

50376  
1978  
133

n° d'ordre : 707

50376  
1978  
133

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

## MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DE LILLE 1

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

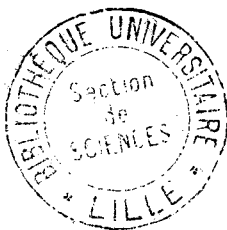
en Biochimie

par

Jean Claude MICHALSKI

DESCRIPTION D'UN NOUVEAU GROUPE DE MALADIES HEREDITAIRES  
DU CATABOLISME DES GLYCOPROTEINES :

LES SIALIDOSES



Soutenu le 30 juin 1978, devant la commission d'examen

Président :	M.	J.	MONTREUIL
Rapporteur :	M.	R.	BOURRILLON
Examineurs :			
	MM.	J.P.	FARRIAUX
		B.	FOURNET
		G.	STRECKER

Ces travaux ont été réalisés sous la direction de Monsieur Gérard STRECKER, Maître de Recherches au C.N.R.S., dans les laboratoires de Chimie Biologique du Professeur Jean MONTREUIL, à l'Université des Sciences et Techniques de Lille I (Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 217 "Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués" ) et 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).

Je remercie Monsieur le Professeur J. MONTREUIL, pour l'honneur qu'il m'a fait en m'acceptant dans son Laboratoire et pour m'avoir permis de réaliser ce travail. Qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur G. BISERTE, Directeur de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille pour m'avoir accueilli pendant près de deux ans dans son établissement.

Monsieur G. STRECKER, qui m'a ouvert la voie enrichissante de la recherche scientifique et qui m'a guidé dans ce travail avec le dynamisme, l'enthousiasme et la bonne humeur qui l'animent constamment. Qu'il me soit permis de lui témoigner ici, toute ma gratitude et mon attachement.

Monsieur le Professeur R. BOURRILLON, Professeur de Chimie Biologique à l'Université de Paris 7, qui m'a fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse.

Monsieur le Professeur J.P. FARRIAUX pour l'intérêt et l'aide qu'il a apporté à la réalisation de ce travail.

Nous exprimons nos plus vifs remerciements :

à Messieurs les Professeurs P. DURAND, P. MAROTEAUX, M. POISSONNIER, J. SPRANGER, R. VERGER, FONTAN et A. FEDERICO qui nous ont aimablement fourni les échantillons biologiques indispensables à la réalisation de ce travail,

à Monsieur le Professeur B. FOURNET qui nous a fourni les dérivés méthylés témoins nécessaires à l'établissement des structures glycaniques,

à Mademoiselle le Professeur G. SPIK et Monsieur S. BOUQUELET pour leurs préparations enzymatiques,

à Monsieur le Professeur J.F.G. Vliegenthart et Messieurs L. DORLAND et J. HAVERKAMP qui ont réalisé l'étude de résonance magnétique nucléaire des sialyl-oligosaccharides,

à Mesdames A. LEMAIRE, A.F. BOUQUELET et Monsieur Y. LEROY pour leur précieuse collaboration technique,

à Mademoiselle B. MAHIEU et Mesdames J. CELEN et GARET pour l'aide apportée à la présentation de la thèse.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	p. 1
GÉNÉRALITES	p. 6
<b>1. - LE CONCEPT DE MALADIE LYSOSOMIALE</b>	p. 7
I - LE LYSOSOME	p. 7
II - PATHOLOGIE LYSOSOMIALE	p. 10
III - ROLE DES GLYCOSIDASES DANS LA PATHOLOGIE LYSOSOMIALE	p. 14
<b>2. - MALADIES HEREDITAIRES DE SURCHARGE LYSOSOMIALE DES GLYCOCONJUGUES</b>	p. 21
I - GÉNÉRALITÉS	p. 21
II - LES MUCOPOLYSACCHARIDOSES	p. 21
III - MALADIES PAR SURCHARGE EN GLYCOSPHINGOLIPIDES	p. 27
IV - LES GLYCOPROTÉINOSES	p. 30
V - LES MUCOLIPIDOSES	p. 42
TRAVAUX PERSONNELS	p. 66
<b>1. - MISE EN EVIDENCE D'UNE SIALYL-OLIGOSACCHARIDURIE ASSOCIEE AUX MUCOLIPIDOSES I, II, III ET A DEUX NOUVEAUX TYPES DE MUCOLIPIDOSES</b>	p. 67
I - MATÉRIEL ET MÉTHODES	p. 67
II - RÉSULTATS	p. 70
<b>2. - STRUCTURE DES 12 PRINCIPAUX SIALYL-OLIGOSACCHARIDES ISOLES DE L'URINE DE MUCOLIPIDOSE TYPE I</b>	p. 76

I - MATÉRIEL ET MÉTHODES	p. 76
II - RÉSULTATS	p. 79
III - CONCLUSIONS	p. 97

<b>3. - MISE EN EVIDENCE D'UN DEFICIT EN <math>\alpha</math>-NEURAMINIDASE ASSOCIE AUX DIFFERENTES MUCOLIPIDOSES</b>	p. 103
--	--------

I - MATÉRIEL ET MÉTHODES	p. 104
II - RÉSULTATS	p. 108

<b>4. - DISCUSSION</b>	p. 117
------------------------	--------

<b>5. - CONCLUSION</b>	p. 125
------------------------	--------

APPENDICE TECHNIQUE	p. 128
---------------------	--------

BIBLIOGRAPHIE	p. 139
---------------	--------

## INTRODUCTION

L'étude des maladies de surcharge lysosomiale remonte au début du siècle, au moment où GAUCHER, TAY, SACHS, FABRY, NIEMANN, HUNTER, HURLER décrivaient les premières maladies auxquelles leur nom est resté attaché. Les premières études purement anatomiques et histologiques mirent en évidence des cellules vacuolées, gonflées de matériel non dégradé, d'où le nom de "thésaurismoses" qui fut attribué à ces maladies. Mais très vite les chimistes s'intéressèrent à la nature du matériel accumulé, étant donné l'intérêt que revêtait l'élucidation de la structure de ces composés pour l'établissement du diagnostic et de l'étiopathogénèse de la maladie. La nature du matériel accumulé dans l'urine, en particulier, reflète de façon exacte les catabolismes anormaux mis en cause dans chacune de ces maladies.

Notre travail s'inscrit dans le cadre de l'étude des oligosaccharides urinaires excrétés dans les cas de "glycoprotéinoses".

Notre contribution personnelle à ce travail repose sur l'étude des oligosaccharides urinaires excrétés dans des cas de Mucopolidoses de type I, II et III, ainsi que dans deux nouveaux types de Mucopolidose : Mucopolidoses De P. et W. Ces travaux font suite aux études préliminaires de T. HONDI-ASSAH et G. STRECKER, qui avaient mis en évidence une sialyl-oligosaccharidurie associée à la mucopolidose II et avaient posé l'hypothèse que cette maladie était due à une déficience primaire en  $\alpha$ -neuraminidase.

La première partie de notre travail a donc consisté à l'établissement de la structure précise des 12 oligosaccharides principaux accumulés dans ces urines.

La seconde partie de notre travail a consisté en la mise au point d'un procédé original et très sensible de dosage de l'activité  $\alpha$ -neuraminidasique,

directement applicable aux homogénats cellulaires bruts, en vue d'une éventuelle forme de diagnostic.

Nous préciserons les résultats d'ordre enzymatique obtenus sur les leucocytes et fibroblastes de différents malades.

Nous essayerons de relier ces données à la pathologie des Mucopolidoses, et d'expliquer en particulier, les multiples anomalies enzymatiques rencontrées dans les Mucopolidoses de type II et type III.

Nous replacerons enfin ces données d'ordre structural et enzymatique par rapport à nos connaissances actuelles sur la structure et le catabolisme des glycoprotéines.

Nous ferons précéder l'exposé de nos travaux personnels par de brefs rappels sur les acquisitions récentes quant à la structure des glycoprotéines, ainsi que sur la pathologie des maladies de surcharge lysosomiale et en particulier les glycoprotéinoses.

Ce travail a fait l'objet des communications et publications suivantes :

## I - COMMUNICATIONS

### 1 - G. STRECKER, M-C. PEERS, J-C. MICHALSKI, B. FOURNET et J. MONTREUIL

Structure de 28 oligosaccharides et glycopeptides excrétés dans les urines de sujets atteints de diverses glycoprotéinoses : mannosidose, fucosidose, maladie de SANDHOFF, mucopolidose type II et deux nouveaux types de mucopolidose.

Journées Franco-Belges de Biochimie, Villeneuve d'Ascq, 24-26 juin 1976 et VIème Journées sur la Chimie et la Biochimie des Glucides, Grenoble, 23-25 septembre 1976

### 2 - J-C. MICHALSKI et G. STRECKER

Déficiencie en  $\alpha$ -neuraminidase associée aux mucopolidoses II et III et à deux nouveaux types de mucopolidose.



Journées Franco-Belges de Biochimie, Villeneuve d'Ascq, 24-26 juin 1976 et  
VIème Journées sur la Chimie et la Biochimie des Glucides, Grenoble, 23-25  
septembre 1976

- 3 - J-C. MICHALSKI et G. STRECKER

Radiodosage de la neuraminidase dans les tissus et dans les liquides biologiques.

Réunion internationale sur les Oligosaccharidoses, Lille, 3 décembre 1976

- 4 - G. STRECKER, J-C. MICHALSKI, M-C. PEERS et J-P. FARRIAUX

Catabolisme normal et pathologique des glycoconjugués.

Société de Médecine du Nord, 28 janvier 1977

- 5 - P. DURAND, R. GATTI, S. CAVALIERI, J-C. MICHALSKI and G. STRECKER

Sialidosis type I

Congrès de la Société Européenne pour la recherche en Pédiatrie, Venise,

7-10 septembre 1977

- 6 - G. STRECKER, J-C. MICHALSKI, M-C HERLANT-PEERS, B. FOURNET and J. MONTREUIL

Structure of 40 oligosaccharides and glycopeptides accumulating in the urine from patients with catabolism defects of glycoconjugates (sialidosis, fucosidosis, mannosidosis and SANDHOFF disease).

Fourth International Symposium on Glycoconjugates, Woods Hole (Mass. U.S.A.),

September 27, October 1, 1977

- 7 - J-C. MICHALSKI et G. STRECKER

Les Sialidoses

Société de Chimie Biologique, Forum des Jeunes, Oullins, 6-8 juillet 1977

- 8 - G. STRECKER, J-C. MICHALSKI, M-C. HERLANT-PEERS, B. FOURNET et J. MONTREUIL

Structure de 40 oligosaccharides et glycopeptides accumulés dans les urines de malades atteints d'un défaut du catabolisme des glycoconjugués (sialidose, fucosidose, mannosidose et maladie de SANDHOFF).

VIIème Journées sur la Chimie et la Biochimie des Glucides, Pont-à-Mousson,

24-26 octobre 1977

II - MEMOIRES

- 1 - G. STRECKER, J-C. MICHALSKI, J. MONTREUIL et J-P. FARRIAUX  
Deficit in neuraminidase associated with Mucopolipidosis II (I-Cell disease)  
Biomed. Exp., 1976, 25, 238-240
- 2 - G. STRECKER, M-C. PEERS, J-C. MICHALSKI, T. HONDI-ASSAH, B. FOURNET, G. SPIK,  
J. MONTREUIL, J-P. FARRIAUX, P. MAROTEAUX and P. DURAND  
Structure of nine sialyl-oligosaccharides excreted in urine of eleven  
patients with three different types of sialidosis  
Europ. J. Biochem., 1977, 75, 391-403
- 3 - J-C. MICHALSKI, G. STRECKER, B. FOURNET, M. CANTZ and J. SPRANGER  
Structure of sialyl oligosaccharides excreted in the urine of a patient with  
mucopolipidosis I  
FEBS-Letters, 1977, 79, 101-104
- 4 - J-C. MICHALSKI et G. STRECKER  
Une nouvelle méthode de dosage de l'activité  $\alpha$ -neuraminidasique appliquée  
au dosage des sialidoses, in J.P. FARRIAUX, Les oligosaccharidoses, Crouan  
et Roques éd., Lille, 1977, 133-136
- 5 - P. DURAND, R. GATTI, S. CAVALIERI, M. TONDEUR, J-C. MICHALSKI and G. STRECKER  
Sialidosis type I  
Helv. Paediat. Acta, 1977, 32, 391-400
- 6 - G. STRECKER and J-C. MICHALSKI  
Biochemical basis of sialidosis  
FEBS-Letters, 1978, 85, 20-25

III - MEMOIRES ACCEPTES POUR PUBLICATION

- 7 - G. STRECKER, J-C. MICHALSKI, M-C. HERLANT-PEERS, B. FOURNET and J. MONTREUIL  
Structure of 40 oligosaccharides and glycopeptides accumulating in the urine  
from patients with catabolism defect of glycoconjugates (sialidosis, fucosi-  
dosis, mannosidosis and SANDHOFF disease)

Proc. 4th Int. Symp. on glycoconjugates, Woods Hole, 27 september-1 october  
1977, academic Press éd., New-York

- 8 - A. FEDERICO, G-C. GUAZZI, APPONI, J-C. MICHALSKI and G. STRECKER

Sialyl oligosacchariduria : a new type of metabolic disease of glycoprotein  
metabolism

J. Neurol. Sciences

- 9 - L. DORLAND, J. HAVERKAMP, J.F.G. Vliegenthart, G. STRECKER, J-C. MICHALSKI,  
B. FOURNET, G. SPIK and J. MONTREUIL

360 MHz-NMR spectroscopy of sialyl oligosaccharides from patients with  
mucopolidosis (sialidosis)

Eur. J. Biochem.

- 10 - P. MAROTEAUX, R. HUMBEL, G. STRECKER, J-C. MICHALSKI et R. MANDE

Un nouveau type de sialidose avec atteinte rénale : la néphrosialidose  
Arch. Franç. Pediat.

GÉNÉRALITÉS

# 1. - LE CONCEPT DE MALADIE LYSOSOMIALE

## I - LE LYSOSOME

### A - DEFINITION

Le terme de lysosome fut attribué par DE DUVE en 1955 (1) à un groupe de particules cytoplasmiques contenant près de 40 enzymes hydrolytiques, dont l'activité optimum se situe à pH acide, d'où le terme d'hydrolases acides qui leur est attribué.

Ces petits sacs digestifs sont entourés par une membrane, qui a pour rôle de circonscrire le foyer de digestion et d'empêcher l'attaque du cytoplasme environnant.

### B - ORIGINE

Les lysosomes seraient formés à partir d'une région spécialisée du réticulum ergastoplasmique lisse nommée le GERL (Fig. 1) par NOVIKOFF et al. (1971) (2). Cette région serait située sur la face intérieure de l'appareil de Golgi et serait responsable de la synthèse de 4 types de lysosomes.

1 - Les corps résiduels dans lesquels des résidus non digérés sont visibles.

2 - Les lysosomes primaires qui transportent les hydrolases acides vers les lieux de digestion.

3 - Les vacuoles antophagiques type I dans lesquelles des portions de GERL enveloppent des régions du cytoplasme contenant des organites tels les mitochondries, l'ergastoplasme ou des peroxyosomes. Lorsque la vacuole est refermée, les hydrolases sont libérées et les structures enfermées sont dégradées.

4 - Vacuoles antophagiques de type II. Dans ce cas c'est une petite portion de cytosol ou de glycogène qui est englobée par le GERL.

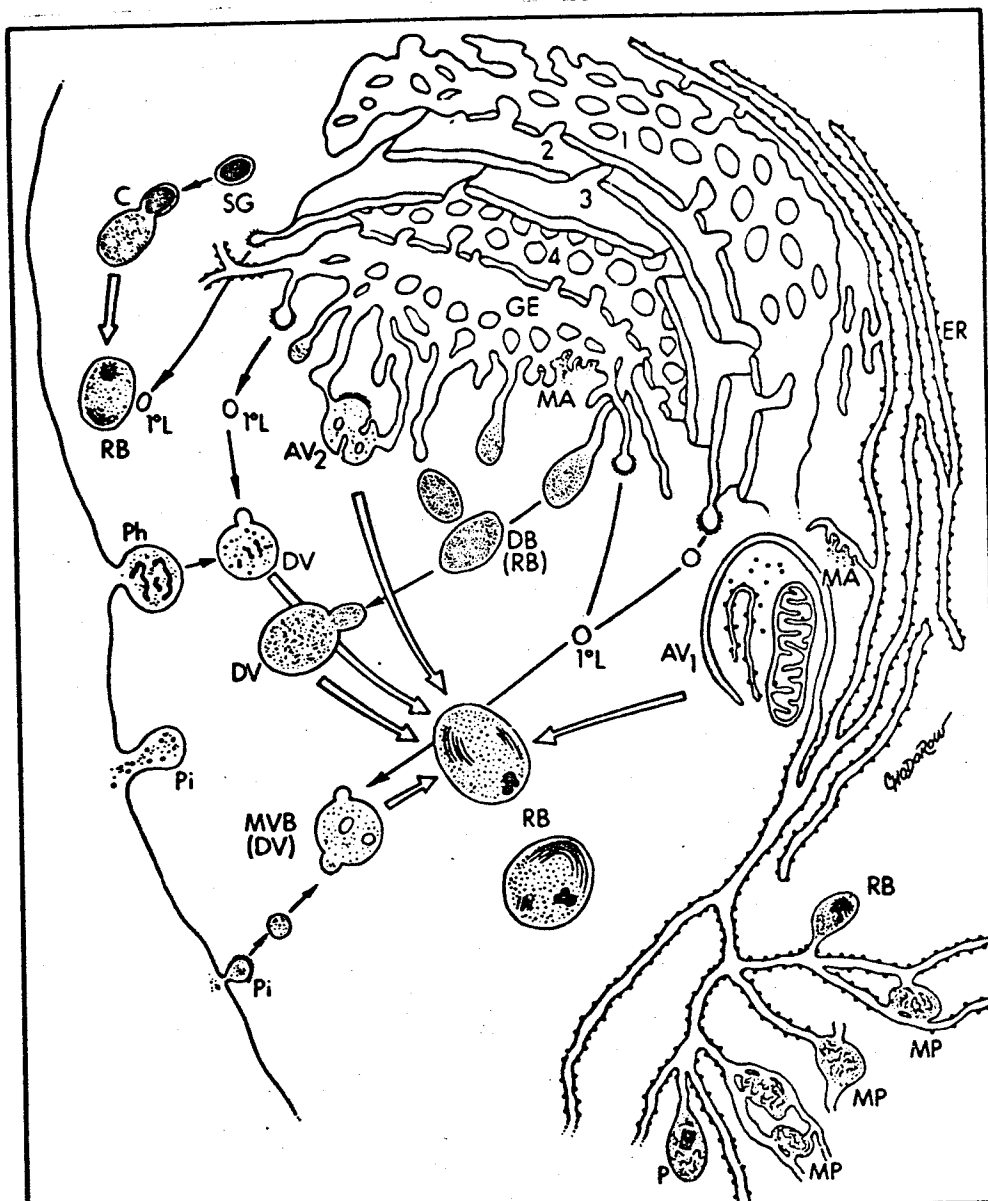


FIGURE 1

Origine et rôle des lysosomes d'après NOVIKOFF et al. 1971 (3)

- 1°L : Lysosomes primaire
- AV<sub>1</sub> : Vacuole autophagique de type I
- AV<sub>2</sub> : Vacuole autophagique de type II
- C : Crinophagie
- DB : Corps denses
- DB : Vacuole digestive
- ER : Réticulum ergastoplasmique
- GE : GERL
- MA : Microantophagie
- MP : Microperoxysome
- P : Peroxysome
- Ph : Vacuole de phagocytose
- P : Vacuole de pinocytose
- RB : Corps résiduel
- SG : Granule de sécrétion



## C - ROLE

Grâce aux hydrolases acides les lysosomes auront une fonction hétérophagique intéressant des substances extracellulaires, ainsi qu'une fonction autophagique portant sur des constituants endocellulaires.

La Crinophagie joue un rôle régulateur dans la sécrétion et a pour but la destruction du matériel en excès formé dans les granules de sécrétion.

### 1 - Matériel extracellulaire : Hétérophagie

Le matériel extérieur pénètre dans la cellule par un phénomène d'endocytose, à la faveur d'une invagination de la membrane cytoplasmique qui enveloppe totalement la substance à ingérer. La vacuole ainsi nouvellement formée portera le nom d'hétérophagosome. Suivant la taille du matériel à ingérer on parlera de phagocytose (grosses molécules, cellules) ou de pinocytose (petites molécules). Les hétérophagosomes fusionnent ensuite avec les lysosomes primaires pour donner les lysosomes secondaires, à l'intérieur desquels s'effectue la digestion.

### 2 - Matériel intracellulaire : Autophagie

La propriété pour la cellule de détruire certains de ses constituants usagés (mitochondrie, réticulum endoplasmique...) a pu être mis en évidence en microscopie électronique par ERICSSON, 1969 (4). Le processus est le même que pour l'hétérophagie, la zone à détruire étant circonscrite par une simple membrane pour donner une vacuole nommée autophagosome qui va venir fusionner avec un lysosome primaire ou secondaire.

### 3 - Exocytose

Seules les petites molécules produites par la digestion lysosomiale passent au travers de la membrane, pour être réutilisées par la cellule. Cependant une petite quantité de matériel non dégradé, peut subsister à l'intérieur du lysosome. Le processus d'exocytose, ou décharge en bloc du matériel non dégradé dans le milieu extracellulaire, ne s'effectue que rarement en raison de la nocivité que pourraient exercer les substances rejetées sur les cellules

avoisinantes. Aussi les résidus seront-ils retenus au sein des lysosomes. Ces résidus apparaissent très réfringents en microscopie électronique d'où le nom de corps denses qui leur est conféré.

## II - PATHOLOGIE LYSOSOMIALE

Pour bien accomplir leur mission, les lysosomes doivent être capables de digérer tous les substrats qui leur sont présentés. Cette digestion, d'autre part, doit s'effectuer sans danger pour la cellule, à l'abri des autres organites cellulaires. Si la fonction digestive vient à faillir, il en résulte une surcharge des lysosomes par du matériel non dégradé. D'autre part, si la membrane vient à être altérée, il en résulte un déversement des enzymes dans le cytoplasme et une lyse de la cellule. Dans les deux cas le résultat est identique, la cellule est lésée et finit par mourir.

### A - RUPTURE DE LA MEMBRANE LYSOSOMIALE

Dans certaines circonstances, telles l'anoxie, les états de choc, l'acidose, il peut y avoir rupture de la membrane lysosomiale et déversement des enzymes dans la cellule, aboutissant à une autophagie de cette dernière. Les cas les plus connus de rupture de la membrane lysosomiale sont ceux survenant chez des malades atteints de silicose. Dans ce cas se sont les membranes lysosomiales des macrophages alvéolaires qui sont attaquées par les cristaux de silice.

Il faut noter que certaines substances telles les vitamines liposolubles (A, K, D, E) et les hormones sexuelles stéroïdes exercent une action labilisante vis-à-vis de la membrane lysosomiale ; il en est de même pour certains agents physiques tels les rayons U.V. et la congélation.

### B - DEVERSEMENT DES ENZYMES DANS LE MILIEU EXTRACELLULAIRE

L'hypersecrétion d'enzymes lysosomiales peut intervenir à la suite d'un



accident phagocytaire appelé "la régurgitation cellulaire" due à une fusion prématurée des lysosomes, avec une invagination endocytaire avant que celle-ci ne se soit refermée.

On aboutit alors à un état inflammatoire local, ou à des affections dégénératives des structures conjonctives dans les os ou les articulations.

### C - SURCHARGE LYSOSOMIALE

Les maladies par encombrement des lysosomes sont très nombreuses. Elles comprennent toutes les situations où il existe un déséquilibre, qualitatif ou quantitatif entre les substrats qui pénètrent dans les lysosomes et les hydrolases chargées de les dégrader.

L'anomalie peut se situer selon les cas du côté des substrats ou de celui des hydrolases.

#### 1 - Surcharges physiologiques

L'encombrement des lysosomes peut se produire après endocytose de substances indigestibles.

Il en est ainsi pour la tuberculose ou la lèpre, la paroi acide des mycobactéries responsables de ces troubles étant en effet résistante à la digestion lysosomiale.

On note alors la présence de macrophages géants, dont les lysosomes sont bourrés de bactéries mortes et vivantes. Un encombrement semblable peut être obtenu lorsque le lysosome ne possède pas l'équipement enzymatique nécessaire à la dégradation d'une substance. C'est le cas des lipopigments (ceroïdes et lipofuschines) qui sont des lipides polaires à haut degré de polymérisation et d'insaturation. Ces produits non dégradés se retrouvent dans les corps denses. On peut également créer des surcharges expérimentales chez l'animal par injection de dextran, saccharose ou de polymères synthétiques tel la polyvinylpyrrolidone.

On note alors l'apparition de cellules possédant d'énormes vacuoles, qui ne sont en fait que les lysosomes gonflés de la substance non dégradée, ou d'eau qui pénètre à l'intérieur de la cellule par un processus osmotique.

## 2 - Surcharges par déficit enzymatique héréditaire

### a) déficit lysosomal

Ce sont les troubles les plus fréquemment rencontrés. Le concept de maladie de surcharge lysosomiale fut établi par HERS en 1965 (5), lorsqu'il pût préciser de façon formelle la localisation lysosomiale de la maltase acide, enzyme déficient dans la glycogénose de type II.

Les travaux de HERS ont montré que des phénomènes de surcharge cellulaire peuvent survenir à la suite d'une incapacité génétique à produire une enzyme fonctionnelle. Le blocage métabolique se traduit par une accumulation de polymères partiellement dégradés au sein des lysosomes. La biosynthèse se continuant à un taux normal ne fait qu'aggraver le processus, provoquant l'apparition d'inclusions cytoplasmiques, d'énormes vacuoles et de lysosomes engorgés de matériel non dégradé qui sont les marques histochimiques de ces maladies (Fig. 2).

Quand les produits accumulés sont de faible masse moléculaire, ou solubles dans l'eau, une excrétion accrue de ces produits est observée dans l'urine, qui constituera un matériel de choix pour l'étude biochimique de ces troubles. Plus d'une vingtaine de maladies lysosomiales congénitales ont pu être décrites, aussi bien chez l'homme que chez l'animal (JOLLY et BLAKEMORE, 1973) (7).

Le tableau clinique et l'évolution de ces affections varie suivant la nature des dépôts, leur localisation préférentielle et la vitesse à laquelle ils se forment. Nous donnerons d'ailleurs, dans la suite de l'exposé, une classification plus précise de ces différents troubles.

Le plus souvent les patients développent rapidement des signes de déficience nerveuse et mentale, des troubles cardiaques et musculaires, des malformations physiques et fonctionnelles variées et ils meurent en bas-âge.

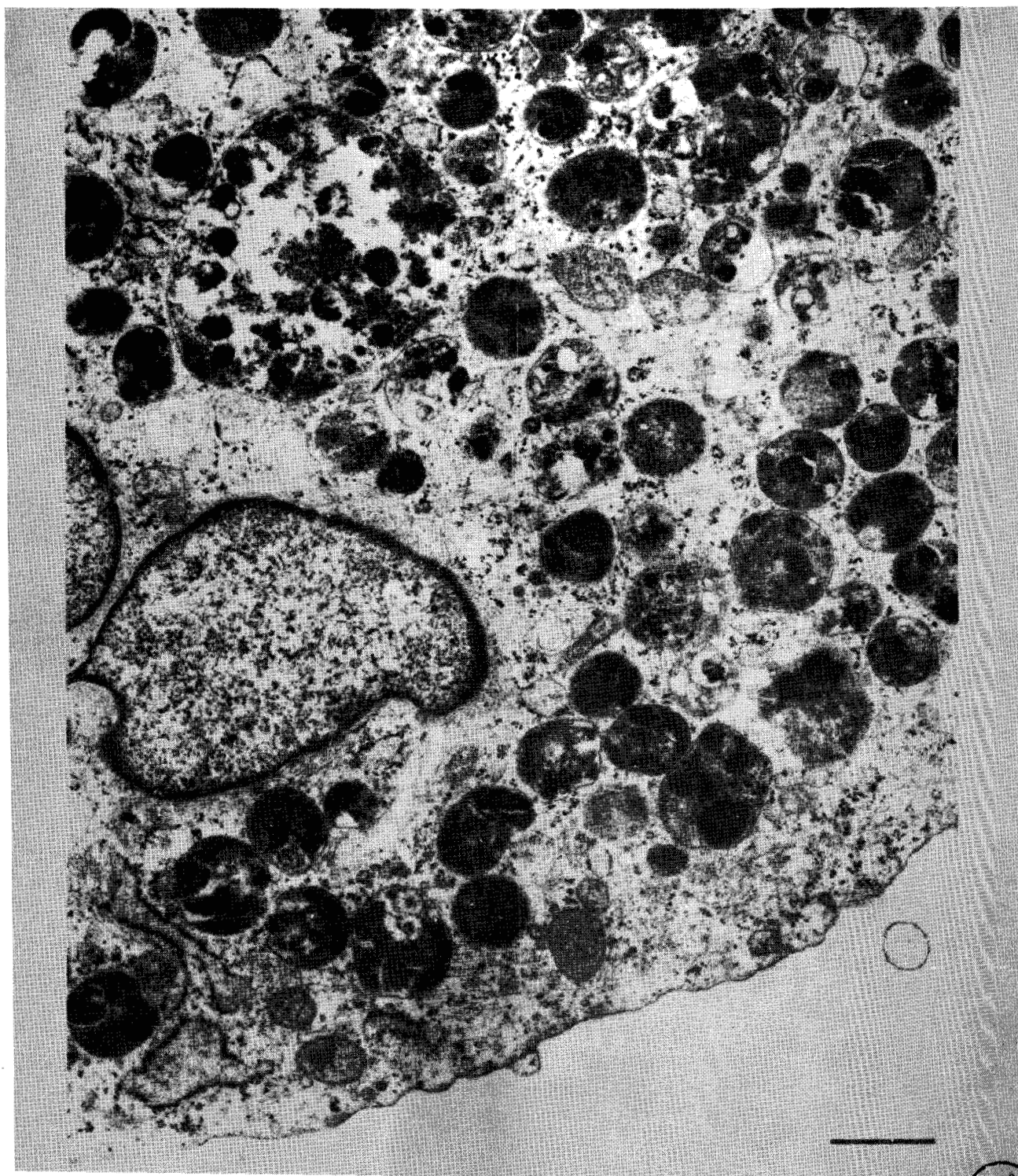


FIGURE 2

Aspect ultrastructural de fibroblastes "I Cell", montrant un cytoplasme riche en inclusions, délimitées par une simple membrane. Cet aspect est caractéristique des lysosomes engagés dans des processus autophagiques (d'après VAN HOFF, 1972) (6).

b) déficit extralysosomal

Une gangliosidose à  $GM_3$  a été récemment décrite par FISHMAN et BRADY, 1975 (8) qui ont montré chez ces malades, une accumulation de gangliosides  $GM_3$  et  $GD_3$  alors que les autres gangliosides  $GM_2$  et  $GM_1$ ,  $GD_1a$ ,  $CD_1b$  et  $GT_1$  étaient absents. Les auteurs ont pu montrer que cette accumulation était due au déficit d'une enzyme cytoplasmique, la  $GM_3$ -N-acétyl-galactosamine transférase qui permet de passer du  $GM_3$  au  $GM_2$  puis au  $GM_1$ .

L'accumulation de gangliosides  $GM_3$  et  $GD_3$  rend compte d'un dépassement des capacités lysosomiales à hydrolyser le  $GM_3$  et ceci à cause d'un excès de substrat.

D - CONCLUSION

Le lysosome est l'organite cellulaire spécifique du catabolisme. Des dérèglements des capacités digestives peuvent survenir, à la suite d'une surcharge en substrat, résultant d'une inaptitude ou d'un dépassement des possibilités du lysosome à dégrader une substance. Les troubles les plus fréquemment rencontrés résulteront de la déficience génétique d'une hydrolase acide, entraînant l'accumulation de produits complexes, spécifiques de la nature de l'enzyme déficiente.

III - RÔLE DES GLYCOSIDASES DANS LA PATHOLOGIE LYSOSOMIALE

A - CARACTERISTIQUES GENERALES DES GLYCOSIDASES

Des glycosidases capables d'hydrolyser toutes les liaisons rencontrées habituellement dans les hétéropolymères des sucres ont pu être localisées dans différents tissus animaux. On considère généralement que ces enzymes sont d'origine lysosomiale, et plusieurs d'entre elles ont été localisées spécifiquement à l'intérieur de ces organites. Cependant, des formes enzymatiques ayant des spécificités d'action et des propriétés cinétiques différentes ont pu être localisées dans d'autres compartiments cellulaires. C'est ainsi qu'une neuramini-

dase a été localisée au niveau de la membrane plasmique (VISSER et EMMELOT, 1973) (9), de l'appareil de Golgi (KISHORE et al., 1975) (10), ainsi que dans le cytosol (TULSIANI et CARUBELLI, 1970) (11). Les glycosidases cellulaires sont de deux types, soit des endoglycosidases (lysozyme, hyaluronidase,  $\beta$ -endo-N-acétylglucosaminidase) coupant directement à l'intérieur des chaînes glycaniques, soit des exoglycosidases, dégradant les polymères linéaires par hydrolyse récurrente à partir du sucre terminal non réducteur.

### 1 - Influence de la liaison

On admet généralement que les hydrolases sont spécifiques d'un type de liaison plutôt que d'un substrat bien défini, si bien qu'un déficit unique, peut causer l'accumulation de substances aussi différentes que les mucopolysaccharides acides, les glycolipides et les glycoprotéines.

Cependant, il est fréquent qu'un type de ces substances prédomine, c'est ainsi que l'on pourra distinguer les sphingolipidoses où l'on notera préférentiellement une accumulation de matériel lipidique, des mucopolysaccharidoses où l'accumulation de MPSA prédomine entraînant sur le plan clinique des dysmorphies osseuses beaucoup plus évidentes.

### 2 - Existence d'isoenzymes

L'existence de multiples formes enzymatiques est très répandue ; dans chaque famille enzymatique, les différentes formes se distinguent par les paramètres cinétiques (Tableau I) ou par des propriétés physiques telles

- le pH optimum
- point isoélectrique (pHi)
- mobilité électrophorétique
- séparation chromatographiques fondées sur la taille ou la charge
- stabilité à la chaleur ou autres agents dénaturants.

Ces phénomènes peuvent être expliqués par la théorie sous-unitaire (ROBINSON, 1974) (12). Dans chaque groupe de glycosidases, les différentes enzymes

TABLEAU I

Propriétés des  $\beta$  galactosidases du foie humain (d'après J.S. O'BRIEN, 1975) (13)

Isoenzyme	PM	pH opt. (4MU $\beta$ Gal)	Stabilité à la chaleur	Effet des ions Cl <sup>-</sup>	Action sur 4MU $\beta$ Gal	Action sur 4MU $\beta$ Gal	Action sur GM <sub>1</sub>	Action sur asialo- fetuine GM <sub>1</sub>	Activité dans la ganglio- sidose GM <sub>1</sub>	Fixation sur Con A	Réaction avec Anti-A	% activité totale (4MU $\beta$ Gal)
A	72.000	4, 35	labile	+	+	0	+	+	-	+	+	85
B	600.000 800.000 <sup>a</sup>	4,20	labile	+	+	0	+	+	-	+	+	10
C (neutre)	57.000	5,80	inactivée	+	+	0	0	0	variable $\pm$	0	0	5



auraient même unité polypeptidique conferrant l'activité catalytique fondamentale vis-à-vis d'un sucre spécifique en position terminale non réductrice sur la chaîne oligosaccharidique. Cette unité polypeptidique serait associée avec d'autres sous-unités protéiques qui conferreraient à l'enzyme une spécificité beaucoup plus étroite qui serait en particulier fonction non plus de la nature du sucre terminal, mais du reste de la chaîne glycanique. Dans certaines maladies lysosomiales, un déficit complet d'une glycohydrolase particulière, pourra être enregistré grâce à des substrats artificiels tels les dérivés fluorogéniques 4-méthyl-umbelliféryl (4MU)-, alors que l'utilisation de substrats naturels permettra de délimiter ce déficit à une forme isozymique particulière.

Les exemples les plus connus d'enzymes présentant plusieurs formes isozymiques sont la  $\beta$ -galactosidase (Tableau I) (enzyme impliqué dans la GM<sub>1</sub> gangliosidose) et les N-acétyl hexosaminidases (impliquées dans la maladie de TAY-SACHS et de SANDHOFF) (Fig. 3).

#### B - NATURE DU DEFICIT GENETIQUE

La nature du déficit enzymatique peut revêtir un grand nombre de formes :

1 - Le gène responsable de la synthèse de l'enzyme ne s'exprime absolument pas. L'activité enzymatique mesurée sera alors totalement nulle. Ce sera le cas de l' $\alpha$ -glucosidase dans la glycogénose de type II, l' $\alpha$ -galactosidase dans la maladie de FABRY, ou l'estérase acide dans la maladie de WOLMAN.

2 - Une mutation peut entraîner une erreur dans la biosynthèse de la chaîne peptidique de l'enzyme. Les molécules d'enzyme modifiées sont néanmoins synthétisées à un taux normal et donneront une réaction croisée avec un antisérum préparé à partir d'enzyme normal. Suivant la "gravité" de la mutation, l'activité enzymatique mesurée sera soit totalement nulle, ou sera comprise entre 5 et 30 % de l'activité normale.

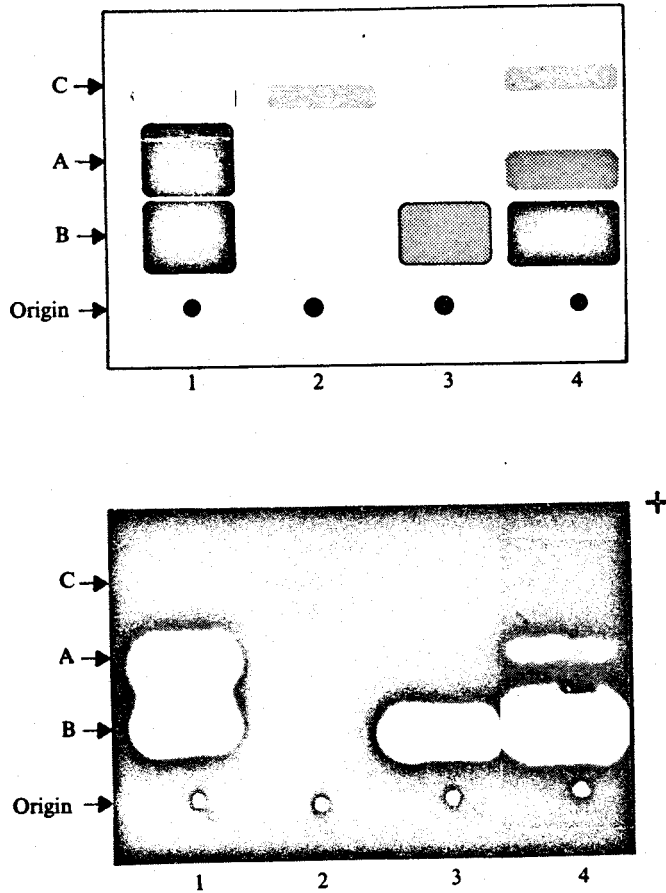


FIGURE 3

Electrophorèse des N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidases humaines sur acétate de cellulose suivant la méthode de RATAZZI et DAVIDSON, 1972 (14) d'après THOMAS et al., 1974 (15) (Tampon 0,05 M borate, acide citrique pH 5,9 ; 3 heures ; révélation avec le 4 méthylumbelliferyl 2 acétamido 2 deoxy- $\beta$ -galactopyranoside).

- 1 - Fibroblastes normaux
- 2 - Fibroblastes SANDHOFF
- 3 - Fibroblastes TAY-SACHS
- 4 - Hétérocaryons SANDHOFF-TAY-SACHS





Dans ce groupe on peut citer l' $\alpha$ -mannosidase où il existe une activité mannosidasique résiduelle et il semble que dans ce cas l'enzyme ait moins d'affinité pour son substrat naturel. Cette activité résiduelle peut être activée de façon significative par une forte concentration en substrat, ou en ions  $Zn^{++}$  (HULTBERG et MASSON, 1977) (16) ; (BEAUDET et NICHOLS, 1976) (17).

3 - L'enzyme existe sous forme isoenzymatique. Seule une des formes est absente, les formes isozymiques subsistantes ayant une activité normale ou même élevée.

Cependant leurs spécificités étant légèrement différentes de celle de la forme manquante, elles ne suffisent pas à compenser le déficit.

C'est le cas des N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidases préalablement citées. Cette enzyme existe sous 2 formes A et B agissant toutes deux sur les nitrophenylhexosaminides et sur des substrats naturels tels les globosides et le céramide trihexoside. Cependant seule l'isoenzyme de type A agit sur le  $GM_2$  ganglioside.

Les deux formes A et B sont constituées à partir de 2 sous-unités protéiques  $\alpha$  et  $\beta$ .

La forme A serait un hétéropolymère  $\alpha\beta$  et la forme B un homopolymère  $\beta\beta$  (SRIVASTAVA et al., 1976) (18).

Dans la maladie de TAY-SACHS une mutation affecte la synthèse de la sous-unité  $\alpha$ , seule la forme B est présente (OKADA et O'BRIEN, 1969) (19). Cette déficience se traduit par une accumulation de  $GM_2$  ganglioside (KLENK et al., 1957) (20).

Dans la maladie de SANDHOFF la mutation affecte la biosynthèse de la sous-unité  $\beta$ . Les deux formes A et B sont absentes, mais on note cependant l'apparition d'une forme enzymatique nouvelle, la forme C qui est pratiquement absente dans les tissus normaux (SANDHOFF et al., 1971) (21) ; (PENTON et al., 1975) (22). Cette forme serait un homopolymère  $\alpha\alpha$ .

La maladie de SANDHOFF se traduit par une surcharge mixte, ganglioside GM<sub>2</sub>, globoside et oligosaccharides (SNYDER et al., 1972) (23); (STRECKER et MONTREUIL, 1971) (24).

4 - L'activité vis-à-vis du substrat naturel demande la coopération de plusieurs facteurs, chacun d'eux étant inactif séparément. La même image clinique peut ainsi provenir de déficits génétiques différents. C'est ce que l'on observe dans la maladie de GAUCHER.

La formation de la  $\beta$ -glucosidase demande l'assemblage de 2 facteurs, un facteur P thermostable et un facteur C thermolabile. Dans la maladie de GAUCHER, le facteur C est déficient alors que le facteur P est présent en grosses quantités (HO et O'BRIEN, 1971) (25).

5 - La localisation de l'enzyme au niveau de la cellule peut être anormale entraînant ainsi l'isolement de l'enzyme et de son substrat potentiel dans des compartiments cellulaires différents. C'est ce que l'on observe dans la Mucopolipidose de type II, où les enzymes sont hyperactives dans le milieu extracellulaire, et pratiquement inactives à l'intérieur de la cellule (LEROY et SPRANGER, 1970) (26). Toutefois, ce fait n'a été vérifié que pour le fibroblaste en culture.

## 2. - MALADIES HEREDITAIRES DE SURCHARGE LYSOSOMIALE DES GLYCOCONJUGUES

### I - GENERALITES

Plusieurs classifications ont été proposées, les unes tenant compte des caractères chimiques de ces différentes maladies, les autres de caractéristiques biochimiques. Le tableau II donne une classification fondée sur la nature du matériel accumulé dans les urines, qui est souvent le reflet exact de la nature de l'enzyme déficiente (STRECKER, 1977) (27).

Néanmoins comme nous l'avons préalablement mentionné, les enzymes sont spécifiques d'un type de liaison, plutôt que d'un type de molécule. C'est ainsi que bien souvent on observera des surcharges mixtes : c'est par exemple le cas des gangliosidoses GM<sub>1</sub> et GM<sub>2</sub> où, outre l'accumulation de gangliosidoses, on note parallèlement une accumulation de matériel de nature glycoprotéinique (VOLK et al., 1975) (28).

Seule la nature du déficit enzymatique primaire pourra servir de base à toute classification future, et ainsi sera tenu compte du fait qu'une déficience enzymatique unique puisse être responsable de l'accumulation de constituants d'origines diverses.

Nous passerons brièvement en revue les différents groupes, en nous attardant sur celui des "Glycoprotéinoses" qui ont fait plus particulièrement l'objet de notre travail.

### II - LES MUCOPOLYSACCHARIDOSES

#### A - CARACTERISTIQUES GENERALES DU CATABOLISME

Mis à part la maladie de MORQUIO (PEDRINI et al., 1962) (29) toutes les Mucopolysaccharidoses sont essentiellement dûes à un dysfonctionnement du catabolisme lysosomal de deux hétéropolymères, le dermatane sulfate et l'héparane sulfate (DORFMAN et MATALON, 1976) (30).

TABLEAU II

PATHOLOGIE DES GLYCOCONJUGUES

DEFICIT ENZYMATIQUE	MATERIEL ACCUMULE	MALADIE
<b>I - ACCUMULATION DE MUCOPOLYSACCHARIDES</b>		
$\alpha$ -L-Iduronidase	Heparan sulfate + Dermatan sulfate	Mucopolysaccharidose I <sub>H</sub> (Hurler)
L-Iduronidase sulfatase	Heparan sulfate + Dermatan sulfate	Mucopolysaccharidose I <sub>S</sub> (Scheie)
Sulfamidase	Heparan sulfate	Mucopolysaccharidose II (Hunter)
$\alpha$ -N-acetylglucosaminidase	Heparan sulfate	Mucopolysaccharidose III <sub>A</sub> (Sanfilippo A)
$\alpha$ -Glucosaminidase (?)	Heparan sulfate	Mucopolysaccharidose III <sub>B</sub> (Sanfilippo B)
N-acétylhexosaminidase 4-SO <sub>4</sub> sulfatase	Keratan sulfate + Chondroïtine sulfate	Mucopolysaccharidose III <sub>C</sub> (Sanfilippo C)
N-acétylhexosaminidase 6-SO <sub>4</sub> sulfatase	Dermatan sulfate	Mucopolysaccharidose IV (Morquio)
$\beta$ -Glucuronidase	Dermatan sulfate + Heparan sulfate + Chondroïtine sulfate	Mucopolysaccharidose VI (Maroteaux Lamy)
		Mucopolysaccharidose VII
<b>II - ACCUMULATION DE GLYCOSPHINGOLIPIDES OU DE LIPIDES</b>		
Sphingomyelinase	Sphingomyeline	Maladie de Nieman Pick
Ceramidase	Céramide	Maladie de Farber
Cerebroside sulfatase	Cérébroside sulfate	Leucodystrophie métachromatique
Calactocerebrosidase		Maladie de Krabbe
Glucocérébrosidase	Glucocérébroside	Maladie de Gaucher
$\alpha$ -Galactosidase	Ceramide trihexoside	Maladie de Fabry
$\beta$ -Hexosaminidase A	Ganglioside GM <sub>2</sub>	Maladie de Tay-Sacchs
$\alpha$ -Neuraminidase (?)	Gangliosides GM <sub>3</sub> et GD <sub>3</sub>	Mucolipidose IV (BACH G. <i>et al.</i> 1975) {33}
UDP-GalNAc : GM <sub>3</sub> N-acétylgalactosami-nyl-transférase	Ganglioside GM <sub>3</sub>	Gangliosidose à GM <sub>3</sub> (MACLAREN N.K. <i>et al.</i> 1976) {34}
<b>III - ACCUMULATION MIXTE DE GLYCOSPHINGOLIPIDES, DE GLYCOPEPTIDES (éventuellement) ET D'OLIGOSACCHARIDES</b>		
$\beta$ -Galactosidase	Ganglioside GM <sub>1</sub> + Oligosaccharides à galactose terminal	Gangliosidose à GM <sub>1</sub>
$\beta$ -Hexosaminidase A et B	Ganglioside GM <sub>2</sub> + Globoside + Oligosaccharides à N-acétylglucosamine terminale	Gangliosidose à GM <sub>2</sub> variant O (Maladie de Sandhoff-Jatzkewitz)
$\alpha$ -Fucosidase	Glycophingolipides à fucose + Glycopeptides et oligosaccharides à fucose terminal	Fucosidose
$\alpha$ -Neuraminidase	Sialyloligosaccharides	Mucolipidose I Mucolipidose II (I-Cell disease) Mucolipidose III Mucolipidose W. Mucolipidose De P. Mucolipidose N.
<b>IV - ACCUMULATION D'OLIGOSACCHARIDES OU DE GLYCOPEPTIDES</b>		
$\alpha$ -Mannosidase	Oligosaccharides à mannose terminal	Mannosidase
Asparaginy-N-acetylglucosaminidase	Glycosylasparagines	Asparaginyglucosaminurie



Ces polymères sont composés de résidus alternés d'hexosamine sulfate (glucosamine ou galactosamine) et d'acide uronique (glucuronique ou L-iduronique). Ces polymères sont composés d'environ 100 résidus de sucres. La voie catabolique principale s'effectue par l'intermédiaire d'exoenzymes, qu'il s'agisse de glycosidases ou de sulfatases qui coupent la chaîne mucopolysaccharidique à partir de l'extrémité terminale non réductrice, procédant ensuite séquentiellement enlevant à chaque fois un résidu sulfate ou un sucre (Fig. 4).

Chaque groupement chimique distinct demande une enzyme différente, aussi quand une seule des enzymes ne fonctionne plus de façon adéquate, ou est totalement absente, la séquence dégradative est interrompue. Cependant une dégradation ralentie est toujours possible par la voie d'endoglycosidases telle la hyaluronidase qui coupe à l'intérieur des fragments oligosaccharidiques (MUIR, 1973) (31).

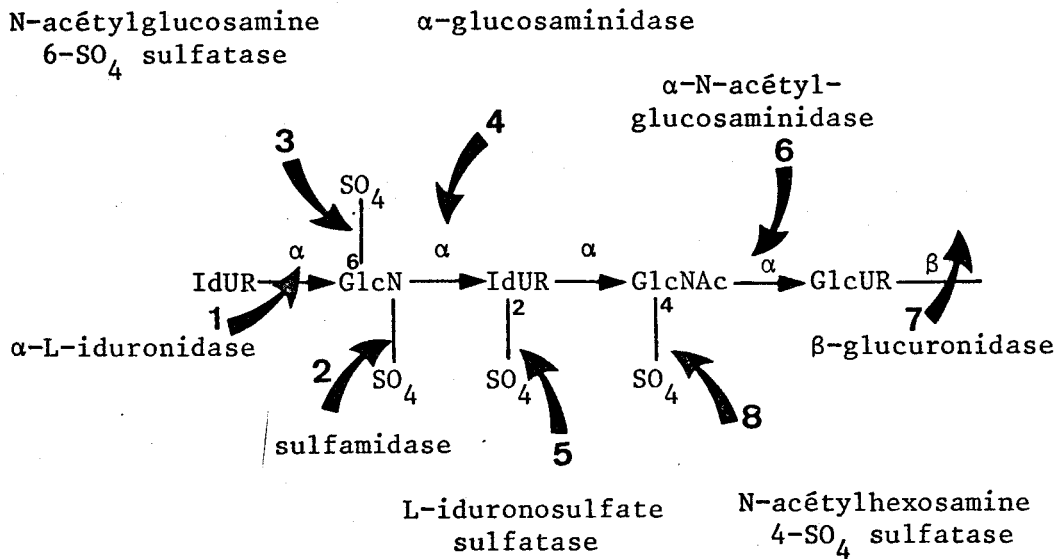
Dans des conditions normales, le catabolisme de l'héparane et du dermatane sulfate aboutit à la formation de sulfate qui est excrété, ainsi que d'hexosamines et d'acides uroniques qui sont respectivement recyclés dans la voie glycolytique, ou dans celle dérivée des hexoses phosphate. Par contraste le catabolisme anormal de ces hétéropolymères, dans le cas des Mucopolysaccharidoses, donne des fragments osidiques, dont certains sont libérés par la cellule et excrétés dans les urines (CALATRONI et al., 1974) (32), les autres venant engorger le lysosome.

## B - NOTION DE FACTEUR CORRECTIF

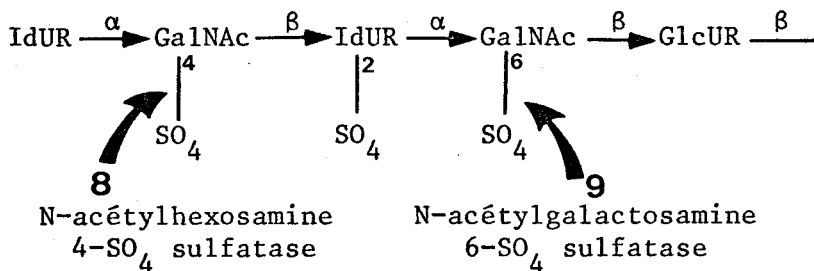
Cette notion, qui peut être maintenant étendue à l'ensemble des maladies héréditaires de surcharge lysosomiale, est née de l'élucidation des déficits responsables du catabolisme anormal des Mucopolysaccharidoses.

### 1 - Données expérimentales

Bien que les syndromes d'HURLER et de HUNTER soient génétiquement distincts (FRARANTONI et al., 1969) (36), le premier étant transmissible de façon autosomale récessive et le second lié au sexe (chromosome X), on ne peut distinguer les fibroblastes des deux patients si l'on étudie la nature des mucopolysaccharides



HEPARAN SULFATE



DERMATAN SULFATE

- 1 : Maladies de HURLER et SCHEIE
- 2 : Maladie de SANFILIPPO A
- 3 : Déficience en N-acétylglucosamine 6-SO<sub>4</sub> sulfatase (DIFERRANTE)
- 4 : Maladie de SANFILIPPO C
- 5 : Maladie de HUNTER
- 6 : Maladie de SANFILIPPO B
- 7 : Déficience en β-glucuronidase
- 8 : Maladie de MAROTEAUX-LAMY
- 9 : Maladie de MORQUIO

FIGURE 4



Métabolisme de l'Héparan-sulfate et du dermatan sulfate, et troubles qui lui sont associés (d'après DORFMAN et MATALON, 1976) (35).

accumulés (FRARANTONI et al., 1968a) (37) ou leur "turnover" en utilisant des mucopolysaccharides marqués au  $^{35}\text{SO}_4$  (CANTZ et al., 1972) (38).

Cependant le catabolisme redevient normal lorsque l'on fait fusionner les deux types de fibroblastes entre eux. (FRARANTONI et al., 1968b) (39). On a pu également montrer que le contact cellulaire n'était pas nécessaire pour la correction puisque le milieu de culture préincubé avec des fibroblastes HUNTER pouvait accélérer le catabolisme des mucopolysaccharides dans les fibroblastes HURLER et vice-versa. De plus la correction croisée ne se limite pas uniquement à ces deux génotypes puisque des cellules HUNTER, par exemple, peuvent être "corrigées" par l'addition de milieu préincubé avec des cellules normales ou d'une manière générale avec des cellules d'un génotype différent de celui de HUNTER (NEUFLED et al., 1971) (40).

Le catabolisme déficient dans la maladie de HUNTER semble donc être la conséquence du déficit d'une substance requise pour le catabolisme des mucopolysaccharides, qui peut être produite par des cellules d'un autre génotype et qui peut être administrée aux cellules HUNTER de façon exogène, aboutissant ainsi à une correction de l'erreur du catabolisme. Des facteurs correctifs analogues ont d'ailleurs été mis en évidence, l'hétérogénéité de la maladie de SANFILIPPO, qui peut être divisée en deux groupes désignés arbitrairement A et B chaque groupe étant dû à la déficience d'un facteur différent (KRESSE et al., 1971) (41).

## 2 - Du facteur correctif à la déficience enzymatique

La nature protéique de ces facteurs a néanmoins pu être montrée et la correction apparaît comme une forme de remplacement de l'enzyme déficiente. Cette hypothèse est d'ailleurs renforcée par les travaux de WEISMAN et al., 1971 (42), PORTER et al., 1971 (43) qui ont démontré que l'Arylsulfatase A pouvait corriger le déficit des cellules de patients atteints de Leucodystrophie métachromatique de manière analogue à ce qui est obtenu avec les facteurs correctifs pour les

fibroblastes de mucopolysaccharidose. Il semble donc que ces facteurs correctifs soient en fait des hydrolases acides lysosomiales, auquel cas un facteur correctif approprié pourrait agir sur les mucopolysaccharides accumulés dans les fibroblastes correspondant non corrigés.

Une telle démarche expérimentale, utilisant comme substrat des mucopolysaccharides marqués, a permis à KRESSE et NEUFELD, 1972 (44) d'identifier le facteur correctif Sanfilippo A comme étant une sulfatase agissant sur les groupements sulfates liés aux groupes aminés des glucosamines (résidus N-sulfate). C'est également de cette manière que SJÖBERG et al., 1973 (45) ont mis en évidence une déficience en sulfoïduronate sulfatase associée à la maladie de HUNTER, en utilisant comme substrat un disaccharide obtenu par diazotation de l'héparine.

#### C - GENETIQUE DES MUCOPOLYSACCHARIDES : PROBLEME DU SPECTRE D'EXPRESSION

Le problème posé par les mucopolysaccharidoses comme pour beaucoup d'autres maladies lysosomiales est l'explication du large spectre clinique observé dans ces maladies et en particulier l'existence de formes graves et de formes atténuées. En dépit du fait que les patients atteints de maladies de HURLER et de SCHEIE présentent des caractères cliniques tout à fait différents, les fibroblastes des deux types de patients sont dépourvus d'activité  $\alpha$ -L-iduronidasiq ue et accumulent le même taux de mucopolysaccharides S<sup>35</sup> WEISMANN et NEUFELD, 1970 (46). Il a été postulé que les mutations dans les maladies de HURLER et SCHEIE n'étaient pas identiques mais alléliques (McKUSIK et al., 1972) (47). Ces mêmes auteurs pensent qu'il existerait des "classes génétiques" possédant soit un gène HURLER, soit un gène SCHEIE. Des patients présentant un phénotype intermédiaire entre celui de SCHEIE et celui de HURLER ont d'ailleurs été diagnostiqués. On n'a d'ailleurs aucune raison de croire que le nombre d'allèles est limité à deux, et la multiplicité des allèles impliquerait l'existence de formes cliniques multiples.



Une forme sévère et une forme atténuée de la maladie de HUNTER ont également été observées (CANTZ et al., 1972) (48). Dans les deux cas on peut observer la même déficience en sulfiduronate sulfatase ; là également l'existence de deux ou plusieurs allèles est postulée, les uns conduisant à la synthèse d'une enzyme modifiée possédant une activité résiduelle *in vivo*, les autres aboutissant à la synthèse d'enzymes inactives.

Ces postulats de l'allélisme et des classes génétiques demandent néanmoins à être établis de façon plus rigoureuse, et cela pourra vraisemblablement être fait en isolant des formes enzymatiques modifiées possédant ou non une activité catalytique résiduelle.

Néanmoins on a pu montrer *in vitro*, par des expériences de complémentation enzymatique que 90 % de "correction" était enregistrée, lorsque la cellule avait retrouvé 10 % de l'activité enzymatique normale, et que cela suffisait à faire disparaître les formes graves de la maladie (MUDD, 1971) (49).

### III - MALADIES PAR SURCHARGE EN GLYCOSPHINGOLIPIDES

Nous ne considérerons dans ce paragraphe que les maladies où la surcharge en glycosphingolipides est unique. En effet des études récentes (STRECKER et MONTREUIL, 1971) (50) ; (WOLFE et al., 1974) (51); ont montré que dans les cas de gangliosidoses à GM<sub>1</sub> et GM<sub>2</sub>, la surcharge en ganglioside était doublée d'une surcharge oligosaccharidique et glycopeptidique ; nous préférons donc traiter de ces maladies sous le chapitre "Glycoprotéinoses".

#### A - CATABOLISME GENERAL

##### 1 - Distribution

La liste des glycosphingolipides n'a fait que croître spectaculairement ces dernières années ; ils s'étendent des monoglycosylceramides (cerebrosides), aux trisialogangliosides qui possèdent huit sucres dans leur chaîne glycanique.

Ces glycosphingolipides peuvent être rangés en deux catégories suivant leur charge ; on distingue les espèces anioniques qui contiennent des groupements sulfates ou des acides sialiques (gangliosides), et les espèces neutres qui ne contiennent aucun groupement chargé. Les glycosphingolipides acides sont particulièrement abondant dans le système nerveux. Ils pourraient également jouer un rôle important dans les phénomènes de reconnaissance membranaire.

Les glycosphingolipides neutres jouent un rôle immunologique important. Beaucoup d'entre eux présentent des activités de groupe sanguin dans les systèmes A, B, H, Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup> et P.

## 2 - Dégradation enzymatique

La voie dégradative pour beaucoup de glycosphingolipides n'a été élucidée que ces dernières années, coïncidant avec la découverte des enzymes impliquées dans leur catabolisme. Les hydrolases dégradant les glycosphingolipides du cerveau ont fait en particulier l'objet de nombreux travaux en raison peut être de l'importance quantitative de ces lipides dans cet organe, et la variété des troubles neurologiques rattachés à leur métabolisme.

La voie dégradative des gangliosides (Fig. 5) a souvent été considérée séparément de celle des glycosphingolipides neutres, mais il est maintenant apparent que les deux catabolismes ont des enzymes en commun et que leur voies convergent.

Tout semble indiquer que la chaîne oligosaccharidique est dégradée de manière récurrente, avec libération des sucres et enfin du céramide. Ce dernier, s'il n'est pas réutilisé, est hydrolysé en acide gras et sphingosine qui peut elle même continuer à être dégradée. (STOFFEL et STICHT, 1967) (52). (GATT, 1970) (53) a postulé que les enzymes responsables de l'hydrolyse des gangliosides cérébraux étaient réunis en un système multienzymatique similaire à celui responsable de leur biosynthèse (ROSEMAN, 1968) (54).

Toutes les enzymes du catabolisme des glycosphingolipides présentent un pH optimum acide, et semblent toutes être liées aux lysosomes. Cependant, il faut

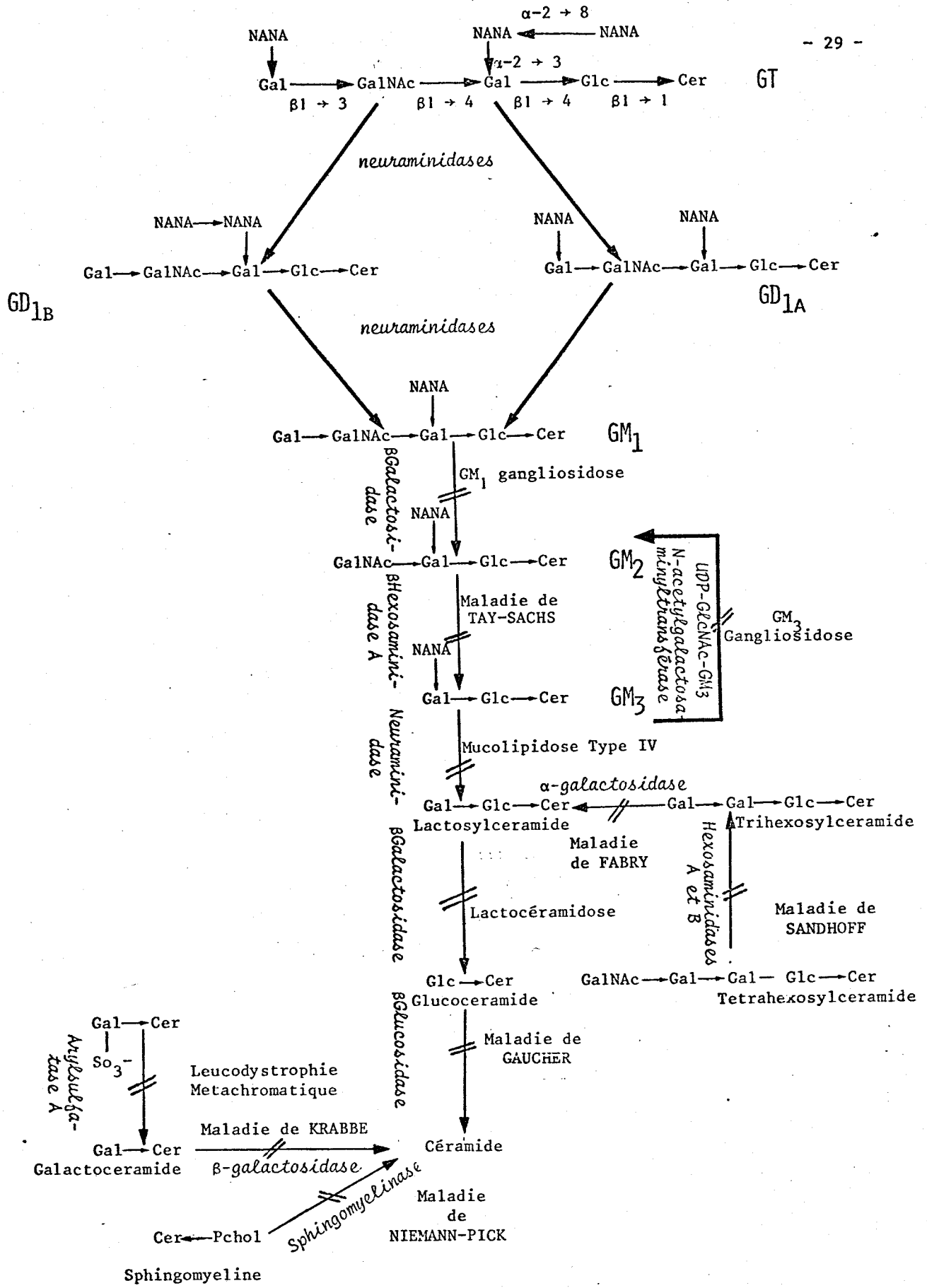


FIGURE 5

Catabolisme normal et pathologique des Gangliosides



noter que la neuraminidase peut avoir des localisations cellulaires différentes ; c'est ainsi que ÖHMAN et al., 1970 (55) ont pu mettre en évidence une enzyme cytosolique dans le cerveau humain.

Les gangliosides sont de tous les glycosphingolipides ceux qui présentent le "turnover" le plus rapide, leur demi-vie étant d'environ 10 jours (BURTON et al., 1964) (56). Les autres glycosphingolipides présentent un "turnover" beaucoup plus lent (SMITH, 1967) (57).

#### B - SURCHARGES EN GLYCOSPHINGOLIPIDES

La plupart des enzymes responsables du catabolisme des glycosphingolipides entrent également dans le catabolisme d'autres molécules complexes, c'est pourquoi lors d'un déficit enzymatique particulier nous aurons généralement plus d'une substance accumulée. Le tableau II (paragraphe II) donne une classification des différentes sphingolipidoses, basée sur la nature du matériel chimique accumulé. Cette classification est cependant limitative et une analyse des caractères cliniques, permet bien souvent de subdiviser ces maladies en différentes formes. Du point de vue biochimique, ces différentes formes peuvent s'expliquer par l'absence d'une forme isozymique particulière, où comme nous l'avons précisé dans le cas des mucopolysaccharidoses, être dues à des mutations alléliques différentes entraînant une plus ou moins grande capacité catalytique d'un même enzyme.

Toutes les lipidoses, mis à part la maladie de FABRY, sont transmissibles suivant un mode autosomal récessif. La maladie de FABRY est liée au sexe (chromosome X) (KOLODNY, 1972) (59).

### IV - LES GLYCOPROTÉINOSES

#### A - GENERALITES

Ces dernières années, plusieurs cas de formes atypiques de surcharge en lipides ou mucopolysaccharides ont été rapportés. Ces maladies étaient considérées

TABLEAU III

Diverses formes cliniques de la Leucodystrophie métachromatique (sulfatidose)

D'après HIRSHHORN et WEISSMANN, 1976 (58).

Désignation	Signes cliniques	Produit accumulé	Enzyme déficient
Infantile tardive	Vers l'âge de 1 à 4 ans Incoordination démence Croissance arrêtée	Galactosyl SO <sub>4</sub> céramide	Arylsulfatase A
Juvenile	Mêmes signes apparaissent après 5 ans	Galactosyl SO <sub>4</sub> céramide	Arylsulfatase A
Adulte	Rare, psychose et démence. Signes moteurs tardifs (après 30 ans)	Galactosyl SO <sub>4</sub> céramide	Arylsulfatase A
Variant type Austin	Rare vers l'âge de 1 à 3 ans. Hepatosplenomegalie Dysostose.	Galactosyl SO <sub>4</sub> céramide Stéroïdes sulfate MPSA sulfate	Arylsulfatase A, B + C Stéroïdes sulfatase



comme des variants de la maladie de HURLER, présentant à la fois les signes cliniques des Mucopolysaccharidoses et des Sphingolipidoses sans qu'il y ait toutefois de mucopolysaccharidurie.

La classification exacte de ces troubles métaboliques était au plus spéculative, sinon tout à fait impossible. SPRANGER et WIEDEMANN, 1970 (60) proposèrent le terme de "Mucolipidoses" pour regrouper ces maladies. En fait la surcharge mixte, à la fois mucopolysaccharidique et lipidique n'a jamais été établie de façon formelle. Tout récemment MAROTEAUX et HUMBEL, 1976 (61) ont proposé le terme d'oligosaccharidoses pour classer ces maladies, afin de rendre compte de l'excrétion d'oligosaccharides spécifiques dans les urines. Nous préférons quant à nous, le terme de glycoprotéïnosés introduit par STRECKER et MONTREUIL, 1978 (62).

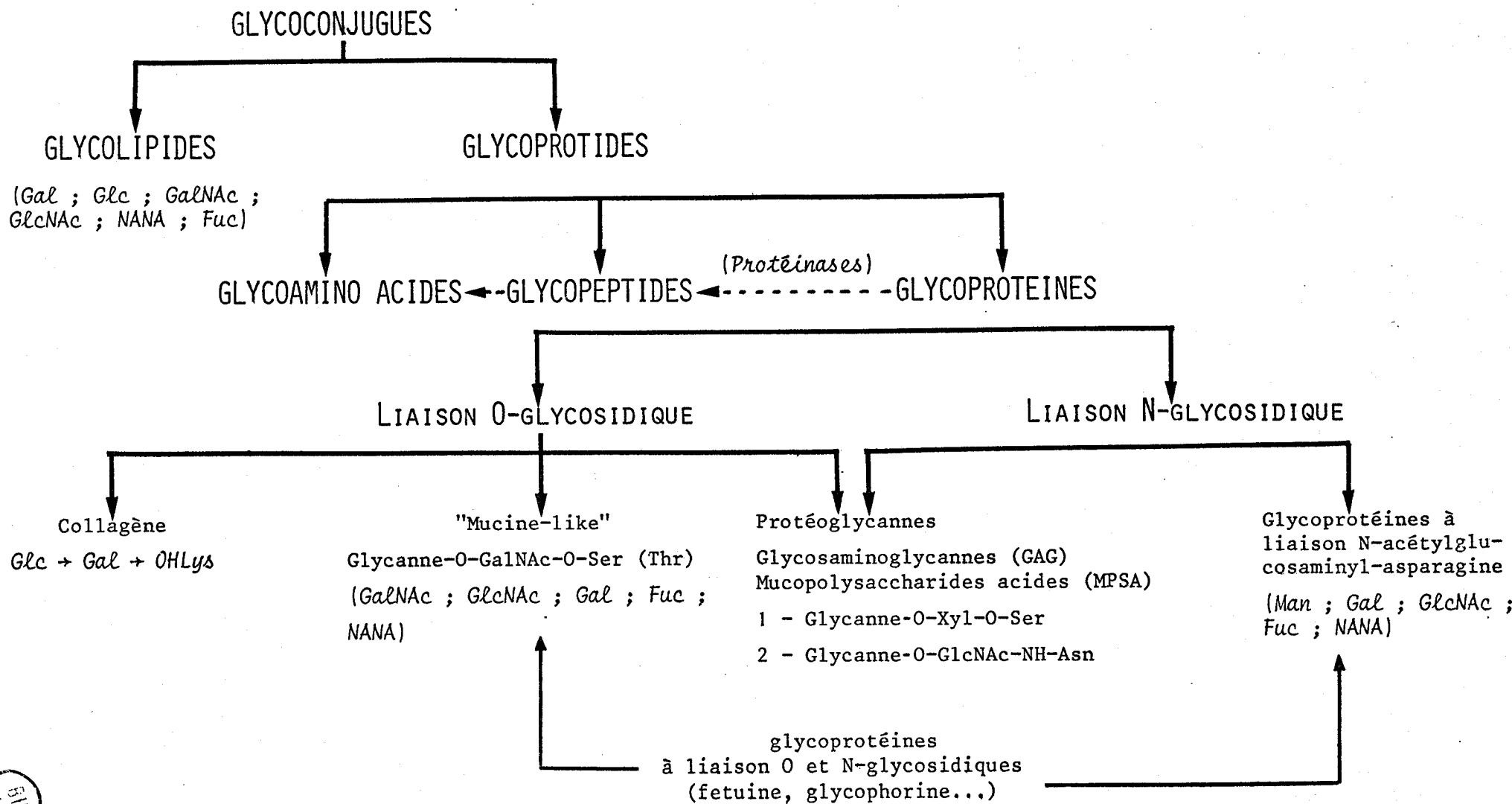
Ces maladies héréditaires, transmissibles suivant un mode autosomal récessif sont caractérisées par un déficit total ou partiel de l'activité de certaines hydrolases lysosomiales intervenant dans le catabolisme des glycoconjugués. Ce catabolisme incomplet, se traduit par une excrétion urinaire massive d'oligosaccharides spécifiques de l'enzyme déficiente.

Jusqu'à présent 5 troubles étaient regroupés sous ce nouvel éponyme

- la fucosidose due à une déficience en  $\alpha$ -fucosidase DURAND et al., 1969 (63)
- la GM<sub>1</sub> gangliosidose due à une déficience en  $\beta$ -galactosidase O'BRIEN et al., 1965 (64)
- la mannosidose due à une déficience en  $\alpha$ -mannosidase OCKERMAN, 1967 (65)
- la maladie de SANDHOFF due à une déficience en hexosaminidases A et B SANDHOFF et al., 1968 (66)
- l'aspartylglycosaminurie due à une déficience en l-aspartamido- $\beta$ -N-acetylglucosamine hydrolase JENNER et POLLITT, 1967 (67).

Afin de mieux comprendre les bases biochimiques de ces maladies nous ferons précéder notre exposé d'une brève revue sur les glycoprotéïnes.

Figure 6 : Classification des glycoconjugués d'origine animale



## B - SCHEMA GENERAL DE STRUCTURE DES GLYCOPROTEINES

Les glycoprotéines sont largement distribuées dans la nature où elles assurent un grand nombre de fonctions ; on les trouve dans le sang, les liquides de sécrétion, dans les membranes cellulaires ainsi que dans les tissus conjonctifs... Elles représentent un groupe très diversifié, allant de composés où la partie glucidique ne représente que 1 % du poids total à d'autres où elle représente plus de 80 % du poids. Ces glycoprotéines résultent de l'association covalentielle d'un polysaccharide ou glycane avec une protéine. Une classification plus détaillée est représentée sur la figure 6. Les protéoglycannes qui sont classés séparément des autres glycoprotéines comprennent les chondroitines sulfate, le dermatan sulfate et l'héparine ; ils sont principalement formés de chaînes hétéropolysaccharidiques attachées par intervalles espacés à une chaîne polypeptidique.

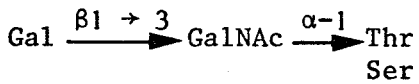
Les sucres les plus couramment rencontrés dans les autres types de glycoprotéines sont le galactose, le mannose, la N-acetylglucosamine, la N-acetylgalactosamine, les acides sialiques, le fucose et moins fréquemment le glucose et le xylose.

Le L-fucose et l'acide sialique occupent généralement la position terminale non réductrice de la chaîne glycanique. Dans tous les cas, la liaison entre le sucre et l'acide aminé est du type "glycosidique", soit N-glycosidique, soit O-glycosidique (Fig. 7 et 8).

Comme nous le verrons plus loin, les glycoprotéinoses proprement dites s'accompagnent de l'accumulation urinaire de constituants riches en mannose, et ce caractère permet de les rattacher au catabolisme des glycoprotéines à liaison N-acetylglucosamine-asparagine.

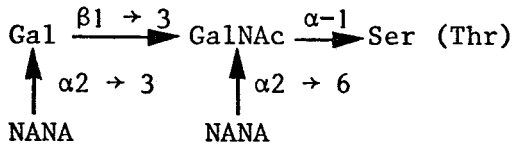
Les résultats les plus récents concernant ce type de glycoprotéines ont mis l'accent sur une certaine unité de structure que MONTREUIL, 1975 (68) a pu classer en deux groupes :



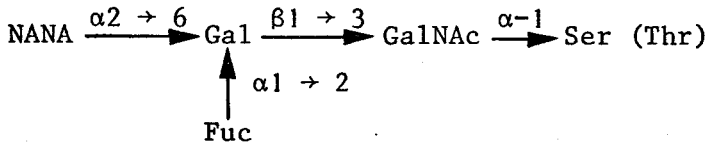


"Antifreeze glycoprotein" (DE VRIES *et al.*, 1971) (69)

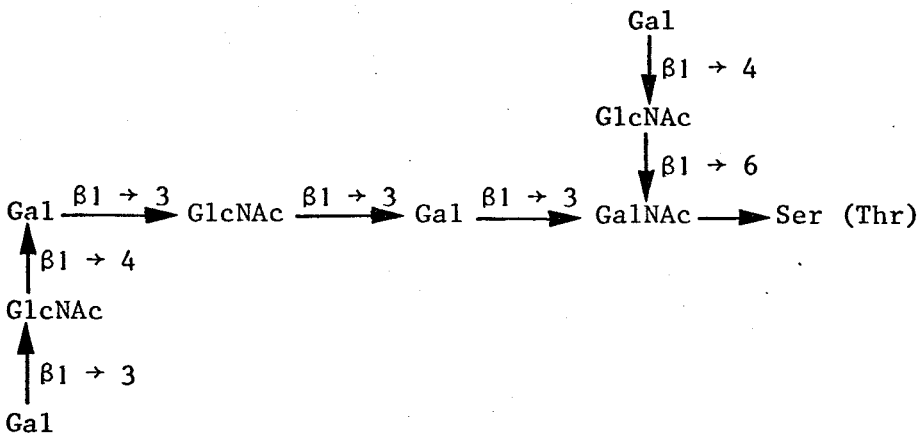
"IgA<sub>1</sub> humaine" (BAEZINGER *et* KORNFELD, 1974) (69bis)



Fetaine (SPIRO *et* BHOYRO, 1974) (70)



Mucine submaxillaire de porc PSM AH<sup>-</sup> (BAIG *et* AMINOFF, 1972) (71)

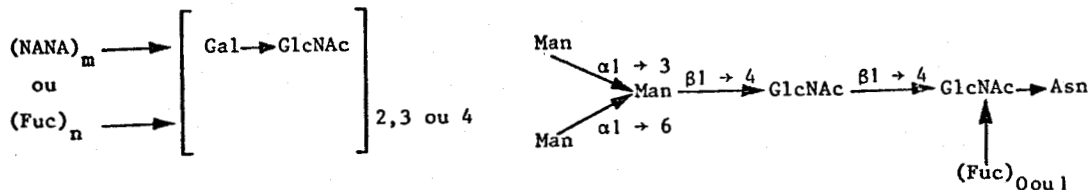


"Noyau" commun à de nombreuses substances de groupe sanguin (FEIZI *et al.*, 1971) (72)

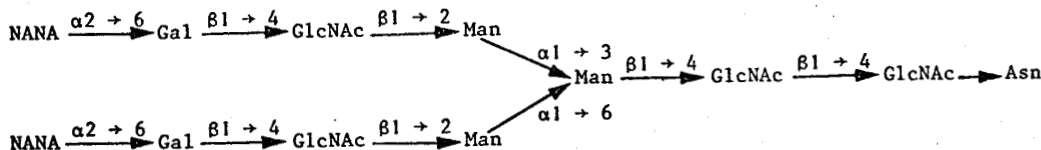
FIGURE 7

Glycoprotéines de type O-glycosidique

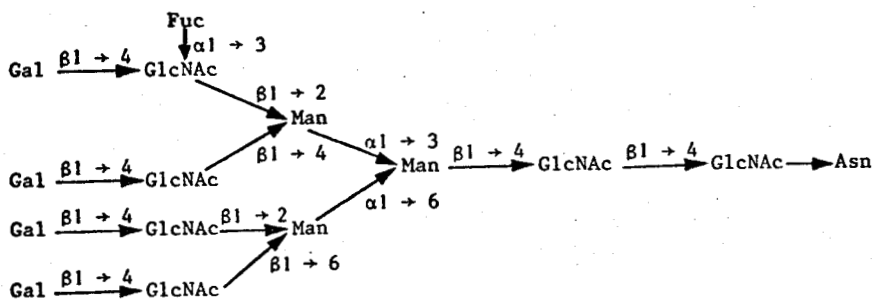
Type lactosaminique



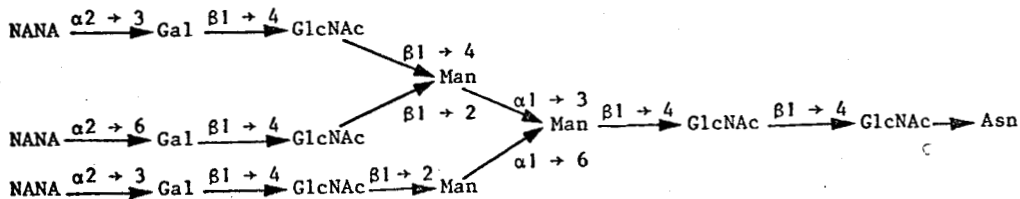
Exemples



Transferrine humaine (SPIK et al., 1975) (73)

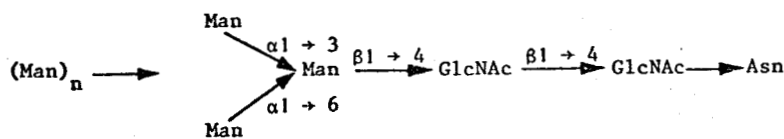


Asialo orosomucoïde humain (FOURNET et al., 1978) (74)

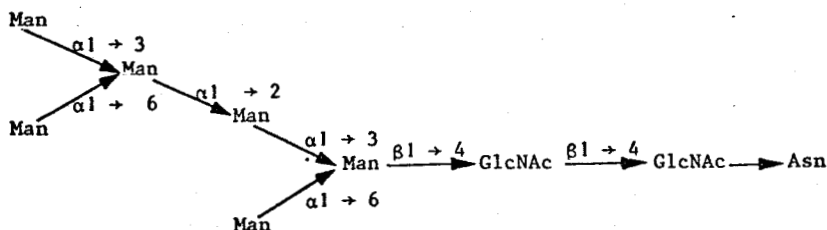


Fetaine (NILSON et SVENSSON, 1978) (75)

Type oligomannosidique



Exemple



IgM humaine (HICKMAN et al., 1972) (76)

FIGURE 8

Structure des glycoprotéines de type N-glycosidique

- glycannes de type "N-acétyllactosaminique"
- glycannes de type "oligomannosidique"

Ces deux types de structure résultent de la substitution d'un "noyau" commun : le mannotriosido-di-N-acétylchitobiose par un nombre variable, soit de résidus de N-acétyllactosamine, soit de molécules de mannose. Dans le premier cas le glycanne est ultérieurement "achevé" par des résidus d'acide N-acétylneuraminique ou de fucose en nombre variable et en position "externe".

### C - CATABOLISME DES GLYCOPROTEINES

#### 1 - Turnover

Les glycoprotéines sont constamment utilisées et remplacées par des molécules nouvellement synthétisées. Le "turnover" des protéines plasmatiques fortement glycosylées est généralement beaucoup plus rapide que celui des protéines faiblement glycosylées (WINZLER et BOCCI, 1972) (77). La chaîne glycanique semblerait donc jouer un rôle important dans ces processus. EYLAR en 1965 (78) proposait que le rôle biologique des chaînes glycaniques serait d'agir comme un signal chimique qui, en interagissant avec un site récepteur membranaire ou un transporteur, permettrait le transport des molécules nouvellement synthétisées de la cellule vers le milieu extracellulaire. Le glycanne servirait donc de "passeport de sortie" aux glycoprotéines.

Les travaux effectués par ASHWELL et MORELL, 1971 (79) semblent indiquer que la chaîne glycanique pourrait également servir de signal d'entrée des glycoprotéines en vue de leur catabolisme dans le lysosome.

VAN DE HAMER, 1970 (80) a montré que le démasquage de deux résidus de galactose sur les chaînes glycaniques de la ceruléoplasmine traitée par la neuraminidase, suffisait à entraîner la reprise immédiate de cette glycoprotéine par les hépatocytes.

MORELL et al. (1971) (81) ont montré qu'il s'agissait en fait d'un phénomène général puisque l'orosomucoïde, la fétuine, l'haptoglobuline, l' $\alpha_2$ -macroglobuline, la thyroglobuline, la lactotransferrine sont acceptés de la même

manière après traitement par la neuraminidase. La seule exception est constituée par la transferrine.

Le signal de reconnaissance pour les hépatocytes semble donc bien être le galactose, puisqu'une modification de ce signal par la galactose oxydase par exemple, entraîne une inhibition du phénomène de reprise avec rétablissement d'une demie-vie normale pour la céruléoplasmine sérique MORELL et al. (1968) (82). L'acide sialique jouerait donc un rôle protecteur pour la glycoprotéine et son enlèvement serait signe de vieillissement pour la molécule, entraînant ainsi sa reprise spécifique par un site récepteur membranaire ; elle serait ensuite transportée sélectivement à l'intérieur de l'hépatocyte et catabolisée dans les lysosomes.

En fait la nature des signaux de reconnaissance semble varier suivant les tissus ; si le galactose en position penultième dans les chaînes glycaniques semble servir de reconnaissance pour les hépatocytes, le démasquage de la N-acétylglucosamine succédant directement au galactose entraîne cette fois une localisation préférentielle des glycoprotéines dans le rein (WINKELHAKE et NICHOLSON, 1976) (83).

Des études similaires ont pu montrer que le mannose servait de signal de reconnaissance pour la reprise des glycoprotéines par les fibroblastes en culture (HIEBER et al., 1976) (84).

Enfin des études récentes semblent également indiquer un rôle important des composés phosphohexosyl dans la reprise cellulaire de certaines glycoprotéines (KAPLAN et al., 1977) (85).

On a pu montrer que beaucoup d'hydrolases acides lysosomales, y compris celles agissant sur les glycoprotéines, étaient elles-mêmes des glycoprotéines. Leur reprise par la cellule s'effectuerait donc de manière analogue à ce qui a été décrit pour les autres molécules. Et en particulier une étude réalisée par STAHL et al., 1976 (86) a montré que l'oxydation périodique abolissait la reprise

des enzymes par la cellule, mettant ainsi en évidence le rôle de la chaîne glycanique. Ces auteurs ont en outre montré qu'après injection à des rats de préparations hautement purifiées de  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -galactosidase et  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase, ces enzymes disparaissaient rapidement de la circulation, avec une demi-vie d'environ 1 à 4 minutes. L'injection d'asialo-orosomucoïde s'averait sans effet, par contre l'agalactoorosomucoïde accroissait de façon significative la durée de vie dans le sérum. Ces résultats semblent mettre en évidence une compétition entre les résidus exposés de N-acétylglucosamine de l'orosomucoïde et des structures semblables sur les enzymes natifs, pour un même site récepteur membranaire.

## 2 - Catabolisme des glycoprotéines.

Des enzymes capables de couper les différents types de liaisons rencontrées dans les glycoprotéines sont largement distribuées dans la nature.

Dans les tissus tels que le foie et le rein, ces enzymes ont pu être localisées au sein des lysosomes.

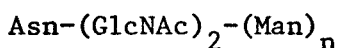
Des glycosidases ont également pu être mises en évidence dans d'autres compartiments cellulaires, en particulier au niveau de la membrane et du cytosol ; cependant, il semble que les lysosomes soient néanmoins le lieu le plus important du catabolisme des glycoprotéines.

La dégradation de la chaîne protéique sous l'action des protéases semble s'effectuer avant l'action des glycosidases, qui n'agissent pas sur des glycoprotéines natives, mais sur de petits glycopeptides. La dégradation de la chaîne glycanique, s'effectue par l'intermédiaire de deux types d'enzymes :

- des exoglycosidases qui agissent de manière récurrente en commençant par l'extrémité terminale non réductrice de la chaîne glycanique.

- des endoglycosidases qui sont capables de couper à l'intérieur des chaînes glycaniques.

Plusieurs endo- $\beta$ -N-acétylglucosaminidases ont été mises en évidence dans les tissus de mammifères (NISHIGAKI et al., 1974) (87) ; (TARENTINO et MALEY, 1976) (88). Ces enzymes agissent sur des glycopeptides du type :



au niveau des résidus di-N-acétylchitobiosiques.

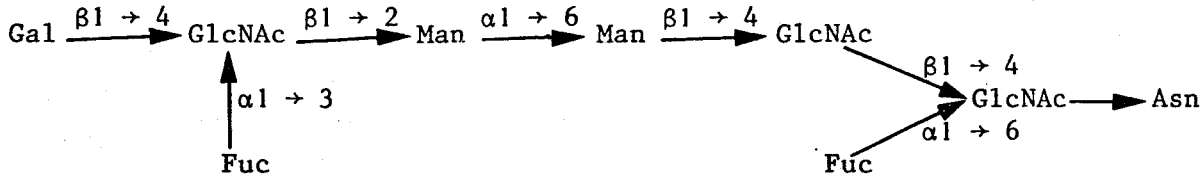
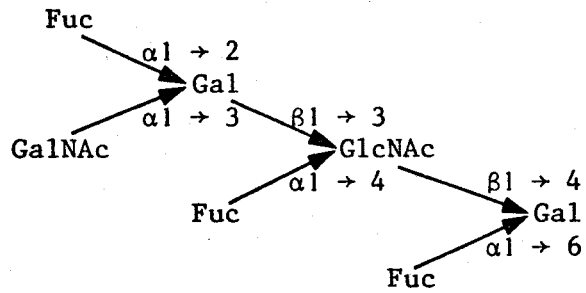
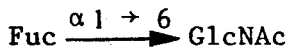
L'action conjuguée d'exo- et d'endoglycosidases aboutit à la libération de sucres libres qui peuvent être réemployés dans d'autres métabolismes cellulaires, ou de petits glycopeptides qui peuvent être excrétés par la cellule et qui se retrouvent en faible quantité dans les urines normales (BOURRILLON, 1972) (89) ; (STRECKER et LEMAIRE-POITAU, 1977) (90).

### 3 - Maladies du catabolisme des glycoprotéines : "glycoprotéinoses"

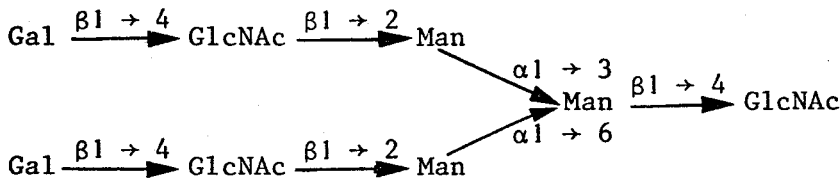
Toutes les "glycoprotéinoses" connues sont dues à un déficit en exoglycosidase.

Cependant il est bien certain qu'un déficit en endoglycosidase peut exister et reste à découvrir. L'existence d'une endoglycosidase agissant sur les chaînes glycaniques de glycoprotéines de type "N-acétyllactosaminique" est d'ailleurs renforcée par le fait que dans des maladies aussi différentes que la mannosidose (NÖRDEN et al. 1974) (91), la fucosidose (STRECKER et al. 1977a) (92), la GM<sub>1</sub> gangliosidose (WOLFE et al. 1974) (93) et la maladie de SANDHOFF (STRECKER et al. 1977b) (94), on note l'excrétion d'oligosaccharides possédant une N-acétylglucosamine en position terminale réductrice témoignant ainsi d'une coupure par une endoglycosidase au niveau du di-N-acétylchitobiose.

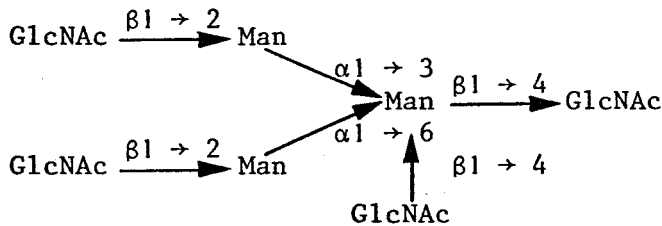
Le déficit enzymatique dans ces maladies se traduit par un engorgement des cellules par des oligosaccharides ou des glycopeptides possédant en position terminale non réductrice, un sucre caractéristique de l'enzyme déficient. Les mêmes composés se retrouvent dans l'urine. Les structures de quelques oligosaccharides isolés des principales glycoprotéinoses sont données sur la fig. 9.



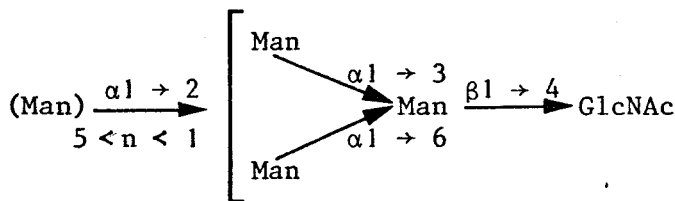
Fucosidose (STRECKER et al., 1977) (95)



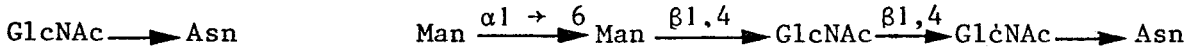
GM<sub>1</sub> gangliosidose (WOLFE et al., 1974) (96)



GM<sub>2</sub> gangliosidose variant 0 (STRECKER et al., 1977) (97)



Mannosidose (STRECKER et al., 1976) (98)



Asparaginyglucosaminurie (JENNER et POLLITT, 1967) (99)  
 (LUNDBLAD et al., 1976) (99 bis)

FIGURE 9

Structure des principaux oligosaccharides et glycopeptides isolés des urines de différentes glycoprotéinoses

## V - LES MUCOLIPIDOSES

### A - GENERALITES

Le terme de "mucolipidoses" fut crée en 1970 par SPRANGER (100) pour désigner un ensemble de maladies héréditaires caractérisées par une accumulation excessive de mucopolysaccharides acides, de sphingo- ou glyco-lipidides dans les cellules viscérales et mesenchymateuses avec un taux normal de ces mêmes composés dans les tissus nerveux.

Les patients atteints de ces maladies présentent tous les signes cliniques des mucopolysaccharidoses, avec cependant une mucopolysaccharidurie normale.

En plus de ces signes, s'ajoutent la présence de lymphocytes vacuolés, la présence d'une tache rouge cerise en fond d'oeil, ainsi qu'une dégénération de la myeline des nerfs périphériques.

Nous avons vu que certaines de ces maladies telles la GM<sub>1</sub> gangliosidose, la mannosidose, la fucosidose pouvaient maintenant être rattachées au groupe des glycoprotéinoses.

Le groupe des mucolipidoses proprement dites constitue donc un groupe d'attente, regroupant des maladies présentant un spectre clinique très étendu, et dont le déficit génétique, responsable des troubles observés, demeurait inconnu à ce jour.

Le groupe des Mucolipidoses comprend :

- la Mucolipidose de type I ou lipomucopolysaccharidose
- la Mucolipidose de type II ou "I cell disease"
- la Mucolipidose de type III ou pseudopolydystrophie de HURLER
- les Mucolipidoses De P. et L.W. (d'après le nom des malades)
- la Mucolipidose de type IV



## B - MUCOLIPIDOSE DE TYPE I

### 1 - Caractéristiques cliniques

La mucopolipidose de type I a été reconnue comme une entité nosologique distincte par SPRANGER (101) et BERARD (102) en 1968.

Il s'agit d'une maladie neurodégénérative, présentant les signes cliniques d'une maladie de HURLER (gargoylisme, retard mental, dysmorphies osseuses), sans qu'il y ait excrétion urinaire de mucopolysaccharides acides. On note parfois la présence d'une tache rouge cerise en fond d'oeil témoignant d'une dégénérescence cornéenne.

### 2 - Cytologie

On note la présence de lymphocytes vacuolés. D'autre part in vivo les fibroblastes en culture présentent d'énormes vacuoles (VAN HOOFF, 1972) (103), ainsi que quelques granules réfringents en microscopie en contraste de phase, qui se colorent en bleu après traitement par le bleu de toluidine.

### 3 - Enzymologie

Les activités enzymatiques mesurées dans le sérum et dans les fibroblastes en culture sont normales (Tableaux IV et V) mis à part la phosphatase acide et la  $\alpha$ -N-acétyl hexosaminidase qui sont légèrement augmentées dans les fibroblastes et le sérum respectivement. Par contre (Tableau IV) la plupart des enzymes présentent une hyperactivité dans les hépatocytes.

## C - LES MUCOLIPIDOSES II ET III

### 1 - Généralités

La Mucopolipidose de type II (De MARS et LEROY, 1967) (107) et sa forme atténuée la Mucopolipidose de type III (MAROTEAUX et LAMY, 1966) (108) sont des maladies transmissibles héréditairement suivant un mode autosomal récessif.

TABLEAU IV

Activité des hydrolases acides lysosomiales en nmoles/mg protéine dans les fibroblastes de patients atteints de MLP I

D'après SPRANGER et al. 1977 (104)

Enzyme	Contrôles (n = 6)	Patients
$\beta$ -D-glucuronidase	1,80 - 6,05	5,01
$\beta$ -D-galactosidase	5,60 - 9,53	7,16
$\alpha$ -N-acétyl-D-glucosaminidase	0,07 - 0,19	0,10
$\beta$ -N-acétyl-D-glucosaminidase	104 - 211	146
$\alpha$ -L-fucosidase	0,32 - 1,31	0,32
$\alpha$ -D-mannosidase	0,69 - 1,61	1,11
Arylsulfatase A	4,21 - 12,02	7,73
Phosphatase acide	6,96 - 15,25	19,80

TABLEAU V

Activité des hydrolases acides lysosomiales en (nmoles/ml sérum) dans le sérum de malades atteints de MLP I

D'après SPRANGER et al. 1977 (105)

Enzyme	Contrôles (n = 25)	Patients
$\beta$ -D-glucuronidase	0,28 - 1,99	1,19
$\alpha$ -N-acétyl-D-glucosaminidase	0,16 - 0,95	0,68
$\beta$ -N-acétyl-D-glucosaminidase	8,92 - 27,07	38,95
$\alpha$ -D-mannosidase	0,65 - 1,37	1,02
Arylsulfatase A	0,10 - 0,69	0,29
Phosphatase acide	4,63 - 35,74	23,21



TABLEAU VI

Activité enzymatique dans les hépatocytes de sujets normaux et de malades atteints de MLP I (activités exprimées en % de l'activité normale)

D'après SPRANGER et WIEDEMAN, 1970 (106)

Enzymes	Contrôles	Patient 1	Patient 2
$\beta$ -D-glucuronidase	34 - 211	633	556
$\beta$ -D-galactosidase	43 - 194	627	358
N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase	48 - 221	685	1280
N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminidase	44 - 148	119	99
$\alpha$ -D-mannosidase	34 - 208	49	111
$\alpha$ -L-fucosidase	38 - 215	613	495
$\alpha$ -D-galactosidase	35 - 258	300	213
$\beta$ -D-glucosidase	34 - 181	204	242
$\alpha$ -D-glucosidase	35 - 270	505	534
$\alpha$ -L-arabinosidase	59 - 148	460	328
$\beta$ -D-xylosidase	36 - 210	122	250



Bien que le déficit génétique responsable soit encore inconnu bon nombre d'observations laissent suggérer qu'il s'agit d'un type particulier de maladie de surcharge lysosomiale.

## 2 - Signes cliniques

Les signes cliniques sont voisins de ceux des Mucopolysaccharidoses. On note une faciès gargoyle type HURLER, un retard psychomoteur sévère, des dysmorphies squelettiques importantes. Les signes cliniques de la Mucopolysaccharidose type III sont plus atténués et si la Mucopolysaccharidose type II conduit à une issue fatale vers l'âge de 1 an, la Mucopolysaccharidose type III apparaît à un âge plus tardif.

## 3 - Caractéristiques histochimiques

Une preuve directe de l'implication des lysosomes dans ces maladies, est la présence d'inclusions cytoplasmiques anormales in vivo et in vitro.

La mucopolysaccharidose II est encore appelée "I Cell disease" ou maladie des cellules à inclusion, en raison de l'aspect des fibroblastes en culture qui présentent en microscopie à contraste de phase, de nombreux granules réfringents (Fig. 10).

En microscopie électronique ces granules semblent être entourés d'une membrane. Les mêmes inclusions se retrouvent en moins grand nombre dans les fibroblastes MLP III.

On note également une vacuolisation des chondrocytes et des ostéocytes ainsi que des lymphocytes.

## 4 - Investigations chimiques : (nature du matériel accumulé)

### a) dans les fibroblastes

Le matériel accumulé dans les fibroblastes présente une réaction positive au P.A.S. et au noir Soudan (GILBERT et DAWSON, 1973) (110) ; (LEROY et HO, 1972) (111). Les tentatives faites pour élucider la nature chimique du matériel accumulé

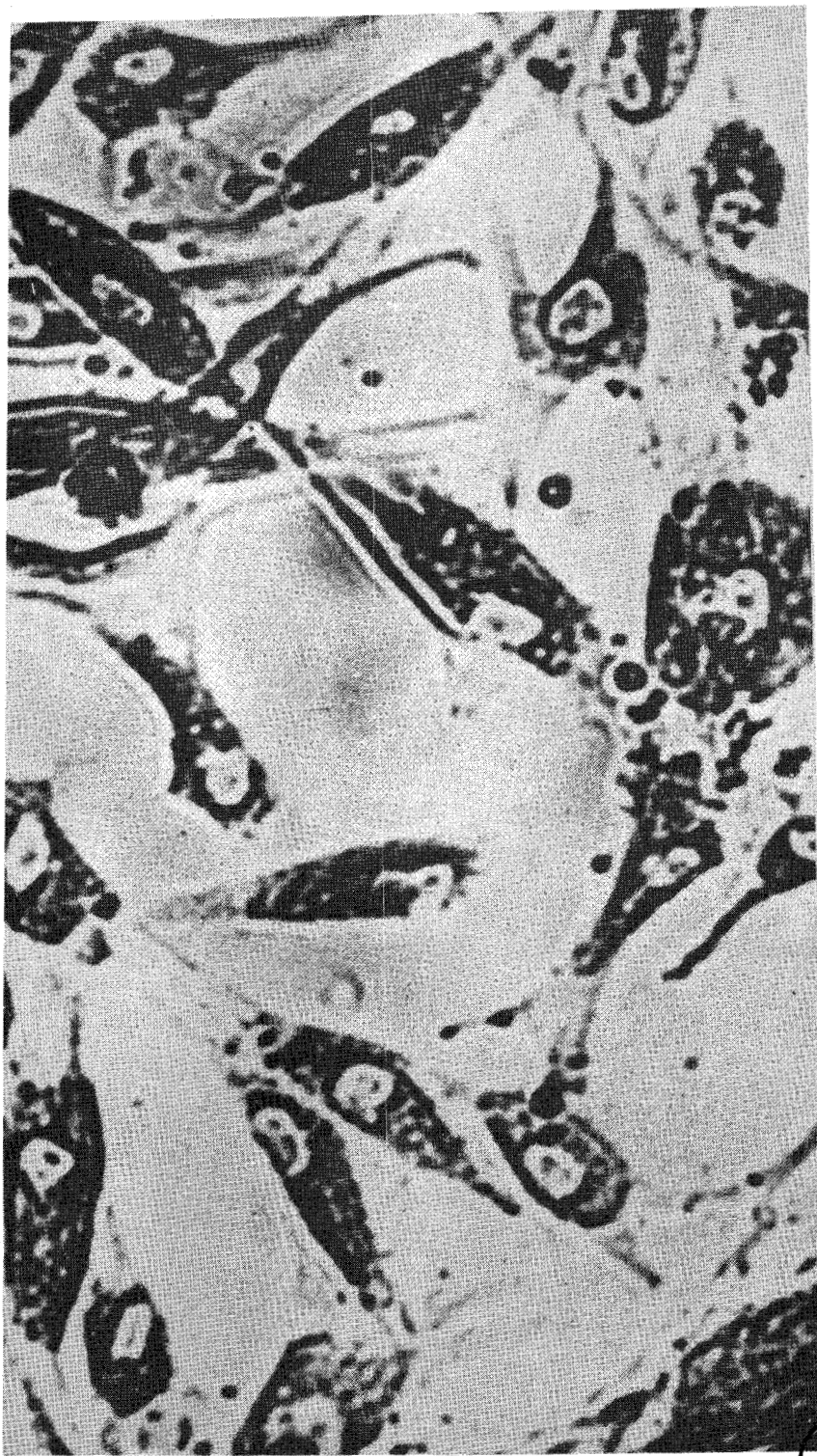


FIGURE 10

Fibroblastes "I Cell" observés au microscope à contraste de phase.

n'ont donné que des résultats assez fragmentaires et pour le moins contradictoires. DAWSON et al., 1972 (112) ont néanmoins pu mettre en évidence la présence de glycosphingolipides dans les fibroblastes en culture. Dans ces mêmes fibroblastes, la présence de MPSA à groupements sulfate a également été montrée par différents auteurs (SMICKEL et al., 1975) (113) ; (TONDEUR et al., 1971) (114). Les résultats les plus intéressants sont néanmoins ceux obtenus tout récemment par THOMAS et al., 1976 (115) qui ont mis en évidence une augmentation massive du taux d'acide sialique intracellulaire dans les fibroblastes en culture.

#### b) dans les milieux biologiques

Une des caractéristiques importantes de ces maladies, comme pour les autres Mucopolysaccharidoses est l'absence de mucopolysaccharidurie. BERMAN et al., 1974 (116) ont pu néanmoins mettre en évidence dans l'urine, une élévation des amino-sucres en particulier des N-acétylglucosamines, ainsi que des oses neutres, du fucose et de l'acide sialique, qu'ils attribuent à la présence anormale de composés de nature glycoprotéinique.

Une élévation analogue d'acide sialique est retrouvée par ORII et al., (117) dans le sérum.

### 5 - Anomalies enzymatiques

#### a) anomalies électrophorétiques

Plusieurs auteurs ont rapporté une anomalie des migrations électrophorétiques des enzymes dans les Mucopolysaccharidoses II et III (LIE et THOMAS, 1973) (118) ; (VLADUTIU et RATTAZZI, 1975) (119) ; (CHAMPION et SHOWS, 1977) (120).

LIE, puis VLADUTIU ont montré que les  $\beta$ -N-acétylhexosaminidases excrétées par les fibroblastes I Cell en culture présentaient une électronégativité plus grande que les enzymes secrétées par les fibroblastes normaux (Fig. 11).

Cette électronégativité résulterait d'une sialylation plus grande des enzymes et se voit diminuée après action de la neuraminidase. Une migration normale

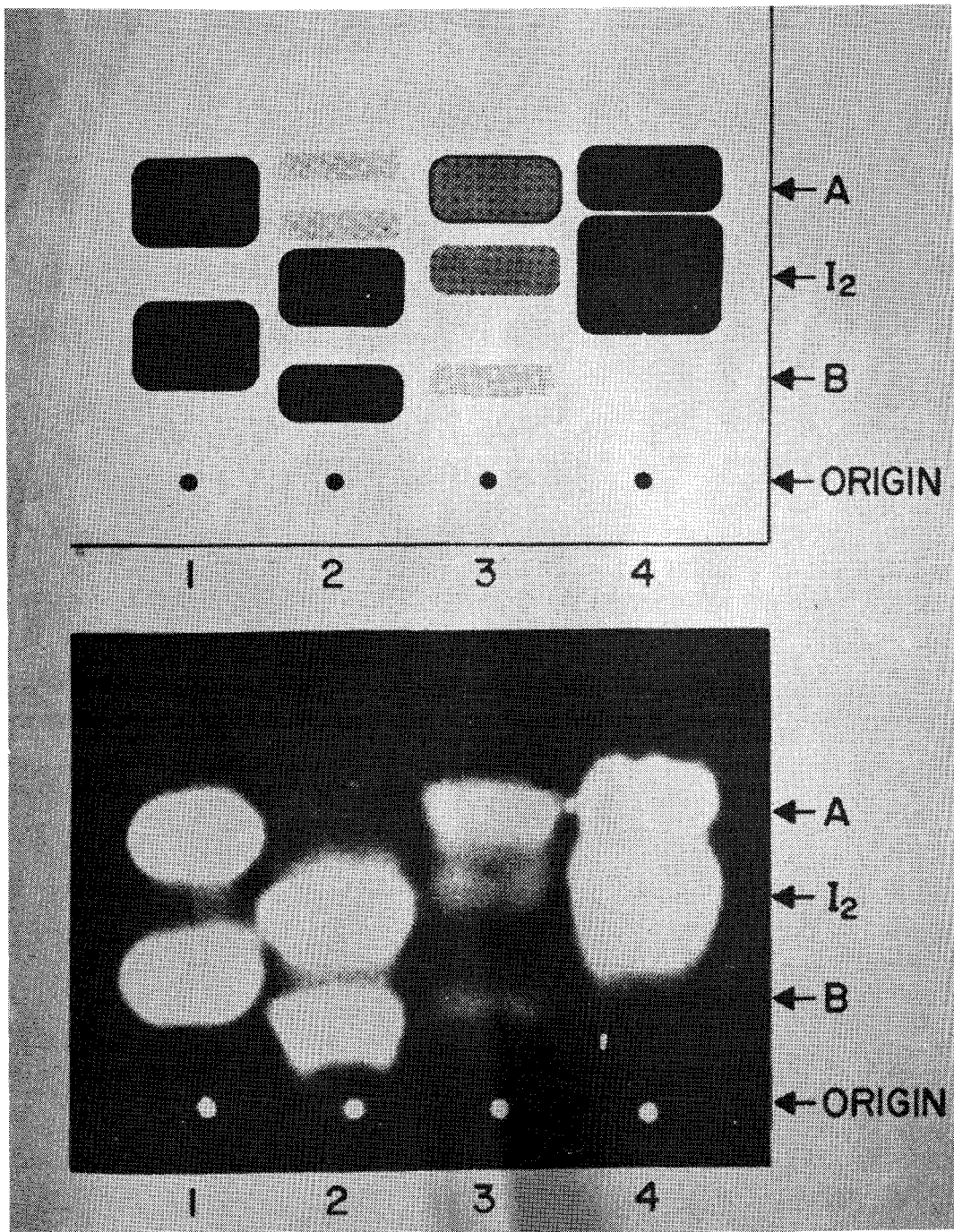


FIGURE 11

Electrophorèse sur acétate de cellulose des N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidoses

(D'après K.V. LIE, 1973) (123)

- 1 : fibroblastes normaux
- 2 : fibroblastes "I Cell"
- 3 : sérum normal
- 4 : sérum MLP II



est également obtenue après fusion cellulaire entre fibroblastes normaux et I Cell (CHAMPION et SHOWS, 1977) (121). Les enzymes non lysosomiales ne présentent pas d'anomalies électrophorétiques à l'exception toutefois de l'adénosine déaminase.

b) anomalies

Les activités enzymatiques mesurées dans divers types cellulaires et milieux biologiques, sont résumées dans les Tableaux VII et XI. On note une hyperactivité enzymatique dans le sérum et le milieu de culture des fibroblastes, ceci contrastant avec une activité amoindrie des mêmes enzymes à l'intérieur des fibroblastes.

Seules 3 enzymes voient leur activité maintenue dans le fibroblaste il s'agit de l' $\alpha$ -glucosidase, de la xylosidase et la phosphatase acide. Les enzymes leucocytaires et hépatiques conservent une activité normale ou amoindrie (à l'exception toutefois de la  $\beta$ -galactosidase qui est fortement diminuée.

Tout récemment DI DONATO, 1977 (122) a également mis en évidence une diminution de l'activité de nombreuses ectosyltransférases dans les fibroblastes (Tableau XII).

6 - Théories sur la pathogénèse de la maladie

Bien qu'aucun déficit génétique primaire n'ait été à ce jour clairement établi, plusieurs théories ont été émises afin d'expliquer les anomalies enzymatiques rencontrées, proposant soit une altération de l'exocytose ou de la pinocytose des enzymes, une modification post translationnelle des enzymes, ou une sialylation anormale.

a) théorie de WEISMANN-HERSCHKOWITZ : perméabilité excessive de la membrane lysosomiale

Le fait que plusieurs des enzymes déficientes dans le fibroblaste présentent une hyperactivité dans le milieu de culture, a conduit WEISMANN et HERSCHKOWITZ, 1974 (130) à émettre l'hypothèse d'une augmentation de la perméabilité membranaire, qui aurait pour effet une "fuite" des enzymes vers le milieu extérieur.



Activité des hydrolases acides lysosomiales dans les fibroblastes. (Activité exprimée en nmoles/h/mg protéine, mesurées à l'aide de substrats synthétiques methylumbelliferyl)

(D'après BERMAN, 1974)(124)

Enzymes	contrôles	I.C.D.	%	MLP III	%
$\beta$ -D-galactosidase	312 - 592	3,17	1	93	21
$\alpha$ -D-galactosidase	15 - 60	3,09	8	9	24
$\beta$ -D-glucuronidase	59 - 203	7,92	6	44	37
$\alpha$ -L-fucosidase	16 - 64	1,79	4	-	0
$\alpha$ -D-mannosidase	49 - 136	16,22	17	16	17
Phosphatase acide	627 - 870	617	82	807	108
$\beta$ -D-N-acétylglucosaminidase	2925 - 8040	122,8	2	735	14
$\beta$ -D-glucosidase	21 - 98	111	187	116	195

TABLEAU VIII

Activité des hydrolases acides lysosomiales dans le milieu de culture de fibroblastes normaux et MLP III (ND : non décelable). Activité en nmoles/h/mg protéine.

D'après BERMAN, 1974 (125)

Enzymes	Contrôles	MLP III
$\beta$ -glucuronidase	ND	46
Arylsulfatase A	ND	385
$\alpha$ -L-fucosidase	ND	ND
$\alpha$ -galactosidase	0 - 16	15
$\beta$ -galactosidase	10 - 49	99
N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminidase	409 - 924	1205
N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase	4050 - 9483	9780
Phosphatase acide	ND	ND



TABLEAU IX

Activité des hydrolases acides dans les leucocytes (nmoles/h/mg protéine)

D'après WENGER, 1976 (126)

Enzymes	Contrôles	I.C.D.	%
$\beta$ -galactosidase	96,2	57,0	59,2
$\beta$ -glucuronidase	337,9	296,1	87,6
$\alpha$ -D-mannosidase	223,8	232,8	104
$\alpha$ -L-fucosidase	61,5	65,4	106,3
$\beta$ -D-glucosidase	8,61	11,0	128
$\beta$ -D-Nac-glucosaminidase	717,6	697,5	97,2
hexosaminidase A	60	45,8	76,3

TABLEAU X

Activités des hydrolases acides dans le sérum

D'après BERMAN, 1974 (127)

Enzymes	Contrôle	MLP III	%
N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase	751	5365 - 26083	2000
$\beta$ -D-galactosidase	26	144 - 634	1496
$\alpha$ -L-fucosidase	277	905 - 3175	736
Arylsulfatase A	57	812 - 1444	1979
Phosphatase acide	460	966 - 1108	225
$\beta$ -glucuranidase	49	2200 - 2260	4551
$\alpha$ -D-mannosidase	57	2460 - 4060	5719



TABLEAU XI

- 53 -

Mesure des activités des hydrolases acides hépatiques chez des sujets sains et atteints de MLP II. (nmoles/h/mg protéine).

D'après NAGASHIMA, 1977 (128)

Enzymes	I.C.D.	Contrôles
$\alpha$ -galactosidase	29	56 - 192
$\beta$ -galactosidase	14	442 - 1540
$\alpha$ -glucosidase	234	243 - 690
$\beta$ -glucosidase	4,7	3,0 - 38,0
$\alpha$ -mannosidase	62	75 - 160
$\alpha$ -fucosidase	263	220 - 1120
N-acétyl- $\beta$ -glucosaminidase	1181	1465 - 4460
$\beta$ -glucuronidase	303	417 - 1120
$\beta$ -xylosidase	0,35	0,15 - 3,37
Acide phosphatase	1900	775 - 2630
Arylsulfatase A	76	55 - 540

TABLEAU XII

Activité des ectosyltransférases dans les fibroblastes normaux et de sujets atteints de mucopolidose type II. (Activités exprimées en dpm/mg protéine/h).

D'après DI DONATO et al., 1977 (129)

Enzymes	Contrôles	Patients	%
Glucosyl-transférase	2830 $\pm$ 850	3480 - 3530	124
Galactosyl-transférase	1890 $\pm$ 300	890 - 960	49
N-acétyl-glucosaminyl-transférase	400 $\pm$ 110	250	63
N-acétyl-galactosaminyl-transférase	510 $\pm$ 60	190	37
Sialyl-transférase	4150 $\pm$ 720	2450 - 3550	72
Fucosyl-transférase	560 $\pm$ 160	280 - 320	54



Dans ce cas l'anomalie primaire, à la différence des autres maladies lysosomiales, ne serait pas un déficit enzymatique, mais une anomalie de la membrane lysosomiale.

Néanmoins, cette hypothèse s'est vue réfutée par le fait qu'un traitement par des composés reconnus comme stabilisateurs de la membrane lysosomiale tels les corticoïdes, le phénergan ou la prédnisone s'est avéré sans effet sur l'élévation du taux enzymatique dans le plasma (WEISMANN et al., 1974) (131) ; (WALBAUM et al., 1973) (132).

b) endocytose anormale : hypothèse de NEUFELD (133)

Après leur biosynthèse dans le réticulum ergastoplasmique, les enzymes lysosomiales seraient excrétées dans le milieu extracellulaire, peut être par l'intermédiaire de vésicules de sécrétion, avant d'être reprises par un récepteur membranaire, pour subir une endocytose sélective, et être empaquetées dans les lysosomes.

Avant leur sécrétion, les enzymes seraient équipées d'un "signal de reconnaissance" qui permettrait leur reprise spécifique par le récepteur membranaire (Fig. 12). Cette hypothèse est renforcée par le fait que certaines hydrolases acides, telle la N-acétylglucosaminidase introduite dans le milieu de culture des fibroblastes, sont reprises par un mécanisme actif et sélectif ; ces enzymes peuvent ensuite être localisées de façon précise à l'intérieur du lysosome (HICKMAN et NEUFELD, 1972) (134). Chaque enzyme existerait sous deux formes, une forme de reprise "lente", et une forme de reprise "rapide" (Tableau XIII). Une reprise est considérée comme "lente" si seulement 1 % de la quantité d'enzyme introduite dans le milieu est endocytée au bout de 1 à 2 jours ; au dessus de cette valeur la reprise est considérée comme rapide, cette reprise n'atteignant jamais plus de 25 % de la quantité d'enzyme ajoutée.

D'autre par la cinétique de reprise de l'enzyme serait du type Michaelien et serait saturable par un excès de substrat.

TABLEAU XIII

Diverses localisations des formes de reprise "lente" et "rapide" des hydrolases acides lysosomiales

(D'après NEUFELD et al., 1977) (138)

Enzymes	"reprise rapide"	"reprise lente"
$\alpha$ -L-iduronidase	urine	urine, rein
$\beta$ -hexosaminidase	fibroblastes	placenta, foie
$\alpha$ -N-acétylglucosaminidase	urine	placenta
Arylsulfatase A	urine	
$\beta$ -galactosidase	testicule de taureau	
iduronate sulfatase	urine	sérum

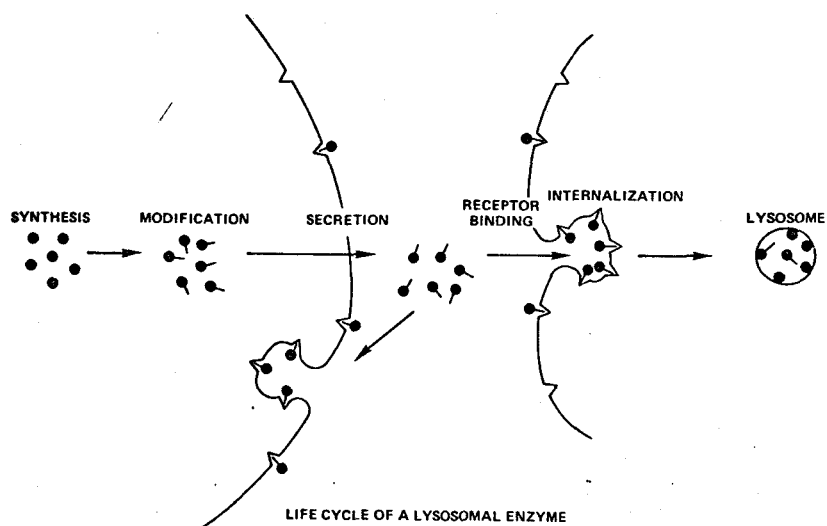


FIGURE 12

Hypothèse de la "secrétion-recapture" de NEUFELD et al., 1977 (137)



Le fait qu'une enzyme puisse passer de sa forme de reprise "rapide" à une forme de reprise "lente" par simple traitement par le  $\text{NaIO}_4$  (HICKMAN et al., 1974) (135) sans qu'il y ait altération du site catalytique, semble indiquer que le signal de reconnaissance porté par l'enzyme serait de nature glucidique. Les fibroblastes I-Cell possèdent le même pouvoir de reprise enzymatique que des fibroblastes normaux, c'est ainsi que l' $\alpha$ -L-iduronidase introduite dans le milieu de culture de fibroblastes I-Cell est reprise avec la même constante cinétique que des fibroblastes normaux, et l'activité  $\alpha$ -L-iduronidasique est maintenue durant 9 jours (HICKMAN et NEUFELD, 1972) (136). Il semble donc que les récepteurs membranaires ne soient pas altérés.

Par contre, les enzymes excrétées par les fibroblastes I-Cell présentent un phénomène de reprise "lente". Sur la base de ces données, NEUFELD émet donc l'hypothèse que les anomalies observées dans les fibroblastes I-Cell, seraient dues à une mutation dans la synthèse du signal de reconnaissance porté par l'enzyme, ce qui expliquerait qu'après leur sécrétion dans le milieu extracellulaire, elles ne soient plus reconnues par la cellule, et s'accumuleraient dans le milieu extracellulaire.

c) exocytose anormale

Se basant sur le fait que les fibroblastes I-Cell puissent retenir les enzymes normales (HICKMAN et NEUFELD, 1972) (139) ; (WEISMANN et al., 1971) (140) ; (VLADUTIU et RATAZI, 1975) (141) proposent que le taux élevé des hydrolases acides dans le milieu de culture ne serait pas dû à une "fuite" des enzymes des lysosomes secondaires, mais résulterait d'une exocytose anormale à la suite d'une fusion préférentielle des lysosomes primaires dérivant du Golgi avec la membrane plasmique au lieu des vacuoles pinocytiques.

Ces auteurs ont pu d'autre part mettre en évidence une électronégativité anormale des enzymes excrétées par les fibroblastes I-Cell, la migration électrophorétique se voyant rétablie après action neuraminidasique.

A l'opposé, on peut noter à l'intérieur des fibroblastes la présence de formes enzymatiques moins électronegatives que les enzymes normaux résultant d'une glycosylation incomplète des enzymes dérivant du réticulum endoplasmique. Ces enzymes seraient ensuite sialylées au niveau du Golgi et excrétées immédiatement, au lieu d'être désialylées au niveau des vacuoles digestives.

La reprise des enzymes par le fibroblaste s'effectuerait de manière analogue à ce qui a été décrit par ASHWELL ET MORELL, 1971 (142) pour les protéines plasmatiques, l'addition d'une molécule d'acide sialique sur les chaînes glycaniques, entraînerait un masquage du signal de reconnaissance aboutissant à une accumulation des enzymes dans le milieu extracellulaire. Une mutation génétique unique affectant le contrôle de l'exocytose pourrait donc être responsable de toutes les anomalies biochimiques rencontrées dans les mucopolysaccharidoses II et III.

d) altération membranaire

SLY et al., 1976 (143), se fondant sur le fait que des fibroblastes "I-Cell" congelés sont difficilement remis en culture, émettent hypothèse d'une altération de la membrane fibroblastique.

Ils constatent, en outre, que des virus Sinbis cultivés sur fibroblastes I-Cell présentent une sensibilité très grande à la congélation-décongélation, ainsi qu'une inactivation exagérée par le Triton X 100. Les mêmes phénomènes se retrouvent pour les fibroblastes de mucopolysaccharidose type III.

Ces résultats indiquent une altération phénotypique des virus cultivés sur fibroblastes "I-Cell". Ces altérations doivent être attribuées aux composés de l'enveloppe virale (lipides ou glycoprotéines) et ces altérations doivent être rattachées au déficit génétique primaire dans "I-Cell disease". Comme l'enveloppe virale dérive directement de la membrane plasmique de la cellule hôte, l'altération doit être localisée au niveau de la membrane du fibroblaste.

Cette observation peut être directement rattachée à l'hypothèse de NEUFELD. En effet les enzymes lysosomiales étant en majorité des glycoprotéines une altération dans une étape de la glycosylation, affecterait aussi bien le signal de reconnaissance des enzymes qu'un récepteur membranaire de nature glycoprotéinique ou glycolipidique.

L'existence d'une altération membranaire affectant la glycosylation semble d'ailleurs renforcée par les observations de DI DONATO et al., 1977 (144) qui ont pu mettre en évidence l'activité anormale de diverses ectosyltransférases du fibroblaste.

e - "recyclage" membranaire anormal

L'hypothèse de LLOYD, 1977 (145) est fondée sur le phénomène de "recyclage" membranaire après la pinocytose ou l'endocytose. Des cellules à haut pouvoir de pinocytose posséderaient un système permettant de retirer les membranes du système vacuolaire aussi rapidement qu'elles y apparaissent.

Ce système schématisé par DEAN, 1977 (146) est représenté sur la Fig. 13. Les petites vésicules résultant de la division du lysosome secondaire (étape C de la figure 13) peuvent contenir des enzymes lysosomiales, qui se voient déversées dans le milieu extracellulaire, après fusion avec la membrane plasmique. Cependant si les enzymes étaient liées à la membrane lysosomiale, le recyclage membranaire s'effectuerait sans grande perte d'enzymes.

La force de liaison à la membrane, ne serait pas très grande et différencierait d'une enzyme à l'autre, expliquant pourquoi de nombreux types cellulaires excrètent des enzymes dans le milieu extracellulaire.

Ceci expliquerait également le fait que la stimulation de la pinocytose est souvent accompagnée d'une augmentation de l'exocytose des enzymes lysosomiales, correspondant à une augmentation du processus de recyclage membranaire. Sur ce schéma, l'incapacité de fibroblastes I-Cell à retenir leurs enzymes résulterait d'une incapacité des enzymes à se lier à la membrane lors du processus de recyclage,



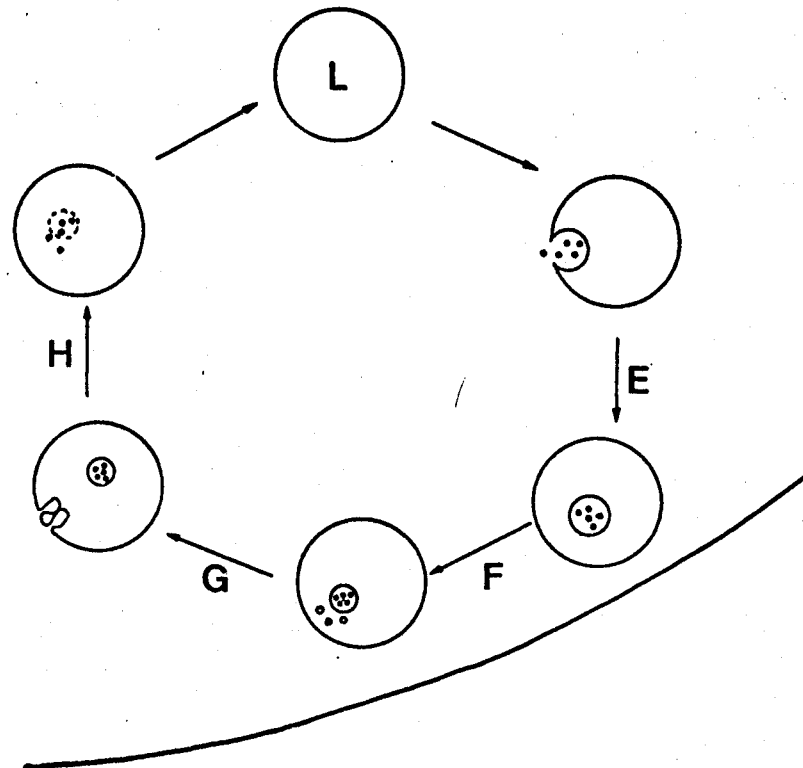
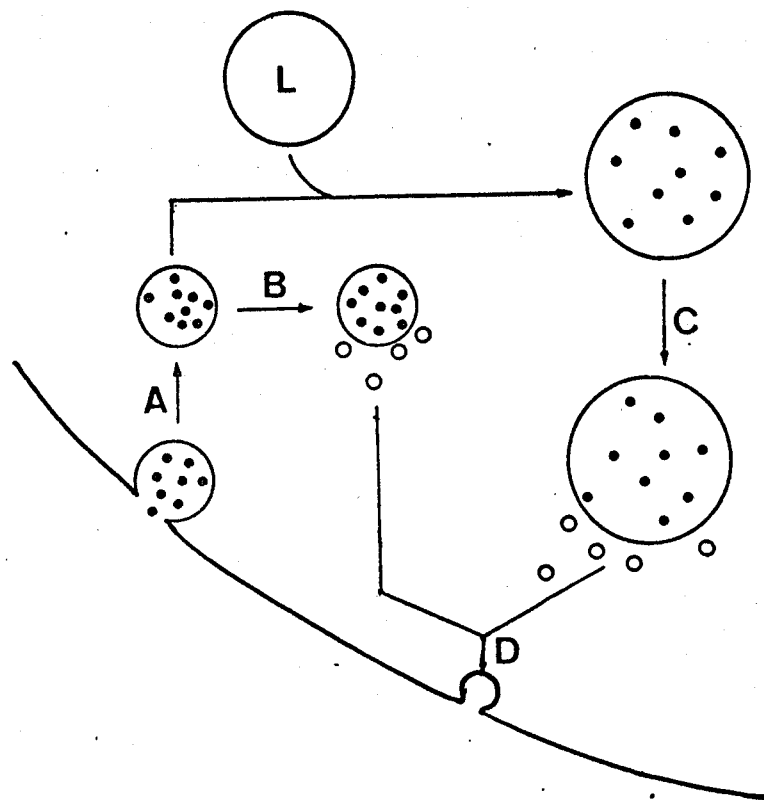


FIGURE 13

"Recyclage membranaire " d'après DEAN (1977) (148)

La figure de gauche schématise les phénomènes de recyclage de la membrane plasmique : après endocytose (A) du matériel soluble (\*\*), la vésicule d'endocytose peut se diviser pour donner naissance à de petites vésicules (B) qui viennent fusionner avec la membrane plasmique. Une division semblable peut se produire après que la vésicule d'endocytose ait fusionné avec le lysosome I. Dans les deux cas la majorité du matériel soluble est retenue au sein de la vésicule d'endocytose.

Le diagramme de droite schématise le "recyclage" de la membrane lysosomiale. La membrane lysosomiale peut s'invaginer de manière à englober du matériel cytoplasmique (E) ; ce matériel est alors englobé dans une vésicule intralysosomiale de manière à être protégé de l'action enzymatique. La vésicule intralysosomiale peut alors se diviser (F), pour donner de petites vésicules qui viennent fusionner avec la membrane lysosomiale (G). La majorité du matériel incorporé est retenu au sein de la vésicule et après désintégration de la membrane intralysosomiale (H) devient accessible aux enzymes et se voit dégradé.

BRNS  
1977

aboutissant à une perte continuelle des enzymes dans le milieu extracellulaire.

La plus ou moins grande aptitude des enzymes à se lier à la membrane lysosomiale expliquerait la plus ou moins grande perte de l'activité enzymatique. C'est ainsi que la  $\beta$ -glucosidase qui est fortement attachée à la membrane lysosomiale, ne pouvant être détachée qu'à l'aide de détergents, (BECK et TAPPEL, 1968) (147), conserve une activité normale lors des mucopolipidoses II et III.

#### 7 - Les mucopolipidoses LW., De P. et N.

##### a) la mucopolipidose L.W. (MAROTEAUX P. et al., 1978) (149)

#### $\alpha$ - signes cliniques

Les patients W. (Pierre Alexandre et Laura, 5 ans) montrent des dysmorphies faciale et osseuse ainsi qu'un retard psychomoteur. On peut noter une hépatomégalie ainsi qu'une splénomégalie (Tableau XIV). L'examen du fond de l'oeil révèle la présence d'une tache rouge-cerise. Pierre Alexandre est décédé à l'âge de 5 ans d'une déficience rénale sévère.

#### $\beta$ - cytologie

Du point de vue cytologique on peut noter la présence de lymphocytes vacuolés, ainsi que de grosses cellules réticulo-histiocytaires de 40 à 50  $\mu$  de diamètre, d'aspect spumeux, dont le noyau central de petite taille est entouré de nombreuses petites logettes de 1 à 2  $\mu$  optiquement vides.

L'étude d'une biopsie hépatique a révélé la présence de cellules de Kupfer vacuolées. Dans les fibroblastes au bout d'un certain temps de culture, des granulations métachromatiques sont observées mais elle sont toutefois moins nombreuses que dans les mucopolysaccharidoses.

#### $\gamma$ - enzymologie

L'étude enzymatique effectuée sur le tissu hépatique révèle une élévation importante de l'activité de la plupart des hydrolases en particulier de la

TABLEAU XIV

ASPECTS CLINIQUES ET RADIOLOGIQUES DIFFERENTIELS ENTRE LA MLP II ET LES DEUX NOUVEAUX TYPES DE MUCOLIPIDOSES.

MLP II	OBS. L. W.	OBS. de P.
<p>Dysmorphie faciale proche de la Mucopolysaccharidose I. Hypertrophie gingivale.</p>	<p>Dysmorphie faciale plus discrète.</p>	<p>Dysmorphie faciale très discrète.</p>
<p>Opacités cornéennes très inconstantes.</p>	<p>Opacités cristalliniennes.</p>	<p>Tache rouge-cerise au fond de l'oeil.</p>
<p>Aspects des os longs du rachis et des mains très proche de la Mucopolysaccharidose I (du moins après l'âge de un ans).</p>	<p>Atteinte squelettique beaucoup plus modérée (aspect trapu des os).</p>	<p>Pas d'atteinte squelettique évidente.</p>
<p>Evolution fatale le plus souvent vers l'âge de deux à quatre ans.</p>	<p>Evolution semblant également assez rapidement fatale.</p>	<p>Evolution compatible avec une plus longue survie (patients encore vivants, 14 et 22 ans).</p>
<p>Abaissement du taux des hydrolases dans les cellules (Fibroblastes).</p>	<p>Elévation de nombreuses hydrolases cellulaires.</p>	<p>Activité des hydrolases normales.</p>



$\beta$ -glucuronidase et des hexosaminidases. Dans les fibroblastes et les lymphocytes l'étude enzymatique confirme l'élévation des activités enzymatiques.

b) la mucopolipidose De P. (DURAND et al., 1977) (150) et N. (FEDERICO STRECKER, MICHALSKI, non publié)

$\alpha$  - signes cliniques

Les patients De P. (Fiorenzo 22 ans et Christina, 14 ans) et N. (18 ans) ne présentent pratiquement aucun signe clinique. On note toutefois une diminution progressive de l'activité visuelle, une tache rouge cerise bilatérale du fond de l'oeil, des opacités ponctuées du cristallin et une cécité rouge-vert avec des signes neurologiques modestes et un développement physique normal.

$\beta$  - aspect histochimique

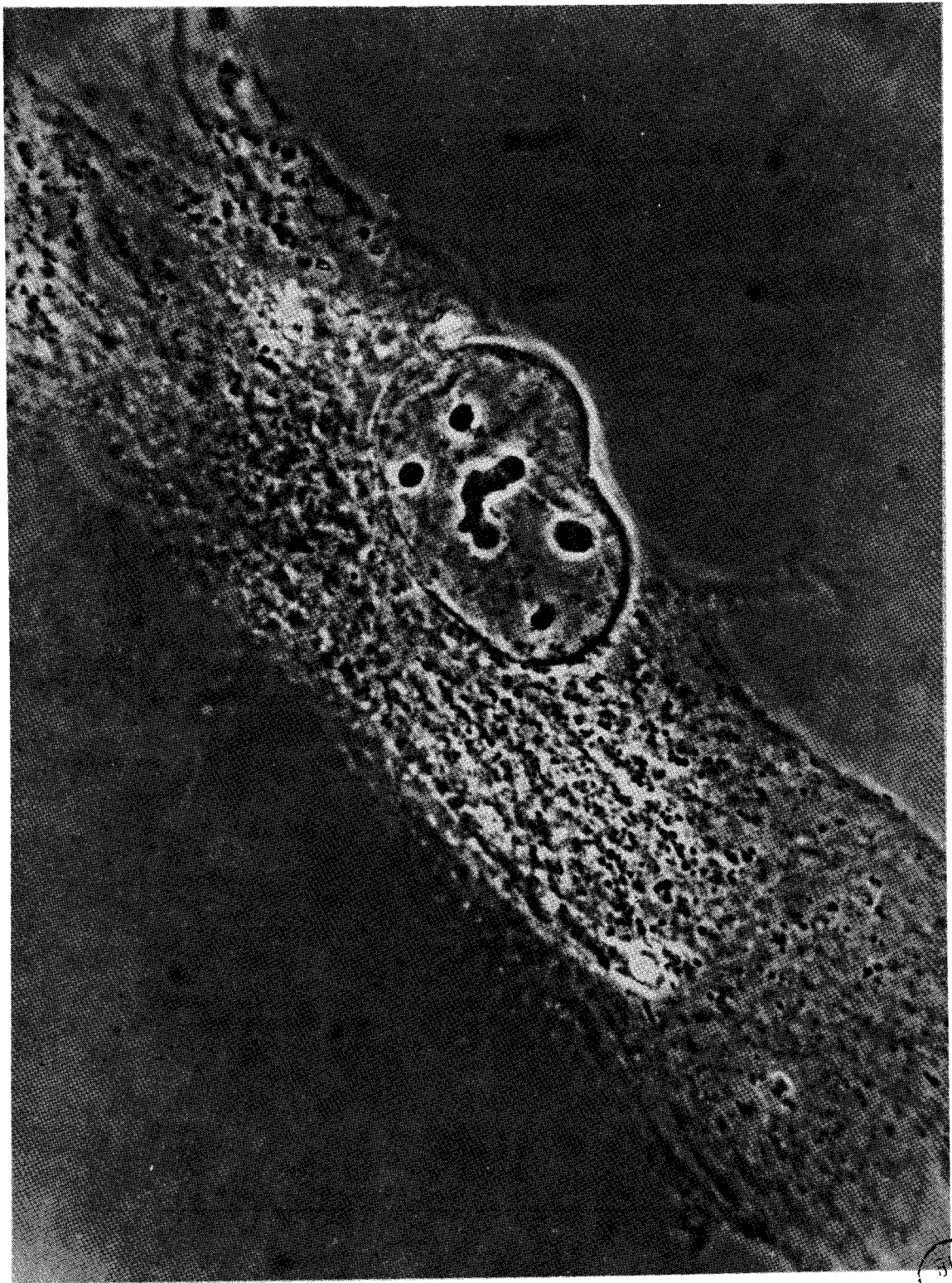
On note la présence de quelques rares lymphocytes vacuolés dans le sang. Une biopsie hépatique a été réalisée montrant des cellules de Kupfer contenant de nombreuses inclusions de taille et de forme variable ainsi que quelques granules osmiophiles. Quelques cellules parenchymateuses du foie contiennent de nombreux et volumineux corps denses. Les fibroblastes en culture présentent quelques inclusions réfringentes (Fig. 11).

$\gamma$  - Enzymologie

L'activité des hydrolases acides mesurées dans le sérum, les leucocytes et les fibroblastes sont normales (Tableau XV).

8 - La mucopolipidose de type IV

Ces cinq dernières années ont vu la description d'enfants présentant des opacités cornéennes bilatérales, un retard mental et moteur progressif, mais pas d'anomalies squelettiques décelables (BERMAN et al., 1974) (151) ; (MERIN et al., 1975) (152) ; (LIVNI et LEGUM, 1976) (153). L'examen au microscope électronique de biopsie de divers tissus, montre de nombreux corps denses remplis d'un matériel de nature lipidique.



D/S  
LILLE

FIGURE 14

Fibroblaste De P. observé en microscopie en contraste de phase,  
montrant la présence d'inclusions réfringentes.

TABLEAU XV

Activité des hydrolases acides lysosomiales dans les leucocytes de sujets normaux et des deux patients De P. (Activité exprimée en nmoles/h/mg protéine)

Enzymes	Contrôle	De P.F.	De P.C.
$\beta$ -galactosidase	143,4 $\pm$ 88,2	124,4	100,5
$\alpha$ -mannosidase	141 $\pm$ 59	123	234,5
$\beta$ -glucosaminidase	783,6 $\pm$ 51,6	970	726,5
Arylsulfatase	299 $\pm$ 176	159,6	94,6



On note également la présence d'un matériel granulaire amorphe, vraisemblablement de nature glycoprotéinique ou mucopolysaccharidique.

L'origine lysosomiale de ces granules a pu être précisée à l'aide de colorations histochimiques spécifiques. L'accumulation simultanée de matériel d'origine lipidique et mucopolysaccharidique a permis de rattacher ces maladies au groupe des mucopolysaccharidoses. Cependant l'analyse enzymatique n'a pas permis de mettre en évidence d'anomalies notables.

Tout récemment BACH et al., 1975 (154) a pu mettre en évidence une accumulation anormale de gangliosides GD<sub>3</sub> et GM<sub>3</sub> dans les fibroblastes de ces malades. Ces auteurs suggèrent que la maladie pourrait être due à un déficit en sialidase intervenant dans le métabolisme des gangliosides.

TRAVAUX PERSONNELS



1. MISE EN EVIDENCE D'UNE SIALYL-OLIGOSACCHARIDURIE  
ASSOCIEE AUX MUCOLIPIDOSES I, II, III ET A DEUX  
NOUVEAUX TYPES DE MUCOLIPIDOSES

I - MATERIEL ET METHODES

A - FRACTIONNEMENT DES URINES

1 à 5 litres d'urine sont fractionnés suivant le procédé mis au point au laboratoire par STRECKER (1977) (155) (Fig. 15). L'urine à laquelle est ajouté de l'azide de sodium (1 p. 1000) est préalablement filtrée sur laine de verre de manière à éliminer tous les composés insolubles.

L'urine est ensuite amenée à pH 6,0 avant d'être déminéralisée par passage successif sur résine échangeuse de cations (Dowex 50 x 8 ; H<sup>+</sup> ; 20-50 mesh) et résine échangeuse d'anions (Dowex 1 x 8 ; HCOO<sup>-</sup> ; 20-50 mesh). On utilise approximativement 300 g de résine par litre d'urine.

Après filtration, les effluents sont concentrés environ 10 fois par évaporation sous vide, à l'évaporateur rotatif à 35°C. La solution concentrée est ensuite soumise à une chromatographie d'adsorption sur colonne de charbon-célite (5 x 30 cm) préparée selon le procédé de WHISTLER et DURSO (1950) (156). Après rinçage par 2 litres d'eau, les oligosaccharides et les glycopeptides sont désorbés en bloc par passage d'environ 5 litres d'une solution éthanolique à 50 % dans l'eau. La fraction éluée est ensuite évaporée à sec et reprise par 100 ml d'eau distillée, avant d'être appliquée sur des colonnes (2 x 20 cm) couplées de résines échangeuses d'ions Dowex 50 x 2 (forme H<sup>+</sup> ; 200-400 mesh) et Dowex 1 x 2 (forme CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> ; 200-400 mesh). Les oligosaccharides neutres sont obtenus dans la fraction effluente, après rinçage des colonnes couplées avec environ 1 litre d'eau distillée.

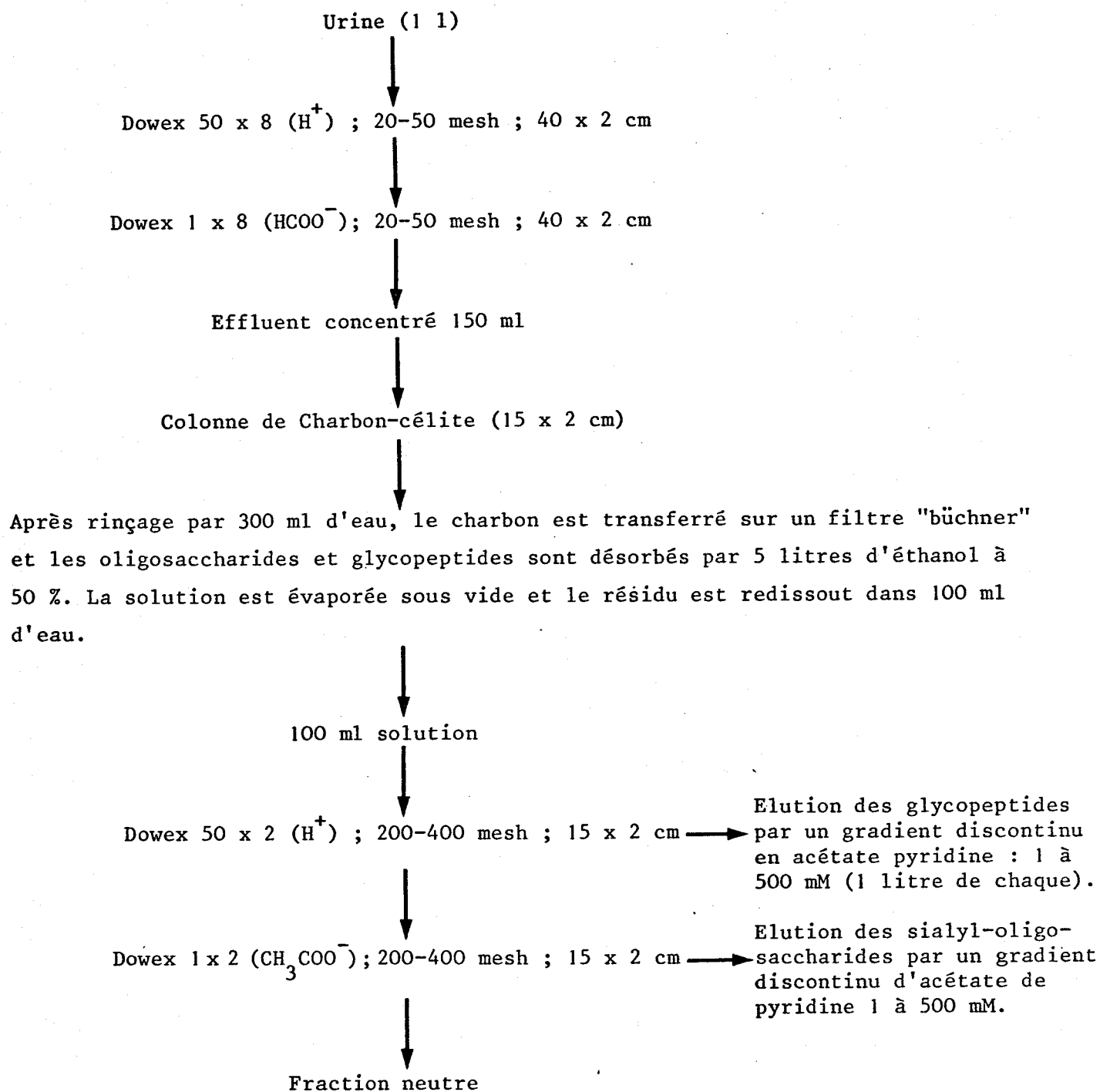


FIGURE 15

Schéma de fractionnement des sialyloligosaccharides urinaires et des glycopeptides

Les colonnes sont ensuite séparées et éluées par un gradient discontinu en acétate de pyridine pH 5,4 de 1 à 500 mM comme le montre la figure 15. 1 litre de chaque solution est recueilli et concentré à 1 à 2 ml par évaporation sous vide.

#### B - TRAITEMENT DES TISSUS

Le foie et le cerveau d'un patient atteint de Mucopolipidose II ont pu également être étudiés. Les tissus sont broyés à l'aide d'un appareil de Fischer et homogénéisés dans l'eau à l'aide d'un homogénéiseur de Potter.

Les homogénats obtenus sont filtrés sur 3 épaisseurs de gaze et sont ensuite directement appliqués sur colonne de charbon, qui est ensuite rincée par environ 1 litre d'eau. Les oligosaccharides sont ensuite désorbés en bloc par passage de 2 litres d'éthanol à 50 % dans l'eau. Après concentration de la solution, les oligosaccharides sont fractionnés de manière analogue à ce qui a été décrit pour les urines (Fig. 15).

#### C - ANALYSES QUALITATIVES DES FRACTIONS OBTENUES

##### 1 - Chromatographie

Les fractions acides éluées de la colonne de Dowex 1 x 2 sont concentrées à environ 1 à 2 ml et soumises à l'analyse chromatographique sur papier whatman n° 3 dans le système solvant de FISHER et NEBEL (1955) (157) : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3). Les oligosaccharides acides peuvent être isolés à l'état pur par chromatographie préparative dans le même système solvant. Le temps de migration varie de 6 jours (oligosaccharides I à V) à 2 mois (oligosaccharides VI à XII).

##### 2 - Electrophorèse

L'analyse qualitative des oligosaccharides acides a été également réalisée par électrophorèse, dans des cuves d'électrophorèse en "toit" à l'aide des tampons suivants :

- Tampon de MILCH (1951) (158) : pH 3,9

pyridine/acide acétique/eau (3 : 10 : 487)

- Tampon MILCH modifié par GRIMMONPREZ (1968) (159)

pyridine:15 ml ; eau : 1935 ml ; acide acétique : q.s.p. pH 5,4

### 3 - Révélation

Les révélations ont été effectuées avec le réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (1950) (160).

## D - ANALYSE QUANTITATIVE DES OLIGOSACCHARIDES

L'identification et le dosage des monosaccharides ont été effectués par chromatographie sur papier à l'aide du solvant de FISHER et NEBEL (161), après hydrolyse par l'acide trifluoroacétique (4N, 100°C, 4 h) ou par chromatographie en phase gazeuse selon le procédé de ZANETTA et al., (1972) (162) après méthanolyse avec le mélange méthanol/HCl/0,5 M pendant 24 heures à 100°C.

## II - RESULTATS

Les résultats de l'analyse chromatographique des sialyl-oligosaccharides urinaires sont illustrés par les figures 16 à 19. Contrairement aux urines normales, les urines des patients étudiés renferment un taux élevé de constituants acides, comme le montre le tableau XVI. Les chromatogrammes sont identiques d'un patient à l'autre, et cette observation permet de conclure au même type d'oligosaccharidurie. Cependant, il est intéressant de noter que dans les cas de mucopolipidose II et III, le rapport des oligosaccharides I/II et IV/V est environ 1, tandis que ce rapport est de 1/8 à 1/30 dans le cas des mucopolipidoses I, De P., W. et N.

L'étude des tissus (foie et cerveau) de l'un des patients décédé (mucopolipidose II) met en évidence une accumulation identique. La chromatographie préparative sur papier, prolongée 12 à 60 jours, a permis d'isoler une vingtaine de ces sialyl-oligosaccharides, dont nous avons pu entreprendre l'étude structurale. Les rapports molaires en monosaccharides des 12 oligosaccharides majeurs sont donnés dans le tableau XVII.

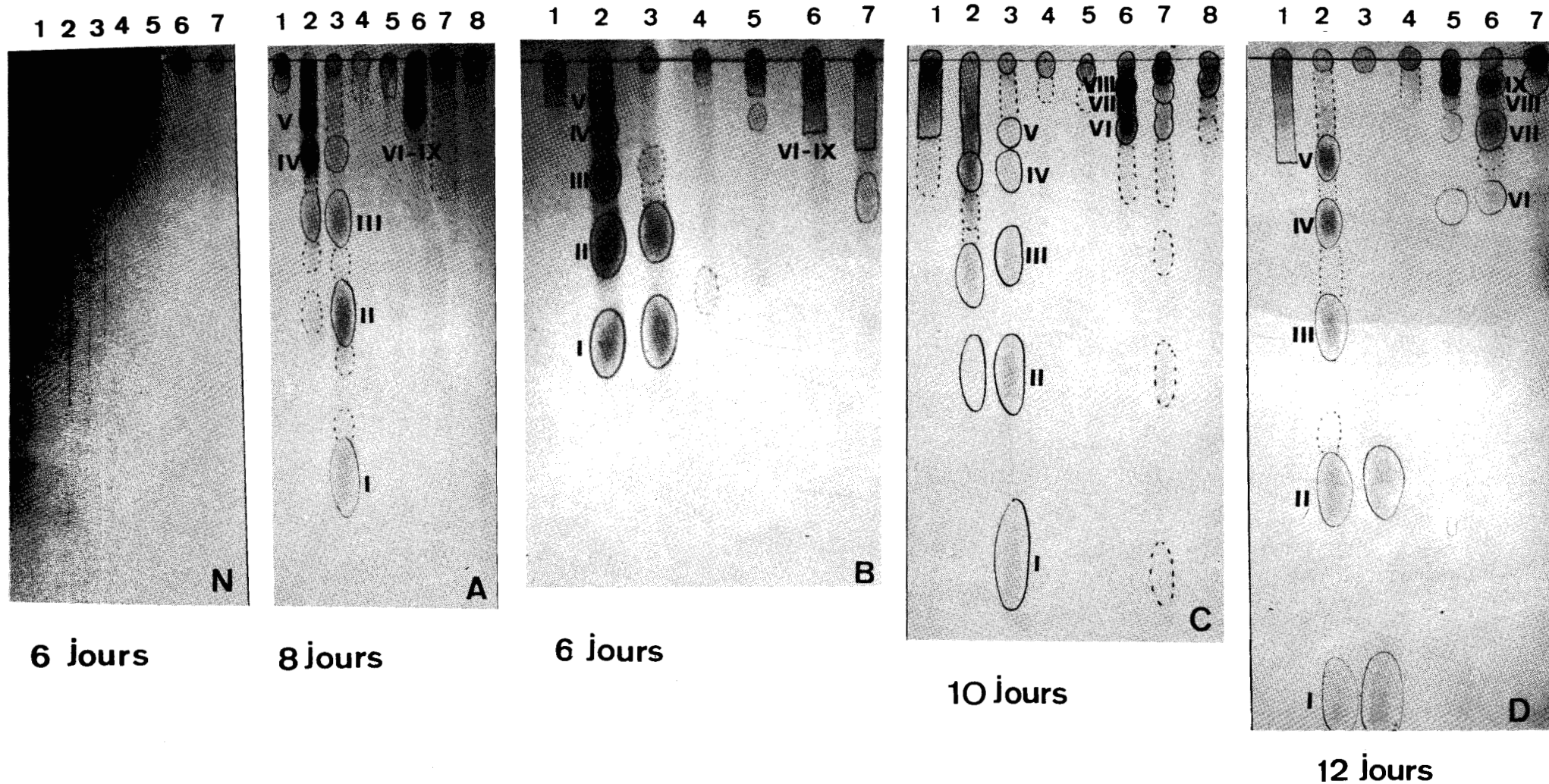


FIGURE 16

Chromatographie sur papier des sialyl-oligosaccharides urinaires élués de l'échangeur d'anions par un gradient discontinu d'acétate de pyridine. 1 : 1 mM ; 2 : 2 mM ; 3 : 5 mM ; 4 : 10 mM ; 5 : 20 mM ; 6 : 50 mM ; 7 : 100 mM ; 8 : 200 mM ; 9 : 500 mM. Solvent : pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3). Durée de la migration : indiquée sous chaque chromatogramme. N : urine normale ; A à D : I-Cell disease (Mucopolidose II).



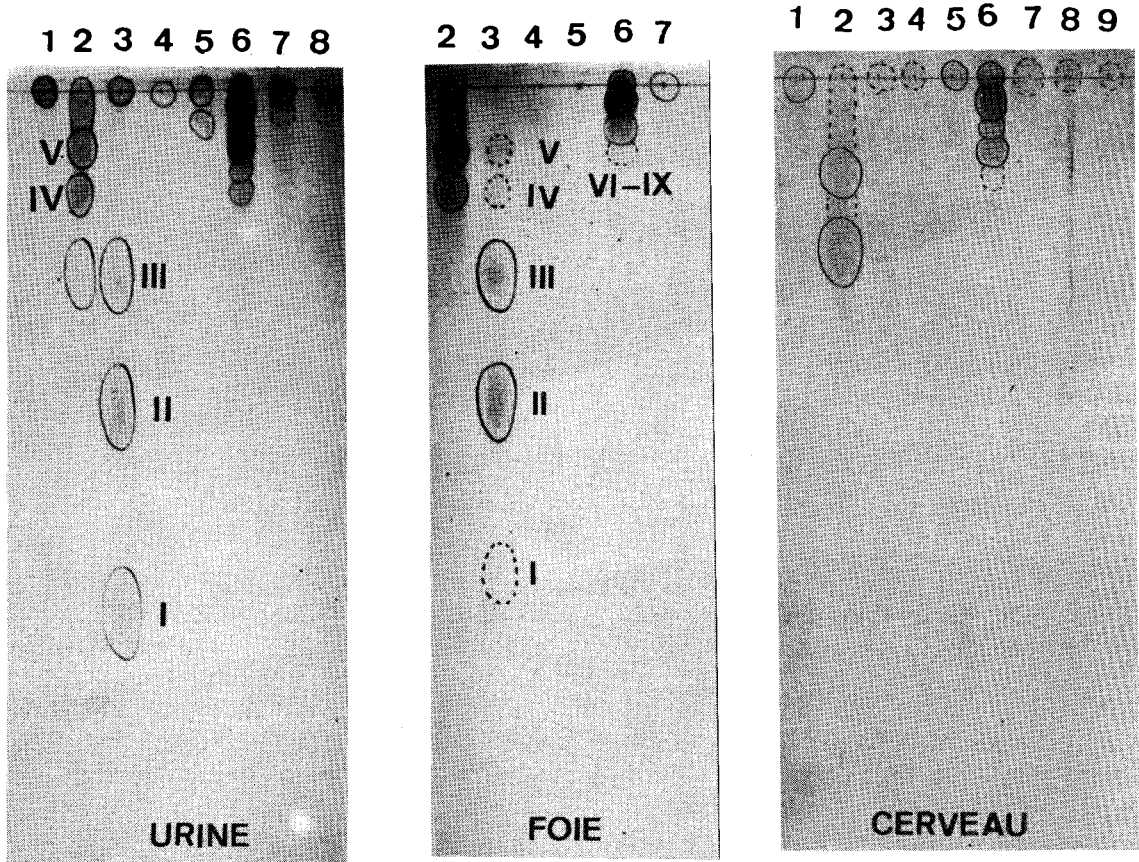
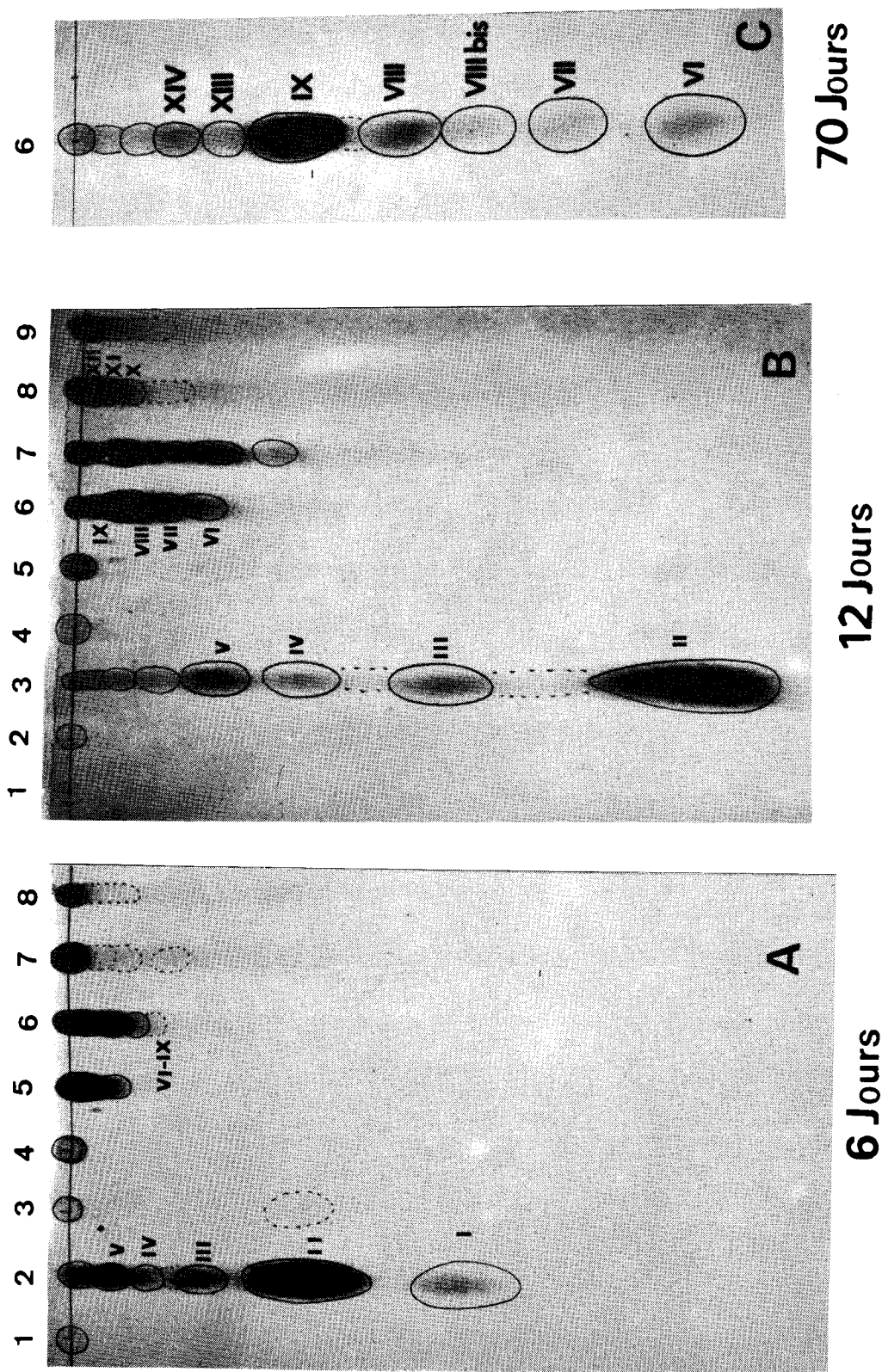


FIGURE 17

Chromatographie sur papier des sialyl-oligosaccharides isolés de l'urine, du foie et du cerveau d'un patient atteint de mucopolysaccharidose II (I-Cell disease). Conditions de la chromatographie : voir figure 16. Durée de migration : 6 jours.

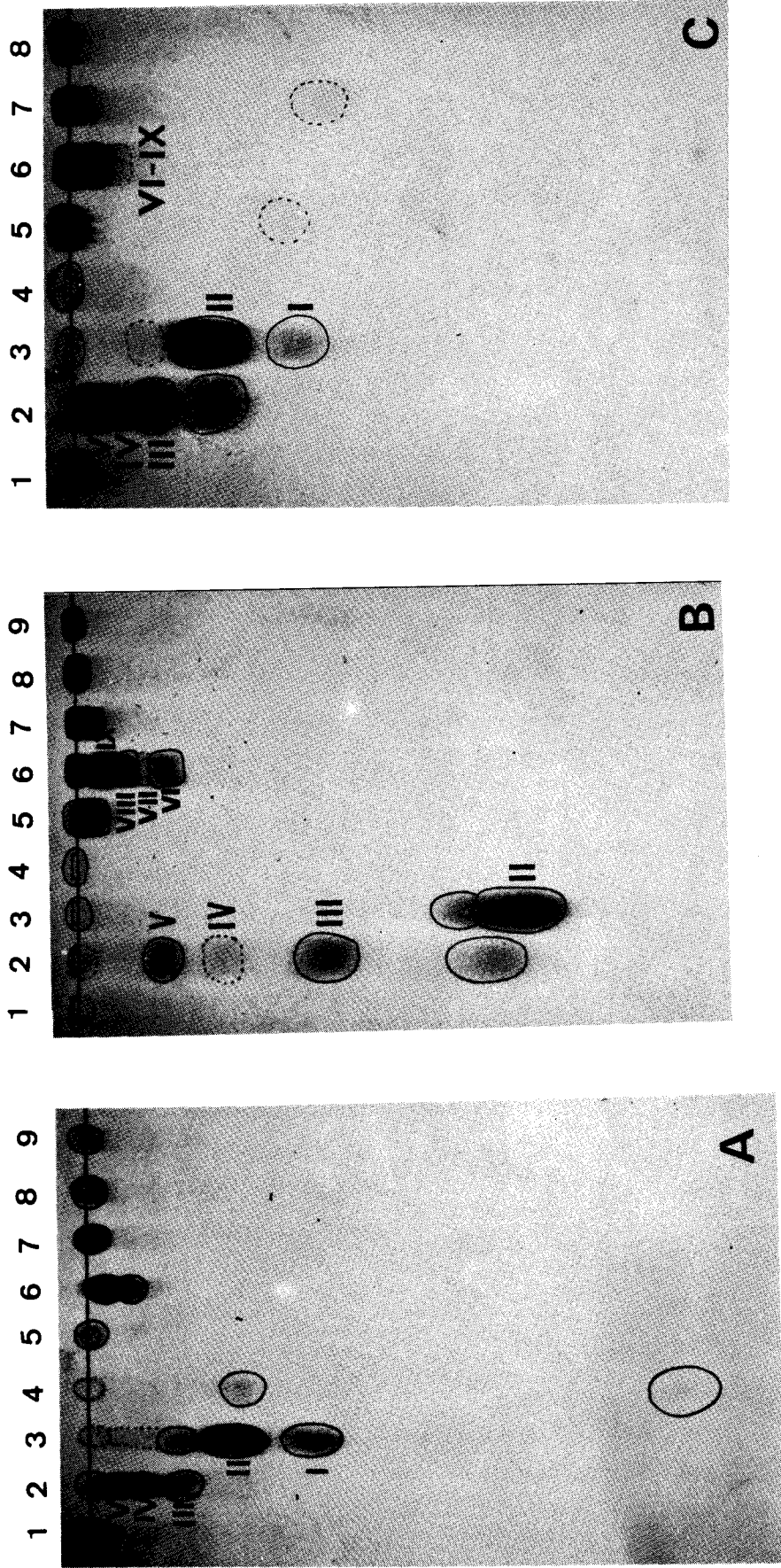




BUS  
LILLE

FIGURE 18

Chromatographie sur papier des sialyl-oligosaccharides isolés de l'urine de 2 patients atteints de Mucopolidose I.  
 Conditions de la chromatographie : voir Figure 16.  
 C : fraction n° 6 (50 mM) de l'urine B, chromatographiée 70 jours.



4 Jours

12 Jours

4 Jours



FIGURE 19

Chromatographie sur papier de sialyl-oligosaccharides urinaires dans les cas de mucopolidose W. (A) et De P. (B et C).  
 Conditions de la chromatographie : voir Figure 16.



TABEAU XVI

Quantité (mg/l) de sialyl-oligosaccharides excrétés dans les urines normales et dans les cas de sialidoses

Sialyl-oligosaccharides	Urines normales	Cas n° 1	MLP III		MLP I	MLP W.	MLP De P.	MLP N.		
			2	3					4	
I	0,1-0,3	8	4	5	7	2	16	28	4	8
II	0,2-0,3	11	6	7	9	3	185	125	140	52
III	0,1-0,3	14	11	7	7	2	22	15	14	12
IV	< 0,1	15	9	9	11	4	8	5	2	3
V	0,1-0,5	12	10	11	8	3	32	70	20	32
VI	< 0,1	5	4	3	7	8	38	15	8	5
VII	0,1-1	7	9	8	8	7	11	24	1,5	8
VIII	0,1-0,5	16	15	11	14	7	6	48	5	11
IX	0,2-4	23	25	20	14	10	225	160	110	135
X	0 -0,5			12	14	6	112	40	10	24



## 2. STRUCTURE DES 12 PRINCIPAUX SIALYLOLIGOSACCHARIDES ISOLES DE L'URINE DE MUCOLIPIDOSE TYPE I

### I - MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### A - IDENTIFICATION DU SUCRE EN POSITION TERMINALE REDUCTRICE

Le sucre en position terminale réductrice est identifié sous forme de polyol après réduction avec le borohydrure de potassium et hydrolyse avec l'acide trifluoroacétique  $CF_3COOH$  4N pendant 4 heures à  $100^\circ C$  (Fig. 20).

#### B - DETERMINATION DE LA SUBSTITUTION DE L'OSAMINE

La nature de la substitution de la N-acétylglucosamine en position terminale réductrice est déterminée par analyse des chromogènes obtenus après action de carbonate de sodium 1,25 M pendant 15 min à  $100^\circ C$ . La réaction avec le para-diméthylaminobenzaldéhyde/HCl est négative dans le cas de liaison  $1 \rightarrow 4$ , positive si la liaison est de type  $1 \rightarrow 3$  ou  $1 \rightarrow 6$ .

#### C - METHYLATION

La méthylation est effectuée par la méthode de HAKOMORI (1964) (163). Après réduction des oligosaccharides par le borohydrure de potassium, les éthers O-méthyliques des sucres sont identifiés par chromatographie en phase gazeuse suivant la méthode de FOURNET et MONTREUIL (1973) (164).

#### D - DEGRADATION DE SMITH

La dégradation de SMITH est effectuée de manière suivante :  
10 mg de sucre réduit sont dissous dans 15 ml du mélange  $NaIO_4$  0,02 M/tampon acétate de sodium 0,05 M pH 4,5. On laisse la réaction se dérouler durant 2 jours à  $+ 4^\circ C$ . La solution est alors amenée à pH 7,0 et on procède à une réduction par le borohydrure de potassium. Après 1 nuit à  $+ 4^\circ C$ , l'excès de borohydrure est détruit en amenant la solution à pH 4,0. La solution est ensuite réamenée à neutralité et concentrée à 1 ml par évaporation sous vide. Le produit d'oxydation est ensuite

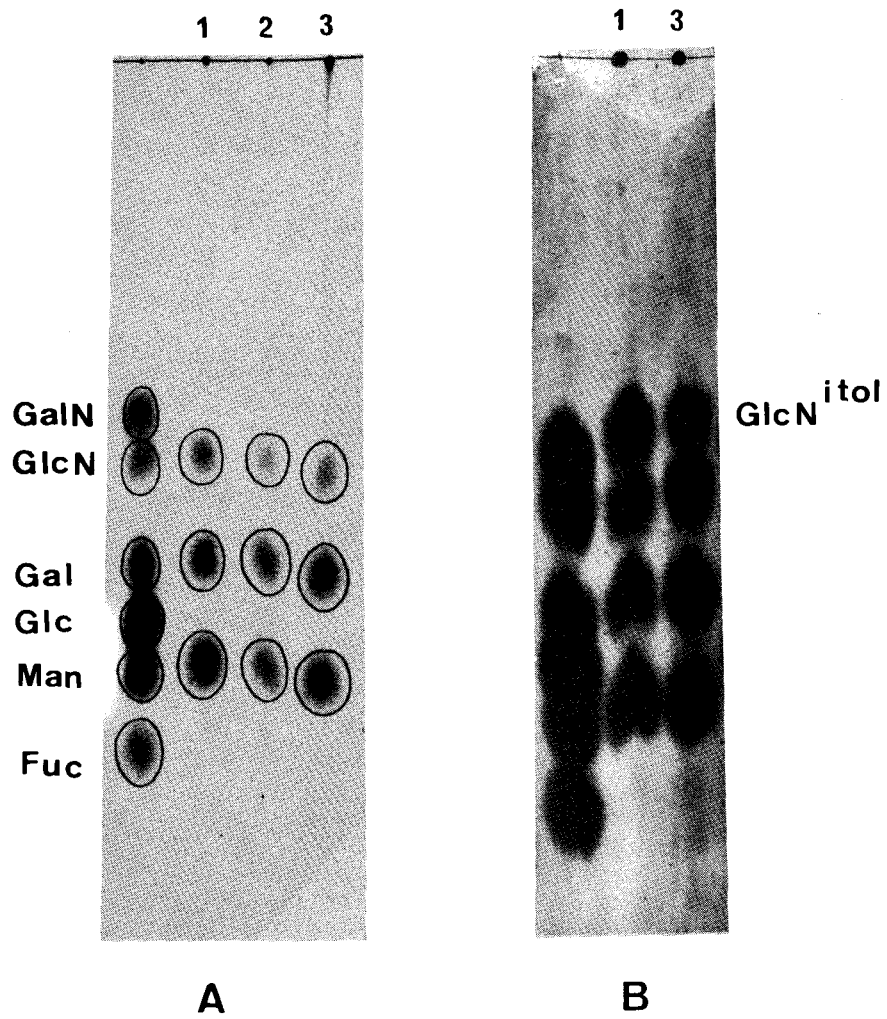


FIGURE 20

Analyse chromatographique des monosaccharides et des hexitols présents dans les hydrolysats des oligosaccharides I, II et III réduits par le borohydrure de potassium.

Chromatographie réalisée durant 1 nuit dans le solvant (acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3)).

A : révélation à l'oxalate d'aniline

B : révélation au nitrate d'argent.



purifié par passage sur colonne de Sephadex G-10 (2 x 80 cm). On procède ensuite à une hydrolyse du produit par  $H_2SO_4$  0,05 M (20°C ; 18 h). L'excès d'ions  $H^+$  est ensuite éliminé par passage sur colonne de Dowex 1 x 8 ; 25-50 mesh ; forme  $HCOO^-$ . L'oligosaccharide ainsi purifié, est resoumis à une étape de dégradation de SMITH suivant un protocole identique.

#### E - HYDRAZINOLYSE

Les oligosaccharides préalablement réduits par  $KBH_4$  (10 mg) et rigoureusement anhydres, sont soumis à l'hydrazinolyse selon le procédé de BAYARD (165). Le produit d'hydrazinolyse est ensuite purifié sur colonne Sephadex G-25 (2 x 8 cm), avant de subir une désamination nitreuse suivant le procédé d'HORTON et al., (1972) (166).

Les produits de la réaction ont été analysés en chromatographie sur papier dans le système solvant pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3).

#### F - ACETOLYSE PARTIELLE

L'acétolyse partielle de certains oligosaccharides a été réalisée selon le protocole expérimental de BAYARD et MONTREUIL (167). Toutefois, la durée de la réaction a été limitée à 1 heure, de manière à obtenir une rupture très sélective des liaisons  $\alpha(1 \rightarrow 6)$ . Les produits de la réaction ont été identifiés par chromatographie sur papier dans le système-solvant décrit p. 69.

#### G - DIGESTION ENZYMATIQUE

Les oligosaccharides V ont été soumis à l'hydrolyse enzymatique par l' $\alpha$ -neuraminidase de Clostridium perfringens, la  $\beta$ -galactosidase et la N-acétyl- $\beta$ -hexosaminidase de la rate de boeuf, ainsi que par l' $\alpha$ -mannosidase de la fève Jack\*.

---

\* Nous remercions vivement Mademoiselle G. SPIK, Monsieur S. BOUQUELET et Madame R. DEBRAY pour leur aide dans la détermination des structures par voie enzymatique.

## H - RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE\*\*

L'étude de la résonance magnétique nucléaire du proton a été effectuée sur les oligosaccharides préalablement traités par l'eau lourde ( $D_2O$ ) de manière à obtenir un échange des hydrogènes mobiles (fonctions hydroxyles).

Cette étude a été effectuée sur un appareil BRUKER HX 360, à 360 MHz, opérant en transformées de FOURIER.

Les glissements chimiques ont été mesurés par rapport au sel de sodium du 2.2-diméthyl-2-silapentane-5-sulphonate, par l'intermédiaire d'un témoin interne constitué d'acétone :  $\delta = 2.225$  ppm.

## II - RÉSULTATS

L'ensemble des résultats de la méthanolyse de la méthylation et de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire sont rassemblés dans les Tableaux XVII, XVIII et XIX et les figures 21 et 22.

### A - OLIGOSACCHARIDE I

La méthanolyse de l'oligosaccharide I a conduit à la libération de galactose, mannose, N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylneuraminique dans les rapports 0,91 : 2 : 2,07 : 1,05. Les éthers méthyliques provenant des sucres neutres sont le méthyl 3,4,6-tri-O-méthylmannoside, le méthyl 2,4,6-tri-O-méthylmannoside et le méthyl 2,4,6-tri-O-méthylgalactoside dans les rapports 1,0 : 1,25 : 0,88. La N-méthyl 3,6-di-O-méthylglucosamine et le N-méthyl 1,3,5,6-tetra-O-méthylglucosaminitol ont été identifiés comme seuls éthers méthyliques "basiques". La substitution en position C-4 de la N-acétylglucosamine réductrice a été confirmée par le fait que la réaction "Ehrlich" indirect était négative. Après désialylation par l'acide trifluoroacétique (0,05 N ; 80°C ; 45 min), la méthylation conduit à du perméthylgalactose.

\*\*

Cette étude a été réalisée par J.F.G. VLIEGENTHART, L. DORLAND et J. HAVERKAMP (Laboratoire de Chimie Organique de l'Université d'UTRECHT), à qui nous adressons nos plus vifs remerciements.

TABLEAU XVII

Composition en sucre des 12 principaux oligosaccharides isolés de l'urine d'un patient atteint de Mucoïipidose type I.

Oligosaccharide	Gal	Rapports molaires			Sucre en position terminale réductrice
		Man	GlcNAc	AcNeu	
I	0,96	2	1,84	0,86	GlcNAc
II	1,12	2	1,94	0,92	GlcNAc
III	0,86	3	1,85	0,94	GlcNAc
IV	2,16	3	3,06	0,99	GlcNAc
V	1,84	3	2,76	0,84	GlcNAc
VI	1,91	3	2,84	2,04	GlcNAc
VII	1,84	3	2,96	1,96	GlcNAc
VIII	2,05	3	3,04	1,94	GlcNAc
IX	3,00	3	3,02	2,05	GlcNAc
X	3,21	3	3,95	2,78	GlcNAc
XI	3,18	3	3,95	2,82	GlcNAc
XII	3,22	3	3,97	2,90	GlcNAc

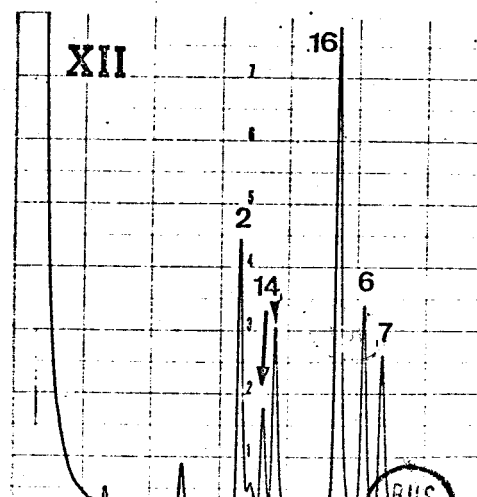
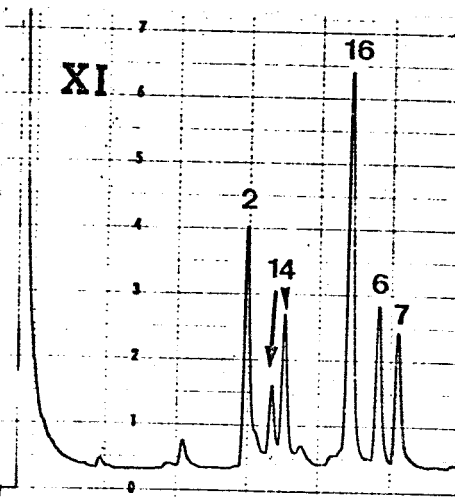
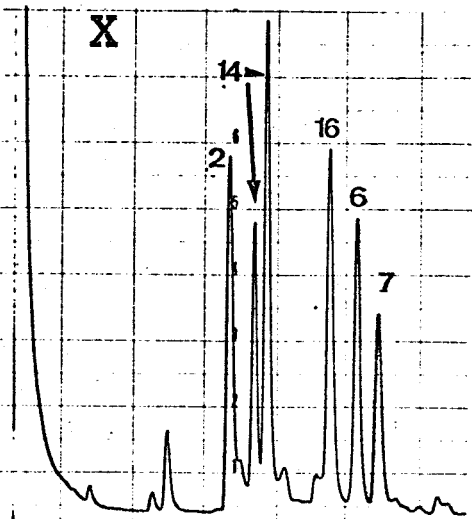
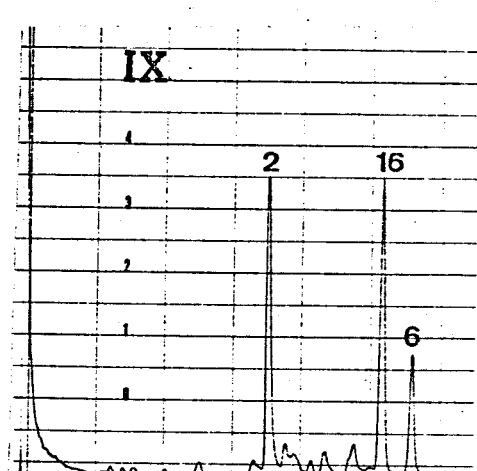
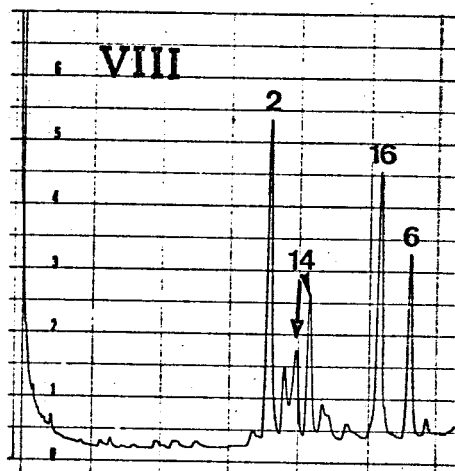
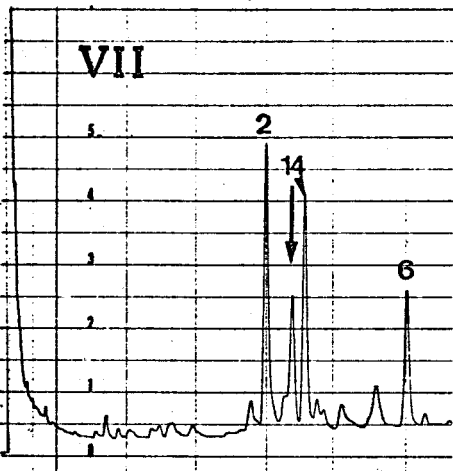
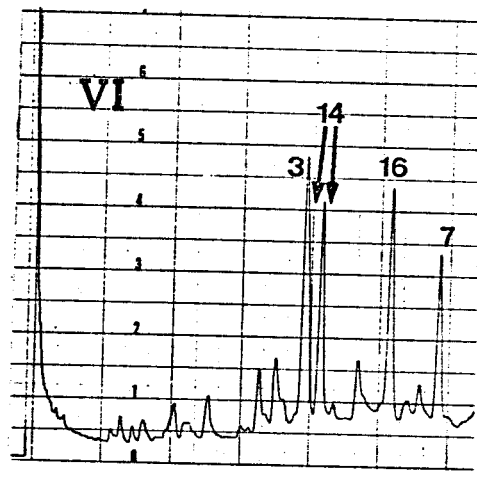
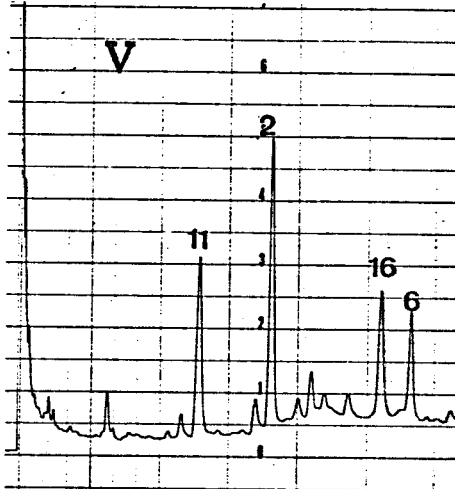
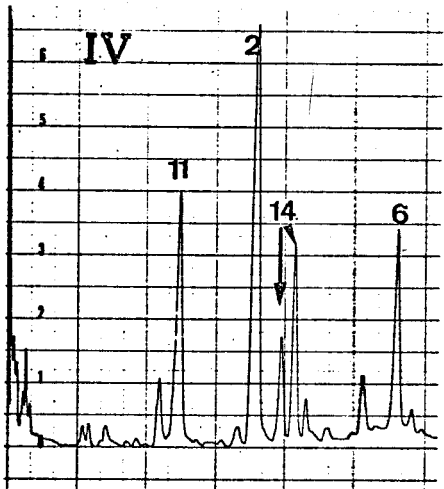
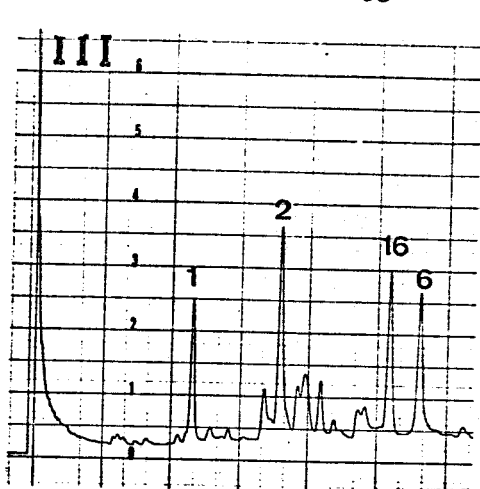
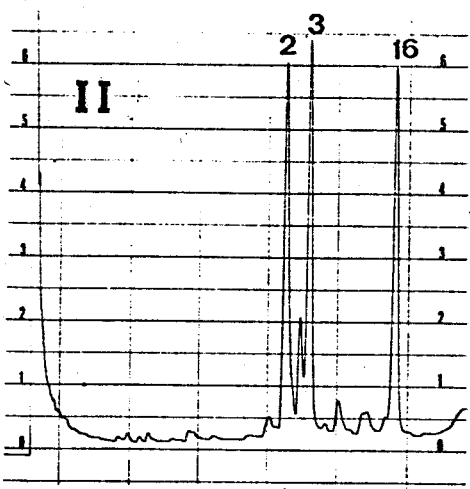
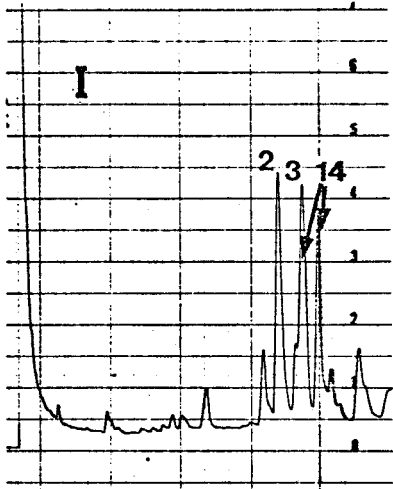


TABLEAU XVIII

Rapports molaires des éthers méthyliques des monosaccharides dans les oligosaccharides perméthylés, isolés de l'urine de Mucoïipidose type I.

	Rapport molaire dans l'oligosaccharide n°											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Méthyl 2,3,4,6-tétra-O-méthylmannoside			0,78									
Méthyl 2,3,4,6-tétra-O-méthylgalactoside				1,09	1,25							
Méthyl 3,4,6-tri-O-méthylmannoside	1,0	1,0	1,0	2,0	2,0		2,0	2,0	2,0	1,0	1,0	1,0
Méthyl 2,4,6-tri-O-méthylmannoside	1,18	1,0				1,0						
Méthyl 2,4,6-tri-O-méthylgalactoside	0,94			1,18	0,12	1,09	2,25	1,10		2,11	1,06	1,15
Méthyl 2,2,4-tri-O-méthylgalactoside		0,97	1,03	0,15	0,16	0,90		1,18	2,20	1,12	1,92	1,90
Méthyl 2,4-di-O-méthylmannoside			0,85	0,85	0,90		0,85	0,87	1,01	0,98	0,85	0,85
Méthyl 3,6-di-O-méthylmannoside						0,75				0,82	0,75	0,82
N-méthyl-N-acétyl-3,6-di-O-méthylglucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-méthyl-N-acétyl-1,3,5,6-tétra-O-méthylglucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+







L'oligosaccharide I desialylé a été ensuite soumis à une digestion enzymatique par un mélange de  $\beta$ -galactosidase et de N-acétyl- $\beta$ -hexosaminidase. Ce traitement a conduit, avec un rendement de 30 % à un trisaccharide possédant un comportement chromatographique identique à celui du composé :

$\alpha$ -Man-(1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -Man-(1  $\rightarrow$  4)-GlcNAc isolé de l'urine de mannosidose. L'ensemble de ces résultats permet donc de conclure à la structure suivante :

$\alpha$ -NeuAc-(2  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -Gal-(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -GlcNAc-(1  $\rightarrow$  2)- $\alpha$ -Man-(1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -Man-(1  $\rightarrow$  4)-GlcNAc.

Cette structure, et en particulier la nature des anoméries a été confirmée par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire. Comme l'indique le tableau XIX les constantes de couplage des protons anomériques des différents monosaccharides sont les suivants :  $\beta$ -Gal :  $J_{1,2} = 8,0$  Hz ;  $\beta$ -GlcNAc :  $J_{1,2} = 8,0$  Hz ;  $\alpha$ -Man :  $J_{1,2} = 1,5$  Hz ;  $\beta$ -Man :  $J_{1,2} < 1$ .

En outre, le glissement chimique du proton H-2 de l' $\alpha$ -mannose n° 4 (voir la nomenclature page 86 ) est de 4,09 ppm, et cette valeur a été démontrée comme étant significative d'une substitution en C-2 (DORLAND, 1977) (168).

#### B - OLIGOSACCHARIDE II

La composition molaire de l'oligosaccharide II est : Gal ; Man ; GlcNAc ; NeuAc (1,04 : 2 : 1,78 : 1,02). Les éthers méthyliques des sucres neutres sont dans les rapports : méthyl 3,4,6-tri-O-méthylmannoside, méthyl 2,4,6-tri-O-méthylmannoside et méthyl 2,3,4-tri-O-méthylgalactoside (1,0 : 1,12 : 0,90). Ces résultats montrent que l'oligosaccharide II est un isomère de l'oligosaccharide I, différent seulement par la liaison 2  $\rightarrow$  6 de l'acide N-acétylneuraminique.

L'analyse en spectroscopie de résonance magnétique nucléaire a confirmé cette structure. En outre, le spectre RMN montre que la nature de la liaison (2  $\rightarrow$  3) ou (2  $\rightarrow$  6) peut être établie d'après les valeurs du glissement chimique des protons H-3 axial et H-3 équatorial de l'acide sialique :

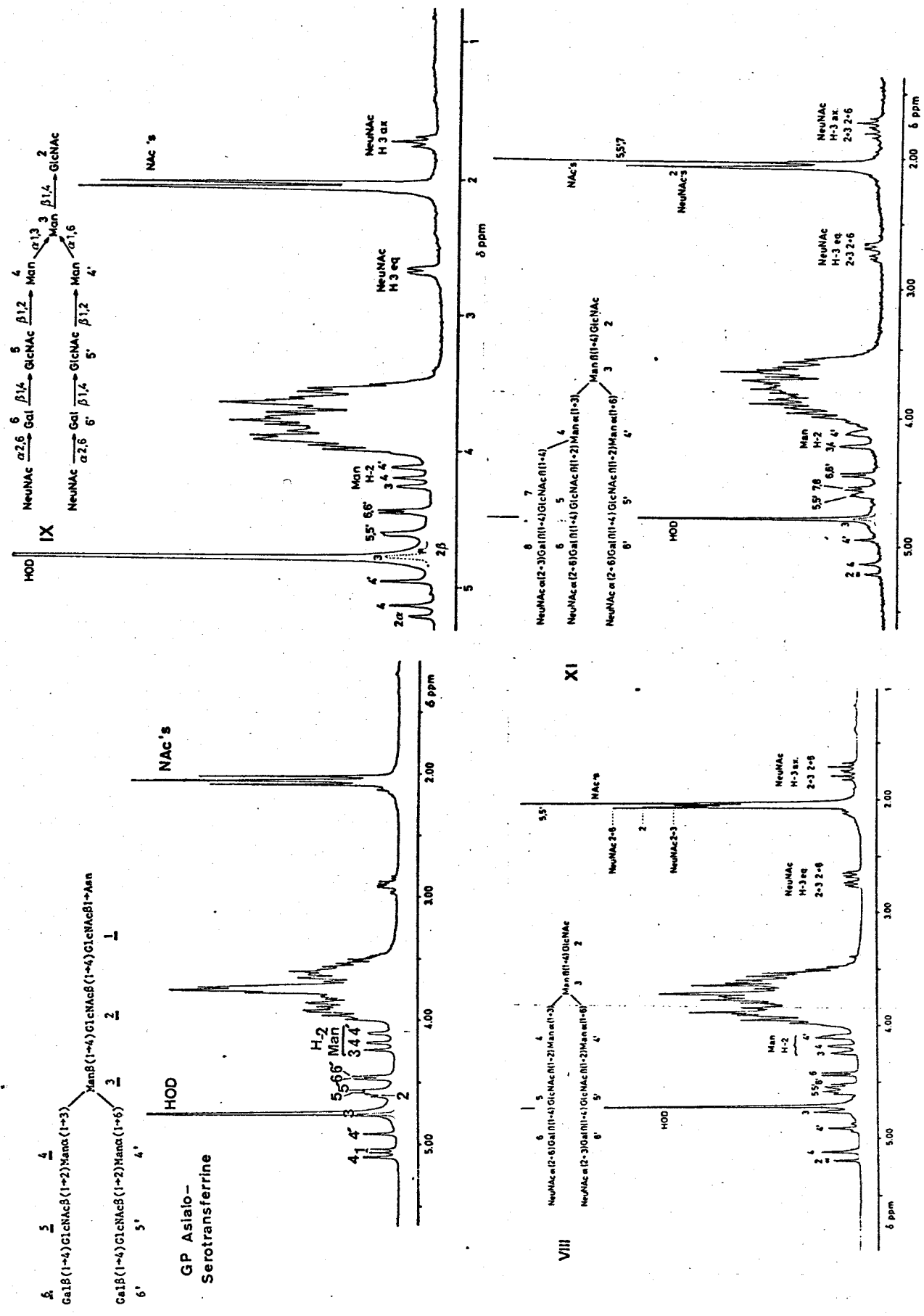


FIGURE 22

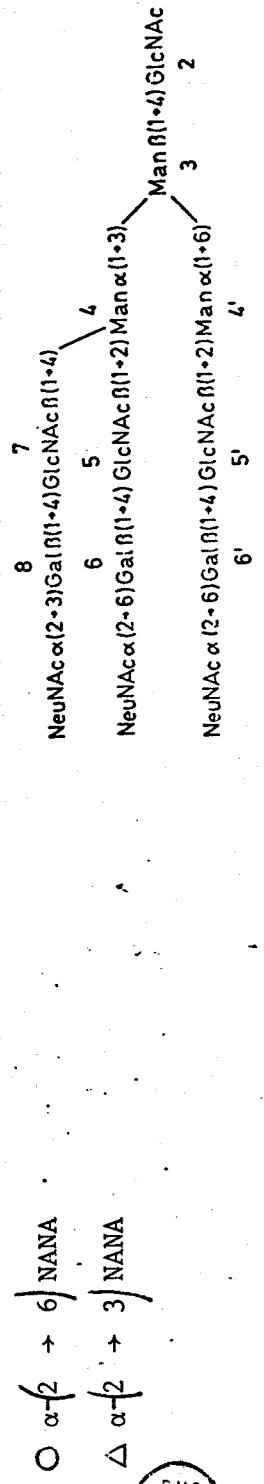
Spectres de RMN des sialyl-oligosaccharides VIII, IX et XI. Spectre de référence : asialoglycopeptide de la serotransferrine.



TABLEAU XIX

Glissements chimiques des protons anomériques, des protons H-2 du mannose, des protons H-3 de l'acide sialique et des protons des groupements N-acétyl.

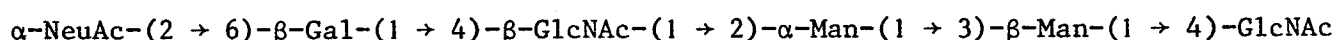
Structures	H-1 des résidus								H-2 du mannose				H-3 de		NAC des résidus										
	1	2 $\alpha$	3	4	4'	5	5'	6	6'	7	8	3	4	4'	AcNeu (2-3) eq.	AcNeu (2-6) ax.	1	2	5	5'	7	Acneu (2-3) (2+3)	AcNeu (2+6) (2+6)		
I	-	5.206	~4.72	~4.77	5.122	-	4.579	-	4.544	-	-	4.243	4.197	-	2.758	1.799	-	2.042	2.030	-	-	2.049	-	-	
II	-	5.206	~4.72	~4.77	5.139	-	4.601	-	4.446	-	-	4.241	4.197	-	-	2.668	1.718	-	2.042	2.029	-	-	2.069	-	
III	-	5.212	~4.72	~4.77	5.138	4.919	4.604	-	4.443	-	-	4.264	4.195	<4	-	2.670	1.719	-	2.058	2.030	-	-	2.070	-	
IV	-	5.212	~4.72	~4.77	5.123	4.930	4.578	4.578	4.552	4.471	-	4.258	4.194	4.11	2.757	1.789	-	2.057	2.030	2.049	-	2.049	-	-	
V	-	5.213	~4.72	~4.77	5.131	4.929	4.603	4.583	4.447	4.468	-	4.260	4.196	4.117	-	2.669	1.722	-	2.061	2.029	2.053	-	2.070	-	
VI	-	5.209	~4.72	~4.77	5.139	-	4.593	-	4.446	-	4.549	4.217	4.217	-	2.759	1.804	2.668	1.721	-	2.041	2.031	-	2.031	2.068	2.074
VII	-	5.211	~4.72	~4.77	5.117	4.920	4.571	4.571	4.546	4.546	-	4.255	4.194	4.11	2.757	1.799	-	-	2.058	2.029	2.029	-	2.045	-	
VIII	-	5.212	~4.72	~4.77	5.138	4.926	4.609	4.578	4.447	4.546	-	4.259	4.198	4.12	2.758	1.799	2.672	1.716	-	2.061	2.031	2.031	-	2.046	2.070
IX	-	5.213	~4.72	~4.77	5.136	4.952	4.605	4.605	4.444	4.444	-	4.263	4.198	4.120	-	2.667	1.727	-	2.067	2.029	2.029	-	2.067	-	
XI	-	5.214	~4.72	~4.77	5.134	4.943	4.601	4.443	4.443	4.443	4.550	4.225	4.225	4.12	2.757	1.804	2.672	1.719	-	2.067	2.030	2.030	2.062	2.067	



BUS LILLE

Oligosaccharide I : liaison (2 → 3)      H-3 ax : 1,800      H-3 éq : 2,758  
 Oligosaccharide II : liaison (2 → 6)      H-3 ax : 1,721      H-3 éq : 2,670

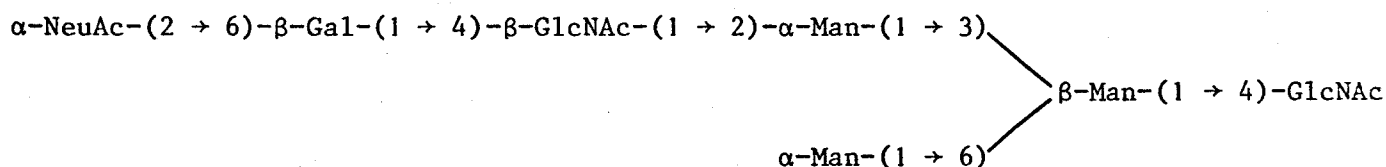
Sur la base de ces résultats, la structure de l'oligosaccharide II a été établie comme suit :



C - OLIGOSACCHARIDE III

L'oligosaccharide III possède la composition molaire suivant : Gal ; Man ; GlcNAc ; NeuAc (0,95 : 3 : 2,28 : 0,95). Les éthers méthyliques sont le méthyl 2,3,4,6-tetra-O-méthylmannoside, le méthyl 3,4,6-tri-O-méthylmannoside, le méthyl 2,3,4-tri-O-méthylgalactoside et le méthyl 2,4-tri-O-méthylmannoside, dans les rapports 0,75 : 1,0 : 0,92 : 0,77. La N-méthyl 3,6-di-O-méthylglucosamine et le N-méthyl 1,3,5,6-tetra-O-méthylglucosaminitol étaient les seuls éthers "basiques".

Ces résultats suggèrent que l'oligosaccharide III possède une structure analogue à celle de l'oligosaccharide II, avec un résidu supplémentaire de mannose externe. Le traitement de l'oligosaccharide III par l' $\alpha$ -mannosidase libère un oligosaccharide qui possède le comportement chromatographique du composé II. La structure de l'oligosaccharide III est donc la suivante :



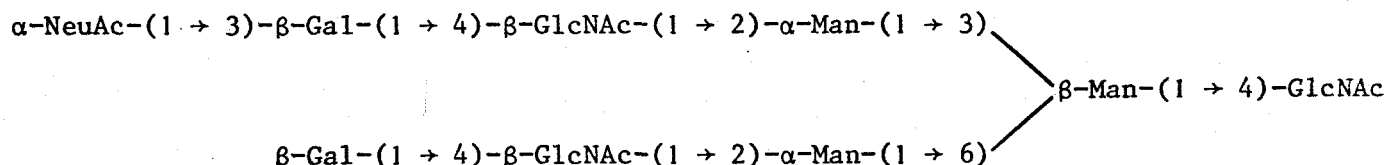
L'étude en RMN a confirmé cette structure. En particulier, le glissement chimique ( $\delta < 4$  ppm) du Man 4' (voir la nomenclature page 86) montre que ce dernier n'est pas substitué en C<sub>2</sub> par une N-acétylglucosamine.

D - OLIGOSACCHARIDE IV

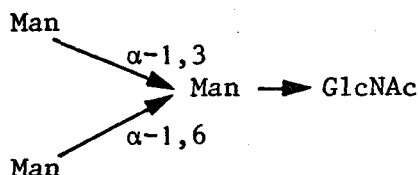
La détermination de la composition molaire en sucres a donné les résultats suivants : Gal ; Man ; GlcNAc ; NeuAc (1,89 : 3 : 2,90 : 0,95). Les dérivés

méthylés sont les suivants :

méthyl 2,3,4,6-tétra-O-méthylgalactoside, méthyl 3,4,6-tri-O-méthylmannoside, méthyl 2,4,6-tri-O-méthylgalactoside et méthyl 2,4-di-méthylmannoside (1,09 : 2,0 : 1,18 : 0,85). Les éthers méthyliques de la N-acétylglucosamine étaient la N-méthyl 3,6-di-O-méthylglucosamine et le N-méthyl 1,3,5,6-tétra-O-méthylglucosaminitol. L'action conjuguée de la  $\beta$ -galactosidase et de la N-acétyl- $\beta$ -hexosaminidase a permis la caractérisation d'un oligosaccharide possédant un comportement chromatographique identique à celui de l'oligosaccharide I. L'ensemble de ces résultats permet de proposer la structure suivante :



Cette structure a été confirmée par spectroscopie RMN. Les valeurs des constantes de couplage des protons anomériques correspondent aux anoméries indiquées ci-dessus. Le spectre RMN indique d'autre part l'existence du noyau

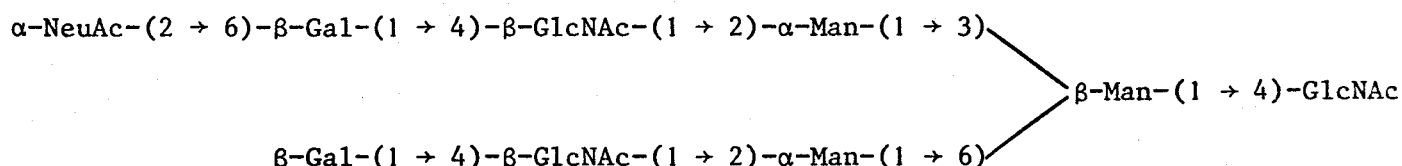


caractérisé par  $\delta\text{H-1 (3)} = 4,77$  ppm,  $\delta\text{H-1 (4)} = 5,123$  ppm et  $\delta\text{H-1 (4')} = 4,930$  ppm, comme il l'a été démontré par DORLAND et al., (1978) (169).

#### E - OLIGOSACCHARIDE V

L'oligosaccharide V renferme du galactose, du mannose, de la N-acétylglucosamine et de l'acide N-acétylneuraminique dans les proportions 1,89 : 3,0 : 3,09 : 0,96. La perméthylation a fourni les résultats suivants : méthyl 2,3,4,6-tétra-O-méthylgalactoside, méthyl 3,4,6-tri-O-méthylmannoside, méthyl 2,3,4-tri-O-méthylgalactoside et méthyl 2,4-di-O-méthylmannoside (1,12 : 2 : 1,12 : 0,94).

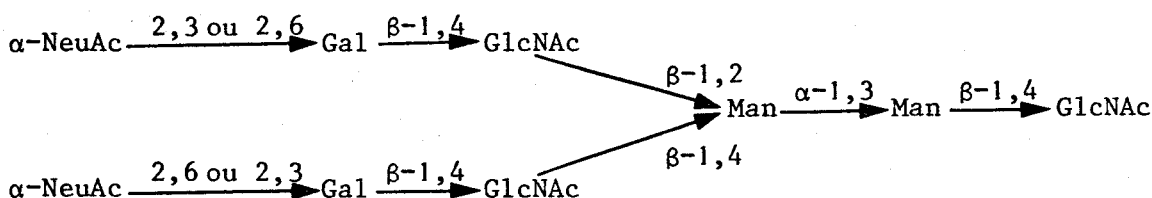
L'action conjuguée de la  $\beta$ -galactosidase et la N-acétyl- $\beta$ -hexosaminidase libère un oligosaccharide possédant le comportement chromatographique de l'oligosaccharide II. Ces résultats permettent d'attribuer à l'oligosaccharide V la structure suivante :



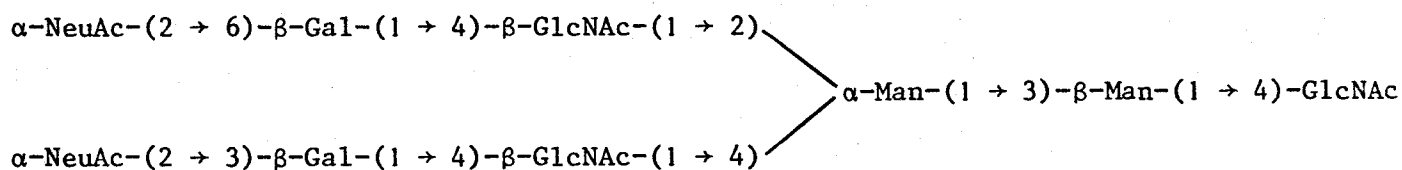
Ces résultats ont été confirmés par spectroscopie RMN (Tableau XIX).

F - OLIGOSACCHARIDE VI

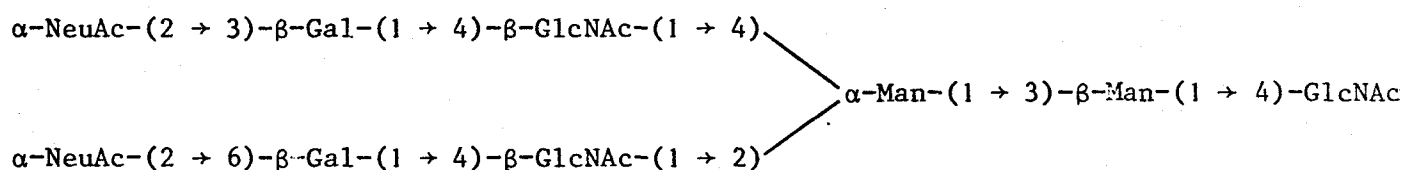
L'oligosaccharide VI renferme du galactose, du mannose, de la N-acétylglucosamine et de l'acide N-acétylneuraminique dans les rapports 1,72 : 2 : 2,95 : 1,96. La perméthylation a conduit à la caractérisation des éthers méthyliques suivants : méthyl 2,4,6-tri-O-méthylmannoside, méthyl 2,4,6-tri-O-méthylgalactoside, méthyl 2,3,4-tri-O-méthylgalactoside et méthyl 3,6-di-O-méthylmannoside (1,0 : 1,14 : 0,84 : 0,82). Les éthers "basiques" étaient la N-méthyl 3,6-di-O-méthylglucosamine et le N-méthyl 1,3,5,6-tetra-O-méthylglucosaminitol. Sur la base de ces résultats, deux structures rendant compte de l'ambiguïté de la position de l'acide N-acétylneuraminique, étaient possibles :



Pour lever cette ambiguïté, l'oligosaccharide VI a été soumis à deux cycles d'oxydation périodique, conformément au schéma décrit dans la figure 23. Le fait d'identifier le 2,4,6 tri-O-méthylmannoside et le 2,3,6 tri-O-méthylmannoside est conforme à la structure suivante :



Cette structure a été confirmée par spectroscopie RMN. L'examen des spectres des oligosaccharide I, II, VIII et IX a permis à DORLAND et al., (1978) (170) de déterminer l'influence des liaisons sialyl (2 → 3) ou (2 → 6) sur les glissements des protons anomériques des autres sucres de la molécule. Dans le tableau XX, il apparaît qu'une liaison α-(2 → 6) sialyl modifie de façon appréciable les valeurs δ des protons H-1 des galactose 6,6' des N-acétylglucosamine 5,5' et surtout des mannose 4 et 4', tandis que la liaison α-(2 → 3) sialyl n'affecte que les résidus de galactose et de N-acétylglucosamine. Dans le cas de l'oligosaccharide VI, le glissement δH-1 (4) : 5,119 → 5,139 est caractéristique de la présence d'un résidu d'acide sialique lié en α-(2 → 6) sur le galactose 6. Le glissement δH (CH<sub>3</sub>) de la N-acétylglucosamine 7 : 2,078 → 2,031 est lui caractéristique d'une liaison α-(2 → 3) sialyl sur le galactose 8. L'ensemble de ces résultats permet donc de préciser la structure de l'oligosaccharide VI :



#### G - OLIGOSACCHARIDE VII

L'oligosaccharide VII renferme du galactose, du mannose, de la N-acétylglucosamine et de l'acide sialique dans les proportions 1,75 : 3 : 2,93 : 1,89. L'analyse des éthers méthyliques a fourni du méthyl 3,4,6-tri-O-méthylmannoside, du méthyl 2,4,6-tri-O-méthylgalactoside et du méthyl 2,4-di-O-méthylmannoside, dans les proportions 2,0 : 2,14 : 0,88, ainsi que de la N-méthyl 3,6-di-O-méthylglucosamine et du N-méthyl 1,3,5,6-tétra-O-méthylglucosaminitol.

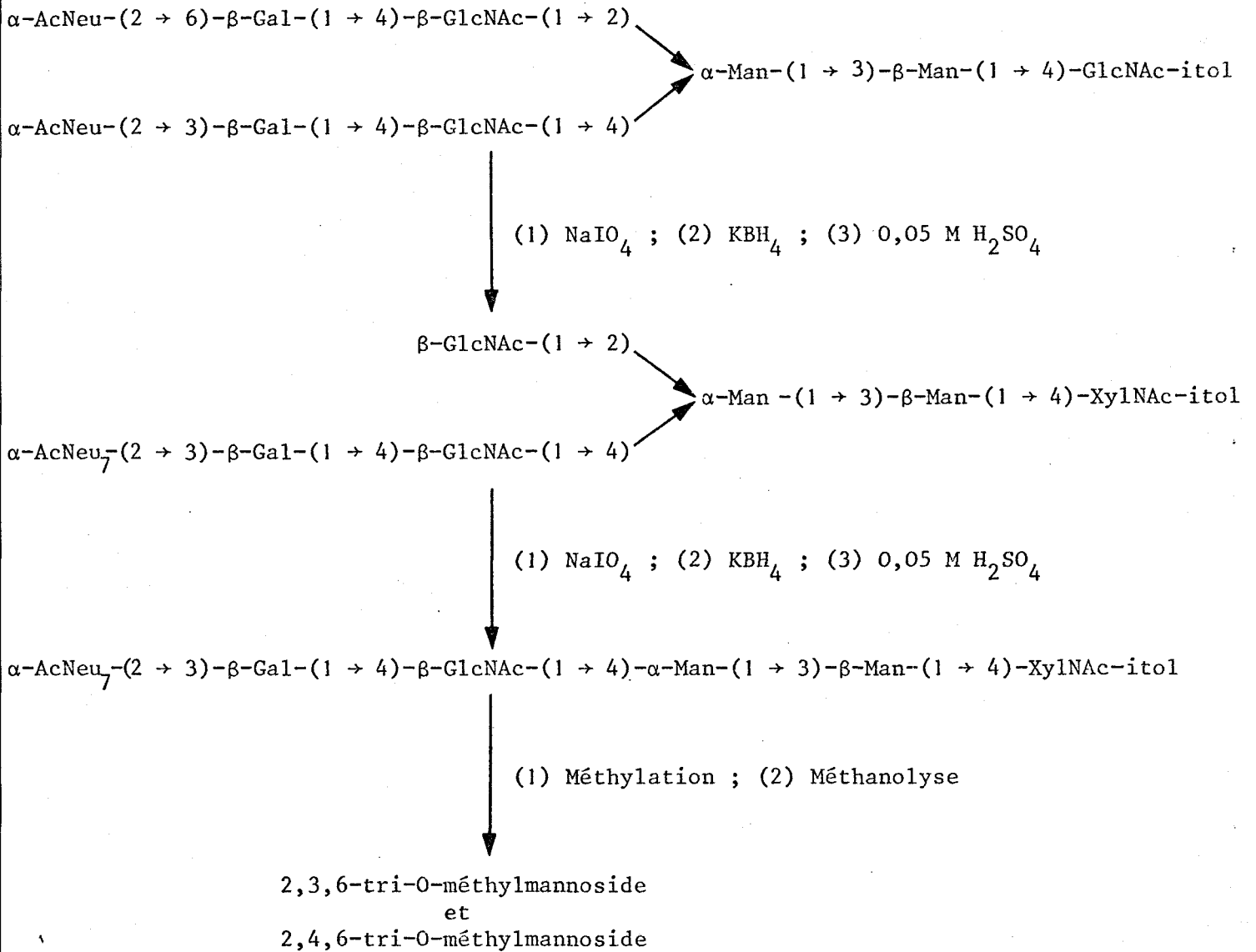


FIGURE 23

Dégradation de SMITH de l'oligosaccharide VI réduit.

AcNeu<sub>7</sub> : acide 5-acétamido-3,5 dideoxy-L-arabino-2 heptulosonique

XylNAc-itol : N-acétyl-D-xylosaminitol





TABLEAU XX

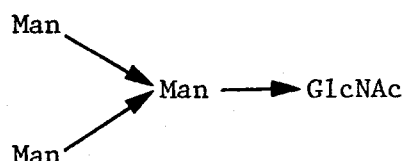
Influence des résidus N-acétylneuraminyl terminaux liés en  $\alpha$ -(2 → 3) et (2 → 3) sur le glissement chimique des protons anomériques et des protons N-acétyl des autres sucres des sialyl-oligosaccharides.

	Référence asialo glyco- peptide de la transfér- rine DOPLAND <u>et al.</u> 1977 (170 bis)		Oligosaccharide sialylé
Influence de (2 → 3) AcNeu	Gal	6,6' 4,470	4,548 ± 0,003 (n = 7)*
	Gal	8 4,469	
	NAc	5,5' 2,047	2,030 ± 0,001 (n = 7)
	NAc	7 2,078	
Influence de (2 → 6) AcNeu	Gal	6,6' 4,470	4,445 ± 0,002 (n = 11)
	GlcNAc	5,5 4,581	4,602 ± 0,005 (n = 11)
	Man	4 5,119	5,136 ± 0,003 (n = 8)
	Man	4' 4,926	4,947 ± 0,005 (n = 8)
	NAc	5,5 2,047	2,030 ± 0,001 (n = 11)

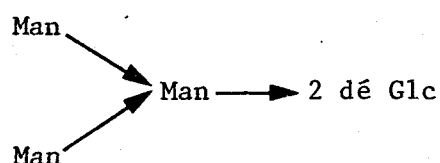
\* n = nombre de cas étudiés.



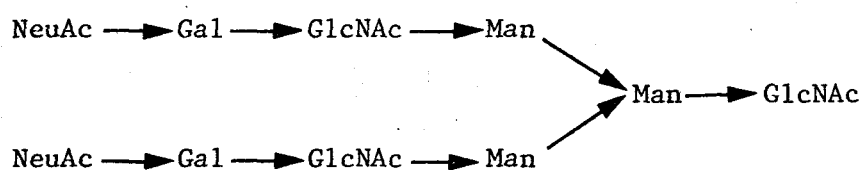
La présence du noyau



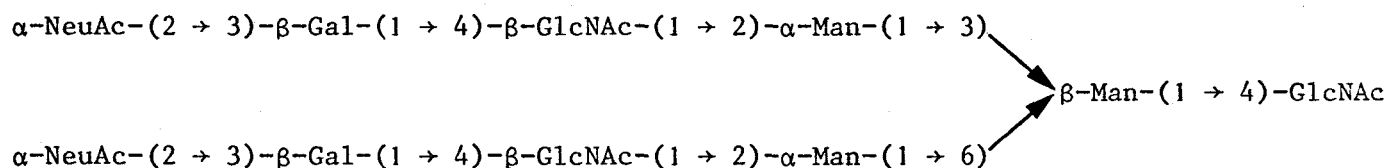
a été démontré selon le protocole expérimental décrit dans la figure 24. Le fait d'isoler le tétrasaccharide



procure la séquence suivante :



Cette structure a été confirmée par RMN, qui a en outre précisé les anoméries des liaisons osidiques. La structure de l'oligosaccharide VII est donc la suivante :



#### H - OLIGOSACCHARIDE VIII

L'oligosaccharide VIII renferme du galactose, du mannose, de la N-acétylglucosamine et de l'acide N-acétylneuraminique dans les proportions 1,91 : 3 : 2,89 : 1,81. La méthylation a fourni les éthers méthyliques suivants : méthyl 3,4,6-tri-O-méthylmannoside, méthyl 2,4,6-tri-O-méthylgalactoside, méthyl 2,3,4-tri-O-méthylgalactoside et méthyl 2,4-di-O-méthylmannoside dans les rapports 2,0 : 1,14 : 1,12 : 0,84. Cette analyse suggère que l'oligosaccharide VIII est un isomère de l'oligosaccharide VII, ne différent que par la nature de

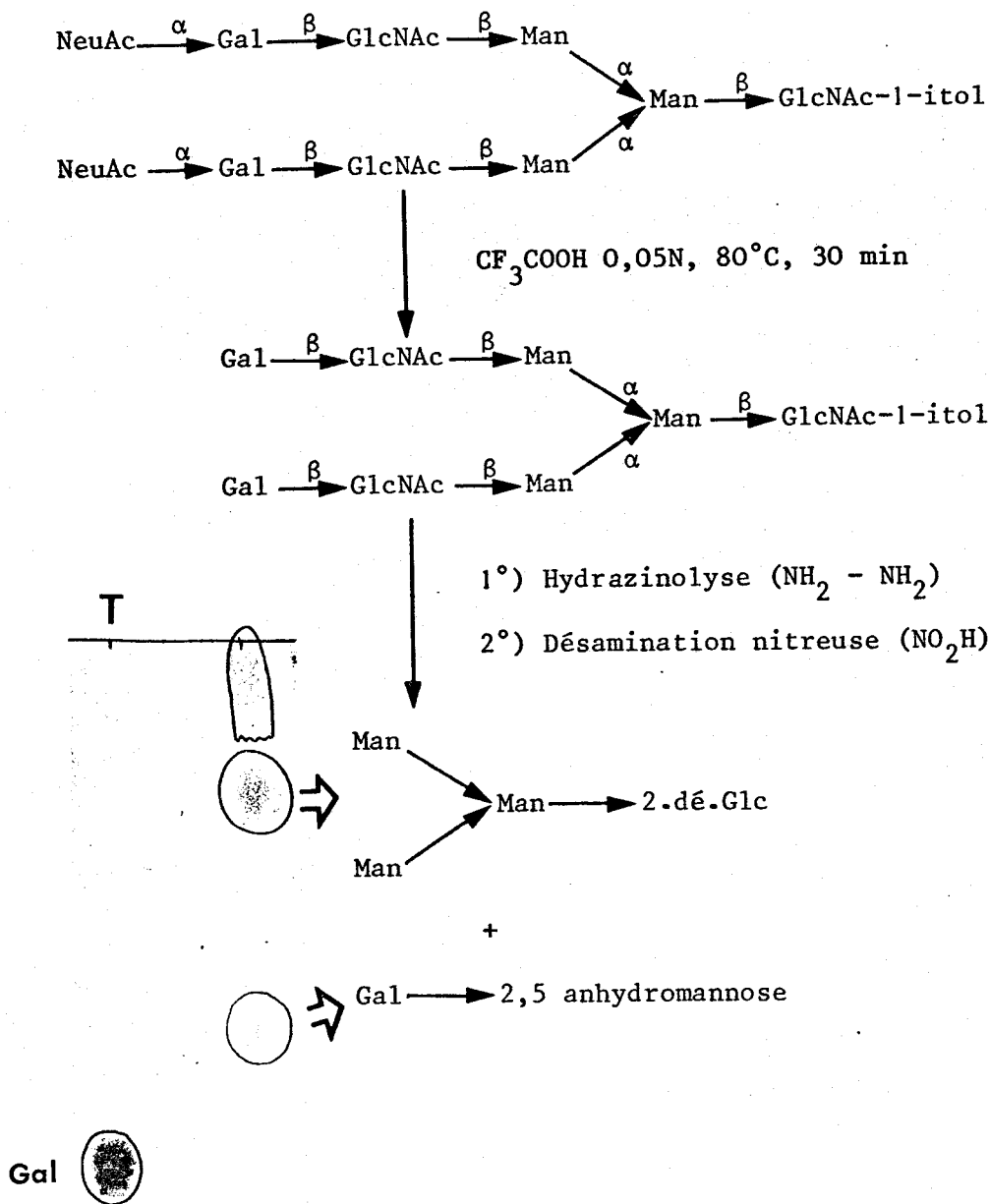
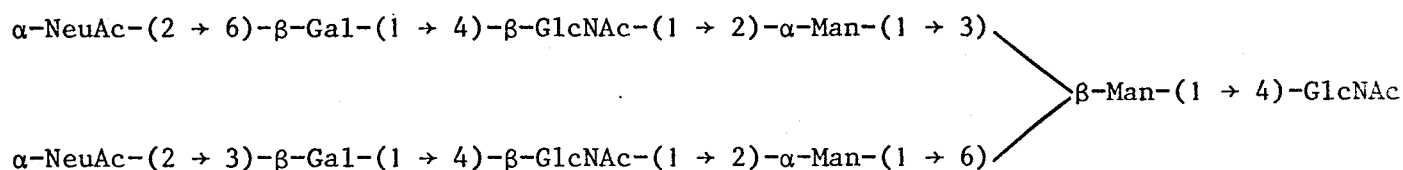


FIGURE 24

Hydrazinolyse-désamination nitreuse des oligosaccharides VII, VIII et IX (Chromatographie dans le système solvant acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau 5 : 5 : 1 : 3) 1 nuit.

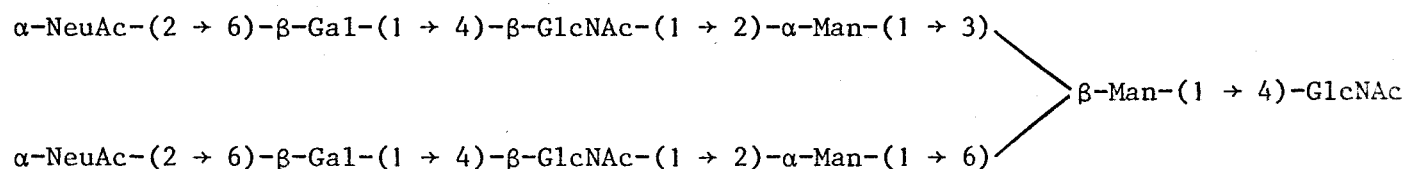


la liaison d'un des deux résidus sialyl. La position de ce résidu sialyl a tout d'abord été précisée en réalisant une acétolyse partielle de l'oligosaccharide VIII. En effet, la coupure préférentielle de la liaison Man-(1 → 6) permet la caractérisation chromatographique de l'oligosaccharide II, parmi les produits résultant de l'acétolyse. Ce résultat montre donc que le résidu sialyl (2 → 6) est lié sur la branche Man-(1 → 3). Ce résultat a été confirmé par RMN (Fig. 22). Le glissement chimique du proton anomérique du mannose 4 (5,119 → 5,138 ppm) montre que cette branche est substituée par un résidu sialyl (2 → 6). D'autre part, le glissement chimique du mannose 4' (4,926 → 4,926) n'est pas modifié, ce qui confirme la présence d'un résidu sialyl (2 → 3) sur la branche Man-(1 → 6). La structure de l'oligosaccharide VIII est donc la suivante :



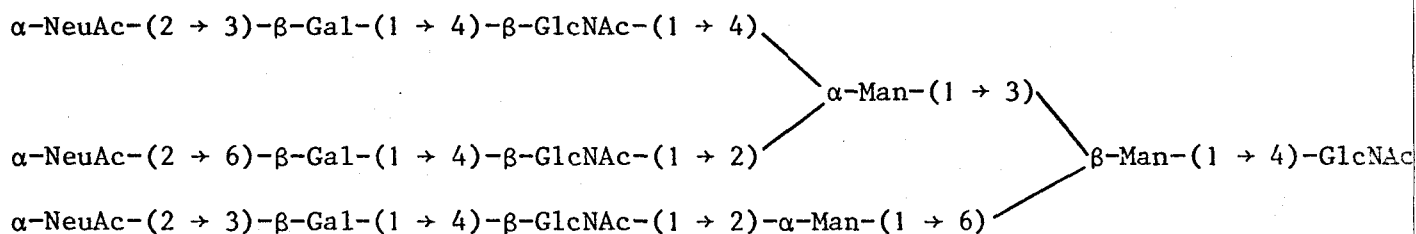
#### I - OLIGOSACCHARIDE IX

L'oligosaccharide IX renferme du galactose, du mannose, de la N-acétylglucosamine et de l'acide N-acétylneuraminique dans les proportions 2,12 : 3,0 : 3,08 : 1,96. La méthylation fournit du méthyl 3,4,6-tri-O-méthylmannoside, du méthyl 2,3,4-tri-O-méthylgalactoside et du méthyl 2,4-di-O-méthylmannoside dans les rapports 2,0 : 2,12 : 1,16. La présence d'un noyau trimannosidique a été confirmée par hydrazinolyse-désamination nitreuse (Fig. 24) et les anoméries caractérisées par RMN. La structure de l'oligosaccharide IX est la suivante :



J - OLIGOSACCHARIDE X

L'oligosaccharide X renferme du galactose, du mannose, de la N-acétylglucosamine et de l'acide sialique dans les rapports 3,21 : 3 : 3,95 : 2,78. La méthylation conduit à du méthyl 3,4,6-tri-O-méthylmannoside, du méthyl 2,4-di-O-méthylmannoside, du méthyl 3,6-di-O-méthylmannoside, du méthyl 2,3,4-tri-O-méthylgalactoside et du méthyl 2,4,6-tri-O-méthylgalactoside dans les proportions 1,0 : 0,88 : 0,74 : 1,12 : 1,89. Une étude préliminaire en spectroscopie RMN a permis de constater que la branche <sup>5</sup>GlcNAc (1 → 2) <sup>4</sup>Man possédait un résidu sialyl (1 → 6). Par analogie avec l'oligosaccharide XI (voir plus loin) une structure provisoire a été proposée :



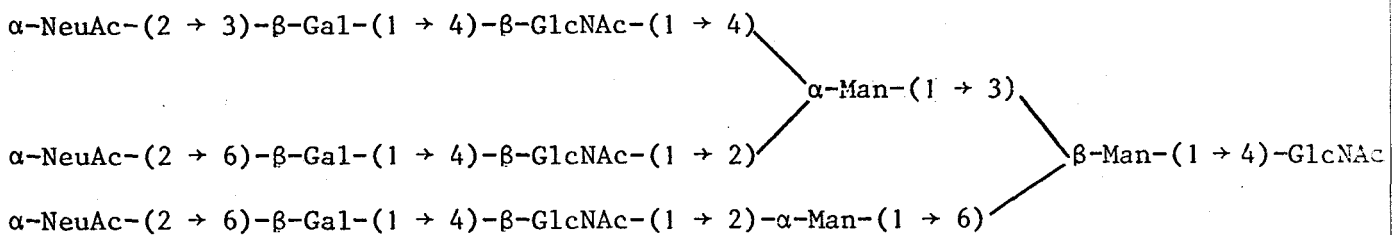
K - OLIGOSACCHARIDE XI

L'oligosaccharide XI renferme du galactose, du mannose, de la N-acétylglucosamine et de l'acide N-acétylneuraminique dans les proportions 3,18 : 3 : 3,95 : 2,82. La méthylation fournit les dérivés méthylés suivants : méthyl 3,4,6-tri-O-méthylmannoside, méthyl 2,4-di-O-méthylmannoside, méthyl 3,6-di-O-méthylmannoside, méthyl 2,3,4-tri-O-méthylgalactoside et méthyl 2,4,6-tri-O-méthylgalactoside dans les rapports : 1,0 : 0,85 : 0,82 : 2,05 : 0,89.

L'analyse en RMN (Fig. 22) a permis les conclusions suivantes : la substitution du mannose 4 par un résidu supplémentaire de lactosamine provoque un glissement du signal du proton H-2 du mannose 4 de 4,198 → 4,225 ppm (DORLAND et al., 1978) (171). Ce glissement caractéristique de ce type de structure avait été observé pour l'oligosaccharide VI (4,198 → 4,217 ppm) et pour les glycopeptides isolés de l'orosomucoïde qui possédaient ce même élément de structure.

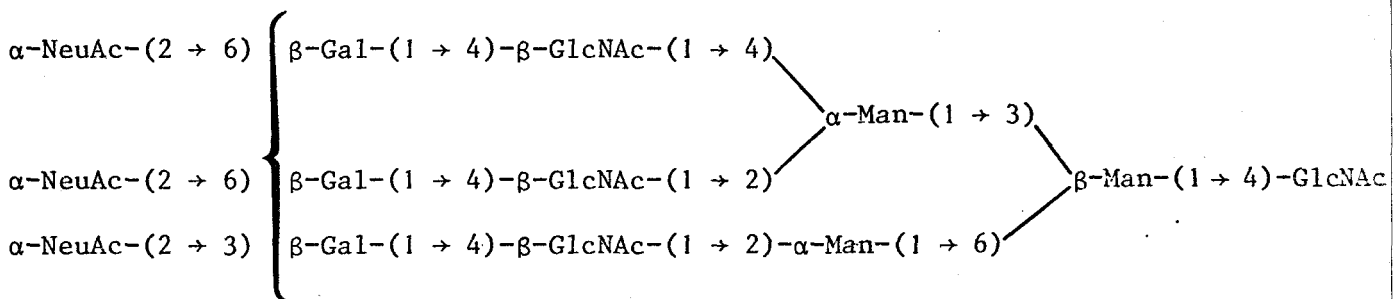
D'autre part, le glissement observé pour le proton anomérique du mannose 4' (4,926 → 4,943 ppm) montre que cette branche est substituée par un résidu  $\alpha$ -(2 → 6) sialyl. Le glissement des protons H-1 des résidus 4,5,6 est spécifique lui aussi d'une liaison d'un résidu  $\alpha$ -(2 → 6) sialyl sur cette branche, le seul acide sialique restant à placer (sialyl 2 → 3) se situant donc sur le galactose 8.

Sur la base de ces résultats, la structure de l'oligosaccharide XI est donc la suivante :



#### L - OLIGOSACCHARIDE XII

Les analyses concernant l'oligosaccharide XII (méthanolyse et méthylation) ont conduit aux mêmes résultats que ceux qui concernent l'oligosaccharide XI. Il s'agit donc d'un isomère de l'oligosaccharide XI, ne différant que par la position des résidus sialyl. Sa structure provisoire est la suivante :

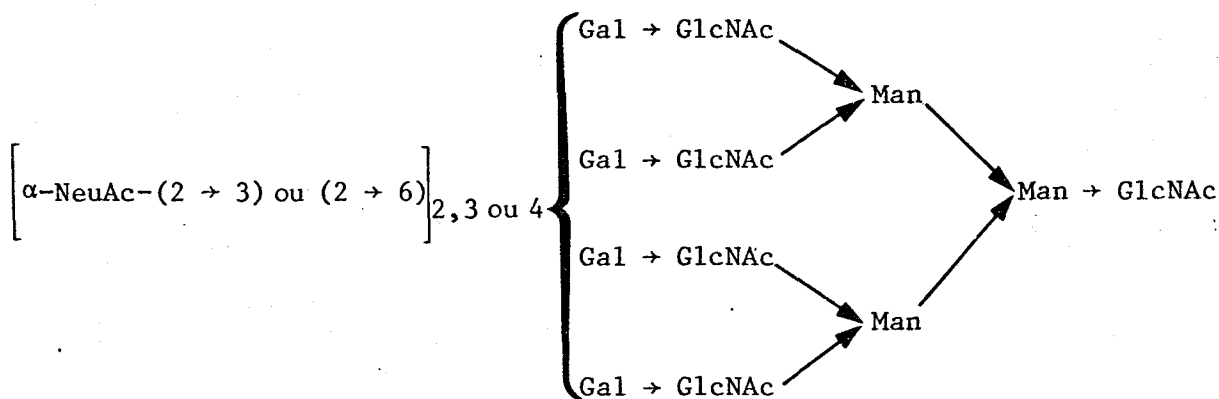


### III - CONCLUSIONS

La figure 25 rassemble les structures des 12 principaux sialyl-oligosaccharides isolés de l'urine des patients. Ces oligosaccharides ont été de même caractérisés dans toutes les urines de patients atteints de mucopolysaccharidose I, II et III, ainsi que dans les autres cas de mucopolysaccharidose (De P., W. et N), comme le montrent les figures 16 à 19.



Nous avons en outre caractérisé 8 autres sialyl-oligosaccharides, dont l'étude chimique n'a été que partiellement abordée. Des premiers résultats, il ressort qu'il s'agit d'isomères des oligosaccharides décrits ci-dessus, les structures variant seulement en fonction du nombre et du mode de liaison des résidus sialyl. Trois sialyl-oligosaccharides, en particulier, possèdent le schéma général de structure :



Les conclusions que nous pouvons tirer de l'étude de ces oligosaccharides sont les suivantes :

1°) Tous les oligosaccharides isolés de l'urine des patients atteints de sialidose sont construits sur le même modèle, que l'on peut subdiviser en classes (Fig. 26). Les classes E et F pouvant se subdiviser en sous-classes selon le nombre de résidus d'acide sialique externe.

L'urine des patients renferme près de 30 oligosaccharides différents, dont plus de 20 ont été caractérisés. Il est probable que les nouvelles entités qui restent à isoler auront des structures analogues, d'autant que la méthylation globale de tous les oligosaccharides en mélange ne conduit pas à des éthers méthyliques nouveaux.

Ces résultats confirment le schéma général de structure des glycoprotéines de type lactosaminique proposé par MONTREUIL (1976) (172).

Il est remarquable de constater qu'un tel schéma général de structure est compatible avec un nombre élevé de structures différentes, si l'on tient compte de la possibilité offerte à chaque galactose externe d'être substitué par



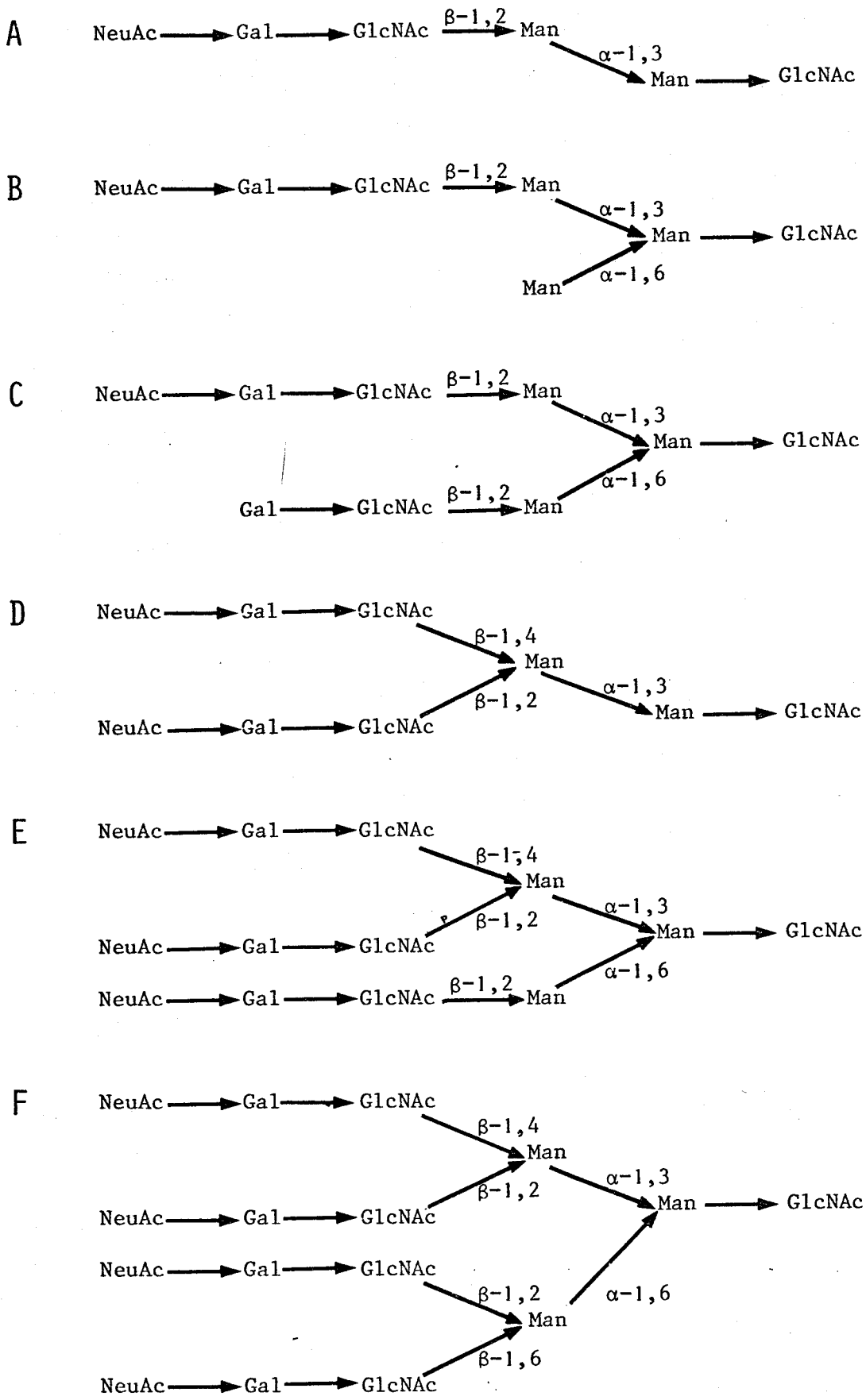


FIGURE 26

Structure des 6 classes de glycanes caractérisées dans les urines de sialidose.



un acide sialique en (2 → 3) ou (2 → 6) ou de n'être pas substitué.

Enfin, dans le cas d'un déficit total en  $\alpha$ -neuraminidase, il est plus que probable que tous les glycanes incomplètement dégradés de l'organisme s'accumulent dans l'urine, et nous pouvons alors supposer que ces oligosaccharides constituent une liste exhaustive de toutes les structures possibles. Le nombre de ces structures est d'ailleurs multiplié par la présence éventuelle d'un résidu d' $\alpha$ -fucose lié en (1 → 6) sur la N-acétylglucosamine n° 1 ou en (1 → 3) sur la N-acétylglucosamine n° 7 (Figure 8 p. 36).

2°) La figure 8 rassemble un certain nombre de structures glycaniques connues. Toutes possèdent un chaînon N-acétylchitobiose lié à l'asparagine de la chaîne peptidique.

Le fait que tous les oligosaccharides présents dans l'urine ne possèdent qu'une seule N-acétylglucosamine en position terminale réductrice ne peut s'expliquer que par l'existence d'une  $\beta$ -endo-N-acétylglucosaminidase capable de libérer les sialyl-oligosaccharides. Une telle enzyme reste à mettre en évidence chez les mammifères, puisque les seules  $\beta$ -endo-N-acétylglucosaminidases connues ne peuvent agir que sur des glycanes de type oligomannosidique (TAI et al., 1975) (173). Le fait que les exoglycosidases soient nettement plus actives vis à vis de substrats oligosaccharidiques que vis à vis de glycopeptides (BEARPARK et al., 1977) (174) nous permet de poser en hypothèse que le catabolisme des glycoprotéines (ou glycopeptides résultant de l'action de protéinases) débute par l'action d'une telle  $\beta$ -endo-N-acétylglucosaminidase.

3°) Le fait de disposer d'une série homogène d'oligosaccharides de complexité structurale croissante a permis l'étalonnage d'un spectromètre de résonance magnétique nucléaire (DORLAND et al., 1978) (175) et les résultats obtenus permettent dès à présent d'aborder des études structurales par cette seule technique.

4°) La caractérisation d'une excrétion massive de sialyl-oligosaccharides dans l'urine de ces patients nous a donc permis de poser l'hypothèse d'une déficience primaire en  $\alpha$ -neuraminidase. Avant de vérifier ce dernier point, il est intéressant de noter que les taux relatifs des divers oligosaccharides varient d'un sujet à l'autre (Fig. 16 à 19 et Tableau XVI). Ainsi, les oligosaccharides possédant respectivement des liaisons sialyl (2  $\rightarrow$  6) et (2  $\rightarrow$  3) sont dans des rapports de 1 : 1 dans le cas des mucopolidoses II et III, et de 8 à 30 : 1 dans le cas des autres mucopolidoses. Cette observation laissant supposer des déficits affectant des espèces enzymatiques différentes, nous avons utilisé comme substrats naturels des sialyl-oligosaccharides possédant précisément des liaisons sialyl  $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  3) ou (2  $\rightarrow$  6) pour vérifier une éventuelle spécificité enzymatique.

### 3. MISE EN EVIDENCE D'UN DEFICIT EN $\alpha$ -NEURAMINIDASE ASSOCIE AUX DIFFERENTES MUCOLIPIDOSES

La méthode de dosage la plus couramment utilisée pour la détermination de l'activité neuraminidasique, est celle à l'acide thiobarbiturique de WARREN, (1959) (176).

Cependant, outre son manque de sensibilité (0,1  $\mu$ g d'acide sialique libéré) cette méthode présente l'inconvénient de ne pouvoir être appliquée aux homogénats cellulaires bruts en raison des nombreuses interférences enregistrées, notamment avec le désoxyribose (WARREN 1959) (177), avec le saccharose (HORVAT et TOUSTER 1968) (178), et les acides uroniques (PREISS et ASHWELL 1962) (179).

En plus, et pour des raisons encore incomprises, plusieurs composés contenant de l'acide sialique lié, réagissent positivement à la réaction de WARREN (CARUBELLI et al., 1965) (180); (BROWN et al., 1970) (181).

D'autres méthodes utilisent comme substrats des dérivés possédant des parties aglycones chromogéniques, tels les groupements phényl (MEINDL et TUPPY, 1967) (182), les méthoxyphényl (PALESE et al., 1973) (183). L'inconvénient de ces méthodes, outre le manque de spécificité des substrats, est que le réactif de Folin Ciocalteu employé pour développer la coloration due à la partie phénolique libérée, réagit également avec les acides aminés aromatiques des protéines présentes dans le milieu d'incubation.

Récemment plusieurs auteurs (SCHAUER et al., 1976) (184), (BERNACKI et BOSMANN, 1973) (185) se sont proposés d'estimer l'activité sialidasique en mesurant la radioactivité libérée après marquage de l'acide sialique au tritium suivant la méthode de VAN LENTEN et ASHWELL (1972) (186). Cette méthode bien que très sensible, présente l'inconvénient de ne donner qu'une valeur en c.p.m. de l'activité, sans que celle-ci soit quantifiable en nanomoles d'acide sialique

libéré. D'autre part, l'acide sialique ne possède plus que 7 ou 8 carbones, et ne constitue donc plus le substrat réel des neuraminidases.

Devant les nombreux inconvénients présentés par les méthodes préexistantes, nous avons mis au point une ultra microméthode de radiodosage de la neuraminidase directement applicable aux homogénats cellulaires, utilisant comme substrats les 2 sialyloligosaccharides majeurs accumulés dans l'urine d'un patient atteint de Mucopolidose type II. Un procédé identique à celui que nous décrivons ci-dessous a été également proposé par BHAVANADAN et al. (1975) (187).

## I - MATÉRIEL ET MÉTHODES

### A - MARQUAGE DES SUBSTRATS

Les sialosides I et II sont réduits spécifiquement sur la N-acétyl glucosamine en position terminale réductrice à l'aide de borohydrure tritié  $B(H^3)_4K$ .

#### 1 - Réduction

Le borohydrure de potassium d'activité spécifique 20 Ci/mM nous a été fourni par le commissariat à l'énergie atomique (CEA). Toutes les réactions sont effectuées à + 4°C en raison de la grande labilité des liaisons sialyl.

##### a) mode opératoire

Une solution de  $BH_4K-\{^3H\}$  (0,25  $\mu$ moles, activité totale 5 mCi) dans 800  $\mu$ l de NaOH 0,05 M est ajoutée à 10 mg de sialoside (8,3  $\mu$ moles) en solution dans 200  $\mu$ l de NaOH 0,05 M. L'addition se fait en quatre fois à intervalles de 10 minutes. Après addition totale du borohydrure tritié, on laisse la réaction se développer durant 1 heure. On ajoute ensuite du borohydrure froid en excès pour compléter la réduction.

##### b) arrêt de la réduction

Après 2 heures, la réaction est arrêtée par addition de Dowex 50 x 8, mesh 25-50, forme  $H^+$ ; la solution est ensuite filtrée sur laine de verre. L'effluent est directement recueilli dans un ballon conique et évaporé à siccité sous pression réduite à + 30°C.

c) élimination du borohydrure tritié

Le borohydrure en excès est éliminé sous forme de méthyl-borates volatils . Pour cela, le résidu sec est soumis à 3 cycles successifs de reprise par le méthanol et évaporation sous pression réduite.

2 - Purification du substrat marqué

Afin d'éliminer les traces d'acide borique tritié qui souillent notre préparation, le résidu final est amené à 2 ml et chromatographié sur colonne de Biogel P-2 mesh 200-400 (1 x 90 cm) ; l'élution est réalisée par l'eau distillée. Les fractions correspondant au pic présentant le maximum de radioactivité et donnant une réaction positive au réactif phénol-sulfurique (DUBOIS et al. 1956) (188), sont rassemblées et concentrées par évaporation sous pression réduite. Le résidu final est amené à environ 10 ml avec de l'eau bidistillée.

3 - Calcul de l'activité spécifique du substrat

La radioactivité d'un échantillon de 10  $\mu$ l est mesurée. Parallèlement la quantité d'acide sialique par ml de solution est mesurée par la méthode de DISCHE à la diphénylamine (189).

L'activité spécifique des substrats est de l'ordre de 100 000 c.p.m./nmole d'acide sialique donc par nmole de substrat. En raison du bruit de fond enregistré dans les mesures de radioactivité, on estimera comme appréciable une évolution de la radioactivité de 100 c.p.m. par rapport au témoin. Cette méthode permet donc d'apprécier de l'ordre de la picomole d'acide sialique libéré donc de substrat hydrolysé.

B - PREPARATION DES LEUCOCYTES

1 - Mode opératoire

10 ml de sang veineux sont prélevés dans une seringue préalablement rincée avec une solution d'héparine. Le sang est placé dans un tube à centrifuger conique contenant 2 ml d'une solution Dextran-Héparinée :

- 250 ml de Dextran 10 %
- 250 ml de sérum physiologique (NaCl 9 %.)
- 0,5 ml d'héparine 5000 U (Roche)

On agite par retournement, débouche et laisse reposer une heure à température ambiante; les hématies sédimentent. On prélève alors le surnageant (5 ml) renfermant le plasma et les leucocytes en suspension. On centrifuge à 6000 t/mn pendant 10 min et on rejette le surnageant (plasma). Le culot renfermant les leucocytes souillés d'hématies est lavé par 2 ml d'une solution de chlorure d'ammonium à 0,85 % pour provoquer l'hémolyse. La solution est laissée 15 min dans un bain de glace. On centrifuge ensuite lentement (1000 t/mn) pendant 10 min. L'opération de lavage est renouvelée plusieurs fois jusqu'à obtention d'un culot leucocytaire parfaitement blanc.

## 2 - Homogénéisation

En vue d'effectuer les dosages enzymatiques le culot de leucocytes est remis en suspension dans 1 ml de tampon acétate de sodium 0,05 M ; pH 4,4. Il est ensuite soumis à une homogénéisation dans un bain de glace, à l'aide d'un petit homogénéiseur de DOUNCE (10 coups de piston).

## 3 - Estimation du taux de protéine

Les activités enzymatiques étant ramenées au mg de protéine , il est nécessaire de mesurer la quantité de protéine dans la suspension leucocytaire prélevée pour le dosage.

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode de LOWRY et al. (1951) (190) en employant la sérum albumine bovine (S.A.B.) comme standard.

## C - CULTURE DES FIBROBLASTES

Les cellules sont cultivées dans des flacons Falcon de 25 cm<sup>2</sup>. L'ensemencement est fait à  $3 \times 10^4$  cellules par cm<sup>2</sup> dans 5 ml de "Minimun Essentia Medium"

MEM de Eagle (Flow) auquel on ajoute du Tryptose phosphate Broth, du glucose 3,5 g/l, de la glutamine 0,3 g/l, des antibiotiques (pénicilline 105 U/l et streptomycine 0,1 g/l) ainsi que du sérum de veau foetal à la concentration de 2,5 % à 15 %. Le milieu de culture est régulièrement renouvelé. Le dosage enzymatique est réalisé sur l'équivalent de 3 boîtes de culture.

Après élimination du milieu et rinçage par le tampon P.B.S. ( Tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,2 ; NaCl 9%), les cellules sont détachées mécaniquement à l'aide d'un grattoir, et sont récupérées en suspension dans 10 ml de tampon P.B.S.. Après centrifugation, le culot de cellules est repris par 1 ml de tampon acétate de sodium 0,05 M, pH 4,5, et les cellules sont homogénéisées à l'aide de l'homogénéiseur de DOUNCE.

#### D - ESTIMATION DES ACTIVITES GLYCOSIDASIQUES

Les activités des principales glycosidases sont mesurées à l'aide de substrats de synthèse fluorescents. Chaque essai enzymatique est réalisé de manière suivante :

- 10  $\mu$ l d'acétate de sodium 1 M ou tampon acide citrique/phosphate de sodium 1 M
- 5 - 25  $\mu$ l de solution enzymatique (100  $\mu$ g de protéine)
- 10 à 50  $\mu$ l de substrat dans un volume total de 0,1 ml, correspondant à des concentrations de substrat allant de 0,5 mM à 5 mM.

Chaque mélange réactionnel est incubé à 37° sous agitation pendant des durées allant de 5 à 15 minutes. Les réactions sont arrêtées par addition de 2 ml de tampon glycine/hydroxyde de potassium 0,25 M pH 10,3. La 4-méthylumbelliférolone libérée est mesurée fluorimétriquement au spectrofluorimètre, la longueur d'onde d'excitation étant de 366 nm et la longueur d'onde d'émission de 446 nm. Toutes les mesures sont réalisées en triple, et seule la valeur moyenne est prise en considération.

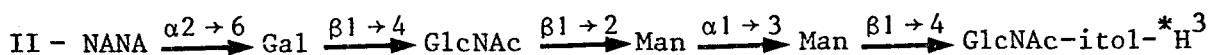
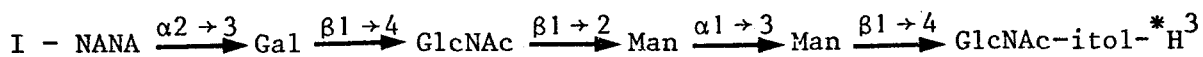


## II - RÉSULTATS

### A - METHODE DE DOSAGE DE L'ACTIVITE $\alpha$ -NEURAMINIDASIQUE

#### 1 - Principe

Les substrats utilisés sont respectivement :



L'action de la neuraminidase sur le substrat se traduit par une libération de l'acide sialique non marqué et de la partie glycanique radioactive.

Après action de la neuraminidase, nous obtenons deux fractions :

- une fraction acide constituée par l'acide sialique libéré et par le substrat non dégradé
- une partie neutre radioactive correspondant au substrat désialylé après action de l'enzyme.

La méthode de dosage consiste à séparer ces deux fractions afin d'estimer la radioactivité de la fraction neutre et pouvoir ainsi mesurer l'activité neuraminidasique.

La séparation pourra être obtenue par passage sur une colonne échangeuse d'anions (Fig. 27) Dowex 1 x 2, "mesh" 200-400, forme  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , qui retiendra l'acide sialique libéré et le substrat non dégradé (fraction acide). La partie neutre, correspondant au substrat hydrolysé par l'enzyme ne sera pas retenue ; on la recueille et mesure sa radioactivité.

#### 2 - Mode opératoire

Les essais enzymatiques sont effectués de manière suivante :

- 20  $\mu\text{l}$  de la solution de substrat (20 à 200 nmoles)
- 100  $\mu\text{l}$  de tampon acétate 0,05 M (le pH étant indiqué pour chaque expérience)
- 100  $\mu\text{l}$  de l'homogénat cellulaire (200 à 300  $\mu\text{g}$  de protéines) fraîchement préparé.

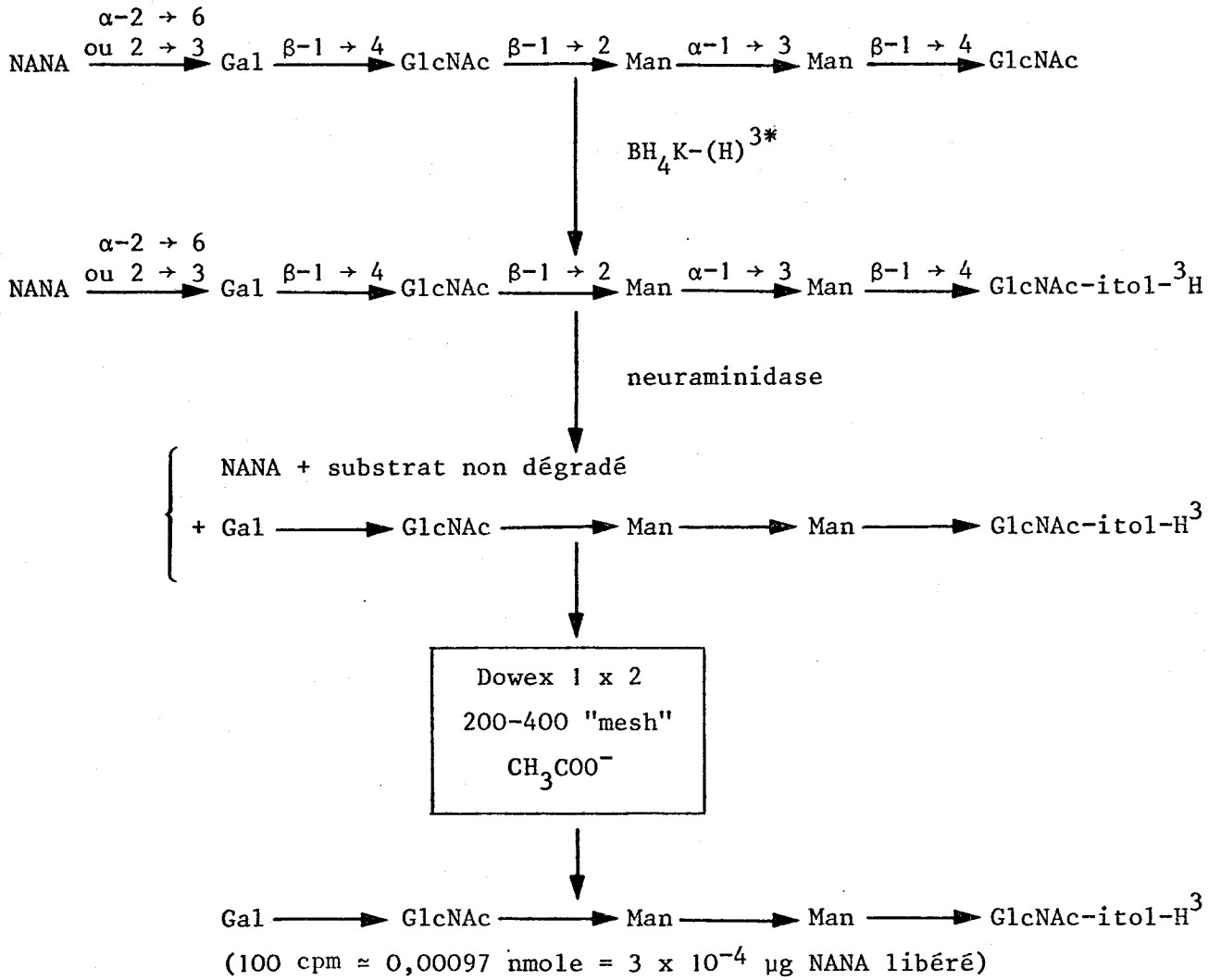


FIGURE 27

Méthode de dosage de la neuraminidase



Parallèlement à ces essais, seront effectués des témoins blancs où la suspension cellulaire est remplacée par de l'eau distillée, afin d'estimer l'auto-hydrolyse de la liaison sialyl qui est assez labile. D'autre part, une goutte de toluène est ajoutée à chaque tube afin d'éviter la contamination bactérienne. L'incubation est réalisée à 37°C, sous agitation et pendant 2 heures. La réaction est ensuite stoppée par congélation brutale des tubes à - 20°C.

Après congélation, chaque tube est amené à 1 ml avec de l'eau distillée. Le contenu de chaque tube est alors appliqué sur une colonne échangeuse d'anions Dowex 1 x 2, "mesh" 200-400, forme  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , 0,5 x 3 cm. Chaque colonne est alors éluée par un excès d'eau distillée (environ 4 ml). Après évaporation à l'étuve à 80°, le résidu est repris par 1 ml d'eau et 10 ml de liquide scintillant et la radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide.

#### B - DETERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES D'ACTIVITE ENZYMATIQUE

Les conditions optimales d'activité neuraminidasique ont été déterminées sur des homogénats leucocytaires. Ces résultats sont rassemblés sur la Fig. 28.

##### 1 - Influence du pH

On constate que le pH optimum diffère suivant que l'on estime l'activité neuraminidasique 2 → 6 ou 2 → 3. Le pH optimum est de 4,4 pour l' $\alpha$ -2 → 6 neuraminidase. Ce pH optimum est légèrement plus acide pour l' $\alpha$ -2 → 3 neuraminidase et se situe aux environs de pH 4,0.

##### 2 - Influence de la température

De même que pour le pH, les 2 activités neuraminidasiques se distinguent par leur sensibilité à la température. Si le maximum d'activité  $\alpha$ -2 → 3 est obtenu pour une température de 37°C, l'activité  $\alpha$ -2 → 6 est optimale pour une température de 25°C. L'activité  $\alpha$ -2 → 6 semble beaucoup plus thermolabile. Un phénomène analogue est obtenu après congélation : des culots leucocytaires

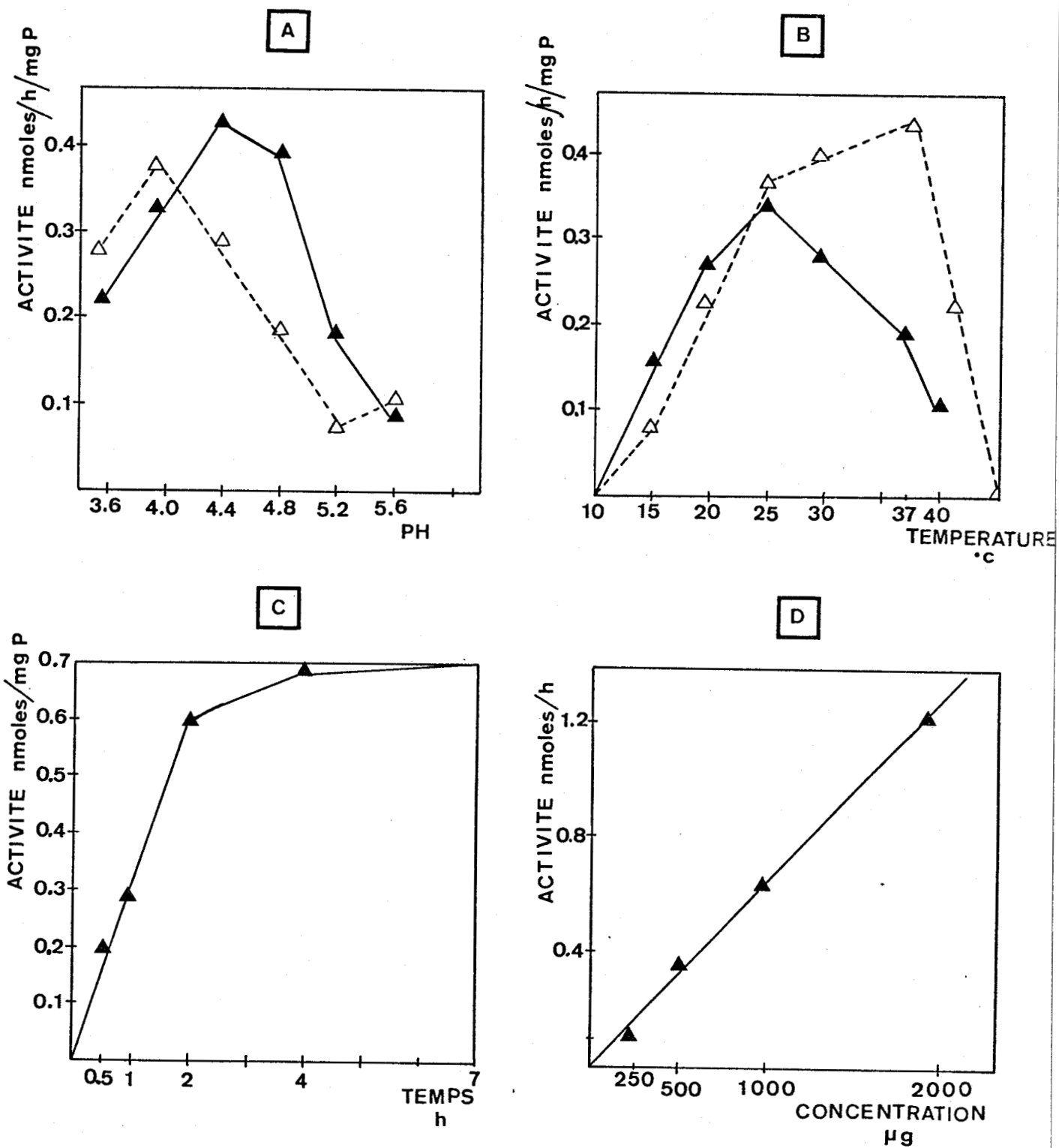


FIGURE 28

Détermination des conditions optimales d'activité neuraminidasique

- ▲ — ▲  $\alpha$ -2  $\rightarrow$  6 neuraminidase
- △ - - - △  $\alpha$ -2  $\rightarrow$  3 neuraminidase



TABLEAU XXI

Activité\* des principales hydrolases acides leucocytaires chez les différents malades. (nmoles/h/mg protéine)

	Contrôle	ICD 1	ICD 2	De PF	De PC
$\beta$ -galactosidase	143,4 $\pm$ 88,2	20,4	150	124,35	100,58
$\beta$ -glucosaminidase	783,6 $\pm$ 51,6	300	960	970,3	726,44
$\beta$ -glucuronidase	320 $\pm$ 151	60	354	-	-
$\beta$ -glucosidase	9 $\pm$ 6	2,88	3	-	-
$\alpha$ -galactosidase	41,4 $\pm$ 34	23,4	12	-	-
$\alpha$ -mannosidase pH 3,5	83 $\pm$ 29	127	-	-	-
pH 4,5	141 $\pm$ 59	222	-	123,04	234,45
Arylsulfatase A	299 $\pm$ 176	216	-	159,63	94,64

\* Ces mesures ont été effectuées à l'aide de substrat de synthèse (umbelliférylglycosides)



TABLEAU XXII

Activité  $\alpha$ -neuraminidasique dans les leucocytes  
(nmoles/h/mg protéine)

	Substrat	
	$\alpha$ -AcNeu-(2 $\rightarrow$ 6)-R	$\alpha$ -AcNeu-(2 $\rightarrow$ 3)-R
1 - Concentration en substrat	20 nmoles/200 $\mu$ l	
Contrôles	0,128 - 0,488 (0,330 ; n = 30)	nd
MLP II cas n° 1	0,00	nd
cas n° 2	0,020	nd
MLP III patient	0,045	nd
père	0,232	nd
mère	0,219	nd
MLP W.	0,006	nd
MLP De P. frère	0,036	nd
soeur	0,045	nd
2 - Concentration en substrat	400 nmoles/200 $\mu$ l	
Contrôles	13,77 - 29,60 (19,60 ; n = 12)	8,00 - 12,90 (12,40 ; n = 12)
MLP II cas n° 3	2,00	1,60
cas n° 4	0,02	2,45
MLP W.	0,00	9,92
MLP I	0,00	10,90



TABLEAU XXIII

Activité des principales hydrolases acides dans les fibroblastes de Mucoïdose type I (MLP I). (nmoles/h/mg protéine).

\* Activités mesurées à l'aide de substrat de synthèse.

	Contrôle	MLP I (cas n° 2)
$\beta$ -D-glucuronidase	1,80 - 6,05	5,01
$\beta$ -D-galactosidase	5,60 - 9,53	7,16
$\alpha$ -N-acétyl-D-glucosaminidase	0,07 - 0,19	0,10
$\beta$ -N-acétyl-D-glucosaminidase	104,34 - 210,80	146,92
$\alpha$ -L-fucosidase	0,32 - 1,31	0,32
$\alpha$ -D-mannosidase	0,69 - 1,61	1,11
Arylsulfatase A	4,21 - 12,02	7,73
Phosphatase acide	6,96 - 15,25	19,80

TABLEAU XXIV

Activité  $\alpha$ -neuraminidasique dans les fibroblastes de Mucoïdose type I et De P. (nmoles/h/mg protéine)

Concentration en substrat	Substrats	
	$\alpha$ -AcNeu-(2 $\rightarrow$ 6)-R	$\alpha$ -AcNeu-(2 $\rightarrow$ 3)-R
	20 nmoles/200 $\mu$ l.	40 nmoles/200 $\mu$ l
Contrôle n° 1	0,436	0,339
Contrôle n° 2	0,835	0,668
MLP De P. (frère)	0,020	0,267
MLP I	0,00	0,607



maintenus 1 minute à  $-20^{\circ}\text{C}$  ne conservent plus que 30 % de l'activité neuraminidase  $\alpha-2 \rightarrow 6$  initiale, alors que l'activité  $\alpha-2 \rightarrow 3$  ne semble pas modifiée. Ces phénomènes montrent la nécessité d'effectuer les dosages, immédiatement après prélèvement des leucocytes ou fibroblastes.

### 3 - Influence du temps d'incubation et de la concentration en protéine

L'activité est une fonction linéaire du temps jusqu'à environ 2 heures d'incubation, à la suite de quoi elle tend vers un palier. Le phénomène résulte vraisemblablement d'une dénaturation de l'enzyme au cours du temps. L'incubation est réalisée à  $37^{\circ}\text{C}$ .

On peut enfin noter que l'activité est une fonction linéaire de la concentration en protéine.

### 4 - Conclusion

En routine les incubations sont réalisées dans le tampon acétate de sodium 0,05 M pH 4,4 pendant une durée de 2 h, à une température de  $25^{\circ}$  ou  $37^{\circ}\text{C}$ . Les quantités de protéine ajoutées varient suivant les préparations de 100 à 300  $\mu\text{g}$ .

## C - MESURE DES ACTIVITES NEURAMINIDASIQES AU NIVEAU DES LEUCOCYTES ET DES FIBROBLASTES DES DIFFERENTS MALADES (Tableaux XXII et XXIV)

### 1 - Mucopolidose type II

Si toutes les hydrolases acides lysosomiales conservent une activité normale au niveau des leucocytes, (Tableau XXI) on constate que l'activité neuraminidase est nulle, ou très fortement affaiblie (de l'ordre de 8 % de la normale).

D'autre part, cette diminution est observée aussi bien pour l'activité  $\alpha-2 \rightarrow 6$  neuraminidase que pour l'activité  $2 \rightarrow 3$ .

### 2 - Mucopolidose de type III

L'activité  $\alpha-2 \rightarrow 6$  neuraminidase est très diminuée dans le leucocyte, ne présentant que 20 % de l'activité normale. Cette activité semble toutefois légèrement plus élevée que dans la Mucopolidose de type II (8 %). L'activité  $\alpha-2 \rightarrow 3$  neuraminidase n'a pu être mesurée.



L'activité  $\alpha$ -2  $\rightarrow$  6 neuraminidasique mesurée chez les parents est égale à 60 % de la valeur normale chez le père, et à 30 % chez la mère.

Il semble donc que le statut d'hétérozygotes peut être avancé pour les parents. Cependant la mesure n'a pu être effectuée que dans un seul cas, et un échantillonnage beaucoup plus important serait nécessaire pour confirmer un mode de transmission autosomal récessif pour cette maladie, sur des bases enzymatiques.

### 3 - Mucopolidoses I, LW, De P.

Contrairement à la Mucopolidose de type II, seule l'activité  $\alpha$ -2  $\rightarrow$  6 neuraminidasique est déficiente dans les Mucopolidoses LW et De P., l'activité  $\alpha$ -2  $\rightarrow$  3 neuraminidasique étant conservée. Une observation analogue est faite pour la Mucopolidose de type I, où l'activité  $\alpha$ -2  $\rightarrow$  6 neuraminidasique est nulle dans les 3 cas étudiés ; l'activité  $\alpha$ -2  $\rightarrow$  3 neuraminidasique est quant à elle de 100 % et 26 % dans les 2 premiers cas étudiés, nulle dans le troisième cas. La grande dispersion des résultats laisse suggérer des mutations différentes responsables du large spectre clinique observé pour la maladie.

### 4 - Conclusion

L'hypothèse d'un déficit en  $\alpha$ -neuraminidase associé aux différentes Mucopolidoses est donc bien vérifiée.

L'utilisation de substrats spécifiques nous a permis de différencier les Mucopolidoses de type II et III, présentant une double déficience en  $\alpha$ -2  $\rightarrow$  3 et  $\alpha$ -2  $\rightarrow$  6 neuraminidasases, des Mucopolidoses De P., L.W. et I présentant une déficience de la seule  $\alpha$ -2  $\rightarrow$  6 neuraminidase, l'activité neuraminidasique  $\alpha$ -2  $\rightarrow$  3 étant normale ou légèrement diminuée.

## 4. DISCUSSION

L'observation d'une excrétion urinaire massive de sialyloligosaccharides, associée à un déficit total ou partiel en  $\alpha$ -neuraminidase, a permis de définir un nouveau groupe de maladies métaboliques transmissibles génétiquement suivant un mode autosomal récessif.

Par analogie avec les autres types de glycoprotéinoses, et afin de rendre compte du déficit génétique primaire, nous proposons de regrouper ces maladies sous le terme général de "Sialidoses".

L'existence d'un déficit spécifique en  $\alpha$ -neuraminidase associé à une augmentation du taux d'acide sialique lié, a récemment été confirmée pour les fibroblastes de Mucopolidose de type I par CANTZ et al., (1977) (191) et pour les fibroblastes de Mucopolidose de type II par THOMAS et al., (1976) (192). Dans ce dernier cas cependant, on ne peut conclure à un déficit primaire en  $\alpha$ -neuraminidase en raison de l'abaissement de l'activité de nombreuses autres hydrolases au sein des fibroblastes "I-Cell". La déficience en  $\alpha$ -neuraminidase ne semble affecter que le catabolisme des glycoprotéines puisque le taux de gangliosides reste normal dans ces différentes maladies (GONATAS et al., 1963) (193).

La déficience en  $\alpha$ -neuraminidase permet d'expliquer les différentes anomalies rencontrées dans ces différents syndromes et en particulier dans la Mucopolidose de type II.

1 - Une hypersialylation membranaire pourrait être à l'origine de la grande fragilité à la congélation-décongélation présentée par les fibroblastes "I-Cell". SLY et al., (1977) (194).

Cette hypersialylation engendrerait une modification de charge à la surface membranaire, entraînant ainsi le dysfonctionnement des ecto-glycosyltransférases mentionné par DI DONATO et al., (1977) (195).

2 - Conformément à la théorie de LLOYD (1976) (196), une sialylation

anormale de la membrane lysosomiale empêcherait l'attachement des enzymes à cette membrane, et il en résulterait un déversement continu des enzymes dans le milieu extracellulaire lors des phénomènes de recyclage membranaire.

3 - L'hypothèse d'un déficit en  $\alpha$ -neuraminidase permet enfin d'expliquer les anomalies enzymatiques rencontrées dans la Mucopolidose de type II.

L'exocytose des enzymes s'effectuerait conformément au schéma proposé par NEUFELD et al., (1977) (197). Après leur biosynthèse dans le réticulum endoplasmique les enzymes seraient secrétées dans le milieu extracellulaire pour être ensuite reprises de façon spécifique par la cellule. Cette reprise ferait intervenir un signal de reconnaissance porté par la chaîne glycanique de l'enzyme, signal qui serait soit le galactose, la N-acétylglucosamine ou le mannose succédant à l'acide sialique dans la chaîne glycanique. Dans le cas de la Mucopolidose de type II, le déficit en  $\alpha$ -neuraminidase empêcherait le démasquage du signal de reconnaissance, entraînant ainsi une accumulation des enzymes dans le milieu extracellulaire.

L'hypersialylation des enzymes excrétées par les fibroblastes "I-Cell" a d'ailleurs été confirmée par VLADUTIU et RATTAZZI (1975) (198). Cette hypothèse est renforcée par les travaux de WILLCOX et RENWICK (1977) (199), qui ont montré que les enzymes sériques sont toutes sialylées, à l'exception toutefois de la xylosidase, la  $\beta$ -glucosidase, et la phosphatase acide qui sont justement les enzymes qui conservent une activité normale dans les fibroblastes "I-Cell". Ces mêmes auteurs montrent que les enzymes hépatiques et cellulaires en général sont peu ou pas sialylées, expliquant ainsi qu'aucune anomalie enzymatique ne soit rencontrée au sein des hépatocytes.

L'hypothèse d'une hypersialylation responsable de la mauvaise endocytose des enzymes a tout récemment été remise en cause par VLADUTIU et RATTAZZI (1978) (200) qui ont montré que les enzymes secrétées par les fibroblastes "I-Cell"

n'étaient pas endocytées par des fibroblastes normaux, même après action d'une  $\alpha$ -neuraminidase. Cependant ce résultat négatif, peut s'expliquer par le fait que les auteurs ne poursuivent pas la dégradation récurrente de la chaîne glycanique de l'enzyme, jusqu'au mannose qui constitue le signal de reconnaissance pour le fibroblaste.

D'autre part, des observations récentes effectuées par KAPLAN et al., (1977) (201, 202), montrent le rôle déterminant joué par les résidus mannosyl-phosphate dans la reconnaissance des enzymes par le fibroblaste et leur empaquetage au sein des lysosomes.

Ces travaux soulèvent le problème d'un rôle régulateur joué par la phosphatase alcaline dans les processus d'exocytose des enzymes, et il sera nécessaire d'étudier de façon plus précise le comportement de cette enzyme dans les différents cas de sialidoses.

Le dernier point, et sûrement le plus important, est le problème du large spectre clinique présenté par ces maladies. Outre les différents cas de sialidoses préalablement cités, 2 nouvelles formes cliniques viennent d'être décrites dans la littérature.

- KELLY et GRAETZ (1977) (203) décrivent un malade âgé de 8 mois présentant un faciès gargoylique, associé à une hépatosplénomégalie ; on note également la présence d'inclusions cytoplasmiques dans divers tissus ainsi que dans les fibroblastes en culture, témoignant d'une maladie de surcharge lysosomiale. L'enfant présente néanmoins un développement psychomoteur tout à fait normal.

Du point de vue enzymatique, on note une absence spécifique d'activité  $\alpha$ -2  $\rightarrow$  6 neuraminidasique dans les fibroblastes et le leucocyte. Aucune autre anomalie enzymatique n'est observée. Dans l'urine seul le sialyl-hexasaccharide n° II semble s'accumuler.

- Les malades de O'BRIEN sont des adultes présentant des troubles neurologiques

analogues à l'épilepsie myoclonale, avec présence d'une tache rouge cerise bilatérale en fond d'oeil.

Tous les examens enzymatiques sont normaux à l'exception des  $\alpha$ -2  $\rightarrow$  6 et  $\alpha$ -2  $\rightarrow$  3 neuraminidases qui présentent une activité nulle ou très fortement diminuée dans les fibroblastes (0 à 8 %). Nous avons pu réaliser l'analyse des oligosaccharides urinaires et avons constaté que seul le sialyl-oligosaccharide n° II s'accumule en quantité appréciable.

Ces différentes formes cliniques ne peuvent s'expliquer que par des mutations différentes. Une étude comparée des anomalies biochimiques précédemment décrites permet de dégager les points suivants :

1 - Il nous est possible de rassembler les sialidoses en 2 groupes distincts

a) sialidose de type A (MLP II et III) caractérisée par une élévation de l'activité de certaines hydrolases sériques, une diminution de ces mêmes activités dans le fibroblaste en culture, une excrétion somme toute modérée de sialosides urinaires (10 à 20 fois le taux normal pour MLP III, 40 à 100 fois le taux normal pour la MLP II) et un déficit total ou partiel de l'activité  $\alpha$ -neuraminidasique du leucocyte (dont toutes les autres activités hydrolasiques sont demeurées normales).

b) sialidose de type B (MLP I, W., De P. et N.) caractérisée par des activités normales des hydrolases sériques ou fibroblastiques. L'excrétion massive de sialyl-oligosaccharides urinaires et un déficit total ou partiel de l'activité  $\alpha$ -neuraminidasique du leucocyte ou du fibroblaste en culture.

2 - Les faits observés à propos de la Sialidose de type B ne permettent pas d'envisager un dysfonctionnement identique à celui décrit pour la Mucopolysaccharidose de type II, bien que le déficit primaire soit le même. Le seul point essentiel qui oppose ces 2 types de sialidoses, mis à part le problème des anomalies enzymatiques

consiste en l'observation d'une différence du rapport des liaisons  $\alpha$ -NANA-(2  $\rightarrow$  6)/ $\alpha$ -NANA-(2  $\rightarrow$  3) pour les oligosaccharides accumulés, qui est de 1 pour la sialidose de type A et de 8 à 30 pour la sialidose de type B.

Les résultats obtenus par mesure des activités des  $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  3) et  $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  6) neuraminidases ont confirmé le fait que les déficiences en  $\alpha$ -neuraminidases portaient sur des formes isoenzymatiques différentes.

La sialidose de type A est due à un déficit des deux activités enzymatiques  $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  6) et  $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  3) neuraminidasiques tandis que la sialidose de type B n'est caractérisée que par la seule perte de l'activité  $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  6) (TABLEAU XXV).

Les différences biochimiques observées à propos des sialidoses A et B s'expliquent peut-être, d'un point de vue génétique, par des mutations ponctuelles des unités oligomériques constitutives des  $\alpha$ -neuraminidases. Il faudrait alors supposer que ces hydrolases sont de la forme ( $\alpha_m$ ) pour l' $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  3)-neuraminidase et ( $\alpha_m \beta_n$ ) pour l' $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  6)-neuraminidase. La mutation de  $\alpha$  correspondrait alors à la sialidose de type A et la mutation de  $\beta$  à la sialidose de type B.

3 - Le fait que le taux de sialyloligosaccharides accumulés dans l'urine de sialidose A soit relativement faible (40 à 100 fois le taux normal), si on le compare à celui de l'urine de sialidose B (400 à 1000 fois le taux normal), peut s'expliquer par le fait que le renouvellement des glycoprotéines sériques serait ralenti à la suite d'un éventuel mécanisme de régulation de la biosynthèse des glycoprotéines, par le taux d'une sialylation de ces dernières, empêchant leur endocytose par les cellules, et donc leur catabolisme.

4 - La "fuite" des hydrolases acides lysosomiales vers le milieu extracellulaire n'est pas observée dans la sialidose de type B, bien qu'une légère augmentation des hydrolases sériques accompagnée d'une électronégativité accrue ait été décrite.

TABLEAU XXV

CLASSIFICATION DES SIALIDOSES

Type de sialidose	Forme clinique	Déficit enzymatique
Sialidose de type A	<u>Forme sévère</u> : Mucolipidose II <u>Forme atténuée</u> : Mucolipidose III	$\alpha$ -(2 → 3) + $\alpha$ -(2 → 6) neuraminidases
Sialidose de type B	<u>Forme sévère</u> : Mucolipidose I et Mucolipidose W. <u>Forme atténuée</u> : Mucolipidose De P. et N. et "red spot-myoclonus syndrome"	$\alpha$ -(2 → 6) neuraminidase



Ainsi une seule déficience en  $\alpha$ -(2 → 6)-neuraminidase est compatible avec une séquestration fonctionnelle des hydrolases par le lysosome. Les discrètes anomalies enzymatiques décrites à propos de la sialidose de type B apportent en outre, une certaine confirmation de l'hypothèse que nous avons formulée pour expliquer la pathogénèse de la Mucopolipidose II.

La fig. 29 schématise les différentes données biochimiques expliquant la pathogénèse des sialidoses A et B.



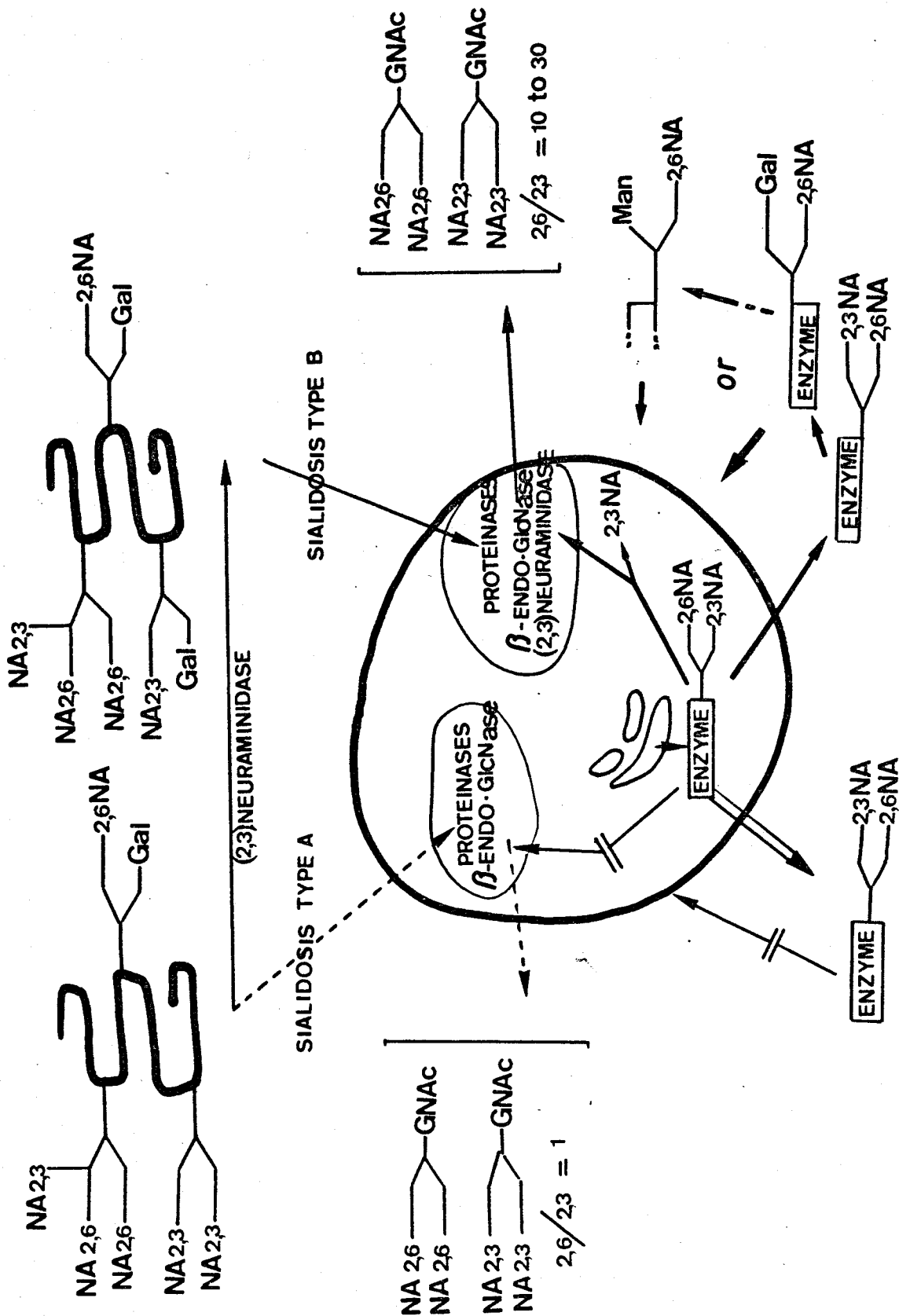


FIGURE 29

Catabolisme des glycoprotéines et "packaging" des hydrolases lysosomiales dans les sialidoses A et B



## 5. CONCLUSION

Nos travaux ont permis de caractériser un nouveau groupe de glycoprotéï-  
nose, les sialidoses, caractérisées par une déficience totale ou partielle en  
 $\alpha$ -neuraminidase et une accumulation massive de sialyl-oligosaccharides tissulaires  
et urinaires.

Nous avons pu ainsi isoler 12 sialyloligosaccharides dont nous avons  
précisé la structure chimique complète. L'examen de la structure de ces oligosaccha-  
rides a permis de confirmer le schéma général de structure proposé par MONTREUIL  
(1975) (204) pour les glycoprotéïnes de type N-acétyllactosaminyl. Leur étude en  
spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à 360 MHz a en outre permis  
d'étalonner un tel appareil pour la mise au point d'un nouveau procédé d'étude  
de la structure primaire des glycanes.

D'autre part, le fait que tous ces oligosaccharides possèdent une seule  
N-acétylglucosamine en position terminale réductrice a permis de poser en hypothèse  
l'existence d'une  $\beta$ -endo-N-acétylglucosaminidase capable d'agir sur des glyco-  
protéïnes ou des glycopeptides sialylés. Une telle enzyme reste à caractériser  
chez les mammifères.

Afin de vérifier l'hypothèse d'un déficit primaire en  $\alpha$ -neuraminidase  
associé aux différents cas de mucopolidoses, nous avons été amené à mettre au  
point une ultramicrométhode de dosage de cette enzyme. Nous avons pu ainsi vérifier  
que les mucopolidoses, et en particulier la mucopolidose II (I-Cell disease) étaient  
bien dues à un déficit primaire en  $\alpha$ -neuraminidase. Nous avons en outre caractérisé  
deux formes isoenzymatiques différentes de l' $\alpha$ -neuraminidase, possédant respective-  
ment une activité  $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  3) et (2  $\rightarrow$  6) neuraminidasique, et deux types fondamentaux  
de sialidoses, sialidose de type A (déficience en  $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  3) et (2  $\rightarrow$  6) neuraminidase)  
et sialidose de type B (déficience en  $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  6) neuraminidase).

Au cours de ces 3 dernières années, l'application de nos méthodes a permis de diagnostiquer 18 cas différents de sialidose, présentant un large spectre d'expression clinique, et d'effectuer un diagnostic ante-natal de sialidose.

L'essentiel de nos recherches futures consistera en une étude plus approfondie des spécificités et de la localisation des  $\alpha$ -neuraminidases tissulaires. En effet, le fait que la distribution des gangliosides soit normale dans les différents cas de mucopolysaccharidose étudiés suggère l'existence d'autres formes de neuraminidases spécifiques des gangliosides.

Les sialidoses complètent la liste des maladies métaboliques qui affectent le catabolisme des glycoprotéines (Fig. 30) et seules les déficiences en  $\beta$ -mannosidase,  $\beta$ -N-acétylgalactosaminidase et  $\beta$ -endo-N-acétylglucosaminidase restent à découvrir.

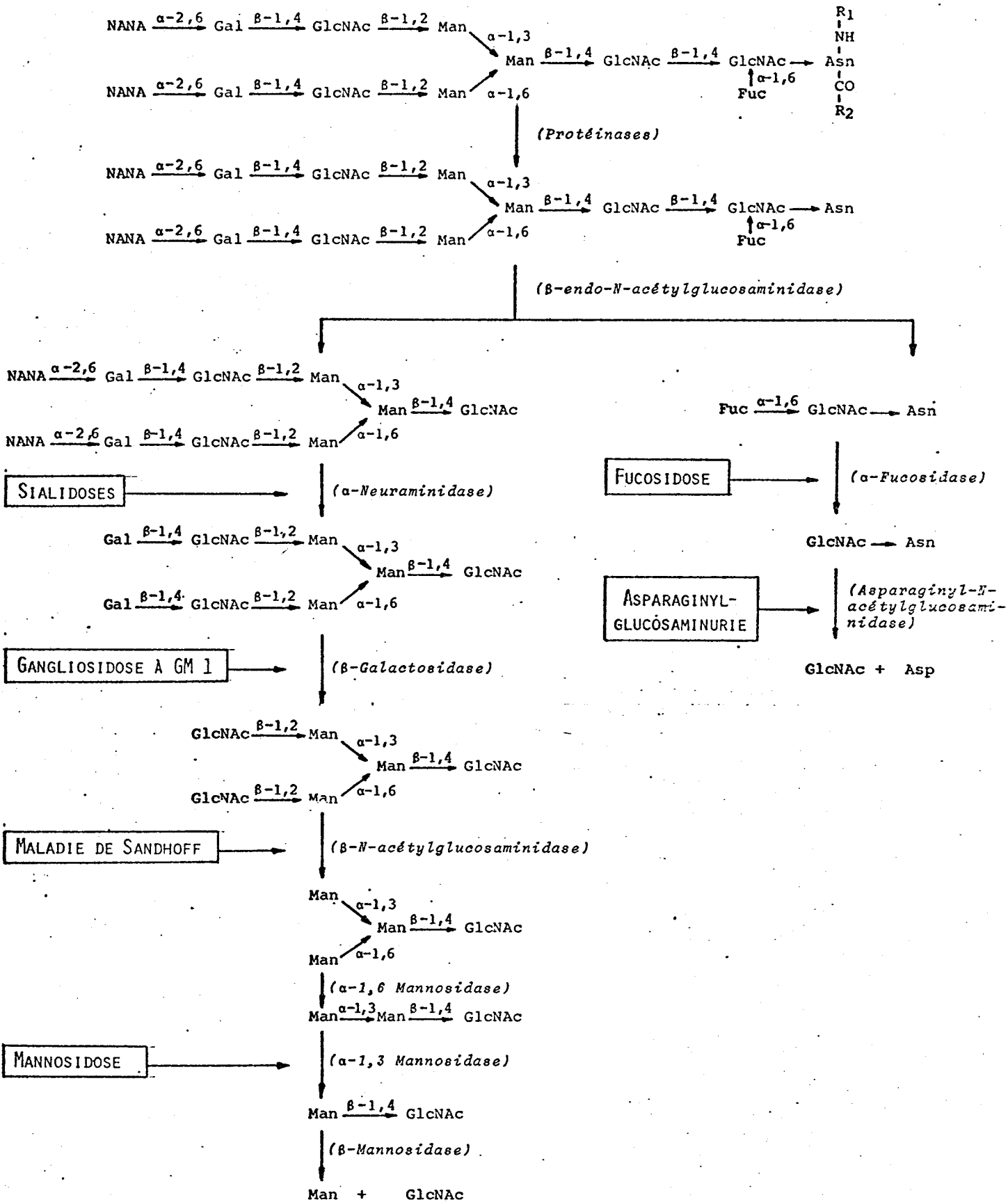


FIGURE 30



APPENDICE TECHNIQUE

TABLE DES MATIERES

I - PRÉPARATION DU CHARBON-CÉLITE	p. 130
II - CHROMATOGRAPHIE PRÉPARATIVE SUR PAPIER	p. 130
III - MÉTHANOLYSE	p. 132
IV - IDENTIFICATION DU SUCRE RÉDUCTEUR	p. 133
V - IDENTIFICATION DE LA SUBSTITUTION DE LA N-ACÉTYL-OSAMINE RÉDUCTRICE	p. 134
VI - MÉTHYLATION	p. 136
VII - HYDRAZINOLYSE	p. 137
VIII - ACÉTOLYSE	p. 137

## I - PRÉPARATION DU CHARBON-CELITE

Le charbon (Activit x 100) est tout d'abord traité par l'acide chlorhydrique de manière à éliminer les impuretés (ions minéraux et organiques). Il est ensuite filtré sous vide sur Büchner et rincé très soigneusement par de l'eau distillée. Le lavage est très important, car la moindre trace d'acide chlorhydrique risque, au moment de la concentration à siccité des effluents glucidiques, de conduire à des réactions de destruction ou de transosidation des sucres (SPIK et al., 1969) (205).

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 permettre un écoulement normal des colonnes, par de simples décantations.

La Célite (Célite 535) est également traitée par de l'acide chlorhydrique 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.

## II - CHROMATOGRAPHIE PRÉPARATIVE SUR PAPIER

### A - CHROMATOGRAPHIE

Les oligosaccharides acides ont été obtenus par chromatographie préparative sur papier ; à cet effet des solutions de l'ordre de 500  $\mu$ l ont été déposées en un trait continu sur une feuille de Whatman 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 (1973) (206). Par ce procédé 10 à 200 mg de produit sont ainsi isolés par chromatogramme. Les solutions d'éluition sont évaporées et purifiées sur des microfiltres, ensuite lyophilisées.

#### B - SYSTEMES SOLVANT

- Système solvant de PARTRIDGE (1948) (207)  
n butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5)
- Système solvant de FISHER et NEBEL (1955) (208)  
acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3)
- Système solvant de BUCHAN et SAVAGE (1952) (209)  
acétate d'éthyle/n propanol/eau (1 : 6 : 3).

#### C - REVELATIONS

- Réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (1950) (210)

Solution A    {        2 ml d'aniline  
                  {        100 ml d'éthanol

Solution B    :    solution aqueuse à 2,5 % d'acide oxalique

Réactif        :    2 volumes de 1 + 3 volumes de B

Après pulvérisation du chromatogramme, un chauffage de 10 à 20 min à 130°C est nécessaire pour le développement des colorations.

- Réactif au nitrate d'argent alcalin de TREVELYAN et al., (1950) (211)

Solution A    {        2 ml d'eau saturée en AgNO<sub>3</sub>  
                  {    + 200 ml d'acétone

Solution B    {        5 ml NaOH 10 N  
                  {    + 100 ml d'éthanol absolu

Tremper dans A, laisser sécher,

Tremper dans B, laisser sécher.

La décoloration est obtenue par passage dans une solution d'ammoniaque à 5 % dans l'eau.



### III - MÉTHANOLYSE

La composition molaire en monosaccharides des oligosaccharides est déterminée par dosage chromatographique en phase gazeuse des dérivés trifluoroacétylés des sucres libérés par méthanolyse selon la méthode de ZANETTA et al., (1972) (212).

#### A - PREPARATION DU METHANOL ANHYDRE

Le méthanol employé dans les réactions de méthanolyse, de méthylglycosylation ou de O-disacétylation est déshydraté de la manière suivante :

- 1 l de méthanol est chauffé à reflux, pendant 4 heures, en présence de 50 g de tournure de magnésium puis distillé à 64,5°C en atmosphère anhydre et conservé dans des flacons bien bouchés.

#### B - METHANOLYSE

300 à 500 µg de sucre sont placés dans un tube de pyrex conique (Sovirel) bouché à l'aide d'un joint de téflon. On ajoute 1 ml d'eau renfermant 50 µg de mésoinositol et la solution est lyophilisée. Le résidu est ensuite séché durant une nuit dans une étuve à 50°C et sous vide, en présence de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Le résidu sec est ensuite repris par 1 ml de méthanol/HCl (obtenu en dissolvant de l'acide chlorhydrique gazeux séché sur H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dans du méthanol anhydre).

Le tube est bouché, agité et laissé à 80°C pendant 24 heures.

Le méthanol est ensuite évaporé sous azote à 50°C.

#### C - TRIFLUOROACÉTYLATION

Le résidu sec est repris par 200 µl de dichlorométhane et 200 µl d'anhydride trifluoroacétique.

Le tube est bouché, placé 3 minutes à 150°C, refroidi à température ambiante, et ensuite replacé 3 min à 150°C.

#### D - ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE EN PHASE GAZEUSE

L'analyse est réalisée sur un appareil Aérograph 2100, la colonne de verre (0,6 x 300 cm) est remplie d'un mélange à 5 % d'OV. 210 sur Varaport 30 (P/P).

- Débit du gaz vecteur ( $N_2$ ) : 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.

#### IV - IDENTIFICATION DU SUCRE REDUCTEUR

1 à 2 mg d'oligosaccharide en solution dans 1 ml d'une solution de NaOH 0,05 M, sont réduits par 5 à 10 mg de borohydrure de potassium à 4°C pendant environ 20 heures. La réaction est alors arrêtée par addition de 0,5 ml de résine échangeuse de cations (Dowex 50 x 8, 25-50 "mesh", forme  $H^+$ ). La solution est alors filtrée et rincée par de l'eau distillée. La solution effluente est ensuite évaporée à siccité à l'évaporateur rotatif. Le résidu est repris plusieurs fois par quelques millilitres de méthanol, et réévaporé afin de distiller l'excès d'acide borique sous forme de borate de méthyle. Le résidu est enfin dissout dans 1 ml d'acide trifluoroacétique 4 N, placé dans un tube pyrex, fermé par un joint de téflon. L'oligosaccharide est alors soumis à une hydrolyse à 100°C pendant 4 heures.

L'identification de l'ose réduit est ensuite réalisée par chromatographie sur papier dans le système solvant de FISHER et NEBEL (1955) (213) pendant 1 nuit. La révélation est réalisée au moyen du réactif au nitrate d'argent.

## V - IDENTIFICATION DE LA SUBSTITUTION DE LA N-ACÉTYLOSAMINE RÉDUCTRICE

La nature de la substitution de la N-acétylglucosamine en position réductrice terminale est déterminée par traitement alcalin ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M à  $100^\circ\text{C}$  10 min) suivie de l'addition du réactif au p-diméthyl-amino-benzaldehyde (LEVY et McALLAN, 1959) (214).

### A - REACTIFS

a - Solution de tétraborate de sodium 0,7 M pH 9,2, la solution est obtenue en amenant à pH 9,2 une solution d'acide borique par addition de potasse.

b - Solution de p-diméthylamine-benzaldéhyde. La solution est obtenue en dissolvant 10 g de p-diméthylamino-benzaldéhyde dans 100 ml d'acide acétique contenant 12,5 ml d'acide chlorhydrique concentré. Le réactif est dilué au 1/10 avec de l'acide acétique concentré au moment de l'emploi.

### B - DEVELOPPEMENT DE LA COLORATION

Dans des tubes à essais on introduit 0,7 ml de la solution à doser et 0,5 ml de la solution de tétraborate de potassium. Les tubes sont maintenus au bain marie bouillant pendant exactement 3 minutes. Ils sont ensuite refroidis sous un courant d'eau. On ajoute alors 6 ml du réactif au p-diméthyl-benzaldéhyde. Les tubes sont soigneusement agités et placés à  $37^\circ$  pendant exactement 20 minutes.

### C - INTERPRETATION DES RESULTATS

La formation d'un chromogène n'est possible que si la fonction alcoolique en 4 de la N-acétyl-osamine est libre, puisque la première étape de la réaction implique le passage à la forme furanique de la N-acétyl-osamine. Dans les cas d'une substitution en  $\text{C}_3$  ou en  $\text{C}_6$  une réaction positive sera donc obtenue, conformément au schéma décrit dans la fig. 31.

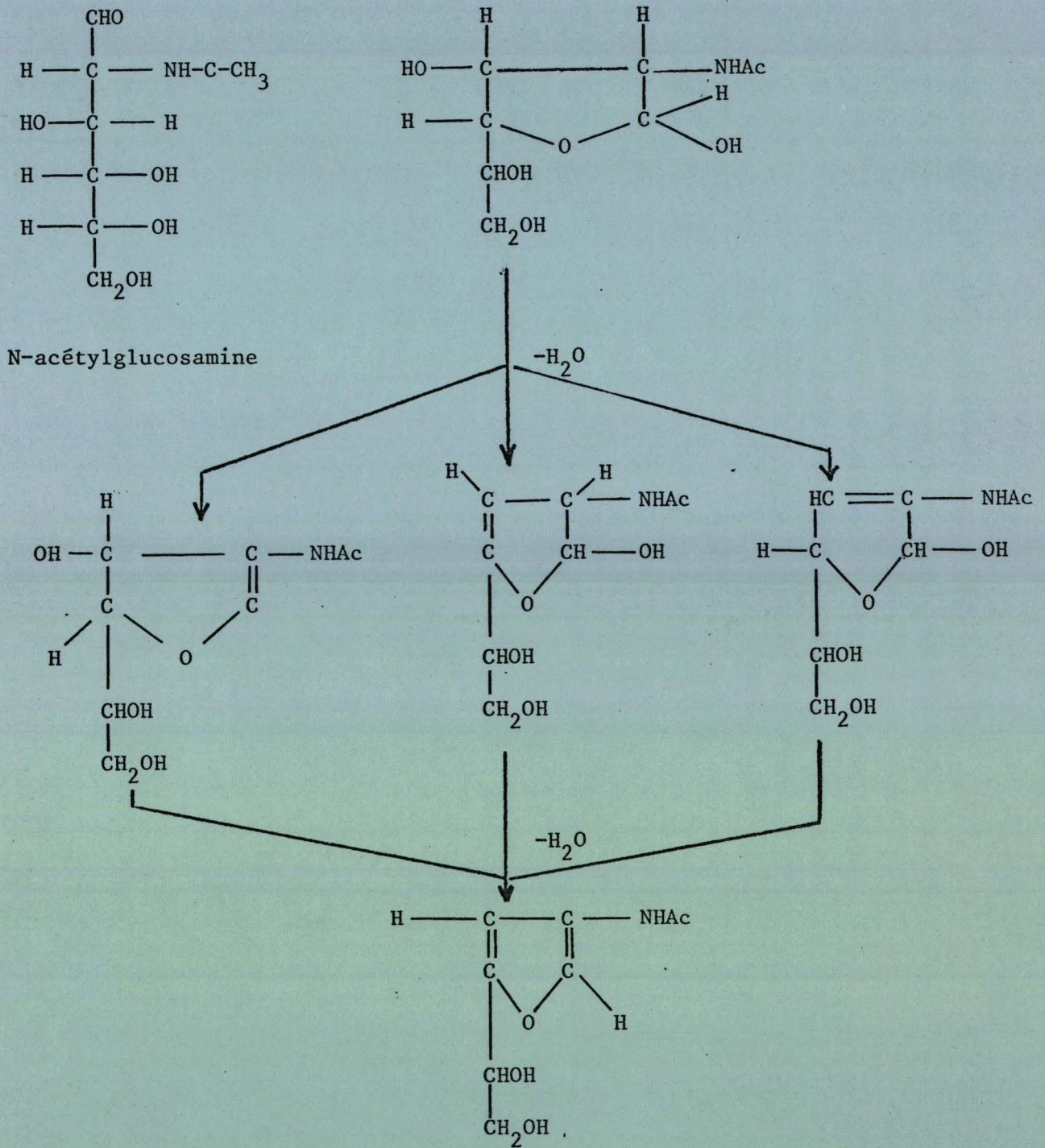


FIGURE 31



Mécanisme de formation des chromogènes à partir des N-acétylhexosamines

D'après STANLEY (1953) (215) et KUHN et KRÜGER (1956) (216)

## VI - METHYLATION

La méthylation des oligosaccharides est réalisée suivant la méthode de HAKOMORI (1964) (217).

### A - PREPARATION DU SULFINYL CARBANION

2,5 g d'une suspension à 50 % d'hydrure de sodium dans la paraffine sont introduit dans un flacon à pénicilline de 100 ml. La paraffine est éliminée par 3 lavages à l'heptane (30 ml) suivies de décantation. Le flacon est ensuite bouché à l'aide d'une pastille de caoutchouc, sertie par un joint métallique.

L'hydrure de sodium est alors séché sous azote par introduction de 2 seringues. On injecte alors 30 ml de diméthyl sulfoxyde et la réaction commence aussitôt avec dégagement d'hydrogène:  $\text{CH}_3\text{-SO-CH}_3 + \text{HNa} \rightarrow \text{CH}_3\text{-SO-CH}_2^- \text{Na}^+ + 1/2 \text{H}_2$ . Cette réaction est accélérée par chauffage (55°C) dans un bain ultrasonique. Après arrêt du dégagement d'hydrogène, le flacon est à nouveau saturé d'azote et conservé au frigidaire.

### B - METHYLATION

1 mg d'oligosaccharide préalablement réduit est dissout dans 1 ml de diméthylsulfoxyde, dans un flacon pénicilline de 5 ml qui est ensuite scellé, puis saturé d'azote.

On ajoute au moyen d'une seringue 0,5 ml de sulfinylcarbanion.

Après une demi-heure d'agitation au bain ultrasonique et congélation, on introduit 0,5 ml d'iodure de méthyle et on replace le flacon pendant une demi-heure au bain ultrasonique. Les produits méthylés sont ensuite extraits dans le mélange chloroforme-eau. La phase chloroformique est abondamment lavée à l'eau puis séchée par le sulfate de sodium. Après évaporation à siccité, le résidu est soumis à une méthanolyse et les dérivés méthylés analysés en chromatographie en phase gazeuse.

### C - ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE EN PHASE GAZEUSE

L'analyse en chromatographie phase gazeuse est réalisée au moyen d'un

appareil Aerograph 1200 en colonne de verre (0,6 x 300 cm) renfermant un mélange Chromosorb WHMDS à 3 % de Carbowax 6000 (60-80 mesh).

- Température de colonne : 170°C
- Débit gaz vecteur (N<sub>2</sub>) : 300 ml/min

Les temps de rétention des éthers méthyliques analysés sont comparés à ceux de dérivés témoins.

## VII - HYDRAZINOLYSE

5 à 10 mg d'oligosaccharide rigoureusement anhydre en solution dans l'hydrazine anhydre (1 ml) sont portés à 100°C pendant 30 heures. Séché à siccité sous courant d'azote, l'hydrazinolysat est ensuite redissout dans 1 ml d'acide acétique à 15 p. 100. La solution est chromatographiée sur une colonne de Séphadex G-50 de manière à isoler le glycanne N-désacétylé à l'état pur et éliminer les contaminants tels que l'hydrazine. La désamination nitreuse du glycanne désacétylé est ensuite réalisée selon le procédé de HORTON et al., (1972) (218) dans les conditions suivantes :

- l'oligosaccharide désacétylé est dissous dans 1 ml d'eau distillée contenant 17 mg de nitrite de sodium et 100 µl d'acide acétique glacial.

La solution est maintenue à 4°C pendant 20 h puis déminéralisée par chromatographie sur colonne d'échangeurs d'ions (Dowex 1 x 8 ; 25-50 "mesh" ; forme HCOO<sup>-</sup>) et (Dowex 50 x 8 ; 25-50 "mesh" ; forme H<sup>+</sup>).

Les diazotats sont ensuite analysés en chromatographie sur papier dans le solvant de FISHER et NEBEL.

## VIII - ACÉTOLYSE

### A - ACETOLYSE

L'oligosaccharide (5 mg) rigoureusement anhydre est ajouté à 5 ml d'un mélange maintenu à + 4°C d'acide acétique glacial, d'anhydride acétique et d'acide

sulfurique concentré (10 : 10 : 1 ; v/v). La solution obtenue est maintenue à 20°C pendant 1 à 4 jours sous agitation constante.

Les solutions d'acétolyse sont alors versées goutte à goutte sur 10 g de glace pilée. Après décongélation, le pH du mélange est amené à 4,5 par addition d'hydrogénocarbonate de sodium. La gelée transparente visqueuse qui renferme les glucides acétylés est extraite 8 fois par 50 ml de chloroforme pur.

Les extraits chloroformiques sont rassemblés, lavés par 50 ml d'une solution d'hydrogénocarbonate de sodium 1 p. 100 et séchés sur chlorure de calcium anhydre.

La solution obtenue est concentrée sous pression réduite.

#### B - O-DESACETYLATION

Les sucres acétylés sont repris par 10 ml d'acétone auxquels on ajoute un volume égal de soude 0,2 N. La solution est maintenue constamment à + 4°C pendant une heure.

La fraction est ensuite purifiée par passage successif sur résine échangeuse de cations Dowex 50 x 8 ; 25-50 "mesh" ; forme H<sup>+</sup>. Les effluents neutres auxquels on joint les eaux de lavage des résines sont concentrés à environ 1 ml et soumis à une analyse en chromatographie papier.

## BIBLIOGRAPHIE

(Les nombres entre parenthèses renvoient à l'ordre de citation dans le texte).

- 1 - ASHWELL G. et MORELL A.G. - "Galactose a cryptic determinant of glycoproteins catabolism" in G.A. JAMIESON et T.J. GREENWALT "Glycoproteins of blood Cells and Plasma" 1971, p. 173, J.B. LIPPINCOTT C., Philadelphia (79,142)
- 2 - BACH G., COHEN M.M. et KOHN G. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 1975, 66, 1483 (33,154)
- 3 - BAEZINGER J. et KORNFIELD S. - J. Biol. Chem. 1974, 249, 7260 (69 bis)
- 4 - BAIG M.M. et AMINOFF D. - J. Biol. Chem. 1972, 247, 6111 (71)
- 5 - BAYARD B. et MONTREUIL J. - Carbohydr. Res. 1972, 24, 427 (167)
- 6 - BAYARD B. et MONTREUIL J. - Actes du Colloque International n° 221 du Centre National de la Recherche Scientifique sur les Glycoconjugués. CNRS éd., Paris 1974, 209-218 (165)
- 7 - BEAPARK T., BOUQUELET S., FOURNET B., MONTREUIL J., SPIK G., STIRLING J. et STRECKER G. - FEBS-Letters 1977, 84, 379 (174)
- 8 - BEAUDET A.L. et NICHOLS B.L. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976, 68, 292 (17)
- 9 - BECK C. et TAPPEL A.L. - Biochim. Biophys. Acta 1968, 151, 159 (147)
- 10 - BERARD M., TOGA M., BERNARD P., DUBOIS P., MARIANI R. et HASSOUN H. - Path. Europ. 1968, 3, 172 (102)
- 11 - BERMAN E.R., KOHN G., YATSIV S. et STEIN H. - Clin. Chim. Acta 1974, 52, 115 (116, 124, 125, 127)
- 12 - BERMAN E.R., LIVNI N., SHAPIRA E., MERIN S. et LEVIS I.S. - J. Pediat. 1974, 84, 519 (151)
- 13 - BERNACKI R.J. et BOSMANN H.B. - Eur. J. Biochem. 1973, 34, 425, (185)
- 14 - BHAVANANDAN V.P., YEH A.K. et CARUBELLI R. - Anal. Biochem. 1975, 69, 385 (187)
- 15 - BOURILLON R. - "Urinary glycoproteins, glycopeptides and related heterosaccharides" in GOTTSCHALK "Glycoproteins" 1972, part. B., p. 909-924 (89)
- 16 - BROWN C.R., SRIVASTAVA P.N. et HARTREE E.F. - Biochem. J. 1970, 118, 123 (181)
- 17 - BUCHAN J.L. et SAVAGE R.I. - Analyst. 1952, 77, 401 (209)



- 18 - BURTON R.M., BALFOUR Y.M. et GIBBONS J.M. - Fed. Proc. 1964, 23, 230 (56)
- 19 - CALATRONI A., PALLAVICINI G. et CASTELLANI A.A. - Ital. J. Biochem. 1974, 20, 183 (32)
- 20 - CANTZ M., CHRAMBACH A., BACH G. et NEUFELD E.F. - J. Biol. Chem. 1972, 247, 5456 (38, 48)
- 21 - CANTZ M., GEHLER J. et SPRANGER J. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 1977, 74, 732 (191)
- 22 - CARUBELLI R., BHAVANANDAN V.P. et GOTTSCHALK A. - Biochim. Biophys. Acta 1965, 101, 67 (180)
- 23 - CHAMPION M.J. et SHOWS T.B. - Amer. J. Hum. Genet. 1977, 29, 149 (120)
- 24 - CHAMPION M.J. et SHOWS T.B. - Nature 1977, 270, 64 (121)
- 25 - DAWSON G., MATALON R. et DORFMAN A. - J. Biol. Chem. 1972, 247, 5951 (112)
- 26 - DEAN R.T. - Biochem. J. 1977, 168, 603 (146, 148)
- 27 - DE DUVE C., PRESSMAN B.C., GIANETTO R., WATTIAUX R. et APPELMANS J.F. - Biochem. J. 1955, 60, 604 (1)
- 28 - DE MARS R.I. et LEROY J. - In vitro 1967, 2, 107 (107)
- 29 - DENT C.E. - J. Biochem. 1973, 27, 1824 (206)
- 30 - DE VRIES A.L., VANDENHEEDE J. et FEENEY R.E. - J. Biol. Chem. 1971, 246, 305 (69)
- 31 - DI DONATO S., WIESMANN U.N., ROSSI E., HERSCHKOWITZ N. - Pediat. Res. 1977, 11, 1094 (122, 129, 144, 195)
- 32 - DISCHE Z. - Mirochemie 1930, 7, 33 (189)
- 33 - DORFMAN A. et MATALON R. - Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 1976, 73, 630 (30, 35)
- 34 - DORLAND L., HAVERKAMP J., SCHUT B.L., VLIAGENTHART J.F.G., SPIK G., STRECKER G., FOURNET B. et MONTREUIL J. - FEBS-Letters 1977, 77, 15 (168)
- 35 - DORLAND L., HAVERKAMP J., VLIAGENTHART J.F.G., STRECKER G., MICHALSKI J.C., FOURNET B., SPIK G. et MONTREUIL J. - "360 MHz-NMR spectroscopy of sialyl oligosaccharides from patients with mucopolidosis (sialidosis)" 1978, sous presse (169, 170, 171, 175)

- 36 - DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. et SMITH F. - *Anal. Biochem.* 1965, 28, 350 (188)
- 37 - DURAND P., PHILLIPART M., BORRONE C. et DONNA CELLA G. - *Minerva Pediat.* 1969, 84, 160 (63)
- 38 - DURAND P., GATTI R., CAVALIERI S., TONDEUR M., MICHALSKI J.C. et STRECKER G. - *Helv. Paediat. Acta* 1977, 32, 391 (150)
- 39 - ERICSSON J.L.E. - In "Biology and pathology" 1969, J.T. DINGLE and H.B. FELL éd., vol. 11, 345-394, North Holland Publ., Amsterdam (4)
- 40 - EYLAR E.H. - *J. Theor. Biol.* 1965, 10, 89 (78)
- 41 - FEIZI T., KABAT E.A., VICARI G., ANDERSON B. et MARSH W.L. - *J. Immunol.* 1971, 106, 1578 (72)
- 42 - FISHER F.G. et NEBEL H.G. - *Z. Physiol. Chem.* 1955, 302, 10 (157, 161, 208, 213)
- 43 - FISHMAN P.M., MAX S.R., TALLMAN J.F., BRADY R.O., McLAREN N.K. et CORNBLATH M. - *Science* 1975, 187, 68 (8)
- 44 - FOURNET B. et MONTREUIL J. - *J. Chromatogr.* 1973, 75, 29 (164)
- 45 - FOURNET B., STRECKER G., MONTREUIL J., DORLAND L., HAVERKAMP J., Vliegenthart J.F.G., SCHMID K. et BINETTE J.P. - *Biochemistry* 1978, sous presse (74)
- 46 - FRARANTONI J.C., HALL C.W. et NEUFELD E.F. - *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1968, 60, 699 (37)
- 47 - FRARANTONI J.C., HALL C.W. et NEUFELD E.F. - *Science* 1968, 162, 570 (39)
- 48 - FRARANTONI J.C., HALL C.W. et NEUFELD E.F. - *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1969, 64, 360 (36)
- 49 - GATT S. - In "Chemistry and Metabolism of Sphingolipids" 1970, C.C. SWEELEY éd., p. 235, North Holland Publ., Amsterdam (53)
- 50 - GILBERT E.F., DAWSON G., ZURHEIN G.M., OPITZ J.M. et SPRANGER J.W. - *Z. Kinderheilk* 1973, 114, 259 (110)
- 51 - GONATAS N.K., TERRY R.O., WINKLER R., KOREY S., GOMEZ C.J. et STEIN A. - *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1963, 22, 557 (193)

- 52 - GRIMMONPREZ L. et MONTREUIL J. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1968, 50, 843 (159)
- 53 - HAKOMORI S. - J. Biochem. (TOKYO) 1964, 55, 205 (163, 217)
- 54 - HERS H.G. - Gastroenterology 1965, 48, 625 (5)
- 55 - HICKMAN S., KORNFELD R., OSTERLAND C.K. et KORNFELD S. - J. Biol. Chem. 1972, 247, 2156 (76)
- 56 - HICKMAN S. et NEUFELD E.F. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 1972, 49, 992 (134, 136, 139)
- 57 - HICKMAN S., SHAPIRO L.J. et NEUFELD E.F. - Biochem. Biophys. Res. Commun 1974, 57, 55 (135)
- 58 - HIEBER V., DISTLER J., MYEROWITZ R., SMICKEL R.D. et JOURDIAN G.W. - Biochem. Biophys. Res. Commun 1976, 73, 710 (84)
- 59 - HIRSHHORN R. et WEISSMANN G. - Progress Med. Genet. 1976, 1, 49 (58)
- 60 - HO M.W. et O'BRIEN J.S. - Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 1971, 68, 2810 (25)
- 61 - HORTON D., PHILLIPS K.D. et DEFAYE J. - Carbohydr. Res. 1972, 21, 417 (166, 218)
- 62 - HORVAT A. et TOUSTER O. - J. Biol. Chem. 1968, 243, 4380 (178)
- 63 - HULTBERG B. et MASSON P.K. - Biochim. Biophys. Acta 1977, 481, 573 (16)
- 64 - JENNER E.A. et POLLITT R.J. - Biochem. J. 1967, 103, 48 (67, 99)
- 65 - JOLLY R.D. et BLAKEMORE W.F. - Vete. Rec. 1973, 92, 391 (7)
- 66 - KAPLAN A., ACHORD D.T. et SLY W.S. - Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 1977, 74, 2026 (85, 201)
- 67 - KAPLAN A., FISCHER D., ACHORD D. et SLY W.S. - J. Clin. Invest. 1977, 60, 1088 (202)
- 68 - KELLY T.E. et GRAETZ G. - Amer. J. Med. Genet. 1977, 1, 31 (203)
- 69 - KISHORE G.S., TULSIANI D.R.P., BHAVANANDAN V.P. et CARUBELLI R. - J. Biol. Chem. 1975, 250, 2655 (10)
- 70 - KLENK E., VATER W. et BATSCH G. - J. Neurochem. 1957, 1, 203 (20)
- 71 - KOLODNY E.H. - Semin. Hematol. 1972, 9, 203 (59)
- 72 - KRESSE H., WEISMANN U., CANTZ M., HALL W. et NEUFELD E.F. - Biochem. Biophys. Res. Commun 1971, 42, 892 (41)
- 73 - KRESSE H. et NEUFELD E.F. - J. Biol. Chem. 1972, 247, 2164 (44)

- 74 - KUHN R. et KRÜGER G. - Chem. Ber. 1956, 89, 1473 (216)
- 75 - LEROY J.G., SPRANGER J.W. - New Engl. J. Med. 1970, 283, 598 (26)
- 76 - LEROY J.G., HO M.W., McBRINN M.C., ZIELE K., JACOB J. et O'BRIEN J.S. - Pedia. Res. 1972, 6, 752 (111)
- 77 - LEVY G.A. et McALLAN. - Biochem. J. 1959, 73, 127 (214)
- 78 - LIE K.V., THOMAS G.H., TAYLOR H.A. et SENSENBRENNER J.A. - Clin. Chim. Acta 1973, 45, 243 (118, 123)
- 79 - LIVNI N. et LEGUM C. - Exp. Cell Biol. 1976, 44, 1 (153)
- 80 - LLOYD J.B. - Biochem. J. 1977, 164, 281 (145, 196)
- 81 - LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J. - J. Biol. Chem. 1951, 193, 265 (190)
- 82 - LUNDBLAD A., MASSON P.K., NORDEN N.E., SVENSSON S. et ÖCKERMAN P.A. - Eur. J. Biochem. 1976, 67, 209 (99 bis)
- 83 - MAC LAREN N.K., MAX S.R.M., CORNBLATH M., O'BRADY R.O., OZAND P.T., CAMPBELL J., RENNELS M., MERGNER W.J. et GARCIA J.H. - Pediatrics 1976, 57, 106 (34)
- 84 - MAROTEAUX P. et LAMY M. - Press Med. 1966, 71, 2889 (108)
- 85 - MAROTEAUX P. et HUMBEL R. - Arch. Franç. Pediat. 1976, 33, 641 (61)
- 86 - MAROTEAUX P., HUMBEL R., STRECKER G., MICHALSKI J.C. et MANDE R. - Arch. Franç. Pediat. 1978, sous presse (149)
- 87 - McKUSIK V.A., HOWELL R.R., HUSSELS I.E., NEUFELD E.F. et STEVENSON R.E. - Lancet 1972, 1, 993 (47)
- 88 - MEINDL P. et TUPPY H. - Monatsh. Chem. 1967, 98, 53 (182)
- 89 - MERIN S., LIVNI N., BERMAN E.R. et YATSIV S. - Invest. Ophtal. 1975, 14, 437 (152)
- 90 - MILCH H. - Monatsh. Chem. 1951, 82, 489 (158)
- 91 - MONTREUIL J. - Pure and Applied Chem. 1975, 42, 431 (68, 172, 204)
- 92 - MORELL A.G., IRVINE R.A., STERNLIEB I., SCHEINBERG I.H. et ASHWELL G. - J. Biol. Chem. 1968, 243, 155 (82)
- 93 - MORELL A.G., GREGORIADIS G., SCHEINBERG I.H., HICKMAN J. et ASHWELL G. - J. Biol. Chem. 1971, 246, 1461 (81)

- 94 - MUDD S.H. - Fed. Proc. 1971, 30, 970 (49)
- 95 - MUIR H. - In "Lysosomes and Storage Diseases" 1973, HERS G. et VANHOOF F. Ed., p. 79-104, Academic Press, London (31)
- 96 - NAGASHIMA K., SAKAKIBARA K., ENDO H., KONISHI Y., NAKAMURA N., SUZUKI Y. et ABE T. - Acta Path. Jap. 1977, 27, 251 (128)
- 97 - NEUFELD E.F. et CANTZ. - Ann. N.Y. Acad. Sci. 1971, 179, 580 (40)
- 98 - NEUFELD E.F., SANDO G.N., GARVIN J.A. et ROME L.H. - J. Supramol. Struct. 1977, 6, 95 (133, 137, 138, 197)
- 99 - NILSON B. et SVENSSON S. - Proc. 4th Int. Symp. on Glycoconjugates, 1978, Woods Hole, 27 september - 1 October 1977, Academic Press Ed., New York, sous presse (75)
- 100 - NISHIGAKI M., MURAMATSU T. et KOBATA A. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 1974, 59, 638 (87)
- 101 - NÖRDEN N.E., LUNDBLAD A., SVENSSON S. et AUTIO S. - Biochemistry 1974, 13, 871 (91)
- 102 - NOVIKOFF A.B., BEARD M.E., ALBALA A., SCHEI B., QUINTANA N. et BIEMPICA L. - J. Microsc. Paris, 1971, 12, 381 (2, 3)
- 103 - O'BRIEN J.S., STERN M.B., LANDING B.H., O'BRIEN K. et DONNELL G.M. - Amer. J. Dis. Child. 1965, 107, 338 (64)
- 104 - O'BRIEN J.S. - Clin. Genet. 1975, 8, 303 (13)
- 105 - ÖCKERMAN P.A. - Lancet 1967, 2, 239 (65)
- 106 - ÖHMAN R., ROSENBERG G.A. et SVENNERHOLM L. - Biochemistry 1970, 9, 3774 (55)
- 107 - OKADA S. et O'BRIEN J.S. - Science 1969, 165, 698 (19)
- 108 - ORII T., MINAMI R., SUKEGAWA K., SATO S., TSUGAWA S., HORINO K., MIURA R. et NAKAO T. - Tohoku J. Exp. Med. 1972, 107, 303 (117)
- 109 - PALESE P., BUCHER D. et KILBOURNE E.D. - Appl. Microbiol. 1973, 25, 195 (183)
- 110 - PARTRIDGE S.M. - J. Biochem. 1948, 42, 238 (207)
- 111 - PARTRIDGE S.M. - Biochem. Soc. Symp. 1950, 3, 52 (160, 210)
- 112 - PEDRINI V., LENZY L. et ZAMBOTTI V. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1962, 110, 847 (29)

- 113 - PENTON E., POENARU L., DREYFUS J.C. - *Biochim. Biophys. Acta* 1975, 391, 162 (22)
- 114 - PORTER M.T., FLUHARTY A.L. et KIHARA H. - *Science* 1971, 172, 1263 (43)
- 115 - PREISS J. et ASHWELL G. - *J. Biol. Chem.* 1962, 237, 309 (179)
- 116 - RATTAZZI et DAVIDSON R.G. - In "Antenatal diagnosis" 1972, DORFMAN A. Ed., p. 207, The University of Chicago Press, Chicago (14)
- 117 - ROBINSON D. - *Enzyme* 1974, 18, 114 (12)
- 118 - ROSEMAN S. - *Proc Int. Congr. Biochem.* 1968, 7th 1967, abstract p. 1937 (54)
- 119 - SANDHOFF K., ANDREAE U. et JATZKEWITZ H. - *Life Sci.* 1968, 7, 283 (66)
- 120 - SANDHOFF K., HARZER K., WASSLE W. et JATZKEWITZ H. - *J. Neurochem.* 1971, 18, 2469 (21)
- 121 - SCHAUER R., VEH R.W. et WENBERG. - *Hoppe Seyler's Physiol. Chem.* 1976, 357, 559 (184)
- 122 - SJÖBERG L., FRANSSON L.A., MATALON R. et DORFMAN A. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1973, 54, 1125 (45)
- 123 - SLY W.S., LAGWINSKA E. et SCHLESINGER S. - *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1976, 73, 2443 (143, 194)
- 124 - SMICKEL R.D., DISTLER J.J. et JOURDIAN G.W. - *J. Labo. Clin. Med.* 1975, 86, 672 (113)
- 125 - SMITH M.E. - *Adv. Lipid. Res.* 1967, 5, 241 (57)
- 126 - SNYDER P.D., KRIVIT W. et SWEeley C.C. - *J. Lipid Res.* 1972, 13, 128 (23)
- 127 - SPIK G., STRECKER G. et MONTREUIL J. - *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1969, 51, 1287 (205)
- 128 - SPIK G., BAYARD B., FOURNET B., STRECKER G., BOUQUELET S. et MONTREUIL J. - *FEBS-Letters* 1975, 50, 296 (73)
- 129 - SPIRO R.G. et BHOYROO V.D. - *J. Biol. Chem.* 1974, 249, 5704 (70)
- 130 - SPRANGER J., TOLKSDORF M., GRAVCOB E. et CAESAR R. - *Z. Kinderheilk* 1968, 103, 285 (101)
- 131 - SPRANGER et WIEDEMAN H.R. - *Humangenetik* 1970, 9, 113 (60, 100, 106)
- 132 - SPRANGER J., GEHLER J. et CANTZ M. - *Amer. J. Med. Genet.* 1977, 1, 21 (104, 105)
- 133 - SRIVASTAVA S.K., WIKTOROWICZ J.E. et AWASTHI Y.C. - *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1976, 73, 2833 (18)
- 134 - STAHL P., SOMSEL-RODMAN J. et SCHLESINGER P. - *Arch. Biochem. Biophys.* 1976, 117, 594 (86)

- 135 - STANLEY P.G. - Aust. J. Exper. Biol. Med. Sci. 1953, 31, 187 (2, 15)
- 135 - STRECKER G. et MONTREUIL J. - Clin. Chim. Acta 1971, 33, 395 (24, 50)
- 137 - STRECKER G., FOURNET B., BOUQUELET S., MONTREUIL J., DHONT J.L. et FARRIAUX J.P. - Biochimie 1976, 58, 579 (98)
- 138 - STRECKER G. - "Glycoprotéines et glycoprotéinoses" In "Les Oligosaccharidoses", FARRIAUX J.P. Ed., CROUAN et ROQUES, Lille (27, 62)
- 139 - STRECKER G. et LEMAIRE-POITAU A. - J. Chromato. Biom. Appl. 1977, 143, 553 (90, 155)
- 140 - STRECKER G., FOURNET B., SPIK G., MONTREUIL J., DURAND P. et TONDEUR M. - C.R. Acad. Sci. Paris, 1977, 284, 85 (92, 95)
- 141 - STRECKER G., HERLANT-PEERS M.C., FOURNET B., MONTREUIL J., DORLAND L., HAVERKAMP J., Vliegenthart J.F.G. et FARRIAUX J.P. - Eur. J. Biochem. 1977, 81, 165 (94, 97)
- 142 - STRECKER G. et MONTREUIL J. - "Glycoprotéines et glycoprotéinoses" Biochimie 1978, sous presse (62)
- 143 - STOFFEL W. et STICHT G. - Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 1967, 348, 1345 (52)
- 144 - TAI T., YAMASHITA K., OGATA-ABRAKAWA M., KOIDE N., MURAMATSU T., IWASHITA S., INOUE Y. et KOBATA A. - J. Biol. Chem. 1975, 250 8569 (173)
- 145 - TARENTINO A.L. et MALEY F. - J. Biol. Chem. 1976, 251, 6537 (88)
- 146 - THOMAS G.H., TAYLOR H.A., MILLER C.S., AXELMAN J. et MIGEON B.R. - Nature 1974, 250, 580 (15)
- 147 - THOMAS G.H., TILLER G.E., REYNOLDS L.W., MILLER C.S. et BACE J.W. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976, 188 (115, 192)
- 148 - TONDEUR M., VAMOS-HURWITZ E., MOCKEL-POHLS., DEREUME J.P., CREMER N. et LOEB H. - J. Pediat. 1971, 79, 366 (114)
- 149 - TREVELYAN W.E., PROTER D.P. et HARRISON J.S. - Nature 1950, 166, 444 (211)
- 150 - TULSIANI D.R.P. et CARUBELLI R. - J. Biol. Chem. 1970, 245, 1821 (11)
- 151 - VAN de HAMER C.J.A., MORELL A.G., SCHEINBERG I.H., HICKMAN J. et ASHWELL G. - J. Biol. Chem. 1970, 245, 4397 (80)
- 152 - VAN HOOFF F. - In "Lysosomes and storage disease" 1972, HERS G. and VAN HOOFF F. Ed., Academic Press, New York, p. 217-259 (6, 103, 109)

- 153 - VAN LENTEN. et ASHWELL. - J. Biol. Chem. 1972, 247, 4633 (186)
- 154 - VISSER A. et EMMELOT P. - J. Membr. Biol. 1973, 14, 73 (9)
- 155 - VLADUTIU G.D. et RATTAZZI M.C. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 1975, 67, 956  
(119, 141, 198)
- 156 - VLADUTIU G.D. et RATTAZZI M.C. - Biochem. Biophys. Acta. 1978, 539, 51 (200)
- 157 - VOLK B.W., ADACHI M. et SCHNECK L. - Human Pathol. 1975, 6, 555 (28)
- 158 - WALBAUM R., DEHAEME P., SCHARFMAN W., FARRIAUX J.P., TONDEUR M., VAMOS-HURWITZ E.,  
KINT J.A. et VAN-HOFF F. - Arch. Franç. Pediat. 1973, 30, 577 (132)
- 159 - WARREN L. - J. Biol. Chem. 1959, 234, 1971 (176, 177)
- 160 - WEISMANN U. et NEUFELD E.F. - Science 1970, 169, 72 (46)
- 161 - WEISMAN U.N., ROSSI E.E. et HERSHKOWITZ N.N. - New Engl. J. Med. 1971, 284, 672 (42)
- 162 - WEISMANN U., VASSELLA F. et HERSCHKOWITZ N.N. - New Engl. J. Med. 1971, 285,  
1090 (140)
- 163 - WEISMANN U. et HERSCHKOWITZ N.N. - Pediat. Res. 1974, 8, 865 (130)
- 164 - WEISMANN U., VASSELLA F. et HERSCHKOWITZ N.N. - Acta Paediat. Scand. 1974, 63, 9 (131)
- 165 - WENGER D.A., SATTLER M., CLARK C. et WHARTON C. - Life Science 1976, 19, 413 (126)
- 166 - WHISTLER R.L. et DURSO D.F. - J. Amer. Chem. Soc. 1950, 72, 677 (156)
- 167 - WILLCOX P. et RENWICK G.C. - Eur. J. Biochem. 1977, 73, 579 (199)
- 170 - WINKELHAKE J.L. et NICHOLSON G.L. - J. Biol. Chem. 1976, 251, 1074 (83)
- 171 - WINZLER R.J. et BOCCI V. - "Turnover of plasma glycoproteins" dans A. GOTTSCHALK,  
"Glycoproteins" part B., p. 1228, Elsevier Amsterdam (77)
- 172 - WOLFE L.S., SENIOR R.G. et NGYING KIN N.M.K. - J. Biol. Chem. 1974, 249, 1828 (51,  
93, 96)
- 173 - ZANETTA J.P., BRECKENRIDGE W.C. et VINCENDON G. - J. Chromatog. 1972, 69, 291  
(162, 212)