



# PLATEFORME LYSODIAG : STRATÉGIES DIAGNOSTIQUES *SUR PAPIER BUVARD* DANS LES MALADIES LYSOSOMALES

---

MALADIES DE FABRY, GAUCHER



**HCL**  
HOSPICES CIVILS  
DE LYON

Magali PETTAZZONI

Laboratoire des Maladies Héréditaires du Métabolisme

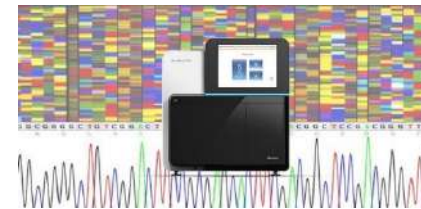
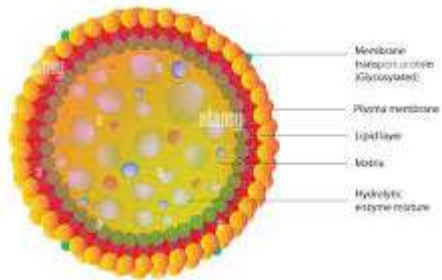
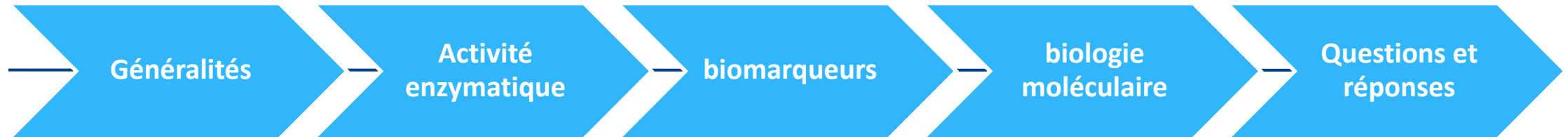
CHU Lyon

21 novembre 2023 CNBH – Aix en Provence

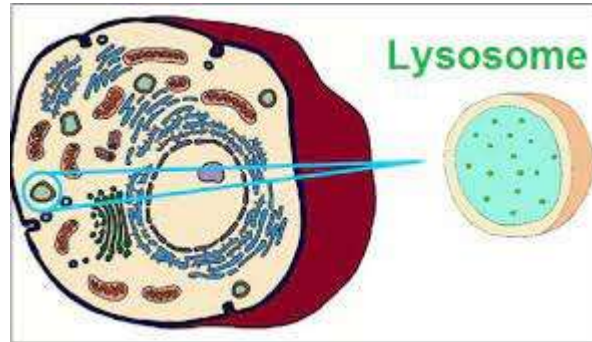
# Liens d'intérêt

- Financement de congrès par Sanofi, Takeda, Orchard
- Honoraires pour des présentations, participation à des Board (Takeda, Orchard, Sanofi, Chiesi)
- Soutien financier pour la plateforme LysoDiag par Takeda

# NOUVEAUX OUTILS DIAGNOSTIQUES DES MALADIES LYSOSOMALES



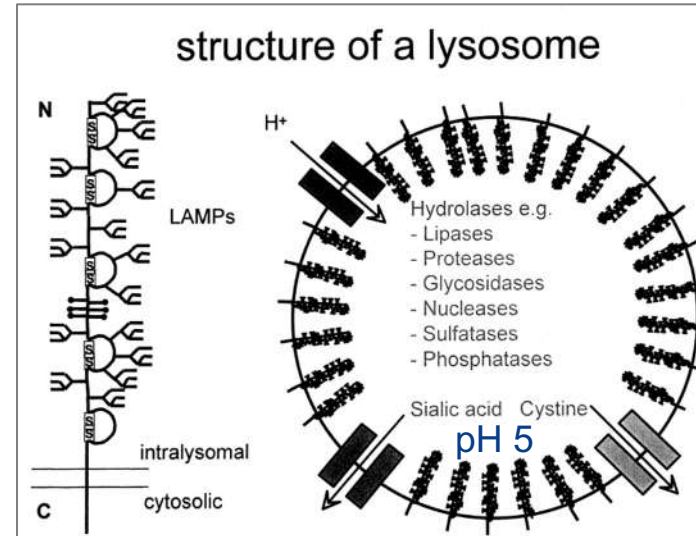
# Le Lysosome



Organelle intracytoplasmique riche  
en enzymes =  
**hydrolases acides**

**Lysosome**

Terme issu du grec luein : **dissoudre**,  
et sôma : **corps**

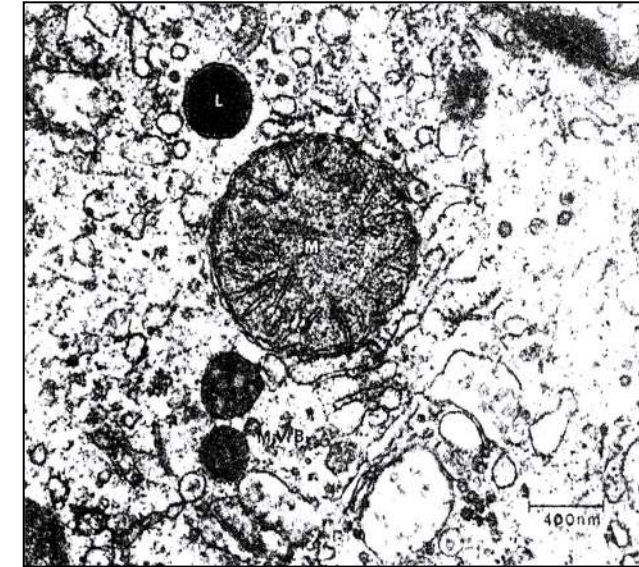


+ protéines solubles

+ protéines membranaires

LIMPs, LAMPs, acidification (pompe à protons H<sup>+</sup>/ATPase), transporteurs (cystinosine, sialine,...),

+ lipides (composition spécifique)

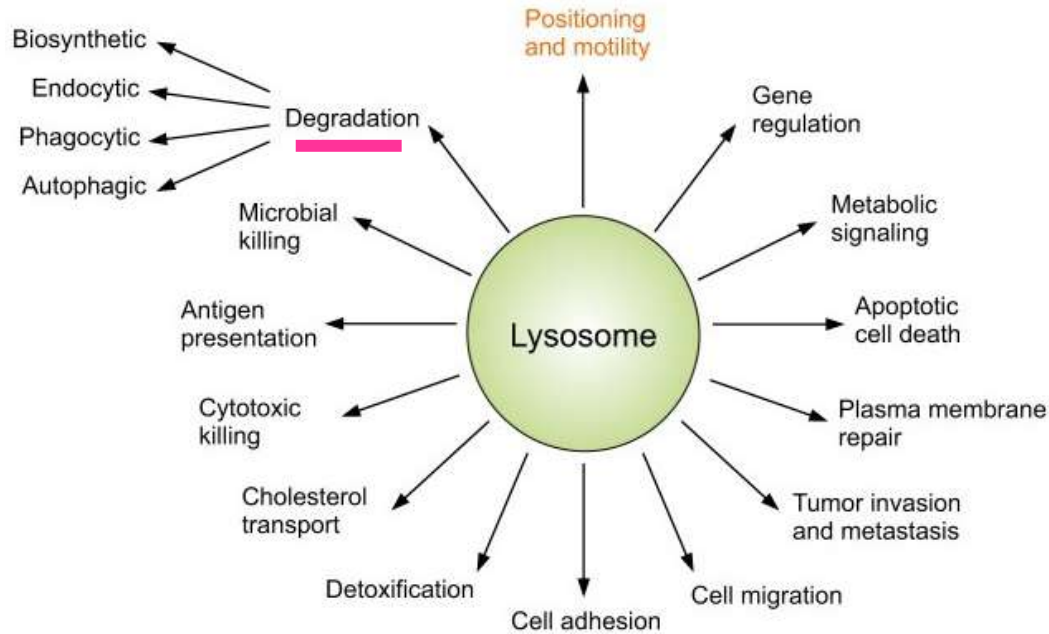


Morphologie:

- Limité par une membrane simple
- Sphérique, ovoïde, parfois tubulaire
- Matrice dense amorphe, osmiophile
- Taille < 1µm à plusieurs µm

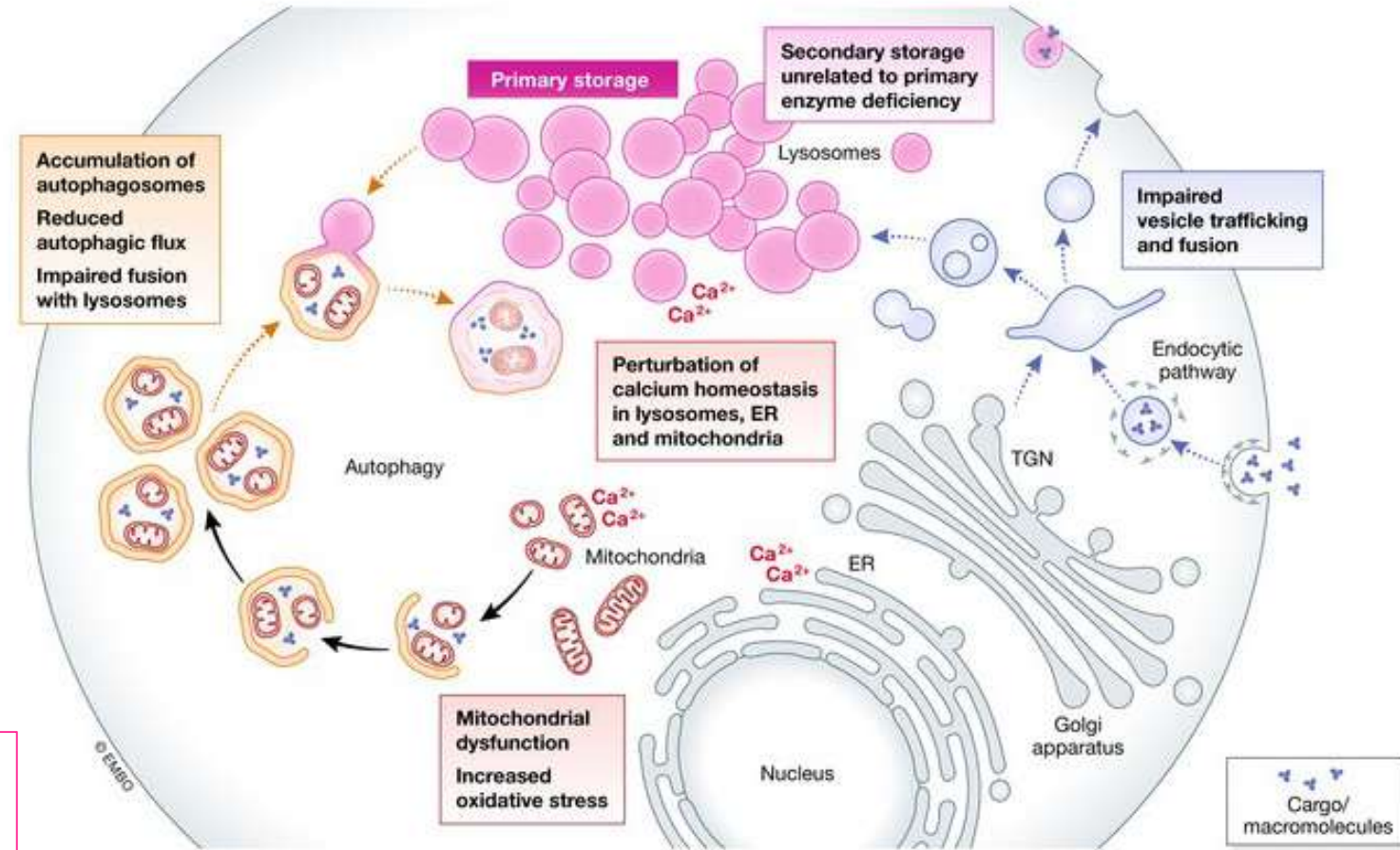
# Physiopathologie des maladies lysosomales

Les multiples fonctions du lysosome sont influencées par sa position et sa mobilité dans la cellule à travers le cytoplasme



Maladies lysosomales = **déficit en une enzyme (ou protéine) lysosomale** impliquée dans la **dégradation de molécules complexes**

L'accumulation de substrats non dégradés (primaires et secondaires) déclenche de **multiples événements impliqués** dans la physiopathologie des maladies lysosomales



# Maladies lysosomales : concept général

Synthèse

Oligosaccharides  
Sphingolipides  
Mucopolysaccharides ...



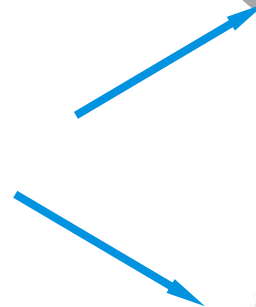
Catabolisme  
Normal



SUJET NORMAL

Oligosaccharides  
Sphingolipides  
Mucopolysaccharides ...

Lysosome



Catabolisme  
Bloqué

Catabolisme  
Normal

MALADIE

Efflux bloqué

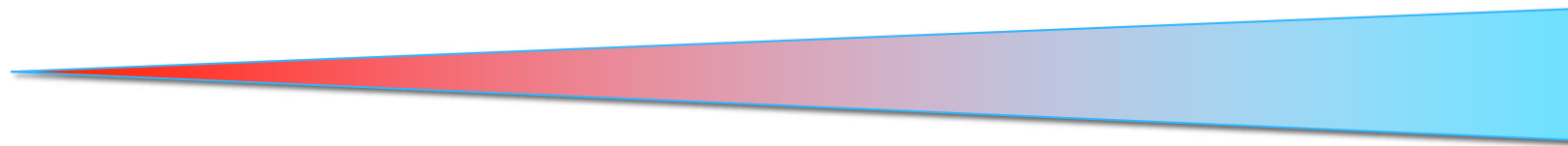
Déficit enzymatique / transporteur

Les maladies de surcharge lysosomale  
= maladies héréditaires du métabolisme  
regroupant **environ 70 pathologies**  
transmission le plus souvent  
**autosomique récessive** (sauf Fabry  
Danon Hunter liées X)

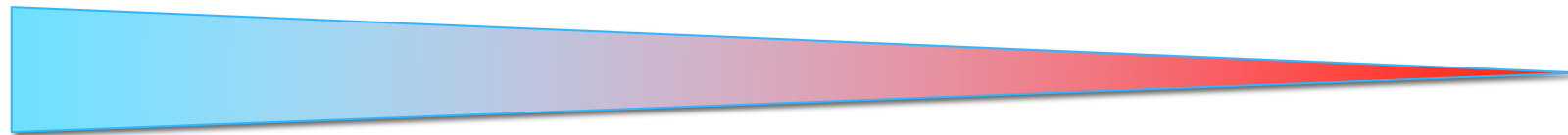
incidence globale est estimée à  
**1:5000 naissances**

# Sévérité des signes cliniques des maladies lysosomales

- Pour une **même** maladie lysosomale



Activité  
enzymatique résiduelle



Sévérité des  
signes cliniques

Foetus

Nouveau- né

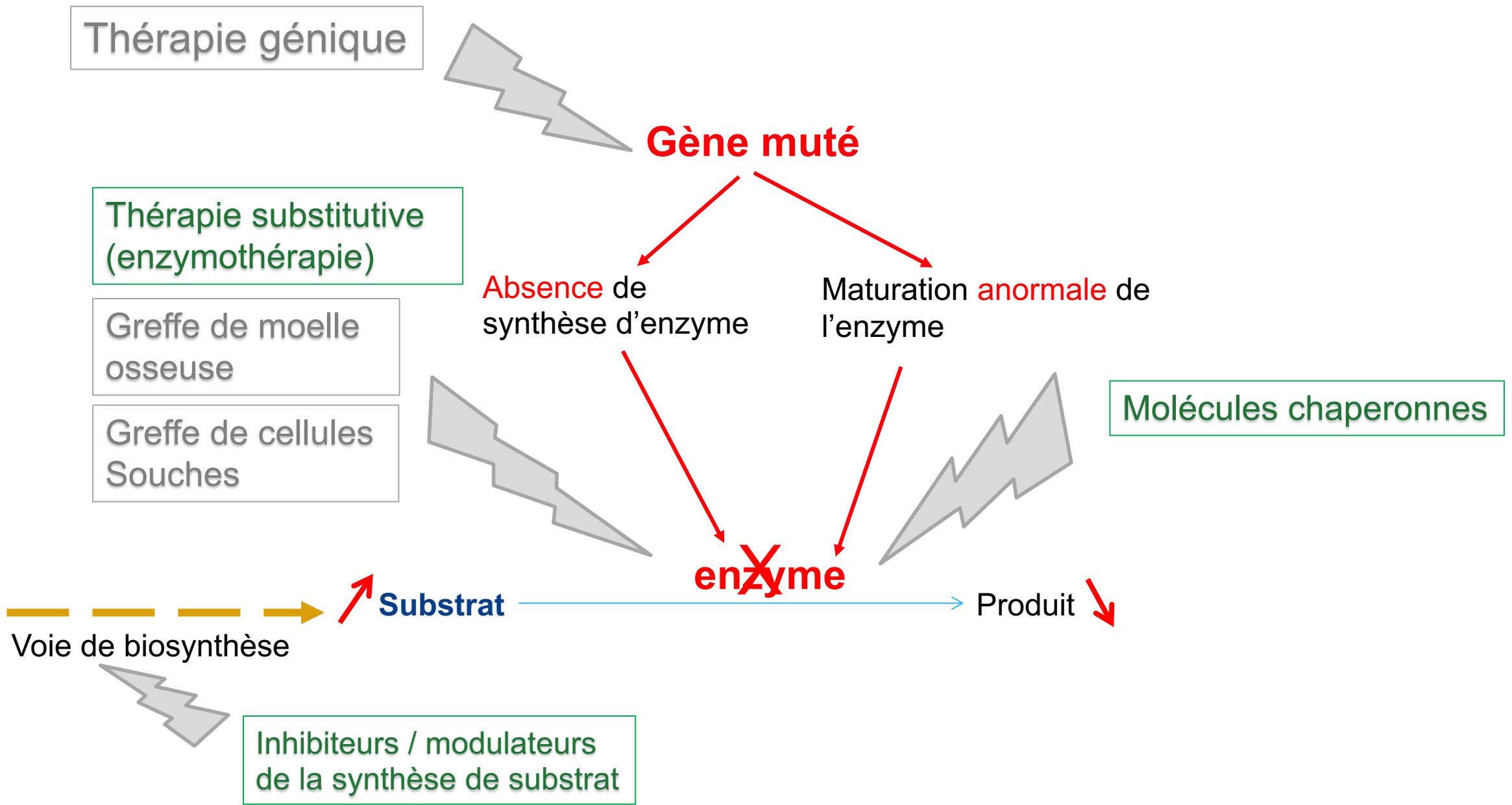
Enfant

Adulte

Age de révélation

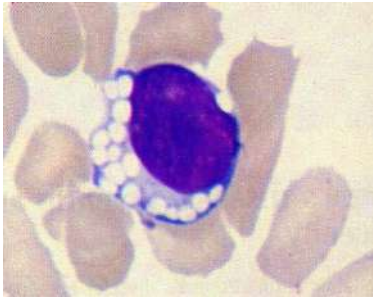
Hétérogénéité clinique +++  
inter-individuelle  
intrafamiliale

# Approches thérapeutiques spécifiques





# Maladies lysosomales : démarche diagnostique



- Gangliosidose à GM1
- Mannosidose
- ISSD
- Sialidose
- ML II
- GSD II
- Wolman
- CLN 3

Tests d'orientation  
Frottis sanguin : lymphocytes vacuolés /  
cellules de surcharge

La biologie moléculaire ne sert généralement PAS au diagnostic initial

## 3-analyse moléculaire

- NGS +++ Sanger • Confirmer le diagnostic
- Panel de gènes • Possibilité de Diagnostic Prénatal
- Exome • Étude familiale (recherche des hétérozygotes)
- Génome • Conseil génétique
- Corrélation phénotype/génotype



## 1-dosage des métabolites

Fluides biologiques: plasma, taches de sang sur buvard, urine, liquide amniotique, LCR...

## 2- mesure d'activité enzymatique

Tache de sang sur buvard, leucocytes, plasma, liquide amniotique, cellules cultivées, biopsies...

Table 1. Inborn errors of lysosomal metabolism

Mucopoly-saccharidoses	Sphingolipidoses	Glycoproteinoses	Miscellaneous
Hurler, Scheie (I)	Tay-Sachs	$\alpha$ -Fucosidosis	Cathepsin C
Hunter (II)	Gaucher	Aspartylglucosaminuria	Cathepsin K
Sanfillipo A-D (III)	Krabbe	$\alpha$ -Mannosidosis	Pompe (GSD type II)
Morquio A, B (IV)	Anderson-Fabry	$\beta$ -Mannosidosis	Niemann-Pick C types I, II
Maroteaux-Lamy (VI)	Farber	Sialidosis	Neuronal ceroid lipofuscinoses (CLN 1-10)
Sly (VII)	Metachromatic leukodystrophy	Galactosialidosis	Wolman (cholesterol ester)
Hyaluronidase deficiency (X)	Niemann-Pick A and B	Kanzaki	Hermansky-Pudlak (1-9)
	GM1 gangliosidosis		Chédiak-Higashi
	Sandhoff		Cystinosis
	GM2 activator deficiency		Salla
			Methylmalonic aciduria (CblF)
			Danon
			I-cell disease (mucopolidoses II and III)
			Mucopolidoses (IV)
			Multiple sulphatase deficiency
			Sphingolipid activator protein deficiencies (A-D)
			T2-family acidic endoribonuclease (RNASET2)
			SCARB2/LIMP-2 deficiency



# Sphingolipidose : Maladie de Fabry

- Déficit en alpha-galactosidase A
- Transmission liée à l' X mais les femmes peuvent être atteintes
- Accumulation progressive de glycosphingolipides neutres (**globotriaosylcéramide** ou Gb3 surtout) dans les lysosomes de différents types cellulaires: **cellules endothéliales** surtout, épithéliales, périthéliales, cellules musculaires lisses
- Maladie **multisystémique**
- Incidence: ~1/60.000 naissances
- Maladie **panethnique**

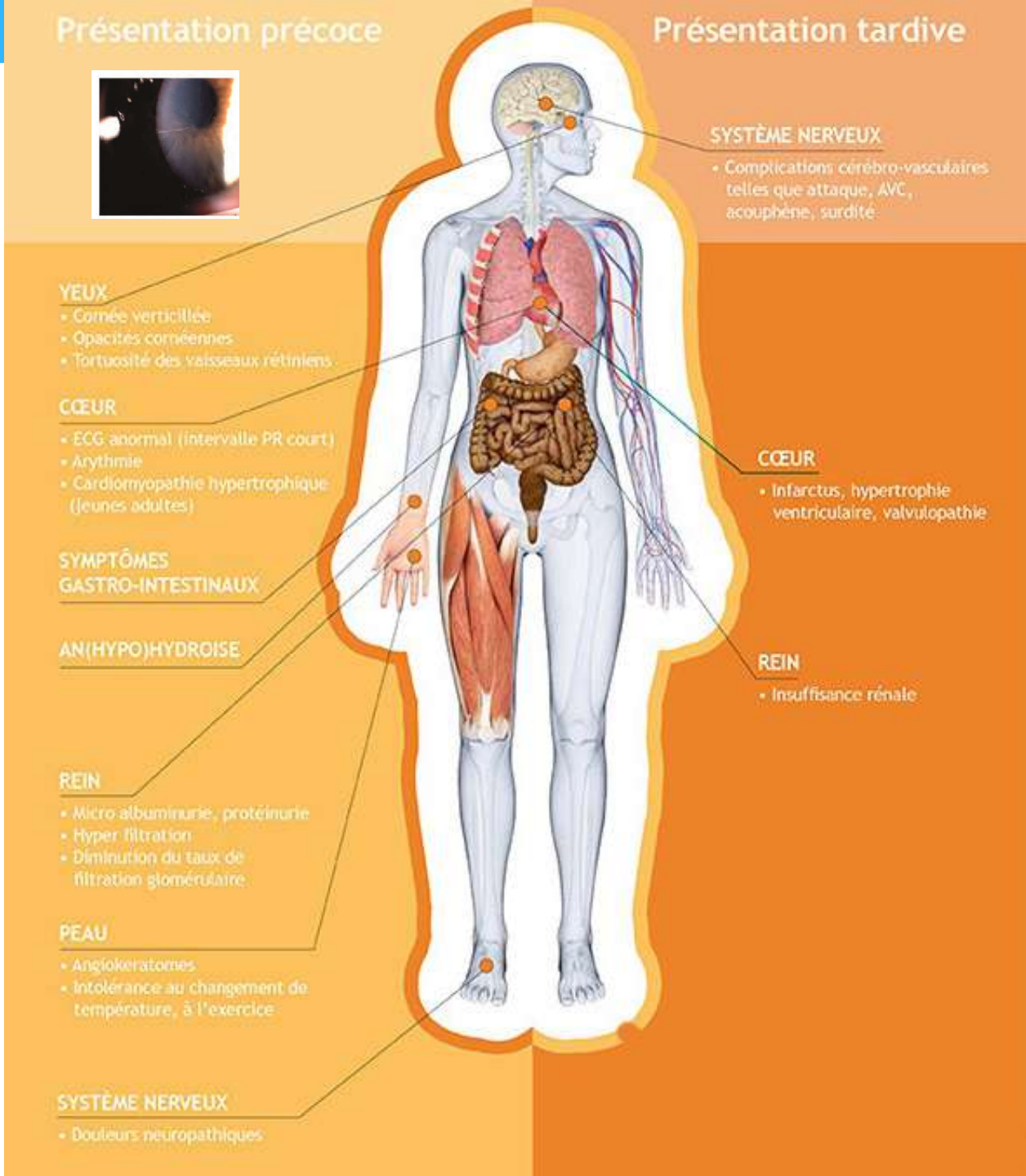


# Maladie de Fabry : présentation clinique

## Forme Classique

surcharge multiorgane, = manifestations algiques, dermatologiques, gastrointestinales, cochléaires **dès l'enfance**

puis de lésions viscérales, rénales, cardiaques, vasculaires et neurologiques dès l'âge adulte jeune entraînant **une morbi-mortalité élevée**



Formes variants ou later onset  
Variants cardiaques/ rénaux

= formes atténuées avec un tableau clinique incomplet

Atteinte des  
cellules  
**VASCULAIRES**

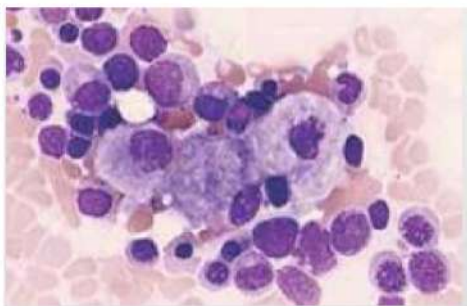


# Sphingolipidose : Maladie de Gaucher

- Déficit en Glucocérébrosidase
- **Transmission autosomique récessive**
- Accumulation progressive de glycosphingolipides neutres (**glucosylceramide**) dans les macrophages : cellules de GAUCHER
- Infiltration RATE FOIE OS POU MON
- Production de cytokines, élévation enzyme de conversion de l'angiotensine, de la ferritine, de la chitotriosidase
- Juifs ashkénazes +++
- Maladie **multisystémique**
- Incidence: ~1/60.000 naissances




Ernest Gaucher

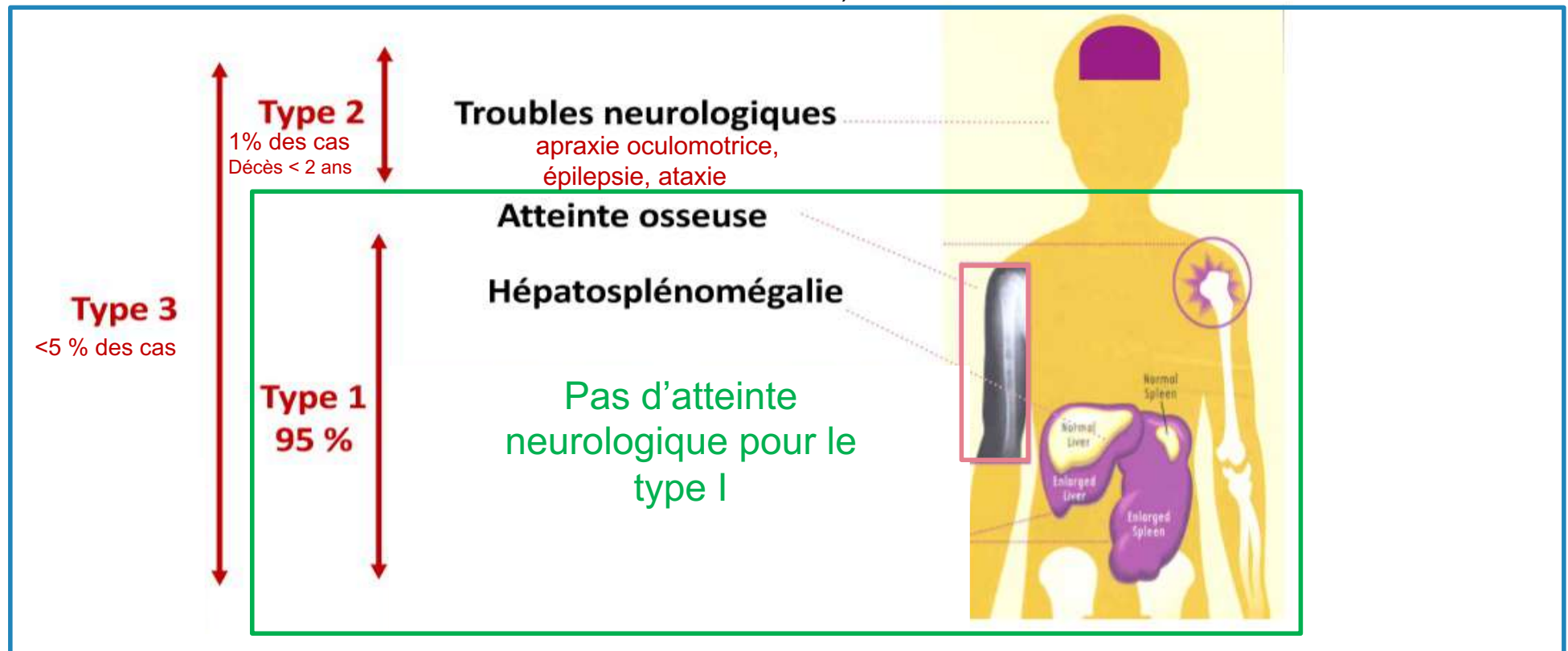


Diagnostic par mesure de l'activité Glucocérébrosidase  
(leucocytes, tache de sang)

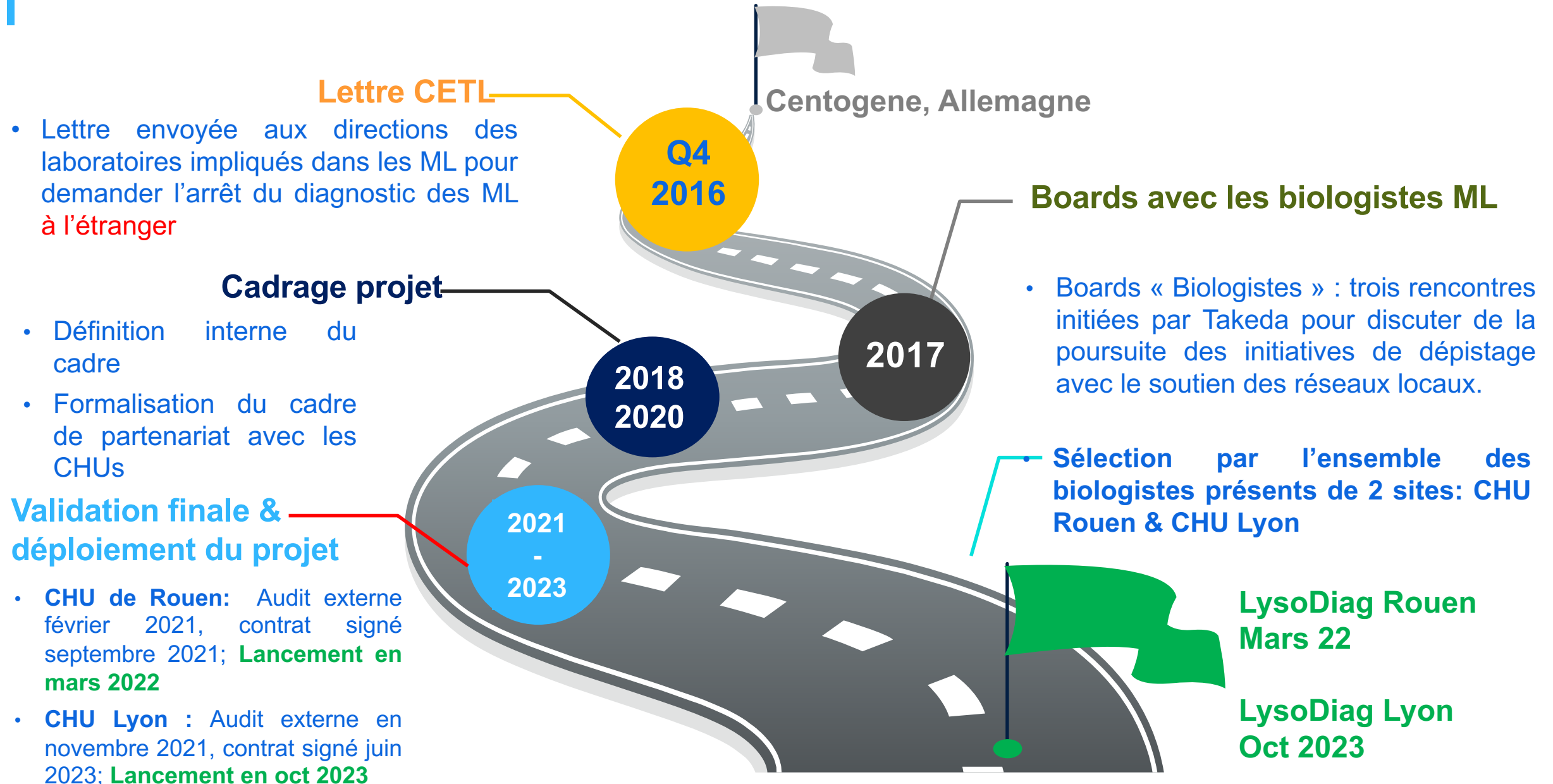
# Maladie de Gaucher : présentation clinique

Fœtus	Nouveau- né	Enfant	Adulte	Age de révélation
 <p>Anasarque, immobilisme foetal</p>	Cholestase néonatale, ictère, cytolyse, hépatosplénomégalie	Retard de croissance Hépatosplénomégalie Cytopénie(s)	(Hépto)splénomégalie Cytopénie(s) Atteintes osseuses (infarctus, ostéonécroses, fractures, diminution de la densité osseuse)	

En 2015, 502 patients vivants sont enregistrés dans le registre français : 444 adultes et 58 enfants.

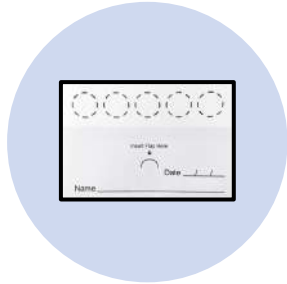


# Le projet de kits DBS français, le fruit de 6 ans de travail collaboratif



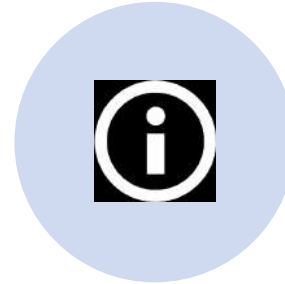
# En quoi consiste le kit LysoDIAG?

1



**Buvar**

2



**Information  
Consentement**

3



**Mode d'emploi**

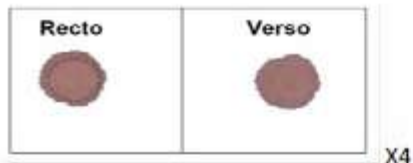
4



**Enveloppe LysoDiag**



## Sang sur papier buvard : étape préanalytique critique !



2-4 taches traversantes  
Séchage 3h à température ambiante



Stabilité : délai  
d'acheminement  
< 7 jours à température  
ambiante



Cytopénies : risque de  
valeurs enzymatiques  
abaissées (jusqu'à 20%  
des cas Gaucher)

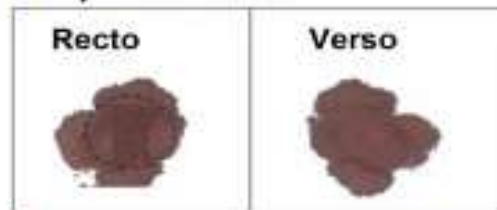


### 1. Prélèvement suffisant au recto mais insuffisant au verso



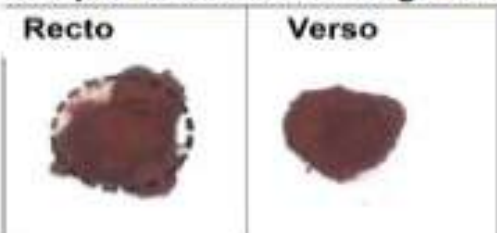
Vérifier le verso

### 2. Dépôts successifs



Éviter les dépôts successifs  
Éviter les applications multiples

### 3. Papier buvard endommagé au centre du cercle



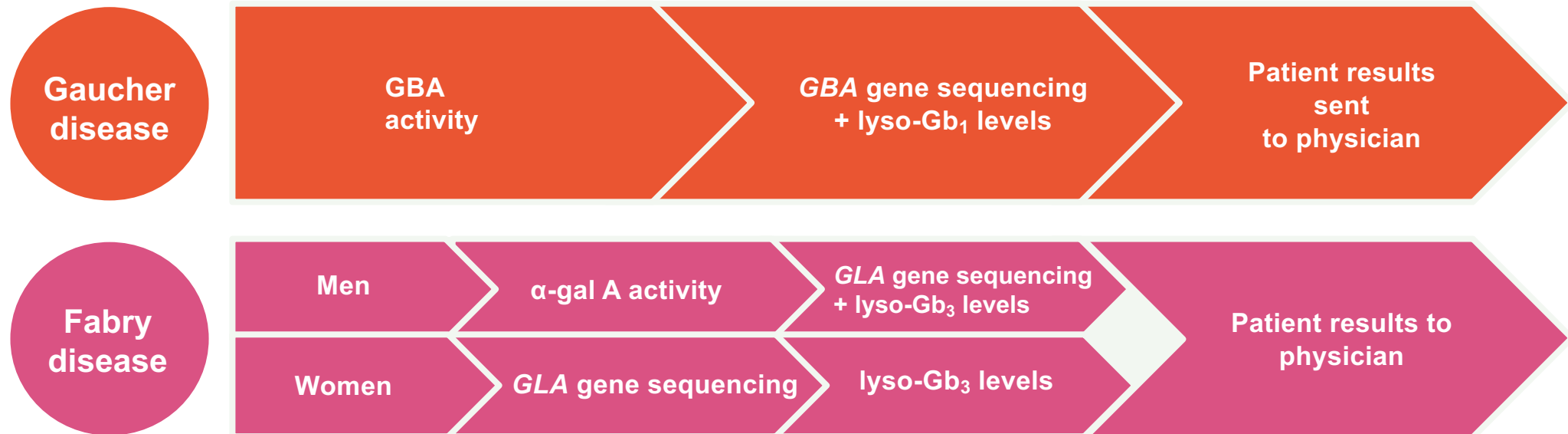
Ne pas toucher le papier buvard avec  
la pipette ou la seringue.  
Ne pas sécher près d'une source de  
chaleur

### 4. Taches humides et ou décolorées



Éviter tout contact avec une solution  
antiseptique, talc des gants, eau ...  
avant et après dépôts sur papier  
buvard

# Algorithmes de la plateforme lysodiag : Diagnostic des maladies de Fabry et Gaucher



**Etablissement signataire d'une convention  
donation Takeda**

**Formulaire demande kit DBS**

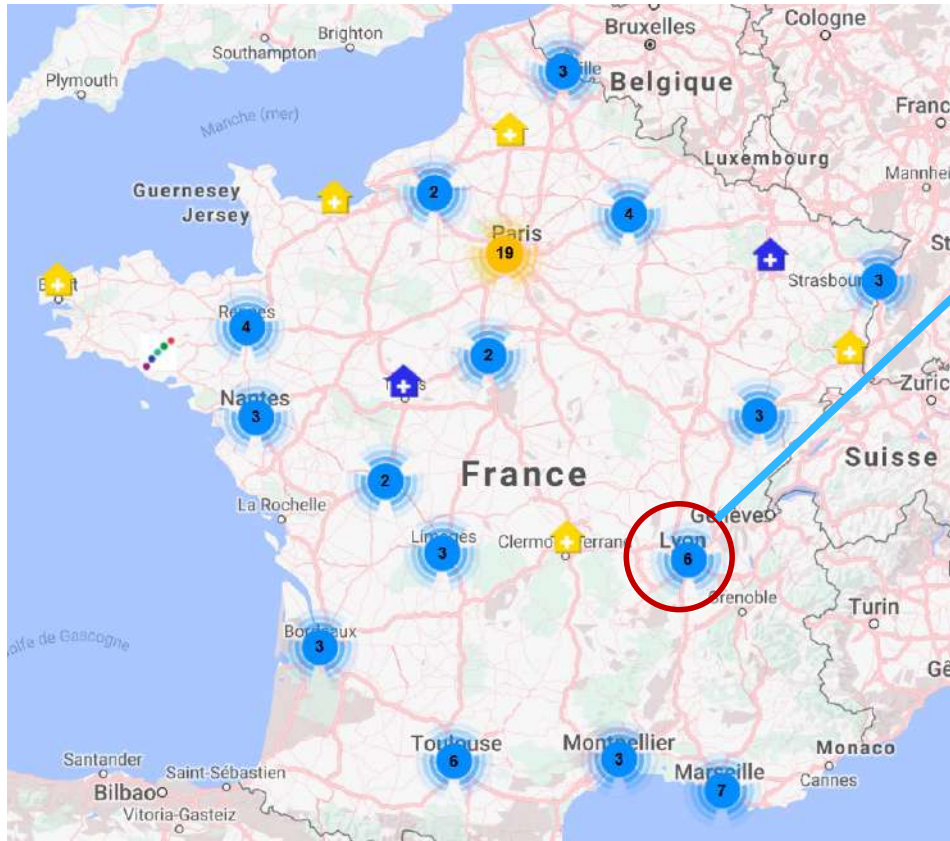
**Envoi des échantillons sur DBS (Lyon ou Rouen)**

**Rendus des résultats (1 seul échantillon DBS)**

**Enzymes / biomarqueurs : 3-4 semaines**

**Génotypage: 2-3 mois**

# Présentation du laboratoire des maladies métaboliques du CHU de Lyon



Hospices Civils de  
Lyon  
**LBMMS**  
Service de biochimie  
et biologie moléculaire



## UF Maladies Héréditaires du Métabolisme (MHM)



**Diagnostic et suivi** de plus de 500 Maladies  
Héréditaires du Métabolisme



**Recrutement national**  
70-80% des échantillons hors HCL



**Accréditation NF EN ISO 15189:2012**



**Laboratoire de Biologie médicale de  
Référence (LBMR)**



**Agrément pour le prénatal**



**Centre constitutif des MHM**  
CERLYMM – Dr Guffon Dr Fouilhoux

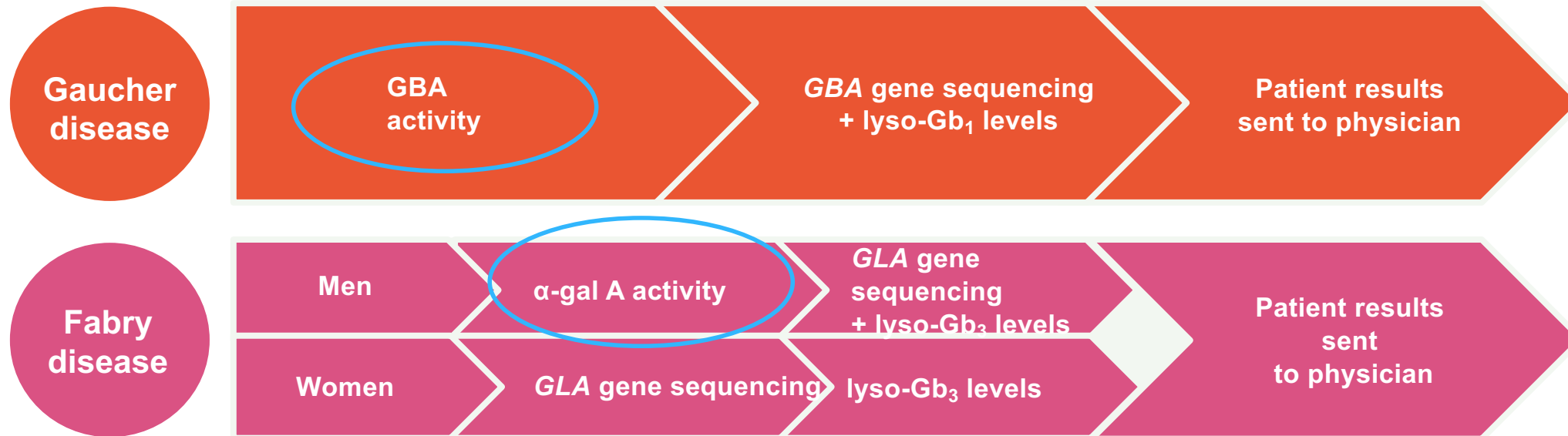


**Maladies rares  
Héréditaires  
du Métabolisme**

Filière nationale de santé

## 1- Mesures d'activités enzymatiques en multiplex sur tache de sang par MSMS

- **Diagnostic**
  - Gaucher
  - Fabry hommes(Fabry femmes : 30-40% faux négatifs)



# Mesures d'activités enzymatiques sur tache de sang (DBS)

Kit NeoLSD™ MSMS, Perkin-Elmer

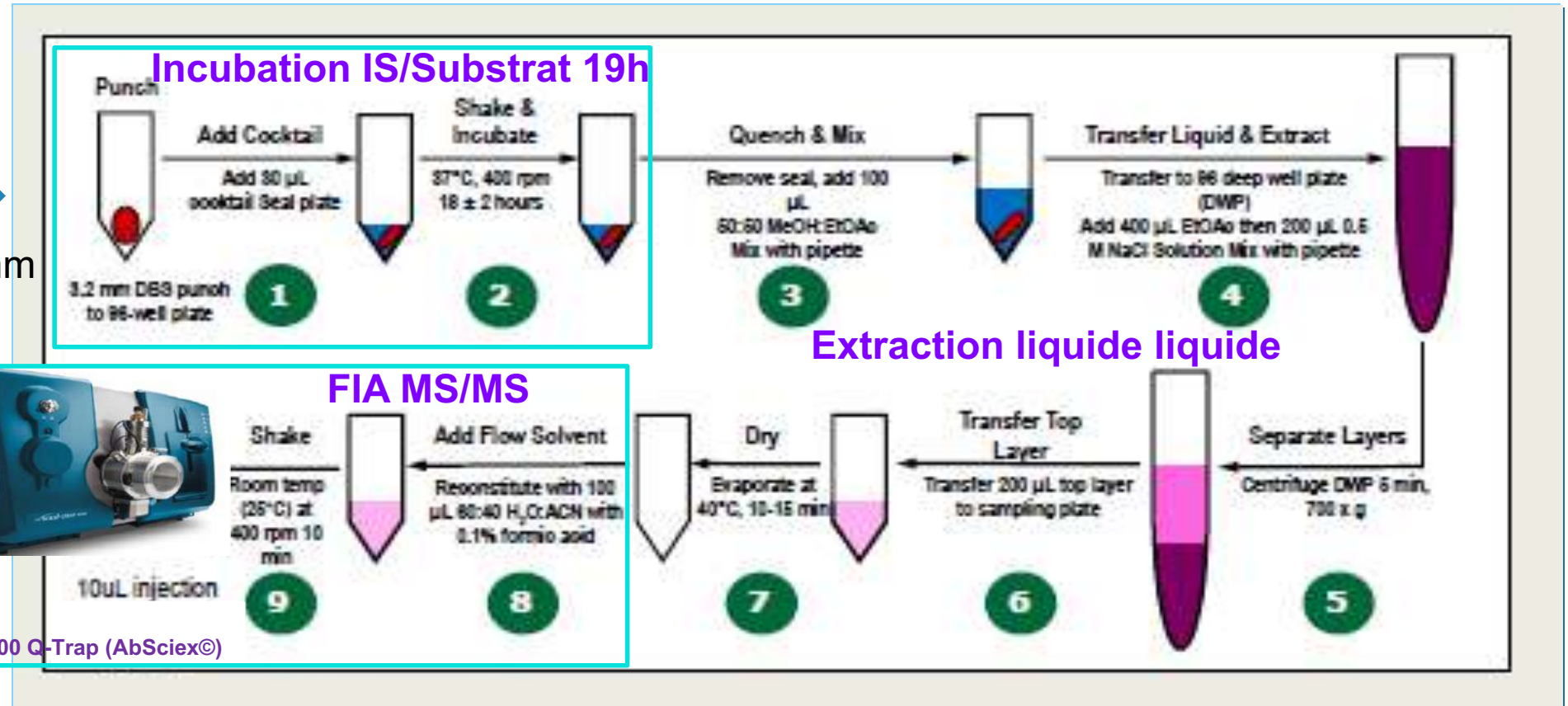
MULTIPLEX  
Fabry, Gaucher, Niemann-Pick  
A/B, MPS I, Pompe, Krabbe



Dried blood spot



3,2 mm



Analyse des données

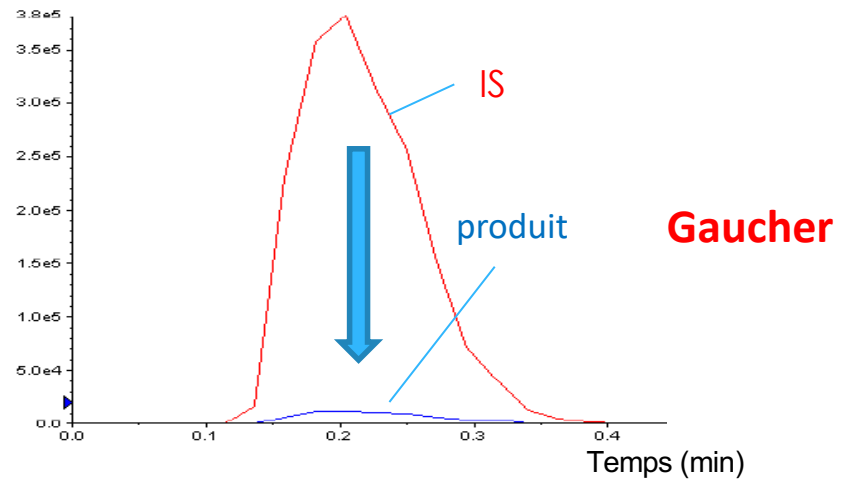
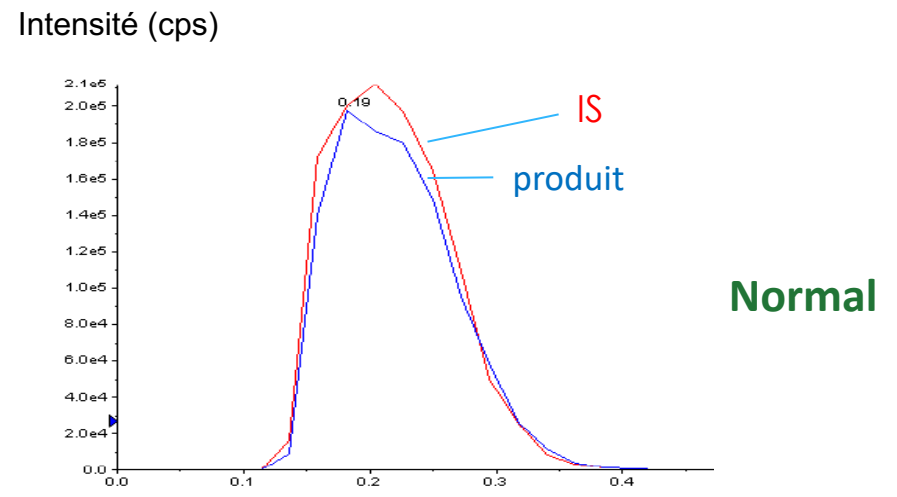
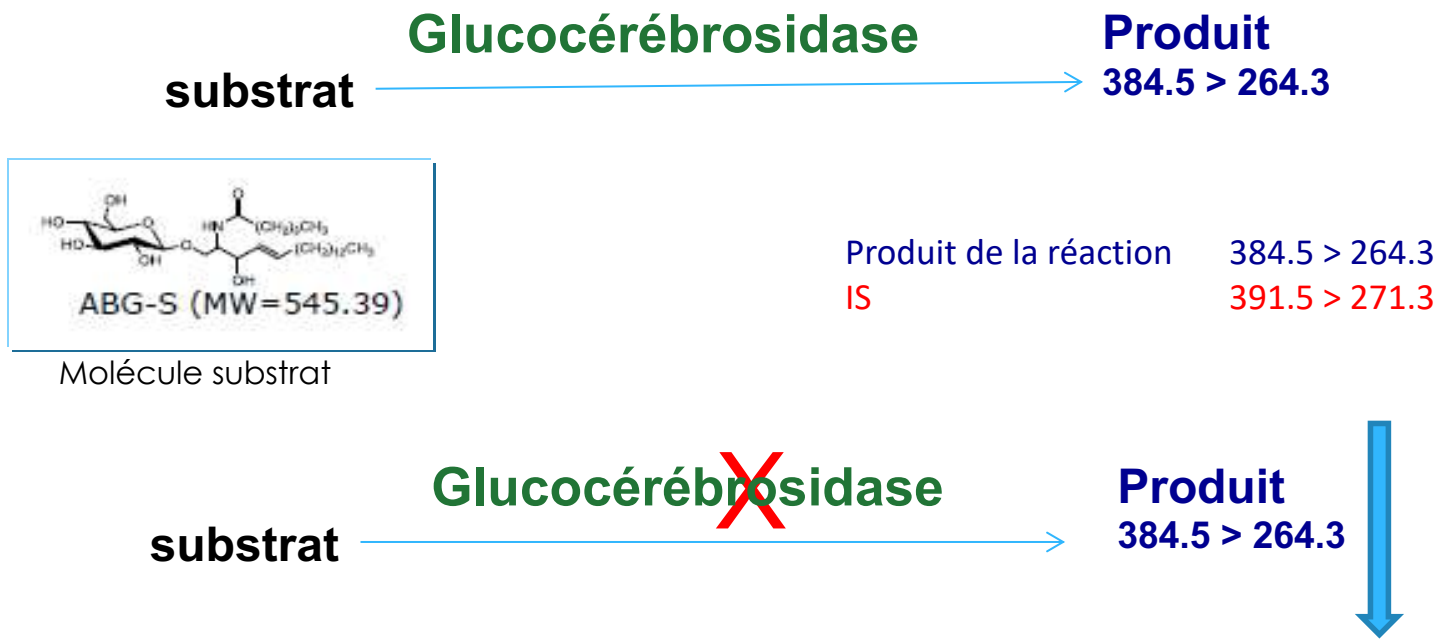
Produit formé  
µmol/L/h

API 4500 Q-Trap (AbSciex©)

Elliot et al Mol Genet Metab 2016

# Mesures d'activités enzymatiques sur tache de sang (DBS)

## Exemple de résultat MSMS : maladie de Gaucher

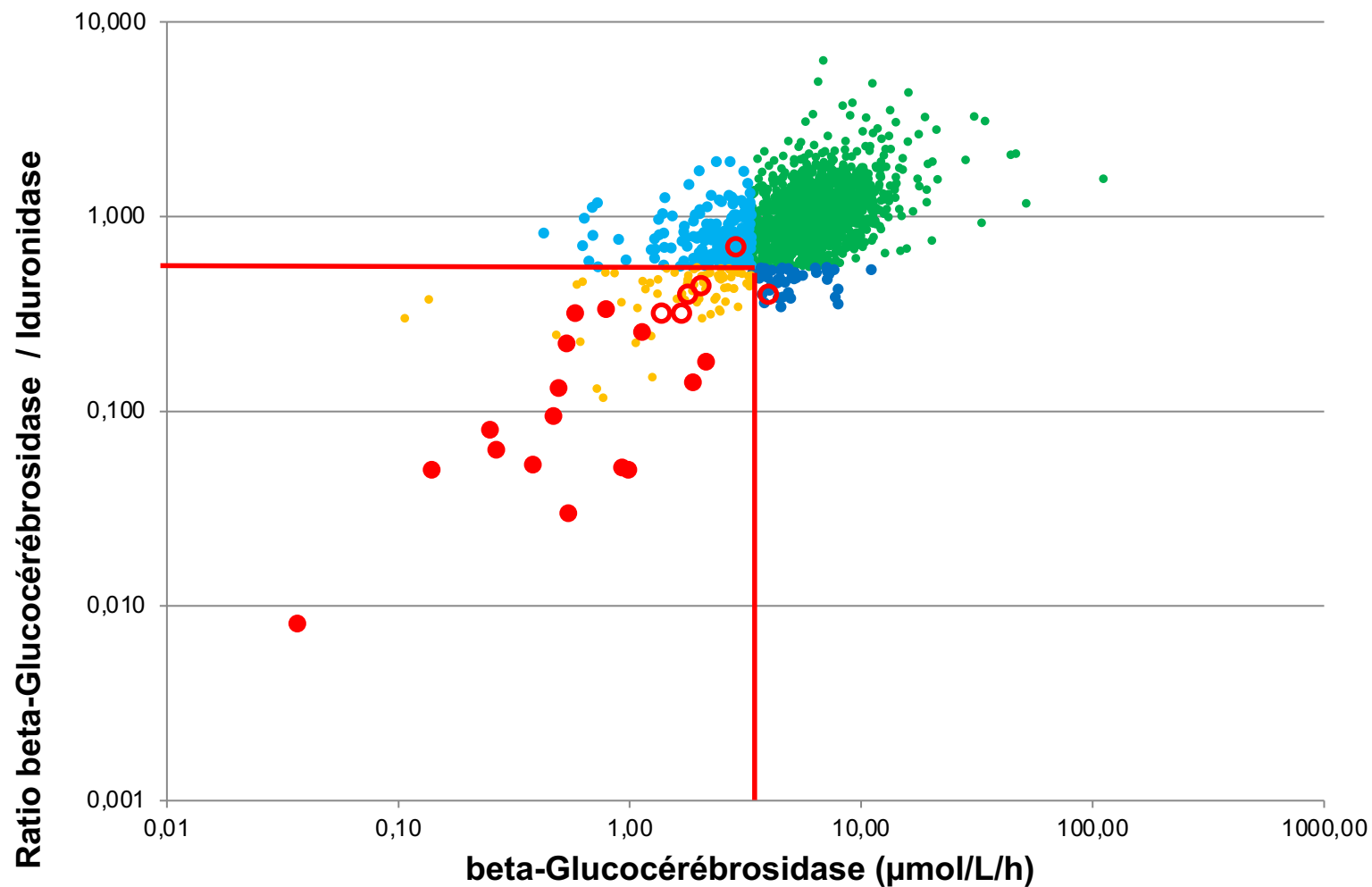


Courbes obtenues par MS/MS  
FIA mode MRM



## Exemple de Résultats : maladie de Gaucher

### beta-Glucocérébrosidase



● Témoins

● Activité diminuée, ratio normal  
(leucopénie ? Qualité de l'échantillon ? Hémodilution ?)

● Activité témoin haute  
responsable d'un ratio bas  
avec activité normale

● A investiguer / contrôler  
Hétérozygotes ? Malades ?  
Leucopénie ?

● Malades

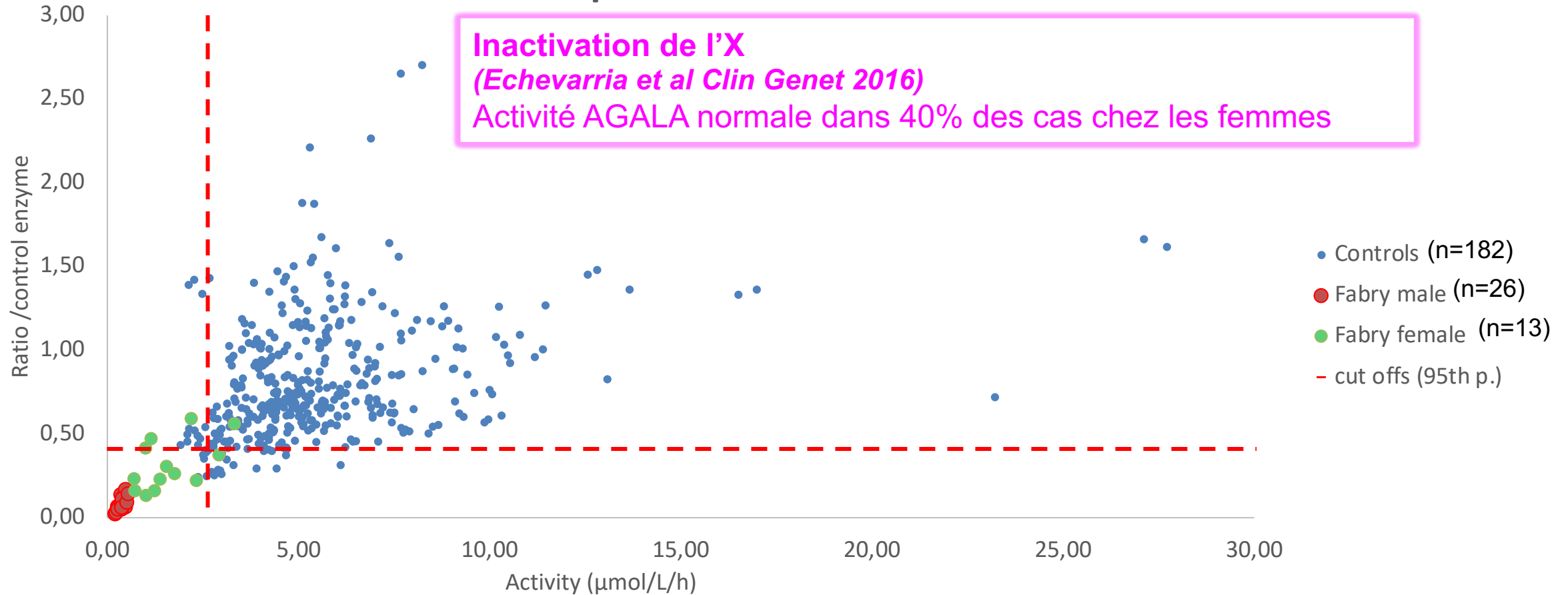
○ Hétérozygotes





## Exemple de Résultats : maladie de Fabry

### Alpha-Galactosidase A

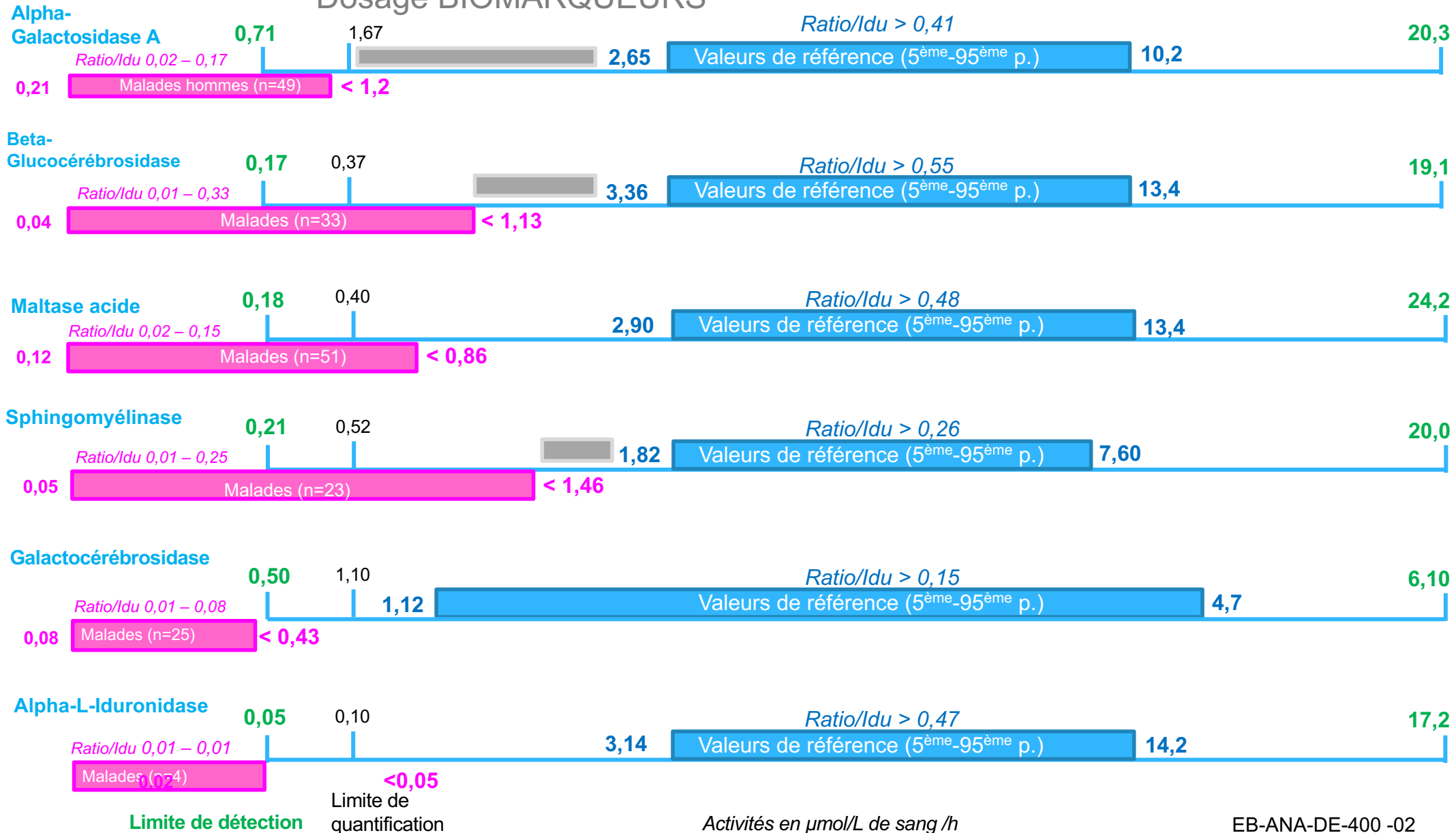


# Domaine de mesure et valeurs de référence - Kit Perkin Elmer Néo-LSD

## ZONE GRISE

### Dosage BIOMARQUEURS

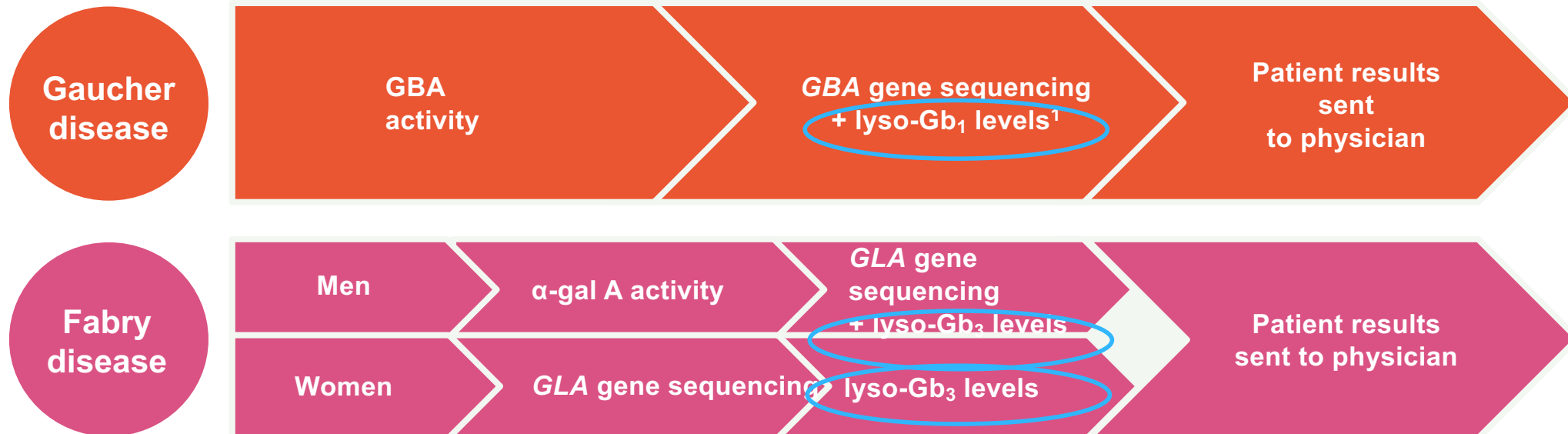
Limite supérieure de linéarité

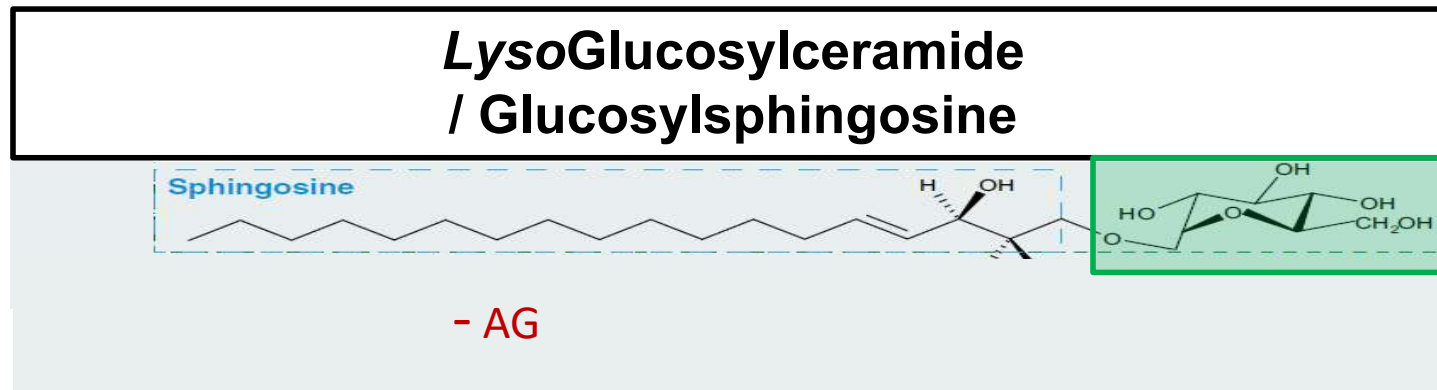
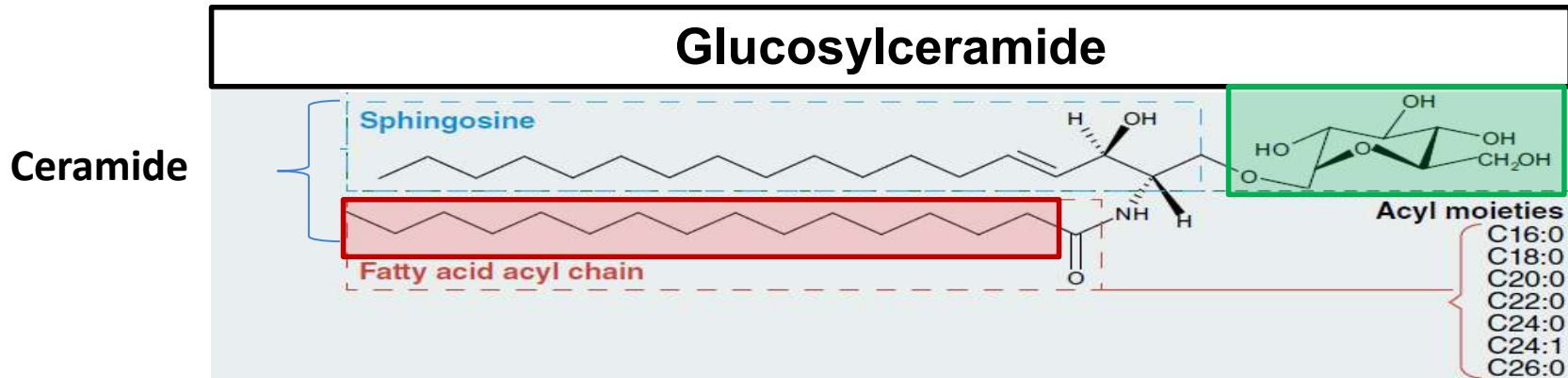


## 2- Dosage de biomarqueurs

### *Lysosphingolipides sur taches de sang par MSMS*

- **Fabry / Gaucher : confirmation et aide au diagnostic**  
**En confirmation si activité déficitaire**  
*En cas de doute* : activité enzymatique diminuée non déficitaire
- **Femme Fabry en complément de l'analyse moléculaire**





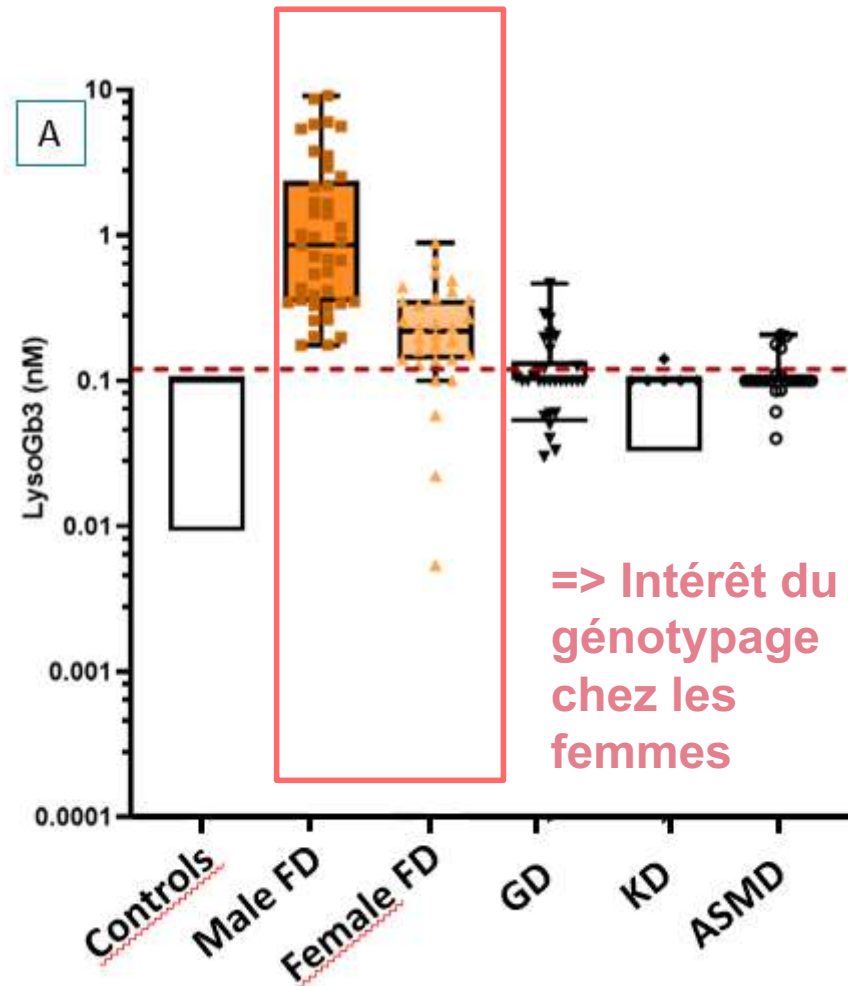
- LysoSphingolipide (LysoSL) = forme déacylée du sphingolipide
- Biomarqueur des sphingolipidoses (screening, suivi thérapeutique)
- Impliqué dans la physiopathologie de la maladie

# Biomarqueurs dans les DBS

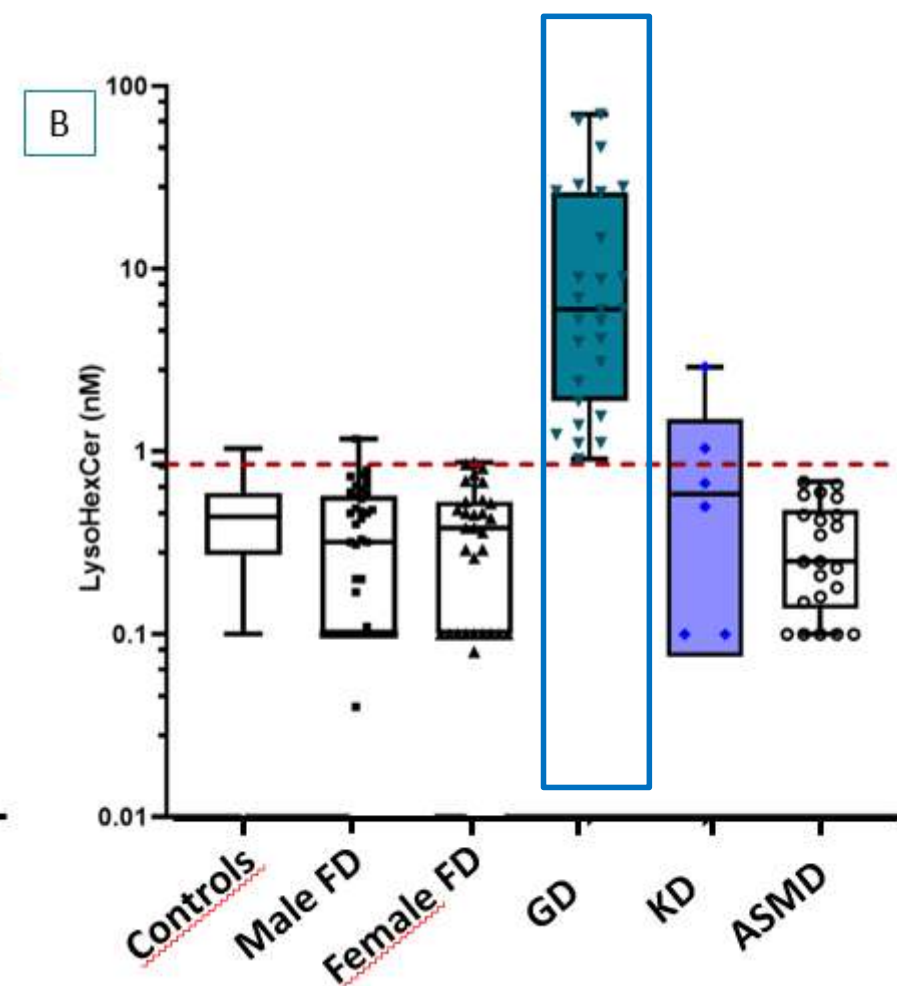
## POPULATION ETUDIEE

Hommes Fabry	n=41
Femmes Fabry	n=30
Gaucher	n=30
Témoins	n=265

### LysoGb3 : maladie de Fabry



### LysoHexCer : Maladie de Gaucher



## 3- Analyse moléculaire sur papier buvard par séquençage haut débit (NGS)

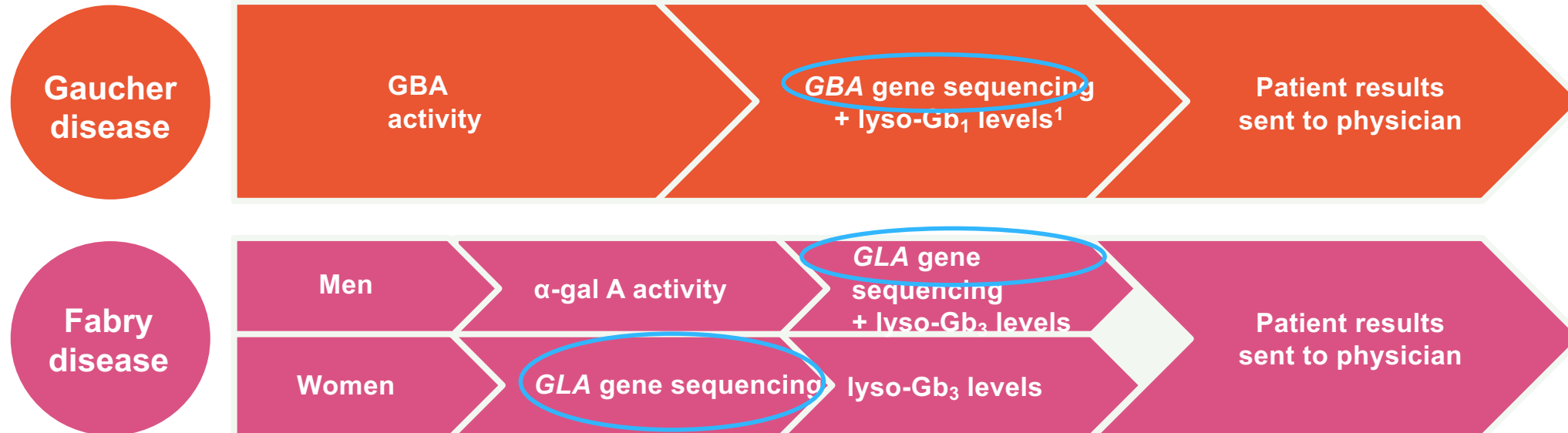
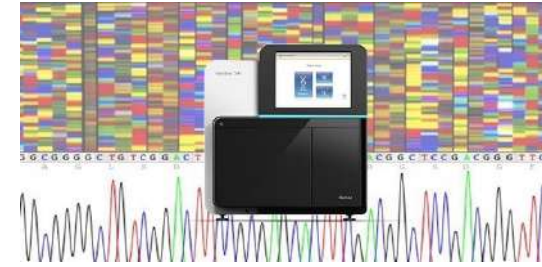
### Diagnostic

- Femme Fabry

### Confirmation du diagnostic

- Gaucher

- Fabry homme



# Analyse moléculaire par séquençage haut débit

## Difficultés de la classification des variants : classification ACMG\*

27 critères  
8 catégories

- Pathogenic variant
- Likely pathogenic variant
- Variant of uncertain significance (VUS)
- Likely benign variant
- Benign variant polymorphisme

ACMG/AMP guidelines <sup>1</sup>	Points <sup>2</sup>	Posterior probability <sup>3</sup>	VUS temperature scale <sup>4</sup>
Pathogenic	≥10	99%	
Likely pathogenic	6-9	90%	
Uncertain significance	1 strong + 1 supporting OR 2 moderate + 1 supporting OR 1 moderate + 3 supporting	5	Hot
	1 strong OR 2 moderate OR 1 moderate + 2 supporting OR 4 supporting	4	81.2% Warm
	1 moderate + 1 supporting OR 3 supporting	3	67.5% Tepid
	1 moderate OR 2 supporting	2	50% Cool
	1 supporting	1	32.5% Cold
		0	18.8% Ice cold
		-1 to -6	10%
Likely benign			
Benign	<-6	0.1%	

Algorithme de classement

Score de pathogénicité

Likely = > 90% probabilité

Sian Ellard et al 2020, ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification in Rare Disease

\*ACMG : American College of Medical Genetics

# Difficultés de la classification des variants

## Exemple de la maladie de Fabry

\* 300644

GALACTOSIDASE, ALPHA; GLA

Alternative titles; symbols

ALPHA-GALACTOSIDASE A; GALA **7 exons**

HGNC Approved Gene Symbol: GLA

Cytogenetic location: Xq22.1 Genomic coordinates (GRCh38): X:101,397,803-101,407,925 (from NCBI)

### Gene-Phenotype Relationships

Location	Phenotype <small>Clinical Synopses</small>	Phenotype MIM number	Inheritance	Phenotype mapping key
Xq22.1	Fabry disease	301500	XL	3
	Fabry disease, cardiac variant	301500	XL	3

PheneGene Graphics

### TEXT

#### ▼ Description

The GLA gene encodes alpha-galactosidase (GLA; EC 3.2.1.22), a lysosomal hydrolase.

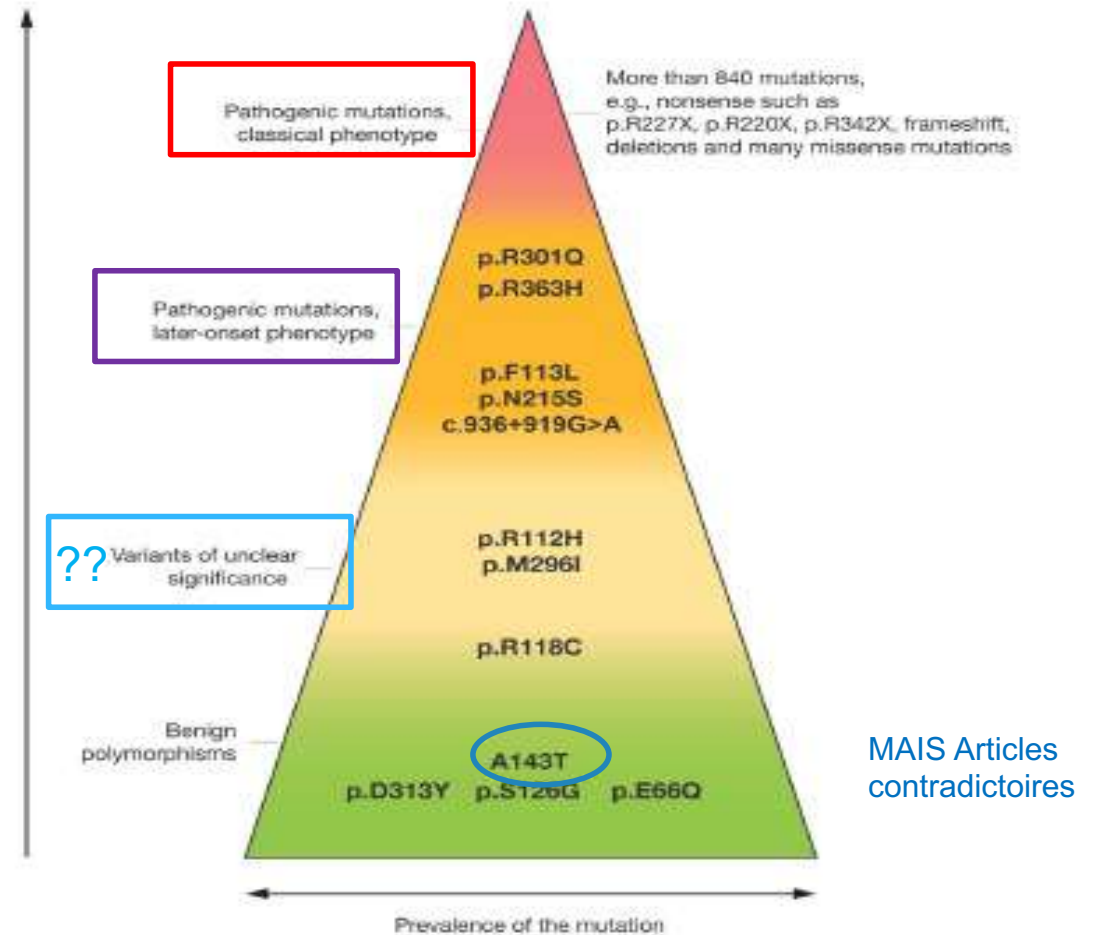
Plus de 1 000 variants du gène *GLA* ont été rapportés, la plupart pathogènes mais certains bénins ou encore de signification incertaine (VUS : Variants of Uncertain Significance).

Le variant définit la forme clinique (classique / later onset).

Minireview

Fabry disease revisited: Management and treatment recommendations for adult patients

Alberto Ortiz<sup>a,\*</sup>, Dominique P. Germain<sup>b</sup>, Robert J. Desnick<sup>c</sup>, Juan Politei<sup>d</sup>, Michael Mauer<sup>e</sup>, Alessandro Burlina<sup>f</sup>, Christine Eng<sup>g</sup>, Robert J. Hopkin<sup>h</sup>, Dawn Laney<sup>i</sup>, Aleš Linhart<sup>j</sup>, Stephen Waldek<sup>k</sup>, Eric Wallace<sup>l</sup>, Frank Weidemann<sup>m</sup>, William R. Wilcox<sup>l</sup>





# Difficultés de la classification des variants

**TABLE 3** Characteristics of common controversial GLA variants according to genetic databases and in silico prediction softwares

	c.427G>A; p.(Ala143Thr) / p.(A143T) / Thr143	c.937G>T; p.(Asp313Tyr) / p.(D313Y) / Tyr313	c.196G>C; p.(Glu66Gln) / p.(E66Q) / Gln66	c.352C>T; p.(Arg118Cys) / p.(R118C) / Cys118	c.376A>G; p.(Ser126Gly) / p.(S126G) / Gly126
<b>GnomAD v2.1.1</b>					
AF (%) in exomes, genomes (total)	0.055, 0.018 (0.051)	0.30, 0.31 (0.30)	0.012, 0.0045 (0.011)	0.022, 0.032 (0.023)	0.033, 0.063 (0.036)
Highest AF (%) by population	0.095 in European (non-Finnish)	0.69 in Ashkenazi Jewish 0.45 in European (non-Finnish)	0.15 in East Asian	0.044 in European (non-Finnish)	0.074 in European (non-Finnish)
<b>Pathogenicity according to FD-specific databases</b>					
dbFGP	Benign	Benign	Benign	Benign	Likely benign
The Japanese Fabry Database	LO [5]; classic [4]; B [3]; VUS [1]; np [8]	Classic [5]; B [2]; LO [1]; np [9]	B [5]; classic [5]; LO [3]; np [3]	LO [2]; np [5]	LO [1]; np [6]
<b>Pathogenicity according to general databases</b>					
ClinVar	VUS [10]; LP [4]; P [2]	LB [13]; VUS [3]; B [2]	VUS [4]; LB [2]	VUS [12]; LP [2]; LB [1]	LB [6]; VUS [4]; B [1]
LOVD	LB [2]; VUS [1]	LB [3]; B [2]; VUS [1]	np	VUS [3]; P [1]	2 LB [2]; VUS [1]
OMIM	FD	VUS (recently reclassified)	Functional polymorphism and not disease causing	not provided	not provided
ACMG classification according to VarSome (date of query)	LP (2019-12-05) VUS because highest ethnic frequency = 0.10% (2020/01/20) P because a user has reported this variant is classified LP in one article (Spada et al. <sup>5</sup> ) and that is confirmed by a functional study (2020-08-03)	VUS (2019-12-05) B because highest ethnic frequency = 0.69% (2020-01-20) LP because alternative variant (Asp313Asn) is classified P by UniProt Variants (and confirmed using ACMG) (2020-08-04)	VUS (2019-12-05) B because highest ethnic frequency = 0.15% (2020-01-20) LP because highest ethnic frequency no longer takes into account again (2020-08-04)	LB (2019-12-05) B (2020-01-20) LB (2020-08-04)	VUS (2019-12-05) B because highest ethnic frequency = 0.074% (2020-01-20) VUS because highest ethnic frequency no longer taken into account (2020-08-04)
Polyphen-2	Probably damaging (1)	Probably damaging (0.996)	Probably damaging (0.996)	Probably damaging (0.993)	Benign (0.043)
Provean	Deleterious (-3.119)	Deleterious (-3.183)	Deleterious (-2.754)	Deleterious (-4.667)	Deleterious (-2.823)
SIFT	Damaging (0.004)	Damaging (0.001)	Damaging (0.002)	Damaging (0.001)	Tolerated (0.060)
Mutation taster	Disease causing	Polymorphism	Disease causing	Polymorphism	Disease causing

Note: Last accessed 2020-08-04. [ ]: The number of times referenced.

Abbreviations: AF, allele frequency; B, benign; dbFGP, International Fabry Disease Genotype-Phenotype Database; FD, Fabry disease; gnomAD, Genome Aggregation Database; LB, likely benign; LOVD, Leiden Open (source) Variation Database; LP, likely pathogenic; np, not provided; P, pathogenic; VUS, variant of unknown significance.

ET AL.

MINIMAL GENETICS - WILEY-

# Cas clinique : Lou... 12 ans

- Hépatosplénomégalie => Envoi kit DBS lysodiag

- ACTIVITE ENZYMATIQUE

**Glucocérébrosidase**                      **0,32  $\mu\text{mol/L/h}$**     (N: 3,36-13,40)

**Enzyme témoin Idu**                      **3,80  $\mu\text{mol/L/h}$**     (N: 3,14-14,20)

**Ratio Gluco/Idu**                              **0,08**                      (N>0,55)

- BIOMARQUEUR :

**LysoHexCer :**                              **> 17,4 nmol/L**    (N <0,84)

**Résultats en faveur d'une maladie de Gaucher par déficit en Glucocérébrosidase**

- GENOTYPAGE gène *GBA* : *en cours*

# Avantages des techniques sur papier buvard

## Avant

1- ENZYME



*Faux négatif femmes Fabry*  
30-40% cas

## Second prélèvement

2- biomarqueur + contrôle enzyme +/- bio mol



## LysoDIAG

1- ENZYME



2- biomarqueur + bio mol



ou BIO MOL  
+ biomarqueur femme Fabry



- Gain de temps pour le diagnostic
- Combinaison de tests pour un diagnostic fiable
- Cout moindre

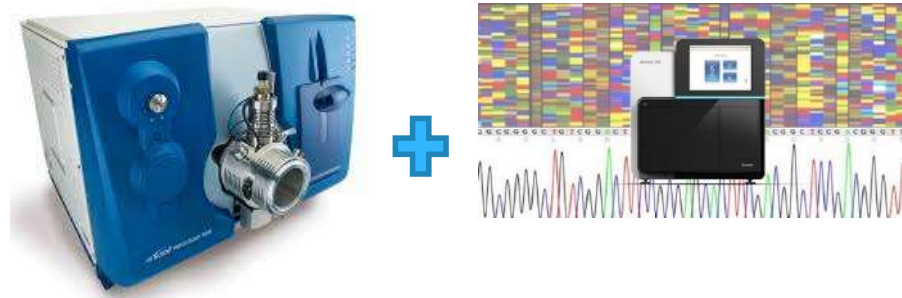
# Avantages des techniques sur papier buvard

## Taille échantillon réduite



- Facilité de recueil
- Facilité d'envoi
- Stabilité
- Épargne sanguine

## 1 seul buvard pour analyse biochimique ET génotypique



### Etudes en multiplex : MS/MS, NGS

Diagnostic différentiel; Plusieurs patients et plusieurs pathologies traitées en parallèle

**Puissance des techniques NGS** : approche multiple (x gènes, x patients simultanément) ≠ Sanger : approche gène/gène patient/patient.

## Haut débit



- Catalogue des examens du CHU de Lyon

<http://biobook.chu-lyon.fr/Home>

- Liste des laboratoires :

- Orphanet <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>

- LBMR [JORF n°0167 du 21 juillet 2021](#)

- CETL comité d'évaluation des traitements des maladies lysosomales <https://www.cetl.net/>

- PNDS <https://www.has-sante.fr/>



magali.pettazzoni@chu-lyon.fr

Unité des Pathologies Héritaires du Métabolisme et du Globule  
Rouge  
Centre de Biologie et de Pathologie Est  
*Hospices Civils de Lyon*

**Roseline Froissart**

**Cécile Acquaviva**  
**David Cheillan**  
**David Paul De Brauwere**  
**Cécile Pagan**  
**Fanny Zhao**

**Séverine Ruet**  
**Sophie Vasseur**