



HAL
open science

Caractéristiques cliniques et moléculaires d'une cohorte de 13 patients algériens atteints de MPS I

Zoubir Adjtoutah

► **To cite this version:**

Zoubir Adjtoutah. Caractéristiques cliniques et moléculaires d'une cohorte de 13 patients algériens atteints de MPS I. Sciences pharmaceutiques. 2012. dumas-00760712

HAL Id: dumas-00760712

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00760712>

Submitted on 4 Dec 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

U.F.R MEDECINE ET DE PHARMACIE DE ROUEN

ANNEE 2012

**THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE**

Diplôme d'Études Spécialisées : Biologie Médicale

Mr. ADJTOUTAH Zoubir

Né le 11/06/1983 à Akbou (Algérie)

Présentée et soutenue publiquement le 25 Octobre 2012

**Caractéristiques cliniques et moléculaires d'une
cohorte de 13 patients algériens atteints de MPS I**

Président du Jury : Isabelle DUBUS, Professeur Universitaire. U.F.R de Pharmacie de Rouen

Membres du Jury : Jean-Jacques BONNET, Professeur Universitaire. U.F.R de Pharmacie de Rouen

Stéphanie TORRE, Praticien Hospitalier. C.H.U de Rouen

Directrice de thèse : Soumeya BEKRI, Professeur Universitaire-Praticien Hospitalier. U.F.R Médecine de Rouen

ANNEE UNIVERSITAIRE 2011 - 2012

U.F.R. DE MEDECINE-PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESSEURS : **Professeur Michel GUERBET**
Professeur Benoit VEBER
Professeur Pascal JOLY
Professeur Bernard PROUST

DOYENS HONORAIRES : **Professeurs J. BORDE - Ph. LAURET - H. PIGUET –**
C. THUILLEZ

PROFESSEURS HONORAIRES : **MM. M-P AUGUSTIN - J.ANDRIEU-**
GUITRANCOURT - M.BENOZIO-
J.BORDE - Ph. BRASSEUR - R. COLIN - E.
COMOY - J. DALION -. DESHAYES - C. FESSARD
J.P FILLASTRE - P.FRIGOT -J. GARNIER - J.
HEMET - B. HILLEMAND - G. HUMBERT - J.M.
JOUANY - R. LAUMONIER – Ph. LAURET - M. LE
FUR – J.P. LEMERCIER - J.P LEMOINE - Mle
MAGARD - MM. B. MAITROT - M. MAISONNET -
F. MATRAY - P.MITROFANOFF - Mme A. M.
ORECCHIONI - P. PASQUIS - H.PIGUET -
M.SAMSON – Mme SAMSON-DOLLFUS – J.C.
SCHRUB - R.SOYER - B.TARDIF -.TESTART - J.M.
THOMINE – C. THUILLEZ - P.TRON -
C.WINCKLER - L.M.WOLF

I-MEDECINE

PROFESSEURS

M. Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
M. Bruno BACHY	HCN	Chirurgie pédiatrique
M. Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. Jacques BENICHOU	HCN	Biostatistiques et informatique médicale
M. Eric BERCOFF	HB	Médecine interne (gériatrie)
M. Jean-Paul BESSOU	HCN	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
Mme Françoise BEURET-BLANQUART	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
M. Guy BONMARCHAND	HCN	Réanimation médicale
M. Olivier BOYER	UFR	Immunologie
M. Jean-François CAILLARD	HCN	Médecine et santé au Travail
M. François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Philippe CHASSAGNE	HB	Médecine interne (Gériatrie)
M. Alain CRIBIER (Surnombre)	HCN	Cardiologie
M. Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
M. Pierre CZERNICHOW	HCH	Épidémiologie, économie de la santé
M. Jean - Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et Imagerie Médicale
M. Stéfan DARMONI	HCN	Informatique Médicale/Techniques de communication
M. Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mme Danièle DEHESDIN	HCN	Oto-Rhino-Laryngologie
M. Philippe DENIS (Surnombre)	HCN	Physiologie
M. Jean DOUCET	HB	Thérapeutique/Médecine – Interne - Gériatrie.
M. Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
M. Philippe DUCROTTE	HCN	Hépto – Gastro - Entérologie
M. Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique traumatologique
M. Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie Orthopédique
M. Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mlle Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
M. Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
M. Pierre FREGER	HCN	Anatomie/Neurochirurgie
M. Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et Santé au Travail
M. Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie Médicale

Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
M. Michel GODIN	HB	Néphrologie
M. Philippe GRISE	HCN	Urologie
M. Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
M. Fabrice JARDIN	CB	Hématologie
M. Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
M. Pascal JOLY	HCN	Dermato - vénéréologie
M. Jean-Marc KUHN	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie cytologie pathologiques
M. Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
M. Alain LAVOINNE	UFR	Biochimie et biologie moléculaire
M. Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
M. Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
M. Xavier LE LOET	HB	Rhumatologie
M. Eric LEREBOURS	HCN	Nutrition
Mlle Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
M. Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
M. Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. Eric MALLET (<i>Surnombre</i>)	HCN	Pédiatrie
M. Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mlle Isabelle MARIE	HB	Médecine Interne
M. Jean-Paul MARIE	HCN	ORL
M. Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - obstétrique
M. Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
M. Pierre MICHEL	HCN	Hépatologie - Gastro - Entérologie
M. Francis MICHOT	HCN	Chirurgie digestive
M. Bruno MIHOUT	HCN	Neurologie
M. Pierre-Yves MILLIEZ	HCN	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique
M. Jean-François MUIR	HB	Pneumologie
M. Marc MURAINÉ	HCN	Ophtalmologie
M. Philippe MUSETTE	HCN	Dermatologie - Vénéréologie
M. Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
M. Jean-Marc PERON	HCN	Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale
M. Christian PFISTER	HCN	Urologie

M. Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
M. Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
M. Bernard PROUST	HCN	Médecine légale
M. François PROUST	HCN	Neurochirurgie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie et méd. du dévelop. et de la reproduction.
M. Jean-Christophe RICHARD (<i>Mise en dispo</i>)	HCN	Réanimation Médicale, Médecine d'urgence
M. Horace ROMAN	HCN	Gynécologie Obstétrique
M. Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie – Pathologie
M. Guillaume SAVOYE	HCN	Hépto - Gastro
M. Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mle Florence THIBAUT	HCN	Psychiatrie d'adultes
M. Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
M. Christian THUILLEZ	HB	Pharmacologie
M. Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
M. François TRON (<i>Surnombre</i>)	UFR	Immunologie
M. Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
M. Jean-Pierre VANNIER	HCN	Pédiatrie génétique
M. Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie Réanimation chirurgicale
M. Pierre VERA	C.B	Biophysique et traitement de l'image
M. Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
M. Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
M. Jacques WEBER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
M. Jeremy BELLIEN	HCN	Pharmacologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
M. Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Physiologie
Mme Sophie CLAEYSSSENS	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
M. Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition

M. Vincent COMPERE chirurgicale	HCN	Anesthésiologie et réanimation
M. Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mme Catherine HAAS-HUBSCHER	HCN	Anesthésie - Réanimation chirurgicale
M. Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
M. Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
M. Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie Cellulaire
Mme Lucie MARECHAL-GUYANT	HCN	Neurologie
M. Jean-François MENARD	HCN	Biophysique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et Biologie moléculaire
M. Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
M. Francis ROUSSEL	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
M. Eric VERIN	HCN	Physiologie

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

M. Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
M. Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Dominique LANIEZ	UFR	Anglais
Mme Michèle GUIGOT	UFR	Sciences humaines - Techniques d'expression

I-PHARMACIE

PROFESSEURS

M. Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
M. Jean-Jacques BONNET	Pharmacologie
M. Roland CAPRON (PU-PH)	Biophysique
M. Jean COSTENTIN (PU-PH)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
M. Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
M. Michel GUERBET	Toxicologie
M. Olivier LAFONT	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX	Physiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
M. Marc VASSE (PU-PH)	Hématologie
M Jean-Marie VAUGEOIS (Délégation CNRS)	Pharmacologie
M. Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mle Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mme Dominique BOUCHER	Pharmacologie
M. Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
M. Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
M. Jean CHASTANG	Biomathématiques
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mle Cécile CORBIERE	Biochimie
M. Eric DITTMAR	Biophysique
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mle Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Roseline DUCLOS	Pharmacie Galénique
M. Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie

M. François ESTOUR	Chimie Organique
M. Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla GHARBI	Chimie analytique
Mlle Marie-Laure GROULT	Botanique
M. Hervé HUE	Biophysique et Mathématiques
Mme Hong LU	Biologie
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
M. Paul MULDER	Sciences du médicament
M. Mohamed SKIBA	Pharmacie Galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie Galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
M. Rémi VARIN (MCU-PH)	Pharmacie Hospitalière
M. Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEUR ASSOCIE

M. Jean-Pierre GOULLE	Toxicologie
------------------------------	-------------

MAITRE DE CONFERENCE ASSOCIE

Mme Sandrine PANCHOU	Pharmacie Officinale
-----------------------------	----------------------

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Anne-Marie ANZELLOTTI	Anglais
----------------------------------	---------

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

M. Bérénice COQUEREL	Chimie Analytique
M. Johann PELTIER	Microbiologie

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEURS

M. Jean-Loup **HERMIL** UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS :

M. Pierre **FAINSILBER** UFR Médecine générale

M. Alain **MERCIER** UFR Médecine générale

M. Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS :

M Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

LISTE DES RESPONSABLES DE DISCIPLINE

Melle Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
M. Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
M. Roland CAPRON	Biophysique
M Jean CHASTANG	Mathématiques
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation, Economie de la Santé
Mlle Elisabeth CHOSSON	Botanique
M. Jean COSTENTIN	Pharmacodynamie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
M. Loïc FAVENNEC	Parasitologie
M. Michel GUERBET	Toxicologie

M. Olivier LAFONT	Chimie organique
M. Jean-Louis PONS	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
M. Mohamed SKIBA	Pharmacie Galénique
M. Marc VASSE	Hématologie
M. Philippe VERITE	Chimie analytique

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

MAITRES DE CONFERENCES

M. Sahil ADRIOUCH moléculaire	Biochimie et biologie (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE moléculaire	Biochimie et biologie (Unité Inserm 614)
M. Antoine OUVRARD-PASCAUD 644)	Physiologie (Unité Inserm 644)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

M. Mario TOSI moléculaire	Biochimie et biologie (Unité Inserm 614)
M. Serguei FETISSOV	Physiologie (Groupe ADEN)
Mme Su RUAN	

Par délibération en date du 03 Mars 1976, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

Avant-propos

J'adresse tout particulièrement mes remerciements à ma directrice de thèse, le Pr. Soumeya BEKRI, qui m'a proposé ce sujet. Quoi demander de plus qu'un projet qui porte sur une mise en point d'une technique de biologie moléculaire et son application dans le cadre d'une étude descriptive d'une maladie métabolique, avec un impact réel sur la démarche diagnostique. Je tiens également à vous remercier pour votre aide et le temps que vous avez bien voulu me consacrer.

Je tiens à remercier sincèrement le Pr. CHALABI, PU-PH et le Dr CHERIET, assistante en pédiatrie, au CHU d'Oran, pour leurs collaborations, leurs disponibilités, et l'énorme effort effectué pour le recueil des données. Je tiens aussi à leurs transmettre tout mon respect pour le travail accompli chaque jour auprès des malades...

Je remercie Madame le Pr. Isabelle DUBUS, de l'honneur que vous me faites de présider ce jury. Merci également d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier également, Monsieur le Pr. Jean-Jacques BONNET d'avoir accepté de participer à ce jury, et d'avoir évalué ce travail.

J'exprime ma gratitude au Dr Stéphanie TORRE, pour l'aide qu'elle m'a accordée dans l'analyse des données cliniques, et d'avoir accepté de siéger dans ce jury.

J'exprime ma grande reconnaissance pour Hélène, et surtout à Carine, pour sa disponibilité, et sa patience, qui m'ont permis d'apprendre la magie de mise au point de technique de

biologie moléculaire. Merci beaucoup pour tout le travail effectué pour venir à bout de ce séquençage.

Je tiens également à profiter de cette section de ma thèse pour remercier profondément toutes les personnes qui m'ont appuyé au cours de mes études. À commencer tout d'abord par mes différents professeurs. J'ai une pensée particulière aux deux « Cheikh Hamid », qui m'ont appris à se donner à fond pour atteindre mes objectifs.

Je désire exprimer ma gratitude envers le Pr. Beljean-Leymarie, qui m'a permis et soutenu pour réaliser mon rêve de devenir biologiste.

Je souhaite aussi adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à la réussite de mon parcours universitaire en France, je pense notamment à mes chers cousins qui m'ont donné ce coup de pouce nécessaire....

Ces remerciements ne seraient pas complets sans une pensée pour trois amis de longue date, Alilou, Koussa et Paul. Merci de m'avoir aidé et encouragé, et pour m'avoir changé les idées quand j'en avais besoin.

Je n'oublie pas mes co-internes à Caen, Lille ou Rouen, avec lesquels j'ai partagé le bonheur de l'internat.

Mes dernières pensées iront vers ma famille, et surtout mes parents, qui m'ont permis de poursuivre mes études. Merci pour votre confiance et d'avoir toujours eu foi en ma réussite.

Merci à mes petites sœurs, Thiziri , ma claire de lune, Tinhinane, la force tranquille et Thafathe, ma lumière.

À ma femme Gouraya, pour ta patience et ton soutien dont tu as fait preuve pendant toute la durée de mon internat et cette thèse. Je t'adore

J'aimerais conclure cette section par citer la réponse d'un champion de Tennis après une victoire d'un grand chelem...

Il disait « le succès, ce n'est pas la victoire en elle-même, mais plutôt toutes les étapes que vous traversez pour y parvenir ; cette certitude d'avoir fait tout ce qui était en votre pouvoir pour l'obtenir. C'est un sentiment qui me rend heureux ».

Je suis très heureux d'avoir réalisé tout ce parcours pour soutenir aujourd'hui ma thèse d'exercice et mémoire de DES de biologie médicale...

Table des matières

Résumé	19
Introduction	20
Chapitre 1 : État des connaissances	21
1. Le lysosome : fonctions et biogenèse	21
1.1. Le système endosome/lysosome.....	21
1.2. Les enzymes lysosomales.....	23
1.3. Les protéines membranaires lysosomales.....	24
2. Les maladies lysosomales de surcharge	27
2.1. Définition.....	27
2.2. Mécanismes étio-pathologiques des MLS.....	28
2.3. Cascade physiopathologique	29
2.4. Classification des MLS.....	32
2.5. Présentation clinique	32
2.6. Diagnostic biologique.....	34
A. Diagnostic non biochimique.....	35
1) Analyse hématologique	35
2) Analyse anatomopathologique	35
B. Diagnostic biochimique.....	37
1) Tests de dépistage	37
2) Tests de confirmation	39
3. Mucopolysaccharidose de type I	42
3.1. Définition.....	42
3.2. Histoire de la maladie.....	43
3.3. Épidémiologie	45
3.4. Présentation clinique	46

3.5.	Diagnostic biologique.....	51
3.6.	Traitement	53
A.	Traitement symptomatique.....	53
B.	Traitement spécifique	53
1)	Transplantation des cellules souches hématopoïétiques.....	53
2)	Traitement enzymatique substitutif.....	54
3)	Autres perspectives thérapeutiques	56
Chapitre 2 : Caractéristiques cliniques et moléculaires d'une cohorte de 13 patients algériens atteints de MPS I		57
1.	Objectif.....	57
2.	Matériel et méthode.....	57
2.1.	Recrutement des patients.....	57
2.2.	Diagnostic Moléculaire	58
2.3.	Nomenclature	59
3.	Résultats	60
3.1.	Caractéristiques cliniques.....	60
3.2.	Caractéristiques biochimiques.....	63
A.	GAG urinaires	63
B.	Activité enzymatique.....	63
C.	Analyse moléculaire	64
4.	Discussion	67
Conclusion.....		76
Bibliographie		78

Liste des Tableaux et Figures

Tableau 1 : Métabolites accumulés dans les MPS.....	38
Tableau 2 : Incidence à la naissance des MPS I dans certains pays.....	45
Tableau 3 : Principales caractéristiques cliniques des patients de la cohorte.....	62
Tableau 4 : Caractéristiques biochimiques des patients.....	63
Tableau 5 : Caractéristiques des 4 mutations détectées dans notre étude.....	64
Tableau 6 : Caractéristiques des polymorphismes retrouvés chez les patients.....	66
Tableau 7 : Génotypes des patients.....	66
Figure 1 : Les différents composants du système endosome/lysosome.....	22
Figure 2 : Voies d'acheminement des prohydrolases et LMPs vers les lysosomes.....	26
Figure 3 : Cascade physiopathologique des MLS	30
Figure 4 : Approche diagnostique de certaines MLS à présentation pédiatrique.....	33
Figure 5 : Principales anomalies cytologiques rencontrées dans les MLS.....	36
Figure 6 : Catabolisme des GAG.....	42
Figure 7 : Localisation, structure, certaines mutations et polymorphismes du gène <i>IDUA</i>	52
Figure 8 : Électrophorégrammes des mutations observées chez les patients.....	64
Figure 9 : Distribution géographique et fréquences relatives des mutations les plus communes en fonction des pays.....	72

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AINS	Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
CHO	Chinese Hamster Ovary
CHU	Centre Hospitalo-Universitaire
CK	Créatinine Kinase
CMH2	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type 2
DMB	Diméthylméthylène
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNTP	Mélange des quatre désoxyribonucléotides
DS	Déviation Standard
DSu	Dermatane Sulfate
E/L	Endosome/Lysosome
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GAG	Glycosaminoglycanes
GlcNA	N-acétylglucosamine
GM	Monosialotétrahexosylganglioside
HLA	Human Leukocyte Antigen
HSu	Héparane Sulfate
HTA	Hypertension artérielle
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LAMP	lysosome-Associated Membrane Protein
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LED	Lupus Erythémateux Disséminé
LIMP	Lysosomal Integral Membrane Proteins
LMPs	Lysosomal Membrane Proteins
LRO	Lysosome-Related Organelle
M6P	Mannose 6 Phosphate
M6PR	Mannose 6 Phosphate Receptor
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MLS	Maladie Lysosomale de Surcharge
MPS	Mucopolysaccharidose
MRc	Récepteur au Mannose
NCT	National Care testing
NPC	Niemann-Pick type C
ORL	Otorhinolaryngologie
PCR	Polymerase Chain Reaction

PPCA	Protective Protein/Cathepsin A
PSAP	Prosaposine
QMPSF	Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescence Fragments
RE	Réticulum Endoplasmique
RIG	Registre International Genzyme
ROS	Reactive Oxygen Species
SERCA	sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ - ATPase
SNC	Système Nerveux Central
SUMF1	Sulphatase Modifying <i>Factor-1 Gene</i>
TCSH	Transplantation de Cellules Souches Hématopoïétiques
TES	Traitement par enzymothérapie substitutive
UDP	Uridine diphosphate

Résumé

Caractéristiques cliniques et moléculaires d'une cohorte de 13 patients Algériens atteints de MPS I

Molecular and clinical characteristics of 13 Algerian MPS I patients

La mucopolysaccharidose de type I (MPS I) est une maladie lysosomale de surcharge liée au déficit d'une enzyme du métabolisme des glycomanioglycanes (GAG), α -L-Iduronidase (IDUA). C'est une maladie récessive rare et grave, avec un spectre clinique hétérogène comportant des atteintes progressives viscérales et osseuses. Trois formes cliniques ont été décrites. La forme sévère est caractérisée par un début de signes précoce et un retard intellectuel. Dans les formes atténuées, les symptômes surviennent plus tardivement et l'atteinte neurologique est absente ou modérée.

Nous rapportons pour la première fois, une étude descriptive portant sur 13 patients algériens atteints de MPS I. Le séquençage du gène *IDUA* a été réalisé dans le cadre de cette étude. Notre cohorte comporte majoritairement des patients de phénotype atténué (12/13). Chez ces patients, la dysmorphie faciale, la valvulopathie, l'opacité cornéenne et la présence de hernie ombilicale sont quasi systématiques. Les données biochimiques trouvent chez tous les sujets une excrétion accrue de GAG, et les profils qualitatifs montrent la présence de bandes de dermatane et héparane sulfate. L'activité enzymatique IDUA est effondrée chez tous les patients. L'analyse moléculaire a mis en évidence 4 variations pathologiques déjà connues, les mutations faux-sens p.P533R (C.1598C>G) et p.E178K (C.532G>A), et les mutations non-sens p.Y167X (C.501C>G) et p.Y581X (C.1743C>G). La mutation p.P533R est prédominante, elle est retrouvée dans 84% des cas. Une meilleure caractérisation des patients atteints de MPS I contribue à définir l'histoire naturelle de la maladie et à la compréhension de ses bases physiopathologiques.

Mots clés : MPS, MLS (maladie lysosomale de surcharge), Lysosome, Maladie de Hurler, Syndrome de Scheie, GAG (glycosaminoglycane), IDUA (iduronidase)

Introduction

Les maladies métaboliques sont des pathologies héréditaires dues à une altération du métabolisme de l'un des trois grands types de nutriments : protéines, glucides et lipides. Leur nombre est d'environ 450. Elles sont, cependant, souvent méconnues ; dans certains cas, leur diagnostic et prise en charge précoce peut modifier le pronostic. L'étape initiale de la démarche diagnostique consiste à rechercher et/ou à quantifier des métabolites accumulés dans différents fluides physiologiques ou types cellulaires (urine, plasma, fibroblastes...). Ce dépistage de base est réalisé grâce à différentes méthodes physiques et permet, le cas échéant, une orientation diagnostique. La deuxième étape consiste à caractériser la protéine supposée être déficiente. Enfin, l'étude génétique permet d'identifier l'altération causale et ainsi de réaliser une étude familiale et de proposer un diagnostic anténatal si nécessaire.

Trois grands cadres clinico-biologiques peuvent être distingués : 1) Les intoxications, groupe caractérisé par des symptômes neurologiques, digestifs et/ou psychiatriques. Lorsque ces signes sont associés à une acidose et/ou cétose biologique, ils évoquent une aminoacidopathie ou acidurie organique. Ils orientent également vers un déficit du cycle de l'urée en présence d'hyperammoniémie. 2) Les carences énergétiques avec défaillance viscérale sont évocatrices d'une anomalie du métabolisme des glucides ou des lipides. 3) Une symptomatologie progressive, et nécessitant moins souvent une prise en charge en urgence, doit orienter vers des troubles du métabolisme des molécules complexes. Parmi ce dernier groupe, nous nous intéressons dans le cadre de ce travail, aux maladies lysosomales de surcharge (MLS), et en particulier à la mucopolysaccharidose de type I (MPS I).

Afin de bien comprendre la physiopathologie des MLS, des rappels sur la biogenèse et le fonctionnement du système endosome/lysosome seront préalablement abordés. Nous détaillerons ensuite les différents aspects des MLS, en terme notamment de mécanismes étiologiques et de cascade physiopathologique. Nous insisterons en particulier sur la démarche du diagnostic biologique. Nous présenterons par la suite la mucopolysaccharidose de type I (MPS I), comme prototype des MLS.

L'identification des mutations génétiques causales permet d'établir dans certains cas la corrélation phénotype-génotype. Ces corrélations pourraient permettre de prédire l'évolution de la maladie, et d'optimiser ainsi la thérapeutique. L'objectif de ce travail de thèse, est de décrire les caractéristiques cliniques et moléculaires de la MPS I dans une cohorte de 13 patients algériens.

Chapitre 1 : État des connaissances

1. Le lysosome : fonctions et biogenèse

Les lysosomes sont des organites intracellulaires, constitués d'une membrane faite d'une simple couche lipidique, issue du bourgeonnement de la membrane trans-golgienne. Le lysosome est présent dans toutes les cellules mammifères à l'exception des globules rouges. Il est caractérisé par son pH acide, et sa principale fonction est la dégradation de macromolécules intra ou extracellulaires en monomères ¹. Cette action est assurée grâce à plus de 50 hydrolases acides (phosphatases, protéases, glycosidases, lipases, sulfatases, nucléases...) qui catabolisent des substrats de nature différentes, tels que des protéines, des lipides ou des sucres complexes. Outre ces enzymes, une centaine de protéines structurales ou de transport ont été identifiées au sein de cette organelle. Elles contribuent à l'activité catabolique finale et à d'autres fonctions du lysosome.

La découverte et l'identification morphologique des lysosomes ont été réalisées en 1953, par les travaux de Christian De Duve^a. Cette organelle a été nommée *Lysosome* par référence à sa richesse en enzymes hydrolytiques ². D'ailleurs, les lysosomes, étaient initialement considérés comme de simples entités biochimiques contenant plusieurs enzymes hydrolytiques. En 1966, lors du congrès de *Ciba Foundation* en Angleterre. De Duve, a attribué au lysosome deux rôles physiologiques : la digestion de molécules extracellulaires ingérées par endocytose, et la dégradation de molécules endogènes isolées par autophagie^b, processus nouvellement décrit à l'époque. De Duve a placé ainsi le lysosome au centre de ce qu'il a désigné pour la première fois comme le système endosome/lysosome (E/L) ³. Ce système a été qualifié, plus récemment par Walkley du « Grand lysosome »⁴.

1.1. Le système endosome/lysosome

Le système E/L est un réseau vacuolaire, qui relie au sein d'un équilibre fin et dynamique, un ensemble d'organelles cellulaires, comme les lysosomes ou l'appareil de Golgi ⁵. Les différents éléments composant ce système, ont été décrits pour la première fois dans les travaux de Novikoff en

^a **Christian de Duve** : Médecin et scientifique belge, premier à décrire la structure du lysosome et du peroxyosome, il a été récompensé par le Prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 1974, avec Albert Claude et George Palade pour l'ensemble de leurs découvertes sur l'organisation cellulaire

^b **Autophagie** : La macroautophagie ou autophagie est une voie majeure du catabolisme lysosomal conservée au cours de l'évolution des eucaryotes. Sur le plan cellulaire, l'autophagie peut se résumer en trois étapes : la formation d'une vacuole initiale (autophagosome) qui séquestre le matériel cytoplasmique, puis la maturation de l'autophagosome en autolysosome par fusion avec le lysosome, et enfin, la dégradation du matériel séquestré. L'autophagie est une activité domestique qui renouvelle et exerce un contrôle de qualité dans le cytoplasme en éliminant les structures endommagées ou vieillissantes et les agrégats protéiques.

1973 ⁶. Ils comportent essentiellement : *l'endosome précoce*, situé à proximité de la membrane en périphérie de la cellule. Il est subdivisé en 2 types : endosome de tri et de recyclage.

L'endosome tardif se trouve principalement au niveau périnucléaire. Il fusionne avec des vésicules chargées d'enzymes lysosomales en provenance de l'appareil de Golgi pour former des lysosomes. Cependant, dans la voie endosomale de biogenèse des lysosomes, il fusionne directement avec des lysosomes préexistants. Les endosomes tardifs fusionnent aussi avec d'autres endosomes et le surplus membranaire qui en résulte est utilisé pour la formation de vésicules intra-endosomales, conduisant ainsi à des corps multivésiculaires. **Le lysosome**, est considéré comme le site d'acheminement final des molécules à dégrader.

Certains auteurs en incluent également « les organelles liées au lysosome » ⁷ ou **LRO** pour *Lysosome-related Organelle*, comme les mélanosomes, les granules Delta plaquettaires ou lytiques. D'autres auteurs, en additionnent aussi, **les vacuoles autophagiques** ou **les corps résiduels** ⁸.

Les différents composants de ce système sont présentés dans la **Figure 1**

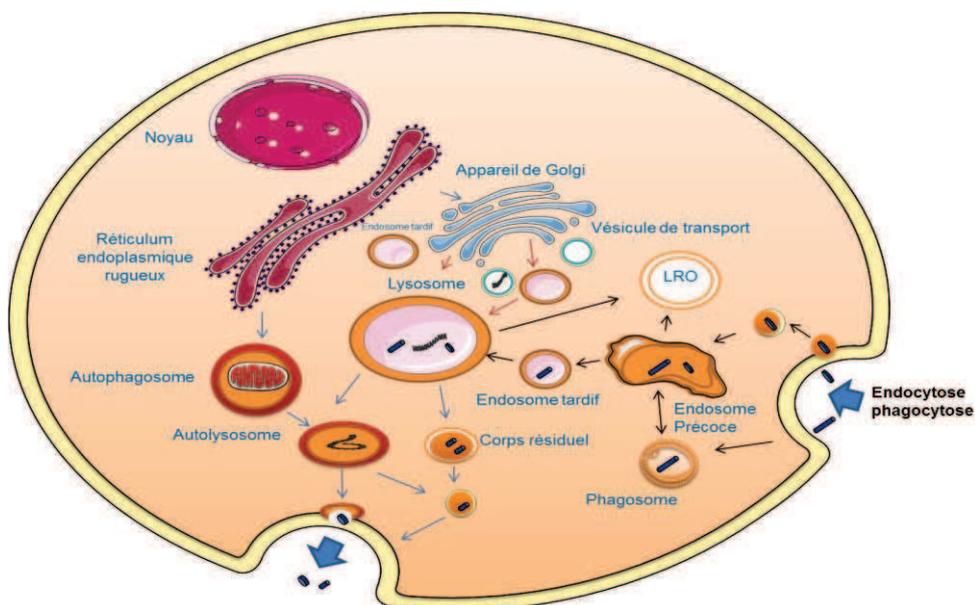


Figure 1 : Les différents composants du système endosome/lysosome

Le système endosome/lysosome ou le « grand lysosome » est un réseau vacuolaire, qui relie au sein d'un équilibre fin et dynamique, un ensemble d'organelles cellulaires, comme les lysosomes ou l'appareil de Golgi. Les principaux composants de ce système sont : l'endosome précoce, l'endosome tardif et le lysosome.

L'endosome précoce joue un rôle important dans le tri et le recyclage des molécules incorporées dans la cellule par endocytose ou phagocytose. L'endosome tardif se trouve principalement au niveau périnucléaire. Au centre de ce système, le lysosome est le compartiment possédant le plus fort potentiel catabolique. Il est considéré comme le site d'acheminement final des molécules à dégrader.

Les *LRO* pour « *Lysosome-related Organelle* » comme les mélanosomes, les granules Delta plaquettaires ou lytiques..., participent également à la dégradation des molécules. Les corps résiduels sont des vacuoles dans lesquelles persistent des résidus non digérés. La formation d'autolysosome par fusion des lysosomes avec les vacuoles autophagiques, est une étape importante du processus autophagique.

Le lysosome est au centre de ce système et possède le plus fort potentiel catabolique. Son pH acide, stabilisé par des pompes à proton dépendantes de l'adénosine triphosphate (ATPase), permet la maturation finale des hydrolases acides. D'ailleurs, la plupart de ces enzymes ont une action optimale à un pH de 4 à 5, alors que dans le cytoplasme le pH est de 6,5 à 7,0. De même, la dénaturation et la dégradation de la plupart des macromolécules acheminées au lysosome, sont favorisées par ce pH lysosomal^{9,10}. Les LRO, participent et complètent également la fonction catabolique du lysosome⁷. Toutefois, le lysosome n'est pas seulement un « site final de digestion », il est capable également *via* un mécanisme d'exocytose de sécréter son contenu après fusion avec la membrane cellulaire¹¹. Il exerce aussi d'autres fonctions physiologiques comme le stockage de neuromédiateurs ou d'ions calcium¹². Il participe également à la réparation de la membrane plasmique et à la régulation de la mort cellulaire^{13 14}.

Jusqu'au début des années 2000, les seules fonctions du système E/L connues, étaient l'acheminement puis la digestion de molécules. Ces molécules sont d'origine extracellulaire, intégrées dans la cellule par les processus d'endocytose et phagocytose, ou intracellulaire isolées par autophagie.

Les avancées considérables dans la compréhension de la signalisation cellulaire et une meilleure connaissance du système E/L ont permis ensuite de confirmer l'importance de ce système dans la sélection, l'adressage et le recyclage de plusieurs composés cellulaires. Nous pouvons citer à titre d'exemple, le rôle central de ce système dans l'adressage vers la membrane plasmique des peptides du complexe majeur d'histocompatibilité de type 2 (CMH2)¹⁵ ou de molécules de cholestérol¹⁶.

1.2. Les enzymes lysosomales

Les hydrolases lysosomales sont des glycoprotéines synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique (RE) sous forme de précurseurs inactifs : les prohydrolases. La séquence de signalisation dans la partie N-terminale, va permettre à ces prohydrolases de transloquer vers la lumière du RE. Ces précurseurs vont subir des modifications post-traductionnelles, notamment une N-glycosylation avec la fixation de chaînes oligosaccharidiques sur des résidus arginine. Après transfert dans l'appareil de Golgi, la plus part des prohydrolases sont exposées à l'action séquentielle de deux enzymes : la première, une phosphotransférase (l'uridine diphosphate (UDP)-N-acétylglucosamine (GlcNAc)-1-phosphotransférase), qui va modifier leurs chaînes glucidiques, en additionnant un GlcNAc-phosphate en position 6 d'une ou de plusieurs molécules terminales de mannose. La deuxième, une diestérase (GlcNAc-1-phospho-diester β -N-acétylglucosaminidase) va hydrolyser la liaison GlcNAc-phosphate pour donner naissance à des résidus de mannose-6-phosphate (M6P) en position terminale¹⁷.

Le M6P est considéré comme un « ligand de tri »⁹, car l'acquisition du M6P va distinguer, les glycoprotéines adressées au lysosome (M6P+), de celles destinées à être sécrétées (M6P-).

En effet, à leur arrivée dans le réseau trans-Golgien, les enzymes ainsi marquées, se lient au domaine endoluminal d'un récepteur spécifique du M6P (le M6PR, *Mannose-6-Phosphate Receptor*), ce qui va assurer leur conditionnement dans des vésicules de transport destinées à fusionner majoritairement avec les endosomes tardifs. Une fois dans la lumière de l'endosome tardif et sous l'action du pH acide, le complexe formé du récepteur de M6P et des proenzymes est dissocié. Les zymogènes nouvellement libérés de leurs récepteurs, vont subir une maturation finale (par protéolyse, déphosphorylation, modification conformationnelle et agrégation) pour former des enzymes matures et fonctionnelles. Le M6PR est majoritairement recyclé et réadressé vers le réseau trans-Golgien, afin de recruter d'autres enzymes. Il est à noter qu'une faible proportion de ces récepteurs (3 à 10%), est incorporée dans la membrane plasmique¹⁷.

Cependant, l'existence d'une ou plusieurs voie(s) d'adressage alternatives et indépendantes du récepteur de M6P a été suggérée¹⁸. En effet, des travaux sur des tissus de patients atteints de la mucopolysaccharidose de type II, une maladie lysosomale caractérisée par un défaut d'adressage des enzymes vers le lysosome due à un déficit en phosphotransférase (l'UDP-N-acétylglucosamine-phosphotransférase, décrite ci-dessus comme la première enzyme dont l'action est essentielle la formation des résidus M6P) ont montré que les cellules analysées ne sont pas toutes déficitaires en enzymes lysosomales¹⁸. En effet, en absence d'un M6PR fonctionnel, les hydrolases acides nouvellement synthétisées peuvent suivre la voie classique d'exocytose des protéines et après leur sécrétion une partie va être endocytée et acheminée vers le lysosome¹⁰. Dans ce cas, l'endocytose met en jeu des récepteurs universels, tels que le récepteur au mannose (MRc) ou des récepteurs « *Scavengers* ». Ces récepteurs sont préférentiellement exprimés à la membrane des macrophages tissulaires, des cellules dendritiques ou des cellules endothéliales sinusoidales hépatiques^{10,19}.

D'autres mécanismes de transport des pro-hydrolases, indépendants du M6PR, sont avancés. La sortiline (ou le récepteur de la neurotensine de type 3), une glycoprotéine transmembranaire, localisée au niveau de l'appareil de Golgi, a été par exemple impliquée dans ce processus^{20,21}. De plus, l'utilisation de souris « *knock-out* » pour LIMP2 (*Lysosomal Integral Membrane Protein*)²², une protéine de la membrane lysosomale, a montré que LIMP2 est un récepteur sélectif et spécifique de la β -glucosidase (l'enzyme lysosomale déficiente dans la maladie de Gaucher), qui participe au transfert de cette enzyme vers le lysosome²².

1.3. Les protéines membranaires lysosomales

Outre les hydrolases acides, l'activité du lysosome nécessite une seconde classe de protéines, fortement N-glycosylées : les « protéines membranaires lysosomales » ou LMPs pour *Lysosomal Membrane Proteins*.

Ces protéines ont un rôle structural dans la biogénèse des lysosomes, ces protéines assurent diverses fonctions, comme l'acidification du milieu intraluminal, la participation à la fusion membranaire,

l'import de protéines ou lipides depuis le cytosol et le transport de produits dégradés vers le cytoplasme ²³. Elles participent également à la protection de la membrane lysosomale vis-à-vis de l'action hydrolytique des enzymes lysosomales.

Parmi ces protéines, LAMP1 et 2 pour *Lysosome-Associated Membrane Proteins*, et LIMP1 et 2 sont les plus abondantes (> 50% de l'ensemble des LMPs).

Les LMPs, contrairement à la plus part des hydrolases lysosomales ne comportent pas de résidu M6P. Par conséquent, les mécanismes de leur acheminement vers le lysosome, qui sont loin d'être complètement élucidés, sont indépendants du M6PR. Cependant, dès leur synthèse, un signal d'adressage est incorporé au niveau de leur fragment cytosolique, ce qui va permettre l'endocytose rapide de ces protéines à partir de la membrane cellulaire et leur transfert vers le lysosome ^{10,17} Le transport des LMPs au lysosome est effectué selon deux voies : une voie dite « directe » et une autre « indirecte ». Dans la voie directe, les LMPs, synthétisées dans l'appareil de Golgi, sont transférées d'abord aux endosomes, pour atteindre ensuite directement les lysosomes sans jamais être exprimées à la surface cellulaire. En revanche, dans la voie indirecte, elles sont préalablement transférées à la membrane cellulaire *via* le processus général d'exocytose des protéines membranaires, avant d'être internalisées par endocytose, puis incorporées aux endosomes précoces, tardifs et enfin aux lysosomes. Le transfert de la classe des LIMP ou LAMP, les protéines les plus abondantes dans la membrane plasmique, passe majoritairement par la voie directe ²³.

Un résumé de l'ensemble de ces étapes d'acheminement des enzymes et protéines lysosomales est illustré dans la **Figure 2**.

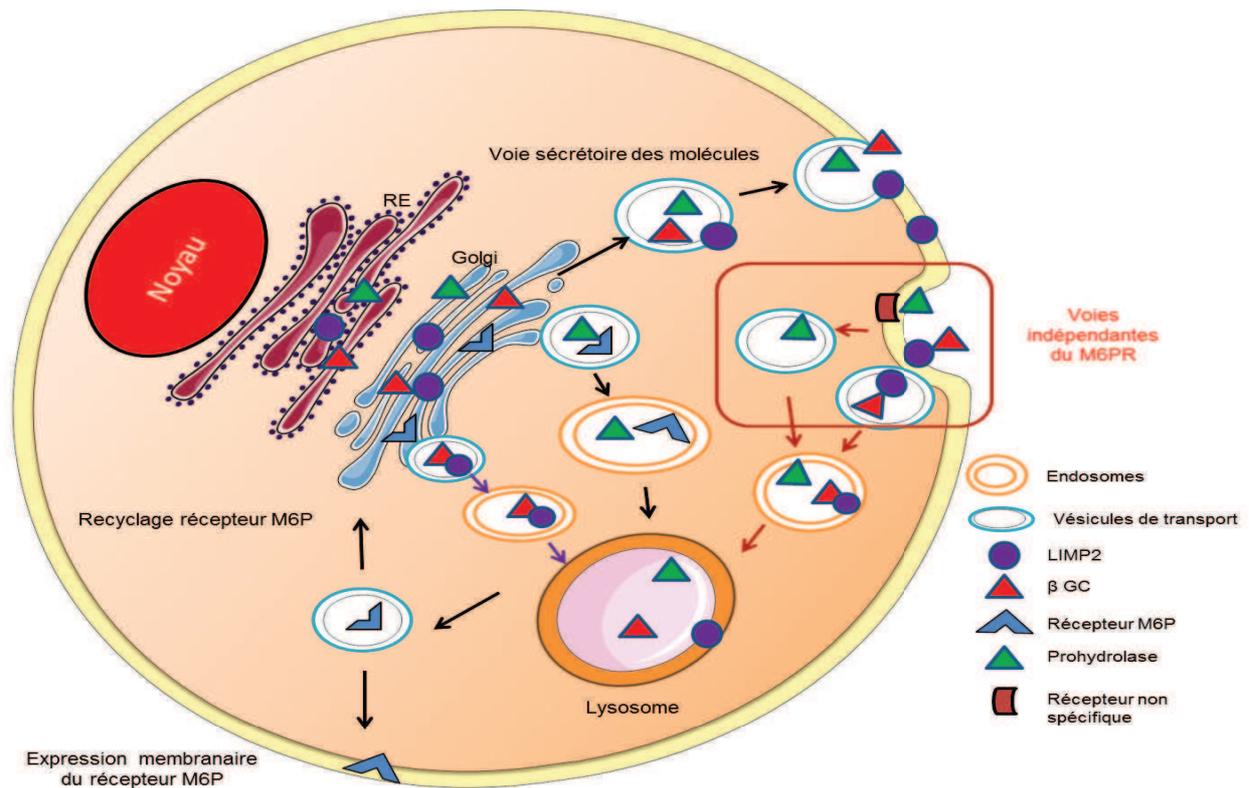


Figure 2: Voies d'acheminement des prohydrolases et LMPs vers les lysosomes.

Des modifications post-traductionnelles au niveau de l'appareil de Golgi, vont permettre de fixer un M6P sur les chaînes oligosaccharidiques de la plupart des proenzymes lysosomales. Ce résidu se lie à un récepteur spécifique (le M6PR (*Mannose 6 Phosphate Receptor*)), l'ensemble M6P et son récepteur sont transportés au sein de vésicules, qui fusionnent avec les endosomes tardifs. Sous l'action du pH acide, le complexe formé du récepteur de M6P et des proenzymes est dissocié. Les zymogènes nouvellement libérés de leurs récepteurs, vont subir une maturation finale pour former des enzymes matures et fonctionnelles. Le récepteur est majoritairement recyclé vers le réseau trans-Golgien, afin de recruter d'autres enzymes alors qu'une faible proportion (3 à 10%) est incorporée dans la membrane plasmique.

Des voies alternatives, indépendantes du récepteur du M6P sont également décrites pour le transport des pro-enzymes. En effet, les zymogènes sont acheminés vers l'extérieur de la cellule *via* la voie sécrétoire classique des molécules. Les pro-hydrolases sont ensuite acheminées vers les lysosomes après phagocytose et/ou endocytose. Cette dernière met en jeu des récepteurs universels non spécifiques tels que le récepteur au mannose (MRc) ou des récepteurs « *Scavengers* ». Elle peut également mettre à contribution dans le cas de la β -glucocérébrosidase (β GC), des molécules membranaires comme LIMP2.

Le transport des LMPs (*lysosomal membrane proteins*) tel LIMP2 au lysosome est effectué selon les deux voies « directe » et « indirecte ». Dans la voie directe, les LMPs, synthétisées dans l'appareil de Golgi, sont transférées d'abord aux endosomes pour atteindre ensuite directement les lysosomes sans jamais être exprimées à la surface cellulaire. En revanche, dans la voie indirecte, elles sont préalablement transférées à la membrane cellulaire via le processus général d'exocytose des protéines

2. Les maladies lysosomales de surcharge

La perturbation de l'activité physiologique du lysosome, est à l'origine de certaines maladies qualifiées de « pathologie de digestion cellulaire ». Ces affections, sont caractérisées par l'accumulation délétère au niveau intracellulaire de composés de nature endogène et/ou exogène, non ou partiellement dégradés. La thésaurismose, désigne la surcharge imputée à l'accumulation de substances exogènes non résorbables, telles que les molécules d'amiante « asbestose », ou de la silice « silicose »²⁴.

Ces anomalies fonctionnelles peuvent être « acquises » ou « induites ». En effet, des dysfonctionnements lysosomaux suite à l'ingestion de plantes toxiques contenant un alcaloïde appelé swainsonine, puissant inhibiteur des mannosidases lysosomales, ont été observés²⁵. Un tel effet, est également induit par certains médicaments. La chloroquine, utilisée comme antipaludéen, antiamibien et dans le lupus érythémateux disséminé (LED), a été rapportée d'entraîner une faiblesse musculaire chez une femme atteinte de LED et traitée pendant 4 ans par ce médicament²⁶. La biopsie musculaire exploratrice, a révélé des anomalies lysosomales proches de la lipofuscinose (une maladie lysosomale). Plus récemment, un cas similaire, est décrit au niveau myocardique, chez un patient traité dans le cadre d'une polyarthrite rhumatoïde, avec l'hydroxychloroquine²⁷.

Toutefois, les troubles les plus fréquents de la fonction lysosomale sont attribués à des causes héréditaires constitutionnelles. L'ensemble de ces affections héréditaires constitue le groupe des « maladies lysosomales de surcharge » ou MLS.

2.1. Définition

Les MLS sont un ensemble d'affections génétiques rares, qui regroupe actuellement, plus d'une cinquantaine de maladies héréditaires du métabolisme. Elles sont dues à la perturbation du catabolisme des macromolécules au niveau du lysosome^{28,29}. L'absence et le défaut de dégradation de ces substrats, sont à l'origine dans un second temps, d'une surcharge cellulaire progressive en composés partiellement ou non dégradés. Le mode de transmission des MLS est majoritairement récessif autosomique, à l'exception des maladies de Fabry, de Hunter et de Danon, pour lesquelles la transmission est liée à l'X.

Bien qu'individuellement rares (quelques cas à 1/40000), ces pathologies ont une incidence globale estimée à un cas pour 4000 à 7000 naissances vivantes³⁰. Toutefois, ces données épidémiologiques sont limitées à quelques pays (Grèce, Australie, Portugal, Pays-Bas, République Tchèque) ou populations particulières (Juive d'Ashkenazi, Finlandaise)³¹.

Historiquement, il y a plus d'un siècle, que les MLS ont été isolées comme des entités pathologiques. En effet, la description clinique de la plupart de ces maladies, remonte à la fin du 19^{ème} et au début du 20^{ème} siècle³². En 1882 à Paris, lors de sa thèse de médecine, Gaucher, a été le premier à rapporter un

cas d'hépatosplénomégalie accompagnée d'une surcharge réticulo-endothéliale. Il a ainsi décrit l'une des deux premières MLS : La maladie de Gaucher. De même, en 1881, l'ophtalmologue anglais Tay a décrit pour la première fois la tache rouge rétinienne (la macula rouge cerise) caractéristique d'une autre MLS : la maladie de Tay-Sachs. Le nom de cette maladie, fait également référence au neurologue américain Sachs, qui a été le premier, en 1887, à préciser les changements cellulaires observés dans cette maladie ³¹.

2.2. Mécanismes étio-pathologiques des MLS

Il a fallu attendre les dernières décennies du 20^{ème} siècle, après notamment la découverte du lysosome, pour comprendre les premiers mécanismes étio-pathogéniques des MLS. Depuis, six types d'anomalies biochimiques sont reconnues de pouvoir déclencher une MLS ^{31,33-35} :

1) Le défaut de synthèse d'une enzyme lysosomale :

C'est le cas le plus fréquent (environ 75% des MLS), généralement une ou plusieurs mutations sont à l'origine d'un déficit de l'activité catalytique d'une hydrolase lysosomale.

2) Le déficit d'une protéine activatrice ou d'un cofacteur d'une enzyme lysosomale :

Nous pouvons citer à titre d'exemple, certaines sphingolipidoses caractérisées par des mutations dans le gène *PSAP* (pour *prosaposine*). Les PSAP sont des précurseurs des saposines (ou Sap, acronyme de *Sphingolipid Activator PrO[S]teINs*). Ces protéines facilitent la digestion des sphingolipides, par notamment l'activation des enzymes lysosomales intervenant dans le catabolisme de ces molécules, comme par exemple la β -glucocérébrosidase (l'enzyme déficitaire dans la maladie de Gaucher). Certains cas de maladie de Gaucher sont d'ailleurs liés à un défaut en Saposine C ³⁶.

3) Le déficit d'une protéine qui stabilise un complexe enzymatique lysosomal :

La galactosialidose est une MLS caractérisée par un déficit combiné en α -D-neuraminidase et β -galactosidase lié à un déficit en « *Protectrice Protein Cathepsine A* (ou PPCA) ». Cette serine carboxypeptidase s'associe dès sa biosynthèse avec les précurseurs de ces enzymes lysosomales précitées et forme un complexe « proenzymes-cathépsine ». Ces glucosidases sont ainsi protégées d'une protéolyse rapide au niveau lysosomal.

4) Le défaut de maturation extralysosomale de l'enzyme lysosomale :

Il s'agit essentiellement d'un défaut de modifications post-traductionnelles, par incorporation des résidus M6P ou de la formylglycine dans la partie C terminale des proenzymes lysosomales. Ces déficits sont respectivement responsables de la mucopolysaccharidose II/III et du déficit multiple en sulfatase. La première pathologie est due à un déficit en phosphatase nécessaires au processus de fixation de M6P sur les hydrolases. Il en résulte un défaut d'adressage d'hydrolases vers le lysosome. La seconde, est induite par des mutations dans le

gène *SUMF1* (sulphatase modifying *factor-1 gene*), qui est à l'origine d'un déficit enzymatique en FGE (*Ca-formylglycine-generating enzyme*); cette enzyme catalyse la conversion des résidus cystéines situés dans les centres actifs des 12 sulfatases en résidus formylglycine. Cette transformation est essentielle pour l'activité catalytique des 12 sulfatases lysosomales.

5) Le déficit d'un transporteur de la membrane lysosomale :

Parmi les protéines membranaires lysosomales, la sialine est un transporteur anionique qui assure la sortie de l'acide sialique (ou acide N-acétylneuraminique) du lysosome. Le déficit de ce transporteur est à l'origine de la maladie de surcharge en acide sialique libre (maladie de Salla). L'altération de la cystinosine, un autre transporteur membranaire, est responsable de la surcharge lysosomale en cystine observée dans la cystinose.

6) Le défaut d'une molécule indispensable à la dynamique du système E/L :

Dans la maladie de Danon, plusieurs mutations sont identifiées dans le gène *LAMP2*. *LAMP2* est une protéine impliquée dans la fusion des lysosomes avec l'autophagosome, de ce fait, cette pathologie est caractérisée par une accumulation de vacuoles autophagiques dans de nombreux tissus³³.

Un déficit en transporteur de cholestérol (NPC1-NPC2) induit une accumulation des molécules de cholestérol libre dans les endosomes tardifs, ou les lysosomes³⁷. D'autres anomalies de la fusion ou du trafic des vésicules du système E/L sont décrites dans les syndromes de Griscelli, Chediak-Higashi ou de Hermansky-Pudlak.²⁹

2.3. Cascade physiopathologique

En dépit de la nature différente des substrats accumulés et des anomalies biochimiques impliquées dans chaque maladie, les MLS présentent une certaine analogie dans leur cascade physiopathologique. L'altération de plusieurs voies de signalisation cellulaire a ainsi été décrite. Les symptômes cliniques des MLS sont attribués aux perturbations et à la mort de cellules, possédant un « *turn over* » ou des besoins importants en molécules concernées par le déficit enzymatique, telles que les cellules nerveuses, myocardiques ou hépatiques. Plusieurs théories ou mécanismes physiopathologiques sont avancés pour expliquer la cascade physiopathologique des MLS³⁸ :

- 1) Théorie cytotoxique : Elle repose sur le concept définissant chaque MLS comme une anomalie d'une seule enzyme, induisant l'accumulation de son seul substrat, c'est-à-dire, la notion de « monoenzyme-monosubstrat ». La survenue des perturbations cellulaires, est alors attribuée à l'engorgement de la cellule en substrats, qui va provoquer par un simple effet mécanique, l'altération de la physiologie puis la mort des cellules.

Même si cette hypothèse est encore évoquée pour expliquer la physiologie des MLS, de nouveaux mécanismes sont proposés ^{33,39,40}.

2) Altération du processus autophagique :

Le lysosome joue un rôle important dans la voie de dégradation des éléments intracytoplasmiques qui lui sont acheminés par le processus autophagique. La fusion entre l'autophagosome et le lysosome est une étape clé dans cette dégradation. L'accumulation dans les MLS de vacuoles autophagiques a amené certains auteurs à placer l'altération de l'autophagie, au cœur la cascade physiopathologique des MLS ³³. Deux niveaux de dérégulation du processus autophagique, sont rapportés: sa sur-induction et son blocage partiel ³³. Le dysfonctionnement de cette voie de dégradation, provoque l'accumulation de substances cytotoxiques, ou d'organelles défectueuses comme les mitochondries altérées. Ceci peut être à l'origine d'autres effets délétères secondaires, tels qu'une réponse inflammatoire chronique ou la production de radicaux libres par des mitochondries défectueuses. Ce nouveau concept rapproche la physiopathologie des MLS, des maladies beaucoup plus communes, les pathologies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer.

La **Figure 3** résume ce modèle autophagique.

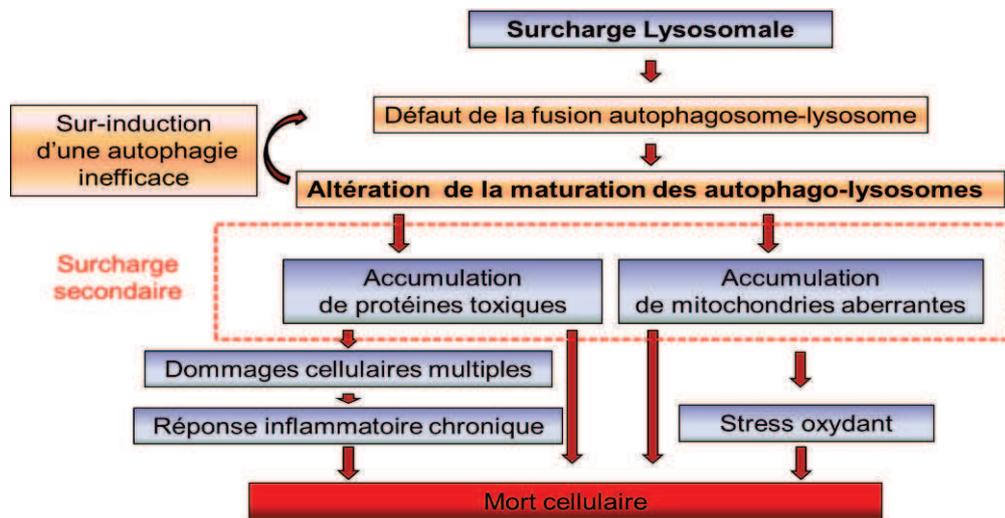


Figure 3: Cascade physiopathologique des MLS proposée par Ballabio ³³

La surcharge primaire induite par les déficits enzymatiques lysosomales pourrait être responsable de la diminution des capacités de fusion entre les lysosomes et les autophagosomes. Il en résulterait un blocage partiel et/ou une sur-induction d'un processus autophagique inefficace. Par conséquent, il y a une accumulation secondaire de substrats spécifiquement dégradés par ce processus, tels les agrégats protéiques et les mitochondries défectueuses. Cette surcharge secondaire va promouvoir la mort cellulaire par différents mécanismes. Elle contribue notamment à l'entretien d'une réaction inflammatoire chronique, à l'induction d'un stress oxydant et à plusieurs dommages cellulaires.

3) Processus inflammatoire :

Une réaction inflammatoire chronique, résultante de l'activation inappropriée du système immunitaire en réponse à la surcharge cellulaire est retrouvée dans l'ensemble des MLS, mais les voies d'activation de ce processus restent à élucider. Dans la maladie de Gaucher de type 1, la sur-stimulation des macrophages induit l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, de chitinase ou également d'une enzyme, la chitotriosidase, utilisée comme un marqueur diagnostic ⁴¹. Sur un modèle animal, il a été montré également que l'inflammation est directement liée à la survenue des symptômes des gangliosidoses ⁴². La réaction inflammatoire est un évènement précoce dans la cascade physiopathologique de nombreuses MLS, ceci laisse supposer que l'utilisation de stratégies thérapeutiques anti-inflammatoire pour le traitement de ces affections peut être indiquée. Dans cette optique, le bénéfice d'anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) a été démontré récemment sur un modèle de souris NPC1 ⁴³.

4) Stress oxydatif :

L'augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) est un évènement commun à plusieurs MLS ^{40,44}. Le stress oxydatif observé va provoquer des effets nocifs, par l'oxydation des lipides, des protéines ou de l'ADN. Toutefois, il faut considérer ce stress comme une réponse secondaire de la cellule à d'autres processus pathologiques et non comme un effet direct de la surcharge en substance non dégradées.

5) Altération de l'homéostasie calcique :

L'altération de l'homéostasie calcique est un évènement émergent dans les MLS ⁴⁰. Le niveau de la dérégulation est néanmoins propre à chacune des maladies. En effet, il a été observé sur un modèle de culture cellulaire de la maladie de Gaucher, une augmentation du relargage d'ion calcium (Ca^{2+}) à partir du réticulum endoplasmique (RE) suite à la sur-activation des canaux calciques de type RyR (récepteurs de la ryanodine). À l'inverse, la réduction du stockage du Ca^{2+} dans le RE *via* la pompe calcique de type SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*) a été trouvée dans la gangliosidose à GM2 ou le Nimann-Pick de type 1 (NPC1).

6) Autres mécanismes physiopathologiques :

D'autres processus peuvent être cités comme l'altération du métabolisme du fer, le développement d'un processus auto-immun, altération du métabolisme des lipides ^{40,45}...etc. Cette liste est loin d'être exhaustive.

2.4. Classification des MLS

La classification des MLS, est fondée soit sur la nature du substrat primaire accumulé, ou les mécanismes étiopathogéniques responsables de la maladie. La première classification, très usuelle, est basée sur la nature biochimique de la surcharge. Les pathologies sont respectivement classées en sphingolipidoses, mucopolysaccharidoses (MPS) et oligosaccharidoses (ou glycoprotéinoses), lorsque les produits accumulés sont des sphingolipides, des glycosaminoglycans (ou GAG, anciennement désignés par le terme de mucopolysaccharides) ou des oligosaccharides.

La définition, et la structure de ces substrats sont présentées dans l'**Annexe 1**.

Ce type de classification peut être une source d'ambiguïté, car en réalité, les MLS caractérisées par l'accumulation d'un seul type de substrat sont rares. La seconde classification, est plus récente, elle se réfère aux anomalies moléculaires causales de chaque maladie, telles les déficits enzymatiques ou les déficits en protéines membranaires. Cette classification peut être pratique pour envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques ⁴⁶. Le tableau en **Annexe 2**, rapporte la première classification et précise les anomalies étiopathogéniques impliquées pour chaque MLS.

2.5. Présentation clinique

Les premiers symptômes des MLS commencent le plus souvent à l'âge pédiatrique. Ils sont généralement très variés. Cependant, de nombreux points d'appel dits « signes cardinaux » permettent d'orienter le clinicien vers ce type de maladie. En effet, le pédiatre peut être alerté par l'association et l'évolution de certains signes comme : la dysmorphie faciale, les atteintes oculaires, l'organomégalie, la dysostose multiple, les atteintes articulaires, les valvulopathies, les troubles neurologiques, et le retard d'acquisition mentale.

La **Figure 4** illustre un algorithme d'orientation proposé par certains auteurs pour le diagnostic de quelques MLS ⁴⁷. Il est basé sur la présence ou non dans le tableau clinique de quatre des signes cardinaux.

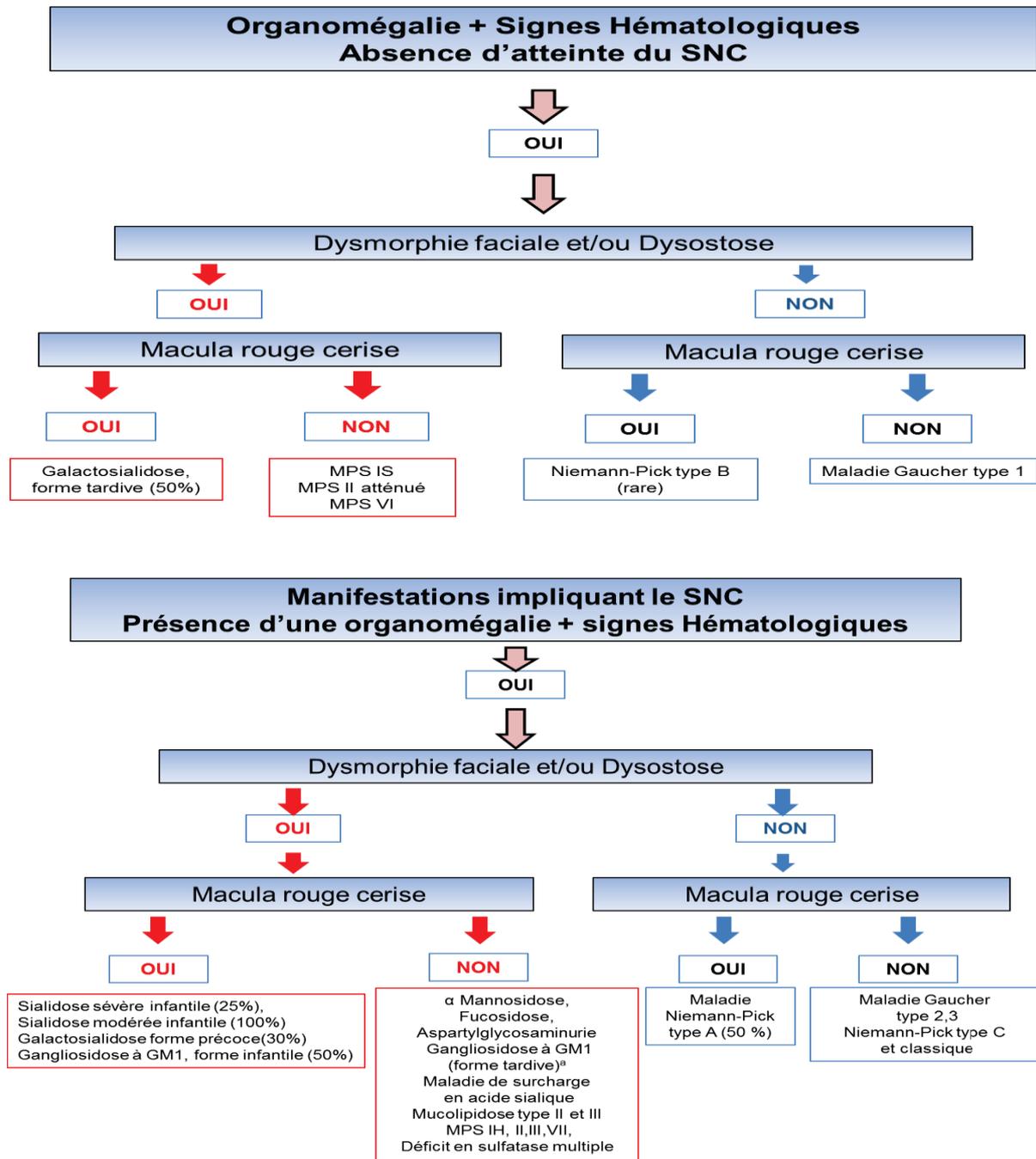


Figure 4: Approche diagnostique de certaines MLS à présentation pédiatrique. Adapté d'après Astarita *et al.* ⁴⁷

Ce logigramme diagnostique repose sur l'association de quatre signes cardinaux observés dans les MLS, c'est-à-dire, l'atteinte du SNC, l'organomégalie, le phénotype d'Hurler (dysostose et/ou dysmorphie faciale) et les manifestations hématologiques (sang périphérique ou myélogramme). La présence d'une atteinte oculaire de type macula rouge cerise est considérée secondairement. Lorsqu'il est indiqué, le chiffre entre parenthèse témoigne de la variabilité clinique de chaque maladie et indique la fréquence de chaque forme.

a: absence d'organomégalie

D'autres auteurs préfèrent réunir les MLS au sein de quatre grands phénotypes cliniques ⁴⁸ :

- 1) **Le phénotype « dysmorphique »** : Il est caractérisé par la présence d'une dysmorphie faciale progressive, d'une dysostoses multiples et/ou de manifestations cutanées, il regroupe les glycoprotéinoses, les mucopolysaccharidoses, certaines lipidoses (Maladie d'Austin, de Farber, de Landing, de Niemann-Pick A et de Salla), les maladies de Chediak-Higashi et de Papillon-Lefèvre.
- 2) **Le phénotype « moteur »** : Il existe soit une atteinte neuromusculaire comme dans les maladies de Pompe et Danon ou un tableau neurodégénératif évolutif telle que la maladie de Salla (la MPS IV) et les lipidoses.
- 3) **Le phénotype « comportemental »** : Il est marqué par une déficience ou une régression intellectuelle et des troubles de comportement comme dans les maladies de Sanfilippo, l'aspartylglucosaminurie et les formes juvéniles des lipidoses.
- 4) **Le phénotype « épileptique »** : Une épilepsie myoclonique est observée dans la plupart des céroïde-lipofuscinoses, les sialidoses, la maladie de Schindler et de Niemann-Pick C. Elle peut survenir également dans les formes sévères de la maladie de Gaucher de type III.

Les symptômes observés dans les MLS sont caractérisés par leur nature progressive, permanente, sans fluctuations ni lien avec les affections intercurrentes ou l'alimentation. Ceci va, ainsi, permettre de distinguer les MLS des autres maladies métaboliques de type « intoxication » ou « déficit énergétique ».

Il est également important d'évoquer le diagnostic d'une MLS dans le cadre d'échecs répétés de grossesse. En effet, une présentation anténatale sous forme d'anasarque fœto-placentaire est fréquente pour certaines MLS ³¹. À titre d'exemple nous pouvons citer la MPS I, VII, IVA, les maladies de Niemann-Pick A et C, la maladie de Gaucher de type 2 et la gangliosidose à GM1.

Dans ce cadre, il faut penser au prélèvement du liquide amniotique (et sa bonne conservation) afin de réaliser les explorations biologiques nécessaires.

2.6. Diagnostic biologique

La difficulté de diagnostic des MLS provient de leur extrême hétérogénéité, à la fois biochimique, et moléculaire. Il existe grande variabilité clinique pour un même déficit enzymatique (ex : MPS I). De plus, pour un phénotype donné, plusieurs déficits enzymatiques peuvent être rapportés (ex : MPSIII), et d'autres voies métaboliques peuvent être perturbées (mitochondrie, peroxyosome) ³¹. Une démarche rationnelle est nécessaire pour aboutir au diagnostic d'une MLS, sans multiplier des analyses le plus souvent très coûteuses. Elle repose sur un examen clinique et para-clinique approfondie, suivi de la mise à contribution, d'une bonne collaboration entre le clinicien et le biologiste, afin de choisir les

tests biologiques adéquats. Les renseignements cliniques et para-cliniques sont également indispensables pour une meilleure expertise biologique du résultat.

A. Diagnostic non biochimique

1) Analyse hématologique

Si le diagnostic des MLS est principalement biochimique, la mise en évidence d'anomalies morphologies caractéristiques des cellules sanguines ou médullaire, peut permettre un dépistage rapide et une aide précieuse dans l'orientation diagnostique.

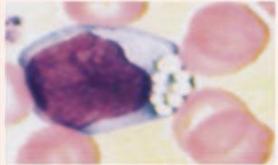
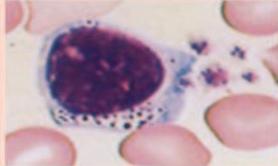
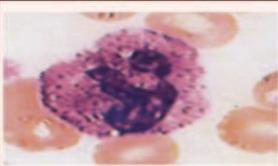
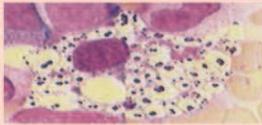
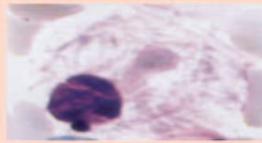
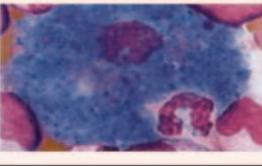
La lecture minutieuse du frottis sanguin ou médullaire d'un patient souffrant d'une MLS peut révéler de multiples anomalies cytologiques ⁴⁹. Elles peuvent concerner les lymphocytes, les polynucléaires, les histiocytes ou les plasmocytes.

La **Figure 5** répertorie les anomalies les plus fréquentes et les maladies visées. Ces anomalies sont parfois caractéristiques, comme les plasmocytes de Buhot dans les MPS. Toutefois, la majorité de ces cellules sont inconstantes, et plus au moins spécifiques, car elles sont également rencontrées dans des pathologies acquises.

2) Analyse anatomopathologique

L'analyse des tissus pour examiner le matériel de surcharge est un examen qui peut être intéressant. Les biopsies des tissus périphériques, en particulier cutanées et conjonctivales, les moins traumatiques, sont parfois utilisées. L'accès à l'ultrastructure cellulaire par la technique de microscopie électronique, peut révéler la présence d'une surcharge et une perturbation de la structure cellulaire, ce qui peut orienter vers une MLS ⁵⁰. Ces examens peuvent être réalisés sur des biopsies notamment cérébrales en post mortem.

Figure 5 : Principales anomalies cytologiques rencontrées dans les MLS. adaptée d'après Maier-redelsperger et Fenneteau ⁴⁹

Anomalies cytologiques	Photos	Définitions	MLS concernées
Hemogramme			
Lymphocytes vacuolés		La plus fréquente mais la moins spécifique des anomalies , Lymphocytes avec des vacuoles intracytoplasmiques, optiquement vides, de taille et de nombre variable 5 à 80 % des lymphocytes peuvent être atteints.	Trouvé dans la plus part des MLS. Gangliosidose à GM1 et GM2 Maladie de Niemann-Pick, Fabry, Farber, Wolman. MPS I, II, III, IV, La plus part des oligosaccharidoses Mucopolidose type II et III Sialidose
Lymphocyte de Gasser		Lymphocyte vacuolé dont les vacuoles sont centrés par une inclusion plus ou moins volumineuse, de teinte violet noir à la coloration de May-Grünwald-Giemsa	Caractéristique des différents types de mucopolysaccharidoses (MPS), except le type IV (maladie de Morquio), Maladie d'Austin Gangliosidose à GM1
Anomalie d'Alder		Les granulations sont plus nombreuses et plus volumineuses que la normale ou atypiques : granulations de teinte anormale, violacée, rouge, rose ou grise. L'anomalie est présente dans les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles.	Elle traduit la surcharge en mucopolysaccharides des granulations primaires des éléments de la lignée granuleuse Elle s'observe dans les MPS, essentiellement de type VI.
Myélogramme			
Histiocytes de Gasser		Le cytoplasme est rempli de nombreuses granulations de couleur violet noir à la coloration de May-Grünwald-Giemsa, de taille variable, incluses ou non dans des vacuoles.	Idem que les lymphocyte de Gasser MPS Maladie d'Austin Gangliosidose à GM1
Histiocytes vacuoles		Cytoplasme rempli de vacuoles de taille variable, leur donnant un aspect « spumeux ».	Niemann-Pick de type A Mucopolipidoses Oligosaccharidoses (mannosidose, maladie Pompe) A différentier des histiocytoses réactionnelles (états infectieux, inflammatoires,...) ayant une morphologie généralement plus polymorphe
Histiocytes de Gaucher		Cytoplasme grisâtre, strié, avec inclusions incolores, fibrillaires et curvilignes.	Très évocatrice de la maladie de Gaucher. Trouvé aussi dans certaines pathologies acquises avec (leucémie myéloïde chronique, infection par le VIH...).
Histiocyte bleu		Cytoplasme rempli de granulations colorées en bleu intense à la coloration de May-Grünwald-Giemsa. Il est de contour souvent irrégulier. Les granulations peuvent être fines et dispersées, coexistant avec des vacuoles et des images de phagocytose	En grand nombre, elle évoque la maladie de Niemann-Pick de type B Elles reflètent le débordement des capacités de dégradation des macrophages. Elles sont également retrouvées dans des pathologies acquises (PTI, hémolyses constitutionnelles).
Plasmocyte de Buhot		Plasmocyte vacuolé dont les vacuoles contiennent une inclusion violet foncée à la coloration de May-Grünwald-Giemsa, de forme variée.	Signe une MPS, plus particulièrement de type III (maladie de Sanfilippo).

B. Diagnostic biochimique

Une stratégie en deux temps est souvent adoptée, avec l'utilisation en première intention de tests dits de « dépistage » ou de « *screening* ». Ces tests vont permettre d'étudier, en un seul examen, plusieurs hypothèses diagnostiques, et indiquent l'appartenance du patient à un groupe donné de MLS (oligosaccharidoses, mucopolysaccharidoses..).

En cas d'un dépistage positif, une confirmation par des examens plus spécifiques, basés sur l'étude de l'activité enzymatique et/ou de biologie moléculaire, est réalisée.

1) Tests de dépistage

Ils reposent classiquement sur l'identification et/ou la quantification des oligosaccharides en cas de suspicion d'une oligosaccharidose, et des GAG en cas de mucopolysaccharidose. Cependant, d'autres examens de dépistage, plus spécifiques de certaines MLS, peuvent être pratiqués. La concentration de ces métabolites dans les urines et la facilité relative de leurs recueils font des urines un prélèvement de choix pour ces dépistages

a) Oligosaccharides urinaires.

L'étude des oligosaccharides urinaires, est basée uniquement sur l'analyse qualitative des profils obtenus par la technique de chromatographie en couche mince *high-performance thin-layer chromatography* (HPTLC). Elle permet de reconnaître le profil caractéristique d'une pathologie donnée (aspartylglucosaminurie, GM1-gangliosidose, GM2-gangliosidose, sialidose, galactosialidose, fucosidose, α -mannosidose, etc..). Cette technique est simple, et peu coûteuse mais son interprétation est délicate et les interférences alimentaires et médicamenteuse sont nombreuses.

b) GAG urinaires

L'étude des GAG urinaires, comporte une analyse qualitative et une autre quantitative. La quantification est réalisée par différentes techniques colorimétriques, notamment celle utilisant l'harmine ou le bleu de diméthylméthylène (DMB) ⁵¹. La technique à l'harmine permet de quantifier l'acide hexuronique contenus dans les GAG. Le DMB réagit avec les GAG pour former un complexe GAG-DMB qui absorbe à 535 nm ⁵². La technique au DMB, actuellement la plus utilisée ⁵¹, est disponible sur automate car elle peut s'affranchir de l'étape de purification ⁵³. Toutefois, ces dernières années, de nouvelles méthodes analytiques, de type ELISA ⁵⁴ ou de spectrométrie de masse ⁵⁵⁻⁵⁷, ont été développées pour déterminer, de façon plus spécifique, la concentration des GAG urinaires ou sériques. Les résultats de dosage des GAG sont rapportés aux concentrations de la créatinine, et exprimés en fonction de l'âge des patients. Les concentrations sont généralement augmentées dans la plupart des mucopolysaccharidoses. Cependant, la concentration des GAG diminue avec l'âge chez les patients atteints de mucopolysaccharidoses et il est donc possible de ne pas faire le diagnostic avec

cette approche dans ce cas^{53,58}. L'analyse qualitative est effectuée par des techniques d'électrophorèse le plus souvent unidirectionnelle⁵¹. Elle permet de séparer quatre types de GAG : chondroïtine sulfate, kératane sulfate, dermatane sulfate et héparane sulfate. Dans les situations physiologiques, seule la chondroïtine sulfate est détectable. Cependant, chez les nouveau-nés une bande d'héparane sulfate peut être objectivée¹. En fonction des fractions surnuméraires retrouvées en électrophorèse, une orientation diagnostique est proposée. Le **Tableau 1** rapporte les molécules accumulées dans chaque type de mucopolysaccharidoses.

Tableau 1 : Métabolites accumulés dans les MPS. Tableau adapté d'après Bekri¹

Pathologies	Phénotype Biochimique
MPS I / Syndrome de Hurler syndrome Syndrome de Scheie	Dermatane sulfate / Héparane sulfate
MPS II / Syndrome de Hunter	Dermatane sulfate / Héparane sulfate
MPS III A / Syndrome de Sanfilippo	Héparane sulfate
MPS III B / Syndrome de Sanfilippo	Héparane sulfate
MPS III C / Syndrome de Sanfilippo	Héparane sulfate
MPS III D / Syndrome de Sanfilippo	Héparane sulfate
MPS IV A / Syndrome de Morquio	Kératane sulfate
MPS IV B / Syndrome de Morquio	Kératane sulfate / Chondroïtine 6-sulfate
MPS VI / Syndrome de Maroteaux-Lamy	Dermatane sulfate
MPS VII / Syndrome de Sly	Dermatane sulfate / Chondroïtine 4,6-sulfates
MPS IX	Hyalurane

c) Tests indirects utilisés dans quelques MLS

Il n'est pas possible ici de faire une revue exhaustive de tous les tests indirects proposés, ou utilisés pour la caractérisation des MLS. Nous citons quelques exemples :

L'analyse des sulfatides dans les urines est pratiquée en cas d'investigation pour une leucodystrophie métachromatique, et l'augmentation de l'excrétion urinaire de l'acide sialique, est recherchée dans la maladie de surcharge en acide sialique libre (et sa forme modérée : la maladie de Salla). La créatine kinase (CK) est souvent élevée dans la maladie de Pompe⁵⁹.

D'autres métabolites ou protéines sériques dits « biomarqueurs » peuvent être utilisés. En effet, la mesure de l'activité de la chitotriosidase, une enzyme produite en grande quantité par des macrophages activés par la surcharge cellulaire, est indiquée dans le diagnostic de la maladie de Gaucher. Cependant, cette activité est aussi augmentée dans d'autres maladies lysosomales mais à des niveaux beaucoup moins importants que dans la maladie de Gaucher⁶⁰. Il est à noter que 5% de la population générale présente une insertion de 24 paires de bases dans les séquences de gènes codant

pour la chitotriosidase. Cette mutation entraîne une inactivation de la protéine et rend ce marqueur non informatif¹.

d) Tests globaux de dépistages

La stratégie consistant à rechercher un biomarqueur diagnostique commun et spécifique de toutes les MLS, tel que les LIMP ou les saposines, a échoué. En effet, l'augmentation des concentrations de ces composés est retrouvée chez de nombreux patients atteints de MLS n'est pas systématique, ce qui rend cette approche impropre pour le screening de masse. Des travaux de recherche supplémentaires doivent être poursuivis pour déterminer un tel marqueur.

2) Tests de confirmation

Une confirmation par la mesure de l'activité enzymatique et/ou par l'étude moléculaire, est obligatoire en cas d'un test de dépistage positif.

En effet, elle permet de :

- Préciser la pathologie à l'origine des anomalies retrouvées lors de l'étude des oligosaccharides urinaires.
- Valider les anomalies détectées par l'analyse des GAG urinaires, en excluant particulièrement des résultats faussement positifs. Ce type de résultats est observé dans certaines maladies rénales, la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé, ou l'énurésie nocturne^{53,61}. Il peut également être induit par l'interférence de substances comme héparine ou l'hémoglobine libre.
- Vérifier sur un prélèvement sanguin ou sur biopsie tissulaire, l'anomalie trouvée sur papier buvard ou au niveau urinaire.
- Poser directement le diagnostic de certaines MLS ou solutionner des cas dits « à problème ».

a) Analyse de l'activité enzymatique

La mesure de l'activité des enzymes lysosomales est effectuée le plus souvent par des méthodes fluorimétriques sur des leucocytes, des fibroblastes ou sur d'autres biopsies tissulaires. L'activité d'une autre enzyme lysosomale est évaluée en parallèle pour contrôler l'intégrité de la cellule et assurer ainsi la spécificité du résultat obtenu¹. Des méthodes de dosage des activités enzymatiques des hydrolases en multiplex par spectrométrie de masse en tandem ont été récemment décrites. Ces techniques seront développées dans le paragraphe screening néonatal.

Dans les MLS, l'activité enzymatique concernée est basse voire indétectable. Une corrélation, qui est loin d'être prédictive, est parfois rapportée entre le niveau de l'activité résiduelle de l'enzyme et la sévérité du phénotype ou l'âge de la survenue des symptômes⁶².

L'activité enzymatique *in vitro* peut être abaissée, surtout en cas d'utilisation de sérum ou du plasma, chez des individus indemnes de MLS. Cette situation est nommée « pseudo-déficit enzymatique ». Ce

cas de figure n'est pas limité aux enzymes lysosomales et il peut être à l'origine d'erreurs particulièrement dramatiques. En effet, des pseudo-déficits ont été décrits pour 9 enzymes lysosomales : arylsulfatase A, hexosaminidases A et B, galactocérébrosidase, α -galactosidase A, β -glucuronidase, α -iduronidase, α -glucosidase et α -fucosidase^{31,63}. Si la plupart d'entre eux sont rares, le pseudo-déficit en arylsulfatase A, est en revanche très fréquent dans la population générale avec une prévalence de l'ordre de 7 à 22%⁶⁴. Ce qui peut parfois nécessiter le recours à des techniques de biologie moléculaire pour poser le diagnostic

b) Étude moléculaire

La recherche de mutations se fait généralement par séquençage de l'ADN génomique (promoteur, exons, jonctions intro-exon). Certains laboratoires utilisent l'ADN complémentaire comme matrice de séquençage, cette approche permet d'identifier les mutations faux-sens exoniques, mais cette technique est peu ou pas praticable en cas de mutation non-sens ou de mutations complexes. Certaines mutations comme les grandes délétions ou insertions ne sont pas détectables par séquençage, dans ce cas d'autres techniques doivent être mise en œuvre (MLPA : *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* ; QMPSF : *Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescence Fragments*).

L'impact sur la fonction protéique doit être documenté pour toute variation nucléotidique identifiée. Cette démarche permettra de qualifier la mutation comme étant délétère le cas échéant et de définir ainsi les bases moléculaires de la pathologie chez le patient. La première étape consiste à étudier la fréquence de cette variation dans la population générale, en effet, une variation trouvée fréquemment est probablement non délétère et peut être qualifiée de polymorphisme (fréquence dans la population générale > 1%). La deuxième étape consiste à étudier ou évaluer, grâce à des sites de prédiction, l'impact sur la fonction protéique. Ces sites sont surtout utilisés pour l'analyse des mutations faux-sens dont l'interprétation est plus difficile. Les sites les plus communément utilisés sont :

PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), GVGd (<http://agvgd.iarc.fr>)

SIFT (<http://sift.jcvi.org>) et Mutation Taster (<http://neurocore.charite.de/MutationTaster/index.html>).

À l'exception de quelques populations (Finlandaise, Juive d'ashkénazes), la majorité des mutations retrouvées dans les MLS, sont peu fréquentes, voire de type « privées ». L'existence en plus de nombreux polymorphismes, a limité l'approche du diagnostic par l'étude de l'ADN (et/ou ARN)⁶⁵. Cependant, La biologie moléculaire constitue un recours indispensable pour le diagnostic des déficits en activateurs ou en protéines non lysosomales (notamment en cas de clinique très évocatrice de sphingolipidoses avec une étude enzymatique normale). De plus, elle est souvent primordiale pour les études familiales, le diagnostic post mortem, le diagnostic prénatal (cas particuliers avec problèmes de pseudo-déficit ou déficit en activateur...), et la recherche d'une corrélation génotype-phénotype.

L'analyse moléculaire peut se révéler fondamentale pour le diagnostic des maladies liées à l'X chez la femme (maladies de Fabry, Hunter, Danon), en effet, le dosage de l'activité enzymatique des femmes conductrices n'est pas toujours informatif à cause de l'inactivation aléatoire du chromosome X.

Les essais de corrélation génotype-phénotype sont compliqués par l'extrême hétérogénéité moléculaire affectant les MLS. De plus, la fréquence élevée d'hétérozygotes composites dans la plupart des MLS sont une autre source de difficulté.

Néanmoins, l'analyse de corrélation entre le génotype et le phénotype a été rapportée dans plusieurs MLS et pourrait être décisive pour choisir l'option thérapeutique appropriée dans certains cas ^{66,67}. Des registres internationaux répertorient les cas des MLS et constituent des outils pour compléter les études de corrélation génotype-phénotype.

3) Dépistage néonatal des MLS

La disponibilité récente de traitement spécifique de certaines MLS rend légitime la mise en place d'un programme de dépistage néonatal de ces pathologies. Les progrès techniques spectaculaires réalisés en spectrométrie de masse permettent d'envisager l'extension du dépistage néonatal à certaines maladies métaboliques de type MLS. En effet, le principe de l'analyse repose sur l'utilisation du sang total du nouveau-né prélevé sur un papier buvard. L'extraction des enzymes lysosomales à partir de sang séché sur papier buvard est effectuée en présence de leurs substrats synthétiques spécifiques. Puis, l'analyse des produits issus du catabolisme de ces substrats, est réalisée par spectrométrie de masse (SM). La SM a été utilisée pour le dépistage de la MPS I ⁶⁸. Récemment, un essai direct multiplex a été mis au point pour le dépistage néonatal de cinq MLS : les maladies de Krabbe, Pompe, Fabry, Gaucher et Niemann–Pick A/B ⁶⁹. La faisabilité en pratique clinique d'un screening néonatal a été dernièrement évaluée en Italie ⁷⁰.

L'intérêt de ces programmes serait de pouvoir modifier complètement l'évolution naturelle de la maladie, en proposant des interventions, et une prise en charge thérapeutique précoce à des patients qui sont asymptomatiques ou paucisymptomatiques. D'ailleurs, certaines options thérapeutiques, comme la transplantation de cellules souches hématopoïétiques dans la MPS I ne sont parfois bénéfiques que si elles sont pratiquées avant la survenue de lésions neurologiques irréversibles.

3. Mucopolysaccharidose de type I

3.1. Définition

Les mucopolysaccharides ou glycosaminoglycanes sont des composants majeurs des matrices extracellulaires et du tissu conjonctif (os, cartilage milieu de transport de l'œil, paroi artérielle).

Les mucopolysaccharidoses (MPS) sont des MLS caractérisées par un défaut de dégradation des GAG. Elles sont attribuées aux déficits enzymatiques affectant les différentes hydrolases, qui interviennent au niveau de l'une des étapes du catabolisme de ces macromolécules. En effet, 11 types de MPS sont identifiés : cinq sulfatases (MPS II, MPS IIIA, MPS IIID, MPS IVA et MPS VI), cinq glycosidases (MPS I, MPS IIIB, MPS IVB, MPS VII et MPS IX), et une acétyltransférase (MPS IIIC).

La **Figure 6**, présente l'ensemble de processus de dégradation de divers GAG (dermatane, héparane, kératane sulfate), et précise l'anomalie rapportée dans chaque MPS.

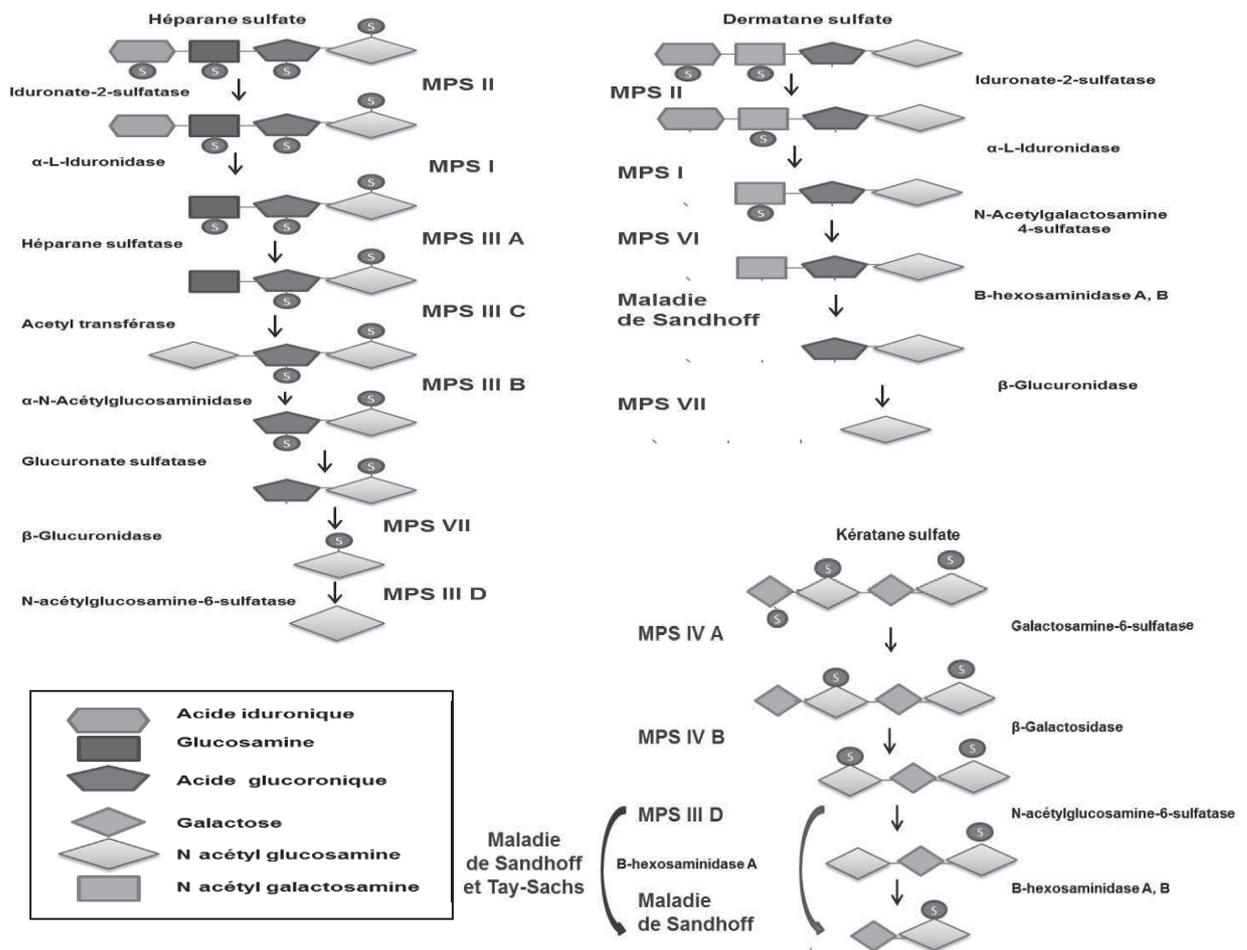


Figure 6 : Catabolisme des GAG

Les trois schémas présentent les différentes étapes et enzymes impliquées dans la dégradation de 3 types de GAG : héparane, dermatane et kératane sulfate.

Les mucopolysaccharidoses concernées par la perturbation de ce catabolisme sont indiquées ainsi que les maladies de Sandhoff et Tay-Sachs.

La MPS I est un parfait prototype de MPS, elle est due à un déficit en α -L-iduronidase, une glucosidase qui assure le clivage des résidus d'acide iduronique de l'extrémité terminale des protéoglycanes de type héparane sulfate (HSu) et dermatane sulfate (DSu). Ce défaut enzymatique va engendrer une accumulation de ces composés.

3.2. Histoire de la maladie

Les premiers cas de gargoylisme^a sont rapportés par John Thompson (entre 1910-1913) et Charles Hunter (en 1917). Ce syndrome regroupant, une dysmorphie faciale, une petite taille, un cou étroit, des mains courtes, une hépatosplénomégalie, la présence d'une hernie ombilicale et des anomalies cardiaques, a finalement été accordé au médecin canadien (sous le nom de la maladie de Hunter ou MPS II). Deux ans plus tard, en 1919, le pédiatre allemand Hurler, a observé deux cas similaires (un garçon et une fille). Toutefois, ces deux enfants sont caractérisés par un gibbus^b, une opacité cornéenne et un retard mental. C'étaient les premiers cas décrits de MPS I ou la maladie de Hurler.

Plusieurs termes, sont ensuite utilisés pour décrire ce nouveau syndrome : Hurler a suggéré le nom de dysostose multiple (*dystosis multiplex*), alors qu'Ellis a utilisé le terme de gargoylisme.

Pensant qu'il s'agit d'un trouble du métabolisme lipidique, Washington a désigné ce syndrome de lipochondrodystrophie. Par la suite, la physiopathologie a été attribuée à d'autres troubles métaboliques, comme ceux affectant la réserve en glycogène ou le collagène. Cependant, en 1952, après des études histologiques réalisées sur des biopsies hépatiques, le Dr G. Brante a constaté que les syndromes de Hurler et Hunter sont causés par l'accumulation cellulaire de mucopolysaccharides. Après la confirmation par Dorfman et Lorincz en 1957 et Meyer en 1958, de l'excès d'excrétion urinaire de mucopolysaccharides (DSu et HSu) chez les patients atteints de MPS I⁷¹, le terme de mucopolysaccharidose a remplacé les autres terminologies⁷².

En 1962, l'ophtalmologue britannique, Harolde Scheie a décrit une forme modérée de MPS I, exempte de l'atteinte cérébrale qui caractérise le syndrome de Hurler. Cette forme a été désignée comme le syndrome de Scheie. En 1965, elle est qualifiée de MPS de type V par McKusick dans sa première classification des MLS (le syndrome de Hurler a été classé comme MPS de type I)⁷³.

^a Gargoysme : Issu du mot gargouille qui désigne des figures sculptées. Dans le domaine d'architecture, les gargouilles (Étymologie, la gorge ou l'œsophage, du latin, *gurgulio*, *gulia* et autres mots similaires dérivant de la racine *gar-*, par allusion au glouglou de l'eau) sont des ouvrages sculptés d'évacuation des eaux de pluie des toitures. Dans le domaine de la légende, la Gargouille est un dragon qui vivait dans les marécages de la Seine près de Rouen.

^b Gibbus : Forme de cyphose structurale faisant référence à la forme d'un poisson : le vivaneau bossu (*Lutjanus gibbus*)

En 1964, alors qu'on pensait qu'une surproduction de GAG était à l'origine de ces deux syndromes, Hoof et Hers ont observé sur les hépatocytes issues de patients atteints de MPS I des troubles lysosomales analogues à la maladie de Pompe. Ils ont alors supposé une cause étio-pathogénique identique à la maladie de Pompe, c'est-à-dire, un déficit en hydrolase lysosomale.

Effectivement, Her, en 1963, et 7 ans après la découverte du lysosome, a montré que le déficit en α -glucosidase lysosomale, est à l'origine de la maladie de Pompe. Cette notion de déficit en enzyme lysosomale dans la MPS I a par la suite été démontrée. En effet, en 1965, Danes et Bearn, ont constaté une accumulation de GAG sur des cultures de fibroblastes issues de patients atteints des maladies de Hunter et Hurler. Une correction de cette perturbation est observée, en 1968, par l'équipe dirigée par Elisabeth Neufeld^a sur des cultures combinées (fibroblastes Hunter + Hurler).

Le déficit enzymatique des patients Hurler pouvait donc être corrigé par un « facteur de correction », présent chez les patients Hunter, et *vice versa*. En 1971, Neufeld *et al* ont identifié ce facteur comme étant des enzymes lysosomales, déficientes dans chaque type de maladie. Cette équipe a identifié le déficit en α -L-iduronidase comme cause du syndrome de Hurler puis découvert que ce déficit enzymatique est commun avec le syndrome de Scheie. En 1972, McKusick, a subdivisé alors la MPS I en 3 catégories cliniques : MPS IH (syndrome de Hurler), MPS IS (syndrome de Scheie) et MPS IH/S (syndrome intermédiaire) ⁷¹. Les progrès réalisés en biologie moléculaire, ont permis par la suite entre 1991 et 1993 à Scott d'isoler l'ADNc du gène *IDUA* ⁷⁴ puis de réaliser son séquençage et d'identifier les premières mutations (p.W402X, p.Q70X, p.P533R) responsables de la MPS I ⁷⁵. Une année plus tard, en 1994, Neufeld et son équipe ont procédé à la synthèse de l' α -L-iduronidase recombinante dans des cellules de hamster chinois (CHO) ⁷⁶. Après le succès de l'enzymothérapie substitutive dans la maladie de Gaucher, l'équipe de Neufeld a montré l'efficacité de cette stratégie dans la MPS I, d'abord sur des modèles animaux (canin ⁷⁷, et félin ⁷⁸), puis en 2001, grâce à des essais cliniques de phase I/II ⁷⁹. Depuis 2003, l' α -L-iduronidase recombinante est commercialisée par la société Genzyme, sous le nom de la spécialité ALDURAZYM[®] (Laronidase). L'AMM concerne le traitement des manifestations non neurologiques de la MPS I. En avril 2003, avant même la mise sur le marché, de ce nouveau médicament, la société Genzyme avait créé un registre international (RIG) pour la MPS I (www.mpsiregistry.com). Il regroupe actuellement des données cliniques et thérapeutiques d'environ 1000 patients issus d'une trentaine de pays.

^a Elizabeth Neufeld (née en 1928): Généticienne américaine, d'origine russe dont recherches sont axées sur la génétique des maladies métaboliques. Elle a fui Paris en 1940 pour échapper à la percusion nazie. Elle a eu plusieurs distinctions dont notamment le *Albert Lasker Award for Clinical Medical Research*, en 1994, pour sa contribution à la compréhension des MLS, et la démonstration de lien fort entre sa recherche fondamentale et les applications cliniques dans la MPS I.

3.3. Épidémiologie

La prévalence exacte de la MPS I est difficile à obtenir à partir des ressources épidémiologiques disponibles son estimation varie considérablement selon les pays. En effet, les études réalisées sont hétérogènes quant à leur méthodologie et il existe souvent une confusion entre incidence et prévalence et/ou entre incidence à la naissance et incidence dans la population générale. En 2012, l'estimation de la prévalence de la MPS I en Europe faite à partir de l'étude systématique des données de la littérature est d'environ 1.3/100 000 ⁸⁰. La prévalence varie généralement entre 0,63 et 3,8 cas pour 100 000 naissances. Avec près d'un cas sur 26 000 au pays de Galle, à moins d'un 1 cas pour 900 000 naissances en Taiwan. Aucun cas n'est retrouvé dans une étude récente en Estonie ⁸¹. Cinquante à 80% des patients présentent une forme sévère, la forte proportion de ce phénotype dans ces différentes populations étudiées, serait en partie attribuable à un biais de sélection ; en effet, les formes graves sont plus facilement diagnostiquées.

Les résultats de différentes études de prévalence, en fonctions des pays, sont rapportés sur le **Tableau 2**. En France, en absence d'études épidémiologiques, le nombre de cas de MPS I a été estimé en 2007 entre 100 et 150 cas dans le rapport de la Haute Autorité de Santé (HAS) : le Protocole National de Diagnostic et De Soins De la MPS I. Le calcul de la prévalence à partir des données de l'INSEE sur la démographie de la population française de la même année trouve une estimation de 0.2 /100 000 habitants. L'incidence rapporté par la HAS est de de 8 à 10 nouveaux cas par an ⁸². Dans le registre international de MPS I Genzyme (RIG) 63 cas français sont enregistrés en 2010 ⁸³.

Tableau 2 : Incidence à la naissance des MPS I dans certains pays.

Pays	Années	Prévalence 1/100000			Référence
		IH	IS	I H/S	
Australie*	2012	1,14	0,2	0,87	84
Taiwan	1984-2004	0,06	0,02	0,03	85
Irlande	2001-2006	3,2	0,12	0,49	86
République Tchèque	1979-2009	0,7	NP	NP	87
Slovaquie	1979-2010	1,32	NP	NP	87
Suède	1975-2004	0,67	NP	NP	88
Norvège	1975-2004	1,85	NP	NP	88
Danemark	1975-2004	0,54	NP	NP	88
Colombie	1952-1986	0,69	0,08	NP	89
Irlande	1958-1985	1,3	0	0,36	89
Pays-Bas	1970-1996	1,19	NP	NP	89
Allemagne	1980-1995	0,61	0,05	0,03	89
Grande Bretagne	1981-2003	0,76	0,07	0,24	89
Oman	1998-2007	0,744	NP	NP	90

NP : non précisé ; * Prévalence dans la population générale.

3.4. Présentation clinique

Classiquement, la MPS I est présentée sous trois grandes catégories cliniques : une forme sévère, définie par un retard mental majeur et des signes précoces correspondant à la maladie de Hurler (MPS IH; OMIM 607014), une forme modérée, sans atteinte intellectuelle, appelée la maladie de Scheie (MPS IS; OMIM 607016), et une forme intermédiaire, désignée par le syndrome de Scheie-Hurler (MPS IH/S; OMIM 607015). En réalité, il existe un continuum de présentation clinique entre les phénotypes sévères et les formes modérées. Il est préférable maintenant d'utiliser les termes de MPS de type I avec régression psycho-intellectuelle ou « forme sévère » et de MPS I sans cette régression ou « formes atténuées »⁹¹. Actuellement, il n'y a aucun marqueur biologique ou critère clinique validés susceptibles de différencier ces 2 formes.

Les signes cliniques évocateurs de la maladie apparaissent généralement dans les deux premières années de vie, et le diagnostic doit être évoqué devant l'association de signes souvent non spécifiques et pouvant être à l'origine d'un retard diagnostic, ces symptômes sont :

- Présence d'hernie inguinale et /ou ombilicale chez un nourrisson né à terme.
- Encombrement rhino-pharyngé chronique avec infections rhinopharyngées et bronchiques répétées ou otites.
- Retard staturo-pondéral.
- Diarrhées chroniques.
- Cyphose dorsolombaire.
- Enraidissement articulaire progressif.
- Modification progressive de la morphologie faciale.

En absence de traitement, le tableau clinique décrit classiquement des manifestations chroniques, progressives avec des atteintes multi-systémiques^{48,91,92} :

Dysmorphie caractéristique :

Elle comporte une macrocranie, saillie des bosses frontales et scaphocéphalie, sourcils bas implantés et épais, cheveux hirsutes, courbure nasale marquée avec des narines larges et antéversées, lèvres épaisses, macroglossie, hyperplasie gingivale, cou court, membres trapus, extrémités très courtes, abdomen proéminent et hypotonique, hernie ombilicale, avec une hépatosplénomégalie. La **Photo 1** présente la dysmorphie faciale observée chez une petite fille atteinte de MPS I.

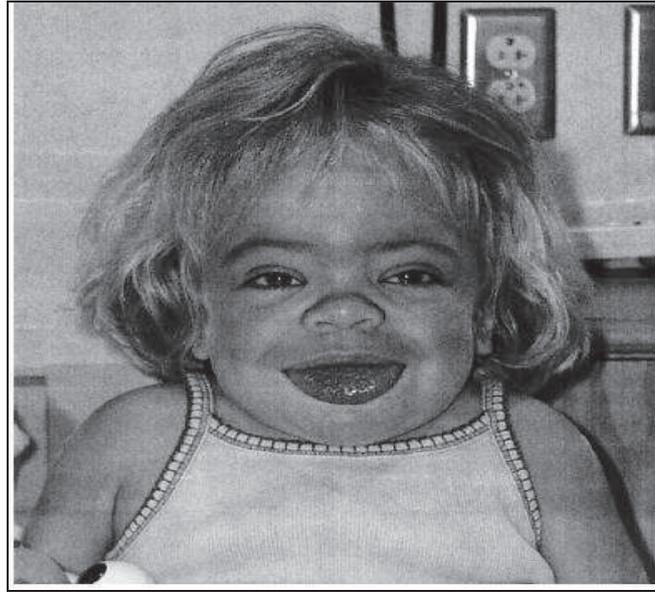


Photo 1 : Dysmorphie faciale d'une fille atteinte de la MPS I.

Photo tirée de l'article de Muenzer *et al.* ⁹³

Retard de croissance staturo-pondérale :

La croissance staturo-pondérale est normale au cours des deux premières années de vie, une cassure progressive de la croissance est ensuite notée, aboutissant à un nanisme sévère avec une taille inférieure à 1,60 mètre. Ce retard de croissance est dû d'une part à une diarrhée chronique provoquée par l'atteinte du système nerveux autonome et l'infiltration de la muqueuse digestive par les GAG et d'autre part à l'atteinte osseuse.

Manifestations respiratoires :

L'infiltration progressive des différentes muqueuses (tissu adénoïdien, l'arrête trachéobronchique, amygdales) est responsable d'un encombrement nasale, avec rhinorrhées et rhinites chroniques. La respiration est alors bruyante, avec bouche ouverte. Les infections récidivantes des voies aériennes supérieures vont conduire à terme à l'apparition d'un syndrome respiratoire obstructif et un syndrome d'apnée-hypopnée du sommeil. Au niveau pulmonaire, la pneumopathie interstitielle est responsable d'un syndrome restrictif, cette insuffisance respiratoire est compliquée par un défaut de distension de la cage thoracique à cause de l'organomégalie. L'ensemble de ces troubles respiratoires combinés aux anomalies cardiaques, font des patients MPS I, des sujets à grand risque aux complications anesthésiques ⁹⁴.

Anomalies cardiaques :

Ce type d'anomalies est très fréquent (70 à 80% des cas). Elles comportent initialement un épaissement des valves aortiques et mitrales, qui vont être à l'origine d'une insuffisance mitrale

et/ou aortique. Cette valvulopathie est très fréquente même dans les formes modérées, 60% des patients Scheie ont par exemple plus d'une valve atteinte⁹⁵.

Les lésions coronariennes sont responsables des maladies cardiaques ischémiques, comme les infarctus précoces du myocarde. D'autres complications cardiaques sont observées, telle une myocardiopathie hypertrophique du ventricule gauche, ou l'hypertension artérielle pulmonaire.

La moitié des décès des patients MPS I sont d'origine cardiaque⁹⁶. Dans ce contexte, il est important de savoir que l'ECG pratiqué chez un patient MPS I peut être parfaitement normal car les GAG ont une faible conductance. Le recours à des explorations échographiques est indispensable chez ces patients⁹⁷.

Manifestations ostéo-articulaires :

Elles sont extrêmement invalidantes, avec un enraidissement articulaire d'aggravation croissante (notamment au niveau du coude et genou), avec notamment une limitation importante des mouvements des épaules. Cet enraidissement touche également les articulations inter-phalangiennes et conduit à l'aspect typique de main en griffe (**Photo 2**).

L'enraidissement des chevilles est responsable d'une marche sur les pointes des pieds. L'enraidissement articulaire progressif peut constituer le seul signe d'alerte dans les formes les moins sévères. D'autres manifestations sont également décrites comme la luxation de hanche, ou la cyphoscoliose thoraco-lombaire, cette dernière quand elle est typique, est appelée le « signe de gibbus », c'est l'une des manifestations les plus précoces (à partir de l'âge de 6 mois) de la maladie.

La **Photo 2** présente une cyphose (signe de gibbus) et des mains en griffe rapportées chez la même fille atteinte de MPS I.

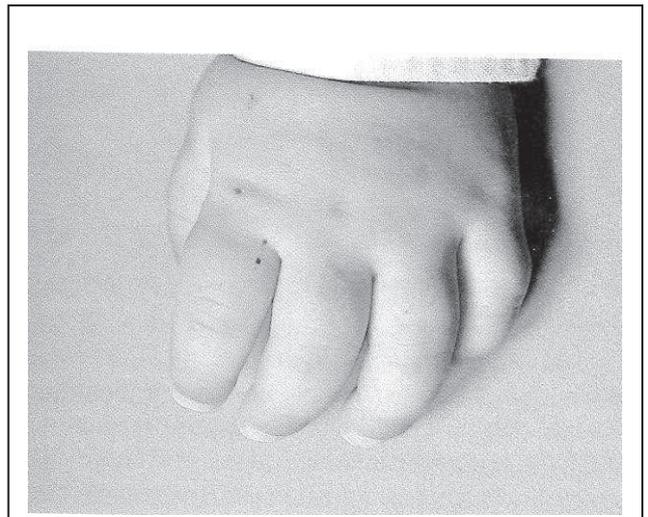
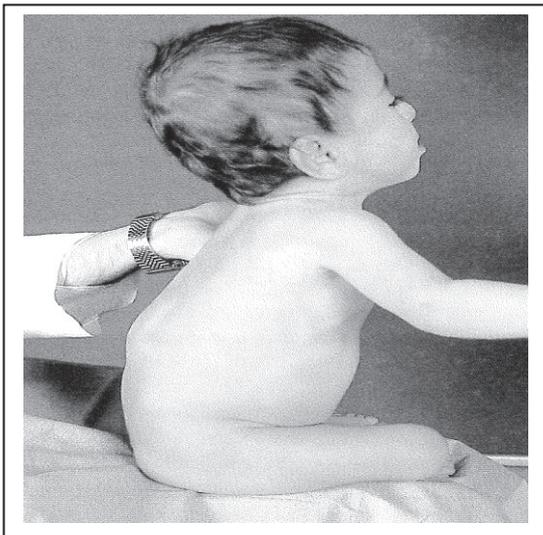


Photo 2 : Signe de gibbus (à Gauche) et mains en griffe (à droite) chez un garçon atteint de MPS I.

Photos tirées du livre Nyhan *et al.*⁹⁸

Le syndrome du canal carpien, lié à la compression du nerf médian par infiltration ligamentaire, est également une complication ostéo-articulaire fréquente et précoce. Il est responsable de douleurs, en particulier la nuit, entraînant des réveils nocturne chez l'enfant.

L'aspect radiologique caractéristique décrit le tableau d'une dysostose multiple avec un aspect ostéomalacique au niveau des os longs. Ces lésions radiologiques sont plus importantes dans les formes les plus sévères de la maladie.

Troubles auditives :

La surdité est quasi constante (70 à 100% des patients). Elle est généralement de type mixte, avec une composante liée aux otites récidivantes, et à l'encombrement chronique et une autre composante liée aux malformations osseuses et aux atteintes neurosensorielles.

Anomalies ophtalmologiques :

La cornée est un site de lésion fréquent, en effet, les GAG est l'un de ses composants principaux (4 à 4.5 % du poids total de la cornée, le kératane sulfate compte pour plus 50 % des GAG de la cornée). L'opacité cornéenne, est observée habituellement dans les formes sévères, elle s'aggrave au cours du temps et elle est responsable d'une photophobie et d'une perte progressive de l'acuité visuelle. En revanche, le glaucome (induit par l'infiltration du trabéculum) est plus fréquent dans les formes atténuées.

La **Photo 3** présente l'opacité cornéenne observée dans la MPS

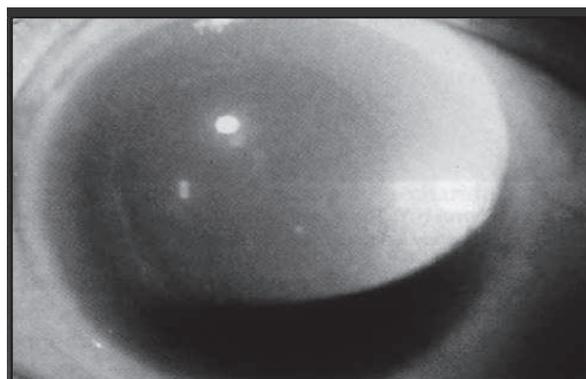


Photo 3 : Opacité cornéenne observée dans la MPS I

Photos tirées du livre de Nyhan *et al.* ⁹⁸

Troubles neurologiques :

L'impact de l'accumulation des GAG au niveau du SNC, sont divers : troubles de langage, détérioration neurosensorielles (auditives et ophtalmologiques) et retard intellectuel (vers 12 à 24 mois de vie). L'infiltration progressive de la moelle épinière et des ligaments vertébraux peut provoquer une compression médullaire au niveau cervical.

Le scanner ou l'IRM cérébrale peut montrer différentes anomalies : une hydrocéphalie (à cause d'un déficit de réabsorption du LCR), des kystes arachnoïdiens, ou rarement des images hypodenses arrondies ou ovales dans la substance blanche traduisant une démyélinisation.

Dans les formes sévères correspondant à la maladie de Hurler, les signes cliniques sont présents dès la première année de vie (médiane = 6 mois, intervalle de 0 à 6.5 ans)⁸³. Il existe chez ces patients, une dégradation psychomotrice progressive, avec stagnation, puis perte des acquisitions. Les signes cliniques les plus communs retrouvés dans la littérature pour le phénotype sévère sont la dysmorphie faciale (94%), l'opacité cornéenne (88%), l'hépatomégalie (83%), la dysostose multiple (81%) et la présence d'une hernie (75%)⁹⁹.

Les formes dites atténuées (Hurler-Scheie et Scheie) se caractérisent par l'absence ou une régression psycho-intellectuelle modérée. La dysmorphie faciale est moins marquée, avec une morphologie qui peut être normale, avec simplement un cou court et une petite taille (1.5 m à 1.6 m). Ces caractéristiques peuvent retarder le diagnostic des formes atténuées (Age médian de diagnostic de 6 ans *versus* 0.8 ans pour la forme sévère)⁸³. En revanche, toutes les complications viscérales, en particulier cardiaques et articulaires, émaillent l'évolution de ces formes dites atténuées. Ces complications constituent souvent les premiers signes d'appel pour le diagnostic de la maladie. Les cinq symptômes les plus souvent décrits dans le syndrome Hurler-Scheie sont : l'opacité cornéenne (84%), la dysmorphie faciale (83%), l'hépatomégalie (81%), une hernie (73%) et la raideur articulaire (72%)⁹⁹.

Il n'y a pas de profil clinique typique du syndrome de Scheie, ce phénotype atténué, présente une grande hétérogénéité. Par conséquent, le diagnostic reste un défi médical, faisant appel généralement à une approche transversale impliquant de nombreux spécialistes. D'autant plus que la variété des symptômes et la survie moyenne supérieure à 28 ans ont fait passer ce challenge d'une médecine pédiatrique à celle de l'adulte, qui est à l'heure actuelle moins sensibilisée au diagnostic et suivi des maladies héréditaires du métabolisme. De ce fait, le diagnostic peut être retardé, ou n'être posé qu'à l'occasion d'anomalies cardiaques ou ophtalmologiques. En effet, les troubles les plus couramment rencontrés dans le syndrome de Scheie sont : les valvulopathies (87%), l'opacité cornéenne (86%), la raideur articulaire (81%), la présence d'une hernie (65%) et le syndrome du canal carpien (62%)⁹⁹,

alors que les signes classiques de surcharge ne sont présents que dans près d'un cas sur deux (54% pour la dysmorphie faciale, 51 % pour l'hépatomégalie).

Toutefois, un groupe de travail, composé de 16 experts internationaux de MPS I, n'a pas pu récemment trouver un consensus pour déterminer les critères cliniques susceptibles de différencier les formes sévères des formes atténuées ¹⁰⁰.

En absence de traitement, la médiane de survie est de 6 à 8 ans pour les formes sévères, alors que dans les autres formes les patients atteignent habituellement l'âge adolescent ou adulte. Les patients MPS I ont souvent des antécédents chirurgicaux ; en effet, 72 % des malades ont eu recours à un au moins une procédure chirurgicale et dans 40 % des cas elle est pratiquée avant même le diagnostic de la maladie ¹⁰¹. De plus, une forte mortalité post-opératoire, imputée aux complications cardiaques et anesthésiques, est rapportée dans la MPS I ⁹⁶.

3.5. Diagnostic biologique

L'étude des GAG urinaires permet d'orienter le diagnostic. Elle retrouve une excrétion accrue et qualitativement anormale (Présence de dermatane et héparane sulfate). Mais, ces anomalies ne permettent pas de distinguer la MPS I la MPS II. Le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence du déficit en α -L-iduronidase dans les leucocytes, sérum ou dans les fibroblastes en culture. Cette activité enzymatique est mesurable également sur papier buvard ¹⁰². Les valeurs inférieures à 35 % de l'activité de référence (le plus souvent indétectables) sont compatibles avec une MPS I. Cependant, ces valeurs ne permettent pas de distinguer les formes sévères des formes atténuées. Par ailleurs, des pseudo-déficits enzymatiques ont été décrits pour l' α -L-iduronidase ⁶³. Ces pseudo-déficits sont rares et ne sont pas associés à une augmentation des concentrations urinaires des GAG ¹⁰³. La confirmation du diagnostic de la MPS I peut aussi être réalisée par l'étude du gène de l' α -L-iduronidase. Le gène *IDUA* est localisé en position 4p16 du chromosome 4, et son ADNc code pour un polypeptide de 653 acides aminés. Il est composé de 14 exons, sa longueur est de 19 Kb.

L'étude du gène *IDUA* chez les patients MPS I a permis l'identification de plus de 150 mutations délétères et 32 polymorphismes. Ces mutations sont majoritairement ponctuelle de type faux-sens ou non-sens (76% des cas). Toutefois d'autres types de modifications telles les petites délétions ou insertions, ou également des modifications de sites d'épissage ont été décrites ¹⁰⁴.

Dans la base « *Human Gene Mutation Database* » (<http://www.hgmd.org>; Stenson *et al.*, 2012), 116 mutations sont validées, 102 dans le syndrome Hurler, et 13 dans les formes atténuées. 1 pseudo-déficit est également répertorié.

Le type de mutation et sa fréquence dépend de l'origine ethnique des patients. Si la plupart des mutations sont d'ordre privé, trois sont communes : p.W402X, p.Q70X et p.P533R. Elles comptent pour près de 59% des mutations recensées en 2009 chez 700 patients du RIG ¹⁰⁵.

En Europe, Les mutations p.W402X, p.Q70X sont retrouvées dans plus de 50 % des cas. La mutation p.W402X compte pour près de la moitié des cas en Espagne, Grande Bretagne et en Amérique du Nord ¹⁰⁴. En revanche, elle ne dépasse pas les 20 % dans les pays Scandinaves ou la Russie ¹⁰⁶. Dans ces derniers, la mutation p.Q70X est plus abondante (environ 50 % des allèles).

La mutation p.P533R est originaire des pays de l’Afrique du nord. Elle a été retrouvée dans l’ensemble des pays méditerranéens, sa fréquence est d’environ 5 à 13 % des sujets en Espagne et en Italie ¹⁰⁴, alors qu’elle est supérieur à 60 % au Maroc ¹⁰⁷ et en Tunisie ¹⁰⁸.

La caractérisation moléculaire permet dans certain cas de prédire le phénotype. En effet, la présence de certaines mutations non-sens, comme la p.W402X ou p.Q70X, à l’état homozygote ou hétérozygote composite, sont prédictives de forme sévère ⁶⁷. Alors que dans le cas des mutation faux-sens p.R89Q ou c.678-7G>A altérant le site d’épissage dans l’intron 5, le phénotype est atténué ¹⁰⁹. Chez les patients porteurs de la mutation p.P533R, une grande variabilité clinique est rapportée ⁶⁷.

La structure du gène *IDUA*, des polymorphismes et quelques relations génotype-phénotype, sont présentées sur la **Figure 7**.

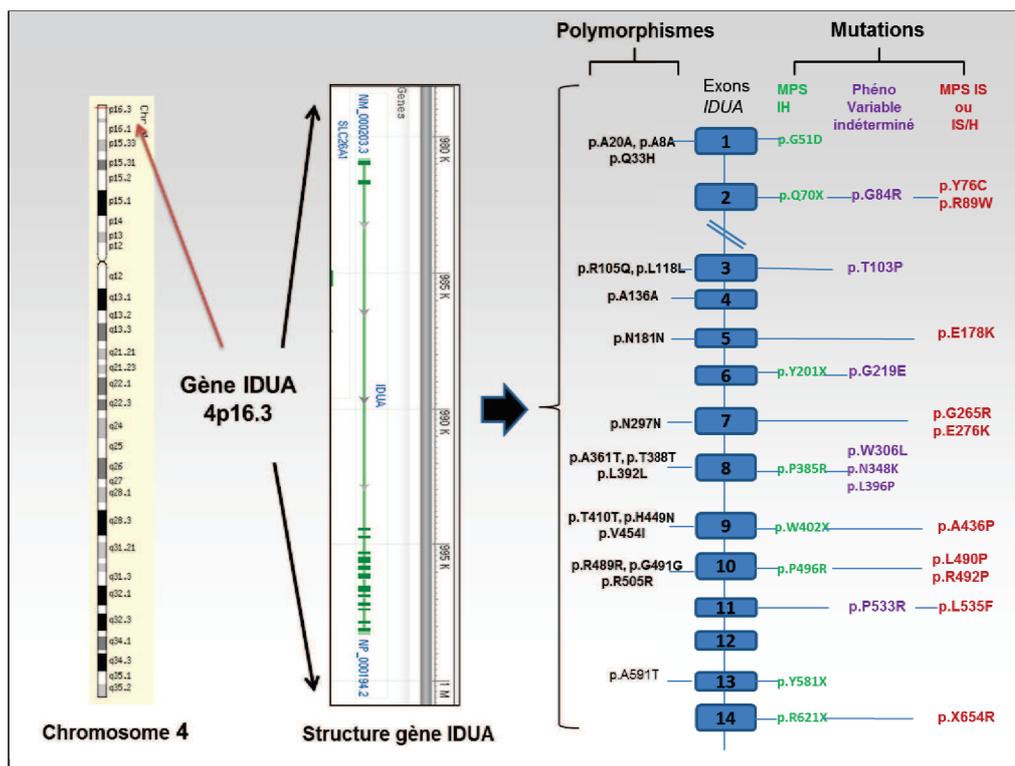


Figure 7 : Localisation, structure, certaines mutations et polymorphismes du gène *IDUA*.

Le gène *IDUA* est localisé sur bras court du chromosome 4 en 4p16. Il comporte 14 exons, sa longueur est de 19 Kb. L’intron 2 est très grand (12 Kb). Plus de 150 mutations et 32 polymorphismes sont rapportés pour le gène *IDUA*. Certains polymorphismes et mutations sont indiqués, les phénotypes associés à ces mutations sont représentés par un code couleur (Vert : forme sévère, Rouge : forme atténuée, Violet : phénotype variable).

3.6. Traitement

La cascade de manifestations multi-systémiques, émaillant l'histoire de la maladie, nécessite un suivi multidisciplinaire, et le recours à différents professionnels de santé. De ce fait, une bonne coordination au sein d'une seule équipe, aura pour objectif d'optimiser la prise en charge thérapeutique.

A. Traitement symptomatique

Le traitement symptomatique revêt une importance certaine pour les patients et leurs entourages. Il permet notamment d'améliorer la qualité de vie, ralentir l'évolution de la maladie et de favoriser l'insertion scolaire et socioprofessionnelle des patients. Il est basé sur le traitement pharmacologique des diverses manifestations. Dans ce cadre plusieurs classes thérapeutiques sont utilisées : antalgiques, anti-inflammatoires, corticoïdes, anti-glaucomeux, neuroleptiques, antidépresseur, antibiothérapie curative et prophylactique de l'endocardite infectieuse, des traitements pour l'insuffisance cardiaque et l'HTA, ainsi qu'une vaccination antigrippale et anti-pneumococcique. Une prise en charge chirurgicale est souvent indispensable, elle comporte les différentes interventions ORL (adénoïdectomie, amygdalectomie, drains trans-tympaniques, trachéotomie), ophtalmologiques (greffe de cornée), odontologiques (pour les kystes folliculaires), orthopédiques (la décompression du nerf médian), cardiaques (remplacement valvulaire), et neurochirurgicales (dérivation pour l'hydrocéphalie). D'autres traitements non chirurgicaux sont également utilisés comme la kinésithérapie articulaire ou respiratoire, le suivi psychologique ou orthophonique et l'ergothérapie.

B. Traitement spécifique

L'objectif du traitement spécifique est de procurer au patient une activité enzymatique minimale, car *in vitro* une faible activité enzymatique de l'ordre de 0.4% est suffisante pour produire un phénotype atténué¹¹⁰. Cette activité minimale va permettre de prévenir, de stabiliser et de retarder la progression de la maladie. Actuellement, deux thérapeutiques spécifiques sont disponibles : la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (TCSH) et le traitement par enzymothérapie substitutive (TES).

1) Transplantation des cellules souches hématopoïétiques

La première transplantation de la moelle osseuse dans la MPS de type I a été réalisée en 1980, chez un enfant âgé d'un an, et présentant un phénotype sévère. Chez cet enfant, 13 mois après la transplantation, le taux sérique de l'activité enzymatique en α -iduronidase, est devenu semblable aux sujets hétérozygotes. L'hépatosplénomégalie et l'opacité cornéenne ont été reversées. Vingt ans après, son niveau intellectuel est préservé, et son autonomie est complète⁹¹. Depuis, plus de 400 TCSH, ont été pratiquées. Initialement il s'agissait uniquement de moelle osseuse, mais actuellement les cellules souches issues de sang de cordon ombilical sont de plus en plus utilisées. L'objectif principal de ce

type de traitement est de préserver le développement intellectuel de l'enfant, avec la possibilité de maintenir un apprentissage scolaire sensiblement normal.

L'efficacité du TCSH dépend essentiellement de l'âge du patient, car la transplantation peut permettre de prévenir les lésions neurologiques mais en aucun cas corriger les dégâts cérébraux déjà constitués. D'ailleurs, le meilleur développement intellectuel est observé dans le groupe de patients âgés de moins de 2 ans au moment de la greffe ¹¹¹. De plus, la transplantation permet une régression des signes viscéraux (hépatosplénomégalie, apnée du sommeil, insuffisance cardiaque, ...). Cependant, cette approche présente une faible efficacité sur les manifestations orthopédiques et articulaires, car le système ostéo-articulaire est peu vascularisé et l'enzyme ne peut pas traverser la matrice intercellulaire du tissu cartilagineux et osseux. De même, les valvulopathies, les atteintes auditives et certaines anomalies oculaires ne sont pas ou peu corrigées.

Ce traitement nécessite, par ailleurs, de trouver un donneur compatible et comporte une morbidité et une mortalité élevée (10 à 20%) en cas d'un donneur intrafamilial ou de greffe de sang de cordon, et jusqu'à 40 % en cas de donneur non compatible ⁹².

2) Traitement enzymatique substitutif

La rh-iduronidase (*recombinant human α -L-iduronidase, Aldurazyme[®], laronidase, Bio-Marin Pharmaceutical Inc, USA Genzyme and Corporation, USA*) a obtenu l'autorisation de mise sur le marché en 2003, suite à la première étude américaine de phase I/II ⁷⁹. Cette étude a mis en évidence une bonne efficacité et tolérance de ce nouveau médicament. L'AMM concerne le traitement à long terme des symptômes non neurologiques de la MPS I. La monographie de ce médicament est consultable sur le site de l'agence européenne des médicaments :

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000477/WC500023378.pdf

Depuis cette étude américaine, plusieurs essais cliniques ont confirmé l'efficacité et l'innocuité du TES. Un essai multicentrique international de phase III, incluant 45 sujets, âgés de 6 à 43 ans, a montré la réduction de la surcharge après traitement avec une diminution de l'excrétion urinaire des GAG de 55 à 66 % et une normalisation du volume hépatique et splénique. Une amélioration des tests pulmonaires, musculaires et cardiaques ont également été observés ¹¹².

Dans un essai clinique européen de phase II multicentrique ¹¹³ (Angleterre, Allemagne, Pays Bas et France), 20 enfants de moins de 5 ans, 16 atteints de forme sévère, et 4 atteints de forme atténuée, ont été inclus. Deux niveaux posologiques ont été testés : 100 UI/kg/semaine et 200 UI/Kg/semaine. La tolérance était satisfaisante pour les deux doses et l'augmentation de la posologie est accompagnée d'une décroissance plus importante des GAG urinaires. Cette réponse biologique est plus marquée chez les patients ayant des taux faibles d'anticorps anti-laronidase. En effet, après ce type de traitement, près de 90 % des patients développent des anticorps dirigés contre l'enzyme exogène. Ces

anticorps peuvent ensuite avoir un impact sur l'excrétion urinaire et la charge en GAG^{82,112,114}. En terme clinique, cet essai clinique a montré plusieurs bénéfices en terme d'amélioration de l'organomégalie, de la cardiomyopathie, de l'obstruction des voies aériennes supérieures, du retard de croissance et de l'état général. L'évaluation des fonctions cognitives (avec l'échelle de développement mentale de Griffiths ou *Griffiths Mental Developments Scales*) a montré pour la première fois un effet positif après un an de traitement. Cet effet est constaté chez tous les patients atteints de la forme modérée et également quand le traitement était initié précocement (< 2.5 ans) chez les enfants atteints de la forme sévère. Une évaluation à long terme reste, cependant, nécessaire pour confirmer ces résultats. Dans ce sens, Dierenfeld et *col* ont récemment montré sur un modèle canin¹¹⁵, une diminution de la surcharge en GAG au niveau cérébral quand les animaux sont traités par de fortes doses de la rh-iduronidase et qu'une immunotolérance est préalablement induite (afin de diminuer les taux d'anticorps anti-laronidase). Un essai clinique (NCT00741338), évaluant le bénéfice de l'association d'immunosuppresseurs (Neoral et Imuran) et TES est en cours au États-Unis (débuté en 2008 et résultats attendus en 2013).

D'autres stratégies pour augmenter l'efficacité du TES au niveau cérébral, sont proposées, comme l'administration intrathécale (essai clinique NCT00215527) ou des modifications de la formes galéniques par microencapsulation¹¹⁶.

La combinaison enzymothérapie et transplantation est actuellement proposée, compte tenu des délais de réalisation de la transplantation, celle-ci doit être encadrée par l'enzymothérapie substitutive, qui sera alors débutée dès que possible et arrêtée lorsque la greffe sera fonctionnelle. L'objectif est de permettre aux patients d'arriver à la greffe en meilleur état général.

Un consensus européen¹¹⁷, est récemment adopté pour définir la stratégie thérapeutique dans la MPS I, il se distingue des directives internationales de 2009⁹¹, par l'âge limite pour la TCSH (2,5 au lieu de 2 ans). Il recommande que:

- Le choix de la thérapeutique se fasse au sein d'une équipe pluridisciplinaire.
- Le génotype doit être établi au moment du diagnostic chez tous les patients (aide à la prise de décision par la prédiction de certains phénotypes)
- La réalisation d'une TCSH le plutôt possible chez les patients diagnostiqués avant l'âge de 2,5 ans dont le phénotype est présumé sévère (dès que les conditions somatiques le permettent).
- Au moment du diagnostic, si l'atteinte neurologique est très avancée (QI<70), les patients devraient avoir moins de chance de bénéficier d'un TCSH (mais s'il existe un donneur compatible, elle doit être discutée cas par cas en fonction des bénéfices attendus).
- Dès le diagnostic, tous les patients doivent bénéficier d'une enzymothérapie, celle-ci doit notamment encadrer la greffe et peut être poursuivie à vie chez les patients ne nécessitant pas de TCSH.

Le suivi biologique des patients traités par ces traitements spécifiques comporte la mesure de l'activité enzymatique et la détermination des taux des GAG urinaire (au moins 1 fois/an). Les anticorps anti-laronidase doivent être également surveillés (dosage recommandé tous les 6 mois) en cas d'enzymothérapie substitutive.

3) *Autres perspectives thérapeutiques*

De nouveaux médicaments dont le principe repose sur l'inhibition de synthèse de substrat ou l'utilisation de molécules chaperons ont fait leur apparition ou sont à l'essai dans les pathologies lysosomales.

Des molécules synthétiques, appelées molécules chaperons (1-deoxyidronojirimycin et 1-deoxygalactonojirimycin), permettent de faciliter le bon repliement et de stabiliser la conformation tridimensionnelle de certaines enzymes mutées dans le réticulum endoplasmique. Cependant, ce traitement est limité aux seules mutations responsables d'un mauvais repliement de l'enzyme, cette approche n'a été appliquée à la MPS I pour l'instant ¹¹⁸.

Des substances telles que le miglustat (Zavesca, utilisée actuellement dans la maladie de Gaucher), ou la rhodamine B peuvent diminuer la production des substrats, et avoir un bénéfice clinique ¹¹⁸.

Une autre approche consiste à utiliser des molécules, comme les aminosides qui permettent aux ribosomes de franchir le codon stop généré par une mutation non-sens ; la traduction de la protéine se poursuit et une activité enzymatique suffisante est alors retrouvée ¹¹⁹.

Enfin, à l'instar de plusieurs maladies héréditaires, la thérapie génique dans la MPS I reste un challenge scientifique d'avenir.

Chapitre 2 : Caractéristiques cliniques et moléculaires d'une cohorte de 13 patients algériens atteints de MPS I

1. Objectif

Cette étude descriptive d'une cohorte de 13 patients algériens atteints de MPS I a comme objectif de recueillir et à analyser les données clinico-biologiques et d'établir le profil mutationnel.

2. Matériel et méthode

2.1. Recrutement des patients

Le laboratoire de Biochimie Médicale du CHU de Rouen réalise le diagnostic moléculaire de plusieurs maladies héréditaires du métabolisme dans le cadre du plan maladies rares.

Treize patients atteints de mucopolysaccharidose de type I appartenant à 11 familles originaires de l'ouest algérien suivis par le Pr Chalabi et le Dr Cheriet dans le service de Pédiatrie B du CHU d'Oran ont été inclus dans cette étude.

La confirmation du diagnostic de la MPS I a été réalisée par l'étude de l'activité enzymatique. Un consentement parental pour la réalisation de l'étude des caractéristiques moléculaires d'une personne est obtenu pour l'ensemble des patients.

Dans le cadre de cette étude, un questionnaire a été élaboré avec l'aide du Dr Torre, Pédiatre au CHU de Rouen afin de recueillir les principales caractéristiques cliniques, biochimiques et radiologiques des patients. Le recueil des données a été effectué entre le 15/02/2012 au 15/10/2012.

Les données recueillies comportent :

- Données générales du patient (nom, prénom, âge, terme de grossesse, âge au moment de l'enquête, âge au diagnostic)
- Données sur le diagnostic enzymatique
- Signes cliniques observés au moment diagnostique ou leur âge d'apparition
- Complications éventuelles (neurologiques, cardiaques, respiratoires)
- Examens complémentaires (Échographies abdominale, cardiaque, radiographies osseuses)
- Évaluation de la dépendance, du langage et de l'insertion sociale

2.2. Diagnostic Moléculaire

Une mise au point préalable de la technique moléculaire a été réalisée avant la recherche des mutations dans notre cohorte.

Notre méthode comporte le séquençage sur ADN génomique des séquences régulatrices (promoteur), des séquences exoniques et des jonctions "intron-exon" du gène *IDUA* (NM_000203.3).

Les ADN ont été extraits, en double à partir de 400 µL de sang total prélevé sur EDTA, avec le kit Qiagen DNA Blood Mini Kit selon les indications fournies par le fabricant. La concentration de l'ADN de chaque échantillon, a été ensuite mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoDrop ND-1000), qui permet à partir d'une prise de 2 µL, le dosage de l'ADN (A260) et la vérification de la pureté des extractions (ratio 260/280). La concentration de travail pour la PCR est d'environ 200 ng/µL. Les ADN sont conservés à 4°C ou à -20°C.

La séquence annotée et comportant la distinction entre les exons et les introns du gène *IDUA* est utilisée pour le choix des amorces. Une recherche de polymorphisme dans cette séquence est effectuée sur le site *SNPper* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) les séquences répétées dans le gène *IDUA* sont recherchées grâce au site *Repeat Masker* (<http://www.repeatmasker.org>). Cette séquence est soumise au logiciel « Primer 3 » pour choisir les amorces en évitant les séquences répétées et les polymorphismes. Les amorces proposées par « Primer 3 » présentent peu ou pas complémentarité de séquence (dimère d'amorces) et un faible risque de formation de structure secondaire. L'absence d'hybridation non spécifique des séquences sur une autre région du génome est analysée sur le site Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Le tableau présenté en **Annexe 3**, répertorie les séquences ainsi choisies. Quinze amplicons sont utilisés pour le séquençage de l'ensemble des régions d'intérêt.

Les exons du gène *IDUA* ont été amplifiés par PCR dans les conditions suivantes : Tampon 1X, 1,5mM de MgCl₂, 100µM DNTPs, DMSO à 10%, 0,025 U/µl de Taq polymérase, 0,6 µM de chaque amorce. Un échantillon de 1 µl d'ADN à environs 200 ng/ml est ajouté au volume final de 50 µl. Un témoin négatif est réalisé en parallèle pour vérifier l'absence de contamination.

Chaque exon a été amplifié par PCR Touch Down 60-48. La réaction de PCR est réalisée sur un thermocycleur ABI 9700 (Perkin Elmer) et consiste en un cycle de 95°C pendant 5 minutes pour l'étape initiale de dénaturation suivi de 12 cycles composés de 25 secondes de dénaturation à 95°C puis 25 secondes d'hybridation avec diminution de la température d'hybridation d'un degré à chaque cycle jusqu'à 48°C, puis une phase d'extension à 72°C pendant 25 secondes. Ensuite, sont réalisés 35 cycles comprenant 25 secondes de dénaturation à 95°C, 25 secondes d'hybridation à 48°C puis 25 secondes d'élongation à 72°C. La PCR se termine par un cycle d'élongation finale à 72°C pendant 5 minutes.

Le produit PCR est soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose pour vérifier que le fragment amplifié est à la taille attendue (marqueur de taille déposé sur le même gel).

La purification des produits PCR est réalisée en suivant les instructions du Kit Qiagen Gel Extraction. Les réactions de séquence sont effectuées avec le Kit Big Dye Terminator V3.1 cycle sequencing (Applied Biosystems) et comporte un cycle de 95°C pendant 2 minutes pour l'étape initiale de dénaturation suivi de 40 cycles composés de 10 secondes de dénaturation à 96°C puis 5 secondes d'hybridation avec diminution progressive de la température à chaque cycle jusqu'à 50°C, puis une phase finale d'élongation à 60°C pendant 4 minutes. La purification des produits de séquençage sont réalisées sur des microplaques remplies avec la poudre Sephadex G 50 ou à l'aide du kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Les produits purifiés sont analysés sur un séquenceur automatique 3100 GENETIC Analyzer (Applied Biosystems).

La comparaison des séquences génomiques des patients par rapport à la séquence de référence est effectuée avec le logiciel Variant Reporter (Applied Biosystem). Lorsqu'une variation est identifiée, son analyse est accomplie grâce au logiciel Alamut (Interactive-Biosoftware), ce logiciel fait appel à toutes les bases de données répertoriant les polymorphismes et les mutations connues des gènes, il permet également de nommer la variation selon les règles de la nomenclature.

2.3. Nomenclature

Les variations moléculaires sont décrites selon les directives courantes de nomenclature, utilisées dans différentes bases (<http://www.hgvs.org/mutnomen>). Elle indique le site nucléotidique de variation, précédé du symbole « c. » indiquant l'utilisation de l'ADN codant, ou l'acide aminé en cause, précédé du symbole « p. » évoquant les modifications protéiques. Pour désigner les acides aminés un code à une lettre est utilisé. Le tableau en **Annexe 4** rapporte le code international de correspondance à une et trois lettres désignant chacun des vingt acides aminés.

3. Résultats

3.1. Caractéristiques cliniques

Notre cohorte est constituée de 13 patients appartenant à 11 familles différentes. Les patients P8 et P9, ainsi que les patients P10 et P11, sont frères et sœurs. Le pourcentage de mariage consanguin est de 85%. Le sexe ratio est de 5 garçons pour 8 filles.

L'âge des patients au moment de l'inclusion dans l'enquête est compris entre 1,7 (P10) et 22,6 ans (P5), avec un âge médian de 13,2 ans.

L'âge médian au moment du diagnostic est de 8 ans. Tous les patients sauf un ont été diagnostiqués après l'âge de 2,5 ans. Le plus précoce (P8) à 2,6 ans et le plus tardif (P5) à 15,7 ans.

Pour le patient P10, le diagnostic a été posé à l'âge de 11 mois par un test enzymatique effectué 4 jours après la confirmation de l'atteinte de sa sœur aînée.

Douze parmi les 13 patients présentent une forme atténuée (2/12 : MPS IS/H et 10/12 : MPS IS). Un seul sujet est atteint d'une forme sévère (P3). Ce patient est décédé au cours de cette étude à l'âge de 9 ans. La classification est basée essentiellement sur l'âge de début de la symptomatologie et la présence ou non d'un retard intellectuel.

Dans les antécédents, tous les patients sont nés à terme. Le poids de naissance est connu pour 8 patients. Trois sont eutrophes à la naissance, 4/8 sont macrosomes (PN > 4 Kg à terme) et un patient présente un retard de croissance modéré.

Au cours de l'évolution, une dysmorphie faciale est présente chez tous les patients (13/13). On a retrouvé une macrocrairie parmi 7 patients (54%), une macroglossie chez 3 patients (23%) et 10 cas avec organomégalie (77%). Une hernie ombilicale est retrouvée chez tous les patients (13/13), avec une médiane de détection de 5,5 ans.

Un retard de croissance pondéral est retrouvé pour 10 patients sur 12 renseignés, avec un poids médian de - 2,5 DS (exprimé en déviation standard par rapport à la courbe pondérale normale). Tous ces patients ont un retard de croissance statural (taille médiane de -3,5 DS). Six patients présentent une macrocrairie au moment de l'enquête et 5 ont un périmètre crânien (PC) dans la moyenne. Les autres signes cliniques retrouvés sont :

- Les manifestations ORL : rhinorrhées chroniques (10/13), hyperplasie gingivale (10/13), kystes folliculaires (1/9), hypoacousie et surdité (6/6). La surdité est de transmission dans 4 cas.
- Les troubles ophtalmologiques : opacité cornéen (10/13).
- Les troubles respiratoires : syndrome obstructif (7/13), syndrome restrictif (2/13).
- Les anomalies ostéo-articulaires : dysostose multiple (10/13), raideur articulaire (8/13).
- Les manifestations digestives : diarrhées chroniques (4/12).

Les complications cliniques observées sont de type:

- Cardiaques (11/12) : avec une médiane de survenue de 7 ans. Ces troubles sont essentiellement valvulaires, de type insuffisance mitrale (8/11), et/ou aortique (5/11), rétrécissement (2/11) ou épaissement mitral (1/11). Une hypertension artérielle pulmonaire est associée à la valvulopathie chez 3 sujets (P6, 9, 13).
- Neurologiques caractérisées par l'apparition d'une hydrocéphalie (7/11) à l'âge médian de 11 ans. L'hydrocéphalie a nécessité une intervention neurochirurgicale chez un seul patient (P2).
- Respiratoires : asthme (2/13), BPCO (1/13) et insuffisance respiratoire (2/13).
- Ophtalmologiques : atrophie optique (1/12) et rétinopathie (1/12).

L'évaluation de l'autonomie des patients montre une autonomie alimentaire chez 9 patients sur 10, et une marche libérée normale pour tous les patients (13/13), avec une marche libérée acquise en moyenne à 18 mois. Les fonctions cognitives sont préservées chez 10 patients. Le patient P3 a un retard sévère et les patients P2 et P13 des retards modérés.

Le langage est normal chez 10 des 13 patients, alors que des difficultés de prononciation sont observées chez les patients P2 et P8. Le langage est incompréhensible pour le patient P3.

Six des 13 patients suivent une scolarisation normale en primaire ou collège.

Le **Tableau 3** résume les principales caractéristiques cliniques des patients.

L'enzymothérapie substitutive a été prescrite pour 8 patients, elle est programmée pour 4 autres. Dans la plus part des cas, le traitement est limité à une année. Le patient P3 décédé, n'a pas été traité par TES. Aucune greffe de cellules souches n'a été réalisée.

Famille	Patients	Age (ans)	Sexe	Mariage consanguin	Motif de consultation	Phénotype	Age diagnostic (ans)	Poids (Kg)	Taille (cm)	Retard mental	Dysmorphie faciale	Dysostose multiple	Raideur articulaire	HM/HSM	Hernie	Rhinorrhée chronique	Surdité	Opacité cornéenne	Anomalie cardiaque	Hydrocéphalie
1	P1	13,80	M	1er degré	MPS 1	IS	5,5	28 (-2,5 DS)	131 (-3,5 DS)	0	1	1	1	HM	OM	1	TB	0	IM	1
2	P2	5,10	F	1er degré	Suspicion de MPS, après suivi d'un glaucome	I H/S	2,7	18	96 (-2,5DS)	1	1	1	1	HM	OM+I	1	/	1	0	1
3	P3	9,60	M	NON	Retard psychomoteur, Dysmorphie, suspicion de MPS	IH	2,6	/	/	1	1	1	1	HSM	OM	1	/	0	/	1
4	P4	10,70	F	1er degré	MPS1	IS	8,7	21 (-2,5 DS)	122 (-3 DS)	0	1	1	0	0	OM	1	TB	1	IM + IA	1
5	P5	22,60	F	1er degré	Nanisme, Sd Dysmorphique	IS	15,7	27 (-3 DS)	128 (<-4 DS)	0	1	1	1	0	OM	1	np	1	IM + IA	1
6	P6	16,10	M	2ème degré	HSM	IS	13	38 (<-3 DS)	146 (<-4 DS)	0	1	1	1	HM	OM	0	/	1	RM+ RA	0
7	P7	15,70	F	1er degré	Suspicion de MPS	IS	15,5	33 (-3 DS)	142 (-3,5 DS)	0	1	1	1	0	OM	0	M	1	IM	0
8	P8	4,20	M	1er degré	Dépistage MPS1	IS	3,1	17	93 (-3 DS)	0	1	/	0	HM	OM	1	/	1	IM	/
8	P9	12,60	F	oui mais np	Suspicion de MPS	IS	11,4	24 (-3 DS)	121 (<-4 DS)	0	1	1	1	HSM	OM	1	/	1	RM + RA	/
9	P10	1,70	M	2ème degré	Dépistage de MPS1	IS	11 mois	11 (-1 DS)	78 (-1,5 DS)	0	1	0	0	HM	OM	1	/	1	IM + IA	0
9	P11	4,50	F	2ème degré	Suspicion de MPS	IS	2,7	15 (-1 DS)	90 (-3,5 DS)	0	1	0	0	HSM	OM	1	/	1	IM	0
10	P12	14,90	F	NON	Dépistage de MPS1	IS	8,3	35 (-3 DS)	135 (<-4 DS)	0	1	1	0	HSM	OM	0	M	0	IM + IA	1
11	P13	15,80	F	2ème degré	MPS1	I H/S	8	31 (<-3 DS)	131 (<-4 DS)	1	1	1	1	HSM	OM	1	P	1	EM	1

Tableau 3: Principales caractéristiques cliniques des patients de la cohorte

Les caractéristiques cliniques des patients sont résumées dans le tableau, 1: présence, 0: absence, M: sexe masculin, F: sexe féminin. Pour les phénotypes IH: forme sévère, I S/H : forme intermédiaire, IS: forme frustrée. Les variations par rapport à la norme du poids et de la taille sont exprimées entre parenthèse par les déviations standards (DS). Pour l'organomégalie, HM : hépatomégalie, HSM : hépatosplénomégalie. Pour les hernies, OM : Ombilicale, I : Inguinale. La surdité est de type mixte (M), de transmission bilatérale (TB), ou de perception (P). Les valvulopathies décrites sont de type : insuffisance mitrale (IM) ou aortique (IA), rétrécissement mitrale (RM) ou aortique (RA), et épaissement mitral (EM). « np » indique que l'atteinte est présente mais le type de l'anomalie n'est pas précisé. « / » désigne que l'information n'est pas disponible.

3.2. Caractéristiques biochimiques

L'étude des caractéristiques biochimiques a été effectuée dans 3 laboratoires, le laboratoire des Maladies métaboliques et Centre de dépistage néonatal de Bruxelles - Pr Vincent, Centre de Biologie Pathologie Est, C.H.U Lyon - Dr Froissart, Service de biochimie et biologie moléculaire Hôpital Cochin Paris - Dr Caillaud.

A. GAG urinaires

L'analyse des GAG urinaires a été réalisée pour 10/13 patients. En terme qualitatif, les profils chromatographiques urinaires ont montré la présence d'une bande d'héparane sulfate (10/10), dermatane sulfate (10/10) et de chondroïtine sulfate (8/10). D'autre part, l'analyse quantitative, a trouvé chez tous les patients (10/10), une forte élimination urinaire des GAG totaux. Cette augmentation est comprise entre 6,7 et 95 fois la normale supérieure en fonction de l'âge des patients au moment du diagnostic. La médiane est de 21,7.

B. Activité enzymatique

L'activité enzymatique de α -L-iduronidase est indétectable chez 5/13 patients. Elle est inférieure à 25% pour les autres cas (8/13). L'ensemble de ces données biochimiques sont rapportés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Caractéristiques biochimiques des patients.

Famille	Patients	GAG électrophorèse qualitative			GAG Quantitative		Activité enzymatique IDUA nmol/h/mg de protéines	
		Chondroïtine	Héparane	Dermatane	mg/g créat	Rapport/norme	Patient	Témoin
1	P1	++	+++	+	70	6,7	Indétectable	1 à 5
2	P2	++	+++	+	294	19,6	0,6	1 à 5
3	P3	np	np	np	np	np	Indétectable	1 à 5
4	P4	0	+++	Trace	451	46,9	Indétectable	1 à 5
5	P5	+	+	+	523	95	0,01	0,11 à 0,21
6	P6	0	+	+	99	18	0,78	1,19 à 4,52
7	P7	+	+++	+	53	9,6	1,08	31,7
8	P8	++	+++	++	169,7	11,3	1,08	20,6
8	P9	+	+++	++	178	21,7	0,72	32
9	P10	np	np	np	np	np	0,72	35,3
9	P11	+	++	+	654	43,6	0,72	35
10	P12	+	+	+	224	23,3	Indétectable	3,2 à 13,6
11	P13	np	np	np	441	45,9	Indétectable	1 à 5

« np » : non précisé

C. Analyse moléculaire

L'analyse des 26 allèles a mis en évidence 4 variations pathologiques (**Tableau 5**) à l'état homozygote ou hétérozygote composite :

- 2 substitutions faux-sens :
 - La mutation p.P533R (c.1598C>G) dans 21/26 allèles.
 - La mutation p.E178K (c.532G>A) dans 2/26 allèles.
- 2 substitutions non-sens :
 - La mutation p.Y167X (c.501C>G) dans 2/26 allèles,
 - La mutation p.Y581X (c.1743C>G) dans un seul allèle.

Tableau 5 : les caractéristiques des 4 mutations détectées dans notre étude.

Variation protéique	Variation nucléotide	Base (ADNc)	Exon	Type de mutation	Fréquence % dans la cohorte
p.P533R	C>G	c.1598	11	Substitution faux-sens	80,8
p.Y167X	C>G	c.501	5	Substitution non-sens	7,7
p.E178K	G>A	c.532	5	Substitution faux-sens	7,7
p.Y581X	C>G	c.1743	13	Substitution non-sens	3,8

La mutation p.P533R est retrouvée chez 11/13 patients étudiés. Cette mutation est à l'état homozygote chez 10 sujets (P1. P4. P5. P6. P8. P9. P10. P11. P12. P13) et à l'état hétérozygote chez un seul patient (P3). Ce dernier, présente un profil de double-hétérozygotie, car une autre mutation située au niveau de l'exon 13, la mutation p.Y581X, est également rapportée.

L'étude a montré chez les 2 patients restants (P2 et 7) la présence de 2 mutations à l'état homozygote, la mutation p.Y167X pour le patient P2 et la p.E178K pour P7. Ces mutations sont situées toutes les deux au niveau de l'exon 5.

La **Figure 8** représente les électrophorégrammes des différents profils mutationnels observés dans notre étude.

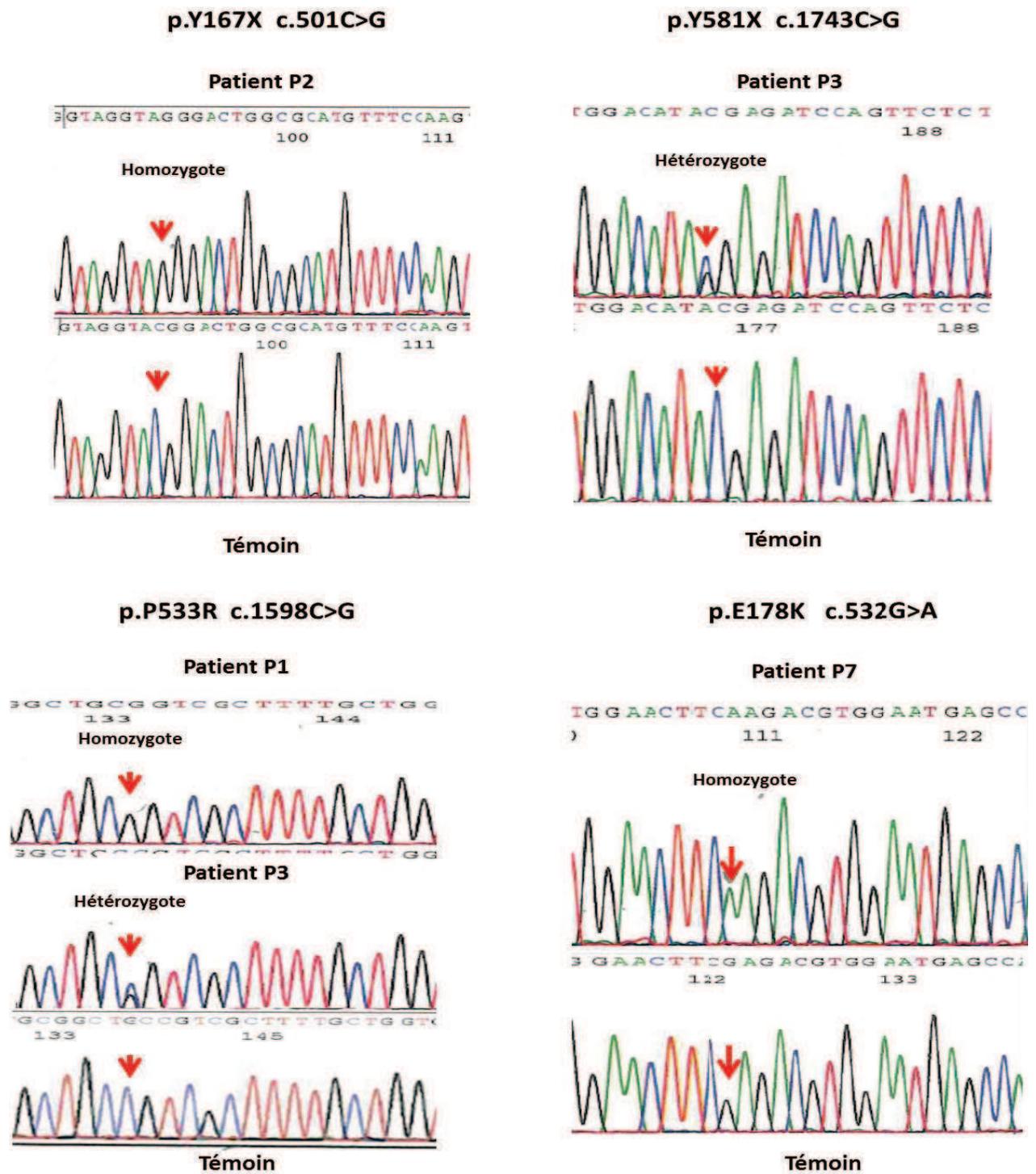


Figure 8 : Électrophorégrammes des mutations observées chez les patients

Les électrophoregrammes illustrent les 4 types de variation retrouvés chez les patients de la cohorte. Ils représentent respectivement les mutations p.Y167X, p.Y581X, p.P533R et p.E178K. Les profils « témoins » sont rapportés. Les flèches rouges indiquent les sites nucléotidiques de variation.

Par ailleurs, 11 polymorphismes ont été identifiés, les polymorphismes p.A20A, p.A8A et p.Q33H sont les plus fréquents (9/11) et sont retrouvés chez tous les patients sauf P2 et 7.

Le patient P2 présente plusieurs polymorphismes (8 au total), et P7 deux polymorphismes (p.Q33H et p.N297N).

La liste de l'ensemble des polymorphismes, leurs fréquences respectives, et le détail du génotype de chaque patient sont rapportés dans les **Tableaux 6 et 7**.

Tableau 6: Caractéristiques des polymorphismes retrouvés chez les patients

Polymorphisme	Base (ADNc)	Exon	Fréquences %
p.A20A	c.60G>A	1	81,8
p.A8A	c.24C>A	1	81,8
p.Q33H	c.99T>G	1	100
p.N297N	c.891C>T	7	9,1
p.R105Q	c.314G>A	3	9,1
p.N181N	c.543T>C	5	9,1
p.A314A	c.942G>C	7	9,1
p.A361T	c.1081G>A	8	9,1
p.T388T	c.1164G>C	8	9,1
p.V454I	c.1360G>A	9	9,1
p.R489R	c.1467C>T	10	9,1

Tableau 7 : Génotypes des patients précisant les mutations et les polymorphismes retrouvés.

Famille	Patients ID labo	Phénotype	Allèle 1	Allèle 2	Polymorphismes
1	P1	IS	p.P533R	p.P533R	p.A20A, p.A8A, p.Q33H
2	P2	I H/S	p.Y167X	p.Y167X	p.Q33H, p.R105Q, p.N181N, p.A314A, p.A361T, p.T388T, p.V454I, p.R489R
3	P3	IH	p.P533R	p.Y581X	p.A20A, p.A8A, p.Q33H
4	P4	IS	p.P533R	p.P533R	p.A20A, p.A8A, p.Q33H
5	P5	IS	p.P533R	p.P533R	p.A20A, p.A8A, p.Q33H
6	P6	IS	p.P533R	p.P533R	p.A20A, p.A8A, p.Q33H
7	P7	IS	p.E178K	p.E178K	p.Q33H, p.N297N
8	P8	IS	p.P533R	p.P533R	NR
	P9	IS	p.P533R	p.P533R	p.A20A, p.A8A, p.Q33H
9	P10	IS	p.P533R	p.P533R	NR
	P11	IS	p.P533R	p.P533R	p.A20A, p.A8A, p.Q33H
10	P12	IS	p.P533R	p.P533R	p.A20A, p.A8A, p.Q33H
11	P13	I H/S	p.P533R	p.P533R	p.A20A, p.A8A, p.Q33H

NR : Non réalisé car seule la mutation familiale a été recherchée

4. Discussion

Nous avons étudié pour la première fois, les caractéristiques cliniques, biochimiques et le profil mutationnel d'une cohorte de 13 patients algériens atteints de MPS I. Les patients sont le plus souvent diagnostiqués sur la base de signes cliniques évocateurs. Le diagnostic a été confirmé par l'étude des GAG urinaires et de l'activité enzymatique. Les études moléculaires ont été réalisées dans le cadre de ce travail.

Les patients de la cohorte présentent majoritairement une forme atténuée (92%). En effet, 10/13 patients sont classés par les pédiatres en MPS IS, et 2/13 en MPS IH/S. Ce qui est justifié par le développement mental préservé chez 10 patients et une atteinte cognitive modérée chez les deux autres. La présence d'un seul phénotype sévère (P3) est surprenante. L'ensemble des études sur la MPS I dans différentes populations rapportent des fréquences de formes sévères beaucoup plus importantes, allant de 54 % à Taïwan⁸⁵ à plus de 88% des cas en Allemagne⁸⁹. Par ailleurs, 57 % des patients inclus dans le Registre International de Genzyme (RIG) ont un phénotype sévère⁸³. De même, les études réalisées sur d'autres populations d'Afrique du Nord ont également observé une forte proportion de forme sévère, 62 % au Maroc¹⁰⁷ et près de 70% des cas en Tunisie^{108,120,121}. Toutefois, un étude récente incluant 57 patients chinois a rapporté un pourcentage de forme sévère relativement plus faible (33%)¹²².

La faible proportion de sujets ayant une forme sévère dans notre cohorte pourrait être due à un biais de sélection par la maladie. En effet, ce biais est fort probable car l'absence de centres spécialisés en Algérie, la méconnaissance de la maladie par les pédiatres généralistes et l'inégalité d'accès au soin sur le territoire entraînent un retard diagnostique. Ce retard associé à la difficulté d'accès aux thérapeutiques spécifiques pourrait être à l'origine d'une forte mortalité des sujets affectés par les formes les plus graves. Dans ce contexte et devant la sévérité de la maladie, certaines familles renonceraient de surcroît à un suivi médical pour se diriger vers une médecine ancestrale.

Un biais de classement peut être également discuté, car il n'existe actuellement aucun marqueur biologique, ou critère clinique validé pour distinguer les formes sévères et atténuées. Dans notre étude, les médecins se sont basés pour établir leurs classifications sur l'âge de début de la symptomatologie, et le développement intellectuel préservé ou non des patients. Mais, nous savons que ces méthodes d'évaluation du quotient intellectuel en pédiatrie sont altérées par une certaine subjectivité, voire un manque de sensibilité. D'autre part, l'évaluation de l'âge de début de la symptomatologie de façon rétrospective (notamment la dysmorphie faciale) est très difficile en cours de cette maladie caractérisée par une évolution chronique.

Le patient P3, seul à avoir un phénotype sévère, est décédé au début de cette étude dans un tableau d'insuffisance respiratoire lié à un syndrome obstructif persistant en dépit d'une adénoïdectomie. Ce patient présente une symptomatologie typique du syndrome de Hurler, avec une dysmorphie faciale observée précocement à l'âge de 12 mois, une hépatosplénomégalie, une dysostose multiple, des raideurs articulaires, une hernie, un syndrome obstructif avec rhinorrhée chronique à l'âge de 18 mois, une hydrocéphalie à l'âge de 7 ans et un retard cognitif sévère. L'échographie cardiaque n'a pas été réalisée, par conséquent, le degré de l'atteinte cardiaque n'a pas pu être évalué. Le phénotype de ce patient est compatible avec les signes cliniques les plus communs retrouvés dans la littérature pour le phénotype sévère (dysmorphie faciale, hépatomégalie, dysostose multiple et présence d'une hernie). Cependant, l'opacité cornéenne n'a pas été rapportée dans le cas de notre patient. Il est à noter que plusieurs sujets ayant un phénotype sévère ne présentent pas d'opacité cornéenne. Cette opacité cornéenne n'est pas un signe spécifique de la MPS I, mais constitue un élément de diagnostic différentiel par rapport à la MPS II ¹²³. En dépit de la dysmorphie précoce (12 mois), l'âge de diagnostic chez ce patient est relativement tardif : 2,5 ans contre une médiane de 0,8 ans dans RIG, et environ 1,5 ans dans les pays voisins (Tunisie et Maroc). Ceci pourrait s'expliquer par un recours retardé à la consultation médicale pour retard psychomoteur associé à une dysmorphie faciale. En revanche, le décès de ce patient est survenu à l'âge de 9 ans, ce qui est relativement tardif pour un phénotype sévère au regard de la médiane de survie rapportée dans différentes études (3,8 ans dans RIG). Ceci est d'autant plus surprenant que ce patient a été diagnostiqué tardivement et n'a reçu aucun traitement spécifique.

Pour les 12 patients ayant le phénotype atténué, la plus part de nos données cliniques sont concordantes avec celles rapportées dans la littérature ⁹⁹. Chez nos deux patients définis comme Hurler/Scheie, l'ensemble des signes liés à ce syndrome est présent. De même, leur âge au diagnostic : 2,7 ans pour le patient P2, et 8 ans pour P13, sont en accord avec les données du RIG qui rapporte un âge médian au diagnostic de 3,8 ans. Ces 2 patients ont développé une hydrocéphalie qui a nécessité, dans un cas (P2), une intervention neurochirurgicale. En revanche ce patient, n'a pas présenté, en cours de l'enquête, d'anomalie cardiaque, ce qui est relativement rare dans la MPS I S/H. Cela pourrait s'expliquer par son jeune âge (5 ans) ; en effet, la médiane de survenue des manifestations cardiaques décrites dans la littérature est de 11,7 ans ⁹⁵. En revanche, le patient P13, âgé de 15 ans au moment de cette enquête, a un épaissement mitral. L'âge de ces deux patients au moment de l'étude est compatible avec la médiane de survie de 17,4 ans trouvée dans RIG ⁸³.

Dans la présente étude, chez les 10 sujets affectés par le syndrome de Scheie, la valvulopathie, l'opacité cornéenne et la présence de hernie ombilicale, sont quasi systématiques. En revanche, la raideur articulaire est rapportée seulement dans la moitié des cas. Toutefois, les signes de surcharge sont plus fréquents : 100% pour la dysmorphie faciale et 70% pour l'hépatomégalie. La médiane d'âge

au diagnostic est de 8,4 ans, un peu plus faible que celle trouvée dans le RIG (9,4 ans). De plus, les sujets apparaissent plus jeunes ; en effet, la médiane de leurs âges est de 13,2 ans contre 22,2 ans dans le RIG. Ceci peut être justifié par la forte proportion des signes de surcharge, qui sont des points d'appel majeurs permettant un diagnostic plus précoce. La présence de ces signes de surcharge permet certainement une orientation plus facile dans un service pédiatrique et leur inclusion dans la présente étude.

L'âge relativement jeune et la prédominance de formes atténuées chez nos patients peuvent probablement expliquer la rareté des complications cliniques observées au moment de cette enquête (absence d'hydrocéphalie nécessitant une chirurgie, aucun cas de compression médullaire, de pneumopathie récidivante ou d'insuffisance coronarienne).

Pour le traitement spécifique, 8/13 de nos patients ont reçu une enzymothérapie substitutive, alors qu'elle est programmée pour 4 autres, malheureusement dans la plupart des cas, la durée de ce traitement est courte. En effet, la période thérapeutique pour la plupart des patients a été limitée à une année, ceci est relatif au coût et aux modalités d'acquisition de l'Aldurazyme®

En effet, le prix d'un flacon de 5 ml d'Aldurazyme® 100 UI/ml est d'environ 714 euros¹²⁴, la posologie optimale est de 0.58 mg/kg/semaine c'est-à-dire 100 U/kg/semaine¹²⁵. Pour un poids moyen de 25 Kg, 5 flacons par semaine sont nécessaires, soit environ 3570 euros par semaine et par patient. De plus, une étude récente, met en garde sur les effets néfastes de l'arrêt de l'enzymothérapie substitutive, qui peut s'accompagner de plus de complications cliniques¹²⁶. Dans notre cohorte, ces complications n'ont pas été spécifiquement signalées.

L'analyse des GAG urinaires est un test de dépistage indispensable dans le cadre du diagnostic des mucopolysaccharidoses. En permettant une orientation rapide, il limite la multiplication des études enzymatiques ou moléculaires. Dans le cadre de ce travail, l'étude des GAG urinaire a été réalisée au moment du diagnostic chez 10/13 patients. Elle a mis en évidence chez tous les patients, une augmentation accrue de l'excrétion des GAG totaux, qui est comprise entre 6,7 et 95 fois la norme. Cette augmentation est due à l'élimination accrue de dermatane sulfate et d'héparane sulfate ; car en parallèle, l'analyse électrophorétique a permis de trouver dans tous les cas des bandes surnuméraires correspondant à ces deux substrats (100% des sujets présentent une double bande DSu + HSu). Dans le cas de la MPS IS et IS/H l'excrétion peut être faible voir comprise dans l'intervalle de référence. Ceci est dû à l'âge relativement avancé des patients au moment du diagnostic ; en effet, la concentration des GAG urinaire diminue considérablement avec l'âge. Cependant, les niveaux des GAG urinaires dans notre cohorte sont relativement importants (> 6 fois la norme) et ceci en dépit du fait que la quasi-totalité des patients étudiés, présentent une forme atténuée (MPS IS ou IS/H) et un âge diagnostic médian de 8 ans.

La mise en évidence du déficit enzymatique en α -L-iduronidase dans les leucocytes chez tous nos patients a permis de confirmer le diagnostic de MPS I. Par comparaison à l'activité d'un témoin normal de même âge, 5 patients présentaient un déficit enzymatique total (activité indétectable). Alors que les 8 restants ont une activité enzymatique inférieure à 25 %.

Nos résultats ne montrent pas une corrélation entre l'activité enzymatique et le phénotype des patients. En effet, dans le groupe des patients ayant un phénotype atténué, nous retrouvons aussi bien des niveaux d'activité indétectables, identiques à celui du patient P3 atteint de la forme sévère, que des activités résiduelles notables. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature, puisqu'aucune étude clinique n'a pu montrer une telle corrélation dans la MPS I.

Trente-huit pour cent des patients ont des niveaux d'activité enzymatique indétectables alors qu'une étude récente en Algérie portant sur l'activité enzymatique de 30 patients atteints de MPS I, retrouve seulement 10 % d'activité indétectable¹²⁷. En revanche, les études réalisées dans des pays voisins, ont également retrouvé une proportion plus importante de patients avec un niveau d'activité indétectable, soit 40% des patient en Tunisie¹⁰⁸ et 100% au Maroc¹⁰⁷.

Nos résultats cliniques sont soumis à certains biais : la cohorte est de faible effectif, le recueil de données est rétrospectif et le recrutement est réalisé en pédiatrie et cible la région oranaise. Ce qui peut ne pas refléter les caractéristiques cliniques de l'ensemble des cas de MPS I en Algérie.

La large variabilité du profil mutationnel du gène *IDUA* est considérée comme un facteur majeur de l'hétérogénéité clinique caractérisant la MPS I. Plusieurs travaux ont été réalisés à la recherche d'une corrélation entre génotype et phénotype des patients. Dans la présente étude, nous avons décrit pour la première fois, le profil mutationnel du gène *IDUA* dans une cohorte de 13 patients algériens atteints de la MPS I. Le recrutement concerne plus spécifiquement l'ouest algérien (C.H.U Oran). Pour cette étude, l'amplification et le séquençage de l'ADN génomique des 14 exons du gène *IDUA*, de leurs régions régulatrices, et de leurs jonctions intron–exon ont été réalisés. À noter que les techniques basées sur l'analyse de l'ADNc sont déconseillées dans la cadre de la MPS I, car la grande proportion des mutations de type non-sens, est à l'origine d'une instabilité des ARNm. Cette instabilité est induite en particulier par des mécanismes de type NMD « *nonsense mediated decay* », décrit précédemment par Neufled ou récemment par Almeida¹²⁸ chez des patients MPS I porteurs de ce type de mutations.

Dans ce travail, 4 mutations déjà connues dans la littérature ont été identifiées. Deux mutations sont de type faux-sens (p.P533R, p.E178K) et 2 autres de type non-sens (p.Y581X, p.Y167X).

La mutation p.P533R est largement prédominante dans notre cohorte, elle est retrouvée dans 21/26 allèles étudiés, soit chez 84% de nos patients. Elle est identifiée à l'état homozygote chez 10/11 patients et un seul cas hétérozygote. La mutation faux-sens p.P533R est située dans l'exon 11 (c.1598C>G), elle conduit à la substitution d'un acide aminé neutre (la proline) par un acide aminé

basique (l'arginine) en position 533 de la protéine IDUA, l'écart physicochimique entre ces deux acides aminés est important. Par ailleurs, le nucléotide muté et le résidu proline sont très conservés au cours de l'évolution ; les sites de prédiction SIFT et Mutation Taster concluent au caractère délétère de cette mutation. Cette mutation induit la synthèse d'une protéine mal repliée et partiellement fonctionnelle. Il a été démontré que cette protéine mutante IDUA p.P533R conservait une certaine activité catalytique résiduelle lors de son expression au niveau des cellules CHO-K1¹²⁹. Ceci laisse à penser que cette mutation serait associée aux phénotypes les moins graves. Nos résultats vont dans ce sens, puisqu'ils montrent la présence de la mutation p.P533R à l'état homozygote chez des patients présentant un phénotype atténué.

En revanche, les données de la littérature rapportent une large variabilité clinique chez les patients porteurs de ce génotype⁶⁷. En effet, on trouve la mutation p.P533R, aussi bien dans des phénotypes atténués que sévères. Cette mutation est d'ailleurs identifiée pour la première fois par Scott *et al* en 1993 chez des patients de phénotype sévère¹³⁰.

La forte proportion (84%) de cette mutation dans notre cohorte est en accord avec les résultats de Chkioua en Tunisie^{108,120,121} et ceux d'Alif au Maroc¹⁰⁷. Ces travaux rapportent la présence de la mutation p.P533R chez environ 64% des cas en Tunisie et 92% des patients marocains. Toutefois, dans ces études, cette mutation est associée à différents phénotypes. Par ailleurs, il est considéré que l'origine de cette mutation est méditerranéenne, avec un probable foyer fondateur en Sicile où elle est identifiée chez 11% des patients¹⁰⁷. Cette mutation est ainsi retrouvée dans d'autres pays méditerranéens comme l'Italie (6 à 13%)^{67,104}, l'Espagne (6 à 10%) et la Turquie (4.8%)^{67,104}. Cependant, une proportion relativement élevée est également observée au Brésil (11 à 14.5%)^{67,129} et en Russie (8%)¹⁰⁶. En revanche cette mutation n'est retrouvée dans la population européenne et nord-américaine que dans 3% des cas¹³⁰, et aucun cas n'a été identifié au Japon¹³¹. À l'inverse, aucune des deux mutations les plus fréquentes dans la population caucasienne (p.Q70X, p.W400X) n'a été trouvée dans notre étude.

La fréquence des unions entre apparentés dans les pays de l'Afrique du Nord, notamment entre cousins germains, qui est estimée à 32 % de l'ensemble des mariages tunisiens, et 22.6 % en l'Algérie, et pouvant parfois atteindre 60% dans les régions rurales¹²⁰, peut expliquer la forte proportion de la mutation p.P533R dans ces populations. Dans notre étude, le taux de consanguinité est de 85%. De plus, un biais de sélection provenant du recrutement de nos patients dans une seule région en Algérie (Ouest d'Algérie), peut être également avancé pour justifier la forte proportion de la mutation p.P533R dans la présente étude.

La **Figure 9** présente la distribution géographique et les proportions relatives des 3 mutations les plus fréquentes en fonction des pays.

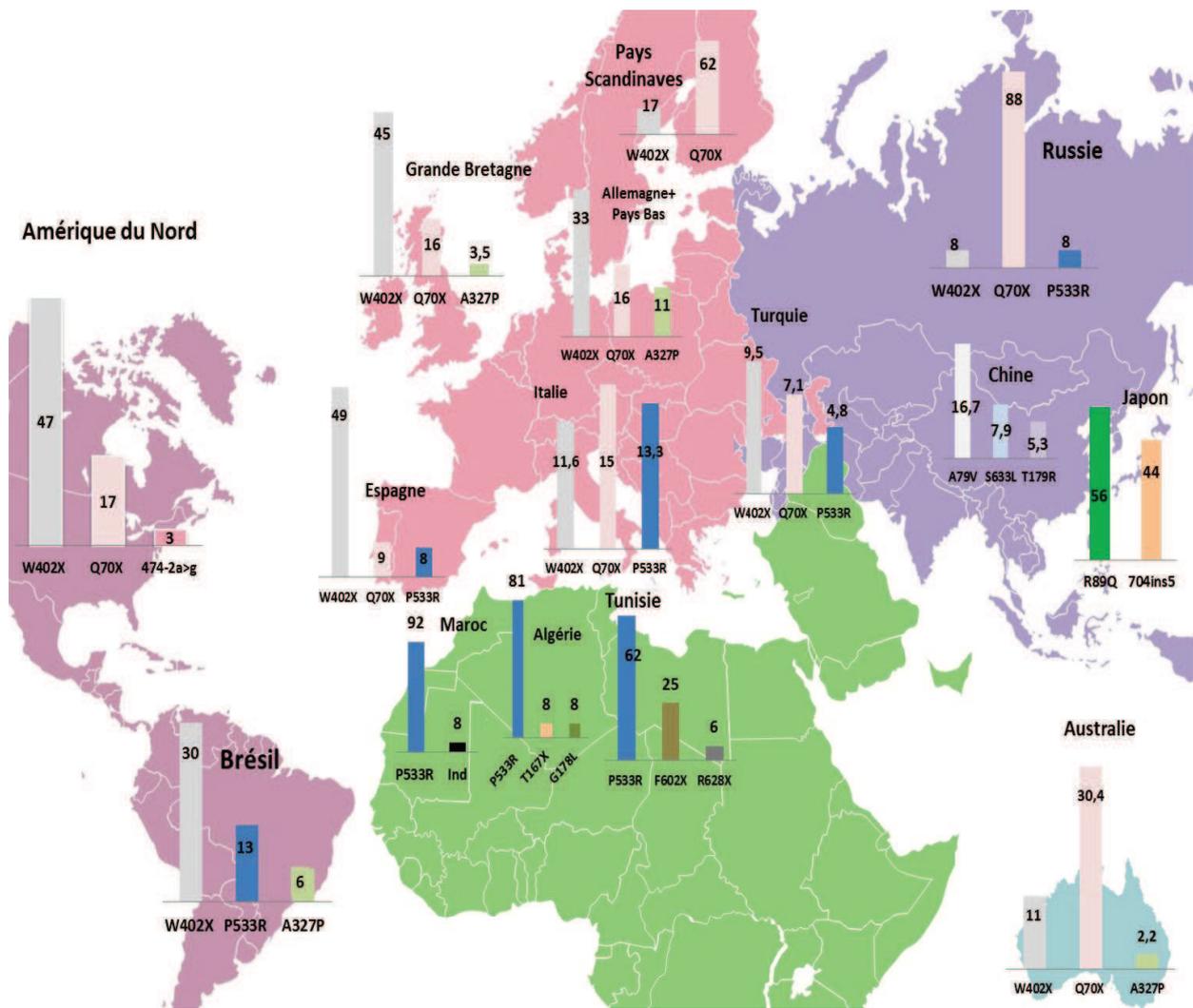


Figure 9 : Distribution géographique et fréquences relatives des mutations les plus communes en fonction des pays.

Les chiffres indiquent le pourcentage allélique des mutations dans chaque population, Au Maroc 8% des allèles ne sont pas identifiés (Ind). On peut remarquer la forte proportion de la mutation p.P533R dans les pays de l'Afrique du Nord. Elle est retrouvée aussi dans certains pays méditerranéens, mais également au Brésil et la Russie (URSS). Les mutations p.W402X et p.Q70X sont très fréquentes dans la population caucasienne.

La deuxième mutation faux-sens p.E178K a été identifiée au cours de ce travail chez le patient P7. Cette mutation est localisée dans l'exon 5 (c.532G>A), elle induit la substitution de l'acide glutamique par une lysine en position 178 de la protéine IDUA. Le nucléotide muté est moyennement conservé au cours de l'évolution alors que le résidu glutamate est très conservé. Il est à noter que l'écart physico-chimique entre ces deux acides aminés est peu important. Les sites de prédiction SIFT et Mutation Taster concluent au caractère délétère de cette mutation. Cette mutation n'a été documentée que dans trois cas : un patient italien en 2002 ¹³² et deux autres patients italien ¹⁰⁴ et chinois ¹²² en 2011 et 2012 respectivement. À noter, que dans ces trois cas, cette mutation est retrouvée à l'état hétérozygote, avec la délétion 134-145del12 chez le premier patient italien et la mutation non-sens p.W402X dans le travail de Bertola *et al*, tandis que le deuxième allèle muté n'a pas été identifié chez le patient chinois. Nous rapportons donc pour la première fois un patient porteur de cette mutation à l'état homozygote. En terme de corrélation génotype-phénotype, cette mutation semble atténuer la sévérité de la maladie, car les deux mutations 134-145del12 et p.W402X sont connues pour être associées à des phénotypes sévères lorsqu'elles sont retrouvées à l'état homozygote. Alors que dans le cas de ces deux patients italiens, les phénotypes étaient intermédiaires (MPS IH/S). La présence de cette mutation à l'état homozygote chez notre patient pourrait expliquer son phénotype atténué (MPS IS). Ce patient n'a été d'ailleurs diagnostiqué qu'à l'âge de 15 ans et il est parmi les rares sujets à ne pas avoir d'hépatosplénomégalie. Cependant, une telle corrélation doit être confirmée chez un nombre de sujet plus important, ou avec des modèles animaux, tels que les souris « *knock-in* » pour cette mutation comme celles utilisées dans une étude américaine récente pour la mutation p.W402X ¹³³.

La mutation non-sens p.Y581X est retrouvée chez le seul patient qui présente un phénotype sévère dans notre cohorte (P3), associée à la mutation p.P533R. Cette mutation est située dans l'exon 13 du gène *IDUA* (C.1743C>G). La mutation p.Y581X est rarement rapportée dans la littérature, 3 cas au total. Elle a été identifiée à l'état hétérozygote chez un patient d'origine croate ¹²¹ et chez un patient italien ¹⁰⁴. Plus récemment, en 2011, Chkioua *et al* ont décrit un patient tunisien de phénotype sévère porteur de cette mutation à l'état homozygote ¹²¹. La gravité de la maladie chez ce patient est en accord avec l'association des mutations ayant un fort impact sur la stabilité de l'ARNm aux phénotypes les plus sévères de la maladie ⁶⁷. Les mutations induisant un décalage de cadre lecture, celles ciblant les sites d'épissage et les mutations non-sens, sont parmi les mutations ayant un impact directe sur la stabilité de l'ARNm. Terlato *et al*. suggèrent que comparativement aux patients homozygotes pour la mutation non-sens p.W402X, les patients présentant les deux mutations p.P533R et p.W402X auraient une progression moins sévère ⁶⁷. Cette notion est retrouvée chez le patient P3 de phénotype sévère (MPS IH) qui n'a reçu aucun traitement spécifique et qui est décédé en cours de cette enquête à l'âge relativement tardif de 9 ans. En effet, l'âge moyen de décès des patients de phénotype sévère est de 3.8 ans dans le RIG.

La seconde mutation non-sens p.Y167X, est identifiée à l'état homozygote chez la patiente P2. Cette variation localisée dans l'exon 5 du gène *IDUA* (C.501C>G). Cette mutation a été décrite auparavant chez 2 patients à l'état hétérozygote : un patient d'origine indienne de phénotype atténué en association avec la mutation faux-sens p.C205Y¹³⁴. Un patient tchèque de phénotype sévère porteur d'un génotype, associant les deux mutations non-sens p.Q70X et p.Y167X a été rapporté⁸⁷. Dans ce présent travail, nous rapportons pour la première fois la présence de la mutation p.Y167X à l'état homozygote. La patiente P2 a été considérée comme ayant un phénotype intermédiaire (MPS IH/S) marqué par un retard intellectuel modéré, une hydrocéphalie nécessitant une intervention neurochirurgicale et une insuffisance respiratoire. Cependant, sa dysmorphie faciale est détectée précocement à l'âge de 14 mois rend sa classification en syndrome intermédiaire discutable. De plus, la sévérité de la maladie chez cette petite fille, âgée actuellement de 5 ans, concorde avec l'idée précédente de l'association entre les mutations non-sens et la forme la plus grave de la maladie.

Le polymorphisme est défini comme une variation génétique bénigne présente dans plus de 1 % de la population normale. Onze polymorphismes du gène *IDUA* ont été identifiés chez nos patients. L'association des polymorphismes p.A8A, p.A20A et p.Q33H, est décrite dans 81% de nos sujets. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature, qui décrivent très fréquemment cette triade^{104,135}. Elle est rapportée dans près de 70% des cas décrits par Chkioua en Tunisie.

La patiente P2 semble présenter un profil génétique distinct des autres. En effet, il présente 8 polymorphismes différents et la mutation causale p.Y167X, il présente 8 polymorphismes différents.

Il a été suggéré que certains polymorphismes non délétères, lorsqu'ils sont associés à la mutation causale, pourraient modifier le phénotype clinique⁶⁷. Chez les patients présentant en particulier des mutations faux-sens, comme par exemple la mutation majoritaire dans notre cohorte p.P533R, le phénotype pourrait être amélioré¹²⁰.

L'influence des polymorphismes (p.A8A, p.A20A et p.Q33H) sur le phénotype lié à la mutation p.P533R pourrait être suggérée. En effet, tous les patients de notre cohorte ayant un génotype associant la mutation causale p.P533R à ces trois polymorphismes sont de phénotype atténué. Cependant, un patient de phénotype sévère a été rapporté en Tunisie en présence de ces 3 polymorphismes et la mutation p.P533R¹²¹. L'analyse des phénotypes liés à la présence de la mutation p.P533R en fonction des polymorphismes présents sur un plus grand nombre de patients permettrait de mieux cerner l'effet de ces variations.

En absence d'une échelle de sévérité uniformément utilisée pour l'évaluation clinique des malades MPS I, les comparaisons des sujets dans différentes études et les corrélations génotype-phénotype sont très difficiles à établir. Par ailleurs, le profil mutationnel de notre cohorte peut ne pas refléter l'ensemble de la population algérienne car le recrutement cible uniquement la région de l'ouest

algérien. Les mutations retrouvées chez les patients de notre cohorte n'ont pas été recherchées chez les parents, cela est essentiellement dû à la difficulté pratique d'acheminement des prélèvements.

Conclusion

Au cours de ce projet, nous avons préalablement mis au point la technique de séquençage du gène IDUA, cela a permis d'élargir la liste de maladies héréditaires du métabolisme pour lesquelles ce type de diagnostic est réalisé au sein de notre laboratoire.

Nous rapportons pour la première fois, les résultats d'une étude descriptive d'une cohorte de 13 patients algériens atteints MPS I. Le recrutement a été réalisé au service de pédiatrie du CHU d'Oran en Algérie. L'objectif était de répertorier les caractéristiques cliniques, biochimiques et moléculaires des patients.

Notre cohorte comporte majoritairement des patients de phénotype atténué. Leurs données cliniques sont conformes aux données connues dans la littérature. Avec la présence quasi systématique d'une valvulopathie, d'une opacité cornéenne et de hernie ombilicale. En revanche, les signes de surcharge, comportant la dysmorphie faciale et l'hépatomégalie sont beaucoup plus fréquents chez les patients de notre cohorte. Ces signes d'appel pourraient expliquer le diagnostic précoce des patients et leurs recrutements dans un service pédiatrique. Par conséquent, les patients de notre cohorte sont plus jeunes, avec un âge médian de 13 ans contre 22 ans dans le RIG. Cependant, la forte proportion de forme atténuée dans cette étude est en désaccord avec l'ensemble des données de la littérature. Un biais de sélection par la maladie, avec une mortalité précoce des sujets atteints de forme grave, peut être avancé. De plus, en absence de critères cliniques ou biologiques permettant de distinguer les différents phénotypes, un biais de classement ne peut être écarté.

Les données biochimiques des patients sont compatibles avec le diagnostic de MPS I, avec une excrétion accrue de GAG urinaires pouvant atteindre parfois 95 fois la norme. Leurs profils électrophorétiques sont anormaux, avec présence systématique de bande de dermatane et héparane sulfate. L'étude enzymatique a confirmé le diagnostic de MPS I pour l'ensemble des patients.

Selon les recommandations européennes récentes pour la prise en charge de la MPS I, il faut établir le génotype au moment du diagnostic chez tous les patients¹¹⁷. En effet, certaines relations phénotype-génotype sont rapportées dans la littérature et pourraient permettre d'optimiser le suivi thérapeutique des patients.

Par ailleurs, en augmentant le nombre de cas décrits, ces études moléculaires systématiques pourraient également mettre en évidence d'éventuelles nouvelles relations phénotype-génotype ou confirmer d'autres.

Notre étude moléculaire, révèle la prédominance de la mutation p.P533R. Ce résultat est concordant avec les études réalisées dans d'autres populations d'Afrique du Nord^{107,108,120,121}. La forte proportion de mariages consanguins dans ces populations, est probablement à l'origine de cette fréquence élevée.

Cependant, la forte prédominance de phénotypes atténués et de la mutation p.P533R dans notre cohorte ne nous permet pas de conclure sur une relation génotype-phénotype.

De plus, une grande variabilité clinique est rapportée dans la littérature chez les patients porteurs de cette mutation. Cette hétérogénéité phénotypique, ne permet de prédire l'évolution de la maladie chez les patients de notre cohorte. En revanche, la forte prédominance de cette mutation dans la population maghrébine pourrait offrir une stratégie de diagnostic moléculaire moins coûteuse. Avec une recherche directe de la mutation p.P533R, puis un séquençage complet du gène *IDUA*, si cette mutation est absente.

Toutefois, l'analyse génétique complète et systématique du gène *IDUA* pourrait être informative et permettrait ainsi de rechercher une éventuelle influence des polymorphismes sur la sévérité de la présentation clinique.

Par ailleurs, la caractérisation du génotype et éventuellement le dépistage des hétérozygotes dans la famille constituerait des outils importants pour faciliter le conseil génétique et la réalisation d'un éventuel diagnostic prénatal.

Il est par ailleurs essentiel pour comprendre la physiopathologie de la MPS I et des MLS en général, d'analyser la structure tridimensionnelle des enzymes défectueuses. En effet, la compréhension des modifications conformationnelles induites par les différentes mutations causales constituerait ainsi dans l'avenir la base de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les MLS. Dans ce sens, les molécules chaperonnes seraient une option intéressante. Il est important également de poursuivre les études sur l'implication de l'autophagie dans la cascade physiopathologiques des MLS. Ces travaux pourraient ainsi offrir la possibilité de stratégies thérapeutiques innovantes.

Bibliographie

- 1 Bekri S. Diagnostic Biologique des Maladies Lysosomales. *Annale de Biologie Clinique* 2006; **64**: 592–600.
- 2 De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochememy journal* 1954; **60**: 604–17.
- 3 Fawcett DW. Chaper 8: Lysosomes. In: Fawcett DW, ed. *The Cell*, 2nd ed. , W. B. Saunders Company, 1981: 487–510.
- 4 Walkley SU. Pathogenic mechanisms in lysosomal disease: a reappraisal of the role of the lysosome. *Acta paediatrica* 2007; **96**: 26–32.
- 5 Vellodi A. Lysosomal storage disorders. *British journal of haematology* 2005; **128**: 413–31.
- 6 Novikoff AB, Novikoff PM, Quintana N DC. Studies IV. interrelations reticulum. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1973; **21**: 1010–20.
- 7 Huizing M, Helip-wooley A, Westbroek W, Gunay-aygun M, Gahl WA. Disorders of Lysosome-related Organelle Biogenesis: Clinical and Molecular Genetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008; **9**: 359–86.
- 8 Nixon R, Mathews P, Cataldo A. The neuronal endosomal-lysosomal system in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 2001; **3**: 97–107.
- 9 Garnotel R. Biochimie du lysosome: Place des cibles thérapeutiques. *Annale de Biologie Clinique* 2006; **64**: 590–2.
- 10 Saftig P, Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature reviews Molecular cell biology* 2009; **10**: 623–35.
- 11 Luzio JP, Rous B a, Bright N a, Pryor PR, Mullock BM, Piper RC. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *Journal of cell science* 2000; **113**: 1515–24.
- 12 Morgan AJ, Platt FM, Lloyd-Evans E, Galione A. Molecular mechanisms of endolysosomal Ca²⁺ signalling in health and disease. *The Biochemical journal* 2011; **439**: 349–74.
- 13 Reddy A, Caler EV, Andrews NW, Haven N. by Ca²⁺ -Regulated Exocytosis of Lysosomes. *Cell* 2001; **106**: 157–69.
- 14 Boya P. Lysosomal function and dysfunction: mechanism and disease. *Antioxidants & redox signaling* 2012; **17**: 766–74.
- 15 Watts C. The endosome-lysosome pathway and information generation in the immune system. *Biochimica et biophysica acta* 2012; **1824**: 14–21.

- 16 Aqul A, Liu B, M. Ramirez C, *et al.* Unesterified Cholesterol Accumulation in Late Endosomes/ Lysosomes Causes Neurodegeneration and is Prevented by Driving Cholesterol Export from this Compartment. *Journal of neuroscience* 2011; **31**: 9404–13.
- 17 Braulke T, Bonifacino JS. Sorting of lysosomal proteins. *Biochimica et biophysica acta* 2009; **1793**: 605–14.
- 18 Glickman JN, Kornfeld S. Mannose 6-phosphate-independent targeting of lysosomal enzymes in I-cell disease B lymphoblasts. *The Journal of cell biology* 1993; **123**: 99–108.
- 19 Elvevold K, Simon-Santamaria J, Hasvold H, McCourt P, Smedsrød B, Sørensen KK. Liver sinusoidal endothelial cells depend on mannose receptor-mediated recruitment of lysosomal enzymes for normal degradation capacity. *Hepatology* 2008; **48**: 2007–15.
- 20 Lefrancois S, Zeng J, Hassan AJ, Canuel M, Morales CR. The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *The EMBO Journal* 2003; **22**: 6430–7.
- 21 Ni X, Morales CR. The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor. *Traffic* 2006; **7**: 889–902.
- 22 Reczek D, Schwake M, Schröder J, *et al.* LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell* 2007; **131**: 770–83.
- 23 Eskelinen E-L, Tanaka Y, Saftig P. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends in Cell Biology* 2003; **13**: 137–45.
- 24 Bellier S. Les maladies lysosomales de l’homme et des animaux domestiques. *Revue de Médecine Vétérinaire* 2001; **152**: 435–46.
- 25 Huxtable CR, Dorling PR. Animal model of human disease. Mannosidosis. Swainsonine-induced mannosidosis. *American Journal Of Pathology* 1982; **107**: 124–6.
- 26 Neville HE, Maunder-Sewry CA, McDougall J, Sewell JR DV. Chloroquine-induced cytosomes with curvilinear profiles in muscle. *Muscle Nerve* 1979; **2**: 376–81.
- 27 Lee JH, Chung W-B, Kang JH, *et al.* A case of chloroquine-induced cardiomyopathy that presented as sick sinus syndrome. *Korean circulation journal* 2010; **40**: 604–8.
- 28 Staretz-Chacham O, Lang TC, LaMarca ME, Krasnewich D, Sidransky E. Lysosomal Storage Disorders in the Newborn. *Pediatrics* 2009; **123**: 1191–207.
- 29 Parkinson-Lawrence EJ, Shandala T, Prodoehl M, Plew R, Borlace GN, Brooks D a. Lysosomal storage disease: revealing lysosomal function and physiology. *Physiology* 2010; **25**: 102–15.
- 30 Poupetová H, Ledvinová J, Berná L, Dvůráková L, Kozich V, Elleder M. The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations. *Journal of inherited metabolic disease* 2010; **33**: 387–96.

- 31 Filocamo M, Morrone A, Metabolische PM, Neuroscienze D, Gaslini IG, Gaslini LG. Lysosomal storage disorders: Molecular basis and laboratory testing. *Human genomics* 2011; **5**: 156–69.
- 32 Wilcox WR. Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *The Journal of pediatrics* 2004; **144**: S3–14.
- 33 Ballabio A, Gieselmann V. Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochimica et biophysica acta* 2009; **1793**: 684–96.
- 34 Ruivo R, Anne C, Sagné C, Gasnier B. Molecular and cellular basis of lysosomal transmembrane protein dysfunction. *Biochimica et biophysica acta* 2009; **1793**: 636–49.
- 35 Dierks T, Schlotawa L, Frese M, Radhakrishnan K, Figura KV, Schmidt B. Molecular basis of multiple sulfatase deficiency, mucopolipidosis II/III and Niemann-Pick C1 disease - Lysosomal storage disorders caused by defects of non-lysosomal proteins. *Biochimica et biophysica acta* 2009; **1793**: 710–25.
- 36 Tamargo RJ, Velayati A, Goldin E, Sidransky E. The role of saposin C in Gaucher disease. *Molecular genetics and metabolism* 2012; **106**: 257–63.
- 37 Ishibashi S, Yamazaki T, Okamoto K. Association of autophagy with cholesterol-accumulated compartments in Niemann-Pick disease type C cells. *Journal of clinical neuroscience* 2009; **16**: 954–9.
- 38 Purpura DP, Einstein A. Pathogenic cascades in lysosomal disease-Why so complex? *Journal of inherited metabolic disease* 2009; **32**: 181–9.
- 39 Schultz ML, Tecedor L, Chang M, Davidson BL. Clarifying lysosomal storage diseases. *Trends in neurosciences* 2011; **34**: 401–10.
- 40 Vitner EB, Platt FM, Futerman AH. Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *The Journal of biological chemistry* 2010; **285**: 20423–7.
- 41 Jmoudiak M, Futerman AH. Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management. *British journal of haematology* 2005; **129**: 178–88.
- 42 Jeyakumar M. Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis. *Brain* 2003; **126**: 974–87.
- 43 Smith D, Wallom K-L, Williams IM, Jeyakumar M, Platt FM. Beneficial effects of anti-inflammatory therapy in a mouse model of Niemann-Pick disease type C1. *Neurobiology of disease* 2009; **36**: 242–51.
- 44 Wei H, Kim S-J, Zhang Z, Tsai P-C, Wisniewski KE, Mukherjee AB. ER and oxidative stresses are common mediators of apoptosis in both neurodegenerative and non-neurodegenerative lysosomal storage disorders and are alleviated by chemical chaperones. *Human molecular genetics* 2008; **17**: 469–77.
- 45 Futerman AH, van Meer G. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature reviews Molecular cell biology* 2004; **5**: 554–65.

- 46 Platt FM, Lachmann RH. Treating lysosomal storage disorders: current practice and future prospects. *Biochimica et biophysica acta* 2009; **1793**: 737–45.
- 47 Astarita L, Sibilio M, Generoso A. Lysosomal storage disorders: commonalities and differences. In: Rossella P, Generoso A, eds. *Lysosomal storage diseases*. , John libbey, 2010: 3–12.
- 48 Héron B, Guffon G. Progrès dans les maladies lysosomales. In: Cochat P, Chabro B, De Lonlay P, eds. *Maladies métaboliques héréditaires*. , Progrès en pédiatrie, 2011: 25–55.
- 49 Maier-redelsperger M, Fenneteau O. Aspects cytologiques des maladies de surcharge lysosomale. *Revue française des laboratoires* 1998; **303**: 31–5.
- 50 Groote CC. Extracerebral Biopsy in Lysosomal and Peroxisomal Disorders . Ultrastructural Findings. *brain pathology* 1998; **8**: 121–32.
- 51 Ruijter G. Mucopolysaccharidoses diagnostic approaches. 2012; : www.erndim.org.
- 52 De Jong JG, Wevers RA, Laarakkers C, Poorthuis BJHM. Dimethylmethylene blue-based spectrophotometry of glycosaminoglycans in untreated urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidoses. *Clinical chemistry* 1989; **35**: 1472–7.
- 53 Gray G, Claridge P, Jenkinson L, Green A. Quantitation of urinary glycosaminoglycans using dimethylene blue as a screening technique for the diagnosis of mucopolysaccharidoses – an evaluation. *Ann Clin Biochem* 2007; **44**: 360–3.
- 54 Tomatsu S, Gutierrez M a, Ishimaru T, *et al.* Heparan sulfate levels in mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses. *Journal of inherited metabolic disease* 2005; **28**: 743–57.
- 55 Auray-Blais C, Bhérer P, Gagnon R, *et al.* Efficient analysis of urinary glycosaminoglycans by LC-MS/MS in mucopolysaccharidoses type I, II and VI. *Molecular genetics and metabolism* 2011; **102**: 49–56.
- 56 Fuller M, Rozaklis T, Ramsay SL, Hopwood JJ, Meikle PJ. Disease-specific markers for the mucopolysaccharidoses. *Pediatric research* 2004; **56**: 733–8.
- 57 Tomatsu S, Montaña AM, Oguma T, *et al.* Validation of disaccharide compositions derived from dermatan sulfate and heparan sulfate in mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses II and III by tandem mass spectrometry. *Molecular genetics and metabolism* 2010; **99**: 124–31.
- 58 Mabe P, Valiente A, Soto V, Cornejo V, Raimann E. Evaluation of reliability for urine mucopolysaccharidosis screening by dimethylmethylene blue and Berry spot tests. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2004; **345**: 135–40.
- 59 Regnery C, Kornblum C, Hanisch F, *et al.* 36 months observational clinical study of 38 adult Pompe disease patients under alglucosidase alfa enzyme replacement therapy. *Journal of inherited metabolic disease* 2012. doi:10.1007/s10545-012-9451-8.
- 60 Sheth JJ, Sheth FJ, Oza NJ, Gambhir PS, Dave UP, Shah RC. Plasma chitotriosidase activity in children with lysosomal storage disorders. *Indian journal of pediatrics* 2010; **77**: 203–5.

- 61 Budak YU, Huysal K, Guray A. Urinary glycosaminoglycan excretion in patients with primary nocturnal enuresis. *Italian journal of pediatrics* 2010; **36**: 13.
- 62 Gieselmann V. What can cell biology tell us about heterogeneity in lysosomal storage diseases? *Acta Paediatrica* 2005; **94**: 80–6.
- 63 Thomas GH. “Pseudodeficiencies” of lysosomal hydrolases. *American journal of human genetics* 1994; **54**: 934–40.
- 64 Leistner S, Young E, Meaney C, Winchester B. Pseudodeficiency of arylsulphatase A: strategy for clarification of genotype in families of subjects with low ASA activity and neurological symptoms. *Journal of inherited metabolic disease* 1995; **18**: 710–6.
- 65 Maire I. Diagnostic biologique et moléculaire des maladies de surcharge lysosomale. *Revue française des laboratoires* 1998; **303**: 37–40.
- 66 Kroos M, Hoogeveen-westerveld M, Van Der Ploeg A, Reuser AJJ. The Genotype – Phenotype Correlation in Pompe Disease. 2012; **68**: 59–68.
- 67 Terlato NJ, Cox GF. Can mucopolysaccharidosis type I disease severity be predicted based on a patient’s genotype? A comprehensive review of the literature. *Genetics in medicine* 2003; **5**: 286–94.
- 68 Blanchard S, Sadilek M, Scott R, Turecek F, Gelb M. Tandem Mass Spectrometry for the Direct Assay of Lysosomal Enzymes in Dried Blood Spots: Application to Screening Newborns for Mucopolysaccharidosis I. *Clinical chemistry* 2010; **54**: 2067–70.
- 69 Orsini JJ, Martin MM, Showers AL, *et al.* Lysosomal storage disorder 4+1 multiplex assay for newborn screening using tandem mass spectrometry: application to a small-scale population study for five lysosomal storage disorders. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2012; **413**: 1270–3.
- 70 Paciotti S, Persichetti E, Pagliardini S, *et al.* First pilot newborn screening for four lysosomal storage diseases in an Italian region: Identification and analysis of a putative causative mutation in the GBA gene. *Clinica Chimica Acta* 2012; **413**: 1827–31.
- 71 Pennock CA, Barnes IC. The mucopolysaccharidoses. *Journal of medical genetics* 1976; **13**: 169–81.
- 72 Sharma NL, Singh R., Anand JS. Hurler’s Syndrome. *Indian journal of pediatrics* 1965; **32**: 301–6.
- 73 Mckusick VA. The Genetic Mucopolysaccharidoses. *Circulation* 1965; **1**: 1–4.
- 74 Scott HS, Anson DS, Orsborn AM, *et al.* Human alpha-L-iduronidase: cDNA isolation and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; **88**: 9695–9.
- 75 Scott HS, Litjens T, Nelson PV, *et al.* Identification of Mutations in the a-L-Iduronidase Gene (IDUA) That Cause Hurler and Scheie Syndromes. *American journal of human genetics* 1993; **53**: 973–86.

- 76 Shull RM, Kakkis ED, McEntee MF, Kania SA, Jonas AJ, Neufeld EF. Enzyme replacement in a canine model of Hurler syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; **91**: 12937–41.
- 77 Kakkis ED, McEntee MF, Schmidtchen A, *et al.* Long-term and high-dose trials of enzyme replacement therapy in the canine model of mucopolysaccharidosis I. *Biochemical and molecular medicine* 1996; **58**: 156–67.
- 78 Kakkis ED, Schuchman E, He X, *et al.* Enzyme replacement therapy in feline mucopolysaccharidosis I. *Molecular genetics and metabolism* 2001; **72**: 199–208.
- 79 Kakkis E, Muenzer J, Tiller G, *et al.* Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *The New England Journal of Medicine* 2001; **344**: 182–8.
- 80 Les Cahiers d'Orphanet. Prévalence des maladies rares: Données bibliographiques. 2012; : 1–30.
- 81 Krabbi K, Joost K, Zordania R, Talvik I, Rein R, Huijmans JG, Verheijen FV OK. The live-birth prevalence of mucopolysaccharidoses in estonia. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012; **16**: 846–9.
- 82 H.A.S. Mucopolysaccharidose De Type I. 2007; : Protocole National De Diagnostic et De Soins.
- 83 D'Aco K, Underhill L, Rangachari L, *et al.* Diagnosis and treatment trends in mucopolysaccharidosis I: findings from the MPS I Registry. *European journal of pediatrics* 2012; **171**: 911–9.
- 84 Mucopolysaccharide-Related Diseases. Society Aust. 2012.<http://www.mpsociety.org>.
- 85 Lin H-Y, Lin S-P, Chuang C-K, *et al.* Incidence of the mucopolysaccharidoses in Taiwan, 1984-2004. *American journal of medical genetics Part A* 2009; **149A**: 960–4.
- 86 Murphy AM, Lambert D, Treacy EP, O'Meara A, Lynch SA. Incidence and prevalence of mucopolysaccharidosis type 1 in the Irish republic. *Archives of disease in childhood* 2009; **94**: 52–4.
- 87 Vazna A, Beesley C, Berna L, *et al.* Mucopolysaccharidosis Type I in 21 Czech and Slovak Patients : Mutation Analysis Suggests a Functional Importance of C-Terminus of the IDUA Protein. *Medicine* 2009; **149**: 965–74.
- 88 Malm G, Lund AM, Månsson J-E, Heiberg A. Mucopolysaccharidoses in the Scandinavian countries: incidence and prevalence. *Acta paediatrica* 2008; **97**: 1577–81.
- 89 Moore D, Connock MJ, Wraith E, Lavery C. The prevalence of and survival in Mucopolysaccharidosis I: Hurler, Hurler-Scheie and Scheie syndromes in the UK. *Orphanet journal of rare diseases* 2008; **3**: 24.
- 90 Al-Maawali AA, Joshi SN, Koul RL, *et al.* Spectrum of paediatric lysosomal storage disorders in oman. *Sultan Qaboos University Medical Journal* 2012; **12**: 295–9.

- 91 Muenzer J, Wraith JE, Clarke LA. Mucopolysaccharidosis I: management and treatment guidelines. *Pediatrics* 2009; **123**: 19–29.
- 92 Martins AM, Dualibi AP, Norato D, *et al.* Guidelines for the management of mucopolysaccharidosis type I. *The Journal of pediatrics* 2009; **155**: S32–46.
- 93 Muenzer J. The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *The Journal of pediatrics* 2004; **144**: S27–34.
- 94 Kirkpatrick K, Ellwood J, Walker RWM. Mucopolysaccharidosis type I (Hurler syndrome) and anesthesia: the impact of bone marrow transplantation, enzyme replacement therapy, and fiberoptic intubation on airway management. *Paediatric anaesthesia* 2012; **22**: 745–51.
- 95 Thomas JA, Beck M, Clarke JTR, Cox GF. Childhood onset of Scheie syndrome, the attenuated form of mucopolysaccharidosis I. *Journal of inherited metabolic disease* 2010; **33**: 421–7.
- 96 Arn P, Whitley C, Wraith JE, *et al.* High rate of postoperative mortality in patients with mucopolysaccharidosis I: findings from the MPS I Registry. *Journal of pediatric surgery* 2012; **47**: 477–84.
- 97 Brands MMMG, Frohn-Mulder IM, Hagemans MLC, *et al.* Mucopolysaccharidosis: Cardiac features and effects of enzyme-replacement therapy in 24 children with MPS I, II and VI. *Journal of inherited metabolic disease* 2012. doi:10.1007/s10545-011-9444-z.
- 98 Nyhan W, Ozland P, Barshop B. Atlas of Metabolic Diseases, 2nd ed. , Oxford University Press, 2005.
- 99 Bodamer O. Clinical Characteristics of MPS I Patients in the MPS I Registry. *The American Society of Human Genetics* 2007; **San Diego**.
- 100 De Ru M, Teunissen QG, Lee JH, *et al.* Capturing phenotypic heterogeneity in MPS I: results of an international consensus procedure. *Orphanet journal of rare diseases* 2012; **7**: 22.
- 101 Arn P, Wraith JE, Underhill L. Characterization of surgical procedures in patients with mucopolysaccharidosis type I: findings from the MPS I Registry. *The Journal of pediatrics* 2009; **154**: 859–64.e3.
- 102 Aldenhoven M, de Koning TJ, Verheijen FW, *et al.* Dried blood spot analysis: an easy and reliable tool to monitor the biochemical effect of hematopoietic stem cell transplantation in hurler syndrome patients. *Biology of blood and marrow transplantation* 2010; **16**: 701–4.
- 103 Aronovich EL, Pan D, Whitley CB. Molecular genetic defect underlying alpha-L-iduronidase pseudodeficiency. *American journal of human genetics* 1996; **58**: 75–85.
- 104 Bertola F, Filocamo M, Casati G, *et al.* IDUA mutational profiling of a cohort of 102 European patients with mucopolysaccharidosis type I: identification and characterization of 35 novel α -L-iduronidase (IDUA) alleles. *Human mutation* 2011; **32**: 2189–210.
- 105 Cox GF, Wraith JE, Whitley C, Wijburg FA, Guffon N. Genotype frequencies in the MPS I Registry. *Molecular Genetics and Metabolism* 2009; **96**: S19.

- 106 Voskoboeva EY, Krasnopolskaya XD, Mirenburg TV, Weber B, Hopwood JJ. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: mutation analysis among the patients of the former Soviet Union. *Molecular genetics and metabolism* 1998; **65**: 174–80.
- 107 Alif N, Hess K, Straczek J, Sebbar S, Bou AN, Nabet P. Mucopolysaccharidosis type I: characterization of a common mutation. *Annals of human genetics* 1999; **63**: 9–16.
- 108 Chkioua L, Khedhiri S, Kassab A, *et al.* Molecular analysis of mucopolysaccharidosis type I in Tunisia: identification of novel mutation and eight Novel polymorphisms. *Diagnostic pathology* 2011; **6**: 39.
- 109 Hein LK, Hopwood JJ, Clements PR, Brooks D a. The α -l-iduronidase mutations R89Q and R89W result in an attenuated mucopolysaccharidosis type I clinical presentation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; **1639**: 95–103.
- 110 Bunge S, Clements PR, Byers S, Kleijer WJ, Brooks DA, Hopwood JJ. Genotype - phenotype correlations in mucopolysaccharidosis type I using enzyme kinetics, immunoquantification and in vitro turnover studies. *Biochimica et biophysica acta* 1998; **1407**: 249–56.
- 111 Children F, Peters C, Shapiro EG, *et al.* Hurler Syndrome: II. Outcome of HLA-Genotypically Identical Sibling and HLA-Haploidentical Related Donor Bone Marrow Transplantation in Fifty-Four Children. *Blood Cells* 1998; **91**: 2601–8.
- 112 Clarke L a, Wraith JE, Beck M, *et al.* Long-term efficacy and safety of laronidase in the treatment of mucopolysaccharidosis I. *Pediatrics* 2009; **123**: 229–40.
- 113 Wraith JE, Beck M, Lane R, *et al.* Enzyme replacement therapy in patients who have mucopolysaccharidosis I and are younger than 5 years: results of a multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase). *Pediatrics* 2007; **120**: e37–46.
- 114 Dickson PI, Ellinwood NM, Brown JR, *et al.* Specific antibody titer alters the effectiveness of intrathecal enzyme replacement therapy in canine mucopolysaccharidosis I. *Molecular genetics and metabolism* 2012; **106**: 68–72.
- 115 Shah S, Jens JK, Snella EM, *et al.* Replacing the Enzyme α -L-Iduronidase at Birth Ameliorates Symptoms in the Brain and Periphery of Dogs with Mucopolysaccharidosis Type I. *Science Translational Medecine* 2011; **2**: 1–18.
- 116 Matte U, Lagranha VL, de Carvalho TG, Mayer FQ, Giugliani R. Cell microencapsulation: a potential tool for the treatment of neuronopathic lysosomal storage diseases. *Journal of inherited metabolic disease* 2011; **34**: 983–90.
- 117 De Ru MH, Boelens JJ, Das AM, *et al.* Enzyme replacement therapy and/or hematopoietic stem cell transplantation at diagnosis in patients with mucopolysaccharidosis type I: results of a European consensus procedure. *Orphanet journal of rare diseases* 2011; **6**: 55.
- 118 Valayannopoulos V, Wijburg FA. Therapy for the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology* 2011; **50**: 49–59.
- 119 Brooks DA, Muller VJ, Hopwood JJ. Stop-codon read-through for patients affected by a lysosomal storage disorder. *Trends in molecular medicine* 2006; **12**: 367–73.

- 120 Chkioua L, Khedhiri S, Jaidane Z, *et al.* Mucopolysaccharidosis type I: identification of alpha-L-iduronidase mutations in Tunisian families. *Archives de pédiatrie* 2007; **14**: 1183–9.
- 121 Chkioua L, Khedhiri S, Turkia HB, *et al.* Mucopolysaccharidosis type I: molecular characteristics of two novel alpha-L-iduronidase mutations in Tunisian patients. *Diagnostic pathology* 2011; **6**: 47.
- 122 Wang X, Zhang W, Shi H, *et al.* Mucopolysaccharidosis I mutations in Chinese patients: identification of 27 novel mutations and 6 cases involving prenatal diagnosis. *Clinical genetics* 2012; **81**: 443–52.
- 123 Ashworth JL, Biswas S, Wraith E, Lloyd IC. The ocular features of the mucopolysaccharidoses. *Eye* 2006; **20**: 553–63.
- 124 Therapeutique.Info. <http://www.therapeutique.info>.
- 125 Giugliani R, Rojas VM, Martins AM, *et al.* A dose-optimization trial of laronidase (Aldurazyme) in patients with mucopolysaccharidosis I. *Molecular genetics and metabolism* 2009; **96**: 13–9.
- 126 Jurecka A, Zuber Z, Opoka-Winiarska V, Węgrzyn G, Tylki-Szymańska A. Effect of rapid cessation of enzyme replacement therapy: A report of 5 cases and a review of the literature. *Molecular genetics and metabolism* 2012. doi:10.1016/j.ymgme.2012.08.013.
- 127 Imessaoudene B, Hallal S, Ghouali MA, Berhoune A. La maladie de Hurler: à propos de 30 cas. *Revue Francophone des Laboratoires* 2011; **2011**: 73–6.
- 128 Almeida ACG, Pasqualim G, Mayer FQ, *et al.* Analysis of cDNA Molecules is Not Suitable for the Molecular Diagnosis of Mucopolysaccharidosis Type I. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B* 2012; **21**: 53–5.
- 129 Matte U, Yogalingam G, Brooks D, *et al.* Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients. *Molecular genetics and metabolism* 2003; **78**: 37–43.
- 130 Scott HS, Litjens T, Nelson PV, *et al.* Alpha-L-iduronidase mutations (Q70X and P533R) associate with a severe Hurler phenotype. *Human mutation* 1992; **339**: 333–9.
- 131 Yamagishi a, Tomatsu S, Fukuda S, *et al.* Mucopolysaccharidosis type I: identification of common mutations that cause Hurler and Scheie syndromes in Japanese populations. *Human mutation* 1996; **7**: 23–9.
- 132 Venturi N, Rovelli A, Parini R, *et al.* Molecular analysis of 30 mucopolysaccharidosis type I patients: evaluation of the mutational spectrum in Italian population and identification of 13 novel mutations. *Human mutation* 2002; **20**: 231.
- 133 Wang D, Shukla C, Liu X, *et al.* Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation. *Molecular genetics and metabolism* 2010; **99**: 62–71.

- 134 Beesley CE, Meaney CA, Greenland G, *et al.* Mutational analysis of 85 mucopolysaccharidosis type I families: frequency of known mutations, identification of 17 novel mutations and in vitro expression of missense mutations. *Human genetics* 2001; **109**: 503–11.
- 135 Li P, Wood T, Thompson JN. Diversity of mutations and distribution of single nucleotide polymorphic alleles in the human alpha- L -iduronidase (IDUA) gene. *Genetics in Medicine* 2002; **4**: 420–6.

Annexe 1

Définitions et structures des substrats accumulés dans les MLS

Molécules	Définitions et structures		Distributions
Spingolipides	Sphingomyélines	Sphingosine + AG + Phosphorylcholine	Gaine de myéline des nerfs
	Glycolipides	Galactosylcéramides : Sphingosine + AG + β D Galactose Glucosylcéramides : Sphingosine + AG + β D Glucose	Composant des membranes cellulaires Lipides membranaires, notamment tissu nerveux et cérébral
	Céramide	Oligosylcéramides : Sphingosine + AG + chaîne de plusieurs oses L'acide gras est saturé et à longue chaîne	Membranes cellulaires abondants dans les ganglions
Oligosaccharides	La partie osidique comporte: <ul style="list-style-type: none"> D mannose, D galactose 6-désoxyhexoses : L fucose Glucosamine et galactosamine souvent acétylés Acide N-acétylneuraminique (NANA) souvent terminal 	Le premier motif glucidique est fixé de façon covalente à la chaîne polypeptidique. La glycosylation de la protéine, qui peut être de trois types (N-glycosylation, C-glycosylation et O-glycosylation) selon l'acide aminé utilisé, asparagine (NH ₂), Tryptophane (en C2), sérine ou thréonine (OH) Les glycoprotéines ne renferment pas d'acide uronique ni des esters sulfatés dans leur structure	Membranes cellulaires
Glycoprotéines	Oligomères formés d'un nombre n d'oses (monosaccharides) par liaison glycosidique alpha ou beta. Les oligosaccharides se lient à des protéines (Glycoprotéines) ou à des lipides pour former des glycoconjugués		
Glucoaminoglycane (GAG)	Chondroïtine sulfate (CS)	Polymères simples composés de plusieurs unités de l'acide glucuronique liés en β 1-3 au N-acétyl galactosamine-6-sulfate. Chaque unité disaccharidique est reliée à la suivante par une liaison β 1-4.	Cartilage élastique, cartilage hyalin, os, derme, cornée
	Dermatane sulfate (DS)	Copolymères: structure proche du CS avec une épimérisation (en C5) plus ou moins complète, après synthèse de l'acide D-glucuronique en acide L-iduronique	Derme, tendon, ligament, cartilage fibreux
	Kératane sulfate	Copolymères dont le motif de base est composé de D-galactose et de N-acétylglucosamine qui sont liés entre eux par des liaisons β (1-4) et β (1-3). Cet hétéropolymère ne contient pas d'acide glucuronique, mais du galactose à sa place.	Cartilage, cornée
	Héparane sulfate	Copolymères dont l'unité de base est un acide hexuronique relié par une liaison 1-4 à une glucosamine	Foie, poumon, aorte
	Acide hyaluronique	Polymères simples formés de disaccharides eux-mêmes composés d'acide D-glucuronique et de D-N-acétylglucosamine, liés entre eux par des liaisons glycosidiques alternées beta-1,4 et beta-1,3.	Humeur vitrée, liquide synovial, tissus conjonctifs, épithéliaux et nerveux

Annexe 2

Liste des MLS en fonction des anomalies moléculaires et le type de substrats accumulés

Pathologies	Numéro OMIM	Protéine déficiente	Test dépistage	Test confirmation	
Mucopolysaccharidoses (MPS)					
MPS I / Syndrome de Hurler, H/S, Syndrome de Scheie	607014 607015 607016	α -L-Iduronidase	EC 3.2.1.76	GAG urinaire	Enzymatique et BM
MPS II / Syndrome de Hunter	309900	Iduronate-2-sulfatase	EC 3.1.6.13	GAG urinaire	Enzymatique et BM
MPS III A / Syndrome de Sanfilippo	252900	Héparane-N-sulfatase	EC 3.10.1.1	GAG urinaire	Enzymatique et BM
MPS III B / Syndrome de Sanfilippo	252920	α -N-Acétyleglucosaminidase	EC 3.2.1.50	GAG urinaire	Enzymatique et BM
MPS III C / Syndrome de Sanfilippo	252930	AcétylCoA : α -glucosaminide N-acétyltransferase	EC 2.3.1.3	GAG urinaire	Enzymatique et BM
MPS III D / Syndrome de Sanfilippo	252940	N-Acétyleglucosamine-6-sulfatase	EC 3.1.6.14	GAG urinaire	Enzymatique et BM
MPS IV A / Syndrome de Morquio	253000	N-acétylegalactosamine-6-sulfatase	EC 3.1.6.14	GAG urinaire	Enzymatique et BM
MPS IV B / Syndrome de Morquio	253010	β -Galactosidase	EC 3.2.1.23	GAG urinaire	Enzymatique et BM
MPS VI / Syndrome de Maroteaux-Lamy	253200	N-Acétylegalactosamine-4-sulfatase	EC 3.1.6.12	GAG urinaire	Enzymatique et BM
MPS VII / Syndrome de Sly	253220	β -Glucuronidase	EC 3.2.1.31	GAG urinaire	Enzymatique et BM
MPS IX	601492	Hyaluronidase	EC 3.2.1.35	GAG urinaire	Enzymatique et BM
Glycoprotéinoses					
Aspartyleglucosaminurie	208400	Aspartyleglucosaminidase	EC 3.5.1.26	Oligosaccharides urinaires	Enzymatique et BM
Fucosidose	230000	α -L-Fucosidase	EC 3.2.1.63	Oligosaccharides urinaires	Enzymatique et BM
α -Mannosidose de type I/II	248500	α -D-Mannosidase	EC 3.2.1.24	Oligosaccharides urinaires	Enzymatique et BM
β -Mannosidose	248510	α -D-Mannosidase	EC 3.2.1.25	Oligosaccharides urinaires	Enzymatique et BM
Mucopolipidose I / sialidose de type I/II	256550	α -D-Neuraminidase	EC 3.2.1.18	Oligosaccharides sialylés urinaires	Enzymatique et BM
Maladie de Schindler de type I/II	104170	α -N-Acétylegalactosaminidase	EC 3.2.1.49	Oligosaccharides urinaires	Enzymatique et BM

Annexe 2 (suite)

Pathologies	Numéro OMIM	Protéine déficiente		Test dépistage	Test confirmation
Sphingolipidoses					
Maladie de Fabry	301500	α -Galactosidase A	EC 3.2.1.22	Concentration globotriaosylceramide (Gb3)	Enzymatique et BM (chez la femme)
Lipogranulomatose de Farber / Maladie de Farber	228000	Céramidase	EC 3.5.1.23	Catabolisme du céramide	Enzymatique et BM
Maladie de Gaucher type I/II/III	230800, 230900, 231000	β -Glucocérébrosidase	EC 3.2.1.45	Ferritine, ECA, chitotriosidase	Enzymatique et BM
Maladie de Gaucher atypique	176801	Saposine C	/		BM
GM1 gangliosidosis type I/II/III	230500	β -Galactosidase	EC 3.2.1.23		Enzymatique et BM
GM2-Gangliosidose de type I	272750	β -Hexosaminidase A	EC 3.2.1.52		Enzymatique et BM
Maladie de Tay-Sachs					Enzymatique et BM
GM2-Gangliosidose de type II	268800	β -Hexosaminidase A et B			Enzymatique et BM
Maladie de Sandhoff					Enzymatique et BM
GM2-Gangliosidose de type A/B	272800	GM2 activateur	/		BM
Maladie de Krabbe	245200	Galactocérébrosidase	EC 3.2.1.46		Enzymatique et BM
Maladie de Krabbe		Saposine A	/		BM
Leucodystrophie métachromatique	250100	Arylsulfatase A	EC 3.1.6.1	Sulfatide urinaire	BM
Leucodystrophie métachromatique	249900	Saposine B	/	Sulfatide urinaire	BM
Maladie de Niemann-Pick de type A et B	257200 607625	Sphingomyélinase acide	EC 3.1.4.12	Test à la filipine, Chitotriosidase	Enzymatique et BM
Autres lipidoses					
Maladie de Niemann-Pick type C1 et C2	257220, 607625	NPC1, NPC2	/	Test à la filipine, Chitotriosidase	Enzymatique et BM
Maladie de stockage en esters de cholestérol Maladie de Wolman	278000	Lipase acide	EC 3.1.1.13		Enzymatique et BM
Céroïde-lipofuscinose neuronale 1, CLN1 / Maladie de Santavuori	256730	Palmitoyl protéine thioesterase	EC 3.1.2.22	Étude anatomopathologique	Enzymatique et BM
Céroïde-lipofuscinose neuronale 2, CLN2 / Maladie de Jansky-Bielschowsky	204500	Tripeptidyl peptidase I	EC 3.4.14.9	Étude anatomopathologique	Enzymatique et BM
Céroïde-lipofuscinose neuronale 3, juvénile CLN3 / Maladie de Batten	204200	CLN3P	/	Étude anatomopathologique	BM
Céroïde-lipofuscinose neuronale 5, CLN5	256731	CLN5P	/	Étude anatomopathologique	BM
Céroïde-lipofuscinose neuronale 6, CLN6	601780	CLN6P	/	Étude anatomopathologique	BM
Céroïde-lipofuscinose neuronale 8, CLN8 / Epilepsie de Northerm	600143	CLN8P	/	Étude anatomopathologique	BM
Céroïde-lipofuscinose neuronale 9, CLN9	609055	Protéine régulatrice de dihydrocéramide synthétase.	/	Étude anatomopathologique	BM
Céroïde-lipofuscinose neuronale 10, CLN10	610127	Cathépsine D	/	Étude anatomopathologique	BM

Annexe 2 (suite)

Pathologies	Numéro OMIM	Protéine déficiente		Test dépistage	Test confirmation
Glycogénoses					
Glycogénose type II / Maladie de Pompe	232300	α-Glucosidase	EC 3.2.1.20		Enzymatique et BM
Déficit enzymatique multiple					
Déficit multiple en sulfatases	272200	SUMF1	/	GAG + Sulfatide urinaire	Enzymatique et BM
Galactosialidose	256540	PPCA	/	Oligosaccharides urinaires	Enzymatique
Mucopolidose II/IIIA / Maladie de I-cell; pseudo-Hurler polydystrophie	252500 252600	N-acétylglucosamine-1-phosphotransferase	EC 2.7.8.15		Enzymatique
Mucopolidose de type IIIC / Pseudo-Hurler	252605	N-acétylglucosamine-1-phosphotransférase (sous-unité g)	/		Enzymatique
Sphingolipidose complexe	176801	Prosaposine	/		BM
Déficits en transporteurs lysosomaux					
Cystinose	219800	Cytonisine	/	Cystine intraleucocytaire	BM
Maladie de surcharge en acide sialique / Salla disease	269920	Sialine	/	Acide sialique urinaire, fibroblaste	BM
	604369				
Maladie d'Alzheimer précoce	600047	ABCA2	/		BM
Autres déficits					
Maladie de Danon	300257	LAMP-2	/	Maltase acide, anapathologie, immunohistochimie	BM
Mucopolidose IV	252650	Mucopolipine 1	/		BM
Pycnodysostose	265800	Cathépsine K	EC 3.4.22.38	clinique	
Ostéopétrose	259700	ATPase H ⁺ vacuolaire	/		
		OSTM1			
		CIC-7			
Sialurie	269921	UDP-N-acétylglucosamine 2-épimérase	EC 5.1.3.14		

Annexe 3

Listes des amorces utilisées pour le séquençage du gène IDUA

Amplicons		Séquences d'amorces	Taille d'amorce	Taille (pb) des produits de PCR	Température d'hybridation T°C
Promoteur	F	AGGGCCCAGTGTGCTCTTC	20	444	59,6
	R	GCCTCCGGGTCGGAGTC	17		60,4
Exon 1	F	AGCGTTCTTCTGAGCGCTTT	20	519	61,7
	R	AGGGAGCTCCGGTCTCTG	18		60,5
Exon 2	F	CCCTCGTCTTACTGCTGCTG	20	487	60,1
	R	CCAGCAAGGACACGCTCT	18		60,1
Exon 3	F	CATACCAGGCCTTCATAGGG	20	452	59,4
	R	CAAACCCTGGAACACAGGAG	20		60,5
Exon 4	F	CCCTCTGAGTCCTTGGATG	20	378	59,1
	R	CCACCAACCTATCCCTTGTC	20		59,3
Exon 5	F	GCATGGAGATGGGGTTCAT	19	318	60,7
	R	GAGCACTGCGTCTACACCTG	20		59,6
Exon 6	F	TTGACAACGTCTCCATGACC	20	479	59,5
	R	CCTGCTCCAGGATGGAGAT	19		60,1
Exon 7	F	CCACGACGGTACCAACTTCT	20	495	60
	R	GTGTTGGCCAGTAGCAGGTT	20		60,2
Exon 8.1	F	ATCTCCATCCTGGAGCAGG	19	423	60,2
	R	GGGTGTTGTTGACCTGGAAG	20		60,4
Exon 8.2	F	AACCTGCTACTGGCCAACAC	20	357	60,2
	R	CTCCCCTGGTGAAGGAGTC	20		61
Exon 9	F	CTGGGGACTCCTTCACCAAG	20	442	62
	R	AGGTAGCGCGTGACGTAGAC	20		60,5
Exon 10	F	ATCTACGCGAGCGACGAC	18	470	60,1
	R	GGTCCTCAGGGTTCTCCAG	19		59,6
Exon 11-12	F	GTGTGGGTGGGAGGTGGA	18	570	63
	R	ACAGTGTGTGGGGTGAAGG	19		59,4
Exon 13	F	CCTAGGGGACATGAGATGGA	20	471	59,9
	R	CTCGGTAGGAGCCAGAGACA	20		60,5
Exon 14	F	CAGGGCAGTACTGGGTGG	18	331	62
	R	TATATTGCAAAGGGGGTGATG	21		62

Annexe 4

Tableau indiquant le code international de correspondance à une et trois lettres, utilisé pour désigner chacun de des vingt acides aminés.

Nom complet de l'acide aminé	Code à une lettre	Code à trois lettres
Alanine	A	Ala
Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn
Aspartate ou acide aspartique	D	Asp
Cystéine	C	Cys
Glutamate ou acide glutamique	E	Glu
Glutamine	Q	Gln
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu
Lysine	K	Lys
Méthionine	M	Met
Phénylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro
Sérine	S	Ser
Thréonine	T	Thr
Tryptophane	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valine	V	Val

Par délibération en date du 03 Mars 1976, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

