

Les maladies de surcharge lysosomale en 2022

Avancées diagnostiques

Dr Edouard Le Guillou

Service de Biochimie Métabolique

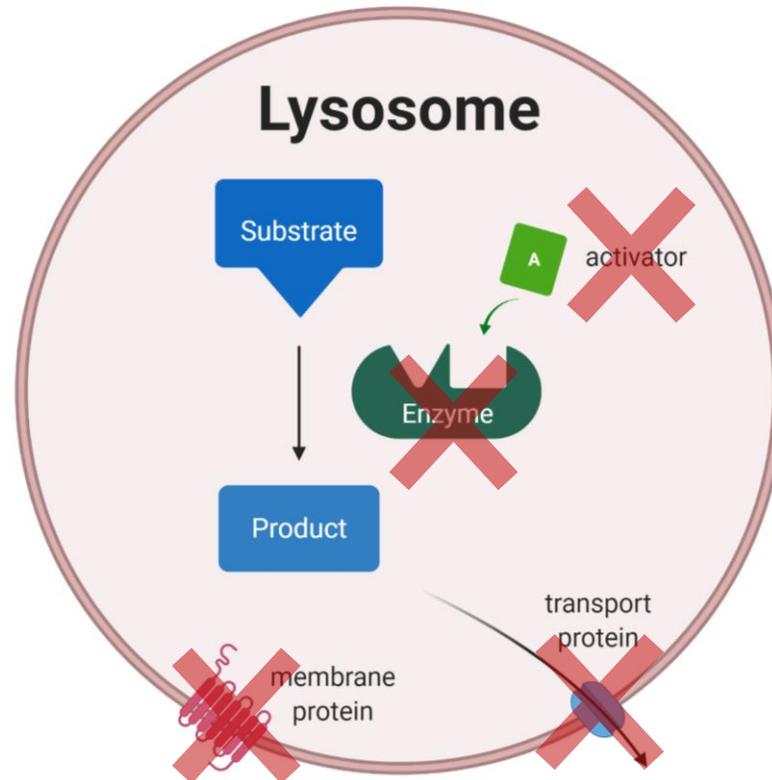
Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris

Liens d'intérêt

- Participation à des boards scientifiques : Orchard Therapeutics, Chiesi

Les maladies de surcharge lysosomale (MSL)

- *Lysosomal storage disorders* (LSDs)
- Définition : **toute maladie causée par un déficit d'origine génétique de la fonction lysosomale**
 - Déficit d'une enzyme lysosomale ++



Conséquence : **accumulation de substrats** dans les lysosomes

Classification des MSL

> 70 MSL décrites

Lipidoses

Fabry
Gaucher
GM1 gangliosidose (Landing)
GM2 gangliosidose (Tay-Sachs, Sandhoff)
Niemann-Pick A/B
Niemann-Pick C
Wolman
Farber
Krabbe
Leucodystrophie métachromatique
Austin

Mucopolysacchariodes (MPS)

Hurler-Scheie (MPS I)
Hunter (MPS II)
Sanfilippo A-D (MPS III)
Morquio A (MPS IV)
Maroteaux-Lamy (MPS VI)
Sly (MPS VII)

Oligosaccharidoses (Glycoprotéinoses)

Aspartylglucosaminurie
Fucosidose
Alpha-mannosidose
Bêta-mannosidose
Sialidose et galactosialidose
Schindler-Kanzaki

Déficits en transporteurs

Cystinose
Salla
Danon

Céroïde-lipofuscinoses (CLN)

Glycogénoses

Pompe

Mucolipidoses (ML)

ML II (*I cell disease*)
ML III

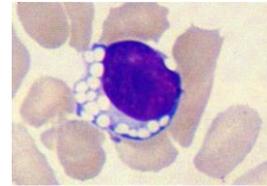
Autres maladies

Pycnodysostose
Papillon-Lefèvre...

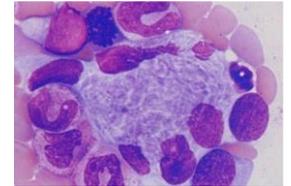
Démarche diagnostique biologique des MSL

1- Recherche de cellules de surcharge

- Sur frottis sanguin ou myélogramme (non obligatoire)



*Lymphocytes vacuolés
(frottis sanguin)*



*Cellules de Gaucher
(myélogramme)*

2- Substrats accumulés (urine et plasma)

- Non spécifiques (diagnostic de groupe) : mucopolysaccharides urinaires, oligosaccharides urinaires
- Spécifiques : sulfatides (LDM), lysosphingolipides (lipidoses) dont lysoGb3 (Fabry), oxystérols (NPC)
- Autres biomarqueurs : chitotriosidase (maladie de Gaucher)

3- Dosage de l'activité enzymatique

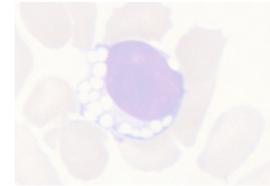
4- Etude génétique



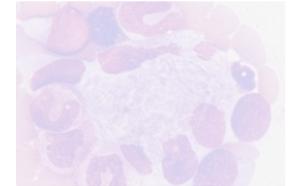
Démarche diagnostique biologique des MSL

1- Recherche de cellules de surcharge

- Sur frottis sanguin ou myélogramme (non obligatoire)



*Lymphocytes vacuolés
(frottis sanguin)*



*Cellules de Gaucher
(myélogramme)*

2- Substrats accumulés (urine et plasma)

- Non spécifiques (diagnostic de groupe) : mucopolysaccharides urinaires, oligosaccharides urinaires
- Spécifiques : sulfatides (LDM), lysosphingolipides (lipidoses) dont lysoGb3 (Fabry), oxystérols (NPC)
- Autres biomarqueurs : chitotriosidase (maladie de Gaucher)

3- Dosage de l'activité enzymatique

4- Etude génétique



Profil des mucopolysaccharides urinaires (MPS)

- Mucopolysaccharidoses : déficit des enzymes nécessaires au **catabolisme lysosomal des mucopolysaccharides (MPS)** ou glycosaminoglycanes (GAG)

→ accumulation de MPS non dégradés dans les lysosomes

→ 6 types différents de MPS selon l'enzyme déficiente

- Clinique :

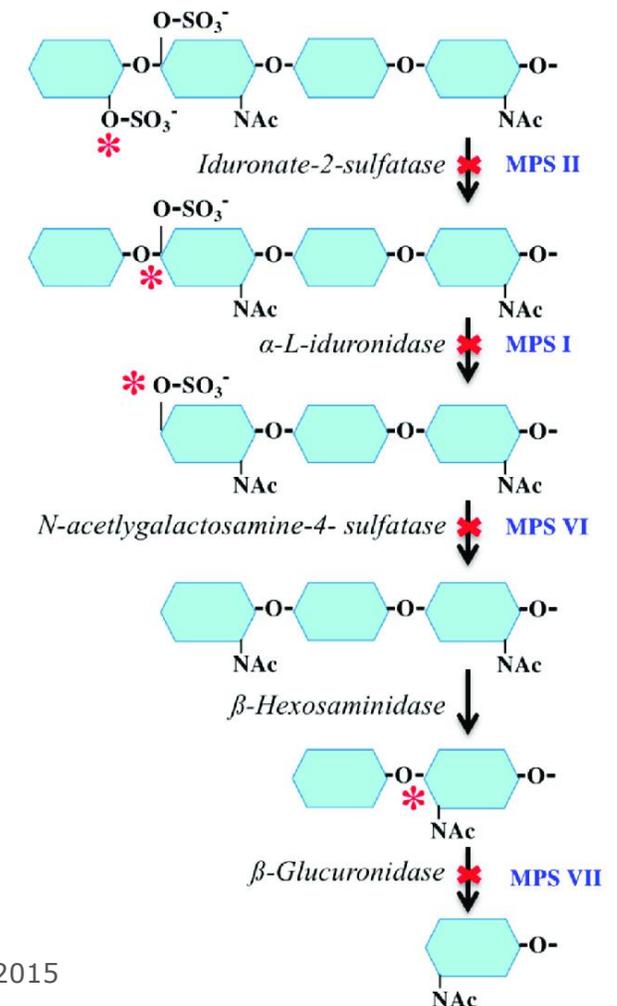
- Dysmorphie faciale
- Organomégalie
- Retard mental
- Opacités cornéennes
- Anomalies du squelette : dysostose multiple, nanisme



- Élimination de MPS dans les urines :

Dermatane (DS), Héparane (HS), Kérotane (KS), Chondroïtine (CS) sulfates

Dégradation du Dermatane Sulfate



Vairo, Appl Clin Genet, 2015

Profil des mucopolysaccharides urinaires (MPS)

Détermination quantitative : test au DMB

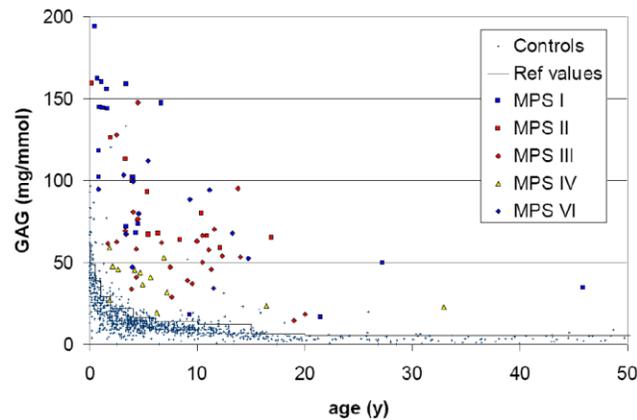
- Dosage colorimétrique
- Fonction de la créatininurie et de l'âge

+

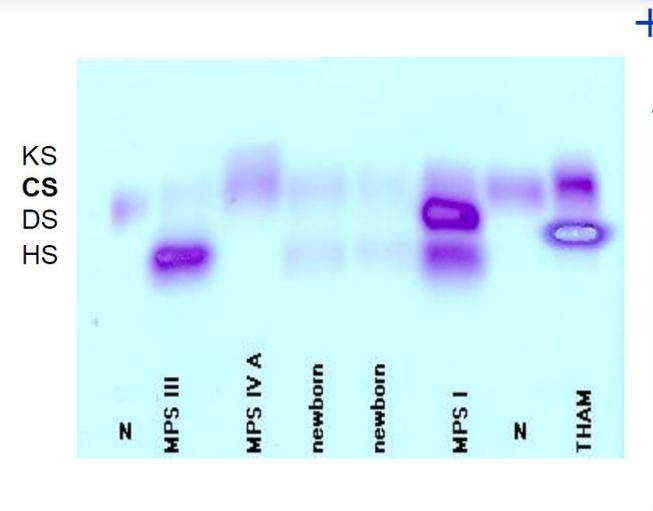
Détermination qualitative : électrophorèse des MPS

- Après isolement et purification des GAG
- 4 bandes visualisables : CS, KS, DS, HS
- Normal : bande modérée de CS

DMB test; normal controls vs. MPS



Erasmus MC
Universitair Medisch Centrum Rotterdam



→ Limites :

- **Résultat semi-quantitatif, biologiste expérimenté**
- **Nombreuses interférences : héparine et dérivés, sulfate de dextran...**
- **Arrêt de commercialisation des plaques d'électrophorèse en 2022 !**

Techniques récentes de dosage des MPS urinaires par LC-MS/MS

UPLC-MS/MS detection of disaccharides derived from glycosaminoglycans as biomarkers of mucopolysaccharidoses

Analytica Chimica Acta 936 (2016) 139–148

- Détecte toutes les MPS
- Traitement par méthanolyse
- Etalon interne (EI) pour DS, CS, HS, KS

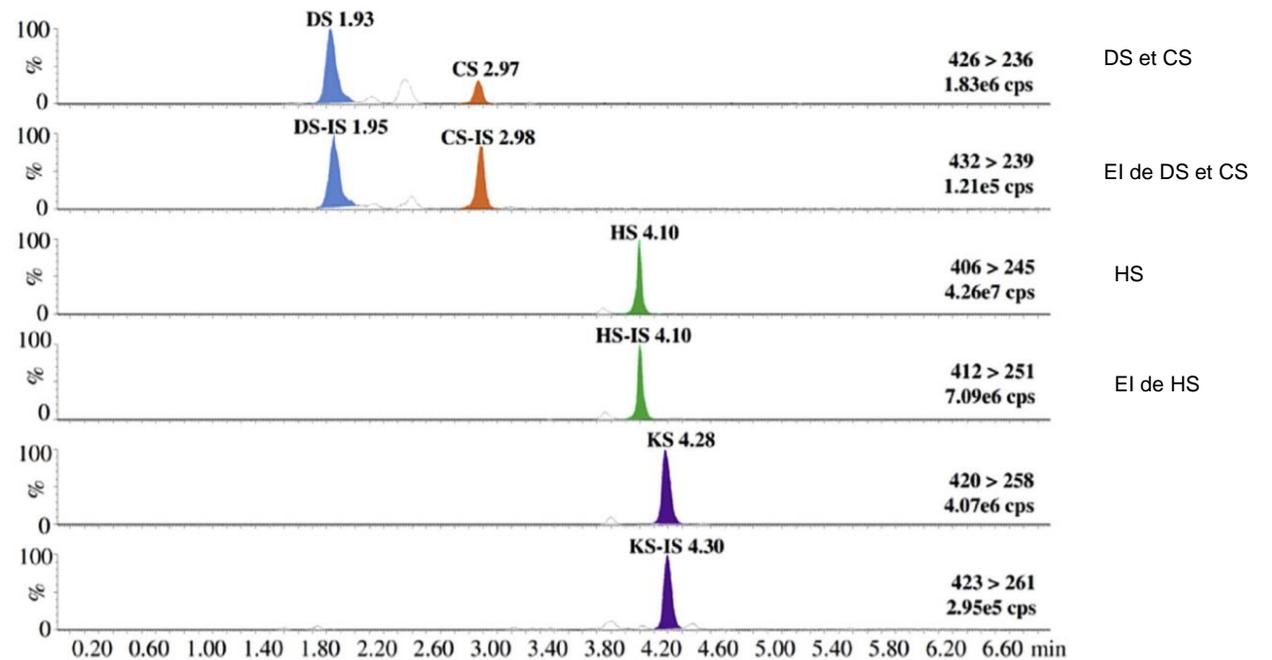
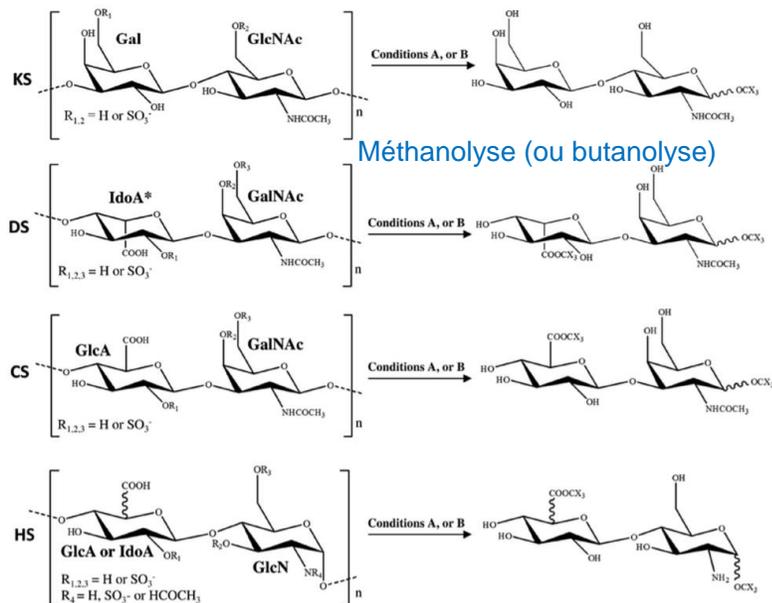
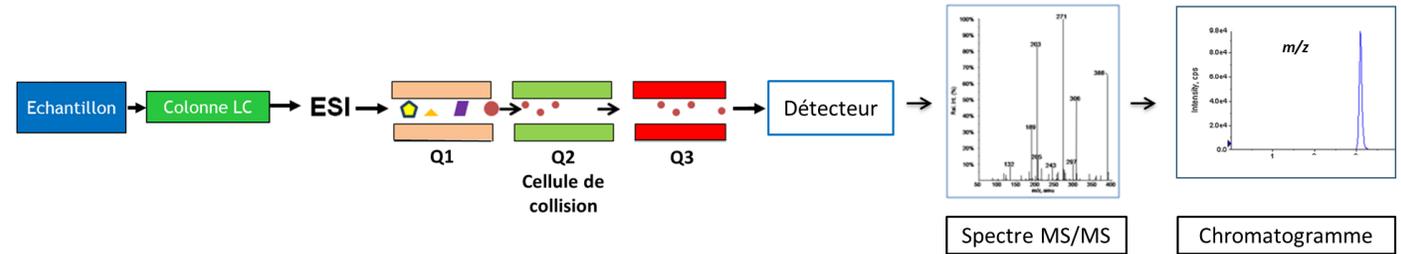
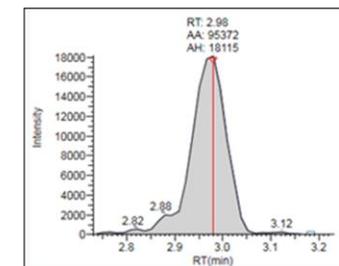
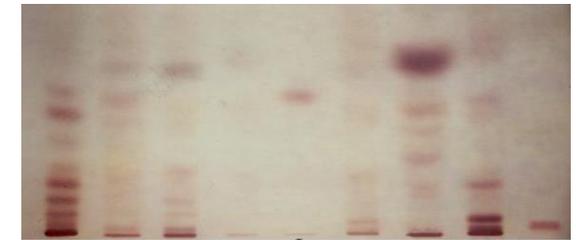
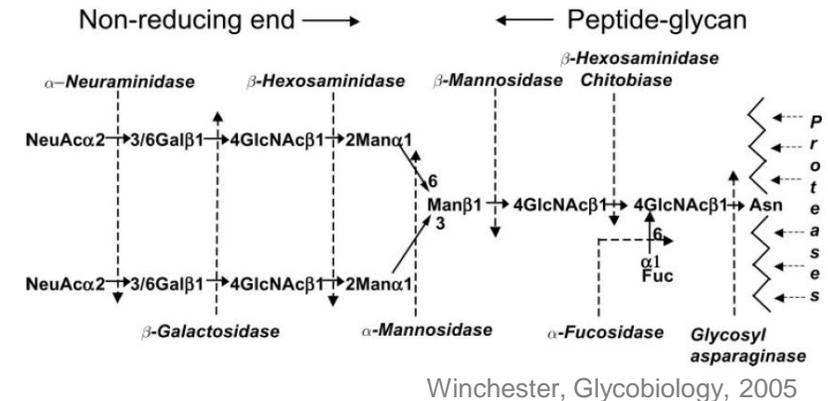


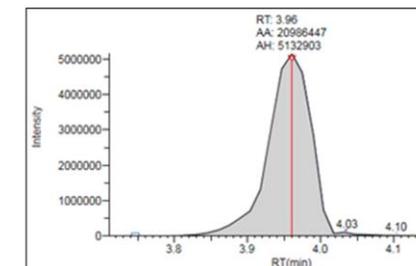
Fig. 1. Methanolysis (conditions A) and deuteriomethanolysis (conditions B) processes for four glycosaminoglycans under study. Conditions A are HCl 3 N in CH₃OH (65 °C, 60 min) and conditions B are DCI in CD₃OD (65 °C, 60 min), where D = ²H, X = H (conditions A), or D (conditions B, synthesis of internal standards). * GlcA might also be present in the polymer, but to a lesser extent.

Profil des oligosaccharides urinaires en LC-MS/MS

- Oligosaccharidoses : déficit du **catabolisme lysosomal de la partie oligosaccharidique des glycoprotéines**
 - Clinique : ressemble aux MPS, plus rares
 - **Intérêt de combiner MPS + oligosaccharides urinaires**
 - Technique historique des oligosaccharides urinaires :
Chromatographie sur couche mince (CCM)
 - **Techniques récentes par spectrométrie de masse :**
 - **MALDI-TOF-MS**
 - **LC-MS/MS**
- plus sensibles, plus spécifiques ++



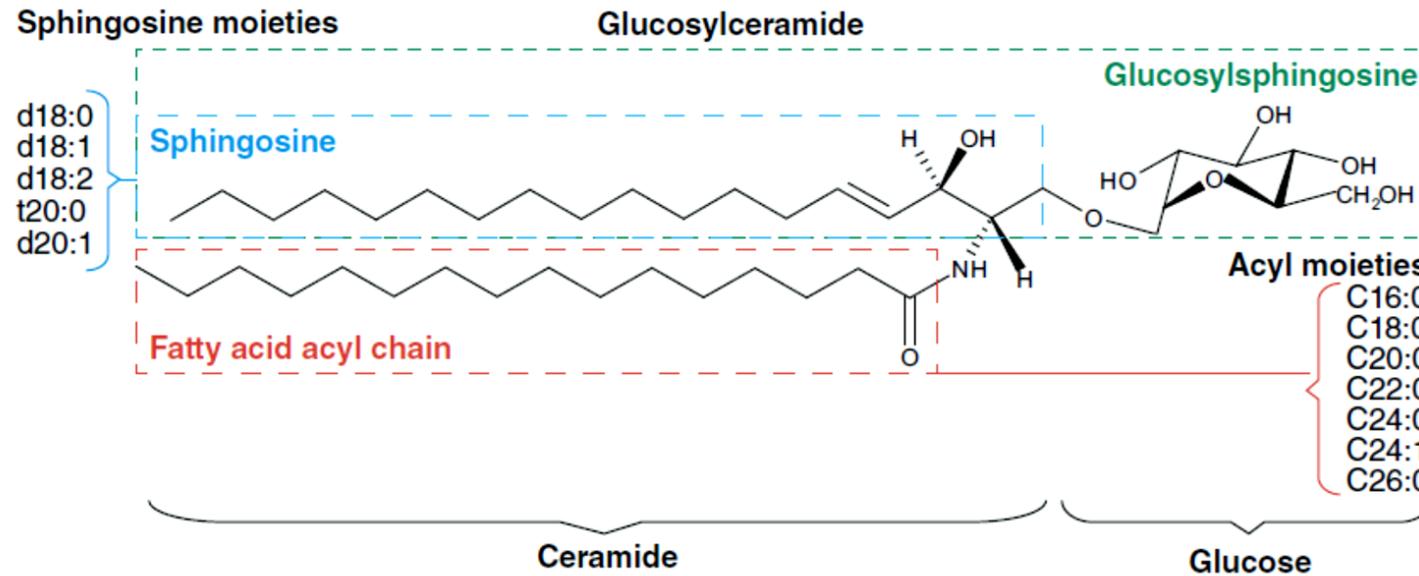
Métabolite « Alpha-mannosidose »
568,2 > 244,1



Etalon interne (Heptasaccharide)
1151,3 > 827,0

Lysosphingolipides

- Forme déacylée des sphingolipides
- Ex: Glucosylsphingosine = forme déacylée du glucosylcéramide



Lysosphingolipides

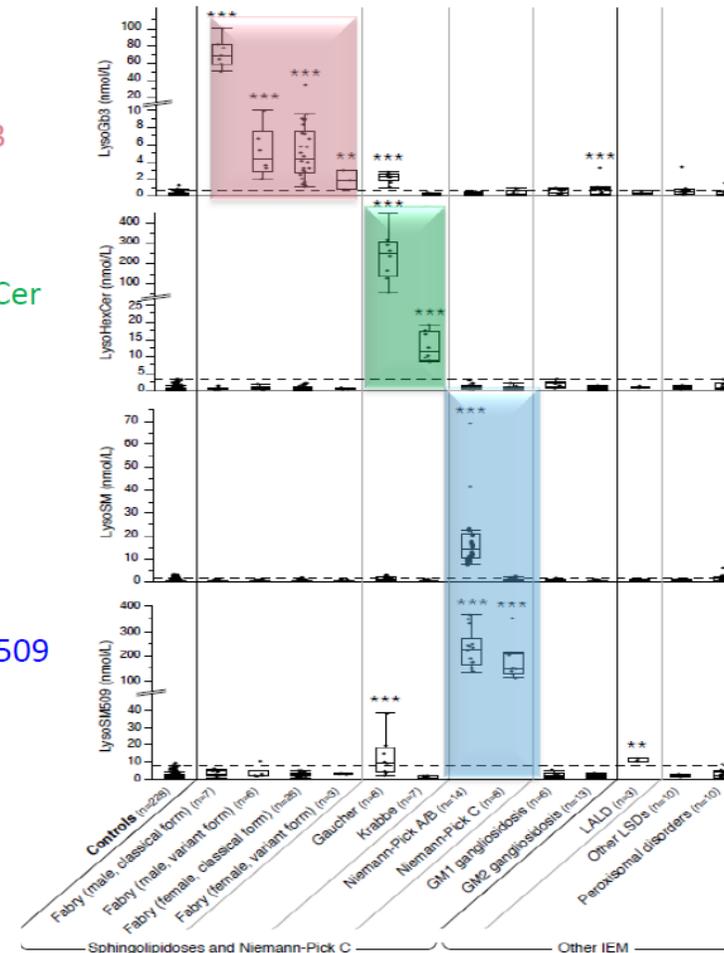
- Plasmatiques ++
- Dosage par LC-MS/MS
- Multiplexage
- Intérêt : diagnostic et suivi des sphingolipidoses

LysoGb3

LysoHexCer

LysoSM

LysoSM509



Screening Fabry

Screening Gaucher et Krabbe infantile

Screening NPA/B et NPC

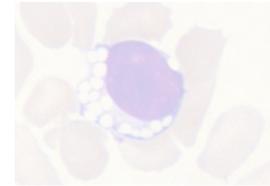
*** p<0,001
** p<0,05
* p<0,1

Pettazzoni et al. PlosOne 2017

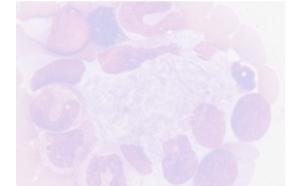
Démarche diagnostique biologique des MSL

1- Recherche de cellules de surcharge

- Sur frottis sanguin ou myélogramme (non obligatoire)



*Lymphocytes vacuolés
(frottis sanguin)*



*Cellules de Gaucher
(myélogramme)*

2- Substrats accumulés (urine et plasma)

- Non spécifiques (diagnostic de groupe) : mucopolysaccharides urinaires, oligosaccharides urinaires
- Spécifiques : sulfatides (LDM), lysosphingolipides (lipidoses) dont lysoGb3 (Fabry), oxystérols (NPC)
- Autres biomarqueurs : chitotriosidase (maladie de Gaucher)

3- Dosage de l'activité enzymatique

4- Etude génétique

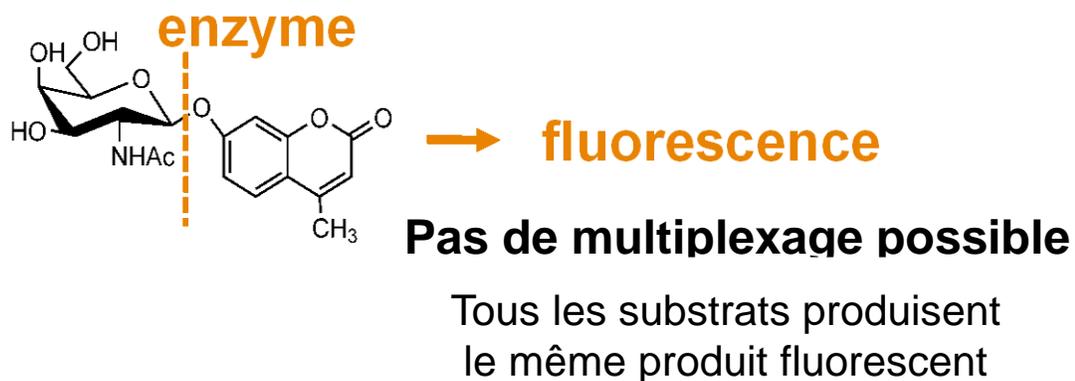


Dosage de l'enzyme déficiente

- La mise en évidence du déficit enzymatique permet le diagnostic de la maladie +++
- Activité enzymatique exprimée dans la plupart des tissus
 - **Leucocytes** +++ ou lymphocytes (prélèvement sur EDTA)
 - Sérum
 - **Taches de sang** sur papier buvard (DBS, *dried blood spot*)
 - Cellules en culture (fibroblastes, villosités chorales, cellules amniotiques)
 - Tissus congelés (foie,.....)

Techniques classiques par fluorimétrie

- Utilisables pour la plupart des enzymes lysosomales
- **Technique manuelle** mais relativement simple
 - Réalisée dans un laboratoire spécialisé
 - Quelques pièges analytiques : pseudodéficits, déficits en activateur, déficits combinés ou multiples...
- **Substrats synthétiques fluorogéniques** (couplés au 4 methylumbelliferyl, 4-MU ++)
- Ou parfois substrats colorimétriques (paranitrocatechol ou paranitrophenyl)



Analyse par spectrométrie de masse sur taches de sang

- Soit développement de tests spécifiques pour chaque maladie
- Soit utilisation de kits commerciaux développés pour le dépistage néonatal (USA)

- **1^{er} kit commercialisé pour 6 maladies : kit NeoLSD™ MSMS**

Technique FIA-MS/MS : nécessite un spectromètre de masse

Avantages :

- Facilité d'envoi des échantillons buvards
- Simplification de la phase préanalytique (pas d'extraction leucocytaire)
- Multiplexage : 1 seul punch et 1 seule incubation/patient, plaque 96 puits
- Résultats quantifiés (étalons internes)
- CIQ commerciaux fournis, EEQ disponibles
- Méthode plus facilement accréditable

- A l'avenir : autres maladies, autres fournisseurs ...

- *2^e kit à venir pour 6 autres maladies (non encore commercialisé) : CLN2, MPS II, MPSIIIB, MPSIV, MPSVI, MPSVII*

Lysosomal Storage Disorders screened by PerkinElmer Genetics:

Fabry Disease

(α -galactosidase deficiency)

Gaucher Disease

(glucocerebrosidase deficiency)

Pompe Disease

(glycogen storage disease type II)

Krabbe Disease

(galactocerebrosidase deficiency)

Hurler Syndrome

(mucopolysaccharidosis I, MPS-I)

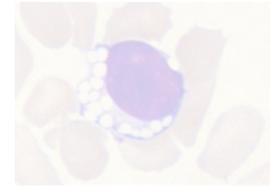
Niemann-Pick A/B Disease

(acid sphingomyelinase deficiency)

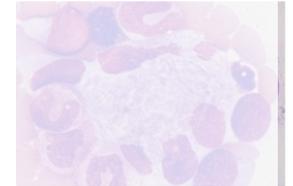
Démarche diagnostique biologique des MSL

1- Recherche de cellules de surcharge

- Sur frottis sanguin ou myélogramme (non obligatoire)



*Lymphocytes vacuolés
(frottis sanguin)*



*Cellules de Gaucher
(myélogramme)*

2- Substrats accumulés (urine et plasma)

- Non spécifiques (diagnostic de groupe) : mucopolysaccharides urinaires, oligosaccharides urinaires
- Spécifiques : sulfatides (LDM), lysosphingolipides (lipidoses) dont lysoGb3 (Fabry), oxystérols (NPC)
- Autres biomarqueurs : chitotriosidase (maladie de Gaucher)

3- Dosage de l'activité enzymatique

4- Etude génétique

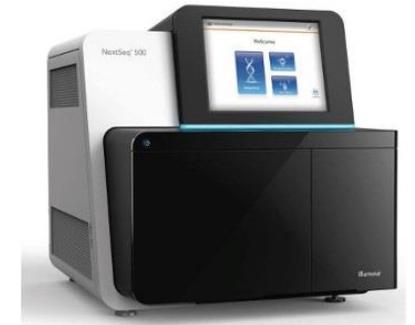
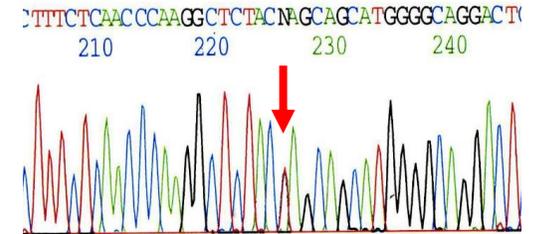


Intérêt du séquençage des gènes des MSL

- **diagnostique** :
 - **Etude moléculaire doit être réalisée chez tous les patients +++**
 - Généralement en 2e intention pour confirmer la maladie (sauf CLN, NPC ...)
- **thérapeutique** :
 - Mutations sensibles (traitement par molécule chaperonne dans la maladie de Fabry...)
 - Statut CRIM et développement d'ADA
- **pronostique**
 - Maladie de Gaucher : mutation « neuroprotectrice »
 - Maladie de Pompe : mutation forme « tardive »

Techniques de séquençage des gènes des MSL

- Auparavant : **séquençage de type Sanger**
 - Partage des gènes à séquencer dans les différents laboratoires français
- Actuellement : **séquençage à haut débit ou NGS** (*next generation sequencing*)
 - Panels « maladies lysosomales » dans les laboratoires de diagnostic des MSL (> 50 gènes) *Exemple : panel LysPur Necker*
 - Panels ciblés sur certains organes (rein et Fabry, ...)
 - Panels ciblés sur certains signes (épilepsies et CLN)
 - Exomes ou génomes sur les plateformes SeqOIA et AURAGEN



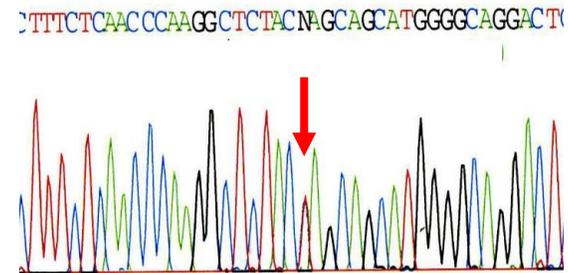
Exemple d'un cas non résolu en Sanger « élucidé » en NGS

Patient atteint de la maladie de Tay-Sachs adulte :

- Déficit patent en Hexosaminidase A

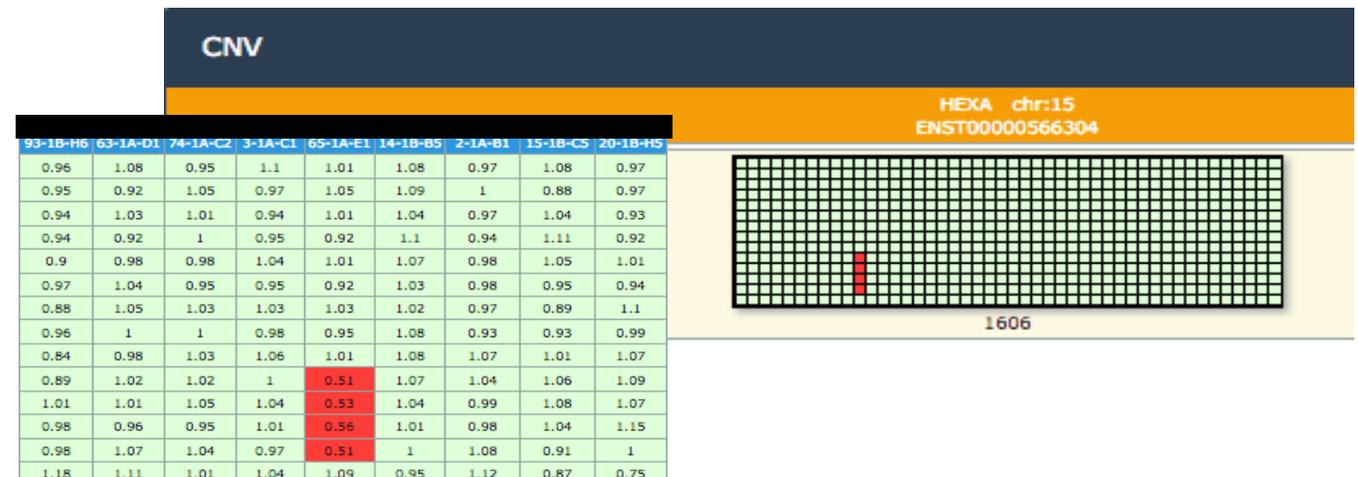
Séquençage Sanger :

- **Confirmation d'une mutation ponctuelle :**
c.1055A>G, p.(Glu352Gly) mais à l'état **hétérozygote**
- Deuxième allèle non trouvé...



Séquençage NGS :

- Variant c.1055A>G HTZ confirmé
- **Analyse des CNV (copy number variant) :**
probable délétion HTZ sur le 2^{ème} allèle
Exon 2 à 5 ?



Conseil génétique

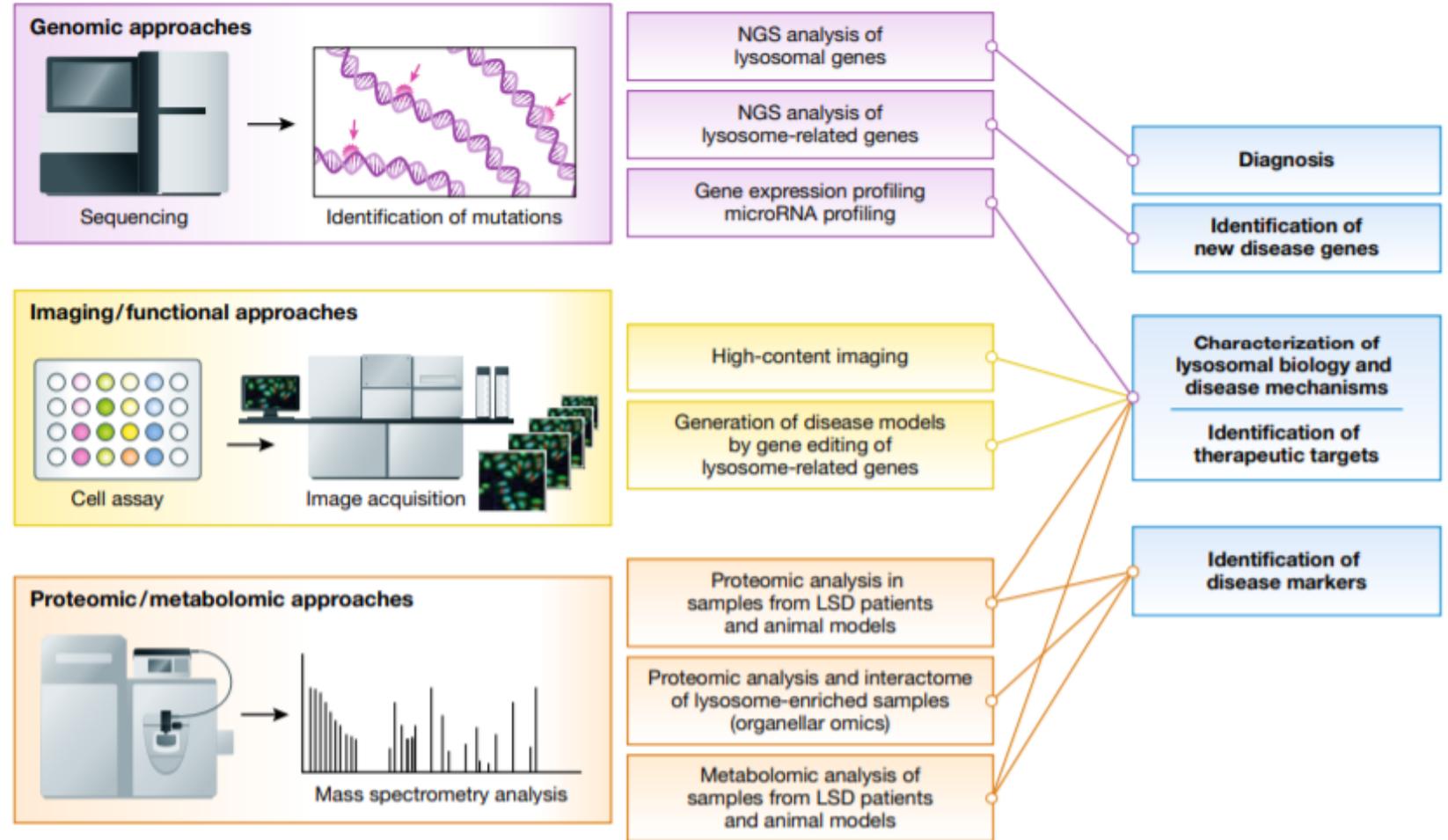
- **Dépistage des sujets hétérozygotes dans les maladies récessives autosomiques**
- **Dépistage des femmes conductrices dans les maladies à transmission liée à l'X**
 - Difficile par dosage enzymatique (exemple : maladie de Fabry)
- **Diagnostic prénatal (DPN)**
 - Recherche des variants parentaux sur VC ou CA
 - Préalable dans les maladies liées à l'X : sexe foetal
 - Eliminer le risque de contamination maternelle à l'aide de microsatellites = marqueurs génétiques
 - DPNI (DPN non invasif) : à venir ?
- **Diagnostic préimplantatoire (DPI)**

Technologies innovantes d'étude de la biologie lysosomale et des MSL

Génomique
Exome, génome,
RNA-seq, transcriptome

Imagerie cellulaire
IHC, IF

Spectrométrie de masse
Protéomique,
Métabolomique
ciblée et non ciblée



Parenti *et al.*, EMBO Molecular Medicine, 2021

Take home messages

- Diversité des maladies de surcharge lysosomale (MSL)
- Diagnostic biologique dans des laboratoires spécialisés
 - LBMR
 - Lien fort avec les cliniciens (notamment centres de référence)
- Démarche diagnostique :
 - Métabolites => activité enzymatique => génétique
- Utilisation de plus en plus courante de **techniques innovantes** :
 - **Spectrométrie de masse** : profils métaboliques, activités enzymatiques
 - **Séquençage NGS**

Merci pour votre attention



Contact :

Dr Catherine Caillaud, catherine.caillaud@aphp.fr

Dr Edouard Le Guillou, edouard.leguillou@aphp.fr

Laboratoire de Biochimie métabolique (Pr Benoist)

Hôpital universitaire Necker-Enfants malades, AP-HP