

Davide Moro  
Travail de maîtrise 2012-2013

L'étude des Biomarqueurs dans la maladie  
de Fabry



Travail de master en médecine n° 18

# Les biomarqueurs dans la maladie de Fabry: relation entre Sphingosine-1 phosphate et Lyso-Gb3

## Étudiant

Davide Moro

## Tuteur

Docteur Nouredine Brakch  
Maître de recherche et d'enseignement-1, Service de Néphrologie,  
CHUV, Université de Lausanne

## Expert

Prof. Dr. Med. Luca Gabutti  
Chef de Service de Médecine Interne  
Hôpital Régional de Locarno- EOC, Tessin

Lausanne, decembre 2012

## **Abstract**

### **Problématique :**

La maladie de Fabry est une maladie métabolique à stockage lysosomal. C'est une maladie héréditaire à transmission récessive qui concerne l'enzyme alpha-Galactosidase A. Le gène de l'alpha-Galactosidase A (GLA) se trouve au niveau du bras long du chromosome X «carté en Xq21.33-Xq22 ». L'enzyme muté ne recouvre plus son rôle catabolisateur et il ne métabolise pas le substrat globotriaosylceramide (Gb<sub>3</sub>). Par conséquence le Gb<sub>3</sub> s'accumule dans tous les tissus. Dans les parois des vaisseaux sanguins le Gb<sub>3</sub> s'accumule dans l'endothélium, la tunique interne des vaisseaux sanguins. Ce déficit métabolique se traduit par l'épaississement de la paroi vasculaire, des processus d'infarctus et ischémies du tissu cardiaque, rénal et cérébral. L'implication cardiaque de la maladie de Fabry est décrite chez plus de 78% des patients affectés par la maladie et se manifeste par une hypertrophie cardiaque du ventricule gauche. Toutefois, il n'existe pas de relation étroite entre hypertrophie cardiaque et le Gb<sub>3</sub>. La sphingosine 1-phosphate a été identifiée dans notre laboratoire et proposée comme facteur de croissance à l'origine du remodelage cardiovasculaire. De plus, la Globotriaosylsphingosine (Lyso-Gb<sub>3</sub>) a été aussi proposée comme facteur vasoactif chez les patients Fabry.

### **Objectif :**

L'identification d'un biomarqueur pour le diagnostic et le suivi thérapeutique de la maladie de Fabry représente un domaine d'investigation active en recherche scientifique. Le Gb<sub>3</sub> plasmatique ou dans les urines, la biopsie rénale ou cardiaque qui est mis en évidence grâce à la microscopie électronique sous forme de corps concentrique lamellaires, constituent les biomarqueurs classiques de la maladie de Fabry. Dernièrement, le Lyso-Gb<sub>3</sub> et le Sphingosine-1 phosphate (S<sub>1</sub>P) ont été proposés comme marqueurs du remodelage cardiovasculaire. Le but de ce travail est de rassembler et de discuter la littérature concernant ces nouveaux marqueurs et, d'étudier une possible interaction entre Lyso-Gb<sub>3</sub> et le S<sub>1</sub>P.

### **Méthodologie :**

Rassembler la littérature scientifique et analyser l'implication de ces marqueurs dans la maladie de Fabry et leur effets cardiovasculaires. De plus, un travail expérimental est effectué. Ce travail consiste en l'identification d'une relation possible entre le Lyso-Gb<sub>3</sub> et le S<sub>1</sub>P.

### **Résultats :**

Avec ce travail on a cherché à actualiser et mettre à jour les notions concernant les biomarqueurs qui prennent place dans cette pathologie et les connaissances qu'on possède à ce jour sur les manifestations cardiovasculaires et neurologiques. La recherche d'un biomarqueur prime par le fait qu'un nombre considérable de patients est sous-diagnostiqués pour la maladie de Fabry et que entre les taux de substrat enzymatique accumulé dans les tissus et l'hypertrophie cardiaque, on peut constater une discordance. Grâce à ce travail expérimental, on a exclu la possibilité d'un effet précurseur du lyso-Gb<sub>3</sub> pour le S<sub>1</sub>P. Nous avons montré que le Lyso-Gb<sub>3</sub> est reconnu par les récepteurs du S<sub>1</sub>P avec des effets communs pour les S<sub>1</sub>P1-3 et différents pour le S<sub>1</sub>P2. Les taux du Lyso-Gb<sub>3</sub> et du S<sub>1</sub>P doivent être mesurés chez les patients Fabry et une stratégie thérapeutique doit prendre en compte le rapport S<sub>1</sub>P/Lyso-Gb<sub>3</sub>.

### **Mot clés :**

**Maladie de Fabry, Sphingosine 1-Phosphate (S<sub>1</sub>P), Globotriaosylceramide (Gb<sub>3</sub>), Globotriaosylsphingosine (Lyso-Gb<sub>3</sub>), système cardiovasculaire, biomarqueurs.**

## **Tables des matières**

<b>Abréviations.....</b>	<b>1</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>2</b>
Les cellules et ses organelles.....	2
Mecanisme de traficking intracellulaire.....	2
Le Lysosome.....	3
Table I: Nomenclature de certaines maladies lysosomales et les enzymes incriminés.....	5
La maladie de Fabry et ses manifestations cliniques.....	6
<b>Le but de ce travail.....</b>	<b>9</b>
<b>La maladie de Fabry et l'appareil cardiovasculaire.....</b>	<b>10</b>
L'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) comme cardiomyopathie dans la maladie de Fabry...10	
Les aspects vasculaires de la Maladie de Fabry.....	12
<b>Les manifestations neurologiques de la maladie de Fabry.....</b>	<b>13</b>
<b>La thérapie dans la maladie de Fabry.....</b>	<b>15</b>
La thérapie avec transplantation de moelle osseuse.....	16
Le traitement de substitution enzymatique (TES).....	16
Autres thérapies.....	17
<b>Introduction sur la notion de Biomarqueur.....</b>	<b>18</b>
<b>L'électrocardiogramme et la maladie de Fabry.....</b>	<b>18</b>
Anomalies de l'électrocardiogramme (ECG) dans la Maladie de Fabry.....	18
L'électrocardiogramme physiologique.....	18
Le tracé de l'ECG.....	19
L'ECG chez les patients Fabry.....	20
L'ECG dans les pathologies à dépôt amyloïde.....	21
<b>Les biomarqueurs lipidiques dans maladie de Fabry.....</b>	<b>22</b>
Le Globotriaosylcéramide (Gb <sub>3</sub> ) et le lysoGlobotriaosylcéramide (Lyso-Gb <sub>3</sub> ou iGb <sub>3</sub> ).....	22
La sphingosine 1-phosphate (S <sub>1</sub> P).....	24
<b>Les biomarqueurs non-lipidiques dans la maladie de Fabry.....</b>	<b>25</b>

<b>État pro-thrombotique, athérosclérose, monoxyde d'azote et radicaux libres, myeloperoxydase et anémie.....</b>	<b>25</b>
<b>Travail expérimental.....</b>	<b>26</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>37</b>
<b>Travail expérimental : la méthode (Annexe).....</b>	<b>39</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>41</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>48</b>

## **Abréviations**

alpha-Gal A	Alpha-Galactosidase A
AGALA	Agalase alpha- Replagal
AGALB	Agalase Beta- Fabrazyme
AVC	Accident cérébral vasculaire
BAV	Bloc atrio-ventriculaire
BBB	Blood brain barrier
BM	Biomarqueur
CMH	Cardiomyopathie hypertrophique
EIM	Épaississement Intimo-Médial
ECG	Electrocardiogramme
FMD	Flow-mediated Dilatation
Gb <sub>3</sub>	Globotriaosylceramide
GLA	Gène GLA
HVG	Hypertrophie ventriculaire gauche
MRI/IRM	Magnetic Risonance Imagery
Lyso-Gb <sub>3</sub>	Globotriaosylsphingosine
MF	Maladie de Fabry
MPO	Mieloperoxydase
MSL	Maladie de stockage lysosomiale
NO	Monoxyde de azote
ROS	Radicaux libre d'oxygène
S <sub>1</sub> P	Sphingosine 1 –phosphate
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
TES	Thérapie enzymatique substitutive
VC	Vasculopathie cérébrale
VD	Ventricule droit
VG	Ventricule gauche
VSMC	Cellules musculaires lisses vasculaires

## **La cellule et ses organelles**

La cellule est l'unité fonctionnelle d'un organisme vivant. On peut prendre en considération deux types de cellules: les eucaryotes et les procaryotes. La différence substantielle c'est que les cellules eucaryotes possèdent un noyau (contenant l'ADN) séparé du reste du contenu cellulaire. Les cellules eucaryotes ont des spécialisations plus affinées par rapport aux cellules procaryotes. De plus, les mécanismes biochimiques sont de loin plus évolués et complexe. L'autre particularité des cellules eucaryotes est leur organisation en compartiments: le métabolisme et la synthèse de macromolécules prennent place à l'intérieur de la cellule dans des espaces particuliers et régulés séparément les organites.

L'être humain est constitué par ce dernier type de cellule; dans son corps, il y a au moins 200 différents types de cellules eucaryotes. Ces cellules sont subdivisées par des membranes en bicouches lipidiques. À l'intérieur de la cellule il y a un espace large qui contient de nombreux composants en solution, le cytoplasme. Des membranes supplémentaires divisent l'espace intracellulaire en différents compartiments (espace confiné aux réactions biochimiques). Chaque compartiment à un but bien précis concernant l'hémostase cellulaire. Ces compartiments sont appelés des organelles. L'organelle le plus gros c'est le noyau.

Le réticulum endoplasmique, important pour la synthèse des protéines, est relié au noyau à travers la membrane externe de celui-ci. Un autre organelle, qui est lui aussi constitué par une bicouche lipidique membranaire, est l'appareil de Golgi. Les endosomes et les exosomes sont des vésicules qui ont comme fonction de favoriser les échanges de substances entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire. D'autres organelles importants dans le métabolisme cellulaire, sont les mitochondries. Les peroxisomes et les lysosomes, ce dernier fortement impliqué dans notre travail, sont des organelles petits et globuleux qui jouent un rôle essentiel dans la catabolisation de certaines macromolécules ou, en particulier pour les peroxisomes, pour la protection contre des agents infectieux ou la protection de l'environnement cellulaire en cas de formation intracellulaire de radicaux libres.(1)

## **Mécanisme de trafficking intracellulaire**

Dans ce mécanisme il y a 5 acteurs principaux qui jouent leur rôle de la translocation protéique : les protéines en cours de biosynthèse, le ribosome, le réticulum endoplasmique rugueux (REr) l'appareil de Golgi et les lysosomes/endosomes. Les protéines sont reconnues par un récepteur au niveau du REr puis, une translocation vectorielle est opérée (2). Cette translocation à comme but la maturation et le transport des protéines à l'intérieur de la cellule pour être soit sécrétées, soit faisant partie de la transmission des signaux en jouant parfois le rôle de récepteur au niveau de certains organelles ou à la surface cellulaire. Le parcours est le suivant: les ribosomes, unités cellulaires impliqués dans la traduction des ARNm en protéines favorisent la formation du peptide-signal (PS). Ce dernier est reconnu par un récepteur (signal receptor peptide- SRP) situé au niveau de la membrane du REr. La liaison PS-SRP détermine aussi l'ancrage transitoire du ribosome à la membrane du REr pour toute la période de traduction de la protéine. Une fois celle-ci terminée, la protéine peut se situer soit à l'intérieur de la lumière du REr est alors destinée à être transportée dans l'appareil de Golgi, soit au niveau de la membrane du REr, destinée à jouer un rôle «de transmission des signaux» vers l'intérieur du REr.

Les protéines et les enzymes, après traduction et clivage du PS, s'acheminent vers l'appareil de Golgi où elles subissent des modifications post-traductionnelles (3). En 1986, Reitman et Kornfeld

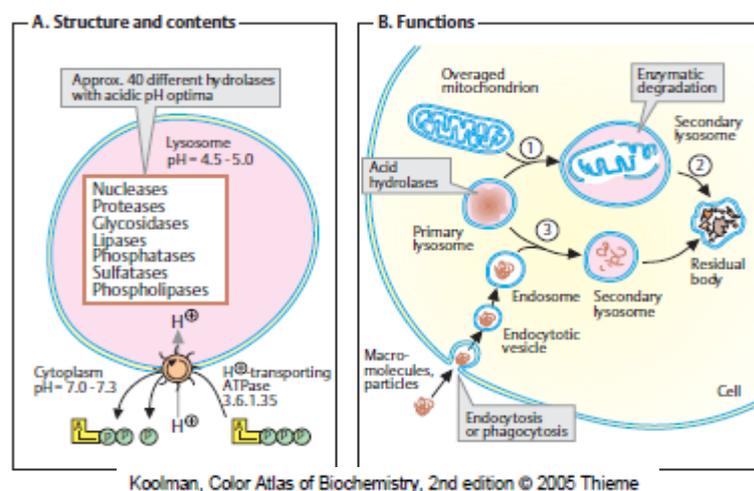
ont identifié le « signe moléculaire » qui permet la ségrégation des enzymes lysosomales vers les lysosomes. C'est l'acquisition d'un phosphate sur un carbone en position 6 d'un mannose faisant partie d'un oligosaccharide qui donne lieu à ce signe de reconnaissance (mannose 6-phosphate) (4). Ces pro-enzymes lysosomales se lient, ensuite, à des récepteurs situés dans les compartiments terminaux du Golgi et ce complexe liant (Man6-P)- récepteur est emballé dans des vésicules enrobées de clathrine (Sahagian et Steer, 1985) (5). Ces vésicules se dirigent ensuite vers des endosomes prélysosomales et fusionnent à ce compartiment pour donner le lysosome primaire (*Figure 1C*).

La localisation intracellulaire des enzymes lysosomales s'effectue grâce à un signal de ciblage (Man6-P) reconnu par un récepteur spécifique. La formation du complexe récepteur-Man6-P assure le transport vers les lysosomes.

## Le lysosome

Le lysosome est une organelle intracellulaire constituée d'une bicouche phospholipidique dans lequel se trouve une variété d'enzymes hydrolytiques qui sont impliqués dans la digestion des substrats complexes comme les mucopolysaccharides et les sphingolipides. Ces enzymes transforment ces substrats en produits solubles (produits de dégradation) (*Figure 1A*). Ces molécules de haut poids moléculaire, en général, dérivent du turnover des autres organelles intracellulaires qui entrent dans le lysosome grâce au processus d'autophagocytose où elles peuvent être métabolisées à partir de l'environnement extracellulaire à travers le processus de phagocytose (*figure 1B*). Dans le cas d'une dysfonction ou manque d'une enzyme lysosomale, le catabolisme des substrats susmentionnés est incomplet. Il en résulte une accumulation de métabolites insolubles partiellement dégradés qui s'accumulent à l'intérieur des lysosomes (4). (*Figure 2*).

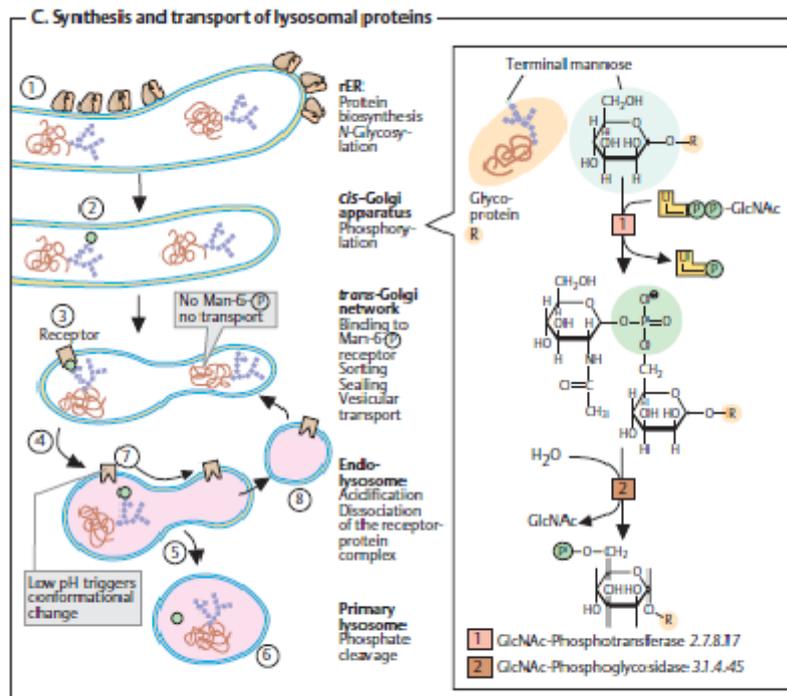
Les maladies de stockage lysosomiales peuvent être subdivisées en différentes catégories basées sur la nature biochimique du substrat et du métabolite qui s'accumule. (Table I)



***Figure 1A (Structure&contents) et 1B (Functions).***

**A. Pour avoir un environnement acide favorable au bon fonctionnement des enzymes catabolisatrices, au niveau de la membrane lysosomale on trouve des pompes à protons qui utilisent le clivage de l'ATP en ADP+P pour transporter contre gradient à l'intérieur du lysosome les ions H<sup>+</sup>. Le pH à l'intérieur des lysosome est acide (4-5).**

**B. Schéma des fonctions du lysosome représentant la dégradation d'une mitochondrie obsolète par auto-phagie. Au cours de ce processus, le lysosome primaire se transforme en lysosome secondaire, dans lequel la dégradation hydrolytique prend place. Le lysosome secondaire contient les éléments résiduels non digérés par le processus de dégradation enzymatique lysosomale.**

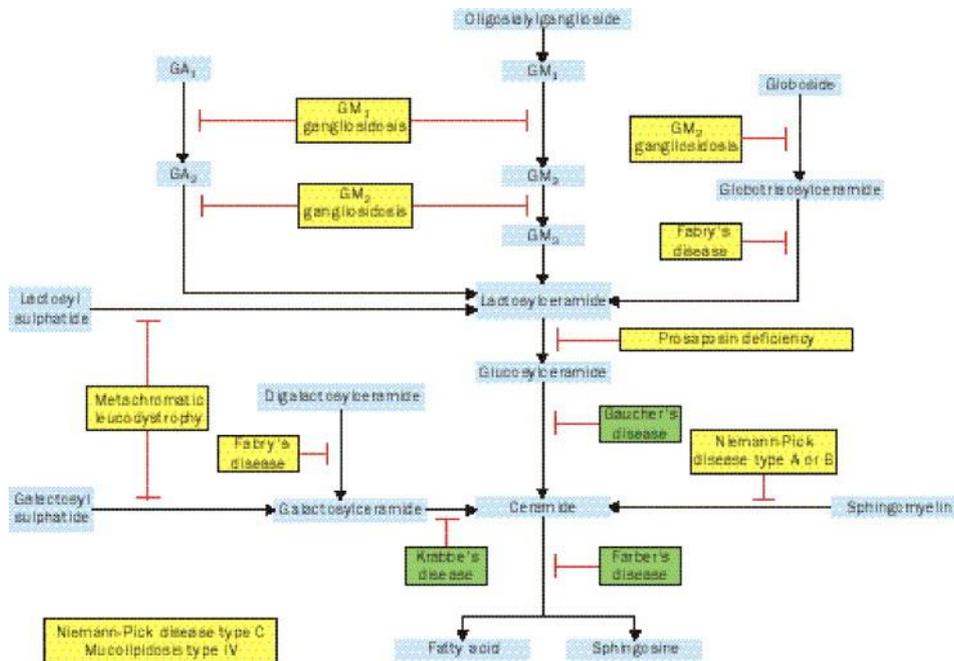


Koolman, Color Atlas of Biochemistry, 2nd edition © 2005 Thieme

**Figure 1C.** Synthèse et transport des protéines lysosomales: le lysosome primaire se forme à partir de l'appareil de Golgi. Les protéines lysosomiales sont synthétisées et o-glycosylées au niveau du RE. Les prochaines étapes sont très spécifiques pour les protéines lysosomiales. En deux passages réactionnels, le résidu terminal Mannose (Man) est phosphorylé au niveau du sixième carbone (C6) du mannose. Les protéines lysosomiales portent maintenant un résidu Man6-P. Sur les membranes de l'appareil de Golgi se trouvent des récepteurs pour le Man6-P. Ces récepteurs reconnaissent les proprotéines lysosomiales à travers le résidu susmentionné qui se lie. À l'aide de la protéine clathrine, les récepteurs sont localement concentrés. Ceci aboutit à la section de membrane localement qui se sépare du reste de l'appareil de Golgi en formant des petites vésicules contenant les proenzymes lysosomiales et d'être transportées aux endolysosomes à l'aide de certaines vésicules de transport. À ce niveau, la maturation du lysosome primaire commence et les groupes phosphates sont enlevés depuis le Man6-P pour former les enzymes lysosomiales matures (6).

Mucopolysaccharidoses (MPS) :		Farber's disease	Ceramidase
MPS I	Alpha-iduronidase	Gaucher's disease	Béta-glucosidase/ Saposin-C activator
MPS II	Iduronate-2-sulphatase	GM1 gangliosidosis	béta-Galactosidase
MPS IIIA	sulphamidase	Tay-Sachs disease	Béta-Hexosaminidase A
MPS IIIB	N-aceti-alpha-glucosaminidase	Sandhoff's disease	Béta-Hexosaminidase A et B
MPS IIIC	Acetyl-CoA:alpha-glucosamide N-acetyltransferase	Krabbe's disease	Galactocerebrosidase
MPS IIID	N-Acetylglucosamine-6-sulphatase	Metachromatic leucodystrophy	Arylsulfatase A
MPS IVA	N-acetylgalactosamine-6-sulphate-sulphatase	Niemann-Pick disease, types A and B	NPC 1 et 2
MPS IV B	béta-Galagtosidase	Other lipidoses :	
MPS VI	N-acetylgalactosamine-4-sulphatase	Niemann-Pick disease type C	NPC 1 et 2
MPS VII	béta-Glucuronidase	Wolman's disease	Lipase acide lysosomale
Glycoproteinoses :		Neuronal ceroid lipofuscinosis	CLN1-2 / transporteur de l'arginine
Aspartylglucosaminuria	N-aspartyl-beta-glucosaminidase	Glycogen storage disease :	
Fucosidosis	FUCA-1	Glycogen storage disease type II (Pompe's disease)	Alpha-glucosidase
a-Mannosidosis	alpha-D-mannosidase	Multiple enzyme deficiency :	
b-Mannosidosis	Beta-mannosidase lysosomale	Multiple sulphatase deficiency	Calpha-formylglycine-generating enzyme
Mucopolipidosis I (sialidosis)	sialidase	Galactosialidosis	Cathépsine A
Schindler disease	alpha-NAGA	Mucopolipidosis II/III	UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme N-acetylglucosaminyl-1Phtrsf
Sphingolipidoses :		Mucopolipidosis IV	Mucolipine-1
<i>Fabry's disease</i>	<i>Alpha-Galagtosidase A</i>	Lysosomal transport defects :	
Danon disease	LAMP-2	Sialic acid storage disease	Sialine
Hyaluronidase deficiency	HYAL-1	Other disorders due to defects in lysosomal proteins	

**Table I. Nomenclature de certaines maladies lysosomales et les enzymes incriminés (colonnes bleu)(3).**



**Figure 2.** Catabolisme des sphingolipides. Tiré de Chii-Shiang Chen et al (7).

## La maladie de Fabry et ses manifestations cliniques

La maladie de Fabry est une maladie de stockage lysosomale. C'est une maladie héréditaire liée au chromosome X. Le gène en question est situé au niveau du bras long du chromosome X carté en Xq21.33-Xq22 et codé pour l'enzyme alpha-Galactosidase A. Jusqu'à maintenant, plus de 300 différentes mutations ont été identifiées. L'enzyme mutée ne remplit plus sa fonction catabolisatrice et il ne métabolise plus ou peu le substrat globotriaosylcéramide (Gb<sub>3</sub>) (8).

Par conséquent il y a une accumulation de Gb<sub>3</sub> dans tous les tissus. Dans la paroi des vaisseaux sanguins le Gb<sub>3</sub> s'accumule au niveau de l'endothélium, la tunique interne des vaisseaux. Ce déficit se traduit avec l'épaississement de la paroi vasculaire qui amène à l'infarctus et l'ischémie au niveau du coeur, du système nerveux central et des reins.

Les manifestations cliniques concernant la MF apparaissent tôt au cours de l'enfance et de l'adolescence.(9) Elles incluent des douleurs intermittentes aux extrémités (acroparésthesies), des lésions cutanées typiques (angiokératomes, voir *figure 3*), une opacité de la cornée qui se traduit par une diminution de l'acuité visuelle sans agnosies (*Figure 3*), une transpiration insuffisante (ipohydrose), une intolérance au chaud, au froid et envers l'exercice physique, ces derniers appelées «crises Fabryques». Ces crises sont caractérisées par un malaise et une douleur aiguë généralisée qui dure plusieurs jours, une protéinurie et des problèmes de motilité gastrointestinaux (8).

Chez l'adulte, l'implication rénale de la maladie porte sans équivoque à l'insuffisance rénale terminale, laquelle nécessite une thérapie chirurgicale, à savoir la transplantation de l'organe (11). Les manifestations cardiaques incluent des pathologies valvulaires (plus fréquemment l'insuffisance de la valve mitrale), une dilatation de l'aorte, des coronariopathies, des anomalies de la conduction

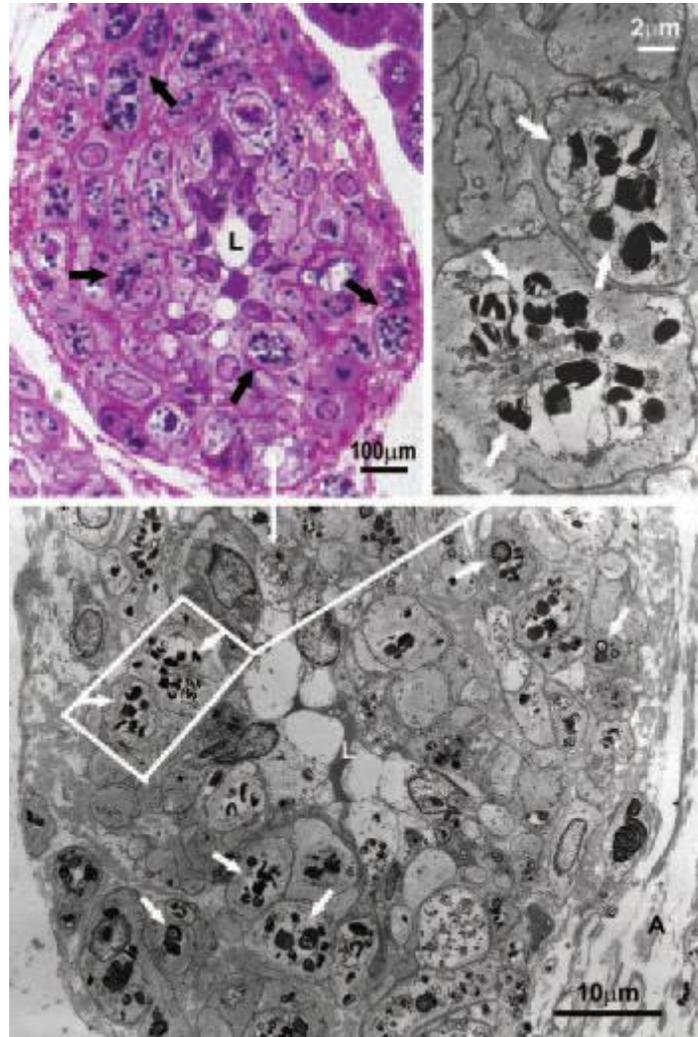
et une hypertrophie ventriculaire gauche en amenant le patient à une défaillance cardiaque grave, des arythmies, et des infarctus du myocarde (10,12)(*Figure 4&5*). Les manifestations cérébro-vasculaires incluent des attaques ischémiques transitoires, des ictus cérébraux précoces, des lésions de la substance blanche cérébrale, une sensation de vertige, un tinnitus, des hémiparésies, et des complications rationnellement déductibles causées par la « vasculopathie Fabryque » comme la dysarthrie, la dyopie, des nystagmus, une hémiataxie, une perte de mémoire et de l'ouïe (13). Plus rare, mais à ne pas sous-estimer, est la symptomatologie sur le plan endocrino-métabolique. Un work-up devrait être fait chez les patients Fabry pour maintenir sous contrôle la fonction de l'axe hypothalamo-hypophysaire. La complication la plus importante réside dans la « selle turcique vide ». Le mécanisme, selon Faggiano et al semble être relié à la présence d'auto-anticorps dirigés contre l'hypothalamus et l'hypophyse (14).



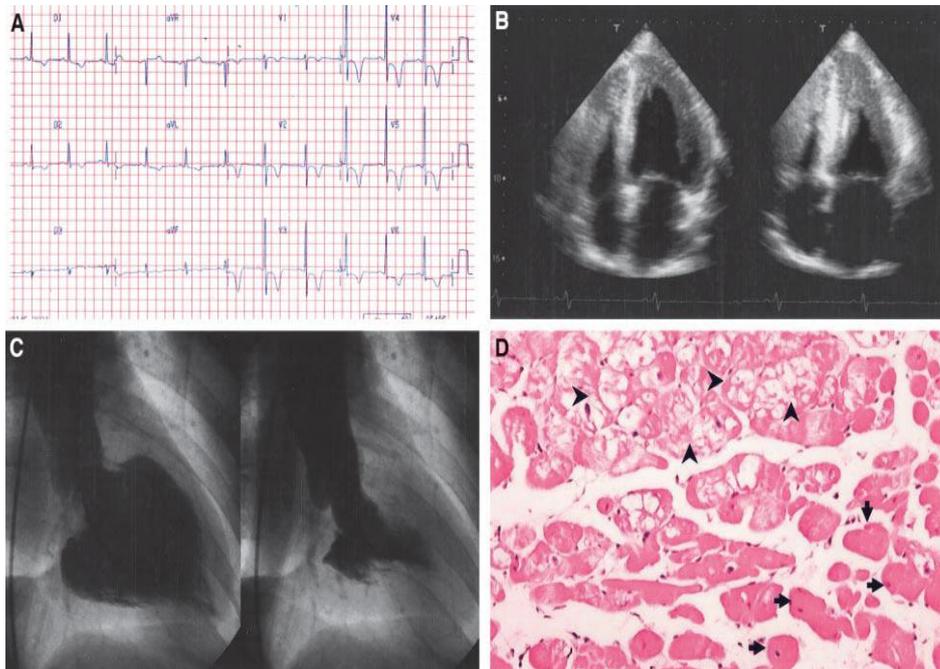
**Figure 3.** A et B. Les angiokératomes, caractéristiques de la MF, sont des angiectasies rouge foncé/noir identifiables au niveau de la région qui se situe entre le nombril et les cuisses. Ces lésions dermatologiques, non bulleuses, deviennent de plus en plus nombreuses et de diamètre grandit avec l'âge. C. Opacité kératitique qui n'interfère pas avec la vue. Cette opacité de la cornée se retrouve chez presque tous les hommes affectés par la MF et chez 70-90% des femmes carrières (5).

Les manifestations cliniques chez les femmes porteuses (carriers) varient entre une asymptomaticité totale à les manifestations cliniques représentées au-dessus concernant les patients de sexe masculin. Malgré que la majorité des porteuses mènent une vie normale, elles peuvent toutefois vivre l'expérience symptomatique de la maladie pendant leur propre enfance ou adolescence ou d'être assujetties à des manifestations cliniques sévères apparentées à celles observées chez l'homme. Les patients âgés, peuvent développer une hypertrophie ventriculaire gauche (15,16).

Des variantes atypiques existent dans la population masculine affectée par la MF. Les manifestations cliniques, chez ces patients, peuvent être peu importantes ou associées à une apparition tardive de la maladie (8). Les études effectuées par Elleder et al (1990) et Von Scheidt et al (1991) suggèrent que la variante cardiaque de la MF peut être une cause importante de l'hypertrophie ventriculaire idiopathique ou de la cardiomyopathie hypertrophique à apparition tardive (17,18).



**Figure 4.** Sections de microscopie optique (en haut à gauche) et de microscopie électronique ultrafine (en haut à droite et en bas) d'une biopsie endomyocardique chez un patient Fabry. Ceci montre l'épaississement et la rétraction de la lumière de l'artère coronarienne intramurale principalement causée par l'hyperplasie et l'hypertrophie des cellules musculaires lisses associées à la présence de corps osmiophiliques mis en évidence grâce à la technique de coloration Azur II (figure en haut et à gauche, masses de couleur noir), et à la microscopie électronique (les deux autres figures) qui montre des amas glycosphingolipidiques organisés en corps membraneux (taches blanchâtres).



**Figure 5.** Patient Fabry. A. ECG à 12 dérivation qui montrent les signes d'HVG ; dépression du segment ST et ondes T négatives dans les dérivation précordiales ce qui suggère une CMH. B. Fin de la dyastole (à gauche) et fin de la systole (à droite) dans une échographie apicale à 4 chambres qui démontre une hypertrophie murale sévère et une oblitération de la cavité de l'apex ventriculaire. C. Angiographie ventriculaire dans une vision oblique antérieure droite (30°) qui met en évidence une hypertrophie massive apicale du VG. D. Biopsie endomyocardique du VG qui met en évidence les cellules normales (flèches noires) et les cellules qui contiennent des inclusions glycolipidiques (petites pyramides noires). -coloration à l'hématoxiline et éosine-

## Le but de notre travail

Le but de notre travail est de recueillir et discuter les caractéristiques de l'hypertrophie cardiaque et l'ECG dans la maladie de Fabry présentées par la littérature scientifique. Documenter l'utilisation des biomarqueurs «paracliniques» comme l'ECG pour la reconnaissance précoce de la maladie est une autre thématique prise en considération dans notre travail.

La discussion de l'utilité et de l'apport des biomarqueurs biochimiques lipidiques et non-lipidiques comme le Gb<sub>3</sub>, le Lyso-Gb<sub>3</sub>, la S<sub>1</sub>P et la MPO, comme données complémentaires à celles de type paraclinique est, elle aussi, exposée dans notre travail.

Il se focalise essentiellement sur les anomalies cardiovasculaires et neurologiques, l'hypertrophie et/ou dilatation cardiaque et vasculaire. Par ailleurs, des données de laboratoire sont apportées pour établir une relation métabolique possible entre la S<sub>1</sub>P, Gb<sub>3</sub> et le Lyso-Gb<sub>3</sub>.

En particulier, on été étudié le rapport possible entre le Gb<sub>3</sub> et le Lyso-Gb<sub>3</sub> avec les récepteurs de la S<sub>1</sub>P. Ces derniers, étant responsables de l'activation intracellulaire des voies biochimiques concernant la prolifération et la survie de la cellule en elle-même, pourraient subir un effet d'activation très similaire à l'action de S<sub>1</sub>P par le Gb<sub>3</sub>/Lyso-Gb<sub>3</sub>. En peu de mots, on pourrait penser à la fonction de agonistes sur les récepteurs de la S<sub>1</sub>P par le Gb<sub>3</sub>/Lyso-Gb<sub>3</sub>, en potentialisant l'effet

de la S<sub>1</sub>P. Certaines études effectuées par Brakch et al ont toutefois déjà mis en évidence comme le Gb<sub>3</sub> n'a pas d'effet sur les différents récepteurs de la S<sub>1</sub>P.

L'expérience consistait à observer la croissance des cellules musculaires lisses dans un environnement contenant le Gb<sub>3</sub>. Le résultat montrait l'absence de critères de croissance pour ces cellules, en conduisant ainsi à la conclusion que le Gb<sub>3</sub> n'a pas d'effet sur les S<sub>1</sub>PRs. On outre, l'équipe de Brakch a aussi montré l'absence d'une voie biochimique qui permet le passage du lyso-Gb<sub>3</sub> en S<sub>1</sub>P.

Les expériences opérées vise à évaluer l'effet du Lyso-Gb<sub>3</sub> sur les S<sub>1</sub>PRs. D'un point de vue clinique, on pourrait obtenir des nouvelles perspectives thérapeutiques pour la MF. Maintenant, outre les thérapies mentionnées telles que la réduction du substrat, de substitution, chaperoniques (en voie d'étude) et chirurgicales soulignées par notre travail concernant la MF, il existe des thérapies moléculaires qui agissent au niveau des voies biochimiques dont on retrouve les biomarqueurs pris en considération par notre étude. En particulier, il est à noter l'existence d'inhibiteurs du récepteur de la S<sub>1</sub>P (sous-type 1) de Novartis-Switzerland, en phase d'étude III. Notre travail ouvre la possibilité d'expansions d'application thérapeutique.

## **La maladie de Fabry et le système cardiovasculaire**

### **L'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) comme cardiomyopathie dans la maladie de Fabry**

Les cardiomyopathies (CM) sont des maladies du muscle cardiaque associées à une dysfonction cardiaque. The World Health Organization (WHO) a classifié les cardiomyopathies dans 5 types (19): dilatées, hypertrophiques, restrictives, reliées à la dysplasie arythmogénique du VD et non-classifiées.

La cardiomyopathie dilatée (CD) est associée à une dilatation de la cavité ventriculaire gauche et à une diminution de la contractilité du myocarde. Cependant le VD peut être concerné aussi. La CD est la forme de CM la plus commune qui concerne à peu près 90% de toutes les CM (20).

La liste des causes de la CD est longue et très variée. Parmi les étiologies les plus répandues et identifiables de la CD on retrouve la CD familiale. Une étude faite par Michels et al démontre que 20% des patients avec CD idiopathique ont une histoire familiale positive. De plus, des études sur des familles avec CD ont démontré de nombreuses possibilités de transmission génétique concernant les CD parmi lesquelles on trouve une transmission autosomique dominante, autosomique récessive, liée au chromosome X, et au génome de la mitochondrie. Il y a aussi plusieurs manifestations phénotypiques qui incluent une CD, une CD avec des pathologies du rythme cardiaque, des CD associées à des myopathies musculo-squelettiques et des CD associées à des pertes de l'ouïe (21).

La cardiomyopathie hypertrophique (CMH) peut se manifester avec une hypertrophie gauche ou droite, plutôt asymétrique et qui inclue le septum interventriculaire. Un épaissement de la paroi VG égal ou de plus de 15 mm suffit pour poser le diagnostic de CMH. La CMH est l'une parmi les formes les plus communes de maladie héréditaire cardiaque avec une prévalence, chez les jeunes adultes de 1:500 (29). De plus, elle est le deuxième sous-type de cardiomyopathie après la cardiomyopathie dilatée (22,23).

Parmi les causes de la CMH on retrouve les causes génétiques/familiales, des pathologies d'obstruction mécaniques comme la sténose aortique, des maladies systémiques, y compris

l'hypertension, des endocrinopathies et, enfin, des pathologie métaboliques, notamment reliées à un phénomène de surcharge d'un substrat comme dans la maladie de Fabry (24).

La CM restrictive (CMR) est caractérisée par un défaut de remplissage ventriculaire et des volumes ventriculaires diastolique diminués associé à un fonctionnement ventriculaire gauche normal ou à peu près normal. La composante clé de cette CM est la diminution de la compliançe ventriculaire, sans une augmentation de l'épaisseur des parois cardiaques dans la majorité des cas, qui amène à un élargissement biatrial.

L'amyloïdose est probablement la cause la plus fréquente de CMR. Des autres causes infiltratives sont liées à l'hémochromatose, la sarcoïdose, la maladie de Fabry et à une variété d'autres maladies peu communes (23).

Plus de 50% des patients Fabry ont une symptomatologie cardiaque à partir de 36 ans. 33% des femmes et plus de 50% des hommes atteints par la MF qui ne reçoivent pas de traitement, développent une HVG. La majorité partie des auteurs traitant de la conformation cardiaque des patients Fabry ont rapporté que l'HVG est associée à une absence de dysfonction systolique et diastolique. Le ventricule gauche (VG) subit un remodelage de type concentrique prédominant sans dilatation des cavités comme l'ont démontré en 2000 par Linhart et al. Toro et al en 2009. Grâce à l'utilisation du Tissu Doppler (TDI), ont mis en évidence que les patients Fabry ont des dysfonctionnements ventriculaires systoliques et diastoliques sans anomalies échocardiographiques standard fonctionnelles (25,26).

En effet, les anomalies fonctionnelles cardiaques chez les patients Fabry se manifestent sous-forme de cardiopathie de type restrictive ou dilatée, selon le stade de la maladie. La cardiopathie est de type hypertrophique et concentrique, associée à des processus fibrotiques secondaires témoignant d'une cardiopathie restrictive quand elle devient compensée. La transition de la cardiopathie compensée à la cardiopathie décompensée semble montrer une insuffisance cardiaque de type dilatée.

Du point de vue histologique, la manifestation de la MF au niveau cardiaque est caractérisée par une vacuolisation myocytaire et une inclusion intralysosomale visibles à la microscopie électronique.

De plus, les patients Fabry ont des zones d'expansion interstitielles qui peuvent être aisément mises en évidence avec l'imagerie par résonance magnétique (MRI), ce qui suggère donc que la fibrose progressive peut contribuer à la réduction de la fonction systolique ventriculaire. Les patients atteints de la MF devraient ainsi subir un monitoring, afin de pouvoir suivre toute modification de la fraction d'éjection cardiaque, un marqueur clinique très utile dans l'évaluation de la progression de la maladie. À cet égard, les premières manifestations d'un déficit du fonctionnement du VG peuvent être identifiées tôt avant l'épaississement de la paroi myocardique (27).

Niemann et al ont rapporté que les dépôts de Gb<sub>3</sub> dans le VD s'opèrent en parallèle avec les dépôts du VG et est lié au stade de la cardiopathie. De plus, aucune déformation ou fibrose n'apparaît au niveau du VD. Niemann souligne la persistance de paramètres normaux fonctionnels pour le VD y compris pour les stades avancés, sans visualisation de processus fibrotique (28).

Pour le suivi des patients Fabry la fonctionnalité du VD ne représente pas un bon paramètre de monitoring de la maladie.

La fibrose myocardique associée à une anomalie de la motilité myocytaire jouent un rôle important dans l'augmentation de la morbidité et mortalité lors de la cardiopathie terminale chez le patient Fabry (Waidmann et al., 29). Il y aurait ainsi une transition d'un coeur hypertrophique gauche à une

fibrose importante du myocarde. Les zones dyskinétiques semblent être le résultat de la fibrose qui progresse, suite à une microcirculation altérée (Hasegawa, 30). On est en présence d'un cercle vicieux, où les acteurs principaux seraient les cardiomyocytes fibrotiques et une microcirculation cardiaque préjudiciable qui défavorise l'apport enzymatique de alpha-Galactosidase A au niveau myocytaire. Ces observations soulignent l'importance d'une prise en charge précoce des patients Fabry avec la thérapie de substitution enzymatique (TES) pour éviter l'apparition et le maintien de ce cercle vicieux.

## **Les aspects vasculaires de la MF**

À partir de 2001, la TES a été introduite pour les patients Fabry. Comme cela a déjà été souligné auparavant, cette thérapie a comme but celui de réduire au maximum le substrat incriminé dans la MF (Gb<sub>3</sub>).

Cependant, malgré la réduction du Gb<sub>3</sub>, on observe quand même une progression de la maladie, ce qui suggère l'existence d'autres causes de la vasculopathie chez les patients Fabry (31-34), tel qu'un fonctionnement anormal des vaisseaux associé à un état pro-thrombotique avec la formation de ROS (35,36).

Les patients Fabry montrent une augmentation de l'épaisseur intimo-médiale (EIM) de la carotide commune, brachiale, et de l'artère radiale comparées aux sujets contrôles. Cet épaississement dans certains endroits vasculaires plutôt que dans d'autres n'est pas encore bien compris mais l'augmentation du risque pour des complications cardiovasculaires a été documentée (37-39).

À noter que les patients Fabry présentent un dysfonctionnement endothéliale, caractérisé par l'altération du "flow-mediated dilatation" ou "FMD" (39).

L'étude de Aerts et al en 2008, indique que le lyso-Gb<sub>3</sub> joue un rôle d'inducteur de la prolifération cellulaire des cellules musculaires lisses *in vitro* (40). On ne sait toujours pas à travers quel mécanisme le Lyso-Gb<sub>3</sub> agit.

L'équipe de Rombach et al a bien étudié l'existence d'une relation entre l'EIM et le FMD d'une part, et les taux de Lyso-Gb<sub>3</sub> plasmatiques d'autre part (41).

Les résultats de leur étude montrent qu'une augmentation de l'EIM et une diminution du FMD au niveau de l'artère brachiale sont, toutes deux, associées au taux du Lyso-Gb<sub>3</sub>, ceci est maintenu même en présence de la TES. À noter que pour les patients atypiques, les taux plasmatiques du lyso-Gb<sub>3</sub> sont bas, présentant l'EIM et FMD comparables aux patients contrôles.

Il est à remarquer que l'EIM et le FMD au niveau de l'artère brachiale sont des indicateurs de l'artériosclérose (42,43). Cependant, Rombach et al, n'ont pas constaté une artériosclérose significative chez les patients Fabry pris pour leur étude. D'où la conclusion qu'une augmentation de l'EIM est plutôt associée à une augmentation du risque d'ictus (infarctus vasculaire).

Rombach et al ont proposé leur mécanisme physiopathologique qui vise à expliquer la raison de l'augmentation du risque d'ictus. Le Lyso-Gb<sub>3</sub> induirait un phénomène de stress étroitement lié à l'action proliférative qu'il exerce sur les cellules. Ce stress pourrait augmenter l'expression des deux récepteurs de l'angiotensine (I et II). Une activité augmentée de l'angiotensine II avant le commencement de la thérapie substitutive enzymatique a été déjà rapporté dans la littérature (44), ce qui renforce l'hypothèse physiopathologique de Rombach et al.

Une autre explication concernant l'augmentation de l'EIM chez les patients Fabry pourrait être aussi reliée à des taux plasmatiques élevés de S<sub>1</sub>P mais le mécanisme exact qui expliquerait cette augmentation n'est pas encore bien établie.

La persistance des anomalies vasculaires malgré la TES et les autres co-thérapies souligne la modeste contribution thérapeutique actuelle. Des recherches dans le domaine de la physiopathologie de la MF sont essentielles pour la découverte d'autres thérapies plus performantes.

## **Les manifestations neurologiques de la maladie de Fabry**

La MF inclut des manifestations neurologiques qui impliquent soit le système nerveux central (SNC) soit le système nerveux périphérique (SNP). Le mécanisme pathologique de base est relié à l'accumulation de Gb<sub>3</sub> au niveau des cellules de Schwann, dans les ganglions spinaux et dans les neurones du SNC. Les manifestations cliniques de la sphère neurologique sont attribuables à des cérébrovasculopathies associées à une augmentation de l'incidence d'ictus et d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) (45).

Cependant, la pathogenèse de la vasculopathie de Fabry reste peu comprise. Elle serait probablement liée en partie à un contrôle fonctionnel pathologique des vaisseaux sanguins qui serait secondaire à une dysfonction de l'endothélium suite au défaut de l'enzyme alpha-Gal A. La vasculopathie obstructive, reliée en premier lieu à l'accumulation cellulaire de glycolipides ou secondairement à un processus inflammatoire (débuté suite au stockage pathologique de glycolipides intracellulaire ou par d'autres facteurs de risques cardio-vasculaires), peut développer en réponse à un dysfonctionnement de la paroi vasculaire et de l'endothélium, très similaire à ce qu'on observe dans l'artériosclérose.

Au niveau du SNC, l'implication vasculaire a été bien documentée au niveau du système vertébrobasilaire et de la circulation carotidienne, mais elle est plus répandue et commune au niveau de la première citée auparavant et de la circulation postérieure (46,47).

Ce qui signifie que plusieurs défauts neurologiques peuvent toucher les patients Fabry. On inclut, dans cette catégorie l'hémiplégie, les vertiges, une sensation de nausée, la diplopie, les nystagmus, la dysarthrie, les céphalées, les ataxies cérébelleuses et plus rarement des hémorragies intracérébrales.

Des anomalies sur le plan psychiatriques ont été décrites suite à cette vasculopathie cérébrale et des études récentes ont montré que 2-4% des patients ayant subi un AVC, dans la population générale d'un âge compris entre 18 et 55 ans, ont la MF (48).

La vasculopathie cérébrale (VC) chez les patients Fabry, peut être subdivisée et catégorisée en deux classes: la VC des vaisseaux larges, et celle des vaisseaux moyens (49).

Les AVC qui proviennent des grands vaisseaux sont causés normalement par l'occlusion ou par des phénomènes thrombotiques des grands vaisseaux intracrâniens. Toutefois, l'ictus de type embolique peut aussi prendre place. Les AVC chez les patients Fabry sont mis en évidence grâce à l'utilisation de la résonance magnétique (IRM) (50,51), de manière similaire aux autres occlusions vasculaires. Un autre indicateur de la vasculopathie des vaisseaux larges chez les patients Fabry, est la dolichoectasie ou l'élongation et la dilatation du vaisseau concerné. L'artère basilaire et parfois l'artère carotide, sont impliquées dans ce processus de remodelage structurel pathologique (46).

Cependant, les patients Fabry présentent plus fréquemment des VC des vaisseaux moyens. Les lésions prédominent principalement au niveau de la substance blanche, rencontrées surtout dans la région periventriculaire et leur prévalence augmente avec l'âge (47,52).

Le mécanisme avec lequel le défaut de alpha-Gal A et l'accumulation de glycolipides cause cette vasculopathie n'est pas totalement compris. Moore et al (45) ont émis l'hypothèse que la vasculopathie chez les patients Fabry est étroitement associée à des anomalies des composants du flux sanguin et de la paroi vasculaire conduisant à une dysfonction vasculaire. Au niveau plasmatique il a été montré une augmentation de la molécule-1 de l'adhésion cellulaire vasculaire (VCADM-1), de la P-sélectine, de la molécule-1 soluble de l'adhésion cellulaire (sIAM-1), de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène et la diminution des taux de thrombomoduline combinée à une augmentation de l'expression de certaines protéines monocytaires (en particulier le CD11b), indiquant la prédominance d'un état pro-thrombotique dans la MF (53).

À noter que le dysfonctionnement de la circulation cérébrale a été déjà observé lors de différentes études (54-56). Ces études montrent une hyperperfusion cérébrale accrue par rapport à des patients contrôles. Cette hyperperfusion prédomine au niveau de la circulation cérébrale postérieure.

Curieusement, cette hyperperfusion cérébrale est trouvée chez les patient Fabry avec une fonction cardiaque et un volume d'éjection encore conservée (55). À ce point-là, comment pourrait-on s'expliquer l'étiopathogénie de cette hyperperfusion?

Des études effectuées par Stemper et al (57) concernant les mesures de perfusion vasculaire post-ischémiques au niveau de l'avant-bras dans une petite population de patients Fabry qui manifestait cliniquement le début d'un processus ischémique aux membres supérieurs, ont montré une diminution de l'hyperémie dans l'avant-bras (ce qui est logique) mais une hyperperfusion exagérée au niveau de la peau. Ce qui suggère l'existence d'une hétérogénéité dans la réponse des différents lits vasculaire suite à l'accumulation de Gb<sub>3</sub> au niveau endothélial. Moore et al, dans le même année que l'équipe de Stemper a produit ces données, a démontré que l'hyperperfusion cérébrale est un phénomène vasculaire qui n'est pas du tout lié à une conséquente hyperactivité neuronale (49).

L'hyperperfusion est aussi associée avec des calcifications au niveau de la substance blanche, dans le pulvinar et dans les régions postérieures du thalamus (58,59). Il y aurait aussi des signes qui pourraient conduire à la conclusion que l'autorégulation cérébrovasculaire et la vasoréactivité peuvent jouer un rôle dans cette hyperperfusion cérébrale. Concernant cet aspect, Alterscu et al (56) ont montré aussi un lien entre une altération de la fonction des voies biochimiques du monoxyde d'azote et l'hyperperfusion cérébrale. En effet, l'équipe de Alterscu a émis l'hypothèse que la dysfonction vasculaire dans la MF est due à une augmentation de la libération massive des espèces d'oxygène réactives (ROS) au niveau endothélial, qui amène, de suite, à une augmentation du stress oxydatif et à la formation de peroxy-nitrite, impliquées dans la persistance de cette vasodilatation. Une autre étude réalisée par Moore et al en 2004 (60) a montré que les patients Fabry présentent une réponse vasculaire cérébrale à l'ascorbate amoindrie. L'ascorbate est un puissant anti-oxydant. Ce que l'équipe de Moore attendait, c'était la diminution de cette hyperperfusion cérébrale suite à l'injection d'ascorbate endoveineuse chez les patients Fabry. La diminution de la réponse à l'ascorbate pourrait être donc causée par la libération excessive de ROS. Cependant, l'étiologie de cette libération excessive de ROS n'est pas claire. Ceci serait secondairement associée à l'accumulation de glycolipides intracellulaires, essentiellement le Gb<sub>3</sub>. Ce qui conduirait au déclenchement des voies biochimiques responsables de la production de ROS et à une dilatation de la couche musculaire des vaisseaux cérébraux.

La neuropathie périphérique dans la MF se manifeste par une douleur neuropathique, une sensation diminuée du chaud et du froid et des altérations de la motilité intestinale (pour ce dernier: symptomatologie dysautonomique). Les patients affectés par la MF, vont manifester les premiers

symptômes neuropathiques environ vers la fin des 10 premières années de vie ou pendant la puberté (61).

Le mécanisme étiopathologique précis de la douleur neuropathique n'est pas encore démontré. Jensen et al (62) pensent que le taux augmenté de Gb<sub>3</sub> au niveau des compartiments membranaires extra-lysosomales peuvent interférer avec la fonction de certaines protéines impliquées dans la transmission de l'impulsion électrique neuronale telles que les protéines du canal sodium (Sodium Channel Proteins). En effet, l'équipe de Jensen a mis en évidence une augmentation de l'expression de ces protéines au niveau des corps axonaux des nerfs afférents. L'hyperexcitabilité nerveuse périphérique peut être aussi due à des changements moléculaires au niveau du nocicepteur périphérique, de la corne postérieure de la moelle ou encore au niveau du cerveau (homenculus sensitif; la zone de l'élaboration et de la perception consciente des informations sensibles périphériques) (63). Ces changements incluent, une augmentation de l'expression des canaux membranaires sodium, une réponse exagérée à certaines substance endogènes activant la dépolarisation des nocicepteurs, et l'altération de l'influx intracellulaire de calcium au niveau des fibres nerveuses responsables de la transmission de la douleur.

L'objectif principal du traitement est de prévenir les AVCs et les autres manifestations vasculopathiques de la MF.

La TES, approuvée dans ces dernières années, ne semble pas concerner l'ensemble des manifestations neurologiques évoquées ci-dessus (64,65).

Cette thérapie très spécifiques pour la MF ne semble pas diminuer l'incidence de la survenue de ictus cérébraux (66,67).

Les agalsidases alpha et beta, administrés par voie endoveneuse (2x/semaine), entrent dans la circulation mais ils ne traversent pas la barrière hémato-encephalique. L'imagerie par résonance magnétique est un instrument très sensible et il devrait être incluse dans le monitoring chez les jeunes patients affectés par la MF (68). Actuellement la TES est une thérapie qui semble prévenir la progression pathologique de la MF. Toutefois, des évidences en faveur d'effets bénéfiques concernant la VC n'ont pas été rapportées.

En conclusion, chez des patients Fabry présentant une VC, ce serait très utile d'associer à la TES une prophylaxie primaire (comprenant, si indiqué, des anti-hypertenseurs, des statines et des anti-arythmiques) et secondaire (AINS et d'autres agents anti-thrombotiques).

Par contre, concernant la douleur neuropathique, la TES semble la diminuer et être efficace (69).

## **La thérapie**

Les maladies de surcharge lysosomales prennent leurs origines dans une déficience enzymatique qui amène à l'absence/diminution de la dégradation d'un métabolite donné. Ce métabolite, par sa déposition au niveau intracellulaire, affecte le tissu et aboutit à un dysfonctionnement d'organes tels que le rein, le coeur ou encore le cerveau. La thérapie possible est l'apport de molécules faisant la fonction de la protéine défectueuse.

Selon la gravité de la maladie la transplantation de la moelle osseuse peut être envisagée, même si c'est une stratégie thérapeutique lourde. Vu l'issue parfois fatale, ce mode de thérapie est actuellement réservé aux leucémies et certaines maladies oncologiques.

Par ailleurs, ces dernières années, une évolution continue et des progrès dans la recherche dont le but est de trouver de nouvelles alternatives aux options de traitement classiques décrits en haut

comme la transplantation de la moelle osseuse, ont conduit au développement d'autres traitements. Parmi ces traitements, on peut citer le remplacement enzymatique exogène et certains bloqueurs de la formation de métabolites à l'origine de la physiopathologie de la maladie.

### **La thérapie avec transplantation de moelle osseuse**

Les premières tentatives thérapeutiques curatives pour les maladies d'accumulation lysosomale ont été effectuées avec la transplantation de cellules amniotiques et cellules fibroblastiques avec des résultats médiocres et peu contributifs à l'amélioration clinique des patients. La transplantation osseuse pour le traitement des maladies lysosomales a été effectuée par Hobbs et al au début des années '80. Cette thérapie donne des résultats médiocres en ce qui concerne la symptomatologie neurologique. Wada et al en 2000 et Hickey en 1990 démontrent qu'il y aurait une activation des lymphocytes T. L'activation lymphocytaire favorise essentiellement un passage beaucoup plus aisé et simple à travers la barrière hémato-cérébrale (BBB, blood brain barrier). Cependant, la thérapie consistant dans la transplantation de moelle osseuse rencontre certaines limites.

Elle est optimale à but curatif au niveau du SNC, mais moins efficace au niveau du tissu mésenchymateux.

L'efficacité de la transplantation de moelle osseuse dépend aussi de l'expression phénotypique de la maladie. Plus elle est haute, moins la thérapie est efficace. Un autre facteur déterminant concernant l'efficacité de cette thérapie est le timing d'action de cette dernière. Plus cette thérapie est administrée après une longue période de temps à partir des premières manifestations cliniques de la maladie, moins intenses seront les effets curatifs.

### **Le traitement de substitution enzymatique (TES)**

La première maladie de stockage lysosomale traitée par TES fut la maladie de Gaucher en 1965 par Brady et al au National Institute of Health, USA. Plusieurs essais cliniques de TES utilisant un enzyme humain recombinant ont été réalisés pour d'autres MSL comme la MF par Wraith et al en 2004. Cependant, les résultats de la TES varient selon la pathologie en question.

Les aspects importants, à tenir en compte pour une bonne efficacité de la TES sont l'âge d'apparition, la vitesse de progression de la maladie et la présence ou l'absence d'un tableau symptomatologique au niveau de la sphère neurologique.

Actuellement, il n'existe pas de données scientifiques à propos du fait que les enzymes exogènes administrés au patient traversent la BBB. De plus, l'administration intrathécale d'enzymes exogènes a peu ou pas montré de bénéfice pour les manifestations neurologiques associées aux MSL.

Pour la MF, la TES offre un bon contrôle de la maladie dans le cas où le traitement a été introduit en concomitance avec l'apparition des premiers symptômes.

La TES, pour la MF, consiste essentiellement en deux types d'enzymes exogènes: l'Agalase B (Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA) et l'Agalase A (Shire Human Genetic Therapies Inc, Cambridge, MA, USA). Leur administration réduit les douleurs neuropathiques, stabilise la fonction rénale, accourcit le complexe QRS et diminue progressivement l'épaississement interventriculaire et la masse du VG. Plus spécifiquement l'AGALA stabilise la fonction rénale chez

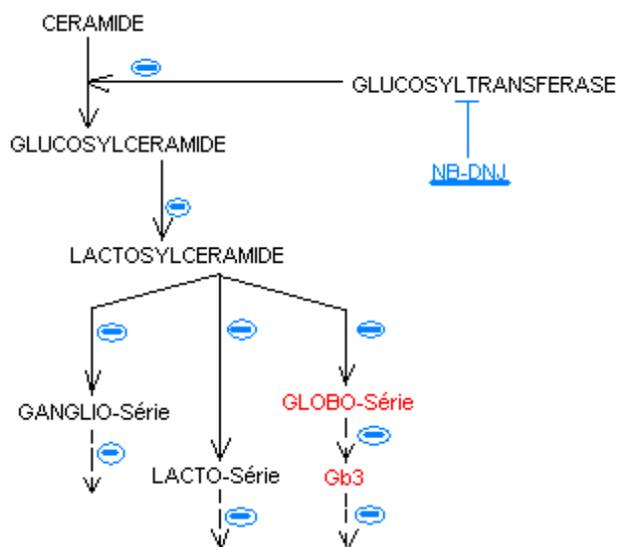
les patients avec une insuffisance rénale légère à modérée, réduit la taille ventriculaire gauche et diminue le score (VAS) de la douleur.

L'AGALAB, par contre, présente une meilleure clearance des dépôts de Gb<sub>3</sub> au niveau des endothéliums microvasculaires, stabilise la fonction rénale et permet de diminuer ou retarder les complications associées à la dialyse (dans le cas où c'est nécessaire de l'adopter à but thérapeutique), réduit l'hypertrophie ventriculaire gauche et améliore la fonction contractile myocardique (70-72).

### Autres thérapies

D'autres sont en cours d'étude.

Entre autres on trouve la thérapie par réduction du substrat. Elle consiste en l'inhibition de l'enzyme glucosyltransferase, en défavorisant le passage du céramide en glucosylcéramide. Le principe actif de ce médicament est l' N-butyl-desoxyjirimicine (NB-DNJ). En inhibant la formation du glucosylcéramide on induit un défaut de lactosylcéramide (produit suivant de la dégradation du glucosylcéramide, ce dernier est précurseur de la ganglio-série, lacto-série, et globo-série comme le Gb<sub>3</sub>). Ceci aboutit à moins d'accumulation de substrat non métabolisé. (*Figure 6*).



**Figure 6.** Action du NB-DNJ sur la formation de substrat suite à un défaut enzymatique. En bleu: Réactions biochimiques inhibées par le NB-DNJ prévenant l'action de l'enzyme glucosyltransferase.

Parmi les thérapies qui présente un grand intérêt dans le futur on trouve aussi la thérapie par utilisation des chaperones. L'utilisation de chaperones permet de stabiliser l'enzyme mutante en promouvant sa maturation pour une meilleure activité enzymatique et un rendement fonctionnel adéquat.

## **Biomarqueurs**

Le biomarqueur (BM) est une caractéristique mesurée objectivement et évaluée comme indicateur de processus physiologique ou pathologique, ou d'une réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique. Cette définition a été conciliée par le National Institute of Health, USA.

Le BM peut avoir différents buts: la recherche et la connaissance de la physiopathologie afin de définir une cible thérapeutique, la classification des individus, la prédiction de l'évolution d'une pathologie (le suivi), l'évaluation de l'efficacité d'une pathologie sous traitement, l'adaptation du traitement selon la réponse d'un patient ou encore la recherche des mutations lors de certaines études de pharmacogénétique (73-75).

Un BM reflète l'étendue d'un processus biologique et il est directement lié aux manifestations cliniques de la maladie incriminée (76).

Une fois qu'un BM est identifié, il faut tenir compte de sa fiabilité et pertinence clinique. La charge totale de la maladie doit pouvoir se refléter dans ce même marqueur, et il ne devrait pas être affecté par des conditions indépendantes de la maladie primaire ou d'autres comorbidités.

Un BM devrait être peu coûteux voire complètement non-invasif, facile d'accès et utilisation.

En ce qui concerne le MSL, Cox et al identifie deux familles de BM (77). Les BM directs (comme les macromolécules liées au processus pathologique d'accumulation lysosomale; le Gb<sub>3</sub> pour la MF prise en considération dans ce travail) et les BM indirects, comme l'observation de certains changements au niveau des cellules, de certaines molécules, tissus ou fonctionnement d'un organe en particulier (pour la MF on retrouve le phénomène de remodelage cardiovasculaire, une opacité cornéenne ou encore une démence et une insuffisance rénale). En 2008, Aerts spécifie en peu plus la thèse de Cox (78). Aerts, concernant les BM, prend en compte les métabolites primaires accumulés suite au défaut enzymatique. Comme Cox le fait (par exemple le Gb<sub>3</sub> pour la MF ou la sphingomyeline pour la Niemann-Pick) Aerts rajoute une autre sous-classe aux BM primaires définis par Cox: les protéines plasmatiques spécifiquement secrétées par les cellules qui accumulent les substrat non-métabolisés.

En ce qui concerne la MF, la problématique tourne autour du fait qu'aucun moyen de détection spécifique n'existe encore afin d'émettre le diagnostic de MF.

Le tableau symptomatologique de la MF est large et il se mélange facilement avec celui d'autres pathologies. D'autre part, la reconnaissance de cette maladie est difficile car il n'existe pas de BMs ou symptômes cliniques qui peuvent conduire le médecin à poser le diagnostic exact.

De plus, la nécessité d'évaluer l'atteinte systématique de la MF et la réponse aux traitements (en particulier la TES) priment beaucoup dans la pratique. En effet, en ce qui concerne la réponse au traitement chez les patients Fabry, il n'existe pas encore de marqueur biologique qui soit capable d'attirer l'attention du médecin au moment opportune pour commencer la TES ou pour la modifier/adapter.

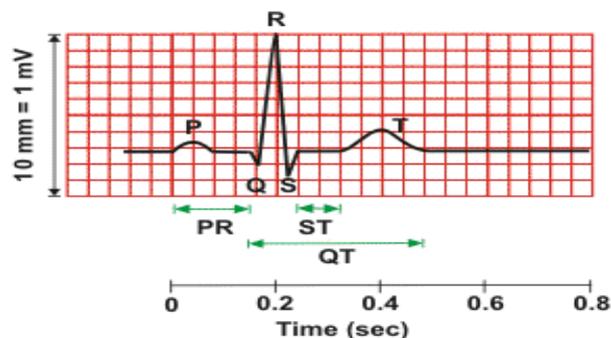
## **Anomalies à l'électrocardiogramme (ECG) dans la MF: un BM indirect de la MF**

### **L'électrocardiogramme physiologique**

L'ECG représente l'enregistrement de l'activité électrique du coeur qui traduit le cycle de la fonction cardiaque.

### Le tracé de l'ECG

L'activité électrique du coeur est étroitement liée à sa fonction physiologique: Les impulsions du myocarde lors de contractions cardiaques se traduisent par la génération de différences de potentiels, qui varient dans l'espace et dans le temps et qui peuvent être enregistrés grâce à l'aide d'électrodes. L'enregistrement de la variation du potentiel par les électrodes mis sur la surface corporelle se fait grâce à la conductibilité des liquides interstitiels du corps humain. Le tracé électrocardiographique représente la méthode la plus facile, la moins chère et la plus pratique pour observer si l'activité électrique du coeur est normale ou s'il y a des pathologies de nature mécaniques ou électriques. Le tracé normal de l'ECG est caractérisé par un aspect caractéristique qui varie uniquement en présence de certains problèmes. Le tracé est caractérisé par différentes ondes, positives et négatives, qui se répètent pour chaque cycle cardiaque (*figure 7*).



P wave (0.08 - 0.10 s)      QRS (0.06 - 0.10 s)  
P-R interval (0.12 - 0.20 s)    Q-T<sub>c</sub> interval (≤ 0.44 s)\*  
\*QT<sub>c</sub> = QT / √RR

**Figure 7. Un tracé ECG physiologique (en première dérivation).**

L'onde P: est la première onde qui se génère dans le cycle, elle correspond à la dépolarisation des oreillettes. Elle a des petites dimensions, puisque la contraction des oreillette n'est pas puissante. Sa durée varie entre 60 et 100 ms.

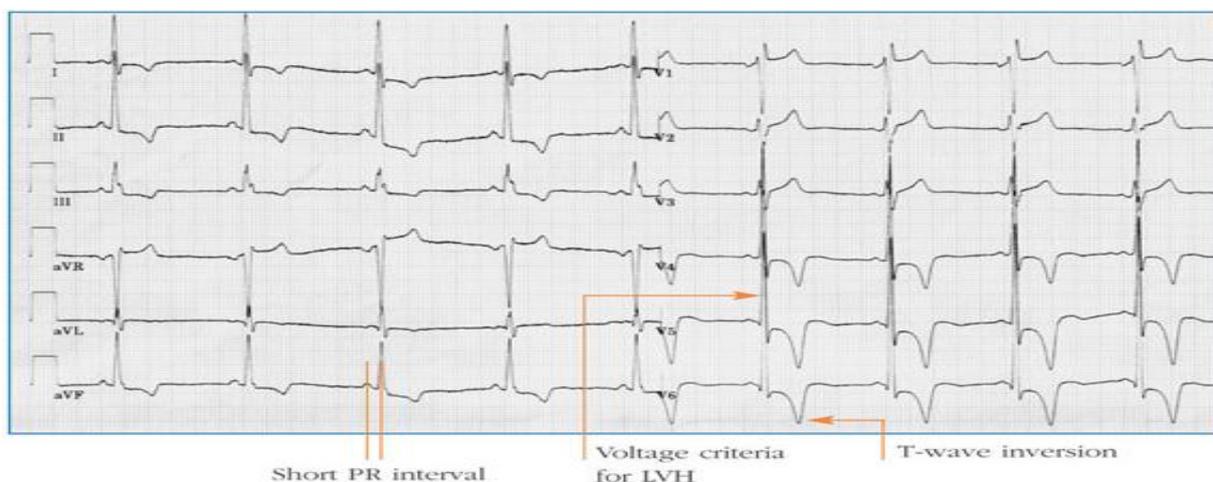
Le complexe QRS: c'est un ensemble de trois ondes qui se suivent l'une après l'autre. Ce complexe correspond à la dépolarisation des ventricules. L'onde Q est négative et de petite taille; l'onde R est caractérisée par un pic très haut et positif; l'onde S est négative et de petite taille. La durée totale du complexe QRS se situe entre 60 et 90 ms.

Onde T: c'est la dernière onde qui apparaît et elle représente la repolarisation des ventricules. Elle n'est pas toujours identifiable, parce qu'elle peut aussi avoir des valeurs très petites.

Onde U: c'est une onde qu'on ne peut pas toujours apprécier dans un tracé ECG. Elle correspond à la repolarisation des faisceaux musculaires qui permettent l'ouverture et la fermeture des valves tricuspidiennes et mitrales.

### L'ECG chez les patients Fabry

Les principales anomalies visibles à l'ECG chez les patients affectés par la MF sont reliées à une diminution de la durée de l'onde P, à une diminution de l'intervalle PQ et à une diminution de la largeur du complexe QRS (79). Une certaine tendance à la dispersion de la dépolarisation (présente dans les segments QT et  $Qt_{corrige}$  ( $QT_c$ )) est aussi observée chez les patients Fabry. En particulier, la diminution de la durée de l'onde P présente une bonne spécificité et sensibilité pour la détection précoce de la MF comme premier signe clinique de la maladie (79,80). Voici un exemple d'un ECG Fabry qui montre le pattern typique des signes électrocardiographiques. (*figure 8*)



**Figure 8.** ECG d'un patient Fabry avec les signes typiques de cette maladie à l'ECG.

L'intervalle PQ est nettement diminué par rapport à la norme mais il n'est mis en évidence que chez 14% des patients affectés (79). Le raccourcissement de l'intervalle PQ peut trouver une explication possible dans l'accumulation du  $Gb_3$  autour du noeud atrio-ventriculaire. Ceci rendrait la conduction du faisceau de dépolarisation myocardique plus rapide. De même, l'accumulation du  $Gb_3$  atrial peut aussi accélérer la conduction de dépolarisation, en donnant naissance au signe le plus important visible à l'ECG et spécifique pour la MF, à savoir, la diminution de la durée de l'onde P.

Certaines études ont rapporté que le diamètre des cellules impliquées dans la transmission de l'onde dépolarisante au niveau cardiaque peut être impliqué dans la vitesse de conduction (79-82).

En particulier, l'augmentation du diamètre de ces cellules est directement proportionnelle à l'augmentation de la vitesse de conduction de l'impulsion électrique. Il est actuellement admis que, dans la MF, l'accumulation chronique de  $Gb_3$  au niveau des cellules est impliquée dans la transmission de l'impulsion cardiaque et est responsable d'une augmentation de la vitesse de conduction. Il en résulte aussi une diminution de la durée des intervalles PR et QT (79,80). En ce qui concerne la dispersion de la repolarisation dans l'intervalle  $Qt_c/QT$  et aussi son prolongement, ces deux aspects sont étroitement liés au risque augmenté de développer des arythmies ventriculaires et des pathologies telles que le syndrome de Brugada et le syndrome du QT court. L'arythmie ventriculaire, la plus connue associée à la MF, c'est la tachycardie ventriculaire (80).

Si l'arythmie est mise en contre balance par rapport au développement de l'hypertrophie ventriculaire du coeur gauche, l'arythmie apparaît plus précocement par rapport à l'hypertrophie. L'hypertrophie va apparaître même en retard par rapport à la précoce accumulation de  $Gb_3$

intracellulaire. Ce qui rend l'utilisation de moyens de diagnostique comme les ultrasons (US) ou l'écho-doppler (Doppler-US) inefficaces pour une détection précoce de cette maladie. L'ensemble de ces éléments attribue à l'ECG un rôle important dans la détection précoce des manifestations cardiaques de la MF (81).

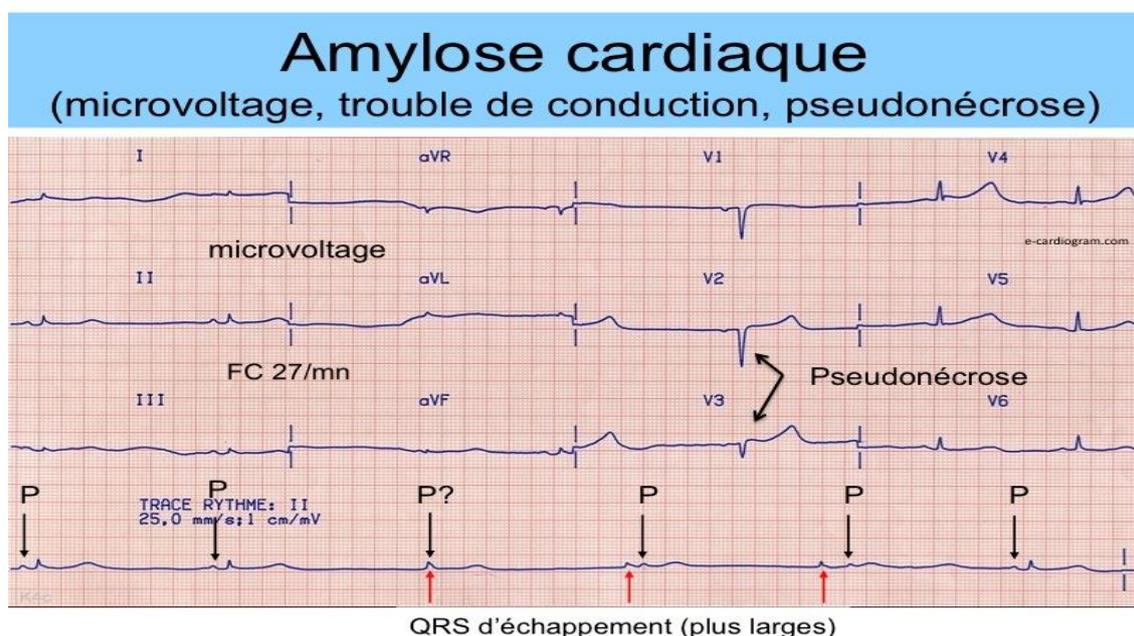
### **L'ECG dans les pathologies à dépôt amyloïde**

Dans la majorité des ECG effectuées chez des patients souffrants d'amyloïdose ou d'autre pathologies de stockage extracellulaire d'immunoglobuline on trouve des signes non-spécifiques et non-patognomiques de la maladie. Une réduction de l'amplitude du complexe QRS est, en général, bien marquée. La présence d'un bas voltage concernant le complexe QRS dans la troisième dérivation (<0.5 mV) peut ce pendant être présent. Il est souvent associé à une déviation axiale et à un bloc atrio-ventriculaire de premier degré (81-83).

Curieusement, la majeure partie des patients maintiennent un rythme sinusal associé à une correcte largeur du QRS, causée par une inexplicable tendance au stockage des dépôts amyloïdes entre le faisceau de His et les fibres de Purkinije plutôt qu'au niveau du noeud atrioventriculaire. Des changement non-spécifiques du segment ST conduisent très souvent au diagnostic d'ischémie myocardique.(83,84)

Parmi les signes principaux observés dans l'ECG (*figure 9*) d'un patient affecté d'amyloïdose ou autre pathologie d'accumulation extracellulaire d'immunoglobuline on peut citer(83,84):

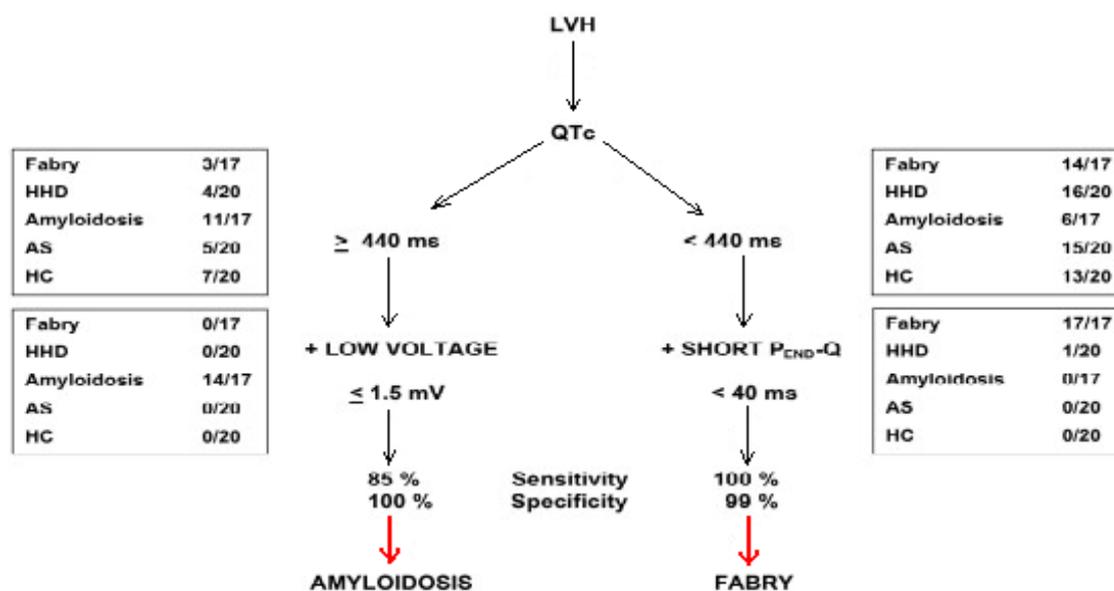
- Diminution du voltage du complexe QRS
- BAV (Bloc Atrio-ventriculaire) du 1er degré
- Sous-décalage de l'onde Q
- Pattern pseudo-infarctus
- Diminution de l'amplitude ou absence des ondes R dans les dérivations précordiales à droite
- Bloc de branche associé à des anomalies de l'axe du coeur
- Fibrillation atriale



**Figure 9.** Pattern typique des signes électrocardiographiques qu'on peut retrouver chez les patients atteints d'une pathologie d'accumulation extracellulaire de type protéinique.

Tant pour la MF, que les pathologies concernant des dépôts de amyloïdes, il peuvent avoir un tableau symptomatologique très similaire. L'équipe de Gavin a proposé un algorithme scientifique qui permet la distinction entre ces deux types de pathologie en se basant uniquement sur l'analyse de l'électrophysiologie cardiaque (*Figure 10*). Ici on a uniquement comparé les deux en n'utilisant qu'un examen paraclinique tel que l'ECG. On peut remarquer combien deux types de pathologies de dépôts (intra- et extra-cellulaire) diffèrent au niveau de leurs mécanismes physiologiques.

La maladie de Fabry présente un ECG de dépôt non classique. Ce dernier est spécifique de la maladie de Fabry mais reste à l'heure actuelle non explicables.



**Figure 10.** Procédure à suivre devant un ECG suspect lors de pathologies “de stockage” telles que l'amyloïdose ou la MF.

## Les biomarqueurs lipidiques de la maladie de Fabry

### Gb<sub>3</sub> e Lyso-Gb<sub>3</sub> (iGb<sub>3</sub>)

Le Gb<sub>3</sub> est un trihexylceramide (85). Comme les autres céramides, le Gb<sub>3</sub> est impliqué dans des événements physiologiques importants. La sur-expression et l'accumulation intralysosomale de Gb<sub>3</sub> sont observables dans la MF.

Le Gb<sub>3</sub> appartient aussi à la classe des glycolipides les plus exprimés dans les tissus cancéreux. La sur-expression de Gb<sub>3</sub> est mieux caractérisée dans l'adénome colorectal et dans le lymphome de Burkitt. Il peut être aussi présent dans d'autres types de tumeurs comme le cancer du sein ou du testicule. Dans l'adénome colorectal, il a été rapporté une claire corrélation entre le potentiel

métastatique de la tumeur et la sur-expression de Gb<sub>3</sub>. La sur-expression du Gb<sub>3</sub> s'observe dans la maladie qui constitue le sujet de cette étude (86).

D'autre part, le Lyso-Gb<sub>3</sub> a une structure très similaire au Gb<sub>3</sub> mais son rôle physiologique est peu clair. Une étude effectuée par Zhou et al a cependant trouvé que le lyso-Gb<sub>3</sub> est capable de stimuler les lymphocytes NK aussi bien chez l'être humain que chez le rat (87). Dans ce sens, l'équipe de Zhou a pu conclure que le lyso-Gb<sub>3</sub> peut être le principale élément endogène qui favoriserait la fonction et le développement des lymphocytes NK.

Le Gb<sub>3</sub> et le Lyso-Gb<sub>3</sub> ont été décrits comme des biomarqueurs de la MF. Ils ont été mis en évidence et quantifiés dans le plasma et dans les urines des patients Fabry. Le domaine de recherche dans le but de découvrir de nouveaux biomarqueurs associés à la maladie et à sa sévérité ainsi qu'à la réponse au traitement (en particulier la TES) reste un domaine très actif.

De nombreuses méthodes ont été développées afin d'isoler et mesurer le Gb<sub>3</sub>, comme la chromatographie gas-liquide et la chromatographie à couches minces. Les glycosphingolipides peuvent être individualisés et identifiés par la spectrométrie de masse. Avec l'avènement des méthodes d'ionisation (softer ionization) de la spectrométrie de masse, les analyses de faibles quantités de glycosphingolipides acides, les acides gras et de la sphingosine ont été rendu possibles. Le développement de la méthode d'extraction a, ensuite, permis une détermination rapide, automatisée et quantitative du Gb<sub>3</sub> dans le plasma et dans les urine grâce à l'utilisation de la chromatographie liquide en conjugaison à la spectrométrie de masse (88). Cette méthodologie permet d'identifier avec précision le taux du Gb<sub>3</sub> chez les patients Fabry- hétérozygotes ou hémizyotes (89).

Young E et al, utilisant la méthodologie d'individualisation des biomarqueurs décrite plus haut, a montré que les taux urinaires de Gb<sub>3</sub> peuvent être considérés comme marqueurs plus spécifiques de la MF par rapport au taux plasmatique (90).

Cependant, la présence de faux négatifs suite au dosage du Gb<sub>3</sub> urinaire n'est pas à exclure. En effet, les patients hétérozygotes avec la MF peuvent ne pas présenter de concentrations urinaires pathologiques de Gb<sub>3</sub>.

De nombreux essais ont été faits dans le but d'identifier les patientes hétérozygotes à partir du profil lipidique urinaire par spectrométrie de masse. Cependant, cette méthode ne permet pas d'identifier tous les patientes Fabry (90).

En ce qui concerne la physiopathologie liée à l'excès d'accumulation de Gb<sub>3</sub> dans différents tissus, Seongee Park et al ont pu mettre au point la dysfonction endothéliale des vaisseaux sanguins chez des souris Fabry (91). Dans les détails, au niveau de la membrane plasmique des cellules endothéliales, la protéine canal Kc3.1 est altérée. La protéine Kc3.1 présente au niveau de la membrane des cellules endothéliales est impliquée dans la transmission de l'hyperpolarisation au niveau des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins en causant une vasodilatation.

Dans la MF, l'accumulation du Gb<sub>3</sub>, réduit l'expression de Kc3.1 à travers la down-regulation de ERK et AP-1, deux facteurs de transcriptions, et l'up-regulation de REST, un autre facteur de transcription. Une accumulation de Gb<sub>3</sub> intracellulaire induit une diminution de la concentration intracellulaire de PI-3K, étroitement lié au bon fonctionnement du Kc3.1. Dans ces conditions, l'activité du Kc3.1 diminue fortement avec la possibilité pour les vaisseaux sanguins de se dilater. Le Kc3.1 est maintenant l'objet d'une possible cible thérapeutique future.

Le Lyso-Gb<sub>3</sub> est le deuxième sphingolipide qu'on retrouve dans la MF. Il a un haut degré de solubilité dans les milieux aqueux et, chimiquement, il dérive du Gb<sub>3</sub> par déacylation.

Des expériences *in vitro* ont rapporté que les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) prolifèrent en présence de plasma provenant de patients Fabry. Ces mêmes VSMC exposées à du lyso-Gb<sub>3</sub> à des concentrations très similaires à celles trouvées dans le milieu plasmatique des patients affectés par la MF poussent également. On peut en déduire que le Lyso-Gb<sub>3</sub> pourrait jouer un rôle important dans la pathogenèse de la MF (92).

Le Lyso-Gb<sub>3</sub> a été proposé comme inhibiteur de l'enzyme alpha-Galactosidase A. Ceci pourrait expliquer le cercle vicieux qui va s'installer chez les patients Fabry symptomatiques où le Gb<sub>3</sub>, le Lyso-Gb<sub>3</sub> et l'alpha-Gal A sont les acteurs principaux.

En effet, comme cela est cité plus haut, le Lyso-Gb<sub>3</sub> dérive du processus de déacylation du Gb<sub>3</sub>. Le lyso-Gb<sub>3</sub> inhiberait à ce point l'alpha-Gal A en amenant à la formation d'une excessive quantité de Gb<sub>3</sub> suite à une aggravation de la fonction de l'alpha-Gal A, déjà compromise à la base chez les patients Fabry.

### **Le Sphingosine 1-Phosphate**

Le S<sub>1</sub>P peut être considéré comme produit final commun de la dégradation des sphingolipides. Il a une fonction de messenger secondaire à l'intérieur de la cellule et de messenger extracellulaire en se liant à ses récepteurs de surface membranaire associés à la protéine G.

Dans la recherche de marqueur circulant responsable de l'hypertrophie cardiaque dans la maladie de Fabry, les travaux de nos laboratoires (Brakch et al) ont permis d'identifier et de mettre en évidence une présence plus importante du S<sub>1</sub>P chez les patients Fabry. Une corrélation entre la concentration de S<sub>1</sub>P dans le plasma des patients Fabry et une augmentation de la prolifération des cellules musculaires lisses a été montrée (92).

Le remodelage cardiaque de la MF et l'hypertrophie des cellules musculaires lisses qui entourent les vaisseaux sanguins peut être régi par le même mécanisme. Ce concept prend origine par la corrélation observée entre l'épaississement intima-media et l'hypertrophie cardiaque chez les patients Fabry.

Ces deux paramètres englobent l'hypertrophie cardiaque et l'épaississement intimo-medial de l'artère carotidienne commencent une bonne corrélation avec le taux circulant du S<sub>1</sub>P.

Le S<sub>1</sub>P est décrit comme ayant un rôle de promoteur de la croissance et de l'hypertrophie impliquée dans le remodelage cardiovasculaire chez les patients des deux sexes qui présentent la MF. Les patients de sexe masculin ont un taux plasmatique de S<sub>1</sub>P plus élevé par rapport à des individus contrôles non affectés par la MF.

Par ailleurs l'administration du S<sub>1</sub>P chez la souris induit un développement de remodelage cardiaque et vasculaire similaire à celui observé chez les patients atteints de la MF (93).

L'hypertrophie cardiomyocytaire semble être médiée par le récepteur 1 de la S<sub>1</sub>P (S<sub>1</sub>PR1). L'utilisation de auto-anticorps qui inhibent la fonction de ce récepteur a pu mettre en évidence une diminution de l'évolution de l'hypertrophie cardiaque (94). En outre, d'autres études ont proposé que le composé S<sub>1</sub>P retrouvé dans les lipoprotéines de haute densité (HDL) a un rôle protecteur dans les pathologies athéromateuses actives au niveau de l'endothélium vasculaire (95). Récemment, il a été proposé que les patients atteints par la MF semblent être protégés des événements athéromateux tel la formation de plaques d'artériosclérose (athéromes) par rapport aux patients non Fabry à un score

similaire pour les facteurs de risque cardiovasculaires (96). Ces observations peuvent nuancer l'effet supposé délétère du S<sub>1</sub>P.

L'S<sub>1</sub>P est, donc, un médiateur bioactif qui participe au remodelage cardiovasculaire chez les patients Fabry mais qui pourrait avoir un rôle protecteur concernant les plaques athéromateuses.

### **Les biomarqueurs non-lipidiques**

La MF peut être aussi décrite comme une maladie inflammatoire. En effet on y retrouve un état anémique, en état pro-artériosclérotique et pro-thrombotique, une altération des voies biochimiques du monoxyde d'azote (NO), une augmentation de la production des radicaux libres d'oxygène (ROS) et une augmentation des taux plasmatiques de la myeloperoxydase (MPO). Les complications macrovasculaires dans la MF, telles que les thromboses, sont augmentées. La microcirculation est, elle aussi, altérée par l'accumulation de Gb<sub>3</sub> au niveau de l'endothélium vasculaire. Les cellules présentent des vacuoles, deviennent hypertrophiques et conduisent à des phénomènes ischémiques.

Moore et al joint au dossier scientifique le fait qu'un défaut de alpha-Galactosidase est étroitement lié à une dérégulation de la production de NO. Une production excessive de NO, associée à la présence de ROS, amène à la formation de peroxy-nitrite, un oxydant responsable des endommagements cellulaires et de cytotoxicité. Comme cité auparavant, les patients Fabry ont un état «pro-artériosclérotique». Les sphingolipides jouent un rôle important dans la signalisation des processus inflammatoires impliqués dans l'athérogénèse. Cependant, contrairement à ce qui peut être attendu, l'étude de Vedder et al, effectué sur un collectif de 440 hommes affectés par la MF ne présentent pas de formes précoces d'artériosclérose (97).

Selon Utsumi et al, les complications de la MF sont à associer au développement accéléré du phénomène d'artériosclérose sous-adjacent et non à la formation directe d'athéromes suite à l'excessif taux de sphingolipides plasmatiques secondaire au mauvais fonctionnement de l'enzyme alpha-Galactosidase (98).

En conclusion, l'association de la MF à l'artériosclérose ne semble pas claire; introduire la MF dans un contexte pro-artériosclérotique plutôt que anti-artériosclérotique reste à définir et à mieux caractériser.

Un autre biomarqueur non lipidique qui se trouve en hautes concentrations plasmatiques est la myeloperoxydase (MPO).

Des études récentes ont confirmé une augmentation proportionnelle du risque des événements cérébrovasculaires et de dysfonctions endothéliales à l'augmentation des taux plasmatiques de MPO (99,100).

La MPO est un enzyme qui se trouve dans les neutrophiles, macrophages et monocytes ayant une activité oxydante et peroxydative forte. Le principal activateur de la MPO est justement le ROS. Comme cela a été décrit auparavant, les patients Fabry ont un taux de ROS élevé par rapport à la normale ce qui se traduit par l'activation de la MPO. Une activation massive de la MPO amène essentiellement à une augmentation de l'interaction entre les leucocytes et les cellules endothéliales vasculaires (état connu sous le nom de «rolling» en anglais, première étape de la diapédèse) qui se traduit par une augmentation du risque thrombotique.

La MPO est aussi capable de faire la peroxydation des lipides circulants (HDL/LDL) en favorisant le processus inflammatoire intimo-médial à la base de la formation des athéromes. Outre à avoir des caractéristiques pro-artériosclérotiques, la MPO a un rôle inhibiteur de la NO synthase (101). Ceci affecte le muscle des vaisseaux en inhibant la vasodilatation (102). Ce qui se traduit par la vasculopathie chez les patients Fabry.

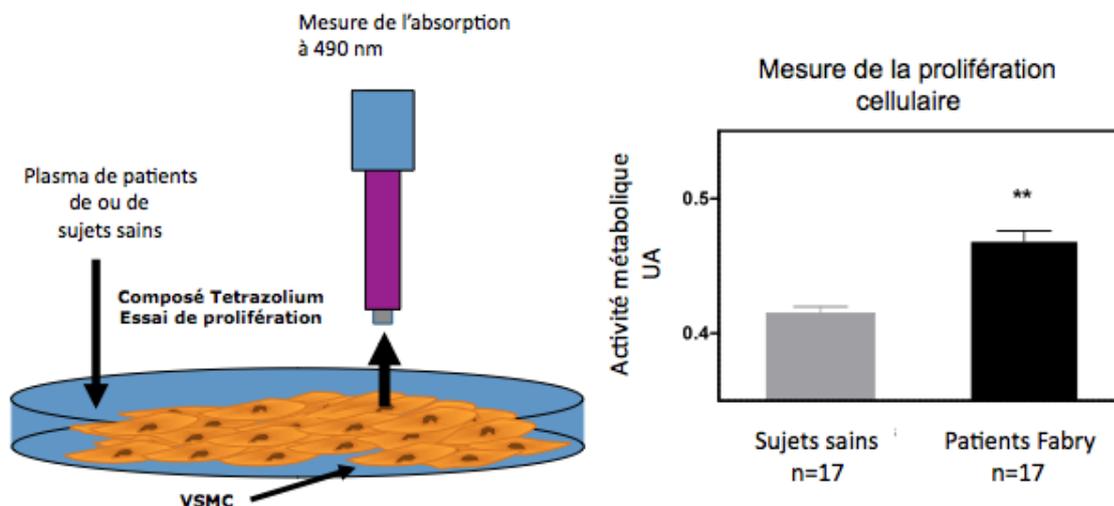
Kaneski et al en 2006 ont toutefois fait observer que l'effet de la TES n'affecte pas du tout les concentrations plasmatiques de MPO en gardant quand même un risque de phénomènes cardiovasculaires dans une mesure non négligeable chez les patients Fabry bien que déjà sous traitement TES (100).

Les thérapies futures pour ce qui concerne la MF, et, plus en général les autres MSL, doivent donc tenir compte de l'effet toxique de la MPO.

## Travail expérimental

Comme indiqué auparavant, dans la maladie de Fabry les dépôts tissulaires sont composés principalement par le Gb<sub>3</sub>. Chez les patients atteints par cette maladie, les taux de Gb<sub>3</sub> sont élevés dans les tissus, le plasma et les urines. L'autopsie pratiquée chez ces patients après décès, montre que l'hypertrophie cardiaque ne peut pas être expliquée par le seul dépôt du substrat Gb<sub>3</sub>. Un mécanisme impliquant « un facteur trophique » responsable de l'hypertrophie cardiovasculaire constatée a donc été proposé.

Dans notre laboratoire, nous avons utilisé les plasmas de patients Fabry couplés à un essai de prolifération cellulaire, pour démontrer la présence d'un facteur trophique dans le plasma des patients Fabry (*Figure 11*). Une corrélation entre l'hypertrophie cardiaque et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires mises en culture a été démontrée (92). Ceci confirme l'hypothèse que dans le plasma de patient Fabry, il existe un facteur responsable de l'induction de l'hypertrophie cardiaque.



A.

B.

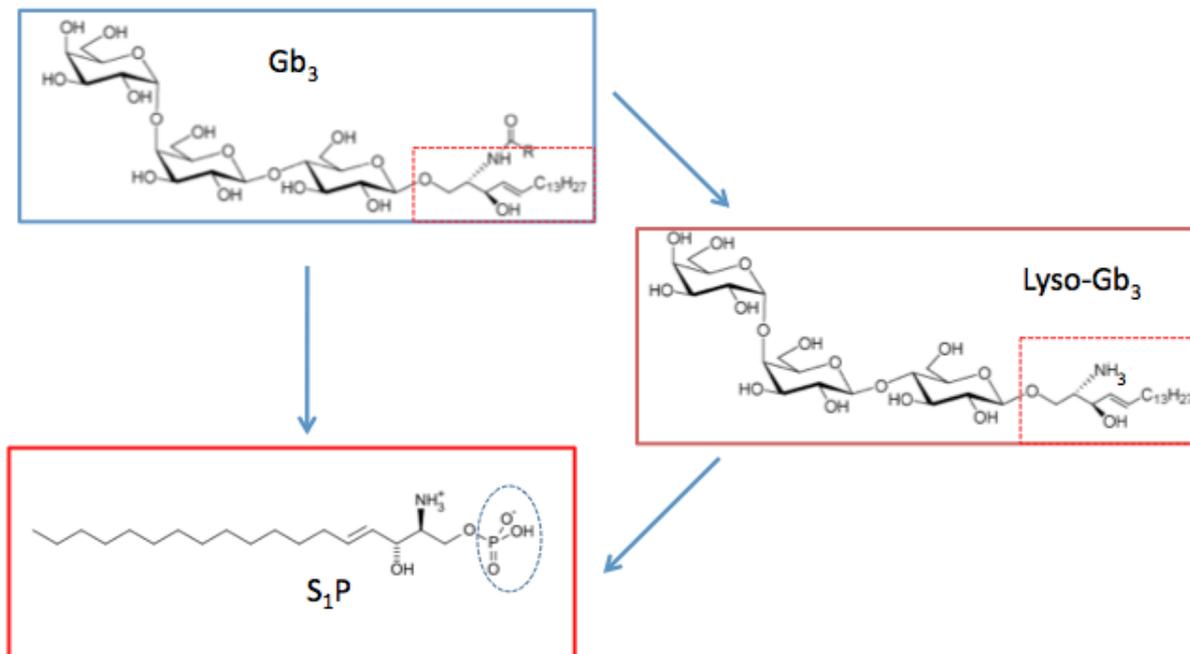
**Figure 11.** Prolifération de cellules musculaires lisses en présence de plasma de patients Fabry versus de sujets sains.

**A:** Les VSMCs sont incubées en présence du composé Tetrazolium. L'absorption à 490 nm reflète l'activité métabolique et traduit le taux de prolifération cellulaire en présence de plasma de patients Fabry versus sujets sains.

**B:** Histogramme de comparaison de la prolifération cellulaire entre un groupe de patients Fabry versus un groupe de sujets sains (\*\* p<0.01).

Nous avons donc cherché à identifier la molécule possiblement à l'origine de ce phénomène. En parallèle, un autre groupe de recherche a identifié et proposé le Lyso-Gb<sub>3</sub> comme molécule responsable de l'hypertrophie (101). Nos recherches utilisant notre essai cellulaire nous ont amenés à identifier le sphingosine 1-phosphate comme facteur potentiellement responsable de l'hypertrophie cardiaque (94).

La comparaison de la structure chimique du lyso-Gb<sub>3</sub> et du S<sub>1</sub>P ainsi que leurs effets similaires sur la prolifération cellulaire nous conduisent à imaginer l'existence d'une relation possible entre les molécules lyso-Gb<sub>3</sub> et S<sub>1</sub>P (*Figure 12*).



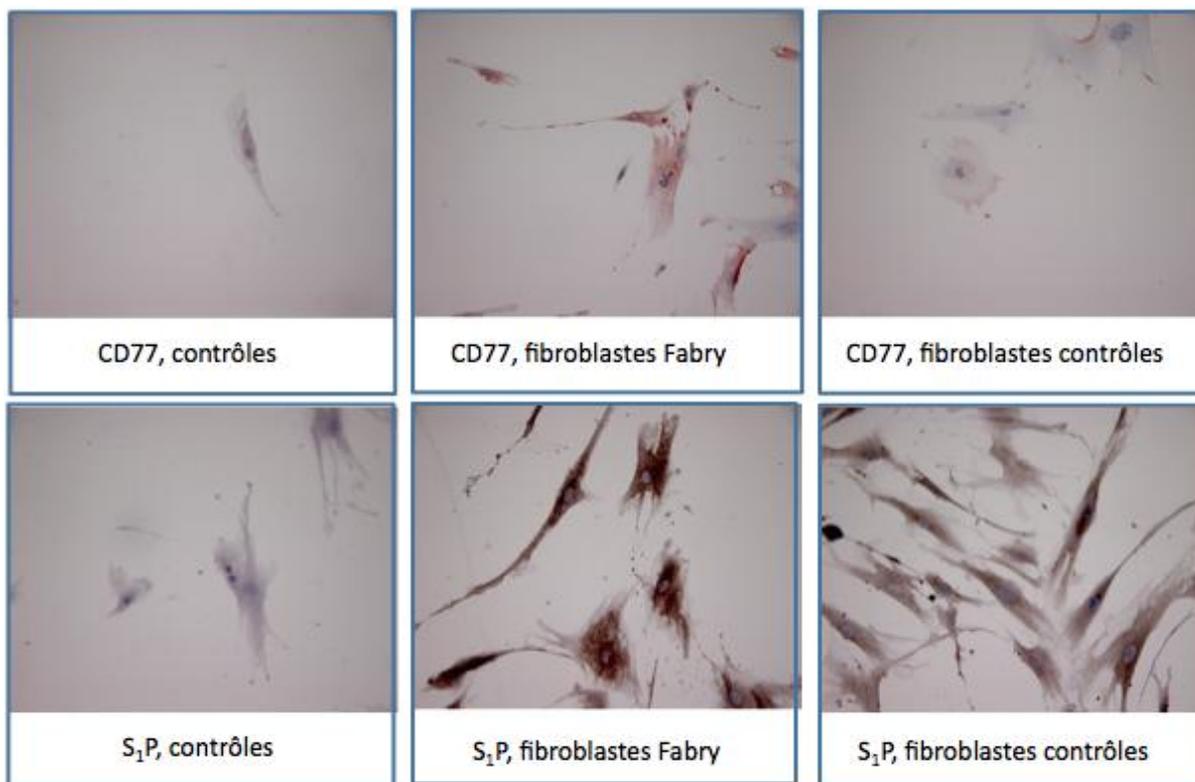
**Figure 12.** Quelle relation peut exister entre le Gb<sub>3</sub>, le lyso-Gb<sub>3</sub> et le S<sub>1</sub>P?

Le dosage du Gb<sub>3</sub> et du Lyso-Gb<sub>3</sub> dans le plasma ou les urines des patients montre qu'il existe une corrélation entre ces deux molécules (89). Selon la même logique, nous avons réalisé des expériences pour montrer l'existence d'une relation entre le Gb<sub>3</sub> et le S<sub>1</sub>P. Pour cela, nous avons fait

généraliser des anticorps anti-S<sub>1</sub>P chez le lapin et avons utilisé des anticorps anti-Gb<sub>3</sub> commerciaux. Nous avons ensuite réalisé un marquage immuno-histologique sur des fibroblastes de patients Fabry et non Fabry.

La *Figure 13* montre un marquage immunologique anti-Gb<sub>3</sub> des fibroblastes issus de patients Fabry versus des fibroblastes de sujets contrôles. Les analyses montrent que le marquage des cellules Fabry est plus intense et plus abondant. Les mesures de l'intensité de marquage et le rapport d'intensité par unité de surface montrent que ces deux paramètres sont plus élevés dans les cellules Fabry par rapport aux cellules non Fabry.

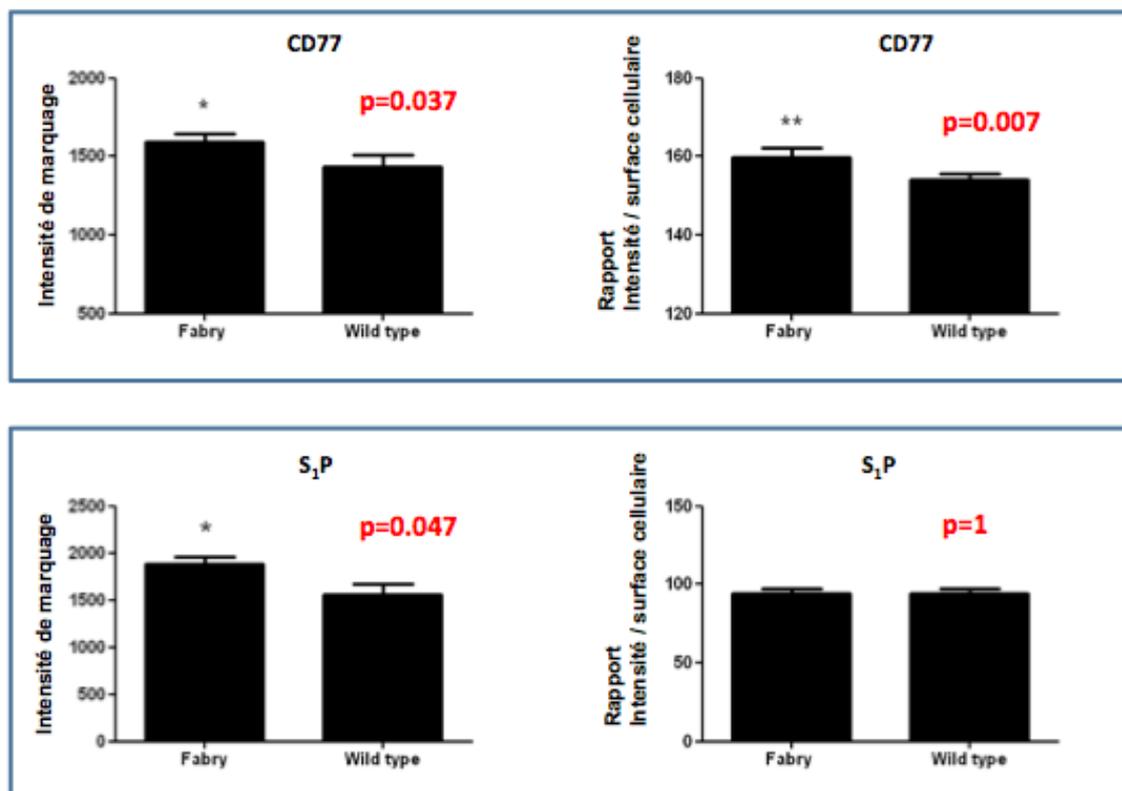
Nous avons ensuite réalisé les mêmes expériences avec les anticorps anti-S<sub>1</sub>P. La comparaison de l'intensité de marquage montre effectivement un marquage intense des cellules Fabry, cependant la comparaison du rapport d'intensité par unité de surface ne présente pas de différence importante entre les cellules Fabry et les cellules contrôles.



***Figure 13.*** Immuno-marquage de Gb<sub>3</sub> et S<sub>1</sub>P sur des fibroblastes Fabry versus des fibroblastes de sujets sains. Les cellules fibroblastes contrôles sont moins marquées que les cellules Fabry.

La variation de l'intensité de marquage aussi bien pour le Gb<sub>3</sub> que pour le S<sub>1</sub>P va dans le même sens et est en faveur d'une association entre la génération de ces deux molécules. Or, la différence observée au niveau du rapport de l'intensité par unité de surface reflète le comportement sécrétoire différent de ces deux molécules. Bien qu'il s'agisse d'une molécule que l'on trouve dans le milieu extracellulaire, le Gb<sub>3</sub> se trouve majoritairement stocké à l'intérieur de la cellule. Ces propriétés ne sont pourtant pas partagées par le S<sub>1</sub>P : cette dernière molécule est présente en intracellulaire mais

se trouve majoritairement dans le milieu extracellulaire. Le S<sub>1</sub>P semble d'ailleurs présenter un faible taux de stockage intracellulaire (*Figure 14*).

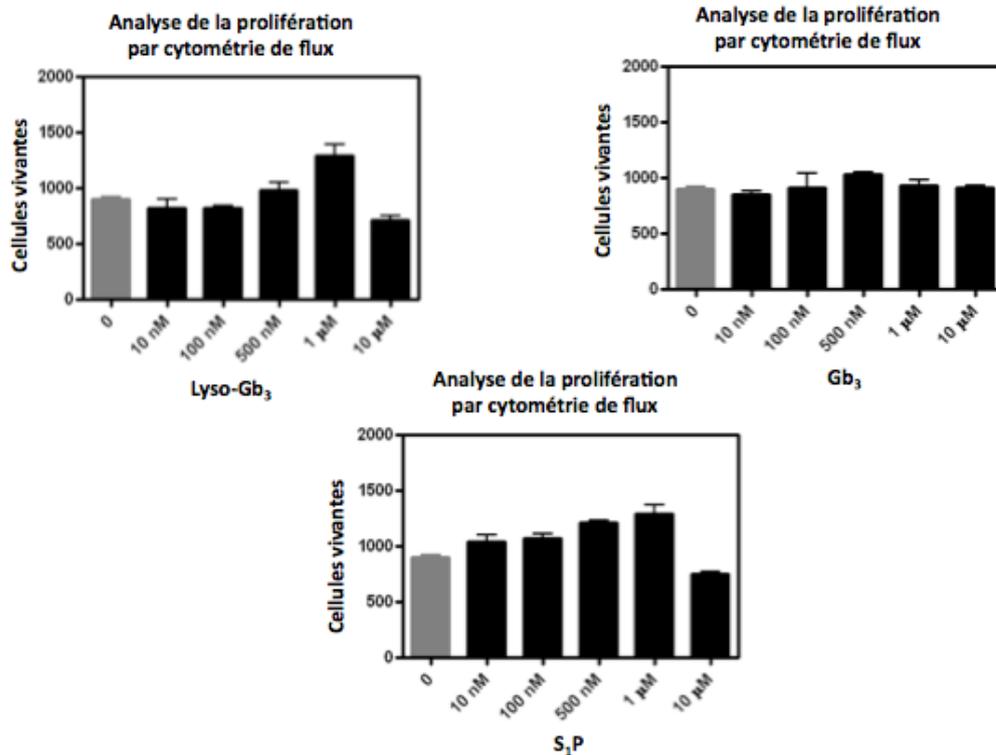


**Figure 14.** Mesure d'immuno-marquage (intensité et rapport intensité/surface cellulaire) du Gb<sub>3</sub> et du S<sub>1</sub>P chez les fibroblastes Fabry et les fibroblastes contrôles.

Ces expériences suggèrent l'existence d'une relation entre le Gb<sub>3</sub> et le S<sub>1</sub>P, et implique qu'en présence de Gb<sub>3</sub>, du S<sub>1</sub>P peut être généré. Les résultats de nos expériences ne peuvent pas être utilisés pour établir une corrélation directe. Par ailleurs, les anticorps ne sont pas capables de discerner le Gb<sub>3</sub> du Lyso-Gb<sub>3</sub>, ce qui indique que les molécules mises en évidence peuvent aussi bien être des molécules Gb<sub>3</sub> que Lyso-Gb<sub>3</sub> ou un panachage de ces deux molécules dans des proportions non déterminées.

Pour apporter d'autres éléments en faveur d'une corrélation directe entre les deux molécules, nous avons comparé l'effet du S<sub>1</sub>P, du Gb<sub>3</sub> et du Lyso-Gb<sub>3</sub> sur la prolifération des cellules musculaires lisses mises en culture. Le Gb<sub>3</sub> n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire alors que dans des conditions identiques, Lyso-Gb<sub>3</sub> et S<sub>1</sub>P induisent une prolifération cellulaire similaire.

Ces expériences ont été réalisées par deux techniques différentes: la première par mesure d'activité métabolique, ce qui reflète le nombre de cellules métaboliquement actives et confirmée par FACS, et la seconde consiste en un comptage individuel des cellules (*Figure 15*).

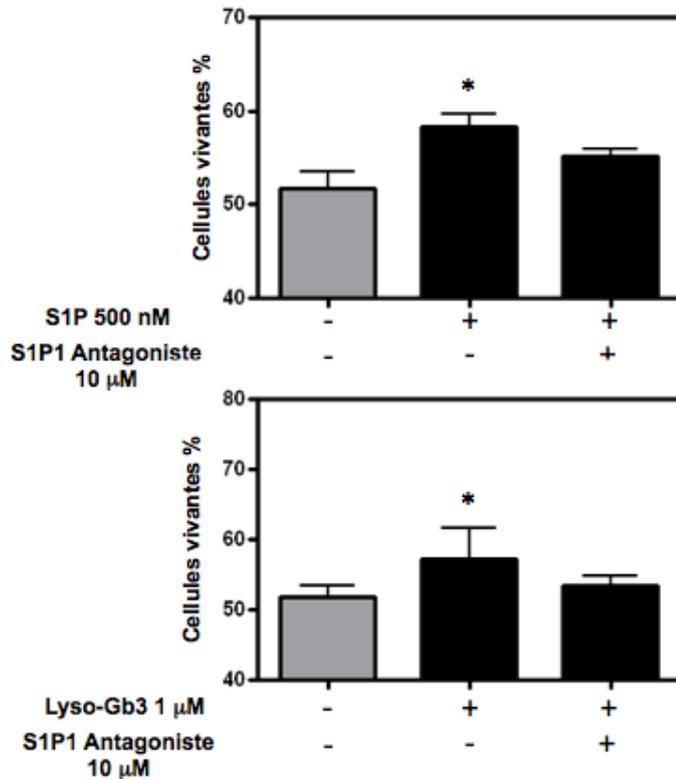


**Figure 15.** Analyse de la prolifération des cellules musculaires lisses après 48 heures d'incubation en présence de différentes concentrations de Gb<sub>3</sub>, Lyso-Gb<sub>3</sub> ou S<sub>1</sub>P. Seul Lyso-Gb<sub>3</sub> et S<sub>1</sub>P induisent une prolifération des cellules musculaires lisses.

Nos expériences ne permettent pas d'établir une relation entre le Gb<sub>3</sub> et le S<sub>1</sub>P ni entre le Gb<sub>3</sub> et le lyso-Gb<sub>3</sub>.

Pour évaluer l'existence potentielle d'une relation entre S<sub>1</sub>P et Lyso-Gb<sub>3</sub>, nous avons utilisé l'antagoniste de récepteur S<sub>1</sub>P1, le W146. Les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs) en culture ont été incubées parallèlement en présence de S<sub>1</sub>P et de Lyso-Gb<sub>3</sub>, une première fois en présence de l'antagoniste du récepteur S<sub>1</sub>P1 et une seconde fois en l'absence de l'antagoniste du récepteur S<sub>1</sub>P1. Les résultats obtenus montrent que l'effet prolifératif des deux molécules a été inhibé en présence de l'antagoniste du récepteur S<sub>1</sub>P1. Ceci indique qu'une relation entre le S<sub>1</sub>P et le Lyso-Gb<sub>3</sub> est à envisager, sans en connaître le lien exact.

Une relation directe impliquerait que le Lyso-Gb<sub>3</sub> soit métabolisé en S<sub>1</sub>P. Le S<sub>1</sub>P ainsi généré est libéré dans le milieu extracellulaire et, se liant au récepteur S<sub>1</sub>P1, induit la prolifération cellulaire. Par ailleurs, l'on peut imaginer que le Lyso-Gb<sub>3</sub>, sans être un précurseur moléculaire du S<sub>1</sub>P, induit la génération de S<sub>1</sub>P par « contre régulation » cellulaire, aboutissant à la prolifération cellulaire visualisée (*Figure 16*).

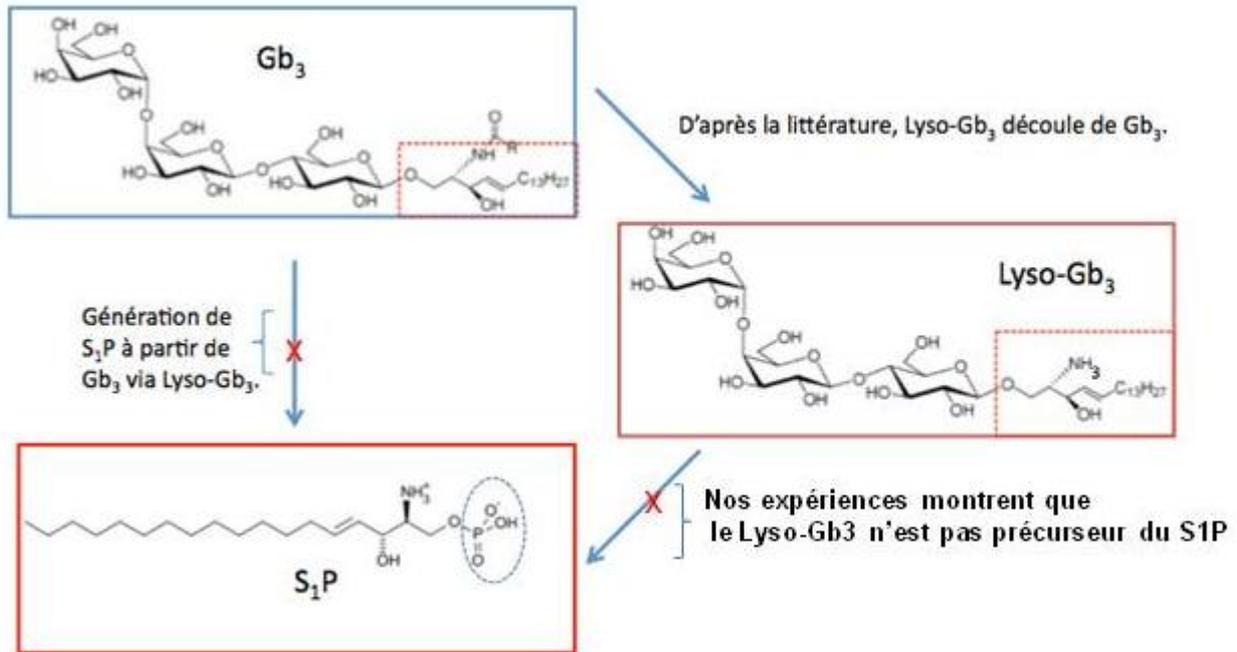


**Figure 16.** L'utilisation de l'antagoniste du récepteur S<sub>1</sub>P1 (W146) induit une diminution de la prolifération cellulaire provoquée aussi bien par Lyso-Gb<sub>3</sub> que S<sub>1</sub>P (\* p<0.05, n=6).

Pour établir une relation directe entre le S<sub>1</sub>P et le Lyso-Gb<sub>3</sub>, nous avons réalisé les expériences suivantes:

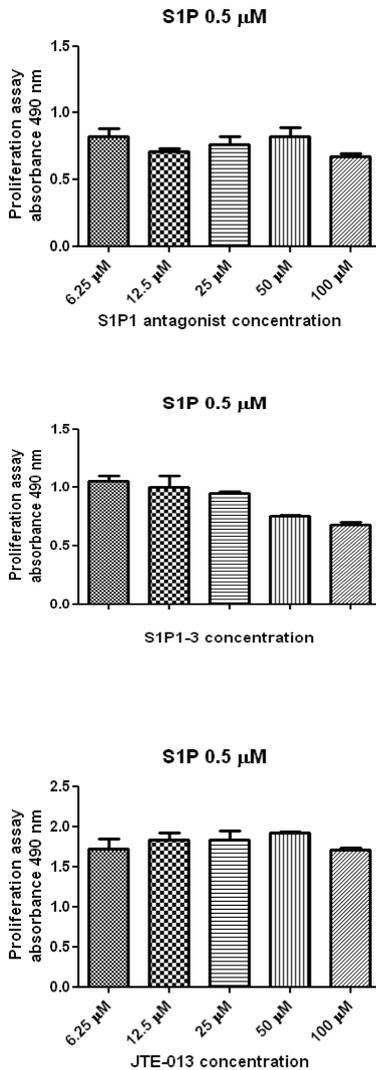
Des cellules musculaires sont mises en culture et différentes quantités de Gb<sub>3</sub> et de Lyso-Gb<sub>3</sub> ont été additionnées et les cellules incubées pour la nuit. L'analyse par spectroscopie de masse des cellules incubées et le surnageant ne montre pas de présence significativement élevée de S<sub>1</sub>P supérieur aux cellules sans additif. Ces résultats ne confirment pas notre hypothèse et excluent la génération du S<sub>1</sub>P à partir du Lyso-Gb<sub>3</sub>.(Figure 17)

Seule le fait que le S<sub>1</sub>P et le lyso-Gb<sub>3</sub> sont des molécules qui compétent pour les mêmes récepteurs est maintenue. Pour apporter plus d'arguments pour cela nous avons étudié l'effet antagoniste sur l'action S<sub>1</sub>P et lyso-Gb<sub>3</sub> sur la prolifération des cellules musculaires lisses.



**Figure 17:** Schéma représentant la formation possible du S<sub>1</sub>P à partir du lyso-Gb<sub>3</sub>.

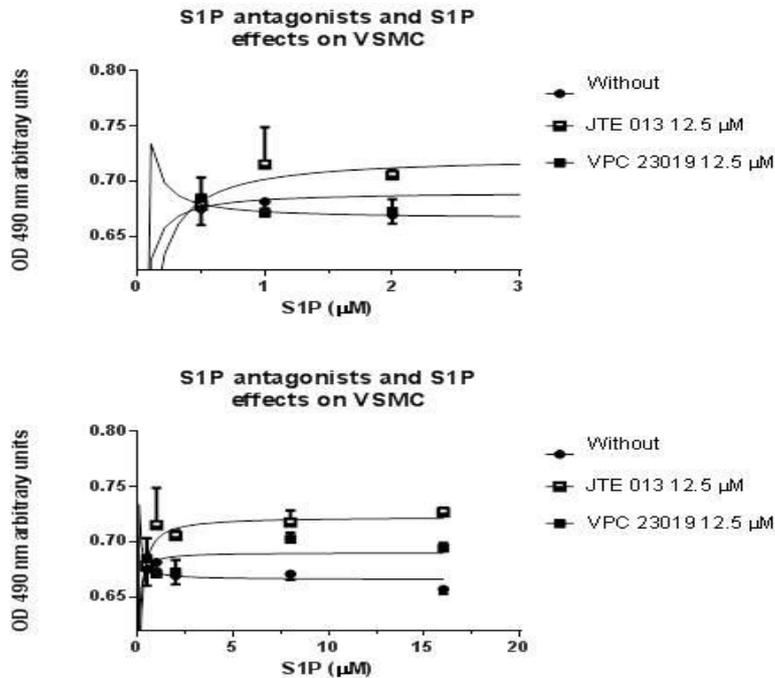
L'effet antagoniste pour les deux récepteurs S<sub>1</sub>P1-3 et S<sub>1</sub>P2 a été étudié par l'antagoniste JTE 013 pour le S<sub>1</sub>P2 et l'antagoniste VPC 23019 pour les récepteurs S<sub>1</sub>P1-3. La *figure 18* montre que le récepteur S<sub>1</sub>P2 n'est pas responsable de la prolifération induite par le S<sub>1</sub>P. Par contre, quand les récepteurs S<sub>1</sub>P1 et S<sub>1</sub>P3 sont bloqués par le VPC 23019, la prolifération des cellules musculaires lisses est inhibée.



**Figure 18.** L'utilisation de l'antagoniste du récepteur S<sub>1</sub>P<sub>1</sub> (W146) induit une faible diminution de la prolifération cellulaire provoquée aussi bien par S<sub>1</sub>P. L'antagonite S<sub>1</sub>P<sub>1</sub>-3 VPC 23019 induit une bonne inhibition de la prolifération.

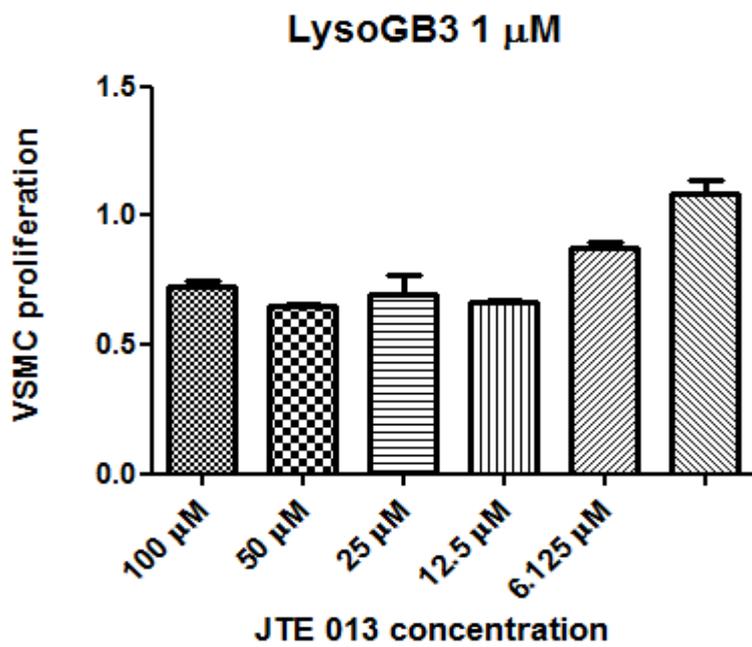
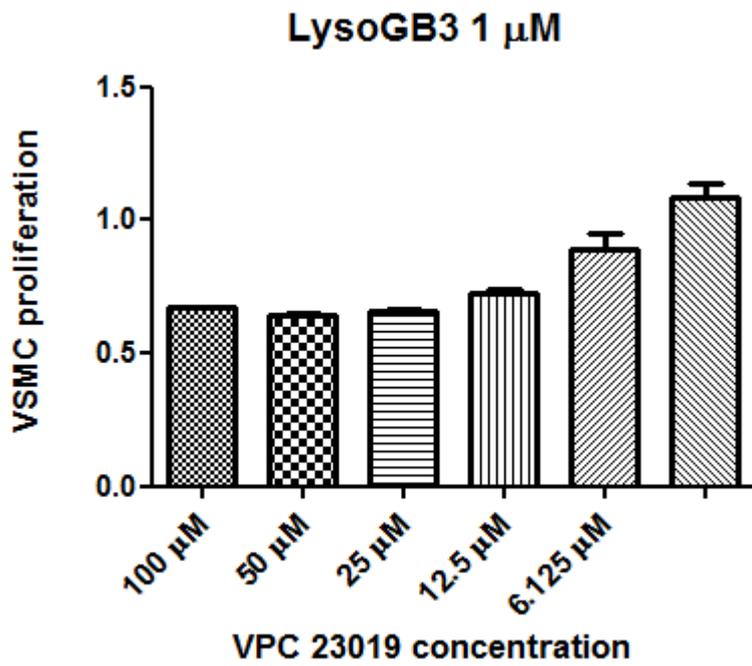
La concentration intermédiaire de 12.5 microM de ces deux antagonistes a été utilisée pour identifier lequel des récepteurs est le plus impliqué dans la prolifération des cellules musculaires lisses.

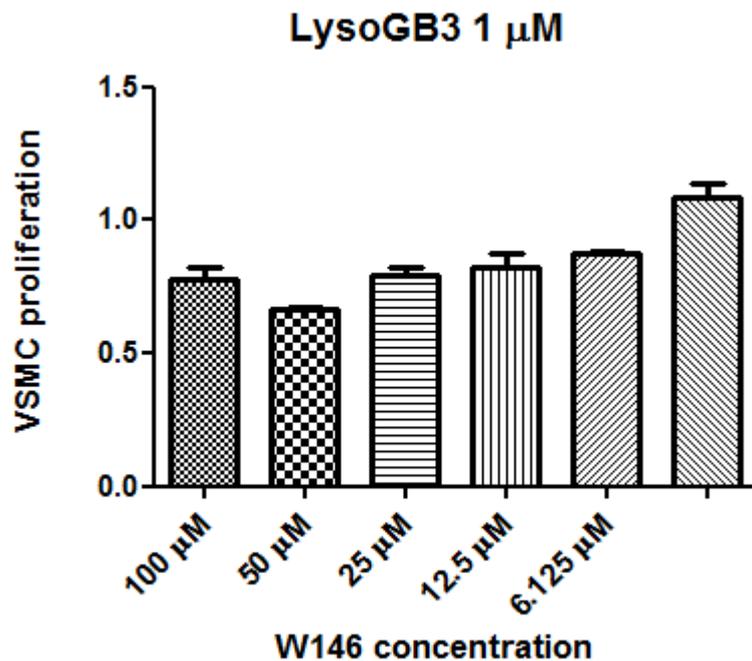
La *Figure 19* montre qu'en présence de l'antagoniste VPC 23019 la prolifération des cellules musculaires est faible mais pas complètement absente. Or, comme attendu la prolifération est plus importante quand les récepteurs S<sub>1</sub>P<sub>1</sub>-3 ne sont pas bloqués.



**Figure 19.** Elle montre que l'effet du S<sub>1</sub>P est différent lors du blocage des récepteurs S<sub>1</sub>P1-3 que lors du blocage du récepteur S<sub>1</sub>P2. En haut, la mesure de prolifération cellulaire (OD 490 nm arbitrary units) est valable pour des petites concentrations de S<sub>1</sub>P.

Nous avons par la suite caractérisé ce même phénomène pour le Lyso-Gb<sub>3</sub>. Les deux antagonistes VPC 23019 et JTE 013 inhibent l'effet du Lyso-Gb<sub>3</sub> avec un effet maximum à partir de 25 microM. Lequel de ces récepteurs est impliqué dans la prolifération des cellules musculaires lisses? Pour répondre à cette question nous avons réalisé des expériences similaires à celles effectuées avec le S<sub>1</sub>P. (*Figure 20*)

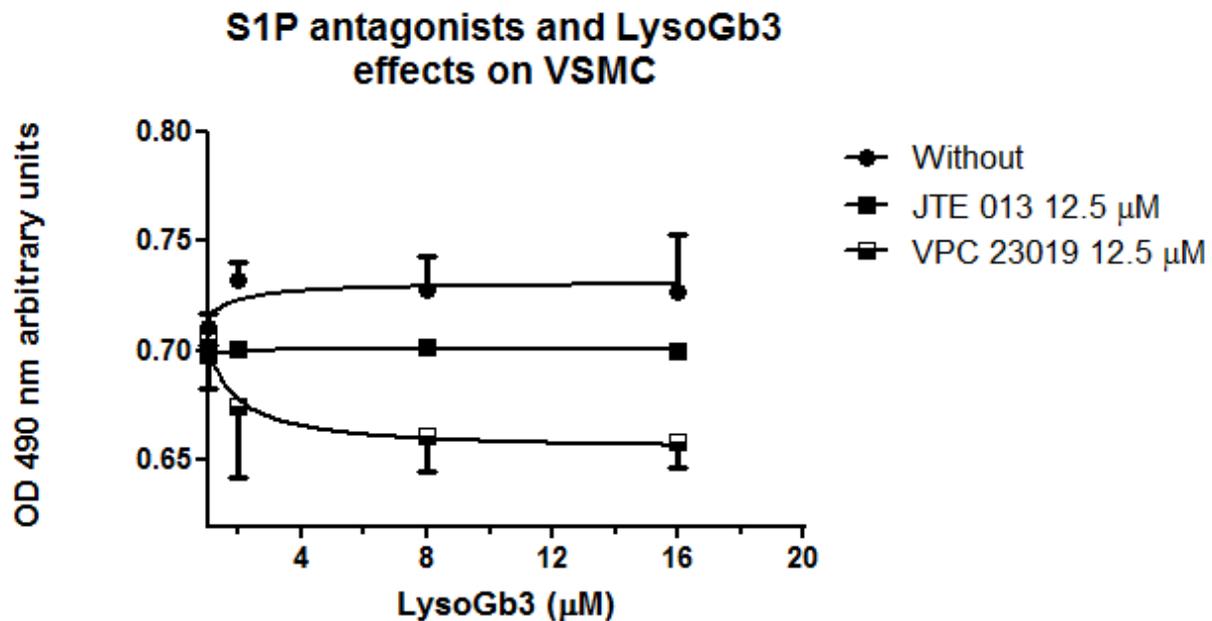




**Figure 20.** L'effet du lyso-Gb<sub>3</sub> inhibé par les antagonistes des récepteurs du S<sub>1</sub>P. Les récepteurs S<sub>1</sub>P sont ciblé par le Lyso-Gb<sub>3</sub>.

En présence d'une concentration inhibitrice intermédiaire nous avons additionné différentes concentrations de Lyso-Gb<sub>3</sub> et mesuré l'induction de prolifération.

Les résultats obtenus montrent, lors du blocage du récepteur S<sub>1</sub>P2, qu'une importante prolifération est induite dépendante de la concentration avec un effet maximum à 2 microM de Lyso-Gb<sub>3</sub>. Lors de l'utilisation de l'antagoniste VPC 23019 bloqueur des récepteurs S<sub>1</sub>P1 et S<sub>1</sub>P3 l'effet du lyso-Gb<sub>3</sub> est inhibiteur de la survie cellulaire. Le taux des cellules est plus bas, à travers le récepteur S<sub>1</sub>P2 la prolifération cellulaire n'est plus induite et même un effet de mort cellulaire est observé (*Figure 21*).



**Figure 21.** Le Lyso-Gb<sub>3</sub> à travers le récepteur S<sub>1</sub>P2 induit une mort cellulaire alors que à travers le S<sub>1</sub>P1-3 il induit une prolifération. Les récepteurs S<sub>1</sub>P1-3 et S<sub>1</sub>P2 reflètent le phénomène de “bon” récepteur et “mauvais” récepteur.

Le Lyso-Gb<sub>3</sub> est reconnu par les mêmes récepteurs que le S<sub>1</sub>P mais a des effets différents. À travers les récepteurs S<sub>1</sub>P1 et S<sub>1</sub>P3 il induit une prolifération. À travers le récepteur S<sub>1</sub>P2, il induit la mort cellulaire.

Ce travail nous a permis d'exclure l'effet précurseur du lyso-Gb<sub>3</sub> pour le S<sub>1</sub>P. Par contre le Lyso-Gb<sub>3</sub> est reconnu par les récepteurs du S<sub>1</sub>P avec des effets commun pour les S<sub>1</sub>P1-3 et différents pour le S<sub>1</sub>P2.

## Conclusion

Ce travail actualise et met à jour les notions concernant les biomarqueurs qui prennent place dans cette pathologie et les connaissances qu'on possède à ce jour sur les manifestations cardiovasculaires et neurologiques.

L'atteinte cardiaque de la maladie de Fabry se traduit par une hypertrophie du ventricule gauche, plutôt concentrique. Vu que l'activité métabolique du ventricule droit est moins intense, ce dernier est préservé. Dans les cas avancés de la maladie, une fibrose secondaire du tissu myocardique se développe, ce qui amène à une dyskinésie du tissu musculaire cardiaque pendant la phase systolique. L'atteinte fonctionnelle se manifeste par une cardiopathie de type restrictive ou dilatée, ce qui dépend fortement du stade de la maladie. La cardiopathie hypertrophique est, le plus souvent, concentrique, avec une fibrose secondaire qui se développe par la suite, ce qui est en faveur d'une cardiopathie restrictive lorsqu'elle est compensée. Lorsqu'elle se décompense, à ce moment-là,

l'atteinte est de type dilatatoire associée à une dilatation de l'anneau fibrotique valvulaire aortique. La cardiopathie dans la maladie de Fabry ressemble fortement à la cardiomyopathie hypertrophique d'apparition tardive. Les critères et les caractéristiques de la cardiopathie de la maladie de Fabry, dépend aussi des comorbidités sous-adjacentes et d'autres pathologies possibles dont le patient souffre.

Le déficit enzymatique de l'alpha-Gal A se traduit par une accumulation précoce de Gb<sub>3</sub> dans les tissus, ce qui conduit, à long terme, à des lésions multi-organes. La détection précoce de ce processus représente la seule possibilité de prévenir les grands dommages terminaux multi-organes. Ceci dit, une sensibilisation des équipes soignant cette pathologie joue un rôle primordial.

Chez des patients dont on pose le diagnostic de maladie de Fabry, la prise en considération de certains "biomarqueurs physiologiques" ou "paracliniques", telles que l'électrocardiogramme ou la TDI, aide l'équipe soignante dans la détection de la progression de la maladie. Les principales anomalies visibles à l'ECG chez les patients affectés par la MF sont reliées à une diminution de la durée de l'onde P, à une diminution de l'intervalle PQ et à une diminution de la largeur du complexe QRS. En particulier la diminution de la durée de l'onde P présente une bonne spécificité et une sensibilité pour la détection précoce de la MF comme premier signe clinique de la maladie. D'autres méthodes qui semblent très sensibles à déceler les atteintes fonctionnelles précoces, avant même l'apparition symptomatologique référée au coeur, est l'imagerie par TDI. À travers ce type de technique radiodiagnostique, on peut visualiser les anomalies lors de la contraction et de myoréflexion myocardique avant qu'une hypertrophie du ventricule gauche ne se développe. Concernant l'MRI cardiaque, il permet l'étude anatomique de la morphologie de la cardiopathie et, de plus, la mise en évidence des zones où la fibrose myocardique s'est déjà développée. Une MRI pathologique, qui révèle des zones fibrotiques traduit une pathologie avancée et cette technique peut être bien utilisée dans le diagnostic des cas sévères. Cependant, la problématique essentielle prend place dans l'utilisation d'un biomarqueur diagnostique avant la première apparition des symptômes de la maladie.

Le processus athérosclérotique ne semble pas être observable de façon constante chez les patients Fabry et les effets du défaut génétique en alpha-Gal A au niveau des plaques athéromateuses sont très peu connus. Cependant, un lien entre défaut de alpha-Gal A et n'est actuellement pas démontré. Par ailleurs, il a été déjà souligné qu'une partie non négligeable de malades, avec un AVC ou infarctus du myocarde, a une mutation génétique qui se situe au niveau du gène GLA. Ceci montre clairement que les complications macro- et micro- vasculaires sont des entités cliniques qu'on retrouve d'une manière constante chez les patients Fabry.

Cependant, une production pathologique de NO, l'anémie ou la MPO, l'état inflammatoire qui est déclenché par ces éléments est le point commun. Le NO, l'état anémique ou la MPO peuvent, quand même, faire partie intégrante du diagnostic différentiel. Face donc à une cardiomyopathie d'origine X, la présence de ces éléments sus-mentionnés, augmentera la possibilité d'être comparée à la maladie de Fabry.

Par contre, en ce qui concerne les biomarqueurs lipidiques, le Gb<sub>3</sub> est le substrat qui caractérise le défaut enzymatique et permet de poser le diagnostic de la maladie de Fabry. On peut le retrouver même chez les patients asymptomatiques en quantité importante. De plus, la concentration plasmatique de Gb<sub>3</sub> ne reflète pas la quantité totale de Gb<sub>3</sub> dans tous les tissus car il se trouve surtout dans le milieu intracellulaire. La sévérité de la maladie ne doit pas être reliée aux taux plasmatiques de Gb<sub>3</sub>, car la variation inter-individuelle chez la population Fabry montre qu'il n'y a

pas une corrélation étroite entre le degré symptomatique du patient et les taux plasmatiques du Gb<sub>3</sub>. Bien que le Gb<sub>3</sub> n'ait pas un bon rendement concernant la prédiction de la sévérité de la maladie, il est un biomarqueur fiable et très utile; quand on suspecte la MF et, qu'en même temps les valeurs du Gb<sub>3</sub> plasmatiques sont au-delà de la norme, on mesure l'activité enzymatique de l'alpha-Gal A. Le génotypage confirme le diagnostic.

Le Lyso-Gb<sub>3</sub> a été nommé comme un deuxième biomarqueur lipidique. La réaction biochimique de déacylation du Gb<sub>3</sub> donne le Lyso-Gb<sub>3</sub>. Il est hydrosoluble, et, logiquement sa mesure dans le sang périphérique serait plus à même d'exprimer la quantité intracellulaire de Gb<sub>3</sub> et la sévérité de la maladie. Au contraire, les taux de lyso-Gb<sub>3</sub> par rapport au taux de Gb<sub>3</sub> ne sont pas significatifs et trop aléatoires. En conclusion, le lyso-Gb<sub>3</sub> n'est pas un bon biomarqueur convenable à utiliser.

Le troisième biomarqueur pris en considération dans ce travail est le S<sub>1</sub>P. Il fait partie de la famille des constituants physiologiques du plasma de chaque individu. Expérimentalement, il favorise la croissance et la prolifération des cellules musculaires lisses des vaisseaux et des cardiomyocytes. En conséquence, on peut déduire qu'il joue un rôle non-négligeable dans l'hypertrophie cardiaque. En effet, il a été trouvé une corrélation entre les taux plasmatiques de S<sub>1</sub>P et l'index de masse ventriculaire gauche (qui reflète l'hypertrophie). S<sub>1</sub>P a une affinité très élevée pour ses sous-types de récepteurs qui sont capable de reconnaître de très faibles changements de concentration. On peut en déduire que S<sub>1</sub>P a les caractéristiques nécessaires pour être un biomarqueur de la sévérité du processus de "remodeling" cardiovasculaire chez les sujets Fabry. En ce qui concerne le futur, le S<sub>1</sub>P ou ces récepteurs, peuvent constituer un ciblage thérapeutique important.

En ce qui concerne la partie de laboratoire, ce travail a mis en évidence que le Lyso-Gb<sub>3</sub> et le S<sub>1</sub>P ne sont pas étroitement liés d'une façon biochimique. À savoir, il n'y a pas de réactions biochimiques directes qui favoriseraient le passage du Lyso-Gb<sub>3</sub> en S<sub>1</sub>P. Un deuxième point fort de notre travail qui a été démontré c'est le fait que le Lyso-Gb<sub>3</sub> et le S<sub>1</sub>P agissent au niveau des mêmes récepteurs (S<sub>1</sub>PRs). De plus, on a découvert qu'une sous-classe de ces récepteurs, notamment le S<sub>1</sub>P2, quand il lie soit le lyso-Gb<sub>3</sub>, soit le S<sub>1</sub>P on remarque un effet apoptotique sur les cellules. En ce qui concerne les autres sous-classes de récepteurs, le S<sub>1</sub>P1 et le S<sub>1</sub>P3, on a remarqué plutôt l'effet envers, ça veut dire une prolifération cellulaire. Dans la littérature on a trouvé déjà des notions en faveur d'un effet prolifératif exercé par le lyso-Gb<sub>3</sub> mais pas encore des études qui expliquait d'une façon précise le mécanisme à travers lequel il le fait et à travers quel type de récepteur. D'autre part, concernant le S<sub>1</sub>P, on a confirmé son effet prolifératif sur les cellules et on a mis en évidence une action d'inducteur de mort cellulaire s'il se lie aux S<sub>1</sub>P2 (sous-classe 2 des récepteurs de la S<sub>1</sub>P).

## **Annexe – travail expérimental : méthode**

### **Culture cellulaire**

Les cellules musculaires lisses ont été isolées à partir de l'aorte de rats Wistar. Les fibroblastes Fabry ou contrôles non Fabry ont été isolés à partir de biopsies de peau.

Les cellules musculaires lisses et les fibroblastes ont été cultivés dans du milieu DMEM glucose 1g/L (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Life Technologies, Inc. Grand Island, NY USA) avec

10% de sérum bovin fœtal (Biochrom AG, Berlin, Allemagne) et +% d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine) dans une atmosphère humidifiées (5% CO<sub>2</sub>/95% air) à 37°C.

### **Essai de prolifération cellulaire**

Composé Tetrazolium : Les cellules musculaires lisses (2000 cellules/puits) ont étéensemencées dans une plaque de 96 puits et incubées pendant 24 heures. Les cellules ont été lavées avec du PBS et incubées pour une autre période de 24 heures dans du milieu DMEM sans sérum. Successivement, les cellules ont été mises en présence des composés S<sub>1</sub>P, Lyso-Gb<sub>3</sub> ou Gb<sub>3</sub> et incubées 24 heures supplémentaires. La prolifération cellulaire a été mesurée à l'aide du réactif « Cell Titer Aqueous assay ». L'utilisation de ce réactif est basée sur la mesure de la conversion du produit 3,4-(5-diméthylthiazol-2yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-H-tetrazolium en produit formazan par les enzymes déhydrogénases présentes dans les cellules. L'absorption à 490 nanomètres est trouvée uniquement dans les cellules métaboliquement actives et traduit la prolifération cellulaire.

Lors d'utilisation d'antagonistes, les cellules sont incubées en présence d'antagoniste pour 1 heure et l'agoniste S<sub>1</sub>P ou Lyso-Gb<sub>3</sub> est rajouté et les cellules sont incubées pour 24 heures. La prolifération cellulaire est mesurée à l'aide du « Cell Titer Aqueous assay ». Les concentrations utilisées pour les différents antagonistes, S<sub>1</sub>P et Lyso-Gb<sub>3</sub> sont indiquées sur les figures.

FACS: Les cellules musculaires lisses (90 000 cellules/puits) ont étéensemencées sur une plaque de 12 puits dans du DMEM contenant 10% de sérum bovin. Après 24 heures, les cellules ont été lavées au PBS et incubées avec du DMEM sans sérum pendant 24 heures supplémentaires. Successivement, les cellules ont été incubées pour 24 heures en présence de différentes concentrations de S<sub>1</sub>P, Gb<sub>3</sub> ou lyso-Gb<sub>3</sub> (Concentrations successives de 0, 10 nM, 100 nM, 500 nM, 1 µM et 10 µM). Les cellules sont lavées avec du PBS trypsinisées et re-suspendues dans 1 ml de DMEM. Le propidium iodide (PI) a été additionné pour une concentration finale de 1 µg/ml. La cytométrie du flux a été pratiquée avec un cytomètre (Becton Dickinson, Basel, Switzerland) utilisant le programme CellQuest. Les cellules ont été analysées selon les signaux « forward- et side-scatter, respectivement FSC et SSC». Un total de 9000 cellules a été analysé. Le PI a été utilisé pour discriminer les cellules vivantes des cellules mortes.

### **Immuno-histochimie**

Mise en évidence de la présence du S<sub>1</sub>P et du Gb<sub>3</sub> dans des fibroblastes.

Des lamelles rondes de 1.1 cm de diamètre sont trempées dans de l'éthanol à 70% et passées sous une flamme pour la stérilisation. Ces lamelles sont ensuite déposées trois par trois dans six puits Wells Costar. 300 à 600 cellules de fibroblastes de sujets Fabry ou non Fabry sont déposées sur chaque lamelle ronde. Après 2 heures d'incubation à 37°C, 2 ml de milieu DMEM contenant 10% de sérum bovin fœtal et 1% d'antibiotiques suivi de 48 heures d'incubation. Après incubation, les cellules sont fixées dans 1 ml de PFA (paraformaldehyde) 4% incubé à 4°C pour 24 heures. Les cellules sont rincées trois fois avec une solution de PBS contenant 100 mM de glycine. Les cellules sont perméabilisées pendant 4 minutes dans 500 µl de PBS contenant 0.1% de Triton X-100. Les cellules sont rincées trois fois au PBS et les sites non spécifiques sont saturés avec 150 µl de BSA 0.5% dans le diluant Dako S3022 pendant 1 heure. Les anticorps S<sub>1</sub>P1 (1/1000) et CD77 (1/60) sont dilués dans la même solution, additionnés aux cellules et incubés pour 24 heures à 4°C. Les lamelles sont rincées trois fois avec du tampon Tris filtré et les anticorps anti-IgG de lapin sont additionnés. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante les cellules sont rincées trois

fois. 200 ml de DAB et 200 ml de AEC sont additionnés respectivement pour le S<sub>1</sub>P et le Gb<sub>3</sub> puis incubation des cellules à l'abri de la lumière pendant 5 minutes à température ambiante. Les cellules sont rincées trois fois à l'eau distillée puis contre colorées pendant 3 minutes à l'hématoxyline de Gill II. Les lamelles sont rincées à l'eau trois fois et montées avec du milieu aqueux sur une lame en verre pour une visualisation au microscope.

## **Bibliographie**

1. Koolman J, Roehm KH. Color Atlas of Biochemistry. 2ème édition, 2005. Thième. p.196-7.
2. Chevrier D. Étude du mécanisme de ciblage intracellulaire de la pro-opiomélanocortine porcine dans des lignées cellulaires hétérologues. Thèse de l'obtention du titre PhD. Mai 1992.
3. Kornfeld S, Mellman I. The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1989;5:483-525.
4. Kornfeld S. Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. *J. Clin. Invest.* 1986;77:1-6.
5. Sahagian GG, Steer CJ. Transmembrane orientation of the mannose 6-phosphate receptor in isolated clathrin-coated vesicles. *J Biol Chem.* 1985;260:9838-42.
6. Koolman J, Roehm KH. Color Atlas of Biochemistry. 2ème édition, 2005. Thième. p.234-5.
7. Chii-Shiang C, Marc C P, Christine LW , O'Brien FJ , Pagano E. Broad screening test for sphingolipid-storage diseases. *The Lancet.* 1999 sept;354(9182):901-5.
8. Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. a-Galactosidase A deficiency: Fabry disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular basis of inherited disease.* 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001:3733–74.
9. Dambrosia MJ et al. Pediatric Fabry Disease. *Pediatrics* 2005;115:344-355.
10. Robert JD, Roscoe B, Barranger J, Collins JA, Germain PD, Goldman M, Grabowski G, Packman S, Wilcox RW. Fabry Disease, an Under-Recognized Multisystemic Disorder: Expert Recommendations for Diagnosis, Management, and Enzyme Replacement Therapy. *Ann Intern Med.* 2003;138:338-346.
11. Meroni M, Sessa A, Battini G, Tazzari S, Torri Tarelli L: Kidney involvement in Anderson-Fabry disease. *Contrib Nephrol* 1997, 122:178–184.
12. Perrot A, Osterziel KJ, Beck M, Dietz R, Kampmann C. Fabry disease: focus on cardiac manifestations and molecular mechanisms. *Herz.* 2002 nov;27(7):699-702.
13. Kolodny HE, Pastores MG. Anderson-Fabry Disease: Extrarenal, Neurologic Manifestations. *J Am Soc Nephrol* 2002 ;13:150-3.

14. Faggiano A, Ramundo V, Milone F, Russo R, Imbriaco M, Lombardi G et al. Fabry Disease and empty sella associated with hypothalamic-pituitary autoimmunity. Presented at the 9<sup>th</sup> Int Symposium on Lysosomal Storage Diseases. 24<sup>th</sup> -25<sup>th</sup> April 2009, Frankfurt, Germany. Original published : J Clin Endocrinol Metab, November 2006, 91(11):4319–4325.
15. Deegan PB, Baehner AF, Barba Romero MA, Hughes DA, Kampmann C, Beck M. Natural history of Fabry disease in females in the Fabry Outcome Survey. J Med Genet 2006; 43:347–352.
16. MacDermot DK, Holmes A, Miners HA. Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate carrier females. J Med Genet 2001;38:769–807.
17. Elleder M, Bradova V, Smid F, Budesinsky M, Harzer K, Kustermann-Kuhn B, et al. Cardiocyte storage and hypertrophy as a sole manifestation of Fabry's disease. Report on a case simulating hypertrophic non-obstructive cardiomyopathy. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1990;417:449-55.
18. Von Scheidt W, Eng CM, Fitzmaurice TF, Erdmann E, Hübner G, Olsen EG, et al. An atypical variant of Fabry's disease with manifestations confined to the myocardium. N Engl J Med. 1991;324:395-9.
19. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. Circulation 1996;93:841-2
20. Michels VV, Moll PP, Miller FA, et al. The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. N Engl J Med 1992;326:77–82.
21. Fatkin D, Graham RM. Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. Physiol Rev 2002;82:945–980.
22. Maron BJ, McKenna WJ, Danielson GK, et al. ACC/ESC clinical expert consensus document on hypertrophic cardiomyopathy: a report of the American College of Cardiology Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol 2003;42:1687–1713.
23. Kushwaha SS, Fallon JT, Fuster V. Restrictive cardiomyopathy. N Engl J Med 1997;336:267–276.
24. Rosendorff C. Essential Cardiology. Principles and practice. 2<sup>È</sup>me édition, 2005. Human press inc. p. 641-7.
25. Toro R, Perez-Isla L, Doxastakis G, Barba M A, Gallego A R, Pintos G, et al: Clinical usefulness of tissue Doppler imaging in predicting preclinical Fabry Cardiomyopathy. Int J Cardiol. 2009 févr6;132(1):38-44
26. Linhart A, Palecek T, Bultas J, Ferguson JJ, Hrudová J, Karetová D, et al. New insights in cardiac structural changes in patients with Fabry's Disease. Am. Heart. J. 2000

27. Chimenti C, Morgante E, Tanzilli G, Mangieri E, Critelli G, Gaudio C, Russo AM, et al. Angina in Fabry Disease Reflects Coronary Small Vessel Disease. *Circ Heart Fail* 2008;1;161-169.
28. Niemann M, Breunig F, Beer M, Herrmann S, Strotmann J, Hu K, et al. The right ventricle in Fabry Disease: natural history and impact of enzyme replacement therapy. *Heart*. 2010 déc;96(23):1915-9.
29. Weidemann F, Breunig F, Beer M, Sandstede J, Störk S, Voelker W, et al. The variation of morphological and functional cardiac manifestation in Fabry disease: potential implications for the time course of the disease. *Eur. Heart J*. 2005 juin;26(12):557-63.
30. Hesegawa H, Takano H, Shindo S, Takeda S, Funbashi N, Nakagawa K, et al. Images in cardiovascular medicine. Transition from left ventricular hypertrophy to massive fibrosis in the cardiac variant of Fabry disease. *Circulation*. 2006 avr 25;113(16):720-1.
31. Vedder AC, Linthorst GE, Houge G, Groener JE, Ormel EE, Bouma BJ, et al. Treatment of Fabry disease: outcome of a comparative trial with agalsidase alpha or beta at a dose of 0.2 mg/kg. *PloS One*. 2007;2:598.
32. Breunig F, Weidemann F, Strotmann J, Knoll A, Wanner C. Clinical benefit of enzyme replacement therapy in Fabry disease. *Kidney Int*. 2006;69:1216-1221.
33. Schiffmann R, Warnock GD, Banikazemi M, Bultas J, Linthorst EG, Packman S, et al. Fabry disease: progression of nephropathy, and prevalence of cardiac and cerebrovascular events before enzyme replacement therapy. *Nephrol. Dial. Transplant* 2009;24:2102–2111.
34. Banikazemi M, Bultas J, Waldek S, Wilcox WR, Whitley CB, McDonald M, et al. Agalsidase-beta therapy for advanced Fabry disease: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2007;146:77-86.
35. Moore DF, Scott LT, Gladwin MT, Altarescu G, Kaneski C, Suzuki K, et al. Regional cerebral hyperperfusion and nitric oxide pathway dysregulation in Fabry disease: reversal by enzyme replacement therapy. *Circulation*. 2001 sept 25;104(13):1506-12.
36. DeGraba T, Azhar S, Dignat-George F, Brown E, Boutiere B, Altarescu G, et al. Profile of endothelial and leukocyte activation in Fabry patients. *Ann Neurol*. 2000;47:229-233.
37. Barbey F, Brakch N, Linhart A, Jeanrenaud X, Palecek T, Bultas J et al.: Increased carotid intima-media thickness in the absence of atherosclerotic plaques in an adult population with Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl*. 2006 avr;95(451):63-8.
38. Boutoyrie P, Laurent S, Laloux B, Lidove O, Grunfeld JP, Germain DP. Non-invasive evaluation of arterial involvement in patients affected with Fabry disease. *J Med Genet*. 2001;38:629-631.
39. Kalliokoski RJ, Kalliokoski KK, Penttinen M, Kantola I, Leino A, Viikari Js, et al. Structural and functional changes in peripheral vasculature of Fabry patients. *J Inher Metab Dis*. 2006;29:660-6.

40. Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, Donker-Koopman WE, Strijland A, Ottenhoff R, et al. Elevated Globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:2812-7.
41. Rombach MS, van den Bogaard B, de Groot E, Groener EMJ, Poorthuis JB, Gabor E, et al. Vascular Aspects of Fabry Disease in Relation to Clinical Manifestations and Elevations in Plasma Globotriaosylsphingosine. *Hypertension* 2012 aout;60:00-00.
42. Kobayashi K, Akishita M, Yu W, Hashimoto M, Ohni M, Toba K. Interrelationship between non-invasive measurements of atherosclerosis: flow-mediated dilatation of brachial artery, carotid intima-media thickness and pulse wave velocity. *Atherosclerosis*. 2004;173:13-18.
43. de Groot E, van Leuven SI, Duivenvoorden R, Meuwese MC, Akdim F, Bots ML, et al. Measurement of carotid intima-media thickness to assess progression and regression of atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008;5:280-8.
44. Batista EC, Carvalho LR, Casarini DE, Carmona AK, dos Santos EL, da Silva ED, et al. ACE activity is modulated by the enzyme alpha-Galactosidase A. *J Mol Med (Berl)*. 2011;89:65-74.
45. Moore FD, Kaneski RC, Askari H, Schiffmann R. The cerebral vasculopathy of Fabry disease. *J of Neurol Sciences*. 2007;257:258-63.
46. Mitsias P, Levine SR. Cerebrovascular complications of Fabry's disease. *Ann Neurol*. 1996;40:8-17.
47. Moore DF, Herscovitch P, Schiffmann R. Selective arterial distribution of cerebral hyperperfusion in Fabry disease. *J Neuroimaging*. 2001;11:303-7.
48. Rolfs A, Bottcher T, Zschiesche M, Morris P, Winchester B, Bauer P. et al. Prevalence of Fabry disease in patients with cryptogenic stroke: a prospective study. *Lancet*. 2005;366:1794-6.
49. Moore DF, Alterscu G, Barker WC, Patronas NJ, Herscovitch P, Schiffmann R. White matter lesions in Fabry disease occur in "prior" selectively hypometabolic and hyperperfused brain regions. *Brain Res Bull*. 2003;62:231-40.
50. Morgan SH, Rudge P, Smith SJ, Bronstein AM, Kendall BE, Holly E. et al. The neurological complications of Anderson-Fabry disease (alpha-galactosidase A deficiency)- investigation of symptomatic and presymptomatic patients. *Q J Med*. 1990;75:491-507.
51. Grewal RP, McLatchey SK. Cerebrovascular manifestations in a female carrier of Fabry's disease. *Acta Neurol Belg*. 1992;92:36-40
52. Crutchfield KE, Patronas NJ, Dambrosia JM, Frei KP, Banerjee TK, Barton NW. et al. Quantitative analysis of cerebral vasculopathy in patients with cerebral disease. *Neurology*. 1998;50:1746-9.

53. DeGraba T, Azhar S, Dignat-George F, Brown E, Boutiere B, Alterescu G. et al. Profile of endothelial and leukocyte activation in Fabry patients. *Ann Neurol.* 2000;47:229-33.
54. Moore DF, Alterescu G, Ling GS, Jeffires N, Frei KP, Weibel T. et al. Elevated cerebral blood flow velocities in Fabry disease with reversal after enzyme replacement. *Stroke.* 2002;33:525-31.
55. Moore DF, Scott LT, Gladwin MT, Alterescu G, Kaneski C, Suzuki K. et al. Regional cerebral hyperperfusion and nitric oxid pathway dysregulation in Fabry disease: reversal by enzyme replacement therapy. *Circulation.* 2001;104:1506-12
56. Alterescu G, Moore DF, Pursley R, Campia U, Glodstein S, Bryant M. et al. Enhanced endothelium-dependent vasodilatation in Fabry disease. *Stroke.* 2001;32:1559-62.
57. Stemper B, Hilz MJ. Postschismic cutaneous hyperperfusion in the presence of forearm hypoperfusion suggests sympathetic vasomotor dysfunction in Fabry disease. *J Neurol.* 2003;250:970-6.
58. Moore DF, Ye F, Schiffmann R, Butman JA. Increased signal intensity in the pulvinar on T1-weighted images: a pathognomonic MR imaging sign of Fabry disease. *Am J Neuroradiol.* 2003;24:1096-101.
59. Takanashi J, Barkovich AJ, Dillon WP, Sherr EH, Hart KA, Packman S. T1 hyperintensity in the pulvinar: key imaging feature for diagnosis of Fabry disease. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2003;24:916-21.
60. Moore DF, Ye F, Brenna ML, Gupta S, Barshop BA, Steiner RD. et al. Ascorbate decreases Fabry cerebral hyperperfusion suggesting a reactive oxygen species abnormality: an arterial spin taggin study. *J Magn Reson Imaging.* 2004;20:674-83.
61. Ries M, Gupta S, Moore DF, Sachdev V, Quirk JM, Murray GJ. Et al. Pediatric Fabry disease. *Pediatrics.* 2005;115:344-55.
62. Jensen TS. Anticonvulsions in neuropathic pain: rationale and clinical evidence. *Eur J Pain.* 2002;6(Suppl A):61-8.
63. Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2001;429:23-37.
64. Schiffmann R, Kopp JB, Austin III HA, Sabnis S, Moore DF, Weibel T. et al. Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2001;285:2743-9
65. Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, Germain DP, Lee P, Waldek S. et al. Safety and efficacy of recombinant human alpha-galactosidase A- replacement therapy in Fabry disease. *N Engl J Med.* 2001;345:9-16.
66. Schiffmann R, Ries M, Timmons M, Flaherty JT, Brady RO. Long-term therapy with agalsidase alfa for Fabry disease: safety and effects on renal function in a home infusion setting. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21:345-54.

67. Wilcox WR, Banikazemi M, Guffon N, Waldek S, Lee P, Linthorst GE. Et al. Long-term safety and efficacy of enzyme replacement therapy for Fabry disease. *Am J Hum Genet.* 2004;75:65-74.
68. Buechner S, Moretti M, Burlina AP. Et al. Central nervous system involvement in Anderson-Fabry disease: a clinical and MRI retrospective study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008;79:1249-1254.
69. Schiffmann R, Floeter MK, Dambrosia JM, Gupta S, Moore DF, Sharabi Y. et al. Enzyme replacement therapy improves peripheral nerve and sweat function in Fabry disease. *Muscle Nerve.* 2003;28:703-10.
70. Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, Germain PD, Lee P, Waldek S, et al. Safety and efficacy of recombinant human alpha-galactosidase A-replacement therapy in Fabry's disease. *N. Eng. J. Med.* 2001 juill 5;345(1):9-16.
71. Spinelli L, Pisani A, Sabbatini M, Petretta M, Andreucci M V, Procaccini D, et al: Enzyme replacement therapy with agalsidase beta improves cardiac involvement in Fabry's disease. *Clin. Genet.* 2004 août;66(2):158-65.
72. Schaefer RM, Tytki-szymanska A, Hilz MJ. Enzyme replacement therapy for Fabry disease: a systematic review of available evidence. *Drugs.* 2009 nov 12;69(16):2179-205.
73. Taioli E, Kinney P, Zhitkovich A, Fulton H, Voitkun V, Cosma G, et al. Application of reliability models to studies of biomarker validation. *Environ. Health Perspect.* 1994 mars;102(3):306-9.
74. European Medicines Agency -Calendar- 2006 EMEA/EFPIA Workshop on Biomarkers. Available from : <http://www.ema.europa.eu>
75. Mandrekar SJ, Sargent DJ. Clinical trial designs for predictive biomarker validation : one size does not fit all. *J Biopharm Stat.* 2009;19(3):530-42.
76. « converting a biomarker to a surrogate » <http://www.google.ch/search>
77. Cox TM. Biomarkers in lysosomal storage diseases : a review. *Acta Paediatr Suppl.* 2005 mars;94(447):39-42 ; discussion 37-8.
78. Aerts JM, van Breemen MJ, Bussink AP, Ghauharali K, Sprenger R, Boot RG, et al. Biomarkers for lysosomal storage disorders : identification and application as exemplified by chitotriosidase in Gaucher disease. *Acta Paediatr Suppl.* 2008 avr;97(457):7-14
79. Namdar M, Steffel J, Vidovic M, et al. Electrocardiographic changes in early recognition of Fabry disease. *Heart Online First*, published on January 26, 2011 as 10.1136/hrt.2010.211789.
80. Aryana A, Fifer MA, Ruskin JN, et al. Short PR interval in the absence of preexcitation: a characteristic finding in a patient with Fabry disease. *Pacing Clin Electrophysiol* 2008;31:782-3.

81. Takenaka T, Teraguchi H, Yoshida A, Taguchi S, Ninomiya K, Umekita Y, et al: Terminal stage cardiac findings in patients with cardiac Fabry disease: an electrocardiographic, echocardiographic, and autopsy study. *J Cardiol*: 2008 févr;51(1):50-9
82. Mehta J, Tuna N Moller JH, Desnik RJ. Electrocardiographic and vectorcardiographic abnormalities in Fabry disease. *Am. Heart J.* 1977 juin;93(6):699-705
83. Keyur BS, Yoshio I, Mandeep RM. Amyloidosis and the Heart. A Comprehensive Review.(Reprinted) *Arch Intern Med* 2006; 166:1805-13.
84. Gavin A, Coats CJ, Wallace W, Flapan AD:The challenging diagnosis of cardiac amyloidosis. *J R Coll Physicians Edinb* 2008; 38:196–206.
85. Bekri S, Lidove O, Jaussaud R, Knebelmann B, Barbey F. The Role of Ceramide Trihexoside (Globotriaosylceramide) in the Diagnosis and Follow-Up of the Efficacy of Treatment of Fabry Disease: A Review of the Literature. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry* 2006 oct;4(4):289.
86. Kovbasnjuk O, Mourtazina R, Baibakov B, Wang T, Elowsky C, Choti AM, Kane A et al. The glycosphingolipid globotriaosylceramide in the metastatic transformation of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 Déc 27; 102(52):19087–19092.
87. Zhou D, Yin N, Long X, Goff RD, Cantu C 3rd, Mattner J et al. Alpha anomers of iGb3 and Gb3 stimulate cytokine production by natural killer T cells. *ACS Chem Biol.* 2009 Mar 20;4(3):199-208.
88. Auray-Blais C, Ntwari A, Clarke JTR, Warnock DG, Oliveira JP, Young SP, et al. How well does urinary lyso-Gb<sub>3</sub> function as a biomarker in Fabry disease: potential implications for the time course of the disease. *Eur. Heart J.* 2005 sept;94(9):557-63.
89. Kitagawa T, Ishige N, Suzuki K, Owada M, Ohashi T, Kobayashi M, et al: Non-invasive screening method for Fabry disease by measuring globotriaosylceramide in whole urine samples using tandem mass spectrometry. *Mol. Genet. Metab.* 2005 juill;85(3):196-202.
90. Young E, Mills K, Morris P, Vellodi A, Lee P, Waldek S, et al: Is globotriaosylceramide a useful biomarker in Fabry disease? *Acta Paediatric Suppl.* 2005 mars;94(447):51-4; discussion 37-8.
91. Seonghee P, Ji Aee K, Ka Young J, Shinkyu C, Eun-Nam C, Jung-A. S, et al. Globotriaosylceramide leads to KCa3.1 channel dysfunction: a new insight into endothelial dysfunction in Fabry disease. *Cardiovascular Research* (2011);89:290–9.
92. Barbey F, Brakch N, Linhart A, Rosenblatt-Velin N, Jeanrenaud X, Qanadli S, et al. Cardiac and vascular hypertrophy in Fabry disease: evidence for a new mechanism independent of blood pressure and glycosphingolipid deposition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 avr;26(4):839-44.

93. Brakch N, Dormond O, Bekri S, Golshayan D, Correvon M, Mazzolai L, et al. Evidence for a role of sphingosine 1-phosphate in cardiovascular remodelling in Fabry disease. *Eur. Heart J.* 2010 janv;31(1):67-76.
94. Lee KL, Nakon A, Jason HH, Betty SH, Wayne RG. Sphingosine-1-phosphate receptor expression in cardiac fibroblasts is modulated by in vitro culture conditions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 mar 2;292:2698-2711.
95. Cartwright DJ, Cole AL, Cousins AJ, Lee PJ. Raised HDL cholesterol in Fabry disease: Response to enzyme replacement therapy. *J Inherit Metab Dis.* 2004;27(6):791-3.
96. Barbey F, Brakch N, Linhart A, Jeanrenaud X, Palecek T, Bultas J et al. Increased carotid intima-media thickness in the absence of atherosclerotic plaques in an adult population with Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl.* 2006 Apr;95(451):63-8.
97. Vedder AC, Gerdes VEA, Poorthuis BJHM, Helmond M, Trip MD, Aerts JMFG, et al. Failure to detect Fabry patients in a cohort of prematurely atherosclerotic males *J. Inherit. Metab. Dis.* 2007 nov;30(6):988.
98. Utsumi K, Yamamoto N, Kase R, Takata T, Okumiya T, Saito H, et al. High incidence of thrombosis in Fabry's disease. *Intern. Med.* 1997 mai;36(5):327-9.
99. Eitzman DT, Bodary FP, Shen Y, Khairallah GC, Wild RS, Abe A, et al. Fabry Disease in Mice Is Associated With Age-Dependent Susceptibility to Vascular Thrombosis. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:298-302.
100. Kaneski CR, Moore FD, Ries M, Zirzow GC, Schiffmann R: Myeloperoxidase predicts risk of vasculopathic events in hemizygotes males with Fabry disease. *Neurology.* 2006 déc12;67(11):2045-7.
101. Moore DF, Ye F, Brennan M-L, Gupta S, Barshop BA, Steiner RD, et al. Ascorbate decreases Fabry cerebral hyperperfusion suggesting a reactive oxygen species abnormality: an arterial spin tagging study. *J Magn Reson Imaging.* 2004 oct;20(4):674-83.
102. Baldus S, Eiserich JP, Brennan M-L, Jackson RM, Alexander CB, Freeman BA. Spatial mapping of ulmonary and vascular nitrotyrosine reveals the pivotal role of myeloperoxidase as a catalyst for tyrosine nitration in inflammatory diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 2002 oct 1;33(7):1010.

## **Remerciements**

Je remercie Dr. N. Brakch pour son implication, ses conseils et sa patience pour mener à bien ce travail. Des précieux éléments qui m'ont permis d'une part d'aborder le travail scientifique et de recherché dans des bonnes conditions et d'autre part, d'acquérir des bonnes connaissances mécanistiques sur les maladies métaboliques en general et la maladie de Fabry en particulier.