



CHU
Hôpitaux de
Bordeaux

Maladies de surcharge lysosomale : Approche clinico-biologique

Samir Mesli

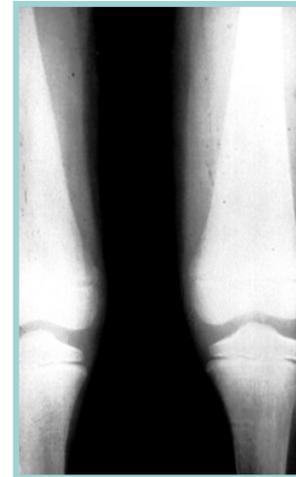
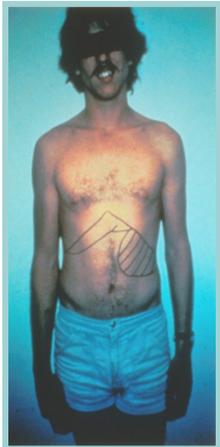
Isabelle Redonnet-Vernhet

Laboratoire de Biochimie, CHU de Bordeaux

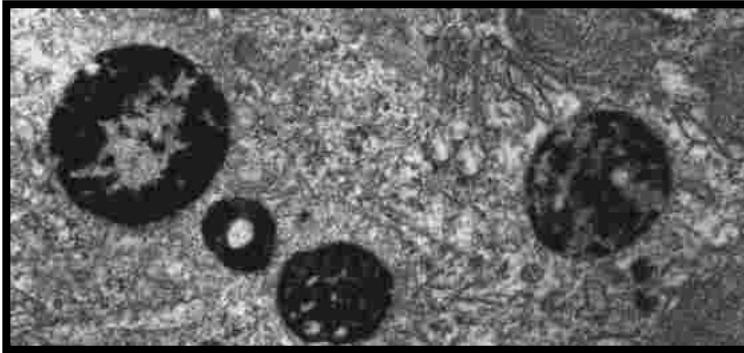


Les maladies lysosomales

- Maladies de surcharge d'origine génétique
Mode autosomique récessif essentiellement
- Prévalence cumulée: 1/7000 nouveau-nés
- De la forme foetale à la forme adulte
- Symptomatologie neurologique/ extra-neurologique

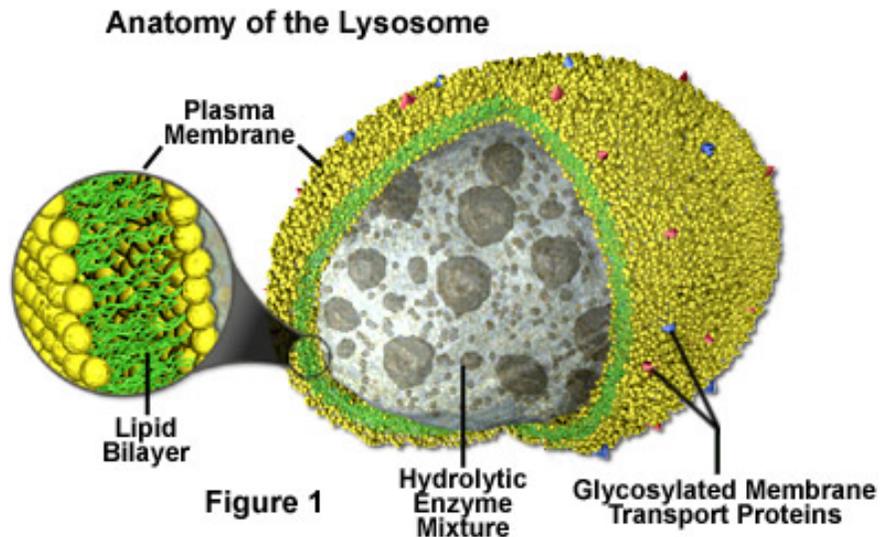


Le lysosome



Découvert en 1955 (De Duve et al, Biochem J.)

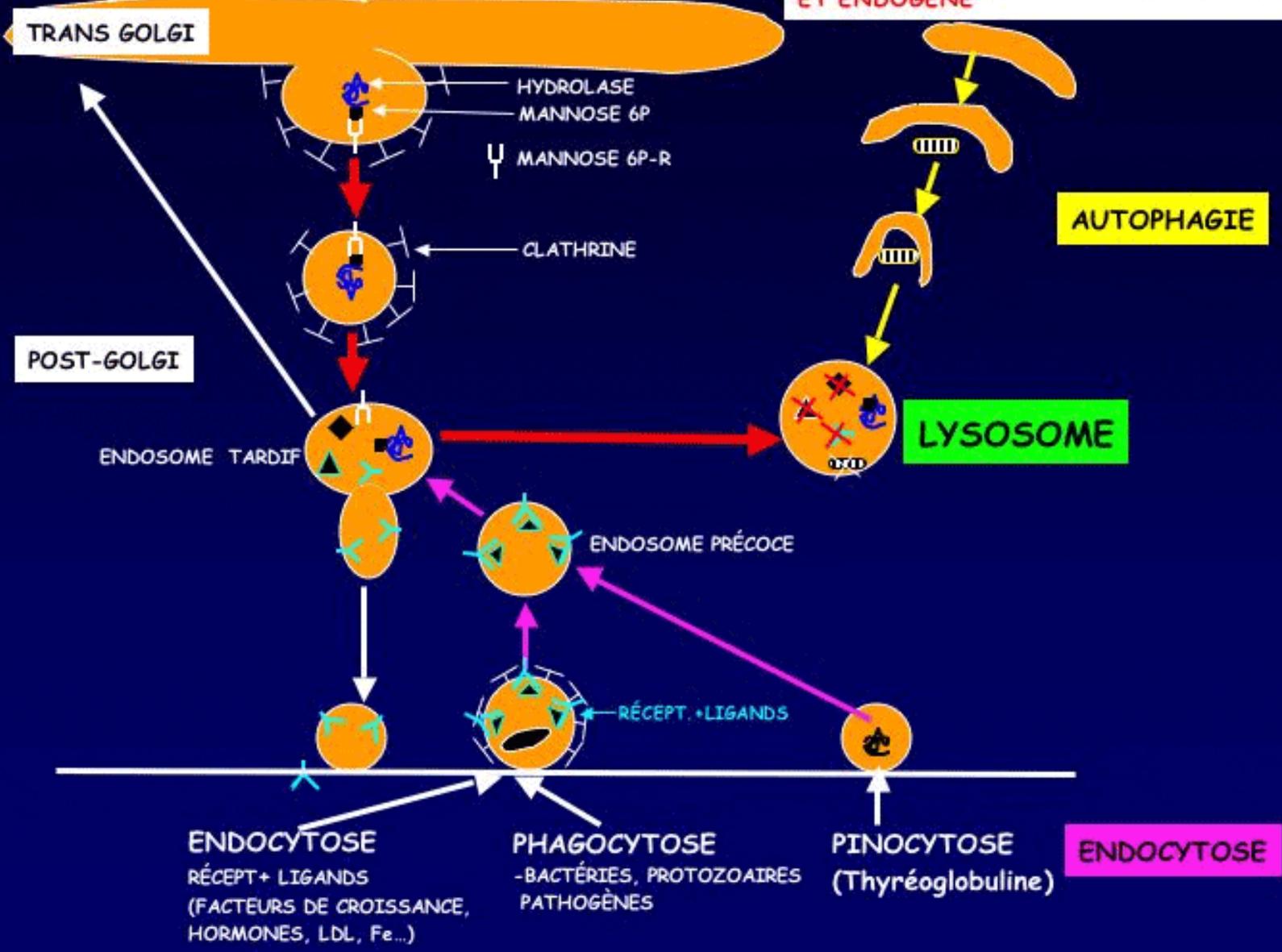
0,25 à
plusieurs μm



- Protéines membranaires:
 - glycoprotéines de transport
 - ATPase- H^+ : pH à 5
- Hydrolases acides

TRI ET CIBLAGE DES ENZYMES LYSOSOMALES

**DÉGRADATION INTRACELLULAIRE
DES MOLÉCULES D'ORIGINE EXOGÈNE
ET ENDOGÈNE**



Classification des maladies lysosomales selon le type de déficit

Déficit primaire des hydrolases

++++

Protéases, lipases, phospholipases, glycosidases, nucléases, phosphatases

Déficit des activateurs des hydrolases

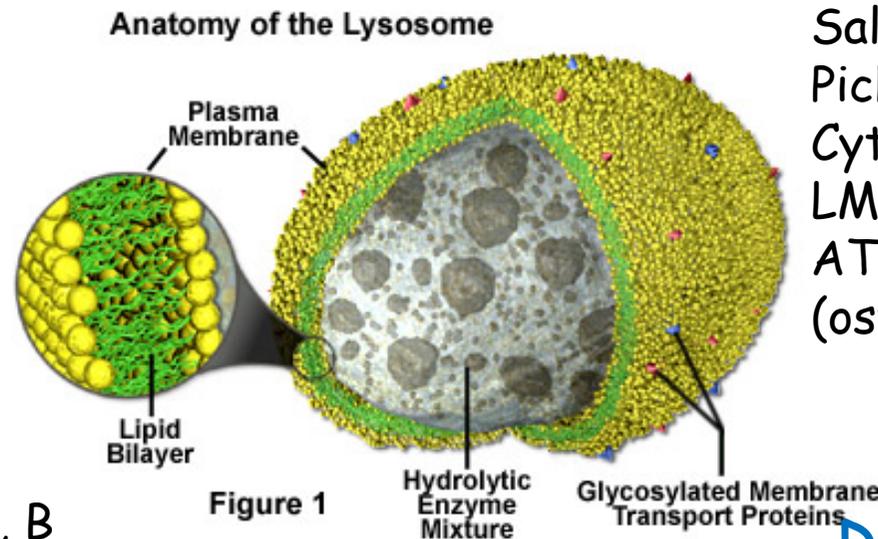
Saposine A (Krabbe), B (LMD), C (Gaucher)

Déficit d'une étape co- ou post-traductionnelle

Déficit multiple des mucopolidoses

Déficit d'un transporteur de la membrane lysosomale

Sialine (Maladie de Salla), NPC (Niemann-Pick type C), CLN3, Cytonisine (cystinose), LMBD1(variant Cbl F), ATPase -H⁺ (ostéopétrose)...



Déficit des protéines membranaires de structure

LAMP-2 (maladie de Danon)...

Classification selon le substrat accumulé

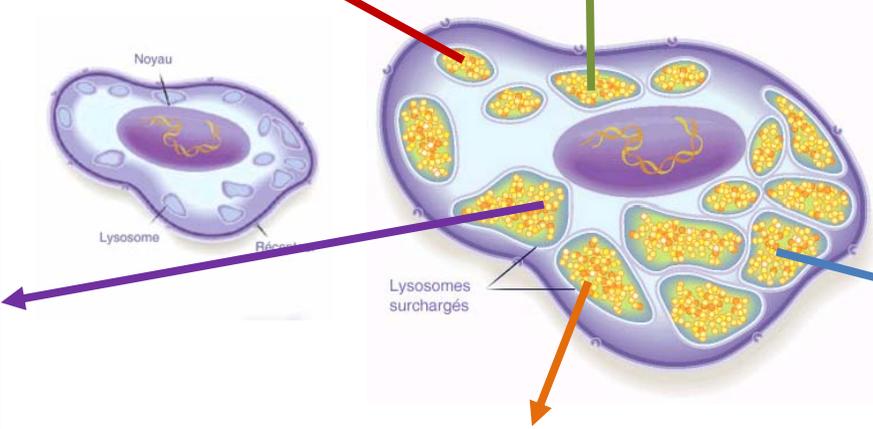
Mucopolycaccharidoses (MPS)
MPS type I, II, III A, IIIB, IIIC, IIID, IV A, IV B, VI, VII, IX

Sphingolipidoses
Gaucher; Fabry; Niemann-Pick A, B; Krabbe; leucodystrophie métachromatique; GM1- et GM2-gangliosidose

Autres lipidoses
Niemann-Pick C, Wolman, céréoïde lipofuschinoses 1,2,3,5,6,8,9,10

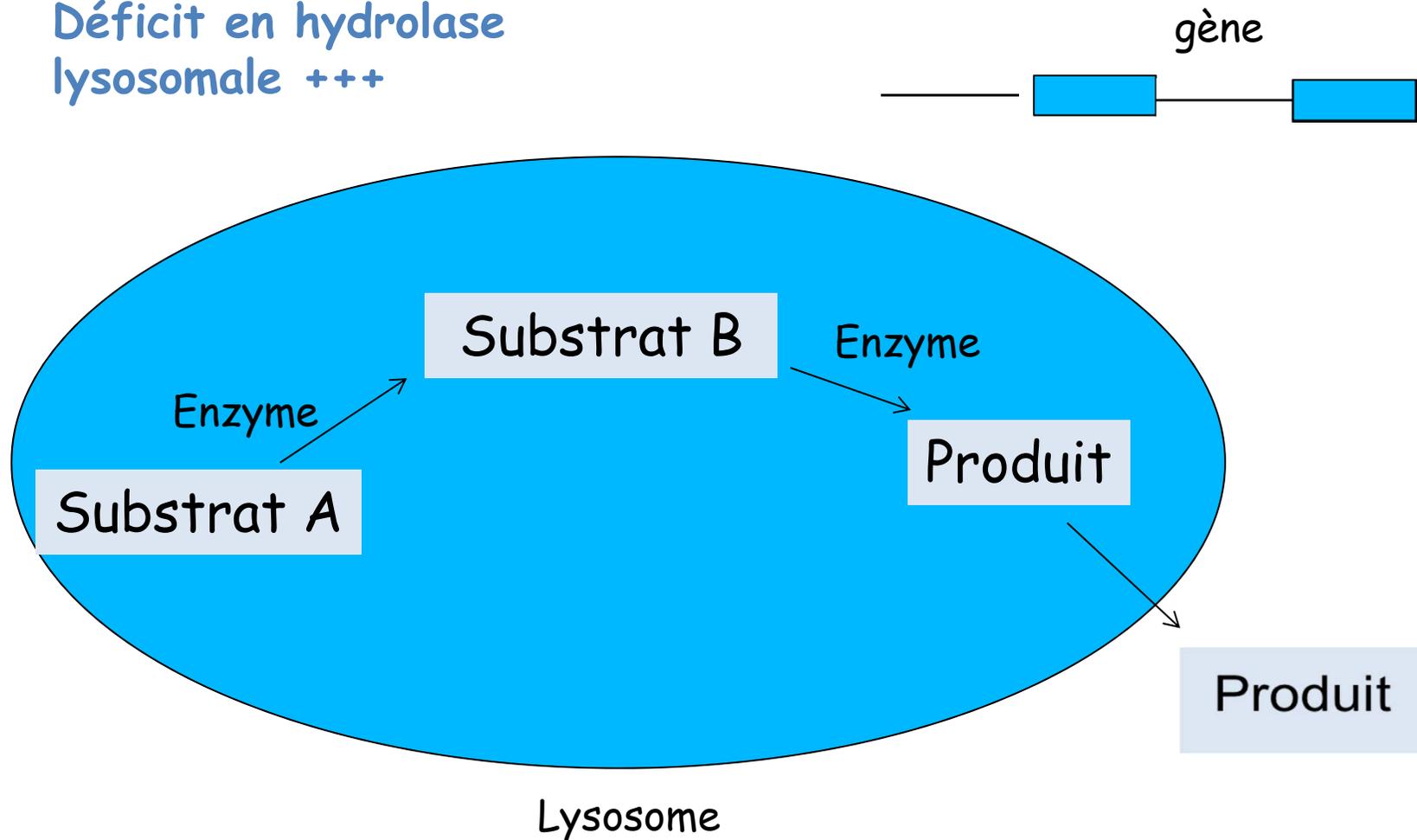
Glycogénose
Pompe

Oligosaccharidoses (glycoprotéinoses)
 α -mannosidose, β -mannosidose, mucolipidose, fucosidose, Schindler, aspartylglucosaminurie

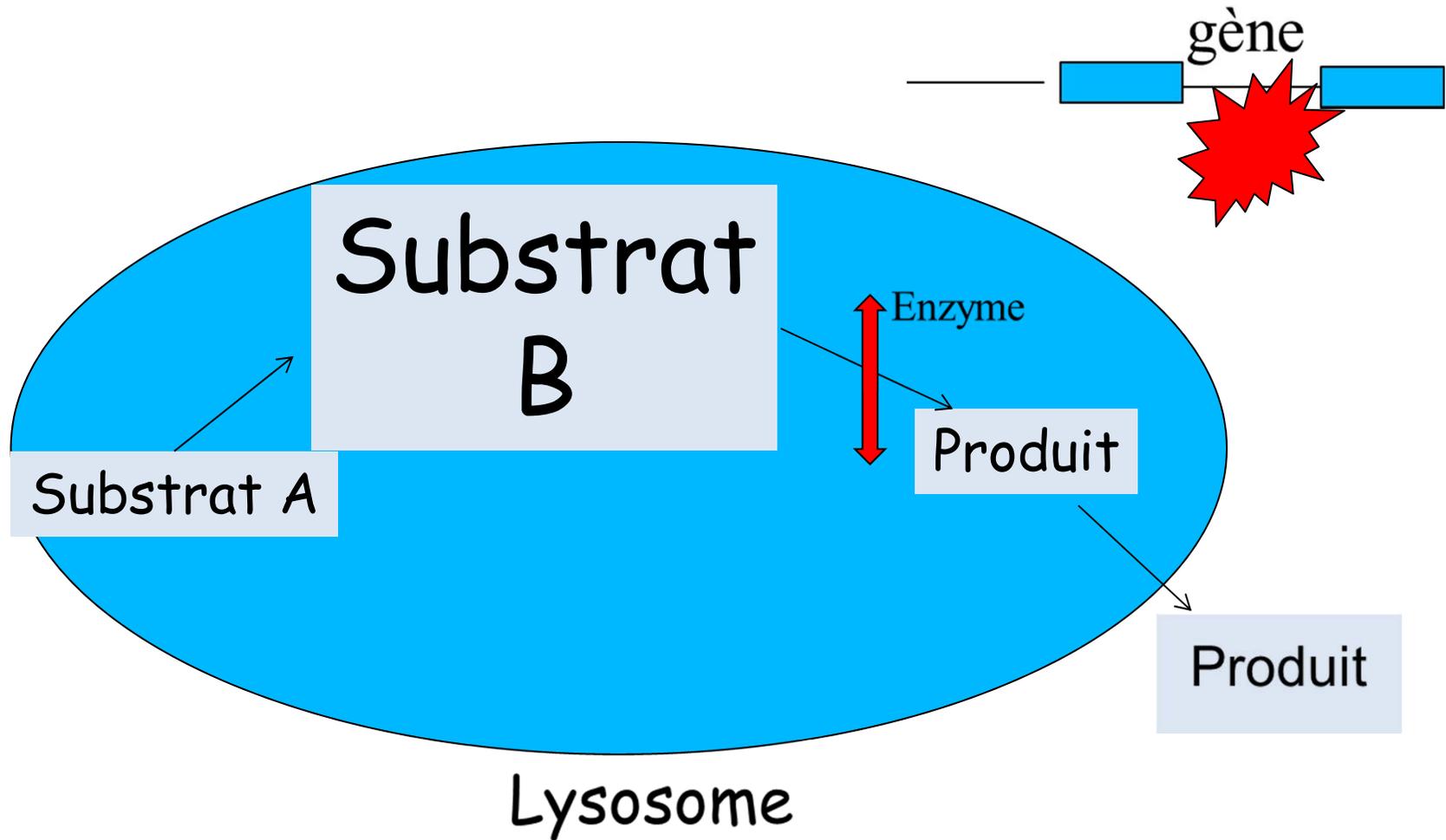


Physiopathologie des maladies lysosomales

Déficit en hydrolase
lysosomale +++



Physiopathologie des maladies lysosomales

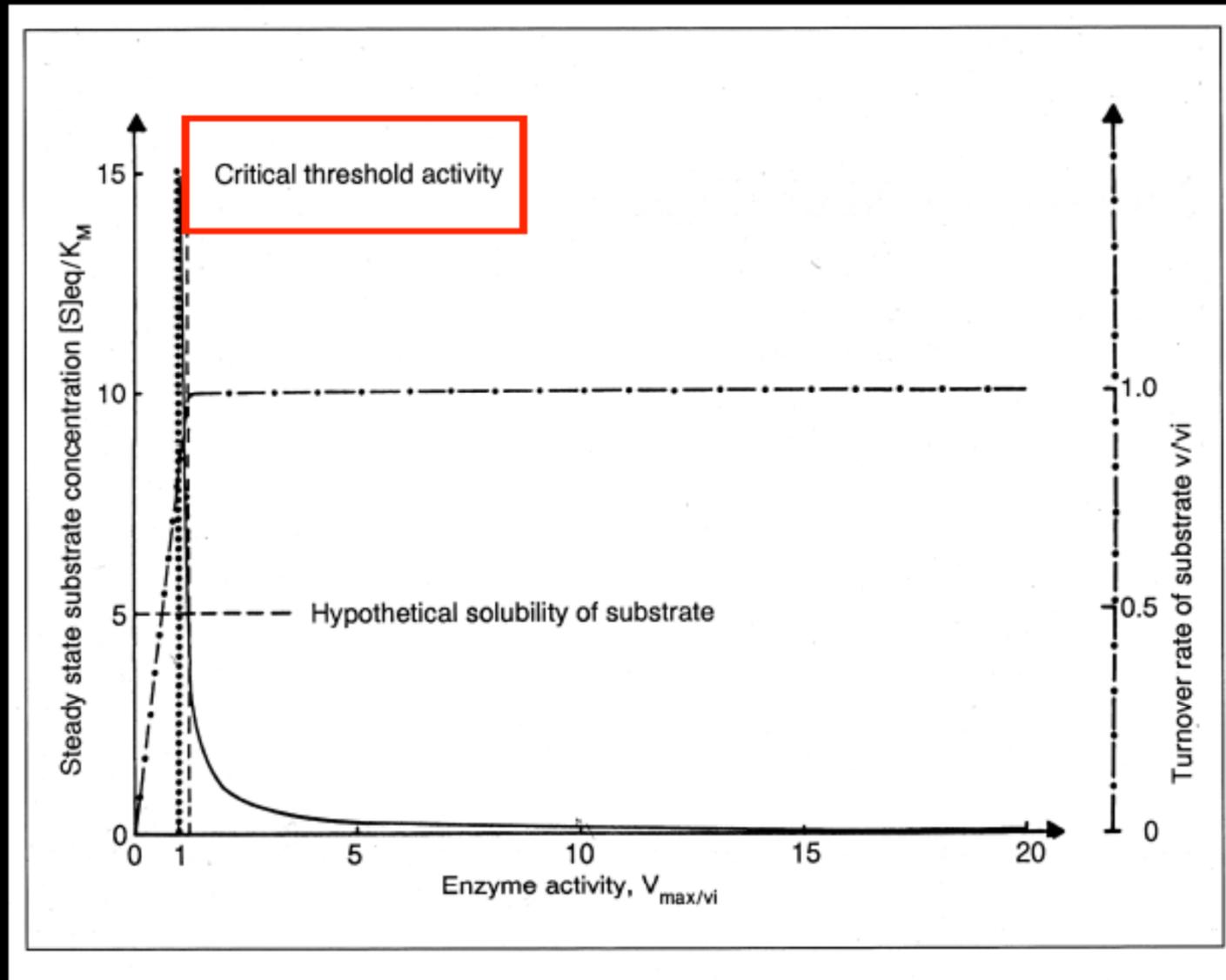


Physiopathologie des maladies lysosomales

La vitesse d'accumulation du substrat non dégradé dépend essentiellement de :

- L'activité enzymatique résiduelle
- L'intensité du métabolisme de la molécule dans le tissu considéré

Activité enzymatique résiduelle et accumulation du substrat : *la théorie du seuil*



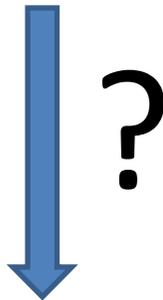
Physiopathologie des maladies lysosomales

?

?

?

Accumulation
de substrat



Dysfonctionnement
cellule/ organe

- Augmentation du volume lysosomal
- Homéostasie du Ca^{++}
- Altération du trafic intracellulaire
- Altération de la biosynthèse des protéines
- Perturbation du signal de transduction
- Apoptose
- Autophagie
- Cytotoxicité des bases sphingoides
-

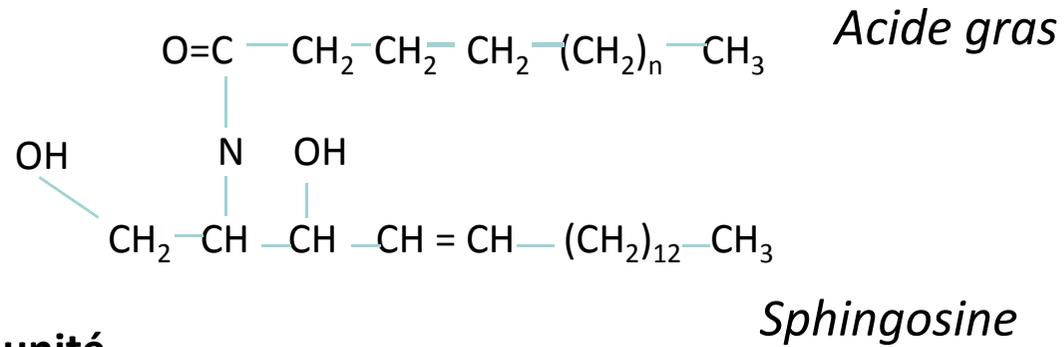
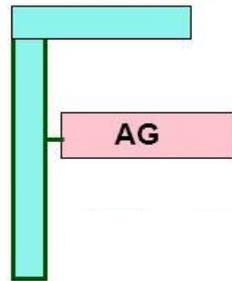
Sphingolipidoses

50% des maladies lysosomales

Exemple de la maladie de Gaucher

Les Sphingolipides

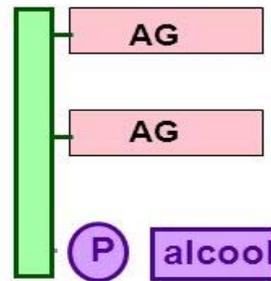
Sphingosine



CERAMIDE = unité de base

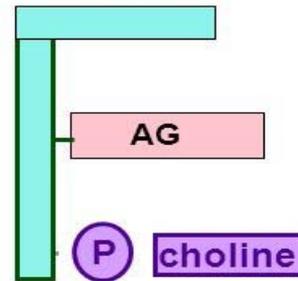
SPHINGOLIPIDES

glycérol



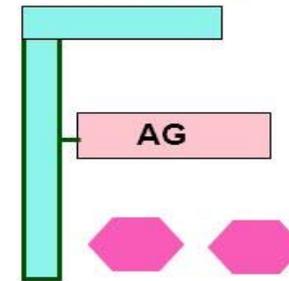
glycéro phospholipides

Sphingosine



sphingo phospholipides

Sphingosine



sphingo glycolipides

PHOSPHOLIPIDES

Les Lyso-sphingolipides

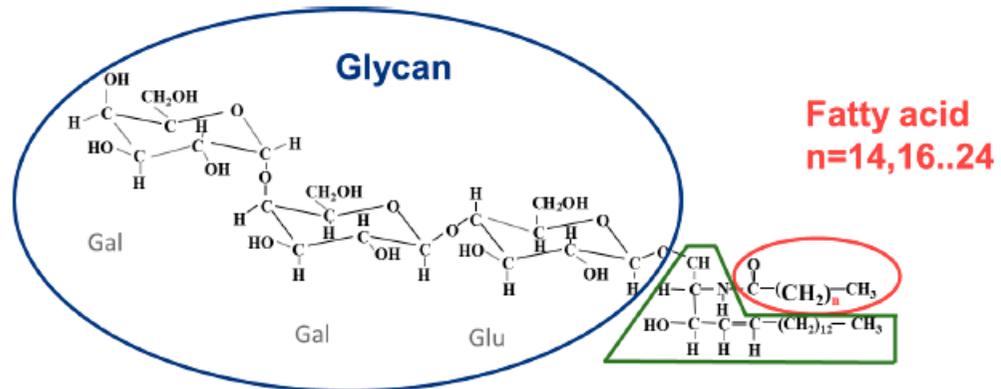
GL-3
(Gb-3)

globotriaosylceramide

céramidase

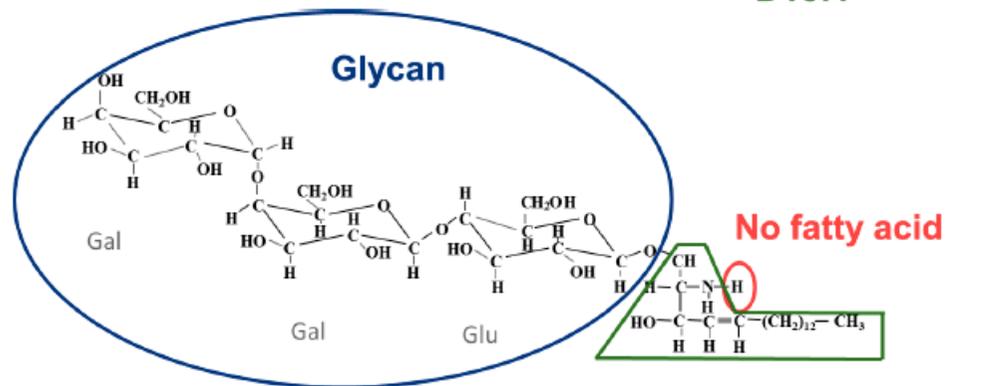
Lyso-GL-3
(Plasma lyso-GL-3 is 1 – 2%
of total GL-3)

globotriaosylsphingosine



Ceramide = Sphingosine + Fatty acid

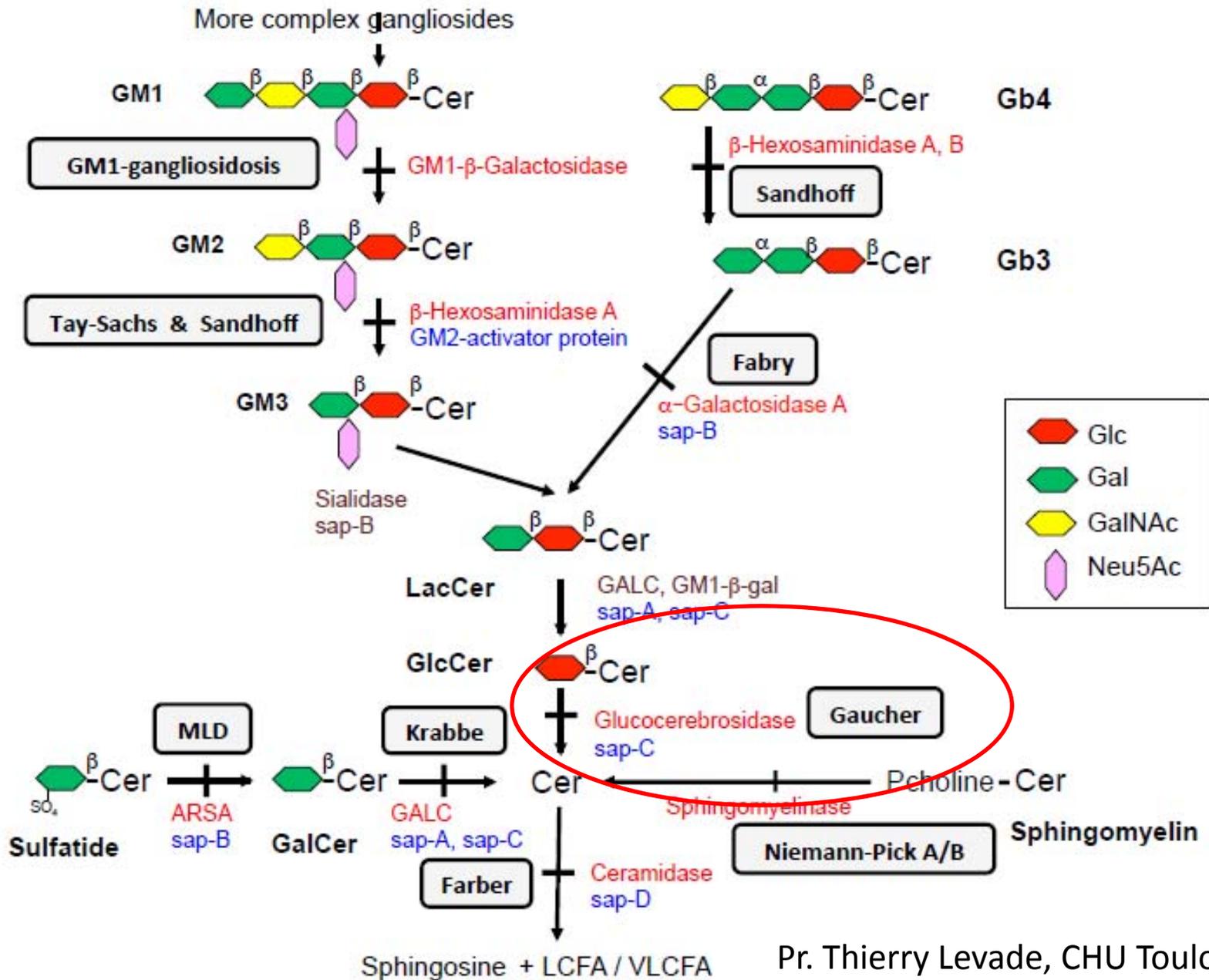
Sphingosine
D18:1



Sphingosine
D18:1

= Sphingolipide dé-acylé

Catabolisme lysosomal des SPHINGOLIPIDES



Diagnostic biologique des sphingolipidoses

- Dosage activité enzymatique
- Dosage des métabolites accumulés : sphingolipides/ lyso-sphingolipides
- Etude moléculaire

Deux analyses particulièrement intéressantes pour:

- Déficit en activateur (saposine)
- Pseudodéficit
- Diagnostic des hétérozygotes (transmission liée à l'X)

Mesure d'activités enzymatiques lysosomales

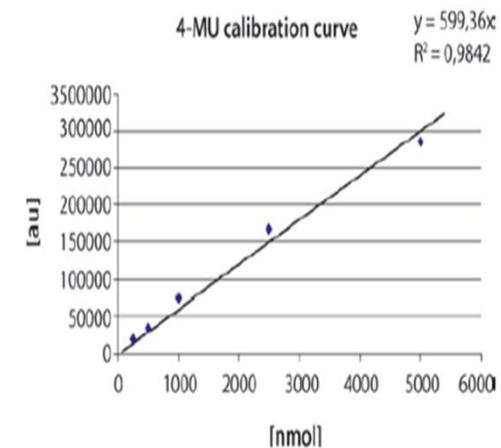
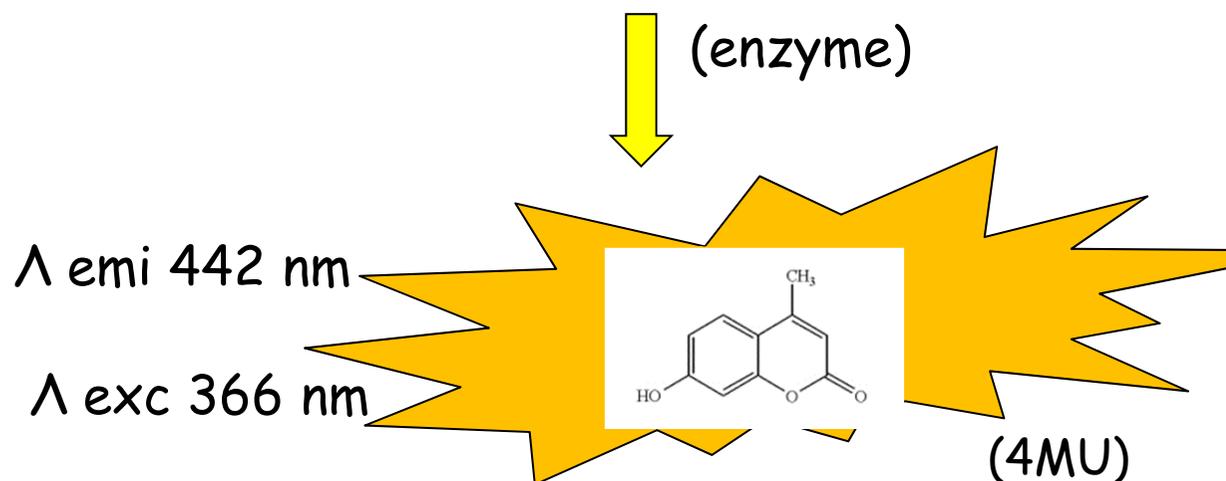


1- Approche classique (leucocytes, fibroblastes) :

Fluorimétrie

- Utilisation de substrats spécifiques synthétiques couplés à la 4-méthylumbelliférol (4MU)
- Dosage deuxième enzyme = enzyme de référence

4-methylumbelliferyl-Substrat



Mesure d'activités enzymatiques lysosomales

2- Dosage à partir de sang séché sur papier buvard



- **Fluorimétrie**
- **LC-MS/MS (multiplex)**
(Application au dépistage néonatal)

➤ *Avantages :*

- *faible volume échantillon*
- *facilité de transport*
- *application au dépistage néonatal*

➤ *Inconvénient: confirmation par une approche classique*

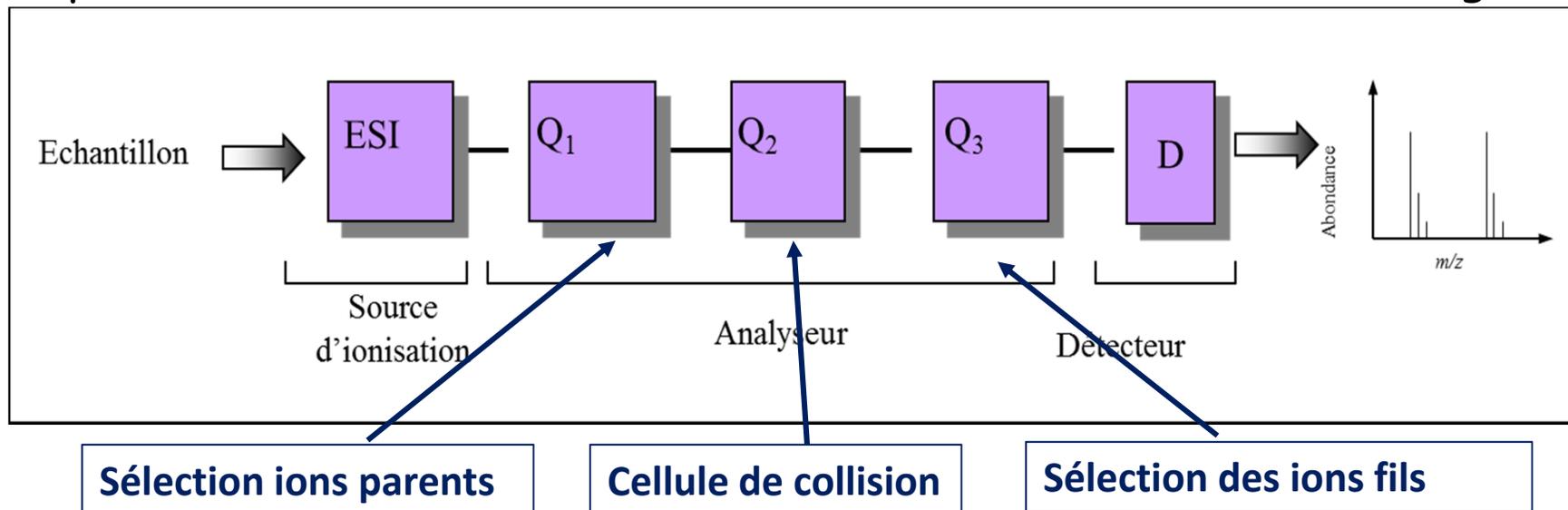
Dosage des lysosphingolipides



LC/MS/MS

Technique
Très sensible
Très spécifique

Analyse qualitative et quantitative d'un mélange complexe en séparant les molécules en fonction de leur masse et de leur charge



Suivi biologique sous traitement

- **Dosage des métabolites accumulés**
- **Biomarqueurs sanguins ± spécifiques**

Traitement spécifique des sphingolipidoses

Comité d'experts pour le traitement des maladies lysosomales (CETL)
Protocoles Nationaux des Soins (PNDS) publiés par la HAS

Thérapie substitutive enzymatique

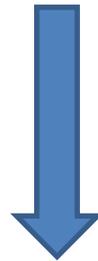
Réduction
du substrat



Substrat

Molécule chaperon

Grefe de moelle osseuse



Enzyme



Produit

Thérapie génique

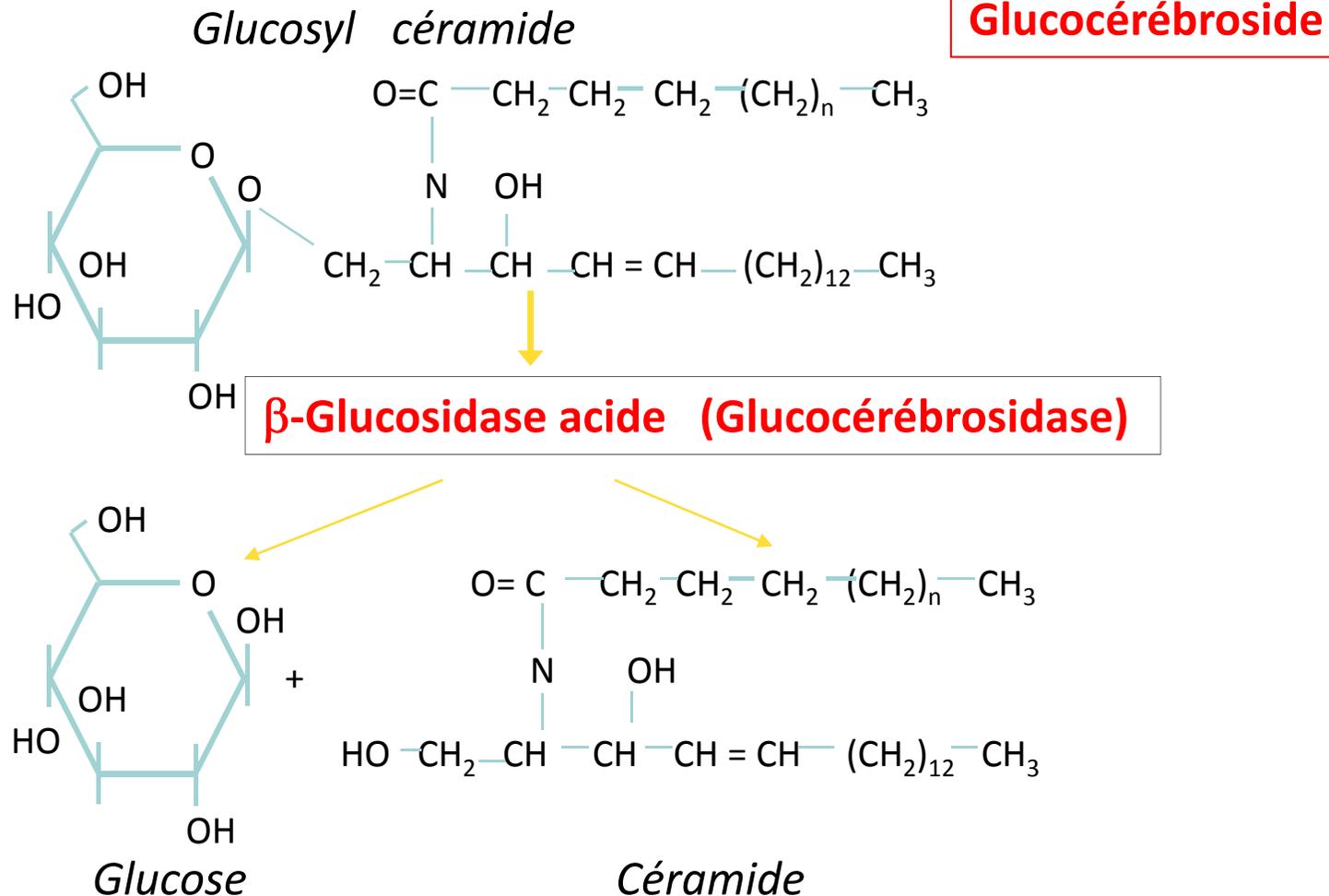


gène



Maladie de Gaucher

Déficit enzymatique en glucocérébrosidase



Maladie de Gaucher type 1

- **95% des phénotypes Gaucher**
type 2, nourrisson neurologique: < 1%
type 3, signes neuro avant 20ans : < 5%
- **Transmission autosomique récessive**
1/60 000 population générale
Juifs Ashkenazes : 1/1000
- **Cellules du système réticulo-endothélial**
Tableau viscéral chronique : foie, rate, moelle osseuse, os, poumons...

Maladie de Gaucher type I

Tableau viscéral chronique

Atteintes hématologiques

- Thrombopénie
- Anémie

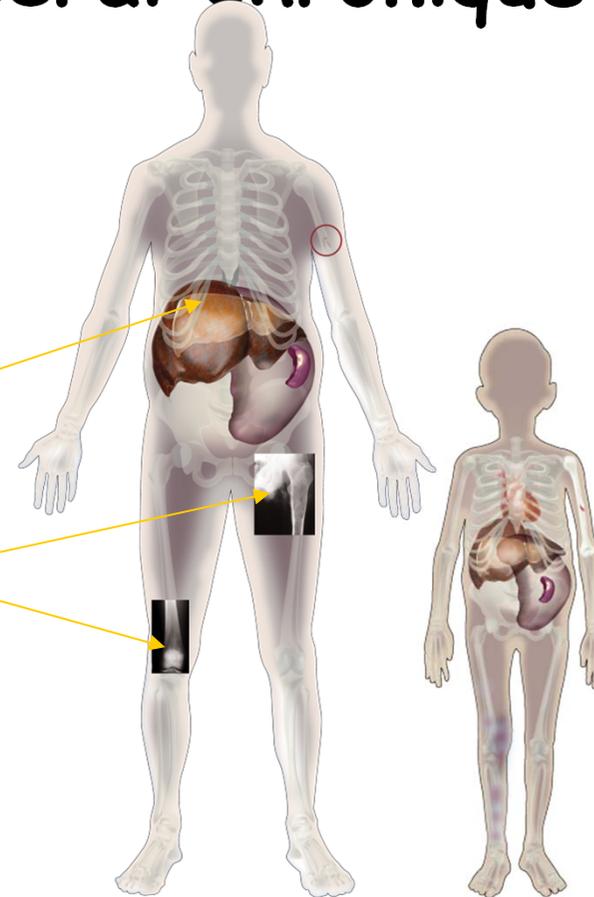
Atteintes viscérales

- Splénomégalie
- Hépatomégalie

Atteintes osseuses

- Douleurs osseuses
- Ostéopénie
- Ostéonécrose
- Infarctus osseux
- Lyse osseuse
- Fractures pathologiques

Retard de croissance



SMG >90%

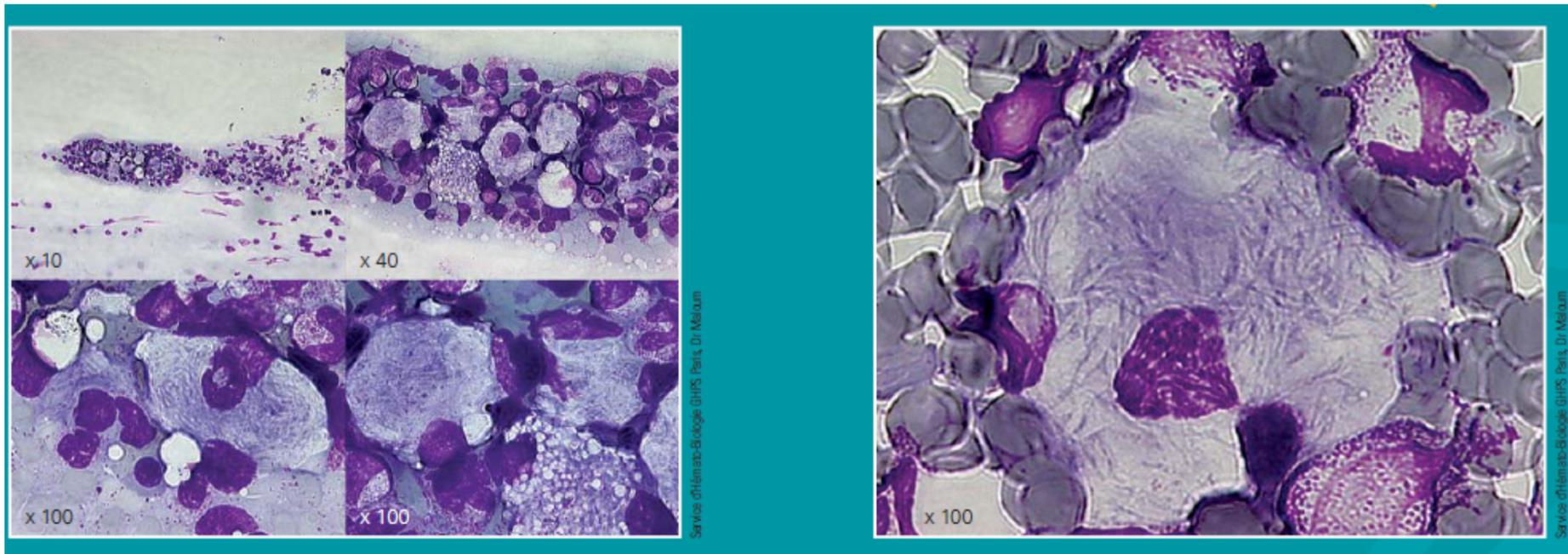
Thrombopénie 60-90%

Atteinte osseuse radiologique 80%

Diagnostic biologique

Orientation diagnostique:

Anomalies cytologiques (sang, moelle osseuse)



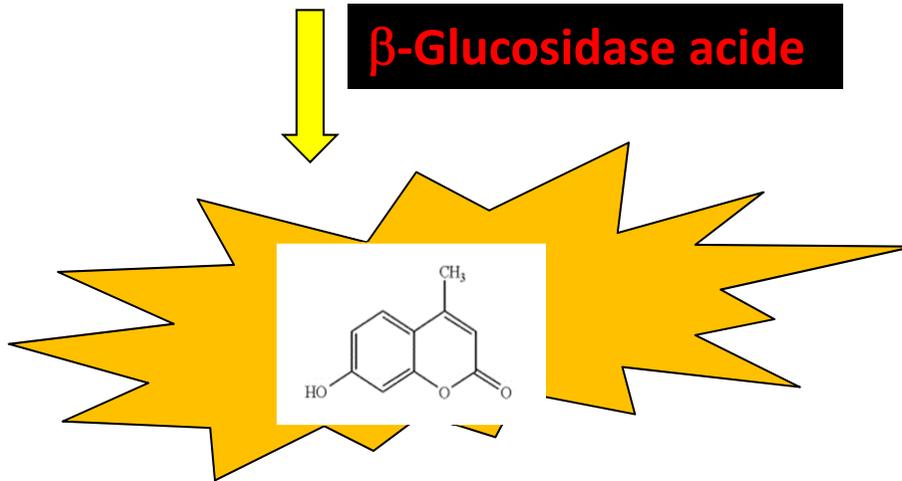
Cellule de Gaucher:
Inclusions en « bulbe d'oignon »
Image de « papier froissé »

Diagnostic biologique

Dosage enzymatique:

4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside

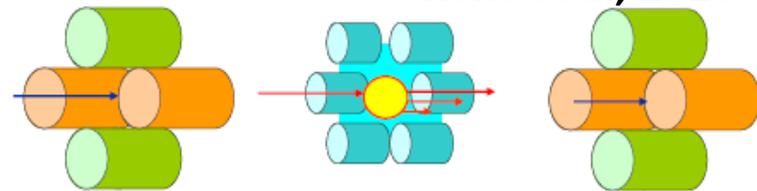
β -Glucosidase acide



4-MU

Dosage LC/MS/MS : Lyso-glucosylcéramide (lyso-hexosylcéramide)

Rolfs et al, 2013



MS1

Collision Cell

MS2

Static at Precursor Ion

RF Only

Static at Product Ion

Lyso-Gl1

$m/z = 462,3$

Ion fils

$m/z = 282,3$

Diagnostic moléculaire maladie de Gaucher

- Etude cas index
- Etudes familiales
- Diagnostic prénatal sur amniocytes ou villosités choriales

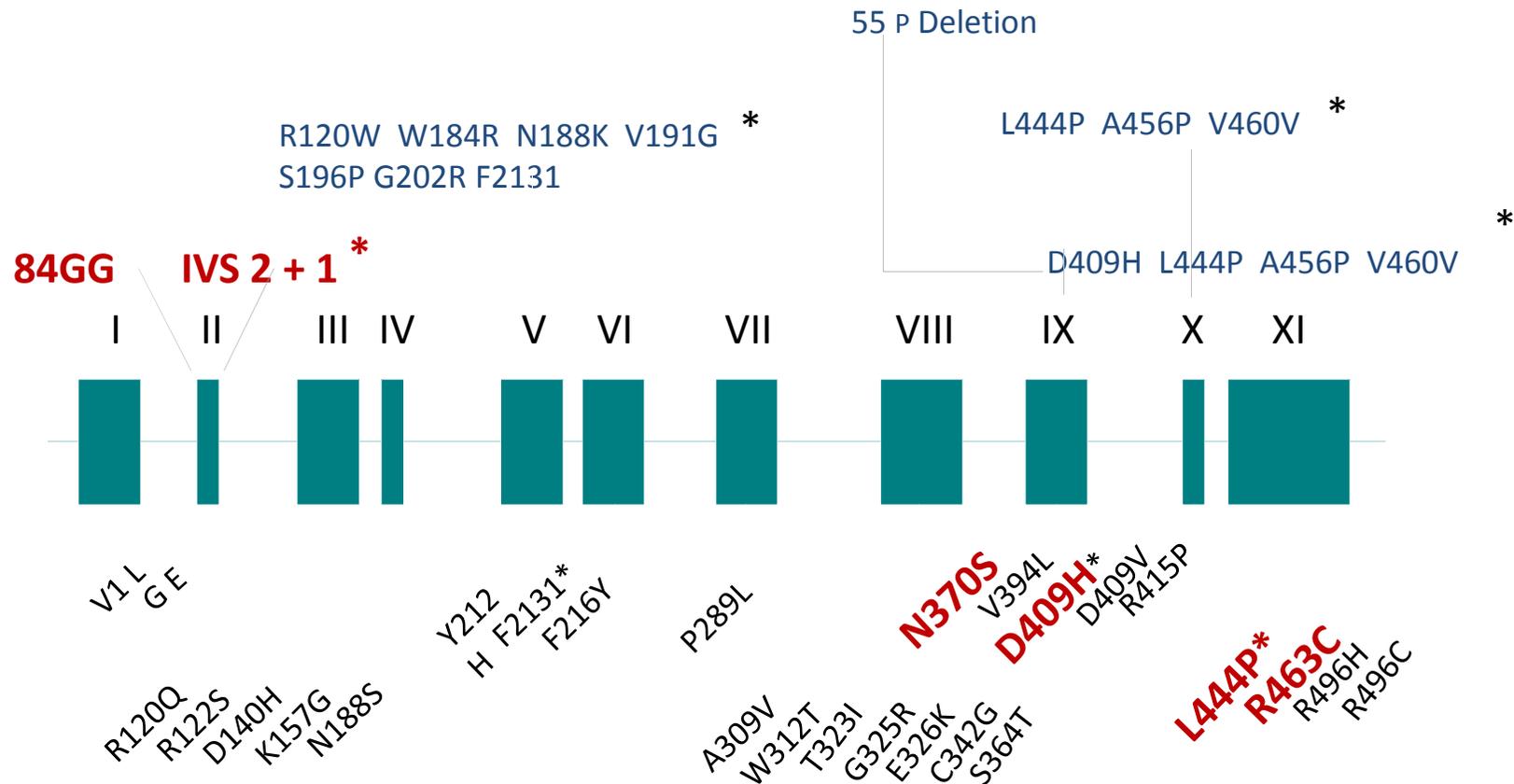
- Approche pronostique: corrélation génotype-phénotype

Génotypage du Gaucher type 1

Gène *GBA* sur chromosome 1q21
7.6 kb; 11 exons

Plus de 300 mutations

6 mutations prépondérantes



Evaluation pronostique: corrélations clinico-biologiques?

Difficile:

- Peu d'études fonctionnelles
- Grande hétérogénéité moléculaire
- Activité enzymatique faible modulable : polymorphismes alléliques, mutations du promoteur, gènes modificateurs...

Quelques corrélations génotype-phénotype:

- N370S (p.Asn409Ser c. 1226A>G) à l'état homozygote, exclut le risque de Gaucher type 3
- L444P (p.Leu483Pro c. 1448 T>C) à l'état homozygote, haut risque de Gaucher type 3
- Associations de deux allèles « nuls »: Gaucher type 2, forme foetale

Traitement maladie de Gaucher

➤ Enzymothérapie substitutive (ES)

Traitement de première intention chez l'adulte

Seul traitement de l'enfant

imiglucérase (CEREZYME®) vélaglucérase (VPRIV®)
taliglucérase-alpha (UPLYSO®)

➤ Traitement par réduction du substrat (TRS)

= Inhibition de la ceramide glucosyl-transferase

- élignustat (CERDELGA®), analogue du céramide

Patient naïf ou en relai de l'ES

- miglustat (ZAVESCA®), analogue du D-glucose

Contre-indication de l'ES

Traitement maladie de Gaucher

Registre français (en 2015: 502 patients;444 adultes, 58 enfants)

La prescription d'un traitement spécifique n'est pas systématique.

Indication: Atteinte d'organe symptomatique

et/ou plaquettes < 50Giga/L et/ou Hb <10g/dL

Validation par le Comité d'Evaluation du Traitement de la maladie de Gaucher (CETG)

Correction significative de la plupart des manifestations cliniques (et biologiques) en 1 à 5 ans

Prévention des complications tardives irréversibles : SMG fibreuse, fibrose hépatique, fibrose pulmonaire, HTAP, arthrose, déformations osseuses

Suivi biologique maladie de Gaucher

Biomarqueurs sanguins

Chitotriosidase

- Produite par les cellules de Gaucher
- Taux corrélé à la sévérité clinique
- Suivi thérapeutique
- 6%-30% pop générale déficit en chitotriosidase (duplication 24pb)

CCL18 (CC chemokine ligand 18)

- Chimiokine produite par les macrophages.
- Bonne corrélation à la chitotriosidase
- Peu de variabilité individuelle

Ferritine

- Moins spécifique

Enzyme de conversion de l'angiotensine

- Moins spécifique
- Augmentation plus variable

Lyso-glucosylcéramide (Glucosylsphingosine)

Plus performant

(*Mirzaian et al, 2015*)

Cas clinique

Mme Aurélie D. née le 26/09/1981

Employée de bureau

Mai 2013, consulte à Mont-de-Marsan pour douleurs abdominales basses transitoires. Kyste ovarien?

Échographie abdominale : splénomégalie 16/7,5cm, aspect hétérogène

De Mai 2013 à Mai 2014, échographie abdominale et scanner : persistance de la SMG sans évolution particulière.

Bio: sans particularité, bilan viral, autoimmun et immunophénotypage des lymphocytes sans particularité.

Mai 2014, consultation auprès du Dr. Marguerite Michaux
(Hématologie, CHU Bordeaux)

SMG

HMG discrète

Bio: Hb 12,3g/dL ; leucocytes 5,2G/L (3,15 G/L neutrophiles;
1,63 G/L lymphocytes)

Plaquettes 118 Giga/L.

Hémostase normale dont protéine C, S, ATIII

Echographie: SMG à 14,5 cm / 13,2 cm, et 3 nodules de 14, 18
et 7 mm.

HMG de 17 cm

Ostéodensitométrie : ostéopénie au niveau du rachis lombaire
(T score - 1,7; Z score -1,7) et du fémur (T score -0,9; Z
score -0,8)

Dosage béta-glucocérébrosidase

Chitotriosidase plasma

➤ Dosages enzymatiques (Pr. T. Levade, CHU Toulouse) :

• Dosage bêta-glucocérébroside sur leucocytes:

1,1 nmol/h/mg protéines

témoin 9,2

IR: 10-25

• Chitotriosidase plasma: 2293nmol/h/mL

témoin 16

IR: 0-200

➤ Etude moléculaire (Dr. C. Caillaud, Hôpital Necker, APHP):

c.259C>T (exon 3) p.Arg87Trp (R48W)

c.1448T>C (exon 10) p.Leu483Pro (L444P)

MALADIE DE GAUCHER TYPE 1

Etude familiale :

Frère jumeau Baptiste D. : porteur des 2 mutations mais
asymptomatique

Octobre 2014: consultation Dr. Fabrice Camou, hôpital St André,
CHU Bordeaux

Grossesse gémellaire depuis Juillet
IRM osseuses, écho transthoracique et EFR prévus après
l'accouchement.

Validation par le CETG de l'indication de thérapie enzymatique
substitutive:

Imiglucérase (CEREZYME) 60U/kg en perf IV tous les 14 jours,
Hôpital de jour CH Mont-de-Marsan, puis à domicile.

Suivi biologique:

Numération sanguine

Electrophorèse des protéines: Hypergammaglobulinémie polyclonale?

Bilan hépatique

Bilan rénal: protéinurie ?

Bilan phosphocalcique: Carence en vitamine D?

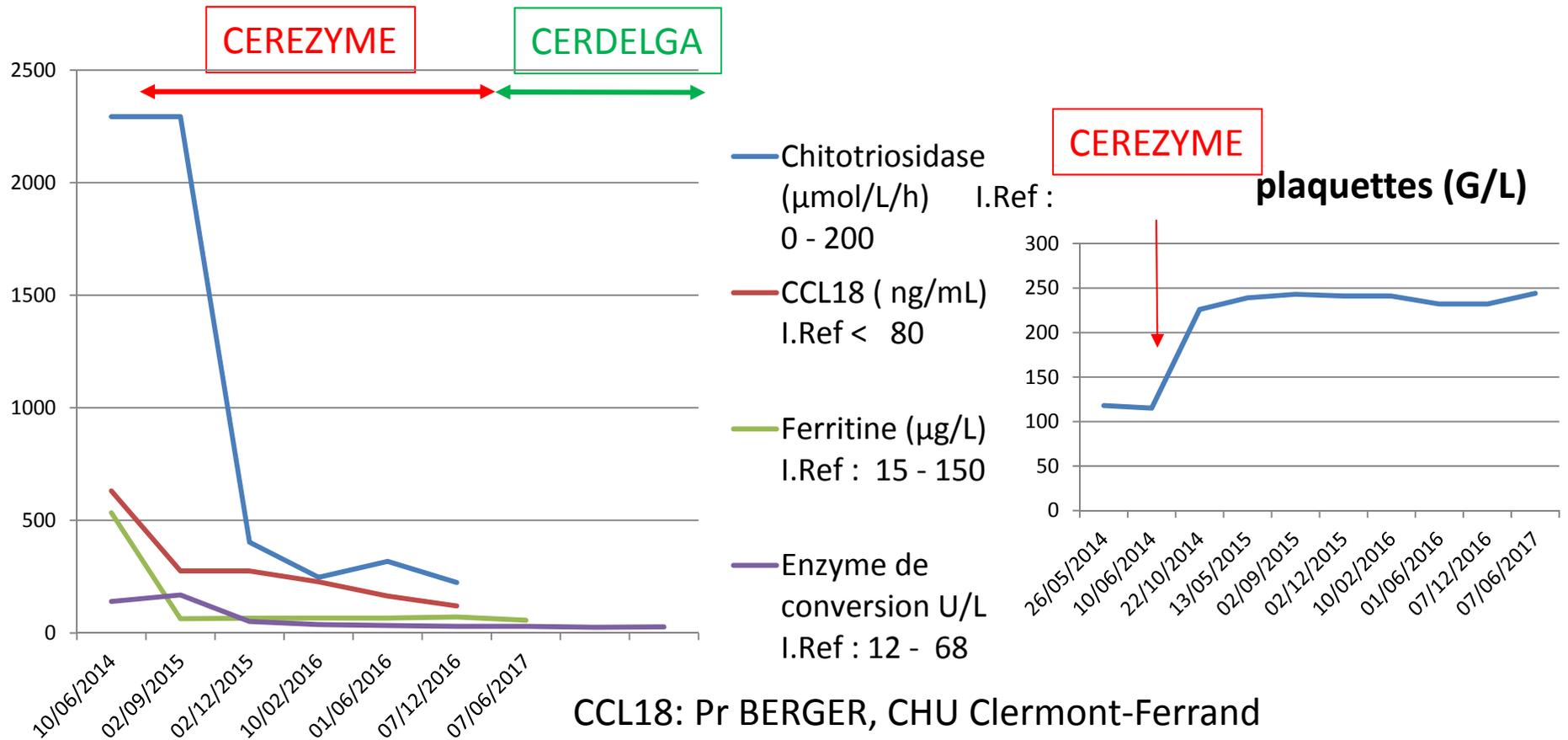
Vitamine B12, folates

Génotypage de l'isoforme 2D6 du cytochrome P450: métaboliseur rapide donc

Éliglustat (CERDELGA):

A partir du 05/12/2015, 1 gel 84 mg matin et soir

Suivi par les biomarqueurs :



Maladie de Gaucher

Message clinico-biologique



Le diagnostic de maladie de Gaucher doit être systématiquement envisagé devant :

- Thrombopénie et SMG
- Hyperferritinémie et SMG
- Hyperferritinémie et thrombopénie
- Hypergammaglobulinémie et thrombopénie
- Crises douloureuses osseuses