-style-type: none"> - Glycosyl (β 1 - 1) céramide (glucocérébroside) essentiellement dans le système réticuloendothélial (AGHION) (50)
Maladie de KRABBE	<p>Diminution de l'activité de la galactocérébroside de 5 à 10 % de la normale, dans le cerveau, dans le foie, dans la rate et dans les leucocytes</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Galactosylcérebroside galactosyl (β 1 - 1) céramide (ETO et SUZUKI) (51) - Sulfatides (NORTON et PODUSLO) (52)
 <p>Leucodystrophie Métachromatique Lipidose à sulfatide</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Déficience complète de l'arylsulfatase A, dans les tissus et dans les urines - Hyperactivité de α-galactosidase de β-glucosidase de β-glucuronidase et de N-acétyl-β-hexosaminidase dans le foie 	<ul style="list-style-type: none"> - Céramide galactase 3 sulfate - et céramide dihexosyl sulfate dans le cerveau, dans les reins et dans les urines (MARTENSON <i>et al.</i> (53) ; PHILIPPART <i>et al.</i> (54))

TABLEAU II (suite)

MALADIES	DEFICIENCE ENZYMATIQUE	NATURE DU MATERIEL ACCUMULE
Mucosulfatidose (Variant de LMD)	<ul style="list-style-type: none"> - Il y a une baisse très marquée de l'activité des sulfatases A, B et C - Une hyperactivité de α-fucosidase dans le foie 	<ul style="list-style-type: none"> - Céramide galactase 3 sulfate - et autres sulfatides (O'BRIEN et SAMPSON) (55) - puis des mucopolysaccharides dans le foie (HOLLANDER (56) ; GREGOIRE (57))
Lactosylcéramidose	<ul style="list-style-type: none"> - Réduction de l'activité de la lactosyl céramidase de 16 à 20 % de la normale dans le foie et dans les cultures de fibroblastes 	<ul style="list-style-type: none"> - Lactosyl céramide dans le cerveau, dans le plasma, dans les urines - des glucocérébrosides dans le foie (DAWSON) (58)
Maladie de NIEMAN-PICK	<ul style="list-style-type: none"> - Il y a une complète déficience ou une forte réduction de l'activité des sphingomyélinases - Une hyperactivité de α-fucosidase de N-acétyl-β-hexosaminidase de β-glycérophosphate dans le foie des enfants 	<ul style="list-style-type: none"> - Sphingomyéline (CROCKER) (59) - Acide lyso bis phosphatidique - Cholestérol (BRADY) (60)
Déficience en phosphatase acide	<ul style="list-style-type: none"> - Il s'agit d'une déficience complète de phosphatase acide, dans le cerveau, dans la rate, dans les reins et dans les cultures de fibroblastes 	
Maladie de WOLMANN	<ul style="list-style-type: none"> - Déficience complète de l'estérase dans les tissus - Hyperactivité de N-acétyl-β-hexosaminidase et de cathepsine D dans le foie 	<ul style="list-style-type: none"> - Triglycérides (CROCKER <i>et al.</i> (61) ; KONNO <i>et al.</i> (62)) - Cholestérol estérifié (LOUGH <i>et al.</i> (63) ; ETO et KITAGAWA (64)) - Cholestérol total (KYRIAKIDE <i>et al.</i>) (65) dans le foie et dans la rate



TABLEAU II (suite)

MALADIES	DEFICIENCE ENZYMATIQUE	NATURE DU MATERIEL ACCUMULE
Cystinose	- Déficience primaire inconnue	- Augmentation de cystine de 80 % de la concentration normale particulièrement dans les cellules réticuloendothéliales
Ceroïd lipofuscine	- Déficience primaire inconnue - Hyperactivité d' α -galactosidase α -fucosidase et de β -glucuronidase dans le foie et dans le cerveau	- Lipofuscine - Pigment céréoïde dans les tissus prédominance dans le cerveau (SIKOTOS <i>et al.</i>) (66) - Ganglioside dans le cerveau et des sphingolipides - Di et triphosphoinontides et des glyco-protéines (DUFFY <i>et al.</i>) (67) - Mucopolysaccharides (BERGER <i>et al.</i>) (68)
Aspartyl glucosaminurie	- Absence d'activité de N-acétyl- β -glucosaminidase dans le plasma, dans les fluides séminaux - Réduction de 16 à 25 % de l'activité normale dans le cerveau, dans le foie - L'activité de α -fucosidase est aussi réduite de 25 % de la normale alors que la N-acétyl- β -glucosaminidase est élevée dans le cerveau, dans le foie	- Aspartyl glucosylamine (JENNER et POLLITT) (69) - Aspartyl glucosylamine contaminée par des oligosaccharides dans le cerveau et dans les urines (JENNER et POLLITT (70) ; PALO et SAVOLAINEN (71)) - Glycopeptides renfermant de l'aspartyl glucosylamine, de l'acide neuraminique et une hexosamine (PALO et SAVOLAINEN) (72)



TABLEAU II (suite)

MALADIES	DEFICIENCE ENZYMATIQUE	NATURE DU MATERIEL ACCUMULE
Maladie de FARBER	<ul style="list-style-type: none"> - Déficience complète en céraminidase acide - Hyperactivité d'α-glucosidase et de la β-glycérophosphatase dans le foie 	<ul style="list-style-type: none"> - Dermatan sulfate (foie, urine, rate) (BIERMAN <i>et al.</i> (73) ; PRENSKY <i>et al.</i> (74) ; MOSER <i>et al.</i> (75)) - Glycolipides contaminés par du glucose dans les viscères (UZMAN) (76) - Galactosamine dans le foie et dans le cerveau (CLAUSEN et RAMPINI) (77)
Mucopolipidose II ou "I Cell Disease"	<ul style="list-style-type: none"> - Déficience en β-galactosidase β-hexosaminidase α-fucosidase 	<ul style="list-style-type: none"> - Mucopolysaccharides dans les reins, dans le foie, dans le cerveau, dans les urines (DEAN <i>et al.</i> (78) ; DIFERRANTE et RICH (79))
Mucopolysaccharidose	<ul style="list-style-type: none"> - Déficience complète en α-L-iduronidase dans les types I et V - Déficience en N-sulfatase dans le type III_A ou "Sanfilippo A" - Déficience en acétyl-α-glucosaminidase dans le type III_B ou "Sanfilippo B" - Déficience en β-glucuronidase dans le cas d'hyperactivité glucosidasique 	<ul style="list-style-type: none"> - Mucopolysaccharides partiellement dégradés essentiellement d'héparan-sulfate et de kératan-sulfate dans les tissus et dans les urines (Mc KUSICK) (80) - Glycopeptides au niveau du cerveau (LEDEEN (81) ; PHILIPPART (82) ; CLAUSEN <i>et al.</i> (83) ; SUZUKI (84) ; WHERRETT (85))



Dans les lipidoses, la majorité des déficiences enzymatiques connues porte sur les hydrolases acides (VAN HOOF) (86).

Les découvertes de ces dernières années sont en faveur de l'hypothèse qu'il existe actuellement six formes de mucopolysaccharidoses, toutes basées sur une déficience congénitale d'une enzyme et principalement des hydrolases acides, entraînant bien entendu des dépôts surchargeant les cellules. Ces dépôts sont hétérogènes et sont constitués, d'une part, de polysaccharides, d'autre part, de glycolipides, enfin et probablement, de la partie glucidique des glycoprotéines.

2 - CLASSIFICATION

Le terme de mucopolysaccharidose est imprécis du fait de la nature hétérogène des dépôts ; ce qui explique les difficultés d'une délimitation exacte, actuellement impossible.

Ce terme est néanmoins utilisé pour désigner des maladies métaboliques dues à des mucopolysaccharides acides, responsables d'une surcharge viscérale et d'une excrétion urinaire massive de ces substances.

Jusqu'à nos jours, six principaux types ont été retenus, mais la liste n'est certes pas close. Pour notre étude, nous adopterons pour une meilleure compréhension l'une des classifications actuellement en vigueur : principalement celle proposée par Mc KUSICK (87). Les principaux types de mucopolysaccharidose sont numérotés de I à VI, cependant, une première distinction est à faire entre les patients qui excrètent un excès de mucopolysaccharides dans les urines, c'est-à-dire mucopolysaccharidoses avec mucopolysaccharidurie, et les autres. Tout récemment, MAROTEAUX et HORS-CAYLA (88), SPRANGER et WIEDMANN (89) ont regroupé ces derniers sous la dénomination de MUCOLIPIDOSE.

2.1. Mucopolysaccharidoses avec mucopolysaccharidurie

Trois critères ont permis à Mc KUSICK *et al.* (90) d'établir la classification du Tableau III (p. 17) :

TABLEAU III

MUCOPOLYSACCHARIDOSES AVEC MUCOPOLYSACCHARIDURIE
Classification d'après Mc KUSICK *et al.* (91)

Dénomination (1)	Type	Transmission génétique	Mucopolysaccharidurie	Arriération mentale	Troubles de l'ossification	Opacités cornéennes
HURLER	I	Autosomique Récessive	Dermatan-sulfate + Heparan-sulfate (2)	++	+ / ++	+
HUNTER	II	Liée au sexe Récessive	Dermatan-sulfate + Heparan-sulfate (2)	+	+ / -	-
SANFILIPPO (Oligophrénie poly dystrophique)	III	Autosomique Récessive	Heparan-sulfate	++	+ / -	Légères ou Absentes
MORQUIO (Ostéochondrose)	IV	Autosomique Récessive	Keratan-sulfate (3)	- / +	++	Légères
SCHEIE	V	Autosomique Récessive	Dermatan-sulfate	- / +	+	+
MAROTEAUX-LAMY (Nanisme polydystrophique)	VI	Autosomique Récessive	Dermatan-sulfate	-	++	++

(1) Les dénominations françaises proposées par MAROTEAUX et LAMY (92).

(2) Différence statistiquement significative entre les maladies : la fraction d'heparan-sulfate est plus abondante dans la maladie HUNTER (MAROTEAUX) (93), fraction riche en unités N-sulfate-hexosamine-acide uronique.

(3) Excès de dermatan-sulfate et d'heparan-sulfate dans les urines de ces malades (d'après SARTORELLI (94) et KAPLAN *et al.* (95)).

- D'une part, le mode de transmission génétique de l'affection,
- D'autre part, la symptomatologie clinique,
- Et enfin, la nature des mucopolysaccharides excrétés.

2.1.1. *Le Type I ou maladie de HURLER.* C'est la forme la plus fréquente de mucopolysaccharidose. Généralement, les symptômes apparaissent très précocement, c'est-à-dire dès la naissance, se traduisant par des troubles d'arriération mentale progressive, d'opacités cornéennes, accompagnés d'hernies ombilicales et inguinales, suivie d'un retard psychomoteur.

Dans les urines, les mucopolysaccharides acides sont excrétés en très grande quantité et deux fractions essentielles sont présentes, l'une de dermatan-sulfate, l'autre d'heparan-sulfate.

Cette maladie obéit au mode de transmission récessif autosomique.

2.1.2. *Le Type II ou maladie de HUNTER.* A côté du type I, il existe une autre variété récessive liée au sexe, mais voisine de la présente : c'est la maladie de HUNTER ou type II. Chez ces malades, l'issue est généralement fatale par défaillance cardiaque.

Dans les urines de ces malades, les deux fractions anormales de mucopolysaccharides sont également présentes.

2.1.3. *Le Type III ou maladie de "SANFILIPPO".* Jusqu'à nos jours, le seul mucopolysaccharide présent en excès dans les urines semble être l'heparan-sulfate. Dans ce cas précis, il y apparaît une détérioration mentale. Les malades sont généralement hyperactifs et très agressifs, la mort survient entre 10 et 20 ans.

Cette maladie a été étudiée principalement par SPRANGER (96) et par SANFILIPPO *et al.* (97).

Après la maladie de HURLER, il semble que le type III est également aussi très fréquent.

2.1.4. *Le Type IV ou syndrome de MORQUIO.* C'est une maladie décrite pour la première fois en 1929 ; morphologiquement, elle se traduit par un nanisme très marqué, suivi de graves déformations squelettiques. Une caractéristique cependant, c'est que l'étude de mucopolysaccharides urinaires a montré, au cours de la croissance, la présence d'une fraction anormale de keratan-sulfate.

C'est une maladie qui se transmet selon le mode récessif autosomique.

C'est un groupe de maladies marqué par une grande hétérogénéité clinique (SPRANGER (98) ; MAROTEAUX (99)).

2.1.5. *Le Type V ou syndrome de SCHEIE.* Il s'agit d'une forme atténuée de type I, ou HURLER tardive. Cette maladie se caractérise par une excrétion urinaire massive de dermatan-sulfate. Des recherches récentes sur des fibroblastes en culture indiquent que les types I et V seraient deux variantes d'une même maladie (WIEDMANN et NEUFELD) (100) qui résulteraient d'une mutation des gènes eualléliques ou pseudo-alléliques (Mc KUSICK *et al.*) (101).

2.1.6. *Le Type VI ou nanisme polydystrophique de MAROTEAUX ET LAMY.* D'un point de vue symptomatologique, c'est la maladie MORQUIO, à quelque chose près ; seule la fraction de dermatan-sulfate est présente massivement dans les urines.

Dans la littérature, on compte une trentaine d'observations de mucopolysaccharidose de type VI.

En dehors de ces syndromes relativement bien caractérisés, d'autres observations de mucopolysaccharidoses avec mucopolysaccharidurie ont été rapportées et qui se distinguent des six principaux types de mucopolysaccharidose.

Ainsi, DYGGVE *et al.* (102) décrivaient une maladie de MORQUIO contractée par trois patients esquimaux, membres d'une même famille. L'étude de cette maladie, réalisée par CLAUSEN *et al.* (103), montre que cette affection diffère de la maladie de MORQUIO par des caractéristiques chimiques et biologiques. En effet

les urines de ces malades contiennent un excès de mucopolysaccharides désulfatés. A cet égard, Mc KUSICK (104) proposa que cette maladie soit classée dans un groupe particulier ou type VII, si d'autres cas venaient à être décrits.

D'autres syndromes avec excrétion urinaire massive de chondroïtine-4-sulfate ont été décrits qui ressemblent étrangement à la maladie de SCHEIE (THOMPSON *et al.* (105) ; PHILIPPART et SUGARMAN (106) ; CAMPAILLA et MARTINELLI (107) ; FREITAC *et al.* (108) ; SPRANGER *et al.* (109)).

De plus, l'existence d'une excrétion urinaire excessive d'acide hyaluronique accompagné de dermatan-sulfate, a été rapportée par SUSCHKE et KUNZE (110), chez un sujet présentant des tumeurs de tissus mous, avec altération squelettique, rappelant le syndrome de HURLER.

Les études faites sur les fibroblastes en culture n'ont pas confirmé la distinction entre syndrome de HURLER et SCHEIE, mais, par contre, montrent l'existence de deux formes distinctes de syndrome de SANFILIPPO.

En effet, MATALON et DORFMAN (111) ont constaté que les fibroblastes pathologiques en culture accumulent généralement un excès important de polysaccharides. On explique ce phénomène en supposant que le taux de biosynthèse des mucopolysaccharides est élevé dans ces cellules d'où une première hypothèse pathogénique est énoncée.

Dans le groupe des maladies de SANFILIPPO, sous-groupe A, le facteur correctif est une N-sulfatase selon KRESSE et NEUFELD (112) ; puis dans le sous-groupe B, il s'agit d'une N-acétyl- α -glucosaminidase, qui rectifie les altérations des fibroblastes en culture (VON FIGURA et KRESSE)(113).

Toutes ces observations apportent des arguments en faveur d'une explication lysosomiale des mucopolysaccharidoses.

2.2. Mucopolysaccharidoses sans mucopolysaccharidurie : Mucolipidoses

A côté des maladies que nous venons d'étudier, un groupe d'affections a été récemment isolé, dans lequel il existe une surcharge viscérale mixte composée à la fois de mucopolysaccharides et de lipides. Autrefois, le rattachement aux mucopolysaccharidoses a été proposé sur des bases purement chimiques, -une des caractéristiques de ce groupe de maladies est l'absence quasi totale d'un accroissement des mucopolysaccharides urinaires-, ce qui complique quelque peu la classification.

Dès lors, des données issues des études ultrastructurales, enzymatiques et chimiques sur les fibroblastes en culture et des tissus, peuvent nous permettre d'établir un diagnostic précis, bien que les études cliniques n'en sont pas à leurs premiers balbutiements dans ce domaine.

2.2.1. Mucolipidose de type I. C'est le syndrome de HURLER sans mucopolysaccharidurie. Actuellement, on lui donne le nom de mucolipidose de type I (MAROTEAUX *et al.* (114); MAROTEAUX et HORS-CAYLA (115) ; SPRANGER et WIEDMANN (116)). A travers les différentes controverses, le type I renferme qu'un petit nombre d'inclusions, alors que pratiquement, tous les fibroblastes en culture en contiennent dans le type II.

2.2.2. Mucolipidose de type II. Décrit par LEROY et DEMARS (117), il s'agit d'un syndrome de HURLER particulièrement marqué dans ses manifestations osseuses et évolutives, entraînant une fin certaine entre 2 et 9 ans (LEROY et DEMARS (118) ; LEROY et CROCKER (119) ; DEMARS et LEROY (120) ; MATALON *et al.* (121), MAROTEAUX *et al.* (122) ; LEROY *et al.* (123) ; TONDEUR *et al.* (124)).

La caractéristique de l'affection est la présence, dans les fibroblastes en culture, d'inclusions denses réfringentes en contraste de phase d'où son nom "I cell disease".

Dans la majorité des cas, aucun excès de mucopolysaccharides urinaires n'a été rapporté. Plusieurs observations ont été publiées sur le type II, parmi elles, on constate que certaines sont manifestement d'ordre familial (LEROY et DEMARS) (125). Néanmoins, ce type II se distingue du précédent par l'activité des hydrolases acides du foie.

HOF *et al.* (126) ont constaté une augmentation de six fois le taux d'acide sialique lié aux lipides, et de huit fois le taux des osides totaux sanguins.

2.2.3. *Mucolipidose de type III ou syndrome de MAROTEAUX et HORS-CAYLA.* C'est une maladie qui évoque le syndrome de HURLER, marquée par la présence de lymphocytes vacuolés et d'une excrétion urinaire normale de mucopolysaccharides.

L'étude enzymatique de ce syndrome n'a pas été entreprise jusqu'à ce jour, du moins à ma connaissance, bien qu'il semble que l'activité de la β -galactosidase serait abaissée, alors que les autres enzymes demeurent normalement actives.

2.3. Les autres maladies apparentées aux mucopolysaccharidoses

Sont réunies sous ce vocable un ensemble d'affections qui, par l'une ou l'autre de leurs caractéristiques, sont à rapprocher des mucopolysaccharidoses ; certaines d'entre elles n'ont été décrites qu'une fois ou deux dans la littérature.

2.3.1. *La GM₁-Gangliosidose.* Cette affection se caractérise par une mucopolysaccharidurie normale. Les produits accumulés sont généralement des polysaccharides. Dans cette maladie, des auteurs ont rapporté des observations suivantes :

- D'une part, SUZUKI (127) et SUZUKI *et al.* (128) ont rapporté une accumulation (10 à 30 fois la normale) d'une fraction constituée en proportions égales de galactose et d'hexosamine, faisant penser à la composition de keratan-sulfate désulfaté ; cette hypothèse a été d'ailleurs confirmée par VAN HOOFF et HERS (129).

- D'autre part, CALLAHAN et WOLFE (130) ont entrepris l'étude des polysaccharides isolés du foie, puis ont apprécié à sa valeur la masse moléculaire de ces derniers. Ces études ont indiqué que la proportion d'acide sialique, d'acides uroniques, de galactosamine est très faible ; en revanche, les constituants majeurs sont représentés par du galactose et de la glucosamine comme s'il s'agissait du keratan-sulfate, dans lequel la teneur en sulfate est très faible.

- Enfin, SUZUKI (131) et SUZUKI *et al.* (132), en étudiant la fraction dite "sialomucopolysaccharidique" isolée du foie et de la rate, ont précisé que cette fraction est composée de galactose, de traces de mannose et d'une quantité équimoléculaire d'hexosamine ; le taux d'acide sialique serait de l'ordre de 5 à 10 %.

Ces sialomucopolysaccharides sont moins importants en proportion du keratan-sulfate désulfaté, en revanche, ils augmentent en proportion dans la forme tardive de la maladie, au niveau du foie et de la rate.

- D'autres auteurs tels que O'BRIEN *et al.* (133), SACREZ *et al.* (134), SERINGE *et al.* (135), DACREMONT et KINT (136), SUZUKI (137), HOOFT *et al.* (138), HUBAIN *et al.* (139), K. SUZUKI *et al.* (140), CALLAHAN et WOLFE (141), SEVERI *et al.* (142) et Y. SUZUKI *et al.* (143) ont montré que dans la GM₁-gangliosidose, on ne détecte pas d' α -galactosidase susceptible d'hydrolyser des glycoprotéines et des keratan-sulfates.

Au cours de cette maladie, il ne semble pas que les glycosphingolipides soient les seuls constituants à s'accumuler dans le cerveau puisqu'on y trouve son dérivé asialo.

SUZUKI *et al.* (144) montrent que le contenu des lysosomes isolés du cerveau de ces malades renferme des débris de membranes, des lipides, des protéines et des lipoprotéines ; cependant, la majeure partie des lipides serait constituée de gangliosides dont 95 % de GM₁-ganglioside. Outre ces gangliosides, on y trouve du cholestérol, des glycosphingolipides et des phospholipides.

2.3.2. *La fucosidose.* Dans cette affection, le taux de mucopolysaccharides urinaires est normal : il s'agit surtout de chondroïtine-4-sulfate et de chondroïtine-6-sulfate, tandis qu'il existe un excès de glycolipides hépatiques (LOEB *et al.* (145) ; VOELZ *et al.* (146)).

L'étude des polysaccharides du foie de ces malades a permis à VAN HOOFF et HERS (147) de mettre en évidence un peu plus de 3 % de fucose après chromatographie sur papier et hydrolyse acide de ces polysaccharides.

DURAND *et al.* (148, 149) et PHILIPPART (150) signalent que les fractions glycopeptidique et oligosaccharidique du foie de ces malades seraient douées d'une activité antigénique Lewis^a et renferment la plus grande part du fucose hydrosoluble. Ils apportent la preuve que la majeure partie du fucose hépatique est liée, d'une part, à un céramide tétrasaccharidique et, d'autre part, à un céramide pentasaccharidique dépourvus du groupement sialyl et doués d'activité de groupe sanguin H.

DAWSON et SPRANGER (151) apportent la confirmation qu'il s'agit d'un glycosphingolipide renfermant du fucose, du galactose, du glucose et de la N-acétylglucosamine, lié à un céramide.

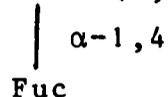
Le Tableau IV (p. 25) donne la structure de ces glycolipides et des difucoglycolipides connus dont l'accumulation n'a jamais été rapportée dans cette maladie, ni dans le sérum, ni dans les urines.

2.3.3. *La mannosidose.* Des mucopolysaccharides ont été isolés du foie et du cerveau des sujets atteints de cette maladie (OCKERMAN) (152, 153). Ces mucopolysaccharides paraissent quantitativement normaux, cependant l'hydrolyse totale des tissus hépatiques et cérébraux, préalablement dégraissés, révèle une augmentation quasi certaine de l'ordre de 6 à 7 fois la quantité normale de mannose (OCKERMAN) (154).

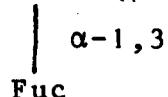
De plus, la présence d'oligosaccharides libres non liés à des amino-acides a été signalée dans les urines, leur isolement et leur composition ont permis de préciser qu'ils possèdent de 3 à 5 résidus mannose pour un résidu glucosamine.

TABLEAU IV
PRINCIPAUX SPHINGOLYCOLIPIDES CONTENANT DU FUCOSE

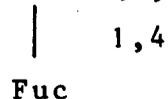
Gal (β -1,3)-GlcNAc (1,3)-Gal (1,4)-Glc (1,1)-CERAMIDE



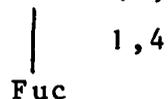
Gal (β -1,4)-GlcNAc (β -1,3)-Gal (β -1,4)-Glc (β -1,1)-CERAMIDE



Fuc (1,2)-Gal (1,3)-GlcNAc (1,3)-Gal (1,4)-Glc-CERAMIDE



Fuc (1,2)-Gal (1,3)-GlcNAc (1,3)-Gal (1,3)-GlcNAc (1,3)-Gal (1,4)-Glc-CERAMIDE



La première substance a été isolée par HAKOMORI *et al.* (155) en 1968. Elle possède une activité Lewis^a. Le pentasaccharide ramifié lié au céramide se trouve dans le lait de femmes possédant l'antigène Lewis^a. C'est le lacto-N-fucopentaose II (KUHN, cité par WATKINS et MORGAN (156) et par VAN HOOFF (157)).

La seconde formule est un composé dépourvu de spécificité ABH ou Lewis, la formule correspond à celle donnée par KOBATA et GINSBURG (158), pour le lacto-N-fucopentaose III isolé du lait.

Les deux difucosylglycosphingolipides représentés ont été isolés par HAKOMORI et ANDREWS (159) du tissu adénocarcinomeux ayant une activité Le^b.



L'origine probable de ces oligosaccharides serait glycoprotéique d'après OCKERMAN (160). OCKERMAN et NORDEN (161) rapportent que ces mannosides macromoléculaires sont susceptibles de s'accumuler dans les tissus.

2.3.4. *La mucosulfatidose ou leucodystrophie métachromatique.* MURPHY *et al.* (162) ont réalisé une étude assez complète de ce syndrome. Ceci leur a permis de signaler qu'il s'agissait d'une accumulation de divers produits sulfatés (des polysaccharides et des lipides).

L'isolement des sulfatides, dans le cas de leucodystrophie métachromatique au niveau du rein, révèle que ces derniers représentent 26 % des lipides totaux. Cependant, un large excès de sulfate et de cholestérol a été signalé au niveau du plasma, du rein, du foie et dans les urines.

Dans le foie, une quantité très appréciable de glycosaminoglycannes, comparable à celle qui s'accumule dans les mucopolysaccharidoses avec mucopolysaccharidurie, a été contrôlée. Ces dépôts sont essentiellement de l'heparan-sulfate et du dermatan-sulfate.

Dans le cerveau de ces malades, l'analyse avait permis de constater un léger excès de GM₂ et de GM₃ gangliosides.

2.4. Les études biochimiques

Nos connaissances acquises dans le domaine des mucopolysaccharides remontent à plusieurs années en arrière. Elles constituent, jusqu'à nos jours, de solides bases fondamentales sans lesquelles une étude pathogénique concrète n'est pas envisageable. Elles représentent le fruit et l'oeuvre de plusieurs années de recherches pour quelques auteurs tels que A. DORFMAN, R.W. JEANLOZ, K. MEYER, H. MUIR et leurs collaborateurs et bien d'autres encore comme KLENK et SVENNERHOLM.

Tout ce que nous connaissons des mucopolysaccharides peut se résumer en quelques mots.

2.4.1. *Les mucopolysaccharides*. Sous le nom de mucopolysaccharides, l'existence de la fraction protéique passe généralement sous silence dans cette molécule, bien que cette partie protéique existe.

La partie polysaccharidique des mucopolysaccharides présents chez l'homme renferme dans sa constitution des acides uroniques ; cette chaîne est souvent sulfatée, d'où le nom de mucopolysaccharides acides.

Ces molécules acides existent généralement dans tous les tissus, très souvent sous forme conjuguée à des protéines ; une exception cependant, celle de l'acide hyaluronique.

Souvent on utilise, pour désigner ces mêmes composés assez complexes, le terme de protéoglycannes, les assimilant ainsi aux glycoprotéines.

Ces deux groupes de composés se distinguent l'un de l'autre par des critères suivants :

— d'une part, par la nature des unités glucidiques constitutives : Un caractère commun à toutes ces molécules se dégage ; il s'agit de la richesse en hexosamine en dehors, bien entendu, de la présence d'acides uroniques et de groupements sulfates qui sont les constituants propres aux mucopolysaccharides.

Dans les glycoprotéines, on constate une quantité très appréciable de mannose, de fucose et d'acide sialique, alors que dans les mucopolysaccharides, ces mêmes composés existent mais surtout à l'état de trace.

— D'autre part, par l'organisation et la taille des chaînes polysaccharidiques : Il s'agit d'unités répétitives disaccharidiques, généralement associées en chaînes linéaires de haut poids moléculaire qui est propre surtout aux mucopolysaccharides.

Par contre, dans les glycoprotéines, il s'agit de chaînes oligosaccharidiques, très souvent ramifiées et généralement de faible poids moléculaire (inférieur à 4000), ce qui reste d'ailleurs à être confirmé.

— Enfin, par la nature du point d'attache entre le polysaccharide et la protéine : Tous ces critères, bien entendu, ne sont pas immuables, ainsi, d'après MUIR (163), le keratan-sulfate serait une molécule ramifiée.

D'autres substances, possédant des caractères assez particuliers et ressemblant à la fois aux mucopolysaccharides et aux glycoprotéines, ont été signalées par des auteurs tels que BRUNNGRABER et BROWN (164), DI BENEDETTA *et al.* (165) et MORGOLIS (166), ceci principalement au niveau du cerveau.

D'après les estimations, on pense qu'il s'agit de molécules dont le poids moléculaire serait compris entre 1300 et 13.000. Ces molécules renferment du mannose, du galactose, du fucose, de l'acide sialique, de la galactosamine et de la glucosamine, très rarement des acides uroniques, mais certaines sont sulfatées.

Des études structurales réalisées sur ces molécules ont permis de mieux connaître la partie protéique, la partie glucidique et le point d'attache.

La partie protéique est fonction de la nature des mucopolysaccharides et du tissu (TSIGANOS et MUIR (166 bis) ; TSIGANOS *et al.* (167) ; MUIR (168)). Ces mêmes auteurs ont décrit l'existence de protéoglycannes contenant à la fois du chondroïtine-sulfate et du keratan-sulfate.

On connaît peu de choses de la nature de l'association entre protéoglycannes et le collagène, cependant, plusieurs auteurs tels que HOFFMAN et MASHBURN (169) pensent qu'il peut s'agir de liaisons covalentes.

La partie polysaccharidique est généralement considérée comme un polymère non ramifié, formé d'unités disaccharidiques dont la structure est donnée dans le Tableau V (p. 29). Ces disaccharides sont généralement sous forme d'uronides, de galactosides, d'osamines. C'est sous ces formes qu'on les trouve lors d'une hydrolyse acide partielle ou enzymatique.

TABLEAU V

STRUCTURE CHIMIQUE DE L'UNITE REPETITIVE DES PRINCIPAUX MUCOPOLYSACCHARIDES ACIDES
(d'après MEYER) (170)

<p>DERMATAN-SULFATE</p> <p>Iduronate (α-1,3)-N-acétyl-galactosamine-sulfate (β-1,4).....</p>	<p>ACIDE HYALURONIQUE</p> <p>Glucuronate (β-1,3)-N-acétyl-galactosamine (β-1,4).....</p>	<p>HEPARAN-SULFATE</p> <p>$R' = C = CH_3$ ou SO_3^- $R'' = H$ ou SO_3^-</p> <p>Glucuronate (α-1,4)-N-acétyl-(ou sulfuryl)glucosamine (ou glucosamine-6-sulfate)...</p>
<p>CHONDROITINE-6-SULFATE</p> <p>Glucuronate (β-1,3)-N-acétyl-galactosamine-4-sulfate (β-1,4).....</p>	<p>CHONDROITINE-4-SULFATE</p> <p>Glucuronate (β-1,3)-N-acétyl-galactosamine-4-sulfate (β-1,4).....</p>	<p>KERATAN-SULFATE</p> <p>$R = H$ ou SO_3^-</p> <p>Galactose (ou galactose-6-sulfate) (β-1,4) N-acétyl-galactosamine-6-sulfate (β-1,3).....</p>

BUS LILLE

On pourrait considérer la plupart des glycosamino-glucuronoglycannes comme des polymères formés de β -1,4 osamides d'acide uronique. Les disaccharides sont des dérivés du lactose β -1,4-galactoside-glucose dont l'unité glucose serait oxydée en position 6 et l'unité galactose serait N-acétylaminée.

Dans le dermatan-sulfate, en plus de l'unité répétitive, on remarque une épimérisation du carbone 5, au niveau de l'acide uronique. D'après FRANSSON et RODEN (171, 172), ce polysaccharide contient également de l'acide glucuronique.

Dans le keratan-sulfate, l'unité répétitive serait du lactose-N-acétylaminé en position 2 du glucose. En outre, d'après MUIR (173), on sait que le keratan-sulfate contient plus de galactose que de glucosamine et cet excès serait probablement dû à la chaîne polysaccharidique au niveau des ramifications.

Plusieurs auteurs, par leurs travaux, ont remarqué dans divers mucopolysaccharides la présence d'autres constituants osidiques. C'est ainsi que,

- d'une part, dans le keratan-sulfate, on trouve des traces de fucose, de mannose et d'acide sialique (GREGORY et RODEN (174) ; SENO *et al.* (175) ; MEYER *et al.* (176) ; GREILING *et al.* (177)),

- et d'autre part, dans l'heparan-sulfate, DORFMAN et MATALON (178) montrent la présence d'une N-acétyl- α -glucosamine. D'autres substances ont vu le jour, telles que le rhamnose (KISTERS et GREILING) (179), l'arabinose (WARDI *et al.* (180) ; CHAKRAPANI et BACHHAWAT (181)).

Ces substances pourraient résulter d'une contamination par d'autres composés. Il est bien entendu que la présence d'arabinose et de rhamnose -si toutefois elle est confirmée- revêterait une grande importance dans la pathologie des mucopolysaccharidoses, dans le sens que la dégradation des protéoglycannes, par voie enzymatique, nécessiterait un grand nombre d'hydrolases, ce qui ferait penser que chacune de ces hydrolases pouvait être le siège d'une lésion génétique responsable de cette maladie.

Le point d'attache. La liaison entre protéine et polysaccharide dans les protéoglycannes est généralement composée de deux résidus de galactose et d'un résidu de xylose. Cette structure se retrouve dans le Tableau VI (p. 32). Il y a cependant une exception à cette règle générale : dans la structure du keratan-sulfate, on trouve une N-acétyl-glucosamine en position réductrice terminale du polysaccharide, comme s'il s'agissait d'une glycoprotéine.

GREILING *et al.* (181bis) signalent que des résidus de N-acétyl-galactosamine et de mannose complètent le point d'attache (voir la structure des différents types de liaisons protéine-polysaccharide dans le Tableau VI).

2.4.2. Les glycolipides. Il s'agit généralement de glycosphingolipides dans les mucopolysaccharidoses ; ce sont des composés possédant dans leur structure un noyau lipidique commun, appelé céramide, formé d'un acide gras lié par une liaison amide à une sphingosine.

Cette structure est souvent variable et dépend en principe de la nature de l'acide gras entrant dans sa composition.

Le groupement hydroxyde à l'extrémité de la sphingosine joue un rôle prépondérant dans la fixation du glucose, du galactose ou d'une chaîne oligosaccharidique, ceci par une liaison β -osidique.

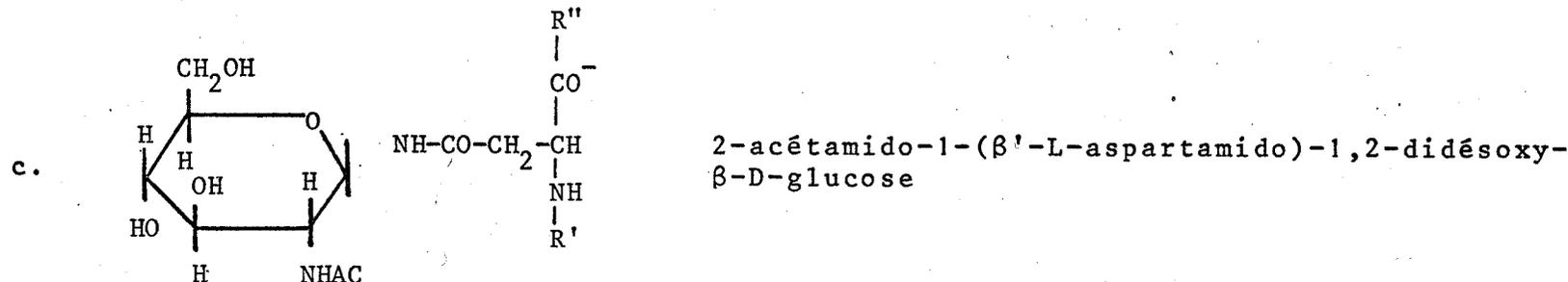
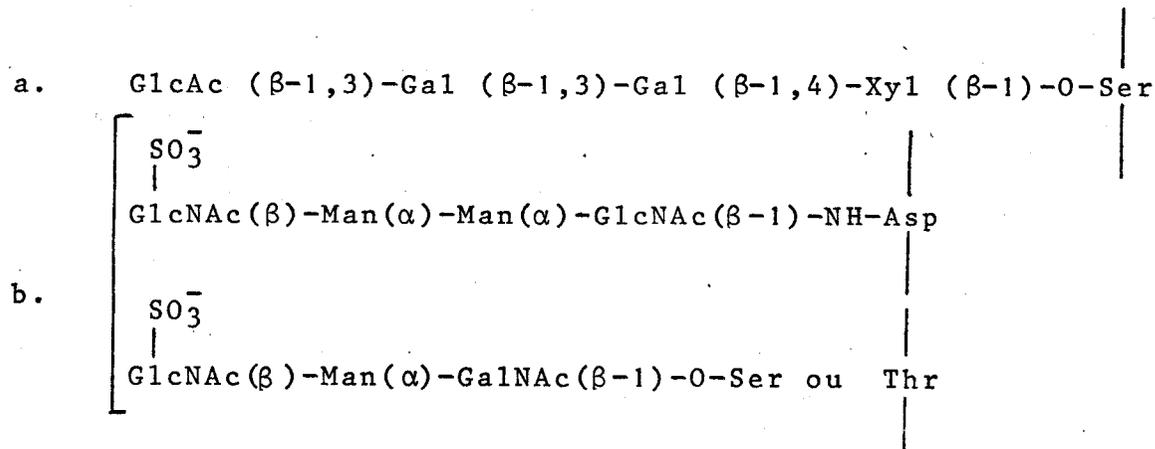
Les glycosphingolipides, renfermant de l'acide sialique -ou exceptionnellement une N-glycolyl neuraminique-, sont souvent appelés gangliosides.

La structure et la composition de quelques glycosphingolipides sont réunies dans le Tableau VII (p. 33).

Ces glycolipides ont des propriétés particulières, ils sont hydrosolubles, ceci grâce à la longueur de leur chaîne osidique -généralement, ce sont des tétra- ou pentaoses-. Ces molécules participent, grâce à leur configuration, à l'édification des membranes et confèrent à ces dernières l'aspect tubulaire s'il s'agit de gluco- ou de galactocérobrosides ; en amas ou en lamelle, s'il s'agit de glycosphingolipides renfermant une chaîne oligosaccharidique dans leur molécule.

TABLEAU VI

STRUCTURE DE POINT D'ATTACHE UNISSANT UN GLYCOSAMINOGLYCANNE A UNE PROTEINE

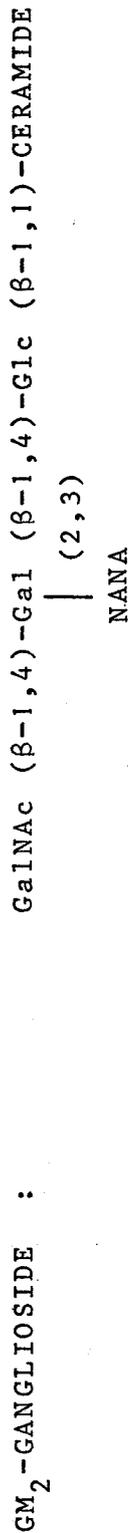


- a. Structure trouvée dans les chondroïtine-sulfates, le dermatan-sulfate et l'heparan-sulfate (d'après RODEN) (182)
- b. Structures proposées par GREILING *et al.* (183) pour le point d'attache unissant le keratan-sulfate à une protéine ; il n'est pas superflu de rappeler que, généralement, la liaison est souvent réalisée par l'intermédiaire de N-acétyl- α -galactosamine dans les glycoprotéines.
- c. Un des modes de liaison entre polysaccharides et protéine dans le cas du protéo-keratan-sulfate (d'après MUIR) (184)

508
LITTE

TABLEAU VII

SCHEMA SIMPLIFIE DE QUELQUES GLYCOSPHINGOLIPIDES (d'après F. VAN HOOFF) (185)



Chacun des glycolipides représentés peut se transformer en celui qui est immédiatement en dessous de lui, sous l'action d'une hydrolase. L'action successive de β-galactosidase, de β-hexosaminidase (isoenzyme A), de sialidase (neuraminidase), d'une seconde β-galactosidase et de β-glucosidase, peut ainsi transformer le GM₁-ganglioside en céramide.



Leur dégradation fait appel pratiquement aux mêmes hydrolases que celles nécessaires au catabolisme des glycosaminoglycannes. Outre ces mêmes hydrolases, on distingue l'action d'une α -galactosidase dans l'hydrolyse du digalactosyl-céramide et du digalactosyl-glucosyl-céramide, et enfin, l'action d'une sulfatase A nécessaire à l'hydrolyse des groupements sulfates des sulfatides.

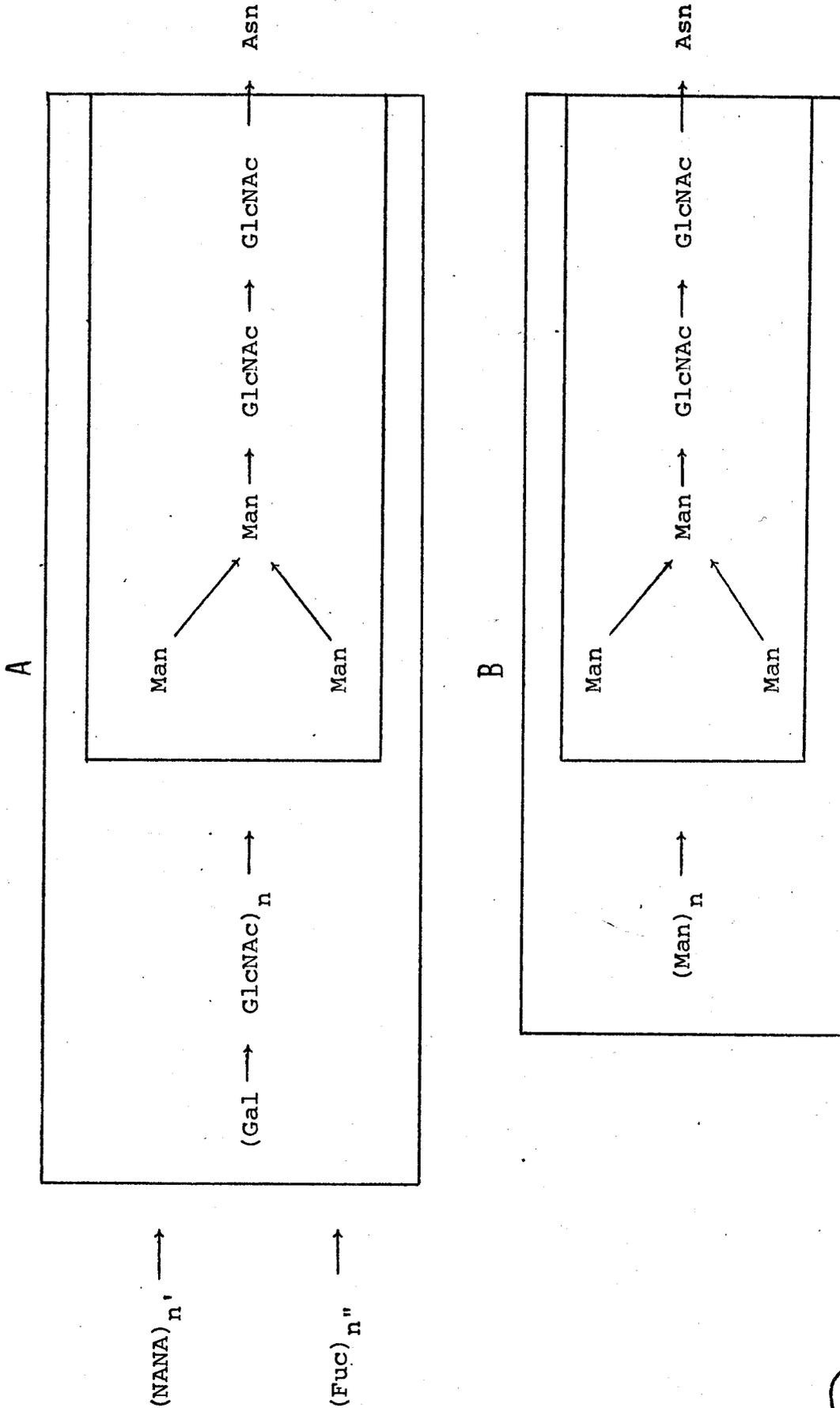
D'autres glycolipides plus complexes nécessitent l'action d'autres enzymes comme l' α -fucosidase, l'isoenzyme B, de la N-acétyl- β -hexosaminidase ou de l' α -galactosaminidase pour accomplir l'hydrolyse de certains globosides et des asialo-gangliosides à GM₂.

2.4.3. *Les glycoprotéines* sont des molécules issues de l'association d'une protéine et d'un groupement prosthétique de nature glucidique. Depuis quelques années, les glycoprotéines suscitent beaucoup d'intérêt, en raison de leur rôle biologique toujours grandissant.

Les recherches effectuées jusqu'à nos jours sur le rôle des glycoprotéines tendent à montrer que la partie glycanique joue un rôle important dans l'expression de leur activité biologique.

Des travaux plus récents et en particulier ceux de MONTREUIL et coll. (186), sur la structure des glycoprotéines, permettent de classer les glycoprotéines à liaison N-asparaginyl-glucosamine en deux groupes distincts (Fig. 1 ; p. 35) :

- Glycoprotéines de type oligomannosidique
- Glycoprotéines de type N-acétyllactosaminique



BUS
LILLE

Fig. 1.- SCHEMA DE STRUCTURE GENERALE DES GLYCOPROTEINES DE TYPE N-ACETYLLACTOSAMINIQUE (A) ET DE TYPE OLIGOMANNOSIDIQUE (B)

TRAVAUX PERSONNELS

MUCOPOLYSACCHARIDOSE AVEC MUCOPOLYSACCHARIDURIE

Isolement et caractérisation des glycopeptides et des oligosaccharides acides des urines d'enfant atteint de maladie de "Sanfilippo".

I - MATERIEL ET METHODES

I - FRACTIONNEMENT DES URINES

Dans une première série d'expériences, 450 ml d'urine ont été fractionnés selon le procédé général décrit par MALLEVAIS-GOUBET *et al.* (187) qui permet d'isoler et de doser sélectivement les glycoprotides, les oligosaccharides et les monosaccharides urinaires : l'urine est recueillie sur un mélange de chloroforme et de Toluène (v:v), puis filtrée après un séjour de 24 heures à + 4°C pour permettre une bonne sédimentation des substances minérales, généralement peu solubles ; ensuite l'urine est concentrée 10 fois par lyophilisation et son pH est amené à 6.

L'urine ainsi concentrée est traitée par 9 volumes d'éthanol absolu et le précipité obtenu est dialysé pendant 3 jours contre eau distillée ; ce qui nous permet d'avoir trois fractions :

la fraction adialysable du précipité éthanolique qui renferme les glycoprotides totaux de l'urine pathologique.

la fraction dialysable du même précipité qui renferme les oligosaccharides.

la solution éthanolique ou surnageant alcoolique dans laquelle se trouvent principalement les monosaccharides.

2 - ANALYSE DES FRACTIONS

Les glucides totaux des fractions adialysables et dialysables des précipités éthanoliques ont été dosés, en appliquant les méthodes colorimétriques suivantes :

Les hexoses totaux

Les hexoses totaux ont été dosés par la méthode à l'orcinol de TILLMAN et PHILIPPI (188) modifiée par RIMINGTON (189) en introduisant dans chaque série de dosages, des témoins internes représentés par des solutions de monosaccharides présents dans les glycoprotéides et surtout dans les proportions molaires où ils existent dans les urines, selon le protocole de MONTREUIL et SPIK (190).

Les acides uroniques

Les acides uroniques ont été dosés par la méthode au carbazole sulfurique de DISCHE (191), en tenant compte de l'interférence des monosaccharides neutres.

Les acides sialiques

Les acides sialiques ont été déterminés par la méthode à la diphénylamine de WERNER et ODIN (192).

Les osamines

Les osamines ont été dosées par le procédé de BELCHER *et al.* (193), après hydrolyse chlorhydrique (HCl 4 N à 100° pendant 4 heures) effectuée dans des tubes scellés sous vide.

De plus, la fraction adialysable du précipité éthanolique de cette première fraction urinaire est chromatographiée sur une colonne de Sephadex G 50, en vue d'établir le profil d'élution des différents constituants.

3 - ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES ET DES OLIGOSACCHARIDES ACIDES

12 litres d'urine représentant la seconde fraction urinaire d'un même malade, ont été recueillies sur un mélange de chloroforme et de toluène, puis filtrées après un séjour de 24 heures à + 4°C, afin de se débarrasser des produits minéraux. Cette fraction d'urine ainsi filtrée est précipitée par de l'alcool à 90%. On obtient deux fractions distinctes :

- d'une part, le précipité éthanolique qui renferme les M.P.S., les glycoprotéines, les glycopeptides et les oligosaccharides ;

- et d'autre part, le surnageant alcoolique qui renferme principalement les monosaccharides.

3.1. Fractionnement de l'extrait urinaire

Le précipité éthanolique ainsi recueilli est soumis à un fractionnement sur une colonne de Séphadex G 50. L'élution des différents composants a été réalisée par l'eau. Les composants glucidiques ont été repérés au phénol sulfurique. Ce fractionnement nous permet d'obtenir deux sous fractions :

- d'une part, une fraction représentant les M.P.S. et les glycoprotéines ;

- et d'autre part, une fraction contenant les glycopeptides et les oligosaccharides.

3.2. Isolement des M,P,S.

La fraction obtenue précédemment après passage sur Sephadex G 50 et qui renferme les M.P.S. et les glycoprotéines

est amené à 1 litre, puis ajustée à pH 8 ; ensuite chromatographiée sur une colonne d'échange d'ions (Dowex 1 x 4 "mesh 200 à 400" forme acétate) (4 x 30 cm). La solution effluente est évaporée sous pression réduite, puis conservée à - 20°C.

L'élution des M. P. S. a été réalisée par un gradient discontinu, mais croissant de chlorure de sodium (1M. 2M. 3M.). Les M. P. S. ont été repérés par la méthode colorimétrique au carbazole sulfurique décrite auparavant.

Chaque composant ainsi repéré est recueilli et dialysé contre de l'eau distillée à + 4°C, pendant 5 jours, en présence d'un mélange de chloroforme et de toluène.

Ensuite l'adialysable de chaque composant est amené à pH 6,5, puis concentré sous vide et lyophilisé,

3.3. Isolement des glycopeptides et des oligosaccharides

3.3.1. *Isolement des glycopeptides basiques*

La fraction renfermant les glycopeptides et les oligosaccharides obtenue après passage sur Sephadex G 50, est amenée à 1,5 litre puis ajustée à pH 3,5 à l'aide d'une solution d'acide acétique 2N. Cette fraction est ensuite soumise à une chromatographie échangeur de cations Dowex 50 x 2 "mesh 200 à 400" forme H⁺ (4 x 40 cm)

L'élution de la colonne de Dowex 50 x 2 forme H⁺ a été réalisée par une solution d'acétate de pyridine 0,2 M. Les composants glucidiques ont été repérés au phénol sulfurique, puis soumis à évaporation sous-vide, pour être ensuite lyophilisés.

3.3.2. *Isolement des oligosaccharides acides*

La solution effluente recueillie après passage sur une colonne de Dowex 50 x 2 "mesh 200 à 400" forme H⁺, est concentrée à 1 litre. Cette solution représente la fraction "acide + Neutre", qui est chromatographiée sur une colonne (4 x 40 cm) de Dowex 1 x 2 "mesh 200 à 400" forme acétate.

Après élimination de la plupart des oligosaccharides "neutres" par rinçage avec 4 litres d'eau, les oligosaccharides acides ont été décrochés de la colonne, par un gradient discontinu, mais croissant d'acétate de pyridine 1-2-5-10-20-50-100-200-500-1000 mM. Ces différentes fractions acides ont été à nouveau refractionnées sur une colonne de sephadex G 25. L'élution de chaque composant glucidique a été réalisée par l'eau distillée. Le repérage des composants a été effectué grâce au procédé colorimétrique à l'orcinol sulfurique, décrite auparavant. Chaque sous fraction ainsi obtenue est évaporée sous vide puis lyophilisée. Les oligosaccharides acides ont été isolés par chromatographie et par électrophorèse préparative sur papier, dans des solvants différents.

a - chromatographie

Les oligosaccharides acides obtenus ont été soumis à une chromatographie préparative sur papier ; à cet effet, des solutions de l'ordre de 500 μ l ont été déposées en un trait continu sur une feuille de papier Whatmann n° 3.

Après passage du solvant, des bandes latérales sont découpées pour permettre une bonne localisation, par révélation spécifique à l'oxalate d'aniline, des différentes substances.

Les bandes ainsi repérées et découpées sont éluées pendant 10 à 12 heures par l'eau distillée, suivant le procédé de DENT (194). Par ce procédé, 10 à 20 mg de produit sont ainsi isolés par chromatogramme.

Les solutions d'élution sont évaporées et purifiées sur des microfiltres, ensuite lyophilisées.

b - Systèmes solvants

- système solvant de PARTRIDGE (195)

n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5)

- système solvant de FISHER et NEBEL (196)
acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5:5:1:3)

- système solvant de BUCHAN et SAVAGE (197)
acétate d'éthyle/n propanol/eau (1:6:3)

c - Révélation

- Réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (198)
- Réactif au nitrate d'argent de TREVELYAN et coll. (199)

d - Electrophorèse

L'isolement des oligosaccharides acides a été également réalisé par électrophorèse préparative, dans des cuves d'électrophorèse en "toit". Les dépôts ont été réalisés à 13 cm du bord de chaque feuille de papier Whatmann n° 3.

- Tampons utilisés

, Tampon de MICHL (200) : pH 3,9
Pyridine - acide acétique - eau (3:10:487)

. Tampon de MICHL modifié par GRIMMONPREZ (201)
Pyridine : 15 ml ; eau : 1935 ml ; acide acétique : q.s.p. pH 5,4

- Révélation

Les révélations ont été effectuées avec le réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (202).

3.3.3. Isolement des oligosaccharides neutres et des glycopeptides

L'effluent "neutre" obtenu après passage sur Dowex 1 x 2 ("mesh" 200 - 400 ; forme acétate) est concentré à 500 ml sous pression réduite, puis soumis à une chromatographie sur charbon-Célite, préparée selon le procédé de WHISTLER et DURSO (203).

Le charbon (Activit x 100) est tout d'abord traité par Hcl pur de manière à éliminer les impuretés (ions minéraux et organiques), Il est ensuite filtré sous vide sur Büchner et rincé très soigneusement par l'eau distillée. Ce lavage est très important, car la moindre trace d'acide chlorhydrique risque au moment de la concentration à siccité des éffluents glucidiques de conduire à des réactions de destruction ou de transosidation des sucres (SPIK *et al.* (204)).

La formation de grumeaux de charbon provoque en particulier la rétention de l'acide chlorhydrique. Le charbon lavé une première fois, sera donc séché à plat sur une feuille de papier filtre, puis écrasé de manière à éliminer ces grumeaux. Ce charbon est ensuite relavé abondamment et séché plusieurs fois de suite. Les particules trop fines sont éliminées pour empêcher un écoulement normal des colonnes, par de simples décantations.

La célite est également traitée par de l'acide chlorhydrique pur, puis lavée comme le charbon. Les colonnes sont montées en mélangeant des volumes égaux de charbon et de célite. Les solutions glucidiques peuvent être fractionnées sur ces colonnes à raison de 1 g de sucres totaux pour 100 ml de charbon-célite. La concentration en sucre ne doit pas dépasser 2 à 5 p.100. Les glucides sont alors désorbés par des solutions éthanoliques de concentration croissante : 3,5 - 7,5 - 8,5 - 50 p, 100 (v:v)

MUCOPOLYSACCHARIDOSE AVEC MUCOPOLYSACCHARIDURIE "SANFILIPPO A"

II - RESULTATS

I - DOSAGE DES GLUCIDES URINAIRES

Glucides "glycoprotidiques"

La teneur en glucides glycoprotidiques de l'urine de Sanfilippo A, est fort élevée par rapport à celles des urines de sujets sains normaux de même âge (Tableau VIII ; p.45). Cette augmentation concerne les mucopolysaccharides acides dont le taux est très nettement supérieur à la moyenne.

En effet, l'augmentation du taux des glucides de la fraction glycoprotidique porte essentiellement sur la fraction glycopeptidique et oligosaccharidique de masse moléculaire élevée comme nous le montre la chromatographie sur Sephadex G 50 : les pics 2 et 3 que nous trouvons dans la figure 2 (p. 44) ont été soumis à l'électrophorèse et à la chromatographie sur papier, ce qui nous a permis de mettre en évidence la présence de glycopeptides et d'oligosaccharides acides, qui ont été isolés d'une part par chromatographie sur charbon-célite, dont le protocole a été décrit plus haut, et d'autre part, par chromatographie d'échange d'ions.

Glucides oligosaccharidiques

Le tableau VIII (p. 45) montre que l'excrétion urinaire de glycopeptides et d'oligosaccharides est très augmentée dans le cas de la maladie de Sanfilippo A jusqu'à des valeurs de l'ordre de 10 fois celle de la valeur normale pour les glycopeptides et 500 fois la valeur normale des oligosaccharides.

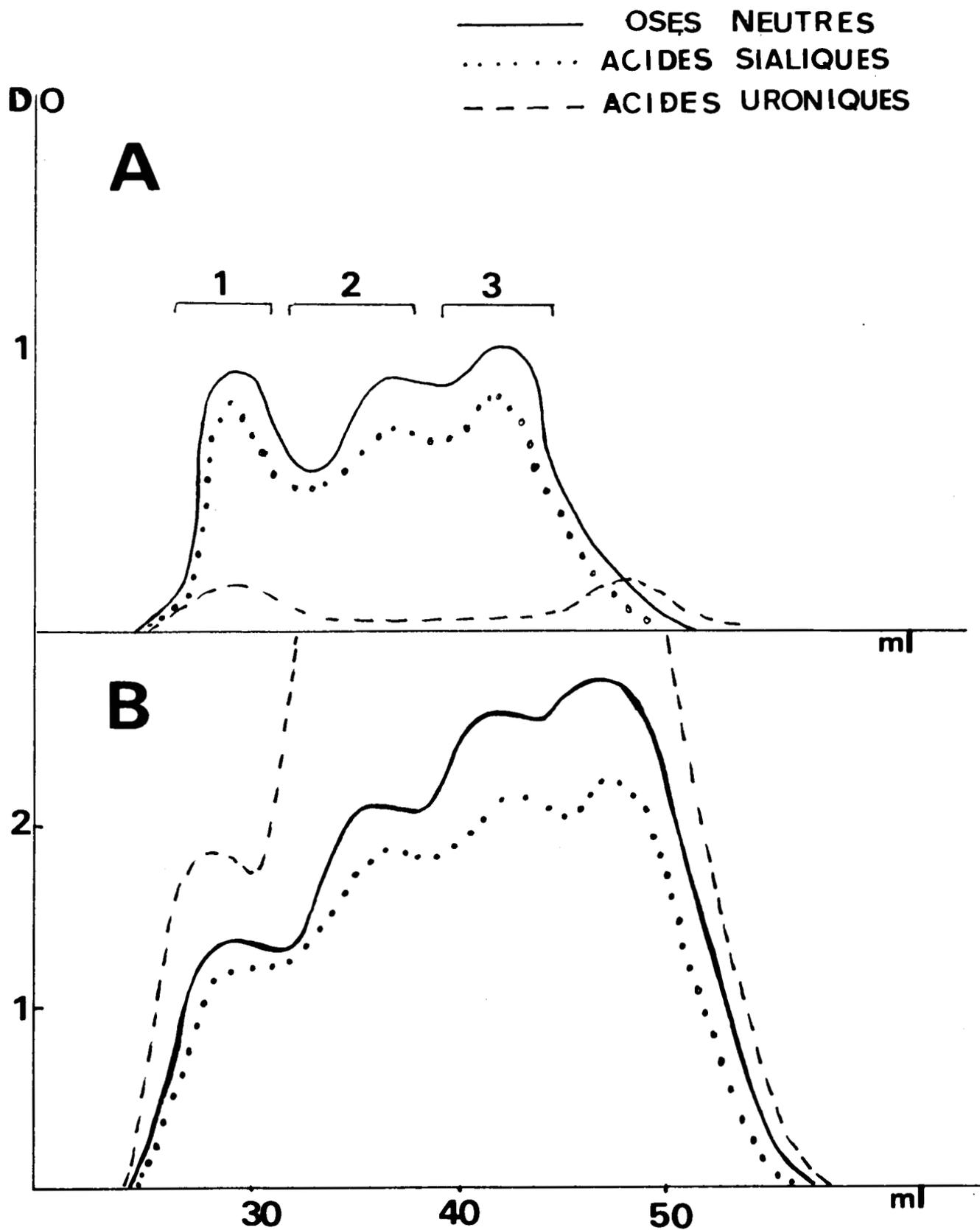


Fig. 2.- Chromatographie sur Sephadex G-50 de la "fraction glycopeptidique" (A) d'urine normale et (B) de l'urine de mucopolysaccharidose de type IIIA ou "Sanfilippo A".

——— monosaccharides neutres ; acides sialiques ;
 - - - - acides uroniques ; D.O. : densité optique.

ELIMINATION JOURNALIERE * DES GLUCIDES "GLYCOPROTIDIQUES" ET OLIGOSACCHARIDIQUES
 DANS L'URINE D'ENFANTS NORMAUX ET DE MUCOPOLYSACCHARIDOSE A (SANFILIPPO DE TYPE A)

	OSSES	ACIDES URONIQUES	OSAMINES	NANA
Glycoprotides :				
Adultes	69,23	13,12	37,64	51,94
Enfants normaux (10 à 15 ans)	63,02	13,17	35,92	48,64
Sanfilippo A (12 ans)	784	96	351	370
Oligosaccharides :				
Enfants normaux (10 à 15 ans)	54	12	31	45
Sanfilippo A	2096	260	216	857

* en mg de monosaccharides neutres, d'acides uroniques, d'osamines et d'acide sialique



2 - FRACTIONNEMENT DES GLUCIDES URINAIRES

Le fractionnement des glucides urinaires est décrit dans la figure 3 (p. 47). Après chromatographie de la fraction "glycopeptidique" et "oligosaccharidique" sur résine échangeuse d'anions (Dowex 1 x 2), l'élution par un gradient discontinu d'acétate de pyridine conduit à l'obtention de 12 fractions différentes (Fig. 4 ; p. 48). Ces fractions sont essentiellement constituées d'oligosaccharides acides, riches en acides uroniques (Fig. 5 ; p.49) et la complexité de ces mélanges ne nous a pas permis d'isoler des constituants dans un état de pureté satisfaisant pour l'étude chimique. Toutefois, l'électrophorèse préparative dans le tampon de pH 5,4 nous a permis d'isoler, à partir de la fraction élevée par l'acétate de pyridine 0,100 M, un composé constitué de galactosamine et de sulfate.

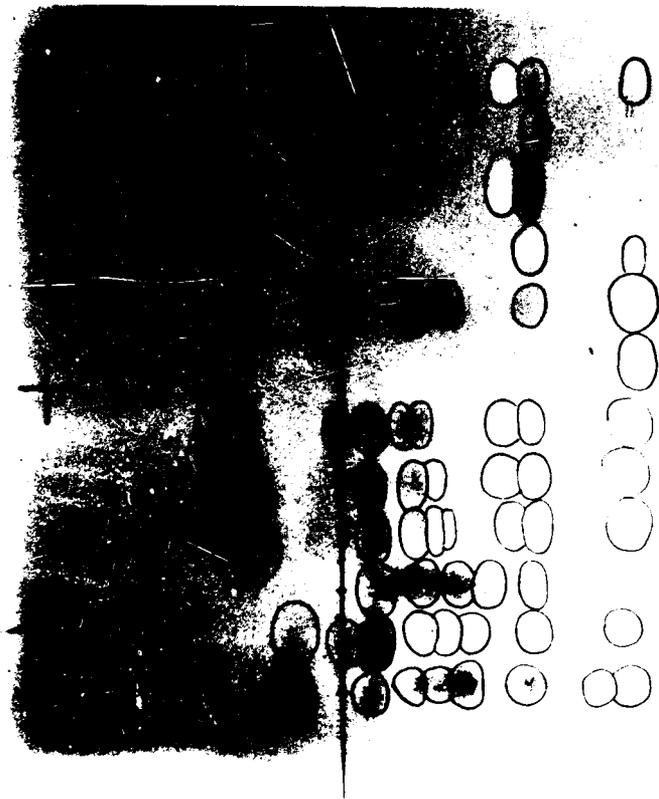
Ces différentes fractions, en outre, ne renfermaient pas les glycopeptides, qui ont été exclus de la colonne d'échangeur d'anions, probablement à cause de l'extrême acidité des autres constituants fixés.

Aussi, la fraction "neutre" effluente a-t-elle subi un deuxième fractionnement sur charbon-Célite, d'une part, puis sur résine Dowex 1 x 2, d'autre part, dont l'élution par un gradient d'acétate de pyridine de concentration croissante fournit 11 fractions différentes (Fig. 6 ; p.50) riches en glycopeptides.

3 - TENTATIVE D'IDENTIFICATION DE LA GALACTOSAMINE-SULFATE

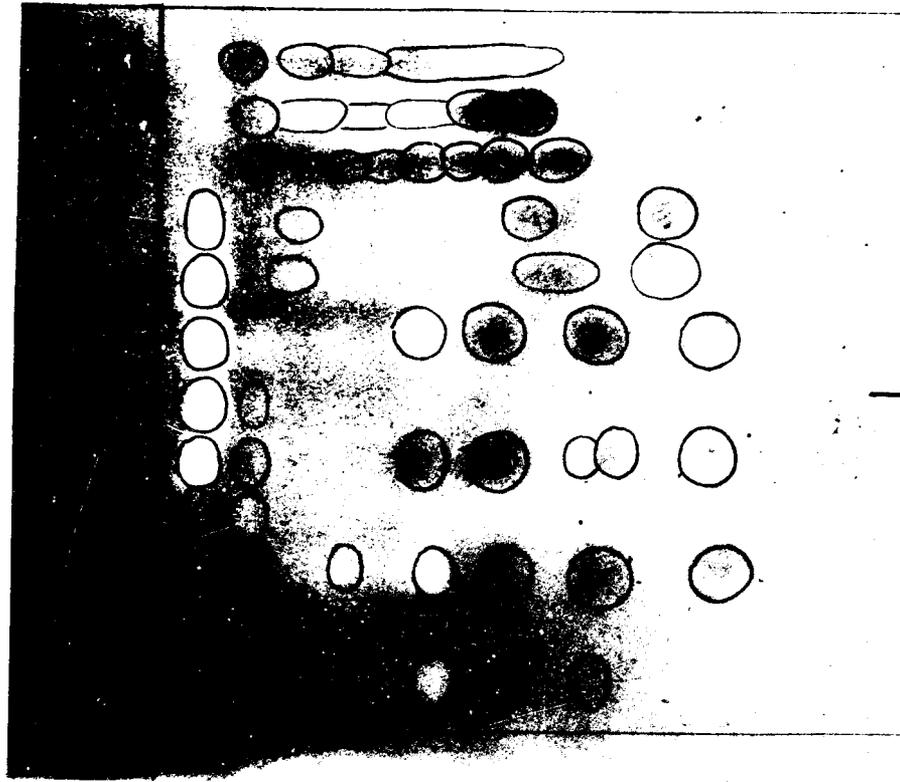
3.1. Hydrolyse acide par l'acide trifluoroacétique

L'identification des glucides ou monosaccharides constituant ce composé, a été réalisée après hydrolyse acide au moyen d'acide trifluoroacétique 4 N - 4 heures à 100°C.



pH 3,9

A



pH 5,4

B

Fig. 4.- Electrophorèse sur papier des différentes fractions d'osides acides
 A : Système-tampon de MICHL à pH 3,9 ; B : Système-tampon de MICHL
 à pH 5,4. Révélation à l'oxalate d'aniline.



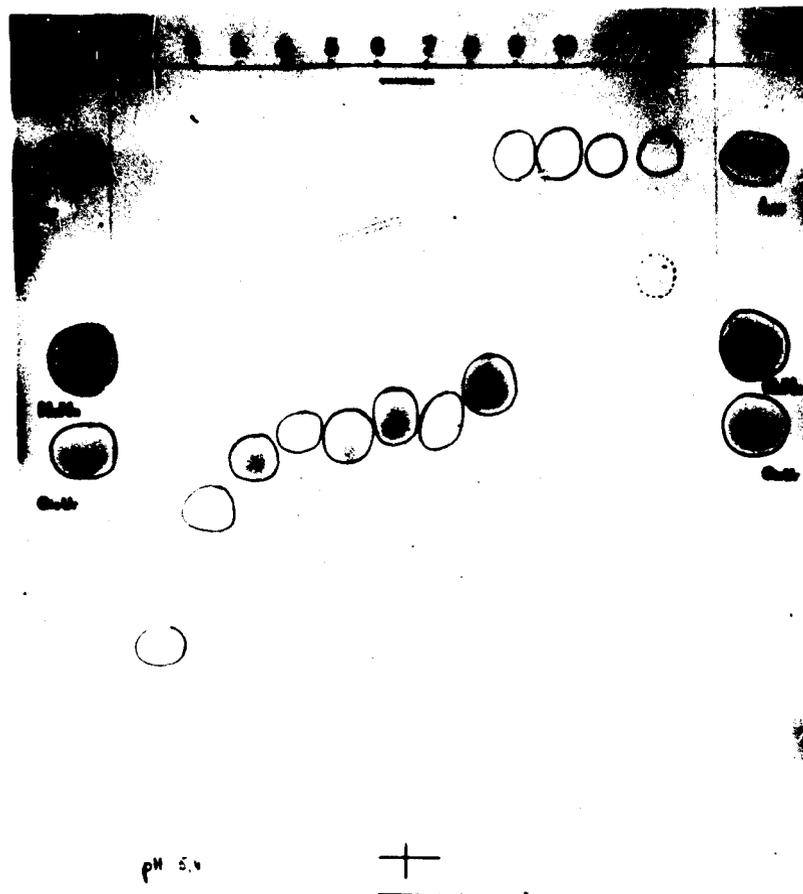


Fig. 5.- Etude des oligosaccharides acides isolés de l'urine de Mucopolysaccharidose de type IIIA. L'électrophorèse a été réalisée dans les conditions suivantes : Système tampon de pH 5,4. Révélation à l'oxalate d'aniline. Les témoins de référence sont le lactose, l'acide sialique et l'acide uronique.



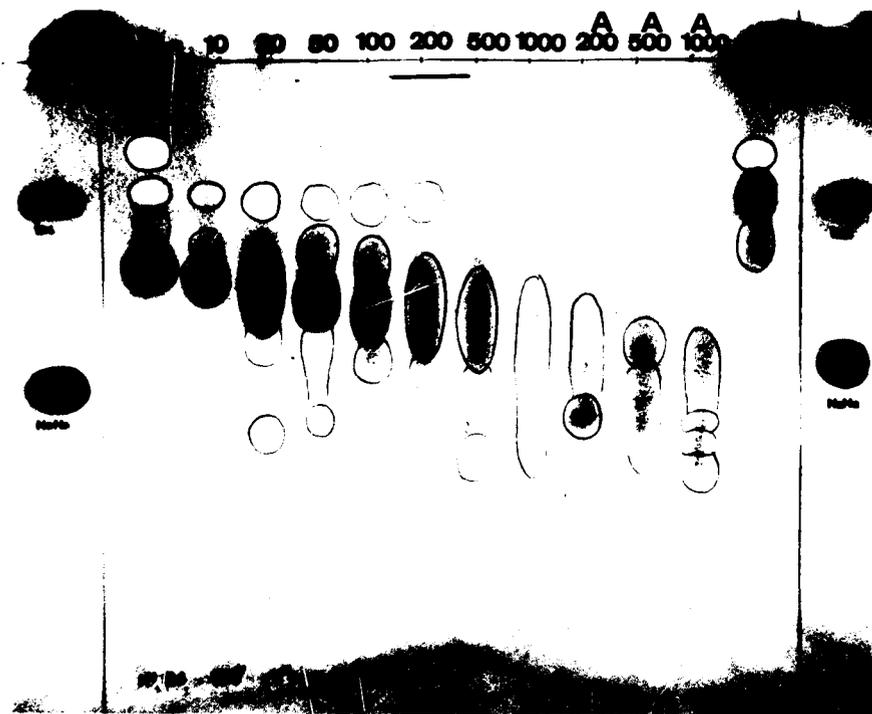


Fig. 6.- Etude électrophorétique des différentes fractions glycopeptidiques isolés de la fraction éthanolique après passage sur Dowex 1 X 2 ("mesh" 200-400 ; forme acétate).
 Conditions d'électrophorèse : Papier Whatman n° 3. Système-tampon de MICHL modifié par GRIMMONPREZ (205) à pH 5,4 ; 3 h à 600 volts. Révélation à l'oxalate d'aniline ; 130°C ; 1/2 h. Solution tampon : lactose, acide N-acétylneuraminique.



L'hydrolysate acide a été évaporé à siccité sous un courant d'azote.

Le résidu sec ainsi obtenu est repris par 40 μ l d'eau, puis déposé en chromatographie sur papier en présence des différents témoins marqueurs, dans le système solvant N° 2 (206).

Dans ces conditions, nous observons, après révélation à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (207), l'apparition de la galactosamine (Fig. 7 ; p. 52).

3.2. Cinétique d'hydrolyse du groupement sulfate

La cinétique d'hydrolyse a été réalisée au moyen de l'acide trifluoroacétique 0,2 N pendant 5' - 10' - 20' - 30' - 45' - 1 heure. Chaque hydrolysate est évaporé à siccité sous un courant d'azote, puis repris par 30 μ l d'eau bidistillée. Ces différents temps d'hydrolyse ainsi repris sont soumis à une chromatographie sur papier dans le système solvant N° 2 pendant une nuit.

Dans ce cas, nous voyons apparaître au bout de 10' d'hydrolyse un composé intermédiaire qui s'intensifie au fur et à mesure de l'hydrolyse. Puis, à partir de 20', un autre composé apparaît. Ce dernier s'identifie à la galactosamine (Fig. 8A ; p. 53).

3.3. Identification de la galactosamine par desamination oxydative de GARDELL et coll. (208)

4,6 mg de produit sont hydrolysés à l'acide trifluoroacétique 2 N, pendant 1 heure à 100°C. L'hydrolysate est ensuite évaporé à siccité, puis repris par 2 ml d'une solution de ninhydrine (0,48 g de ninhydrine dans 100 ml de citrate de sodium 0,1 M de pH 4,7). La solution ainsi formée

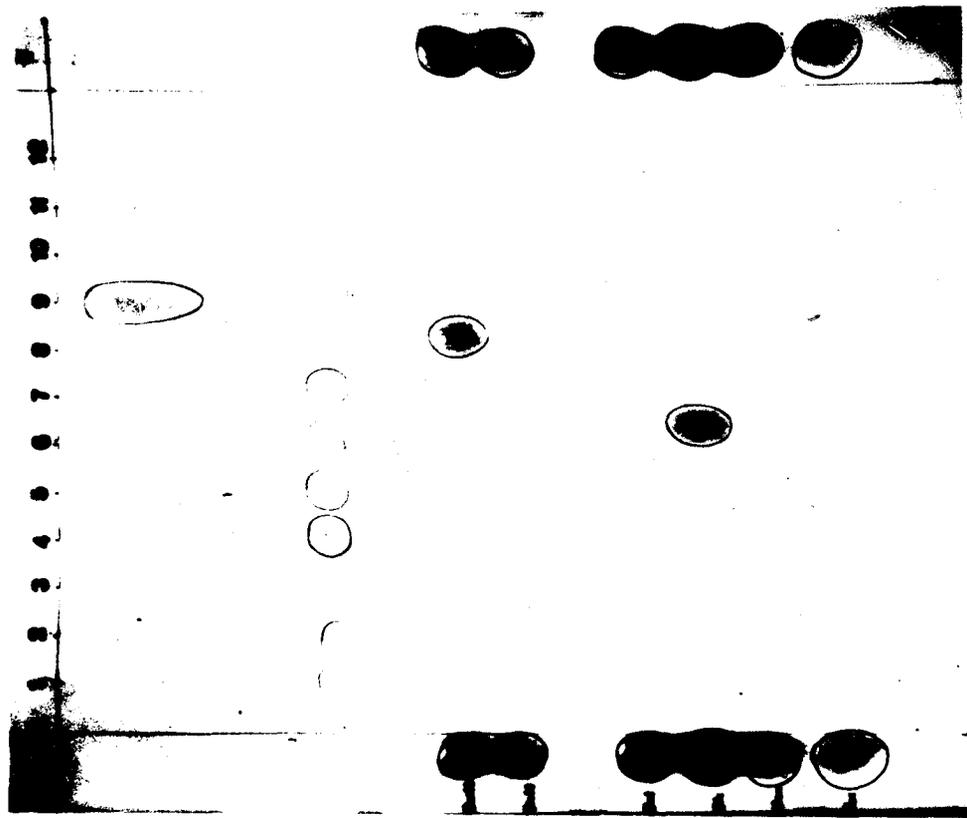


Fig. 7.- Chromatographie sur papier des hydrolysats des différentes fractions d'oligosaccharides acides. Conditions : Système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/eau ; 18 h. Révélation à l'oxalate d'aniline.

BUS
L141.F

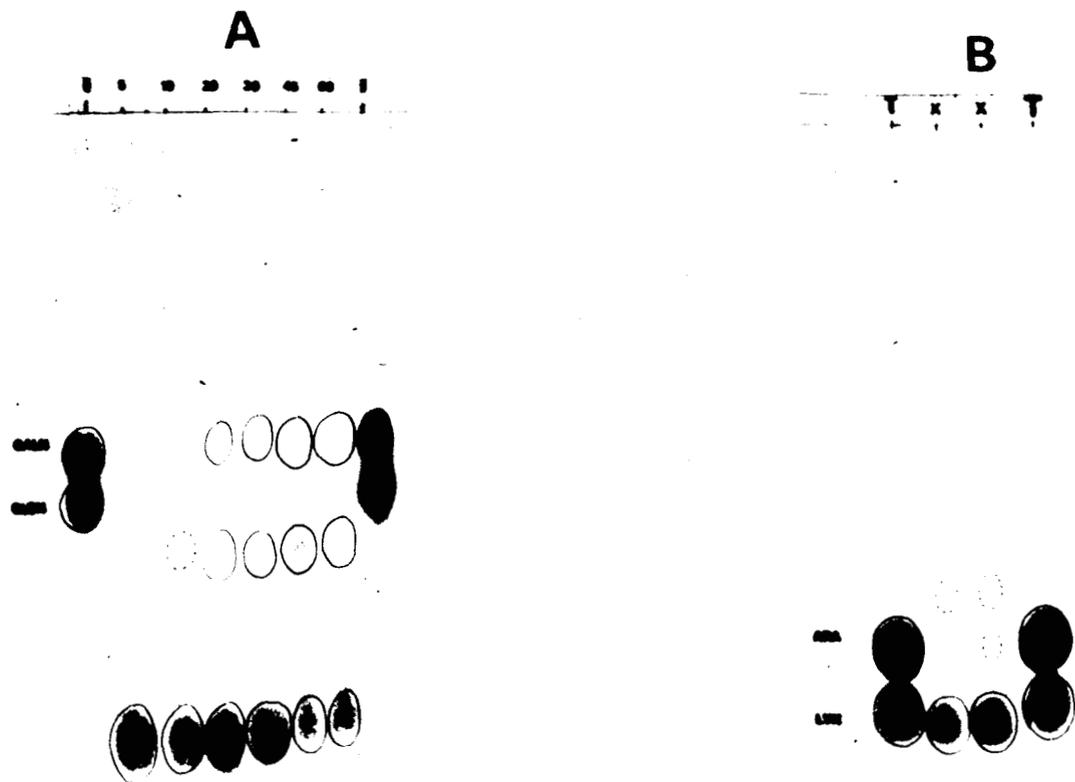


Fig. 8.- A : Chromatographie sur papier des hydrolysats trifluoroacétiques du composé renfermant de la galactosamine isolée de la fraction 0,100 M
 B : Chromatographie sur papier des produits de désamination oxydative par la ninhydrine des hydrolysats acides du composé renfermant de la galactosamine

Conditions de la chromatographie : Papier Whatman n° 3 ; système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/eau (5:5:1:3). Révélation à l'oxalate d'aniline



est à nouveau portée à 100°C pendant 30 minutes. Après ce temps, la solution est passée sur échangeur de cations (Dowex 50 x 8 "mesh" 25-50 - forme acide 1 cm x 10 cm), puis d'anions (Duolite A-40 "mesh" 25-50 forme formiate 1 cm x 10 cm). Après un léger rinçage, l'effluent est concentré par évaporation à siccité et le résidu repris par 50 µl d'eau bidistillée est soumis à une chromatographie sur papier, dans le système solvant n° 2 (209) pendant une nuit, en présence de marqueurs tels que l'arabinose, du xylose ou lyxose.

Dans ces conditions, la désamination oxydative réalisée sur ce composé donne du lyxose qui est une caractéristique de la galactosamine, ceci après révélation à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (Fig. 8B ; p. 53).

3.4. Dosage du sulfate

2,3 mg de produit ont été mis en suspension dans 100 µl d'eau, puis hydrolysés au moyen de l'acide trifluoroacétique 2 N à 100°C pendant 1 heure. L'hydrolysate est évaporé à siccité puis repris par 5 ml d'eau bidistillée. A partir de la solution d'hydrolysate ont été effectués d'une part :

a - le dosage du sulfate

Ce dosage a été effectué par la méthode au rhodizonate de sodium de TERHO et HARTIALA (210) qui est la suivante,

0,5 ml de la solution d'hydrolysate sont additionnés de 2 ml d'éthanol absolu, de 1 ml de solution tampon de chlorure de Barium (acide acétique 2 M - chlorure de Barium 5 mM - NaHCO₃ 0,02 M) (5:1:4) (v:v:v), plus 1,5 ml d'une solution de rhodizonate de sodium préparée extemporanément.

Après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité pendant 10 minutes en même temps qu'une gamme étalon, renfermant 2 à 12 μg de sulfate (soit du Na_2SO_4 ou de H_2SO_4) dans 0,5 ml d'eau. Le maximum de coloration est obtenu au bout de 30 minutes, la lecture est faite à 520 m μ .

De cette façon, nous avons pu doser le sulfate contenu dans ce composé, afin d'établir le rapport osamine / sulfate.

b - Le dosage des osamines

Ce dosage a été réalisé sur l'hydrolysat de 2,3 mg de produit, repris par 5 ml d'eau bidistillée préalablement préparée et selon la méthode d'ELSON MORGAN (211) décrite auparavant.

Ce dosage nous a permis de préciser que les osamines et les groupements sulfates se trouvent dans un rapport équimoléculaire.

3.5. Conclusion

L'hydrolyse partielle réalisée dans les conditions citées ci-dessus, ne libère en aucun cas la N-acétylosamine, mais libère les groupements sulfates et l'osamine correspondant.

Dans le cas présent, il apparaît un composé intermédiaire dont la nature reste à préciser ultérieurement.

4 - CARACTERISATION DES GLYCOPEPTIDES URINAIRES

Les différentes fractions riches en glycopeptides obtenues après élution de la Dowex 1 x 2 par un gradient discontinu en acétate de pyridine, ont été soumises à une électrophorèse préparative dans un système tampon pH 5,4 (la révélation a été réalisée à l'aide de l'oxalate d'aniline à 130° pendant une demi-heure.

L'analyse chromatographique des hydrolysats correspondants à chacune des fractions montre qu'il s'agit de glycopeptides riches en galactose, mannose, en acide sialique et N-acétyl glucosamine.

En outre, ces composés renferment des traces de N-acétyl galactosamine et de fucose comme nous le montre la figure 9 (p. 57),

L'étude des hydrolysats chlorhydriques des différentes fractions glycopeptidiques, à l'auto-analyseur Beckman, permet de constater que les différentes fractions isolées par électrophorèse préparative renferment des quantités variables d'acides-amino, tels que l'acide aspartique, la thréonine, sérine et le glycolle. Les autres acides-amino sont à l'état de traces (Tableau IX ; p. 58). Les quantités relatives de chaque fraction glycopeptidique obtenue, 111 mg à 1,2 g, sont conformes aux résultats obtenus par le dosage des glucides conjugués et montrent que le cas de la maladie de Sanfilippo de type A que nous avons étudiée, s'accompagne d'une excrétion massive de glycopeptides.

5 - CONCLUSION

La maladie de Sanfilippo de type A est caractérisée par une déficience en N-sulfatase et s'accompagne de l'excrétion massive dans l'urine de mucopolysaccharides acides tels que l'héparan-sulfate.

A côté de cette mucopolysaccharidurie, nous avons également observé une accumulation urinaire de glycopeptides riches en mannose, en galactose, en glucosamine et en acide sialique.

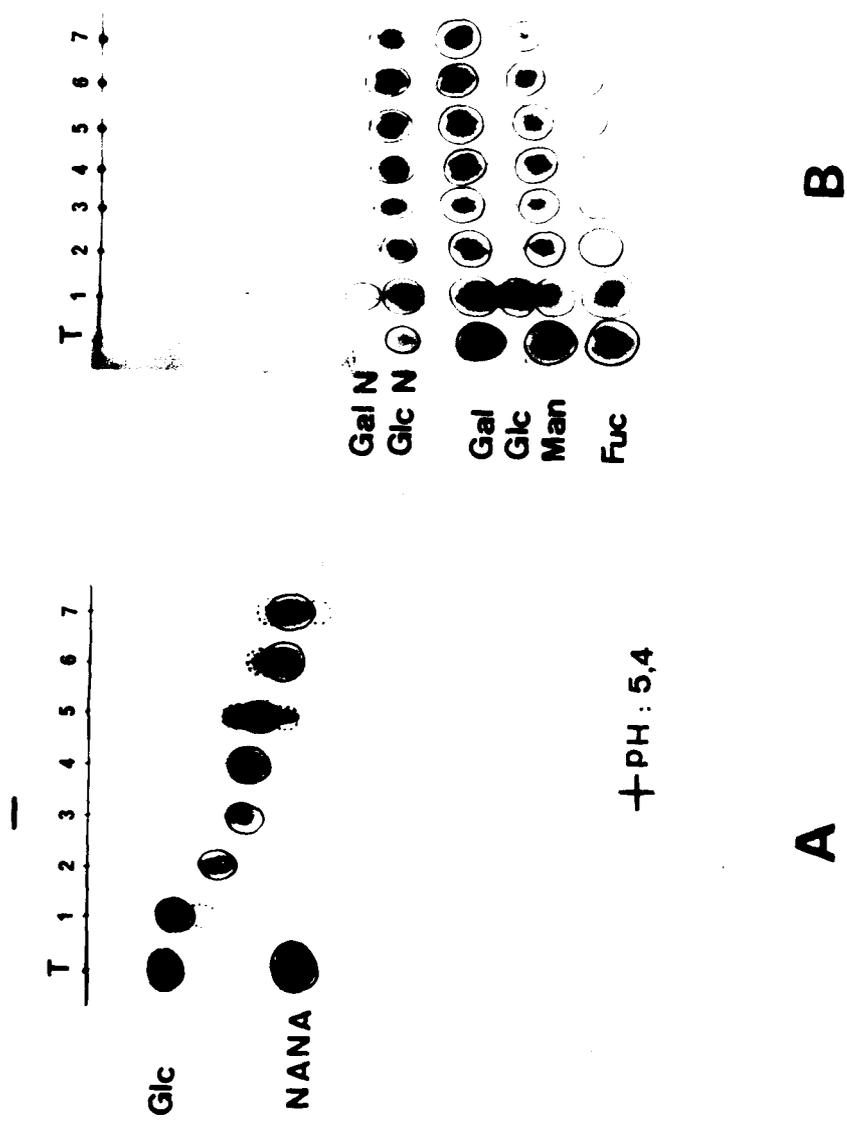


Fig. 9.- Etude électrophorétique et chromatographique des glycopeptides urinaires de l'urine de Mucopolysaccharidose de type IIIA ou "Sanfilippo A"
 A : Electrophorèse sur papier des glycopeptides acides isolés
 B : Chromatographie sur papier des hydrolysats acides de ces mêmes glycopeptides.
 Conditions de la chromatographie : Papier Whatman n° 3 ; système-solvant n° 2 ; 18 h. Révélation à l'oxalate d'aniline.



ANALYSE QUANTITATIVE EN MONOSACCHARIDES ET EN AMINO-ACIDES

ENTRANT DANS LA COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES

ISOLES DES URINES DE MUCOPOLYSACCHARIDOSES

	1 (111 mg)	2 (202 mg)	3 (353 mg)	4 (736 mg)	5 (1,079 g)	6 (1,265 g)	7 958 mg
Gal	+++	+++	id	id	id	id	
Man	+++	+++	id	id	id	id	id
Fuc	+						
GlcNAc	+++	+++	id	id	id	id	id
GalNAc	+						
ANA	++	++	++	++	++	++	++
Sp	+++	+++			+++	+++	
Gal	+++	+++	id	id	++	++	
Gal	+++	++			++	++	
Gal	++	++++	id	id	+	+	
Gal	++	+++	id	id	+	+	
Gal	+	+					
Gal	++	+++			+	+	
Autres amino-acides	+	+			+		

Les différentes fractions que nous avons décrites sont en réalité des mélanges complexes de composés qu'il sera nécessaire, dans un deuxième temps, de sous-fractionner en utilisant, en particulier, des méthodes de chromatographie d'échange d'ions sur cellulose ou séphadex modifiés.

L'origine de ces glycopeptides demeure inconnue. Il est en effet difficile de prendre en considération l'hypothèse selon laquelle une déficience en protéinases serait associée au déficit en N-sulfatase.

Il paraît plus probable que cette glycopeptidurie soit un phénomène secondaire lié au dysfonctionnement des lysosomes dont l'intégrité morphologique et fonctionnelle est gravement perturbée par l'accumulation de mucopolysaccharides acides.

L'isolement et l'étude physico-chimique de ces nombreux glycopeptides seront néanmoins très intéressants dans la mesure où il sera possible de disposer ainsi de quantités élevées de substrats parmi lesquels figureront probablement des produits de catabolisme d'antigènes de membranes.

MUCOPOLYSACCHARIDOSE SANS MUCOPOLYSACCHARIDURIE OU MUCOLIPIDOSE

Etude de la composition de sialo-oligosaccharides isolés des urines d'un sujet atteint d'une Mucopolidose II ou "I cell disease".

I - MATERIEL ET METHODES

I - FRACTIONNEMENT DES URINES

Les urines ont été fractionnées selon le procédé général de MALLEVAIS *et al.*, (212) qui permet d'isoler et de doser sélectivement, d'une part, les glycoprotides et d'autre part, les oligo- et les monosaccharides urinaires.

Les urines, préalablement maintenues pendant 24 h à 2° C, sont filtrées et concentrées 10 fois par lyophilisation. Elles sont ensuite ajustées à pH 6 et traitées, à -15° C, par 9 volumes d'éthanol absolu après dialyse pendant 3 jours contre de l'eau distillée. On obtient ainsi 3 fractions : la fraction adialysable du précipité éthanolique qui contient les glycoprotides totaux de l'urine normale, la fraction dialysable du même précipité qui renferme les oligosaccharides et la solution éthanolique dans laquelle se trouvent tous les monosaccharides.

2 - ANALYSE DES FRACTIONS

Les glucides totaux des fractions adialysables et dialysables des précipités éthanoliques ont été dosés par l'application des méthodes colorimétriques suivantes : les hexoses totaux par le procédé à l'orcino1 sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (213) modifié par RIMINGTON et selon le protocole expérimental décrit par MONTREUIL et SPIK (214), les acides uroniques par la méthode au carbazole sulfurique de DISCHE (215) selon le mode opératoire de MONTREUIL et SPIK (215bis), les osamines par la technique de BELCHER *et al.* (216) après une hydrolyse chlorhydrique (HCl 4 N ; 100° C pendant 4 h) effectuée en tubes scellés sous vide, les acides sialiques par la méthode à la diphénylamine de WERNER et ODIN (217).

3 - ETUDE DE LA FRACTION ADIALYSABLE DU PRECIPITE ETHANOLIQUE

La fraction adialysable du précipité éthanolique a été chromatographiée sur une colonne Sephadex G-50, à l'aide d'une solution de chlorure de sodium 0,08 M. Les constituants glucidiques repérés en appliquant les procédés colorimétriques décrits ci-dessus ont été ensuite soumis à l'analyse électrophorétique sur papier réalisée dans des cuves en "toit" avec le tampon de MICHL (218) de pH 3,9.

4 - ISOLEMENT DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES

Isolement des oligosaccharides totaux

325 ml d'urine ont été directement purifiés sur des colonnes (3 x 30 cm) d'échangeurs de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25-50 ; forme acide) et d'anions (Déacidite A-102 D ; "mesh" à 25-50 ; forme formiate). La solution effluente évaporée à siccité sous pression réduite a été ensuite soumise à une chromatographie sur des colonnes (2 x 15 cm) de charbon-Célite. Après élimination de la plupart des monosaccharides par passage de 500 ml d'eau distillée, les oligosaccharides ont été élués par 500 ml d'éthanol à 3,5 %, à 7,5 % puis à 50 %. Ces trois fractions évaporées à siccité ont été

analysées par chromatographie sur papier dans les deux systèmes solvants suivants : système solvant de PARTRIDGE (219); n-butanol - acide acétique - eau (4:1:5) ; n° 2 système solvant de FISCHER et NEBEL (220) ; acétate d'éthyle - pyridine - acide acétique - eau (5:5:1:3)

Les chromatogrammes ont été révélés à l'aide du réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (221).

Isolement des oligosaccharides neutres

Les oligosaccharides neutres de la fraction éthanolique à 7,5 % ont été isolés par chromatographie préparative dans le système-solvant n° 2.

Isolement des oligosaccharides acides

La fraction éluée par l'éthanol à 50 % a été soumise à une chromatographie sur colonne (2 x 10 cm) d'échangeur d'anions (Dowex 1 x 2 "mesh" 200-400 ; forme acétate). Après rinçage par 300 ml d'eau distillée, les oligosaccharides acides ont été déplacés par 300 ml de solutions d'acétate de pyridine tamponnée à pH 5,5 de concentration croissante : 2,5,10,50 et 100 mM. Les fractions obtenues ont été évaporées à siccité et analysées par chromatographie sur papier dans le système-solvant n° 2. Les oligosaccharides acides ont été isolés à l'état pur par chromatographie préparative sur papier réalisée avec le même solvant.

5 - ETUDE DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES

L'identification des glucides constituant les oligosaccharides a été effectuée par analyse chromatographique des hydrolysats obtenus par l'action de l'acide trifluoroacétique 4 N, à 100° C, pendant 4 h.

La composition molaire en monosaccharides des oligosaccharides a été déterminée par dosage chromatographique en phase gazeuse (Aérogroph 2.100 ; colonnes de verre (0,6 x 300 cm) Varaport 30 à 5 % d'OV-210 ; débit du gaz vecteur (N₂) = 8 ml/mn ; température programmée de 110 à 210° C (1° C/mn) ; température de l'injecteur et du détecteur à ionisation de flamme = 220° C) des dérivés trifluoroacétylés des sucres libérés par méthanolyse selon la méthode de ZANETTA (222).

Le glucide en position terminale réductrice a été identifié par réduction des oligosaccharides par le borohydrure de potassium tritié (20 µCi) dans KOH 0,1 M. Après 20 mn de contact, la réaction est arrêtée par l'addition de 0,5 ml de résine échangeuse de cations (Dowex 50 x 2 ; "mesh" 200-400, forme H⁺). La solution est recueillie par filtration et évaporée à siccité et le résidu sec obtenu est repris par 1 ml du mélange méthanol-acide acétique (5:1;V:V) de nouveau évaporé à siccité, dissous dans 0,3 ml d'acide trifluoroacétique 4 N et hydrolysé dans les conditions décrites plus haut. Les polyols tritiés ont été analysés par chromatographie sur papier à l'aide du système solvant n° 2 et leur radioactivité a été déterminée par comptage en milieu scintillant.

6 - METHYLATION

L'oligosaccharide n° 7 (0,800 mg) est dissous dans 1 ml d'eau distillée auquel on ajoute 5 mg de BH₄Na. Après 2 heures de contact, la solution est neutralisée par de la résine échangeuse de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25-50, forme H⁺), puis filtrée. Après évaporation à siccité, le résidu est repris par 0,5 ml de méthanol et

et évaporé à nouveau. Le résidu sec est alors repris par 0,5 ml de diméthylsulfoxyde et la solution est introduite dans un flacon de pénicilline de 5 ml. Ce flacon est bouché hermétiquement, et après l'avoir saturé avec de l'azote, on introduit 0,5 ml de sulfinyl carbanion (2,5 g d'HNa en solution dans 25 ml de diméthylsulfoxyde). Après une demie-heure d'agitation en bain ultrasonique, on introduit alors 0,5 ml d'iodure de méthyle. Après une demi - heure d'agitation en bain ultrasonique, les produits méthylés sont extraits dans le mélange chloroforme-eau. La phase chloroformique est évaporée à sec, puis le résidu est soumis à une méthanolyse puis à une chromatographie en phase gazeuse (Aérogroph 1200) colonne de verre (0,6 x 300 cm) renfermant une phase stationnaire ou chromosorb WHMDS à 3 % de Carbowax 6000 (60-80 mesh) 170° C, le débit du gaz vecteur (N₂) est de 30 ml/minute.

II - RESULTATS

I - DOSAGE DES GLUCIDES URINAIRES

Glucides "glycoprotidiques"

La teneur en glucides glycoprotidiques de l'urine de mucopolipidose de type II est quadruplée ou quintuplée par rapport à celles des urines d'enfants normaux du même âge (Tableau X ; p. 66). Cette augmentation ne concerne pas les mucopolysaccharidoses acides dont le taux est, au contraire, légèrement inférieur à la moyenne. En fait, l'augmentation du taux des glucides dans la fraction glycoprotidique porte sur une fraction oligosaccharidique de masse moléculaire élevée (1500 à 2500 daltons), comme le confirme la chromatographie Sephadex G-50 : le pic n° 3 (Fig. 10 ; p.65) soumis à l'électrophorèse et à la chromatographie sur papier révèle la présence d'oligosaccharides riches en acide sialique, identiques aux constituants isolés par chromatographie sur

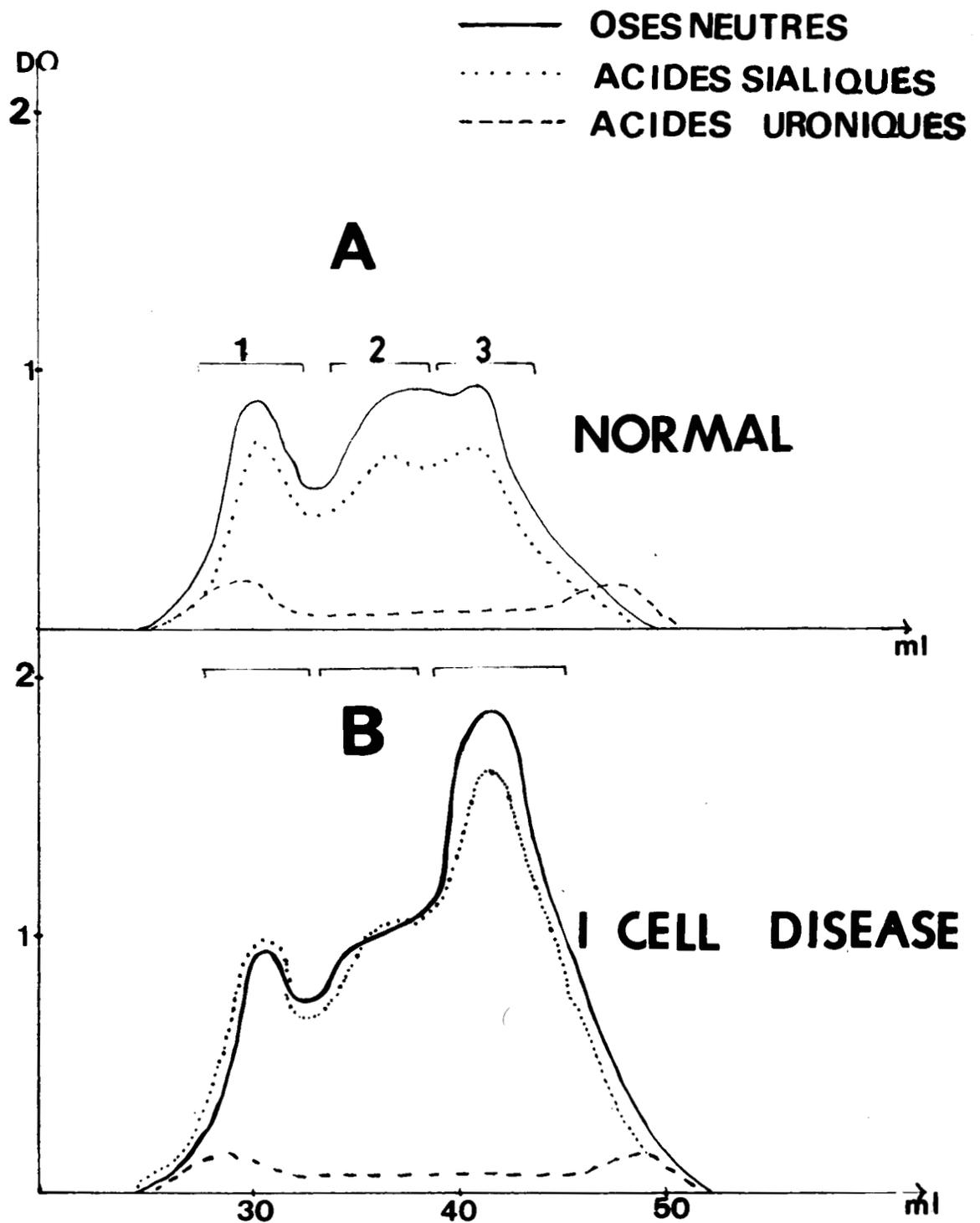


Fig. 10.- Chromatographie sur Sephadex G-50 de la "fraction glycoprotidique" (A) d'une urine normale et (B) de l'urine de mucopolidose de type II

———— monosaccharides neutres ; acides sialiques ;
 - - - - acides uroniques. D.O. : densité optique.



TABLEAU X

ELIMINATION JOURNALIERE (*) DES GLUCIDES "GLYCOPROTIDIQUES" ET "OLIGOSACCHARIDIQUES
DANS L'URINE D'ENFANTS NORMAUX ET DE MUCOLIPIDOSE DE TYPE II ("I CELL DISEASE")

	<u>Oses</u>	<u>Acides uroniques</u>	<u>Osamines</u>	<u>Acide N-acétyl- neuraminique</u>
<u>Glycoprotides</u>				
Enfants normaux (2 à 9 ans)	32 ± 8	7 ± 0,8	22,5 ± 6	23 ± 6
Enfants normaux (8 mois à 2 ans)	16 à 20	5 à 8	14 à 16	13 à 16
"I Cell disease" (8 mois)	92	3,5	64	65
<u>Oligosaccharides</u>				
Enfants normaux (2 à 9 ans)	50 à 80	8 à 15	17 à 24	40 à 60
Enfants normaux (8 mois à 2 ans)	15 à 30	ND	6 à 15	10 à 25
"I Cell disease" (8 mois)	135	14,5	26	54

(*) (en mg de monosaccharides neutres, d'acides uroniques, d'osamines et d'acide sialique)



charbon-Célite que nous décrivons plus loin. Le caractère anionique de ces sialoconjugués explique qu'ils ne dialysent pas.

Glucides oligosaccharidiques

Le tableau X (p. 66) montre que l'excrétion des oligosaccharides est au moins triplée ou quadruplée dans la mucopolidose de type II car les valeurs que nous obtenons sont entachées d'une erreur, par défaut puisque, comme nous venons de le voir, les sialo-oligosaccharides ne dialysent pas.

II - ETUDE DES OLIGOSACCHARIDES

Oligosaccharides neutres.

L'analyse chromatographique des hydrolysats acides des oligosaccharides neutres isolés de la fraction éthanolique à 7,5 % montre qu'ils sont composés, en proportions variables, de galactose, de glucose, de fucose et de N-acétylglucosamine. Ils sont donc identiques aux oligosaccharides des urines de sujets sains du même groupe sanguin (groupe B, sécréteur, Lewis^b) que notre jeune malade.

Oligosaccharides riches en acide sialique

Comme nous le montre la figure 11 (p. 68), l'urine de mucopolidose de type II renferme, dans la fraction éluée du charbon par l'éthanol à 50 %, des quantités très importantes de constituants qui restent au trait de départ du chromatogramme. La chromatographie de ces composés sur des échangeurs d'anions fournit 5 fractions qui renferment des proportions variables d'oligosaccharides. La figure 12 (p. 69) permet de comparer la composition en oligosaccharides d'une urine normale et de l'urine du jeune malade. Les échantillons, analysés par chromatographie sur papier, sont concentrés 1000 fois

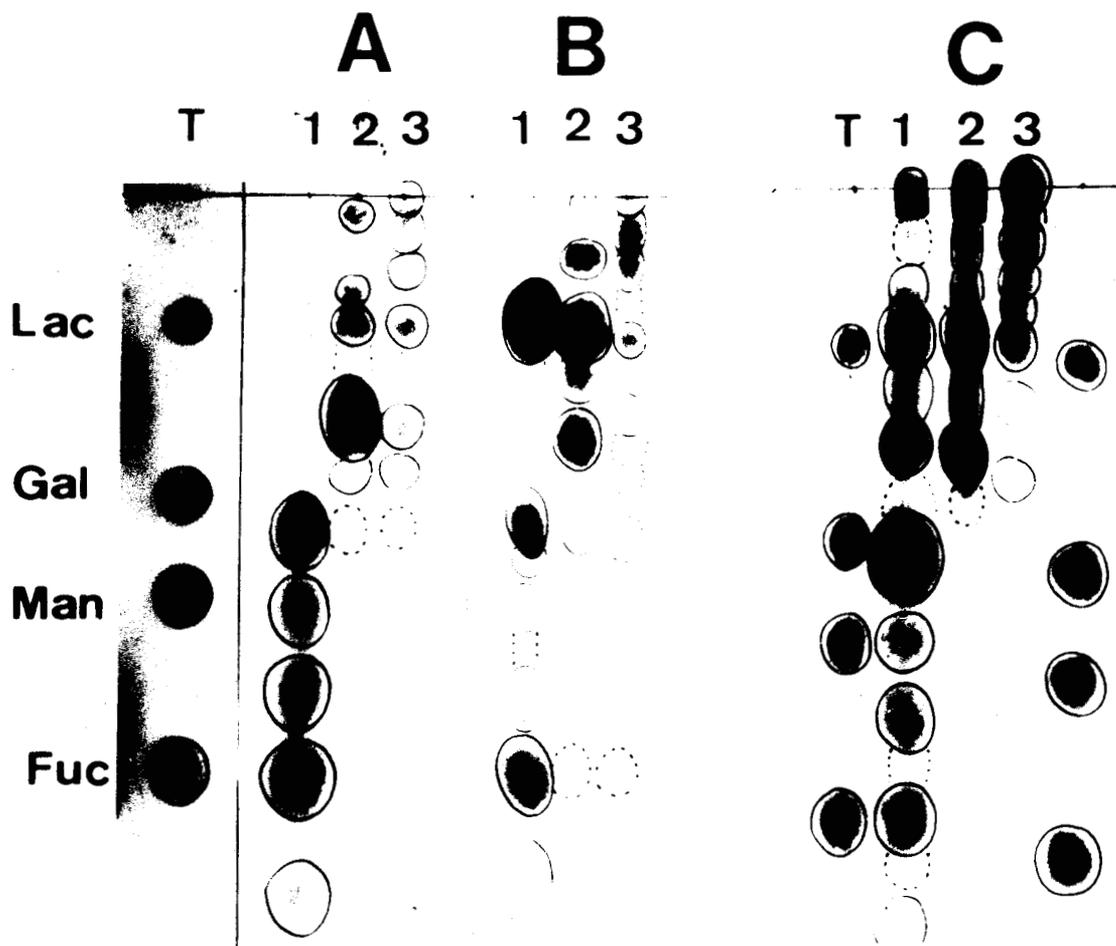


Fig. 11.- Chromatographie sur papier des oligosaccharides désorbés des colonnes de charbon-*Celite*. A et B : urines de sujets sains ; C : urine de mucopolysaccharidose de type II. Conditions de la chromatographie : papier Whatman n° 3 ; système-solvant n° 1 pendant 3 jours ; révélation à l'oxalate d'aniline. 1, 2 et 3 : fractions éluées respectivement par l'éthanol à 3,5 - 7,5 et 50 p. 100.

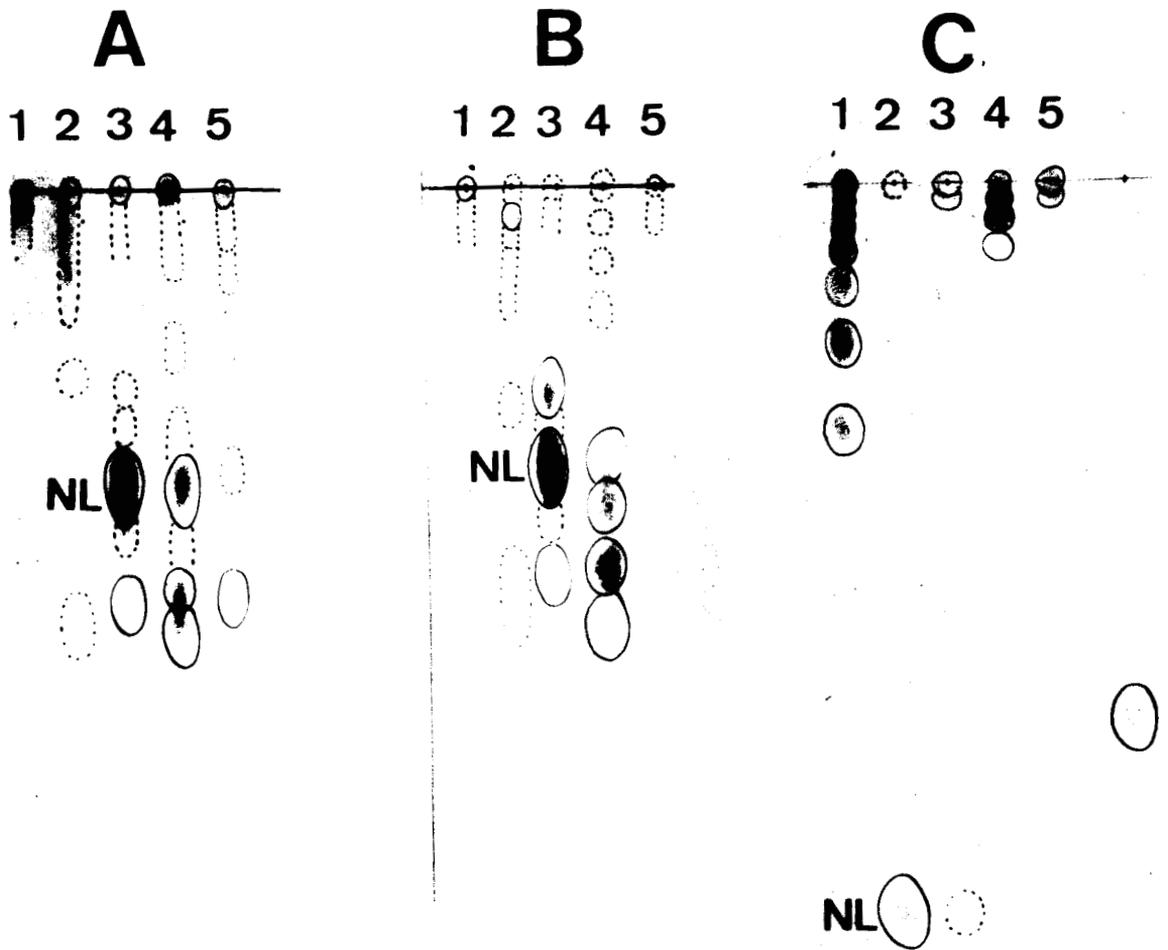


Fig. 12.- Chromatographie des oligosaccharides "acides" élués d'une colonne d'échangeur d'anions (Dowex 1 x 2 ; "mesh" 200-400 ; forme acétate) par une solution d'acétate de pyridine de concentration croissante : 1 : 1 mM ; 2 : 5 mM ; 3 : 10 mM ; 4 : 50 mM ; 5 : 100 mM. A et B : urines normales ; C : urine de mucopolysaccharidose de type II. Conditions de la chromatographie : papier Whatman n° 3 ; système-solvant n° 2. Durée de la chromatographie : 48 h pour A et B ; 4 jours pour C. Les échantillons extraits de l'urine normale sont concentrés 3 fois par rapport à ceux de l'urine de mucopolysaccharidose de type II. NL : N-acétylneuraminyl α 2 \rightarrow 3 lactose.

dans le cas de l'urine du jeune malade et 3000 fois dans le cas de l'urine normale. La comparaison des 2 chromatogrammes montre ainsi que le taux des oligosaccharides riches en acide sialique est environ 10 fois plus élevé dans le cas de la mucopolidose de type II. Toutefois, le taux de sialyl-lactose est identique dans les deux types d'urine.

La chromatographie préparative sur papier nous a permis d'isoler, à partir de 325 ml d'urine, de 2 à 5 mg de 8 oligosaccharides (Fig. 13 A ; p.71). A titre comparatif, il est intéressant de préciser que l'isolement des mêmes quantités d'oligosaccharides à partir d'urine normale nécessiterait de traiter 6 litres d'urine.

L'analyse chromatographique des hydrolysats acides des oligosaccharides de l'urine de mucopolidose de type II montre qu'ils renferment, en proportions variables, de l'acide N-acétylneuraminique, du galactose, du mannose et de la N-acétylglucosamine (Fig. 13 B ; p. 71). Ils sont dépourvus de fucose, contrairement aux oligosaccharides correspondants isolés d'urines normales. Le tableau XI (p. 73) précise les compositions molaires des oligosaccharides ainsi que la nature du glucide réducteur qui est toujours la N-acétylglucosamine,

III - METHYLATION

La méthylation de l'oligosaccharide n° 7 (Tableau XII ; p. 74) conduit à un mélange de 2,3,4,6 tétraméthyl-galactoside, de 2,3,4 tri-méthyl-galactoside, de 3,4,6 tri-méthyl-mannoside, de 2,4 di-méthyl-mannoside et de 3,6 di-méthyl-mannoside. Les faibles quantités de substrat isolé n'ont pas permis de poursuivre l'étude structurale de ce composé. Compte tenu de ce que nous savons de la structure de la plupart des glycannes (Fig. 1 ; p.35), nous pouvons proposer une structure partielle de l'oligosaccharide n° 7, qui est illustrée par la figure 14 (p.72).

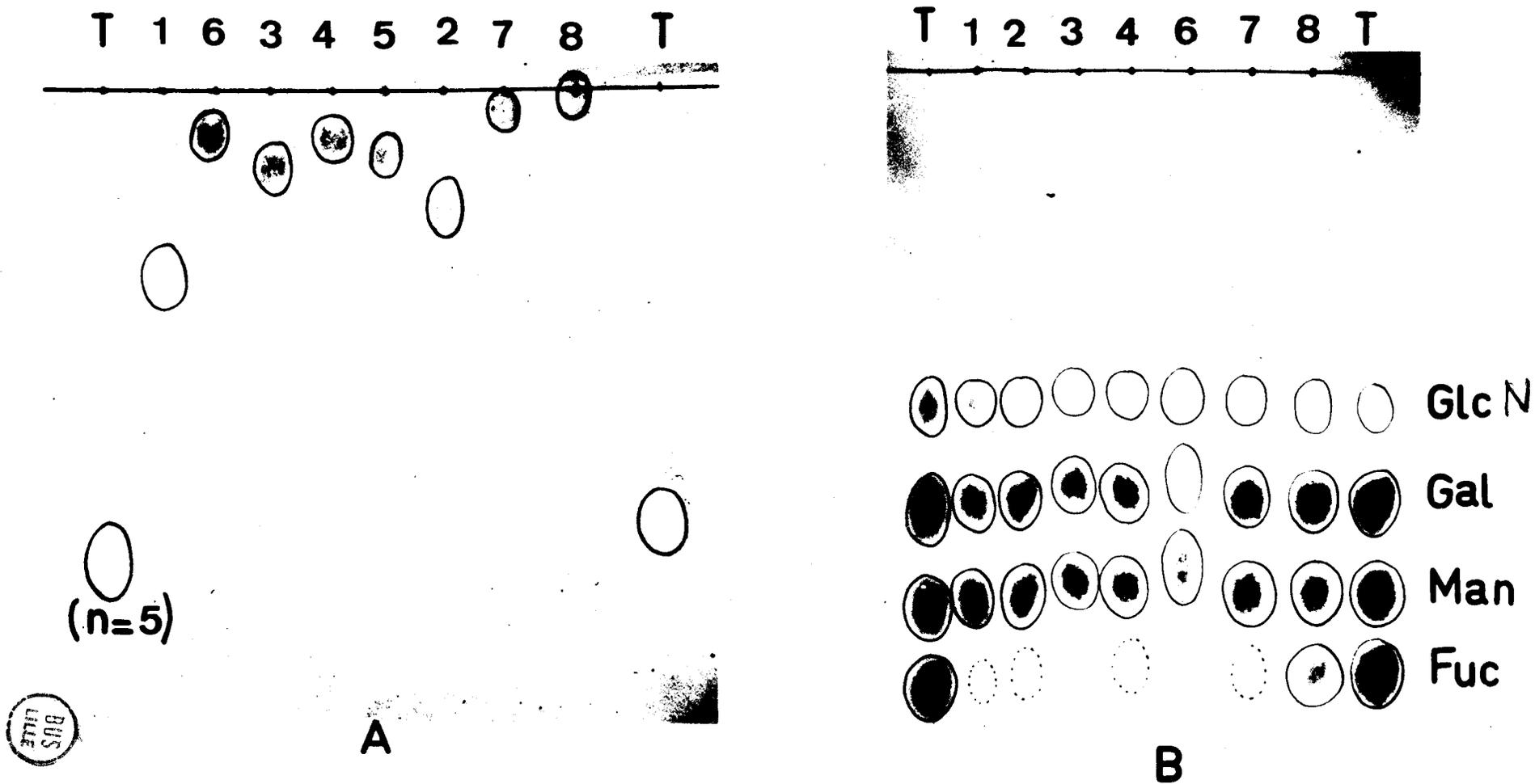


Fig. 13.- Etude des oligosaccharides isolés de l'urine de mucopolidose de type II. A : Chromatographie sur papier des oligosaccharides isolés. B : Chromatographie sur papier des hydrolysats acides de ces mêmes oligosaccharides. Conditions de la chromatographie : papier Whatman n° 3 ; système-solvant n° 2 ; 5 jours pour A et 18 h pour B. Révélation à l'oxalate d'aniline. Le témoin de référence est un pentasaccharide ($R_{Lac} = 0,35$).

TABLEAU XI

CARACTERISTIQUES DES OLIGOSACCHARIDES ISOLES DE L'URINE DE MUCOLIPIDOSE II

Oligosaccharides	Quantités isolées (a)	R_{Lac} (B)	Composition molaire(c)				Nature de l'ose réducteur	Nombre de résidus de monosaccharid
			Gal	Man	GlcNAc	NANA		
1	2,8 mg	0,130	0,96 (1	1,72 2	1,92 2	1 1)	GlcNAc	6
2	1,5 mg	0,088	1,20 (1	2,60 3	2,20 2	1 1)	GlcNAc	7
3	2,5 mg	0,055	1,62 (2	2,60 3	2,91 3	1 1)	GlcNAc	9
4	2 mg	0,032	2,94 (3	2,88 3	3,66 4	1 1)	GlcNAc	11
5	1 mg	0,040	Non déterminé				GlcNAc	
6	2,8 mg	0,033	1,74 (2	2,40 2-3	2,80 3	2 2)	GlcNAc	10
7	5 mg	0,016	2,80 (3	3,14 3	3,70 4	2 2)	GlcNAc	12
8	1,5 mg	0,00	Non déterminé					-

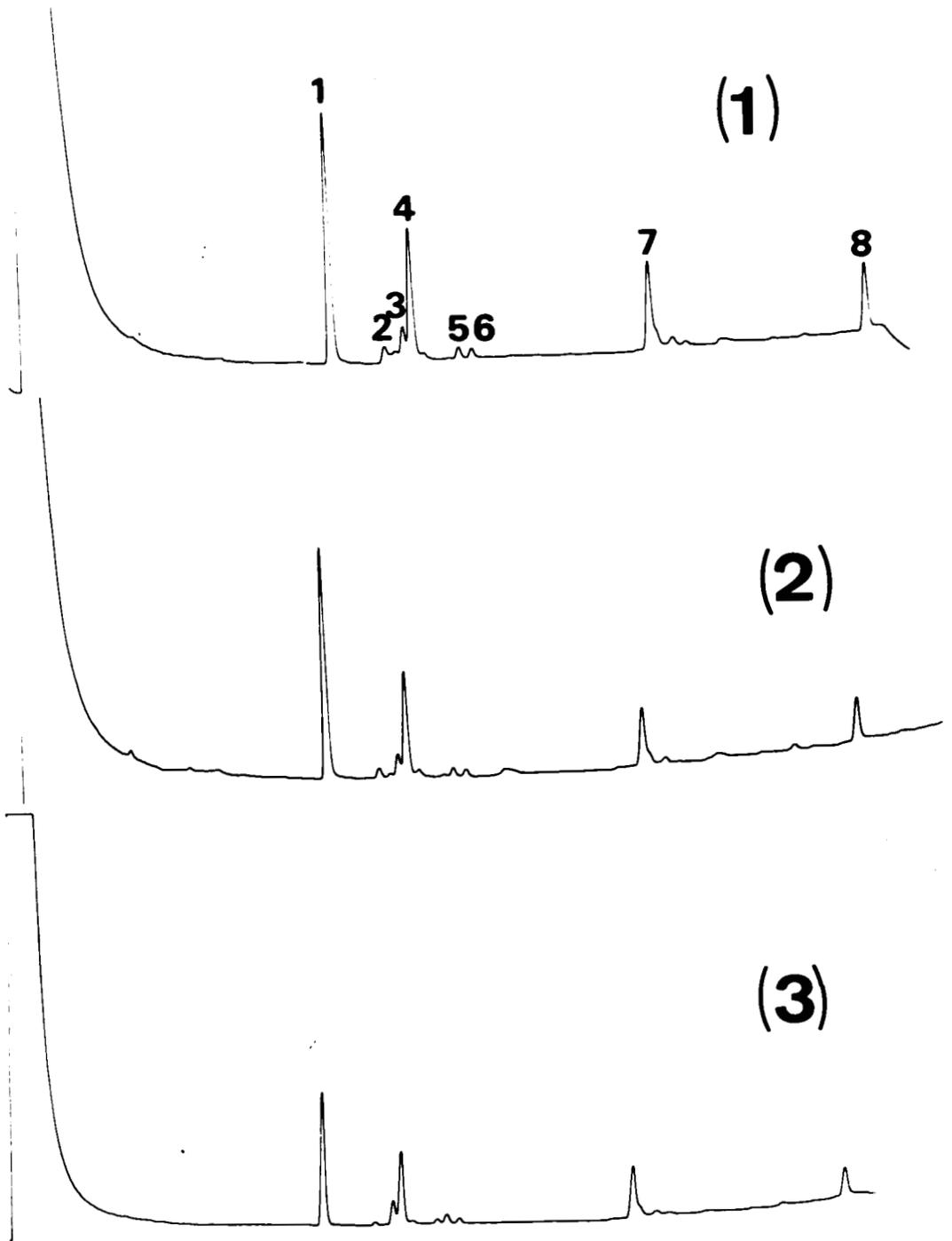
(a) Quantités isolées à partir de 325 ml d'urine. (b) Vitesse de migration par rapport au lactose dans le système-solvant n° 2. (c) Données par rapport à l'acide N-acétylneuraminique, en tenant compte que les oligosaccharides 1 à 4, d'une part, et 5 à 8, d'autre part, possèdent respectivement les vitesses électrophorétiques de mono et de disialyl-dérivés.



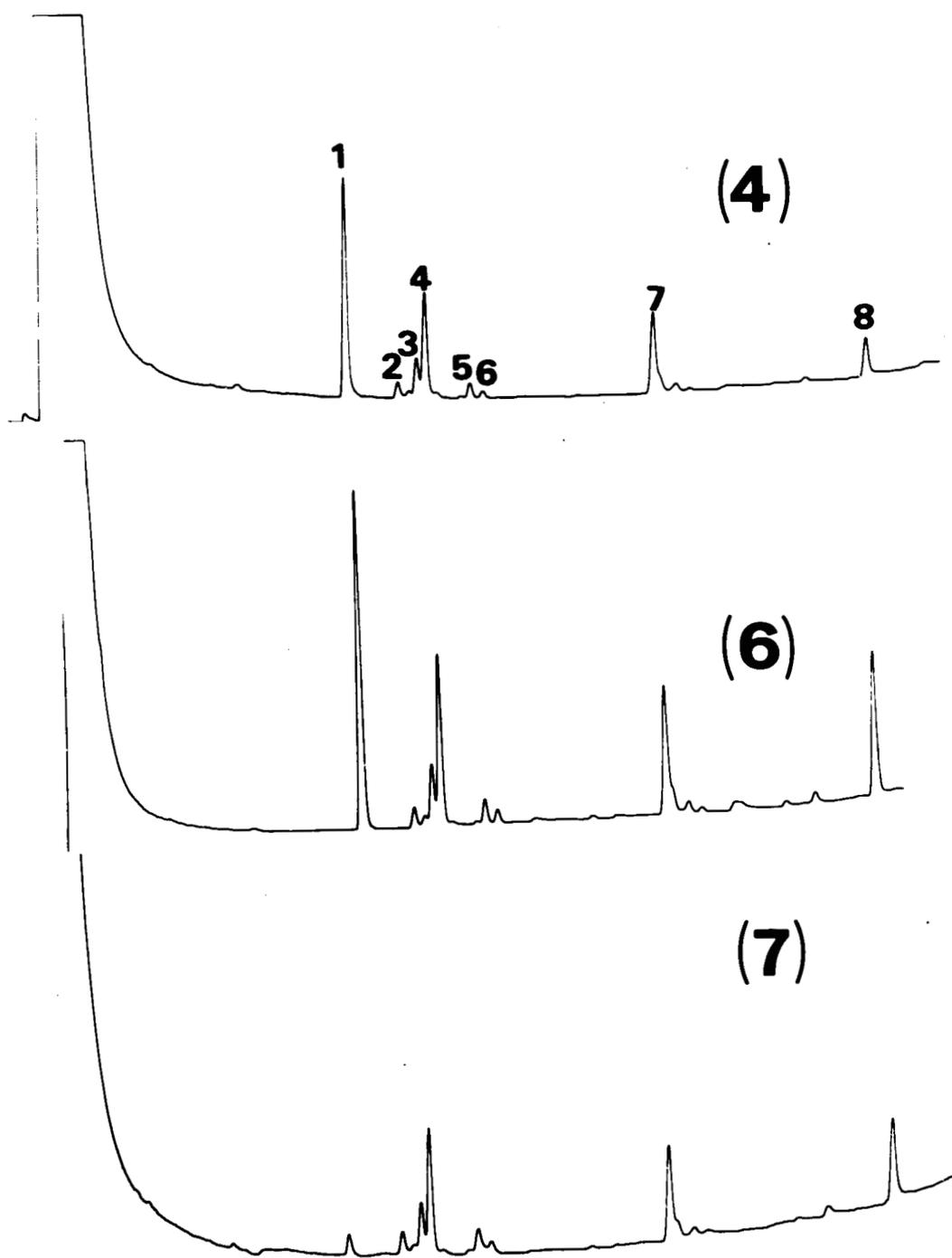
IDENTIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES ESTERS METHYLIQUES
 ET DES MONOSACCHARIDES NEUTRES PRESENTS DANS L'HYDROLYSAT DE
 METHYLATION COMPLETE D'OLIGOSACCHARIDE VII (MUCOLIPIDOSE II)

ESTERS METHYLIQUES	NATURE DES MONOSACCHARIDES		
	Mannose	Galactose	GlcNAc
3,6-di-O-méthyl-mannoside	+		
2,4-di-O-méthyl-mannoside	++		
3,4-6-tri-O-méthyl-mannoside	+++		
2,3,4-tri-O-méthyl-galactoside		++	
2,3,4-6-tetra-O-méthyl-galactoside		+++	





Chromatographie en phase gazeuse des 7 oligosaccharides acides isolés.
1 : Mésoinositol ; 2, 3, 5 : Galactose ; 4, 6 : Mannose ; 7 : N-acétylglucosamine ; 8 : Acide N-acétylneuraminique.



Chromatographie en phase gazeuse des 7 oligosaccharides acides isolés.

1 : Mésoinositol ; 2, 3, 5 : Galactose ; 4, 6 : Mannose ; 7 : N-acétylglucosamine ; 8 : Acide N-acétylneuraminique.



III - DISCUSSION

La mucopolipidose de type II est actuellement caractérisée, du point de vue biochimique, par des anomalies enzymatiques qui portent sur les hydrolyses acides.

Une augmentation du taux des oligosaccharides urinaires provenant du catabolisme des glycoprotéines a été observée par STRECKER et MONTREUIL (223) et NORDEN (224) dans le passé à propos de maladies lysosomales comme la maladie de SANDHOFF-JATZKEWITZ (225) ou comme la mannosidose. En outre, l'accumulation d'oligosaccharides a été récemment observée, dans le foie d'un sujet atteint de gangliosidose à GM₁ par WOLFE *et al.* (226). La mucopolipidose du type II, se caractérise, toutefois, par l'augmentation du taux d'oligosaccharides riches en acide N-acétylneuraminique. Cette observation permet de poser en hypothèse qu'une déficience en neuraminidase peut être ajoutée à la liste déjà longue des anomalies enzymatiques rencontrées dans ce type de maladie. Un tel déficit pourrait d'ailleurs expliquer la "fuite" des enzymes cellulaires vers le sérum des malades ou vers le milieu de culture des fibroblastes. En effet, si l'on se réfère à l'observation de KINT (227) qui a montré, par la technique d'électrofocalisation, que les hydrolases acides du sérum de mucopolipidose II possédaient un point isoélectrique plus bas que celui des enzymes normales correspondantes, nous pouvons souscrire à l'hypothèse de HICKMAN et NEUFELD (228) selon laquelle une inactivation des enzymes interdirait à ces dernières la traversée de la membrane cellulaire vers le cytoplasme. Leur activation serait due à une désialylation d'enzymes de nature glycoprotéinique, modification qui leur permettrait de pénétrer dans les cellules selon un processus identique à celui décrit par PRICER et ASHWELL (229) à propos de plusieurs glycoprotéines sériques.

Enfin, l'étude des oligosaccharides tissulaires ou urinaires de plusieurs maladies lysosomales permet de constater que tous ces constituants possèdent une hexosamine en position réductrice terminale. L'étude des structures ou l'examen des déterminations des rapports molaires en sucres de chacun de ces oligosaccharides montre en outre une séquence terminale réductrice du type $(\text{Man})_n \rightarrow \text{GlcNAc}$, tandis qu'il apparaît de plus en plus que la presque totalité des glycanes de structure connue (oromucoïde, IG_E , sérotransferrine, lacto-transferrine, ovomucoïde, etc...) possèdent une structure pentasaccharidique commune :



Ces observations suggèrent l'existence, dans les tissus humains, d'un endo- β -hexosaminidase qui agit au niveau du chitobiose proche du point d'attache du glycanne avec la protéine, ou le peptide obtenu après action des protéases.

Le catabolisme de la fraction glycanique commencerait donc par la libération d'oligosaccharides libres qui seraient dans un deuxième temps dégradés par l'ensemble des exoglycosidases lysosomales.

Cette hypothèse a d'ailleurs reçu confirmation depuis peu grâce aux travaux de NISHIGAKI, MURAMATSU et KOBATA (230) qui ont caractérisé une endo- β -hexosaminidase dans le foie de Rat.

La figure 15 (p. 79) illustre donc le mécanisme du catabolisme des glycoprotéines tel qu'il ressort de l'étude d'un grand nombre de maladies lysosomales.

A ce schéma doit s'ajouter le fragment
 $\alpha_{1,6} \text{Fuc} \rightarrow \text{GlcNAc} \rightarrow \text{Asn}$, récemment décrit par DAWSON et DURAND (231) (résultats non publiés) dans l'urine de fucosidose.

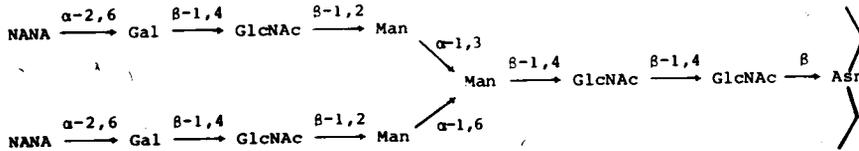
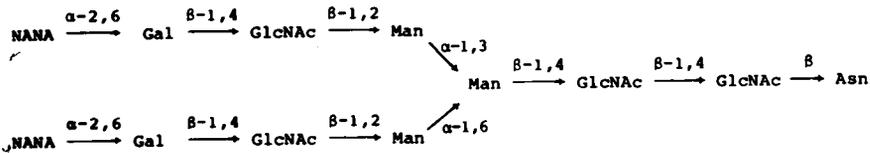
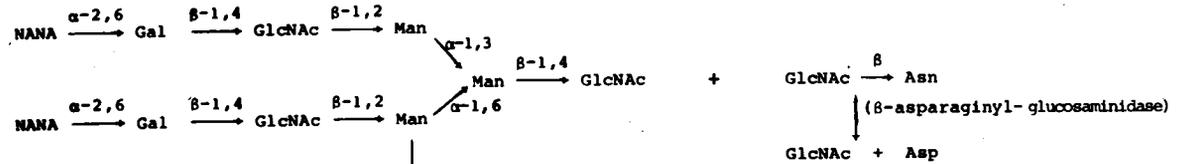


Schéma de structure commune à de nombreuses glycoprotéines (transferrine, sérotransferrine, orosomucoïde, etc...) (Montreuil et coll.)

(Protéinase)



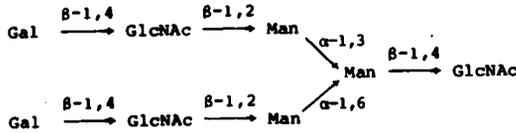
(β-endo-glucosaminidase)



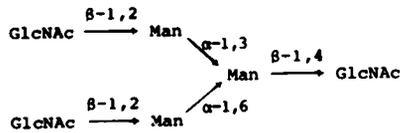
(β-asparaginyl-glucosaminidase)

GlcNAc + Asp

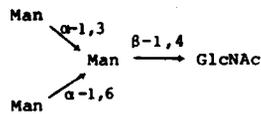
(Neuraminidase)



(β-galactosidase)



(β-glucosaminidase)



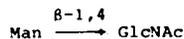
(α-1,6-mannosidase)

(α-1,3-mannosidase)

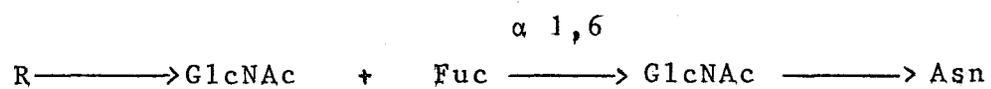
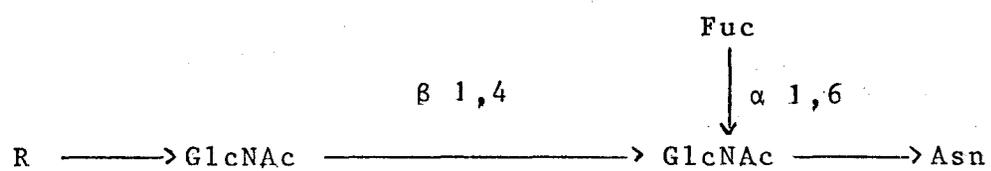


(α-1,3-mannosidase)

(α-1,6-mannosidase)



L'existence de composé prouvé en outre que l'action de la β -endoglucosaminidase agit sur le substrat suivant :



CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les recherches que nous avons effectuées nous ont conduit à mettre en évidence une glycopeptidurie associée à la maladie de Sanfilippo de type A et une oligosaccharidurie associée à la Mucopolipidose II (I Cell disease).

La glycopeptidurie associée à la maladie de Sanfilippo ne peut s'expliquer actuellement par un déficit enzymatique primaire, mais doit plutôt être considérée comme le résultat du dysfonctionnement des lysosomes, dont la surcharge en matériel de nature mucopolysaccharidique inhiberait l'action des protéinases.

Les oligosaccharides riches en acides sialiques isolés de l'urine de mucopolipidose II témoignent pour leur part d'une diminution de l'activité sialidasique tissulaire ; Cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée, par suite de décès prématuré du jeune malade, mais de nombreux arguments, en particulier, la mesure du pHi des différentes enzymes sériques (travaux de KINT) sont en faveur de cette conception.

Les différentes oligosaccharidoses actuellement connues permettent enfin de décrire les différentes étapes du catabolisme des glycoprotéines à liaison Asparaginyl-glucosaminyl, sous l'action successive d'une β -endoglucosaminidase et des exoglycosidases.

BIBLIOGRAPHIE

- AGHION A., Thesis, University of Paris, 1934.
- AUTIO S., NORDEN N., ÖCKERMAN P.A., RIEKKINEN P., RAPOLA J. et LOUHIMO T., Acta Paediat scand, 1973, 62, 555-565 (37)
- ASHFORD T.P. et POTER K.R., J. cell Biol., 1962, 12, 198-202 (12)
- BELCHER R., NUTTENT A.J. et SAMBROOK C.N., Analyst, 1954, 79 201 (193, 216)
- BERGER B., BANMANN N., ESCOUROLLE R., LAUNAY C. et SARRUT S., Acta Neurol. Psychiat. Belg., 1969, 69, 177 (68)
- BIERNAN S.M., EDGINTON T., NEWCOMER V.D. et PEARSON C.M., Arthristis Rheum., 1966, 9, 620-630 (73)
- BRADY R.O., Birth defeets, Orig. Art. Ser 1971, 7, 33-36 (60) in Lysosomes and storage diseases p. 447
- BRADY R.O., GAL A.E., BRADLEY R.M., MARTENSSON E., WARSHAW A.L. et LASTER L., N. Engl. J. Med., 1967, 276, 1163-1167 (18)
- BRADY R.O., KANFER J.N., MOCK M.B. et FREDRICKSON D.S., 1966, Proc. Natl. Acad. Sci. US, 55, 366-369 (17)
- BREWER D.B. et HEATH D., Nature, 1963, 198, 1015-1016 (9)
- BUCHAN J.L. et SAVAGE R.I., Analyst, 1952, 77, 401 (197)
- BRUNNGRABER E.G., BERRA B. et ZAMBOTTI V., Febs Letters, 1973, 34, 350-851 (43)
- BRUNNGRABER E.G., BROWN B.D. et ARO A., J. of Neurochemistry, 1974, 22, 125-128 (47)
- BRUNNGRABER E.G. et BROWN B.G., Biochem. J., 1967, 103, 65-72 (164)
- CALLAHAN J.W. et WOLFE L.S., Biochem. Biophys. Acta, 1970, 215, 527-543 (41, 130, 141)

- CAMPAILLA E. et MARTELLI B., Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1969, 45, 1145-1146 (107)
- CHAKRAPANI B. et BACHHAWAT B.K., Indian. J. Biochem., 1969, 6, 166-168 (181)
- CLAUSEN J., DYGGVE H.V., MELCHIOR J.C. et CHRISTENSEN LOU H.G., Arch. Dis. Childhood, 1970, 42, 62-69 (83)
- CLAUSEN J. et RAMPINI S., Acta Neurol. Scand., 1970, 46, 313-322 (77, 46)
- CROCKER A.C., J. Neurochem., 1961, 7, 69 (59)
- CROCKER G., WAWTER G.F., NEUHAUSER E.B.S. et ROSOWSKY A., Pediatrics, 1965, 35, 627 (61)
- DACREMONT C. et KINT J.A., Clin. chim. Acta, 1968, 21, 421-425 (136)
- DAWSON G. et DURAND P., Résultats non publiés (231)
- DAWSON G., in "Sphingolipids, Spingolipidoses and Allied Disorders" B.W. Volk and S.M., 1972, Aronsoneds, 395-413, Plenum New-York (58)
- DAWSON G. et SPRANGER J.W., N. Engl. J. Med., 1971, 285, 122 (28, 151)
- DEAMS W.Th., In these, 1962, Leiden, 89 (7)
- DEAN M.F., MUIR H. et EWINS R.J.F., Biochem J., 1971, 123-883 (78)
- DE DUVE Ch., Lysosomes in biology and Pathology, 1969, vol. 1, 3-40 (14)
- DE DUVE Ch., Recherche 49, 1974, 815-826 (3)
- DE DUVE Ch., PRESSMAN B.C., GIANETTO R., WATTIAUX R. et APPELMANS F., Biochem. J. 60, 604-617 (1)
- DENT C.E., J. Biochem., 1973, 27, 1824 (194)
- DEMARS J.G. et LEROY R.I., Science, 1967, 157, 360-365 (120)
- DI BENEDETTA C., BRUNNGRABER E.G., WHITNEY G., BROWN B.D. et ARO A., Arch. Biochem. Biophys., 1969, 131, 404-413 (165)
- DI FERRANTE N. et RICH C., Clin. Chem. Acta, 1956, 1, 519-524 (79)

- DISCHE Z., J. Biol. Chem., 1947, 167, 189 (191, 215)
- DORFMAN A. et MATALON R., In the metabolic basics of inherited disease. Ed. J.B. STANBURY ; J.B. WIJNGAARDEN ; D.S. FREDRICKSON. 3e édition MC GRAW HILL New-York, 1972, 1218-1272 (178)
- DUFFY P.E., KORNFELD M.D. et SUZUDI K., J. Neuropathol. Exp. Neurol., 1968, 27, 351 (67)
- DURAND P., PHILIPPART M., BORRONE C., DELLA-CELLA G. et BUGIANI O., Minerva Pediat, 1967, 19, 2187-2196 (34, 148)
- DURAND P., BORRONE C., DELLA-CELLA G. et PHILIPPART M., Lancet, 1968, 11, 1198 (149)
- DYGGVE H.V., MELCHIOR J.C. et CLAUSEN J., Arch. disease childhood, 1962, 37, 525-534 (102)
- ELSON L.A. et MORGAN W.T.J., J. Biochem., 1933, 27, 1824 (211)
- ETO Y. et SUZUDI K., J. Neurochem., 1971, 18, 503 (51)
- ETO Y. et KITAGAWA T., J. Pediat., 1970, 77, 862 (64)
- FISCHER F.G. et NEBEL H.G., Z. Physiol. Chem., 1955, 302, 10 (220, 196, 206)
- FRANSSON L.A. et RUDEN L., J. Biol. chem., 1967, 242, 4161-4169 (171)
- FRANSSON L.A. et RUDEN L., J. Biol. chem., 1967, 242, 4170-4175 (172)
- FREITAC F., KÜCHEMANN K., SCHUSTER W. et SPRANGER J., Virchows. Arch. Abt. B. Zell pathol., 8, 1-15 (108)
- GARDELL S., HEIJENSUOLD F. et ROCHNORLUND A., Acta Chem. Scand., 1950, 4, 970 (208)
- GREGOIRE A., PERIER O. et DUSTIN P. Jr., J. Neuropathol. Exp. Neurol., 1966, 25, 617 (57)
- GREGORY J.D. et RUDEN L., Biochem. Biophys. Res. Commun, 1961, 5, 430-434 (174)
- GREILING H., STUHLSTAZ H.W. et KISTERS R., "In chemistry and molecular biology of the intercellular matrix. Eds. : E.A. BALAZS. Academic Press, London et New-York, vol.II, 1970, 873-877 (177, 181bis, 183)
- GRIMMONPREZ L. et MONTREUIL J., Bull.-Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 843 (201)

- HAKOMORI S. et ANDREWS, Chem. Phys. Lipids, 1970, 5, 96 (159)
- HAKOMORI S. et STRYCHARZ G.D., Biochemistry, 1968, 7, 1279-1286 (155)
- HERS H.G., Biochem. J., 1963, 86, 11-16 (15)
- HERS H.G., Gastro enterology, 1965, 48, 625-633 (16)
- HERS H.G. et VAN HOOFF F., In "carbohydrate Metabolism and its disorders" (F. DICKENS, P.J. RANDLE and W.J. WHELAN, eds.) vol. 2, p. 151, Academic Press New-York, 1968 (26)
- HICKMAN S.C. et NEUFELD E.F., Biochemical et Biophysical Research Communication, 49, 1972, 992-999 (228)
- HOF L., MATALON R. et DORFMAN A., Hoppe-Seyler's, Z. Physiol.-Chem. 1971, 352, 1329-1337 (126)
- HOFFMAN P. et MASHBURN T.A., In chemistry and molecular biology of the intercellular matrix ; BALAZS, Academic Press, London et New-York, 1970, vol. II, 1179-1199 (169)
- HOLLANDER H., J. Neurochem., 1965, 12, 335 (56)
- HOOFT C., SENESAEL L., DELBEKE M.J., KINT J. et DACREMONT G., European Neurol., 1969, 2, 225-241 (138)
- HUBAIN P., ADAM E., DEWELLE A., DRUEZ G., FARRIAUX J.P. et DUPONT A., Helv. Paediat. Acta, 1969, 24, 337-351 (27)
- HUDGSON S., GARDNER-HEDWIN D., WORSFOLD M., PENNINGTON R.J.T. et WALTON J.N., Brain, 1968, 91, 435 (27)
- JACQUES P.J., "In Pathology aspects of cellular membranes" (B.J. TRUMP and A. ARSTILA, eds.) 1972. Academic Press. New-York - London, 1973, p. 150 (4)
- JENNER F.A. et POLLITT R.J., J. Biochem., 1967, 103, 48 (69, 70)
- KAPLAN D., MC KUSICH V., TREBACH S. et LAZARUS R., J. Lab. Clin. Med., 1968, 71, 48-55 (95)
- KIN N.M.K. Ng Ying et WOLFE L.S., Biochem. Biophys. Res. Commun, 1974, 59, 837-884 (46)
- KINT J., Communication personnelle non publiée (227)
- KISTERS R. et GREILING H., I Ve Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, 1967, Oslo, 142 (179)
- KOBATA A. et GINSBURG V., J. Biol. Chem., 1969, 244, 5496 (158)

- KOLODNY E.H., BRADY R.O. et JOLK B.W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1969, 37, 526-531 (24)
- KONNO T., FUJII M., WATANUKI T. et KOIZUMI K., *Tohoku J. Exp. Med.*, 1966, 90, 375 (62)
- KRESSE H. et NEUFELD E.F., *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, 2164-2170 (112)
- KYRIAKIDE E.C., FILIPPONE N., PAUL B., GRATTAN W. et BALINT J.A., *Pediatrics*, 1970, 46, 431 (65)
- LEDEN R., *J. Amer. Oil chem. Soc.*, 1965, 43, 57-66 (81)
- LEROY J.G. et DEMARS R.I., *Science*, 1967, 157, 360-365 (117, 118)
- LEROY J.G. et DEMARS R.I., *Science*, 1967, 157, 804-806 (125)
- LEROY J.G. et CROCKER A.C., "In born disorders of Sphingolipid metabolism, Eds. : S.M. ARONSON et WOLK B.W., Pergamon Press; New-York, 1967, 455-473 (119)
- LEROY J.G., SPRANGER J.W., FEINGOLD M., OPITZ J.M. et CROCKER A.C., *J. Pediat.*, 1971, 79, 360-365 (123)
- LOEB H., TONDEUR M., JONNIAUX G., MOCKEL-POHL S. et VAMOS-HURWITZ E., *Helv. Paediat. Acta*, 1969, 24, 519-537 (30, 33, 145)
- LOUGH J., FAWCETT J. et WIEGENSBURG B., *Arch. Pathol.*, 1970, 89, 103 (6)
- MALLEVAIS-GOUBET B., SPIK G., LOIEZ-HENNETTE A., STRECKER G., VAILLANT-DELACROIX F. et MONTREUIL J., *Clin. Chim. Acta*, in press (187, 212)
- MARGOLIS R.K. et MARGOLIS R.U., *Biochemistry*, 1970, 9, 4389-4395 (166)
- MAROTEAUX P., *Rev. Europ. Etudes clin. Biol.*, 1970, 15, 203-205 (93, 114)
- MAROTEAUX P., Luxembourg, mai 1972, Communication (99)
- MAROTEAUX P., HORS-CAYLA M.C. et PONT J., *Presse Med.*, 1970, 78, 179-181 (122)
- MAROTEAUX P. et HORS-CAYLA M.C., *Ann. Biol. Clin.*, 1970, 28, 111-114 (88)
- MAROTEAUX P. et LAMY M., *J. Pediat.*, 1965, 67, 312-323 (92)
- MAROTEAUX P. et HORS-CAYLA M.C., *Ann. Biol. Clin.*, 1970, 28, 111-114 (115)
- MARTENSON E., PERCY A. et SVENNERHOLM L., *Acta Paediat. Scand* 1966 55, 1 (53)
- MATALON R. et DORFMAN A., A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 1966, 56, 1310-1316 (111)

- Mc KUSICK V.A., KAPLAN D., WISE D., HANLEY W.B., SUDDARTH S.B., SEVICK M.E. et MAUMANEE A.E., *Medicine*, 1965, 44, 445-483 (87, 90, 91)
- Mc KUSICK V.A., *Am. J. Med.*, 1969, 47, 730-747 (80, 104)
- Mc KUSICK V.A., HOWELL R.R., HUSSELS I.E., NEUFELD E.F. et STEVENSON R.E., *Lancet*, 1972, 1, 993-996 (101)
- MATALON R., CIFONELLI J.A., ZELLWEGER H. et DORFMAN A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 1968, 59, 1097-1102 (121)
- MEIJER A.E.F. et WILLIGHAGEN R.G.J., *Biochem. Pharmacol.*, 1963, 12, 973-980 (11)
- MEYER K., *Am. J. Med.*, 1969, 47, 664-672 (170)
- MEYER K., BHAVANANDAN V.O., YUNG D., LEE L.T. et HOWE C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 1967, 58, 1655-1659 (176)
- MICHL H., *Monatsh. Chem.*, 1951, 82, 489 (200, 218)
- MONTREUIL J. et SPIK G., *Monog. II, Lab. Chim. Biol.*, 1968, *Fac. Sci. Lille* (190, 214, 216bis)
- MONTREUIL J., *Pure and Applied Chem.*, 1975 (sous presse) (186)
- MOSER H.W., PRENSKY A.L., WOLFE H.J. et ROSMAN N.P., *Am. J. Med.*, 1969, 47, 869-890 (75)
- MUIR H., In "Lysosomes and Storage Diseases", Eds H.G. HERS et F. VAN HOOFF, 1973, Academic Press, New-York (163, 168, 173, 184)
- MURPHY J.V., WOLFE H.J., BALAZS E.A. et MOSER H.W., In "Lipid Storage Diseases. Enzymatic defects and clinical implications", Eds J. BERNSOHN et H.J. GROSSMAN, 1971, Academic Press, New-York, 67-110 (162)
- NISHIGAKI M., MURAMATSU T. et KOBATA A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, 2, 638-645 (230)
- NORDEN N.E., LUNDBLAD A., SWENSSON S., ÖCKERMAN P.A. et AUTIO S., *J. Biol. Chem.*, 1973, 248, 6210-6215 (36, 224)
- NORTON W.T. et PODUSLO S.E., In "Variation in the Chemical Composition of the Nervous System", Ed., G.B. ANSELL, 1966 Pergamon, Oxford, p. 82 (52)
- NOVIKOFF A.B., ESSNER E. et QUINTANA N., *Fed. Proc.*, 1964, 23, 1010-1022 (2)
- NOVIKOFF A.B. et ESSNER E., *J. Cell Biol.*, 1962, 15, 140-146 (13)
- O'BRIEN J. et SAMPSON E.L., *Science*, 1965, 150, 1613 (55)

- O'BRIEN J.S., STERN M.B., LANDING B.H., O'BRIEN J.K. et DONNELL G.N., Am. J. Diseases Childhood, 1965, 109, 338-346 (133)
- ÖCKERMAN P., J. Pediat., 1969, 75, 360-365 (153)
- ÖCKERMAN P.A., J. Pediat., 1970, 77, 168-169 (160)
- ÖCKERMAN P.A., Lancet, 1967, 2, 239-241 (21)
- ÖCKERMAN P.A., Lancet, 1969, 1, 734 (152, 154)
- ÖCKERMAN P.A., NORDEN N.E. et SZABO L., Adv. Exp. Med. Biol., 1972, 25, 281 (35)
- ÖCKERMAN P.A. et NORDEN N.E., Symposium, Milan, Juillet 1971, Plenum Press, New-York (161)
- OKADA S. et O'BRIEN J.S., Science, 1969, 165, 698-700 (23)
- PALO J. et SAVOLAINEN H., J. Chromatogr., 1972, 65, 447 (72)
- PALO J. et SAVOLAINEN H., Clin. Chim. Acta, 1972, 36, 431 (71)
- PARTRIDGE S.M., Biochem. Soc. Symp., 1950, 3, 52 (198, 202, 207, 221)
- PARTRIDGE S.M., J. Biochem., 1948, 42, 238 (195, 219)
- PHILIPPART M., XXIIe Congr. Ass. Pediat. Langue Franç., Strasbourg, Proc., 1969, 3, 5-41 (32, 150)
- PHILIPPART M., In "Rein et Foie, Maladies de la Nutrition", 1966, 9, 245-249 (82)
- PHILIPPART M., SARLIEVE L., MEURANT C. et MECHLER L., J. Lip., 1971, 12, 434 (54)
- PHILIPPART M. et SUGARMAN G.I., Lancet, 1969, 2, 854 (106)
- PRENSKY B., FERREIRA G., CARR G. et MOSER H.W., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 126, 725-728 (20, 74)
- PRICER W.E. et ASHWELL G., J. Biol. Chem., 1971, 246, 4825-4833 (229)
- RIMINGTON C., Biochem. J., 1931, 25, 1092 (189, 189bis)
- ROBINSON D. et STIRLING J.L., Biochem. J., 1968, 107, 321-327 (22)

- RODEN L., In "Chemistry and Molecular Biology of Intercellular Matrix", Ed. E.A. BALAZS, 1970, Academic Press, New-York, 11, 797-821 (182)
- SACREZ R., JUIF J.G., GIGONNET J.M. et GRUNER J.E., *Pediatric*, 1967, 22, 143-162 (134)
- SANDHOFF K.A. et JATZKEWITZ H., *Pathol. Eur.*, 1968, 3, 278 (225)
- SANFILIPPO S.J., PODOSIN R., LANGER L. et GOOD R.A., *J. Pediat.*, 1963, 63, 837-838 (97)
- SARTORELLI C., *Lancet*, 1968, 2, 737-738 (94)
- SENO N., MEYER K., ANDERSON B. et HOFFMAN P., *J. Biol. Chem.*, 1965, 240, 1005-1010 (175)
- SERINGE Ph., PLAINFOSS B., LAUTMANN F., LORILLOUX J., CALAMY G., BERRY J.P. et WATCHI J.M., *Soc. Med. Hôp.*, Paris, 1968, 119, 685-704 (135)
- SEVERI F., MAGRINI U., TETTAMANTI G., BIANCHI E. et LANZI G., *Helv. Paediat. Acta*, 1971, 26, 192-209 (142)
- SIKOTOS A.N., WATANABE I., SAITO A. et FLEISCHER S., *Biochem. Med.*, 1970, 4, 361 (66)
- SPRANGER J., *Ergeb Inner Med, Kinderheilk*, 1972, 32, 166-246 (96, 98)
- SPRANGER J.W. et WIEDMANN H.R., *Neuropädiat.*, 1970, 2, 3-16 (89, 116)
- SPRANGER J.W., SCHUSTER W. et FREITAG F., *Helv. Paediat. Acta*, 1971, 26, 387-396 (109)
- SPIK G., STRECKER G. et MONTREUIL J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1969, 51, 1287 (204)
- STRECKER G. et MONTREUIL J., *J. Clin. Chim. Acta*, 1971, 33, 395-401 (45, 223)
- SUSCHKE J. et KUNZE D., *Dtsch. Med. Wschr.*, 1971, 96, 1941-1943 (110)
- SUZUKI K., In "Inborn disorders of sphingolipid metabolism", Eds S.M. ARONSON et B.W. WOLK, 1967, pp. 225-230 (84)
- SUZUKI K., *Science*, 1968, 159, 1471-1472 (38, 127, 131, 137)
- SUZUKI K., SUZUKI K. et KAMOSHITA S., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1969, 28, 25-73 (42, 128, 132, 140, 144)
- SUZUKI K., SUZUKI J., RAPIN I., SUZUKI Y. et ISHII N., *Neurology*, 1970, 20, 190 (44)

- SUZUKI Y., CROCKER A.C. et SUZUKI K., Arch. Neurol., 1971, 24, 58-64 (143)
- SWEELEY C.C. et KLIONSKY B., J. Biol. Chem., 1963, 238, 3148-3150 (48)
- TERHO T.T. et HARTIALA K., Analytical Biochemistry, 1971, 41, 471-476 (210)
- THOMPSON G.R., NELSON N.A. et GROBELNY S.L., Arthritis Rheumat, 1968, 11, 516 (105)
- TILLMANS J. et PHILIPPI K., Biochem. Z., 1928, 215, 36 (188, 213)
- TONDEUR M., VAMOS-HURWITZ E., MOCKEL-POHL S., DE REUME J.P., CREMER N. et LOEB H., J. Pediat., 1971, 79, 366-378 (124)
- TREVELYAN W.E., PROTER D.P. et HARRISON J.S., Nature, 1950, 166, 444 (199)
- TSAY G.Ch. et DAWSON G., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1973, 52, 759-766 (39)
- TSIGANOS C.P., HARDINGHAN T.E. et MUIR H., Biochim. Biophys. Acta, 1971, 229, 529-534 (167)
- TSIGANOS C.P. et MUIR H., In "Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix", Ed. E.A. BALAZS, Academic Press, New-York, 1970, Vol. II, p. 859-866 (166bis)
- UZMAN L. et FARBER S., Amer. J. Diseases Childhood, 1952, 84, 499 (76)
- VAN HOOFF F., Thèse d'Agrégation de l'Enseignement Supérieur, 1972, Fac. Med. Univ. Cathol. Louvain p. 34-38 (5, 86, 157, 185)
- VAN HOOFF F. et HERS G.H., Eur. J. Biochem., 1968, 7, 34-44 (31, 129, 147)
- VAN HOOFF F. et HERS G.H., In "Lysosomes and Storage Diseases", 1973, Academic Press, New-York, p. 151 (25)
- VAN HOOFF F. et HERS G.H., Lancet, 1968, 1, 1198 (29)
- VERITY A.M.D., Annals of Internal Medicine, 1973, 78, 725-738 (6)
- VOELZ C., TOLKSDORF M., FREITAG F. et SPRANGER J., Mschr. Kinderheilk, 1971, 119, 352-355 (146)
- VON FIGURA K. et KRESSE H., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, 48, 262-269 (113)
- WALLIS K., GROSS M., KOHN R. et ZAIDMAN J., Helv. Paediat. Acta, 26, 98 (19)

- WARDI A.H., ALLEN W.S., TURNER D.L. et STARY Z., Arch. Biochem. Biophys., 1966, 117, 44-53 (180)
- WATKINS W.M. et MORGAN W.T.J., Nature, 1957, 180, 1038-1040 (156)
- WATTIAUX R., These, 1966, Gembloux, 149 (10, 8)
- WERNER J. et ODIN L., Acta Soc. Med. Upsaliensis, 1952, 57, 230 (192, 217)
- WHERRETT J.R. et HAKOMORI S.I., J. Biol. Chem., 1973, 248, 3046-3051 (49)
- WHERRETT J.R., Pathol. Eur., 1968, 3, 431-439
- WHISTLER R.L. et DURSO D.F., J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 677 (203)
- WIEDMANN U. et NEUFELD E.F., Science, 1970, 169, 72-74 (100)
- WOLFE L.S., SENIOR G.R. et NG YING KIN N.M.K., J. Biol. Chem., 1974, 249, 1828-1838 (40, 226)
- ZANETTA J.P., BRECKENRIDGE W.C. et VINCENDON G., J. Chromatog., 1972, 69, 291-304 (222)

