

centre de compétences



maladies rares

Maladies de surcharge Lysosomale

Approche clinico-biologique

Samir Mesli

Isabelle.Redonnet-Vernhet

Laboratoire de Biochimie, CHU de Bordeaux



LES MALADIES LYSOSOMALES

LIPIDOSES

- Maladie d'Austin
- Maladie de Fabry
- Maladie de Farber
- Maladie de Gaucher
- Maladie de Landing (GM1)
- Maladie de Tay-Sachs et Sandhoff (GM2)
- Maladie de Krabbe
- Leucodystrophie métachromatique
- Maladies de Niemann-Pick type A/B
- Maladie de Niemann-Pick C
- Maladie de Wolman

CEROIDE-LIPOFUSCHINOSES

DEFICIT TRANSPORTEURS

- Cystinose
- Maladie de Danon
- Maladie de Salla

GLYCOGENOSE

- Maladie de Pompe (Glycogénose type 2)

MUCOPOLYSACCHARIDOSES

- Maladie de Hurler/Scheie (MPS IH/S)
- Maladie de Hunter (MPS II)
- Maladie de Sanfilippo (MPS III A, B, C, D)
- Maladie de Morquio A (MPS IVA)
- Maladie de Maroteaux-Lamy (MPS VI)
- Maladie de Sly (MPS VII)
- Mucopolysaccharidose de type IX

GLYCOPROTEINOSES

- Aspartylglucosaminurie
- Fucosidose
- a mannosidose
- b mannosidose
- Sialidose et galactosialidose
- Maladie de Schindler et Kanzaki
- Mucopolipidoses type II et III
- Mucopolipidose de type IV



Les Mucopolysaccharidoses

7 types, 11 déficits enzymatiques

Tableau I.
Les MPS : enzymes déficientes, métabolites accumulés et gènes impliqués.

MPS	Nom courant	Enzyme déficiente	Glycosaminoglycane(s) accumulé(s)	Nom du gène	Localisation du gène
MPS I	Hurler/Scheie	α -L-iduronidase	Dermatane sulfate Héparane sulfate	<i>IDUA</i>	4p16.3
MPS II	Hunter	Iduronate-2-sulfatase	Dermatane sulfate Héparane sulfate	<i>IDS</i>	Xq28
MPS III A	Sanfilippo A	Héparane N-sulfatase	} Héparane sulfate	<i>SGSH</i>	17q25.3
MPS III B	Sanfilippo B	α -N-acétylglucosaminidase		<i>NAGLU</i>	17q21
MPS III C	Sanfilippo C	Acétyl-CoA: α -glucosaminide-N-acétyltransférase		<i>HGSNAT</i>	8p11.1
MPS III D	Sanfilippo D	N-acétylglucosamine-6-sulfatase		<i>GNS</i>	12q14
MPS IV A	Morquio A	Galactose-6-sulfatase	Kératane sulfate Chondroïtine sulfate	<i>GALNS</i>	16q24.3
MPS IV B	Morquio B	β -galactosidase	Kératane sulfate	<i>GLB1</i>	3p21-33
MPS VI	Maroteaux-Lamy	Arylsulfatase B (N-acétylgalactosamine 4-sulfatase)	Dermatane sulfate Chondroïtine sulfate	<i>ARSB</i>	5q11-q13
MPS VII	Sly	β -glucuronidase	Dermatane sulfate Héparane sulfate Chondroïtine sulfate	<i>GUS</i>	7q21.11
MPS IX		Hyaluronidase	Acide hyaluronique	<i>HYAL1</i>	3p21.3-p21.2



Les Mucopolysaccharidoses

7 types, 11 déficits enzymatiques

Tableau I.

Les MPS : enzymes déficientes, métabolites accumulés et gènes impliqués.

+++

MPS	Nom courant	Enzyme déficiente	Glycosaminoglycane(s) accumulé(s)	Nom du gène	Localisation du gène
MPS I	Hurler/Scheie	α -L-iduronidase	Dermatane sulfate Héparane sulfate	<i>IDUA</i>	4p16.3
MPS II	Hunter	Iduronate-2-sulfatase	Dermatane sulfate Héparane sulfate	<i>IDS</i>	Xq28
MPS III A	Sanfilippo A	Héparane N-sulfatase	} Héparane sulfate	<i>SGSH</i>	17q25.3
MPS III B	Sanfilippo B	α -N-acétylglucosaminidase		<i>NAGLU</i>	17q21
MPS III C	Sanfilippo C	Acétyl-CoA: α -glucosaminide-N-acétyltransférase		<i>HGSNAT</i>	8p11.1
MPS III D	Sanfilippo D	N-acétylglucosamine-6-sulfatase		<i>GNS</i>	12q14
MPS IV A	Morquio A	Galactose-6-sulfatase	Kératane sulfate Chondroïtine sulfate	<i>GALNS</i>	16q24.3
MPS IV B	Morquio B	β -galactosidase	Kératane sulfate	<i>GLB1</i>	3p21-33
MPS VI	Maroteaux-Lamy	Arylsulfatase B (N-acétylgalactosamine 4-sulfatase)	Dermatane sulfate Chondroïtine sulfate	<i>ARSB</i>	5q11-q13
MPS VII	Sly	β -glucuronidase	Dermatane sulfate Héparane sulfate Chondroïtine sulfate	<i>GUS</i>	7q21.11
MPS IX		Hyaluronidase	Acide hyaluronique	<i>HYAL1</i>	3p21.3-p21.2



Les Mucopolysaccharidoses

7 types, 11 déficits enzymatiques

Tableau I.

Les MPS : enzymes déficientes, métabolites accumulés et gènes impliqués.

+++

MPS	Nom courant	Enzyme déficiente	Glycosaminoglycane(s) accumulé(s)	Nom du gène	Localisation du gène
MPS I	Hurler/Scheie	α -L-iduronidase	Dermatane sulfate Héparane sulfate	<i>IDUA</i>	4p16.3
MPS II	Hunter	Iduronate-2-sulfatase	Dermatane sulfate Héparane sulfate	<i>IDS</i>	Xq28
MPS III A	Sanfilippo A	Héparane N-sulfatase	} Héparane sulfate	<i>SGSH</i>	17q25.3
MPS III B	Sanfilippo B	α -N-acétylglucosaminidase		<i>NAGLU</i>	17q21
MPS III C	Sanfilippo C	Acétyl-CoA: α -glucosaminide-N-acétyltransférase		<i>HGSNAT</i>	8p11.1
MPS III D	Sanfilippo D	N-acétylglucosamine-6-sulfatase		<i>GNS</i>	12q14
MPS IV A	Morquio A	Galactose-6-sulfatase	Kératane sulfate Chondroïtine sulfate	<i>GALNS</i>	16q24.3
MPS IV B	Morquio B	β -galactosidase	Kératane sulfate	<i>GLB1</i>	3p21-33
MPS VI	Maroteaux-Lamy				
MPS VII	Sly				
MPS IX					


- La transmission génétique de ces maladies est autosomique récessive à l'exception de la MPS II qui est liée à l'X
- Incidence cumulée 1/25000

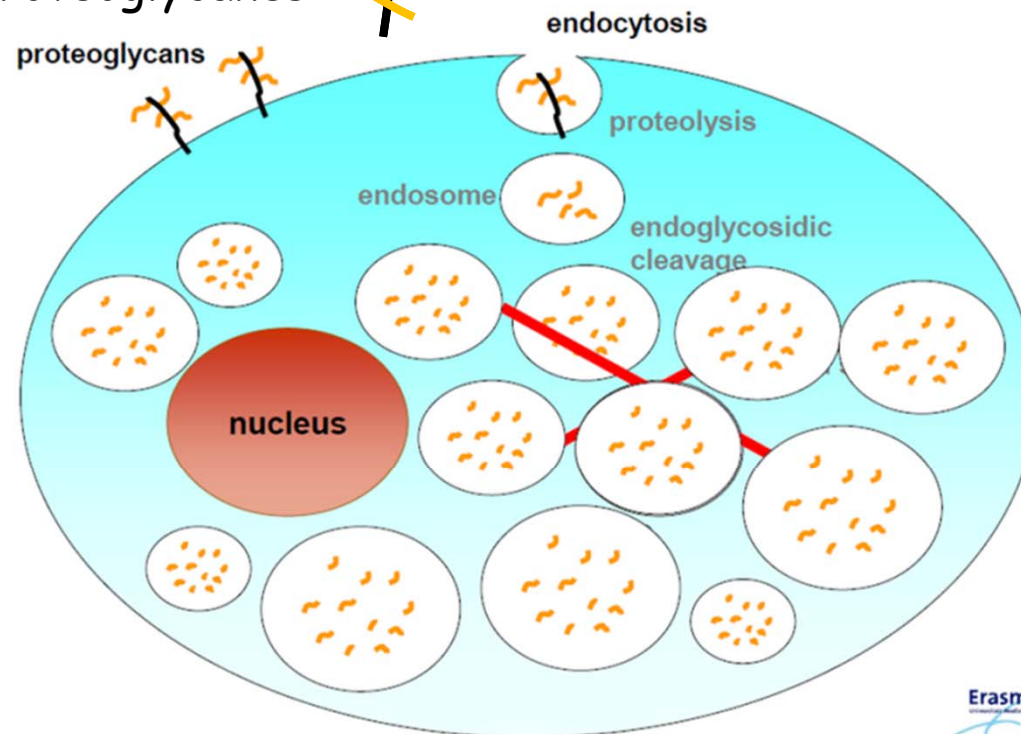


Glycoaminoglycans (GAG) ou Mucopolysaccharides

-Anciennement appelés Mucopolysaccharides (GAG) 

-Composants de la matrice extracellulaire

-liées aux protéines = protéoglycans 

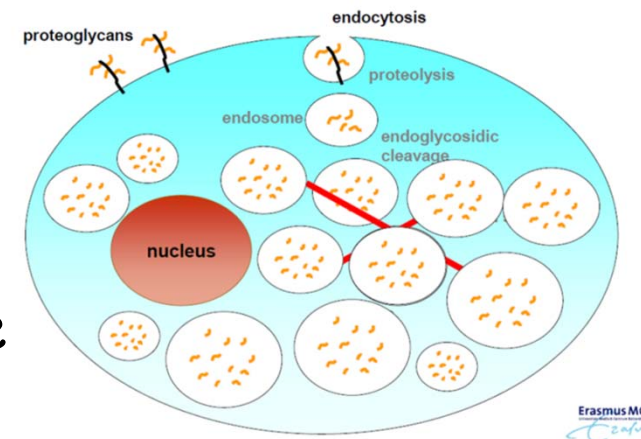




Glycoaminoglycanes (GAG) ou Mucopolysaccharides

Rôles :

- lubrifiant des articulations
- adhésion des cellules à la matrice extracellulaires
- l'hydratation
- résistance aux forces de compression
- communication intercellulaires

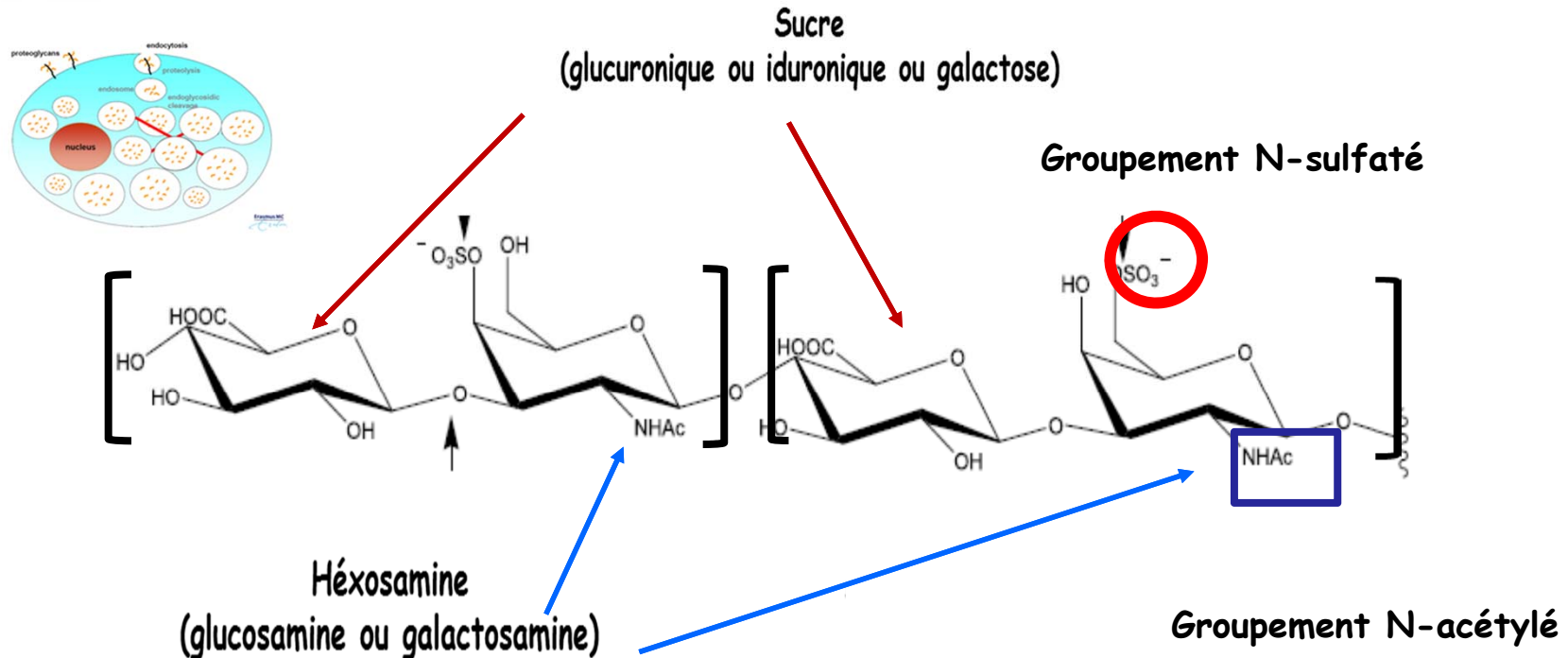




Différents types de glycoaminoglycanes (GAG)

Structure:

-hétéropolysaccharides = répétition d'unité disaccharidiques





Différents types de glycoaminoglycanes (GAG)

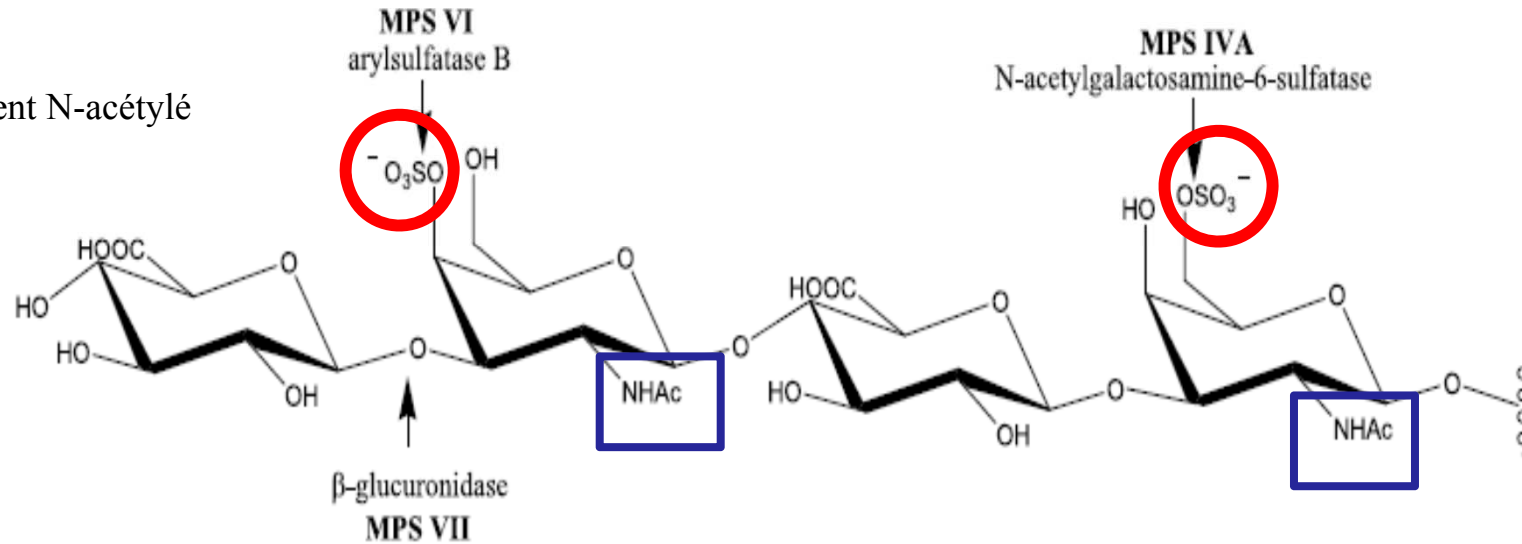
- 1- Chondroïtine sulfate (CS)
- 2- Dermatane sulfate (DS)
- 3- Héparane sulfate (HS)
- 4- Kératane sulfate (KS)



Différents types de glycoaminoglycanes (GAG)

Groupement N-sulfaté

Groupement N-acétylé



Acide glucuronique

N-acétylgalactosamine

Acide glucuronique

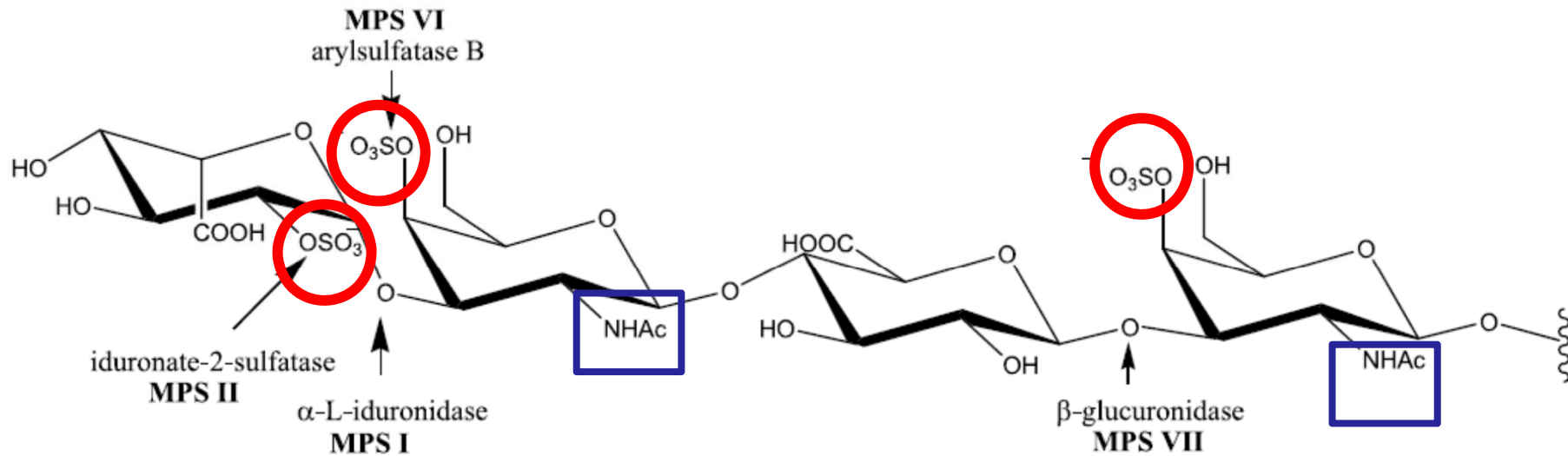
N-acétylgalactosamine

Chondroïtine sulfate (CS)

Localisation : Cartilage, cornée



Différents types de glycoaminoglycanes (GAG)



Acide iduronique

N-acétylgalactosamine

Acide glucuronique

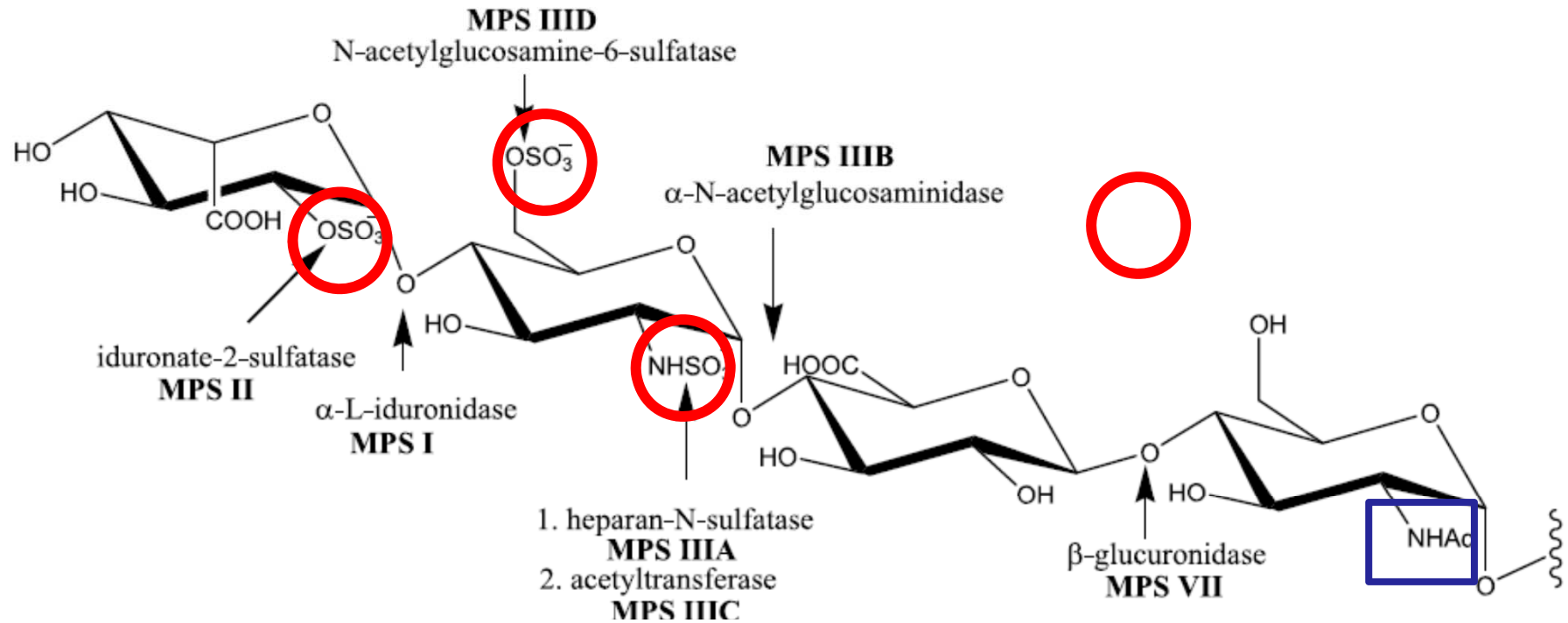
N-acétylgalactosamine

Dermatane sulfate (DS)

Localisation : Peau, tendons



Différents types de glycoaminoglycanes (GAG)



Acide iduronique

Glucosamine

Acide glucuronique

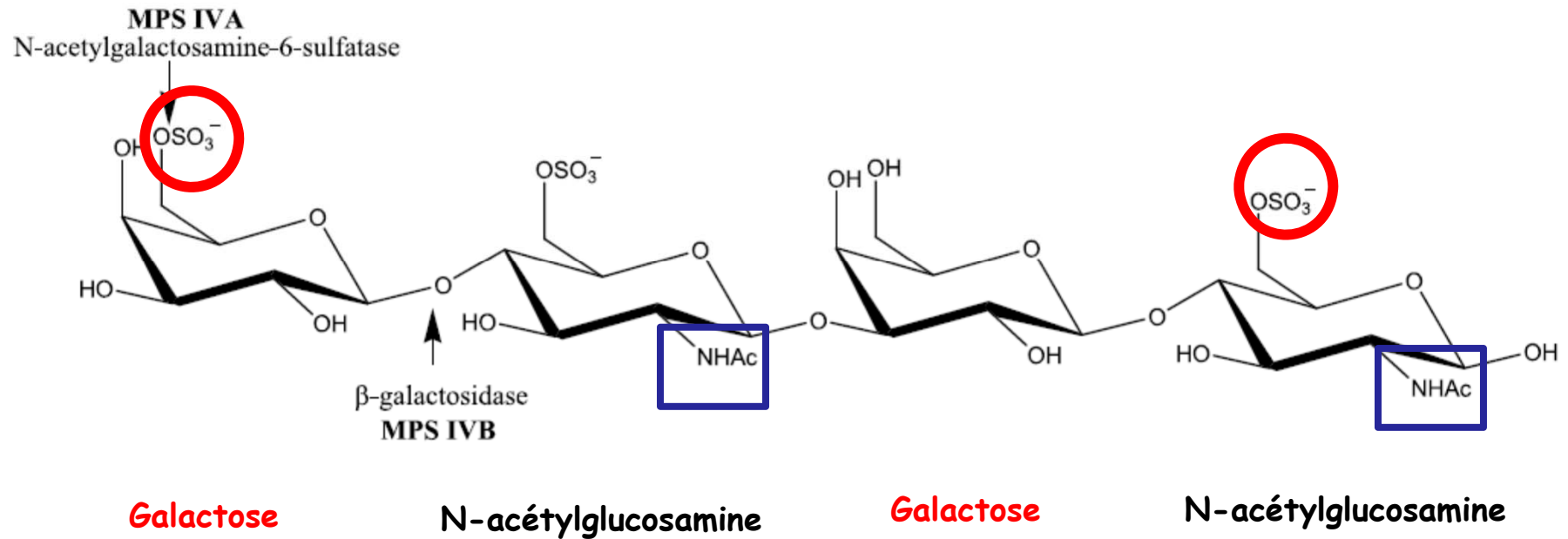
N-acétylglucosamine

Héparane sulfate (HS)

Localisation : Tissus conjonctif de la peau



Différents types de glycoaminoglycanes (GAG)

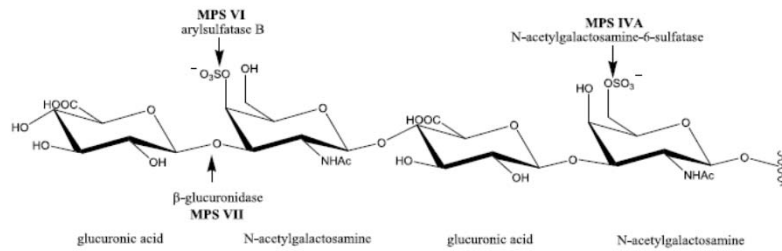


Kératane sulfate (KS)

Localisation : Cartilage, cornée, tissu conjonctif

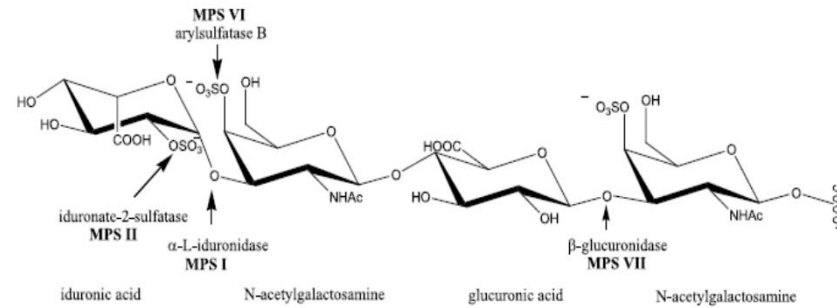


Différents types de glycoaminoglycans (GAG)



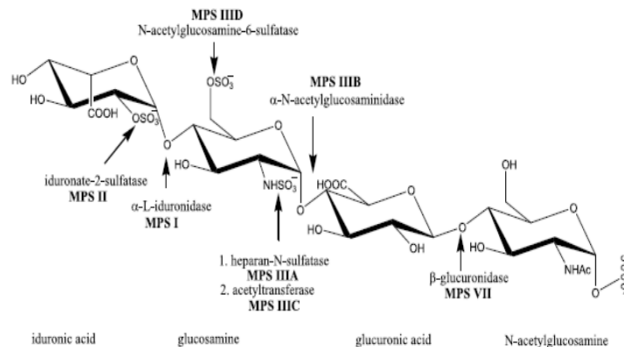
Chondroïtine sulfate (CS)

Localisation : Cartilage, cornée



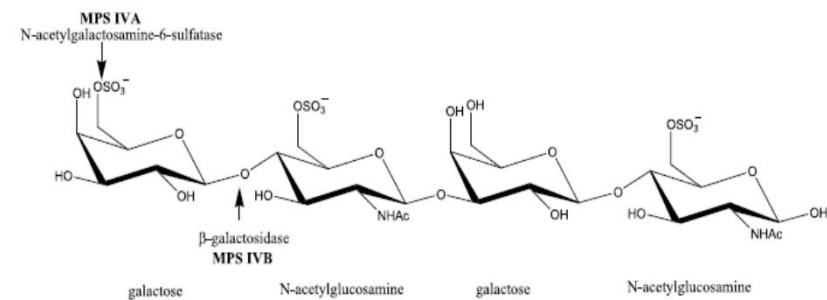
Dermatane sulfate (DS)

Localisation : Peau, tendons



Héparane sulfate (HS)

Localisation : Tissus conjonctif de la peau

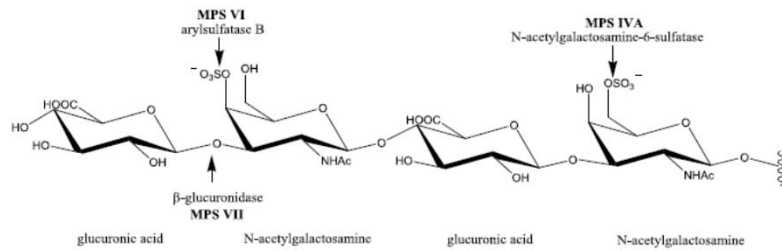


Kératane sulfate (KS)

Localisation : Cartilage, cornée, tissu conjonctif

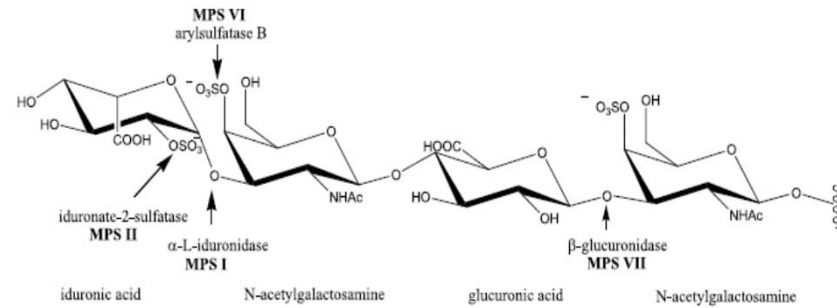


Différents types de glycoaminoglycans (GAG)



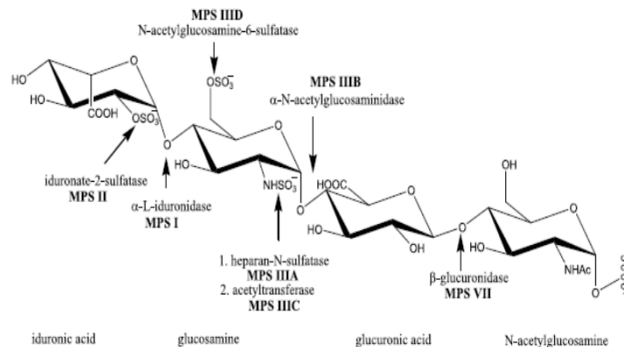
Chondroïtine sulfate (CS)

Localisation : Cartilage, cornée



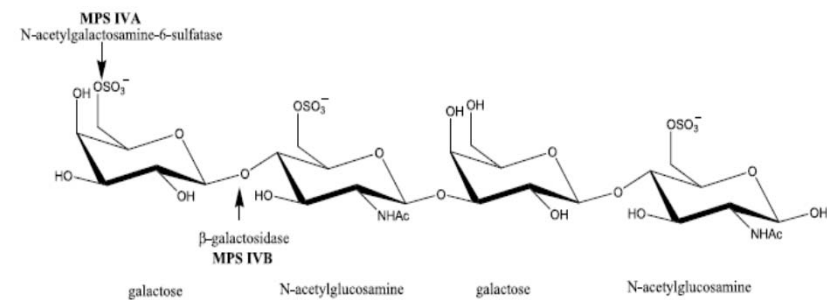
Dermatane sulfate (DS)

Localisation : Peau, tendons



Héparane sulfate (HS)

Localisation : Tissu conjonctif de la peau



Kératane sulfate (KS)

Localisation : Cartilage, cornée, tissu conjonctif



Les Mucopolysaccharidoses

Spectre clinique

Morphologiques

- Avance /retard staturopondéral
- Macro > microcéphalie
- Dymorphie (faciès en gargouille)
- Déformations ostéo-articulaires

Cutanés

- Rash maculopapuleux,
- taches mongoloïdes géantes
- Pilosité, cheveux drus

ORL

- Infections récurrentes
- Surdité

Cardiaque

- Valvulopathie
- Myocardiopathie
- Épanchement Péricarde

Hépto-digestive

- Hernies
- HSM
- diarrhée motrice

Atteinte viscérale

Respiratoire

- Obstructive
- Restrictive
- Atteinte interstitiel

Neurologiques

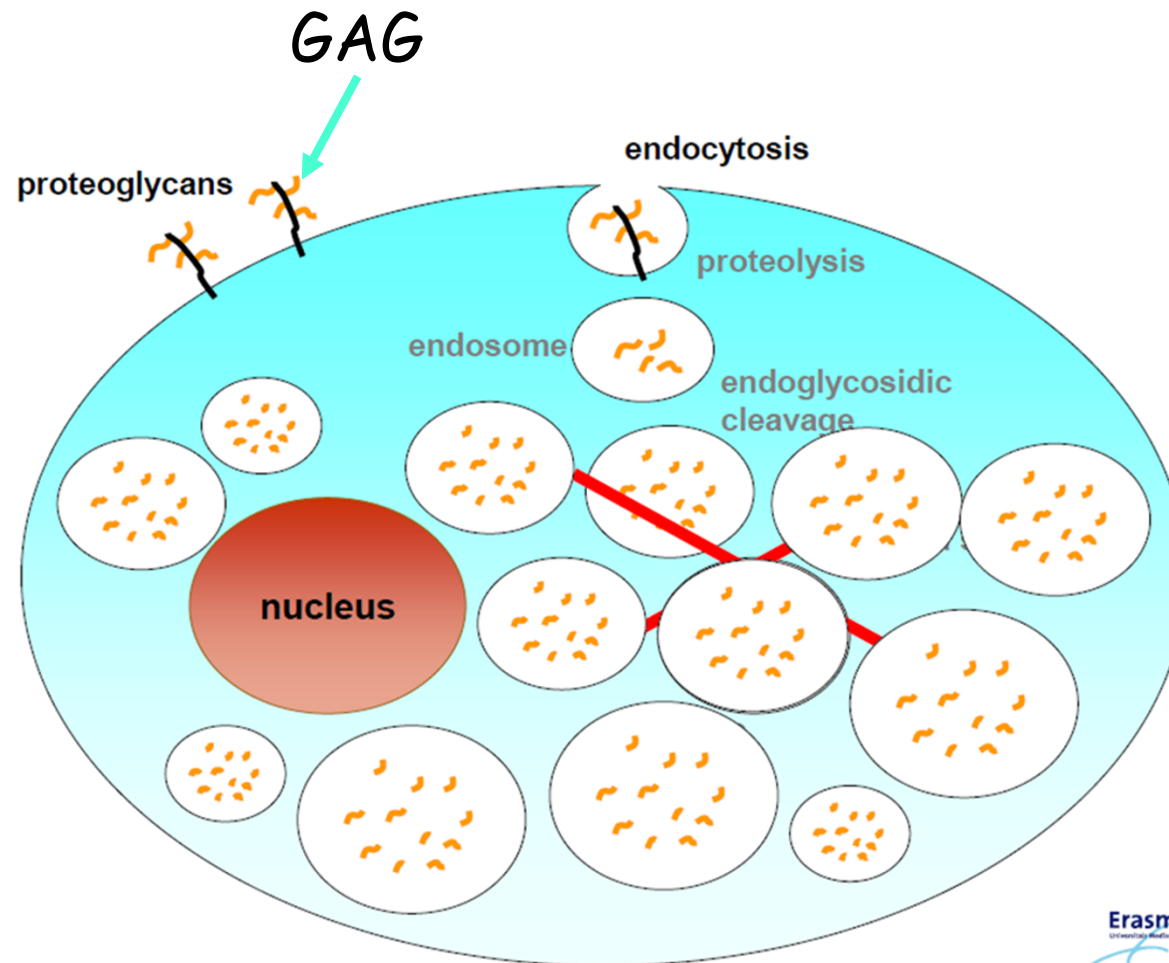
- Régression psychomotrice
- Syndrome compressif
- Canal carpien
- Hydrocéphale
- Anomalie de la substance blanche

Ophtalmologiques

- Dépôts cornéens
- Rétinopathie
- Glaucome
- Atrophie optique



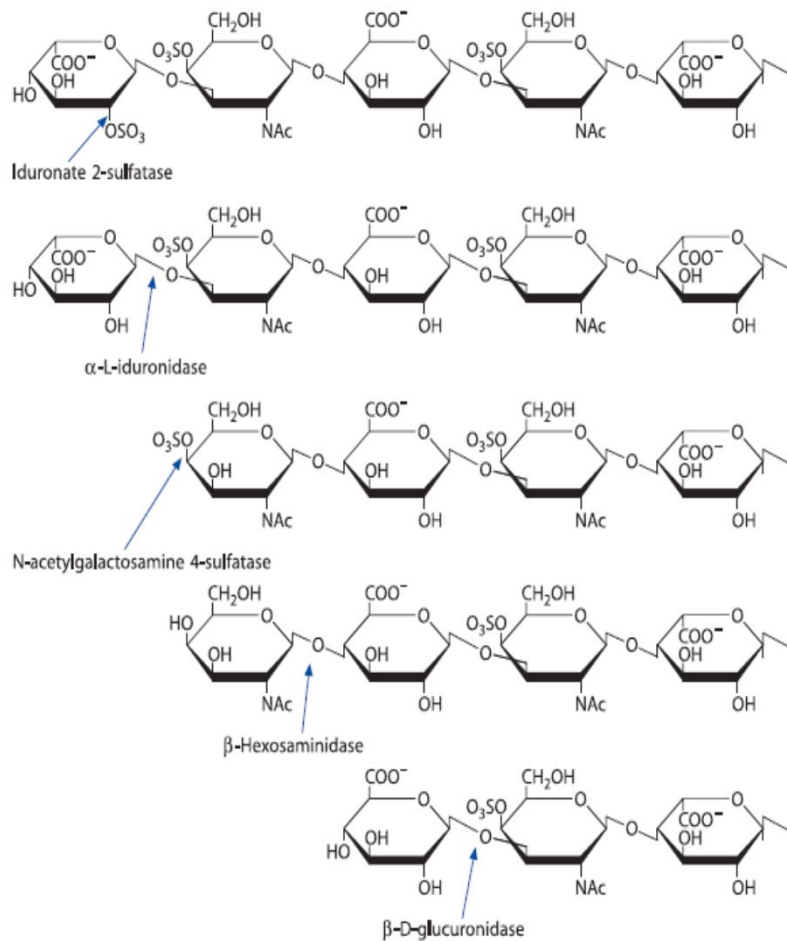
Dégradation lysosomale des glycoaminoglycanes (GAG)



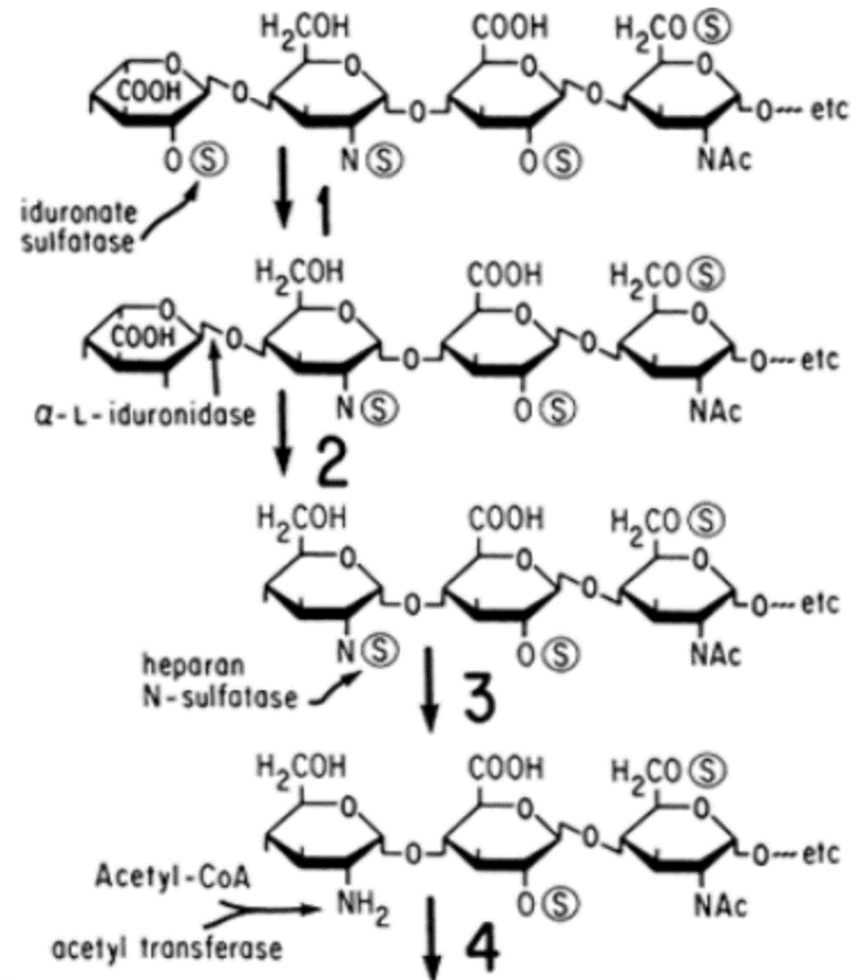


Catabolisme du Dermatane sulfate et Héparane sulfate

Dermatane sulfate



Héparane sulfate





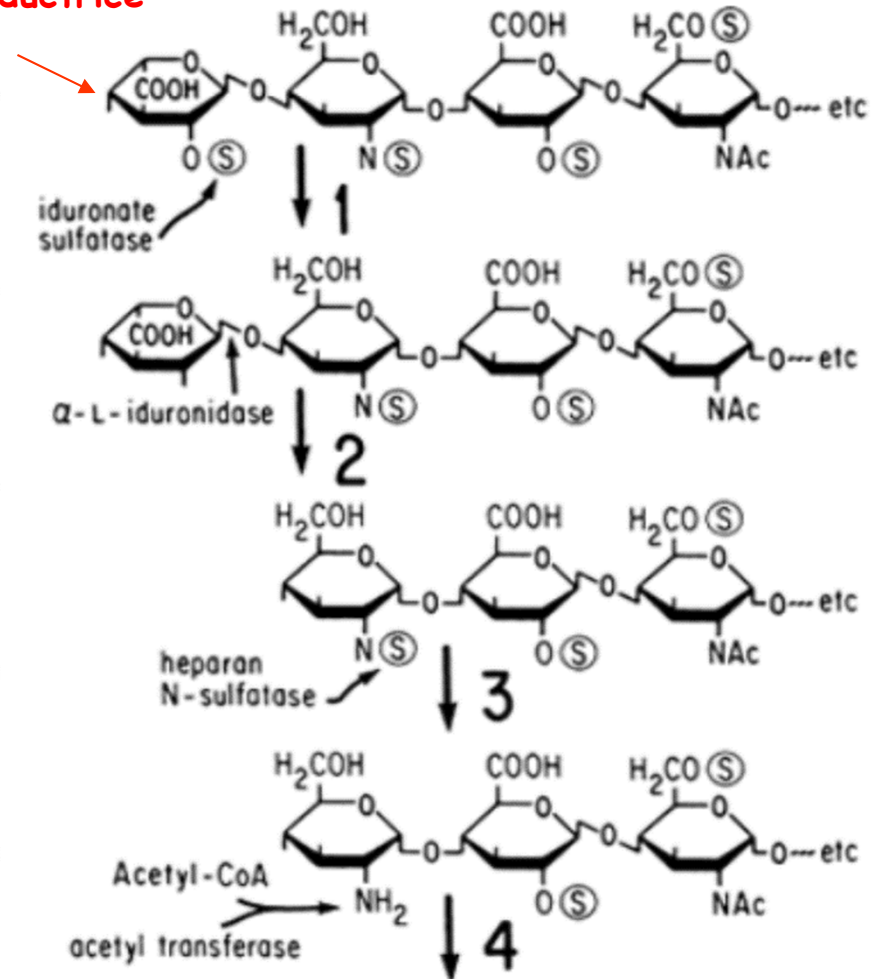
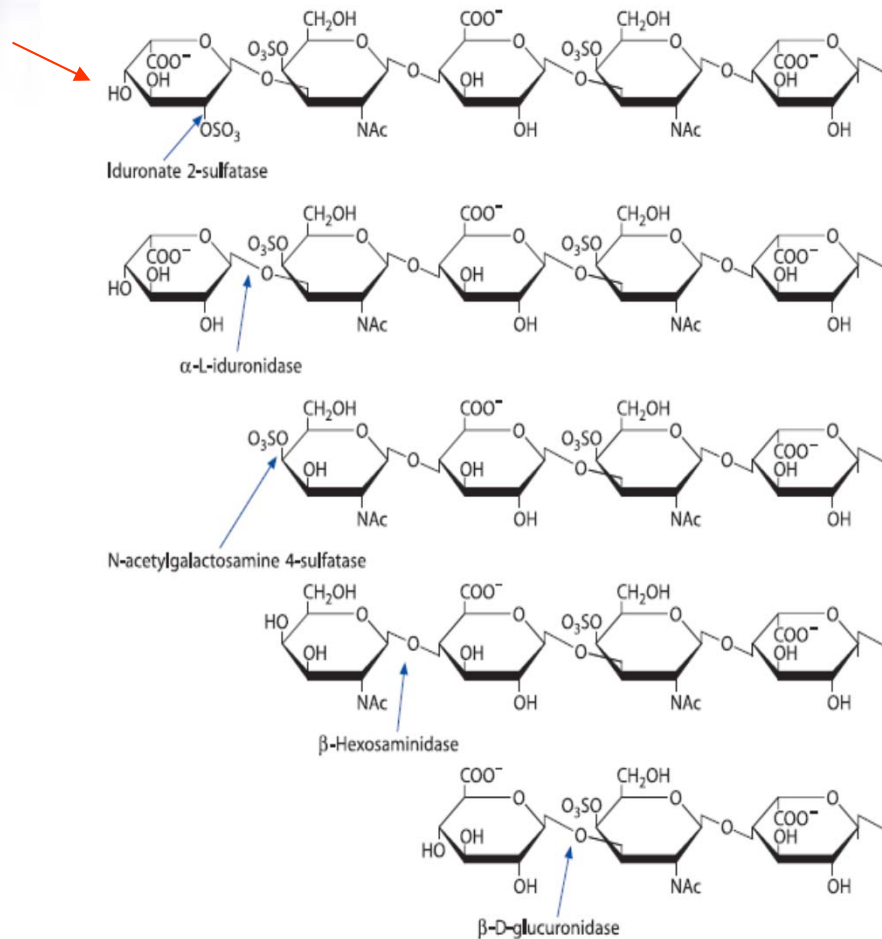
Catabolisme du Dermatane sulfate et Héparane sulfate

Extrémité non
réductrice

Dermatane sulfate

Extrémité non
réductrice

Héparane sulfate





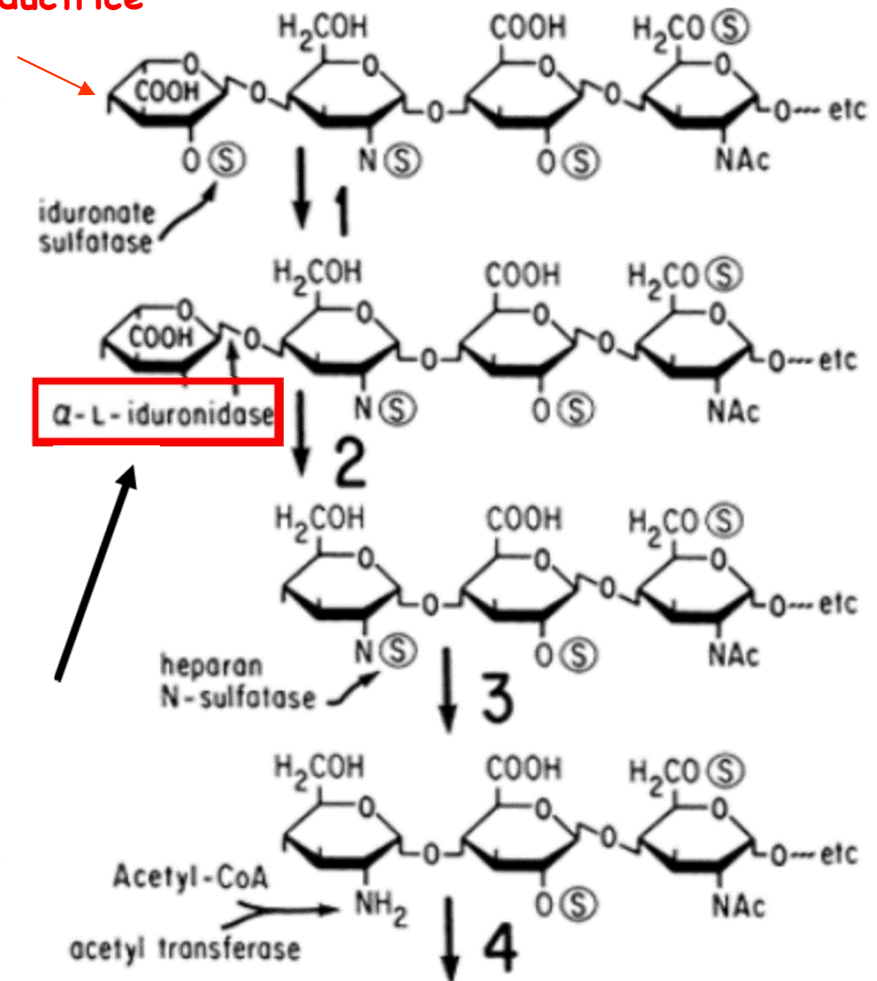
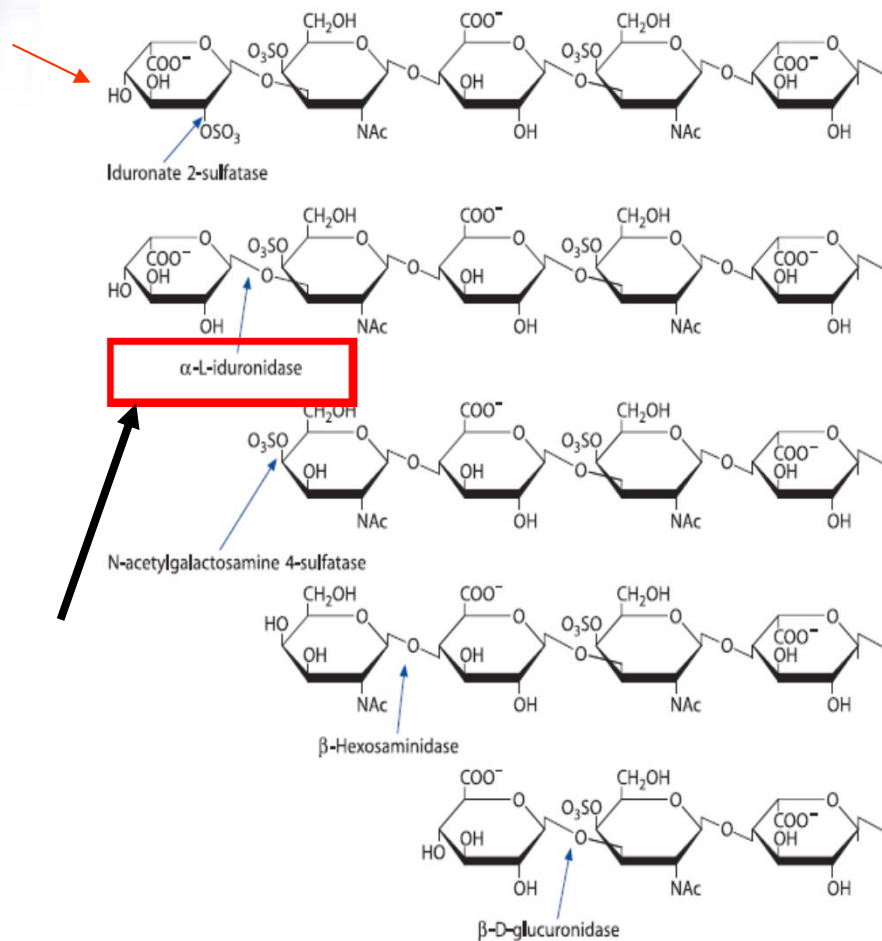
Catabolisme du Dermatane sulfate et Héparane sulfate

Extrémité non
réductrice

Dermatane sulfate

Extrémité non
réductrice

Héparane sulfate





Catabolisme du Dermatane sulfate et Héparane sulfate

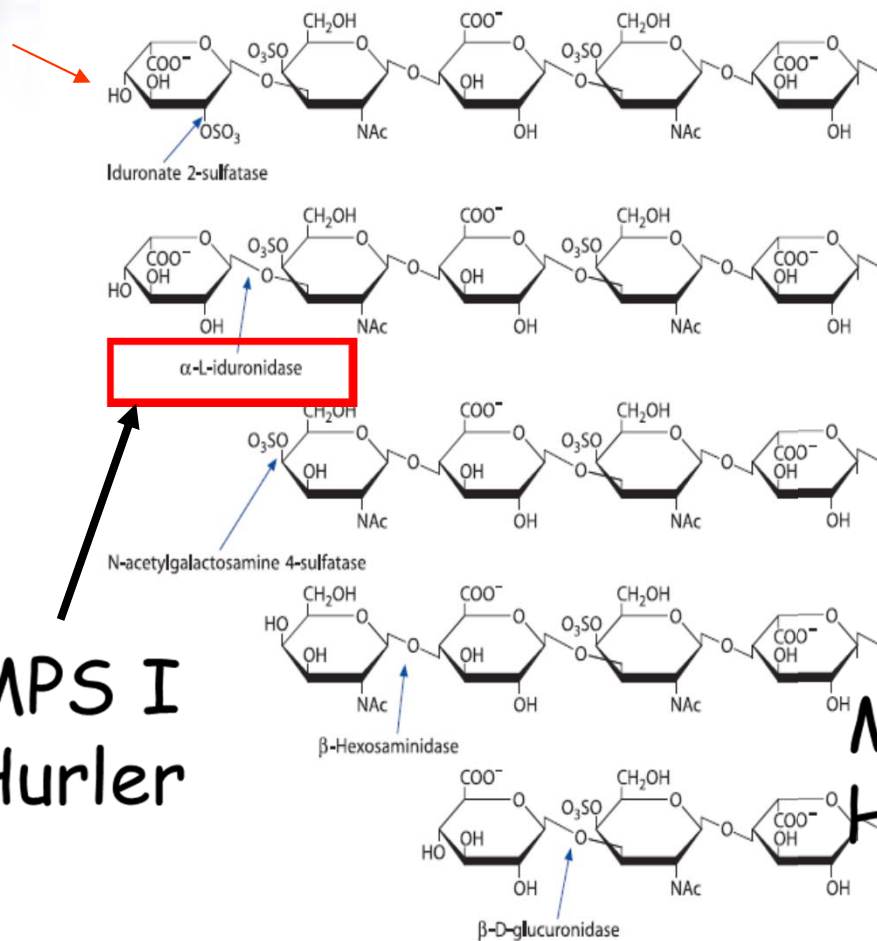
MPS I = accumulation : HS + DS

Extrémité non réductrice

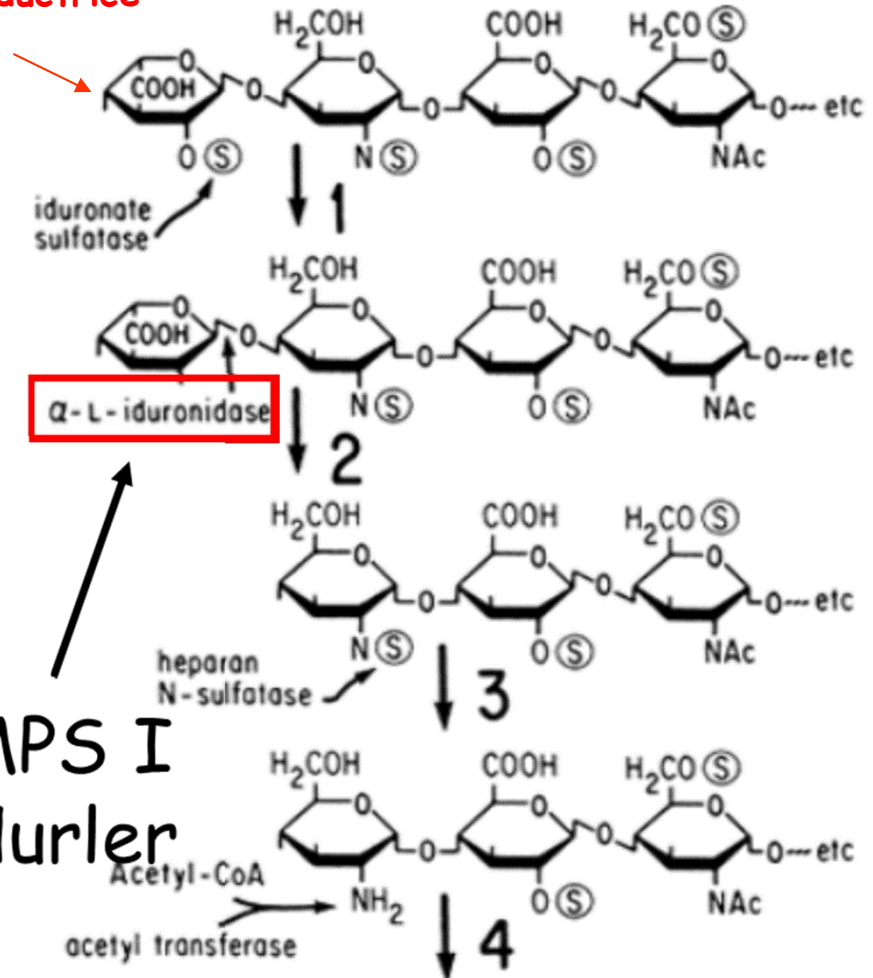
Dermatane sulfate

Extrémité non réductrice

Héparane sulfate



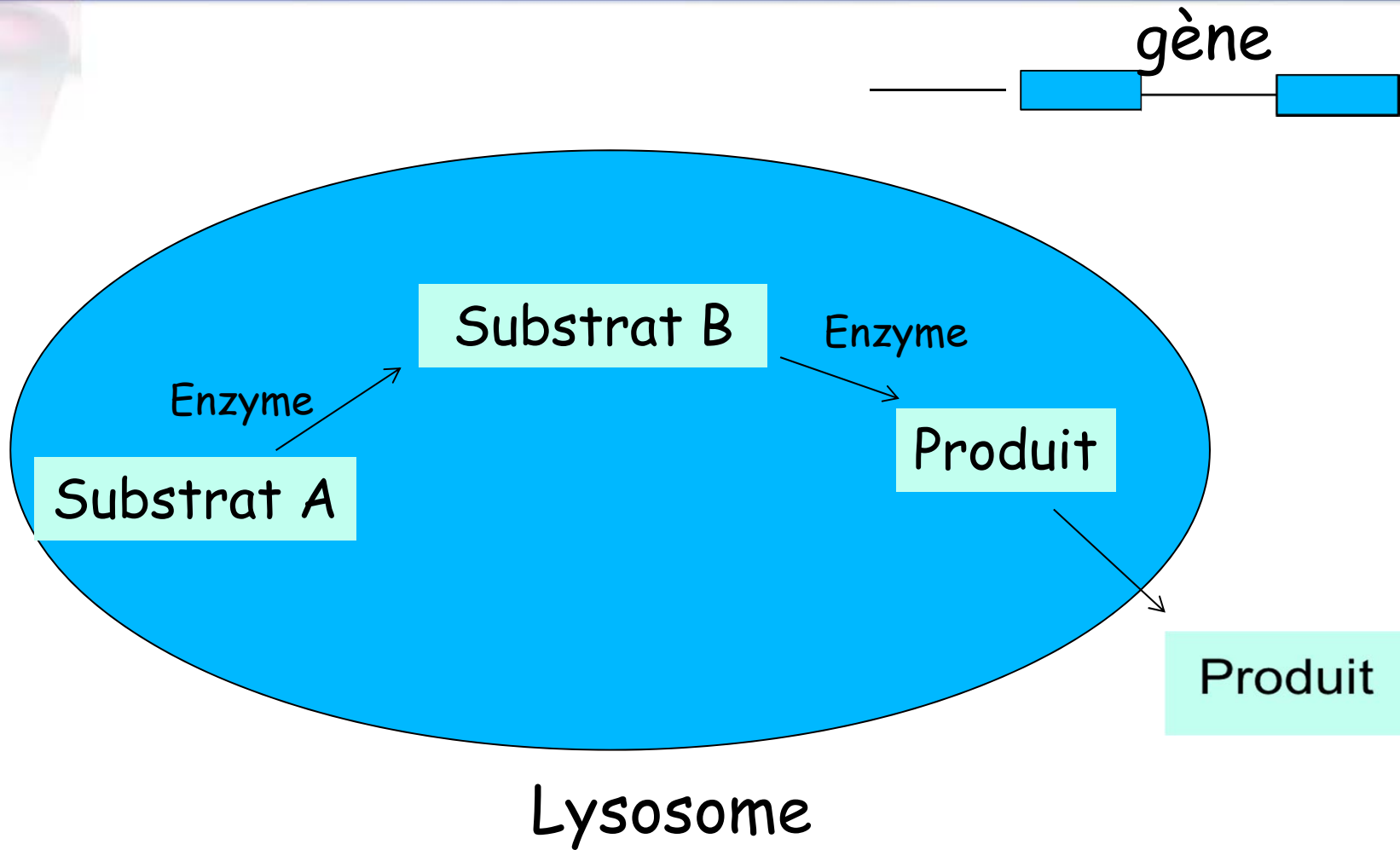
MPS I
Hurler



MPS I
Hurler



Mucopolysaccharidoses: comment explorer ?

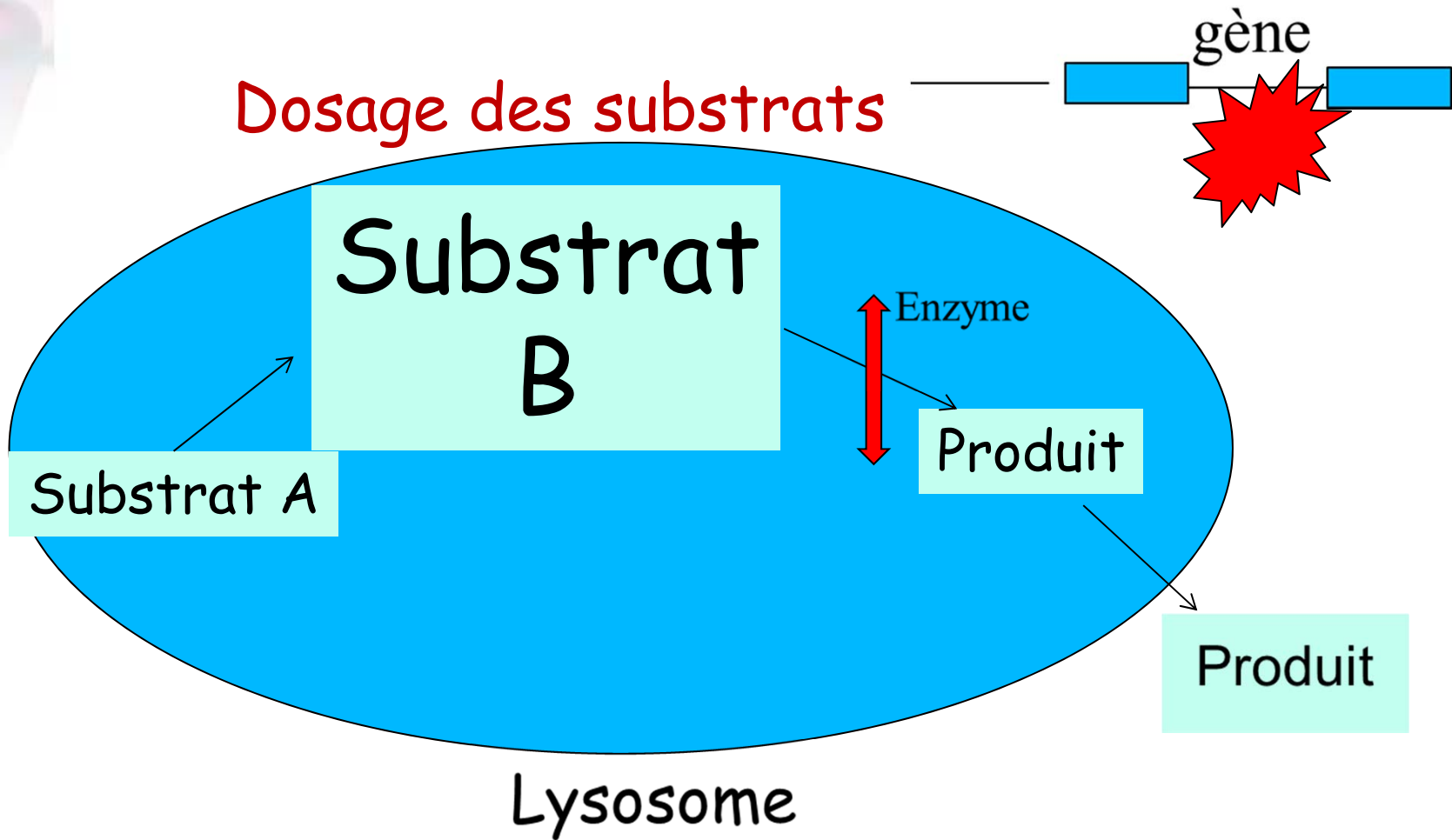




Mucopolysaccharidoses: comment explorer ?

Diagnostic de la surcharge

Dosage des substrats





Diagnostic biologique des MPS

Dosage des substrats

Diagnostic d'orientation

Analyse quantitative des *GAG* urinaires

Analyse qualitative des *GAG* urinaires: séparation des types de *GAG*





Diagnostic d'orientation: *GAGs* urinaires (Mucopolysaccharidoses)

Dosage quantitatif: *GAG* urinaires dans les MPS

1- méthode à l'harmine qui permet de quantifier l'acide hexuronique contenu dans les *GAG* après purification des *GAG* par précipitation au CPC (chlorure de cetylpyridinium) .

- Les complexes *GAG* - harmine = coloration rouge (680 nm)
- Le KS n'est pas constitué d'acide hexuronique, ne se complexe pas à l'harmine

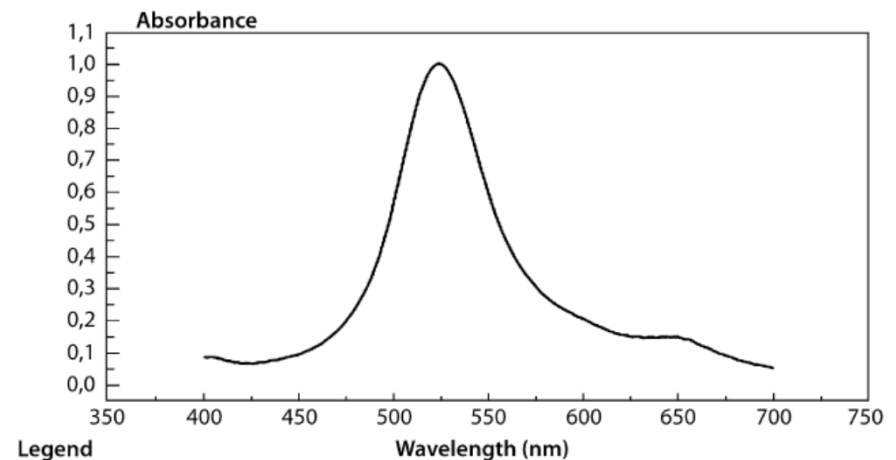
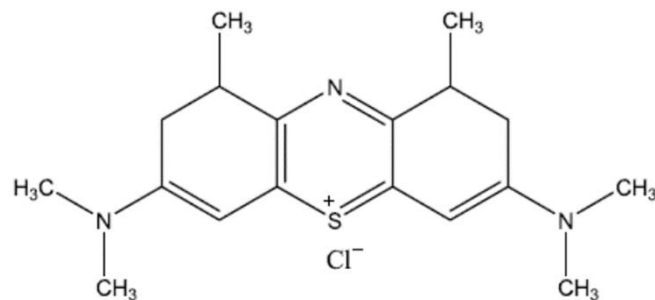
2- méthode au DMB : dimethylmethylenblue



Diagnostic d'orientation: GAGs urinaires (Mucopolysaccharidoses)

Dosage quantitatif: GAG urinaires dans les MPS

- méthode au DMB : dimethylmethyleneboue



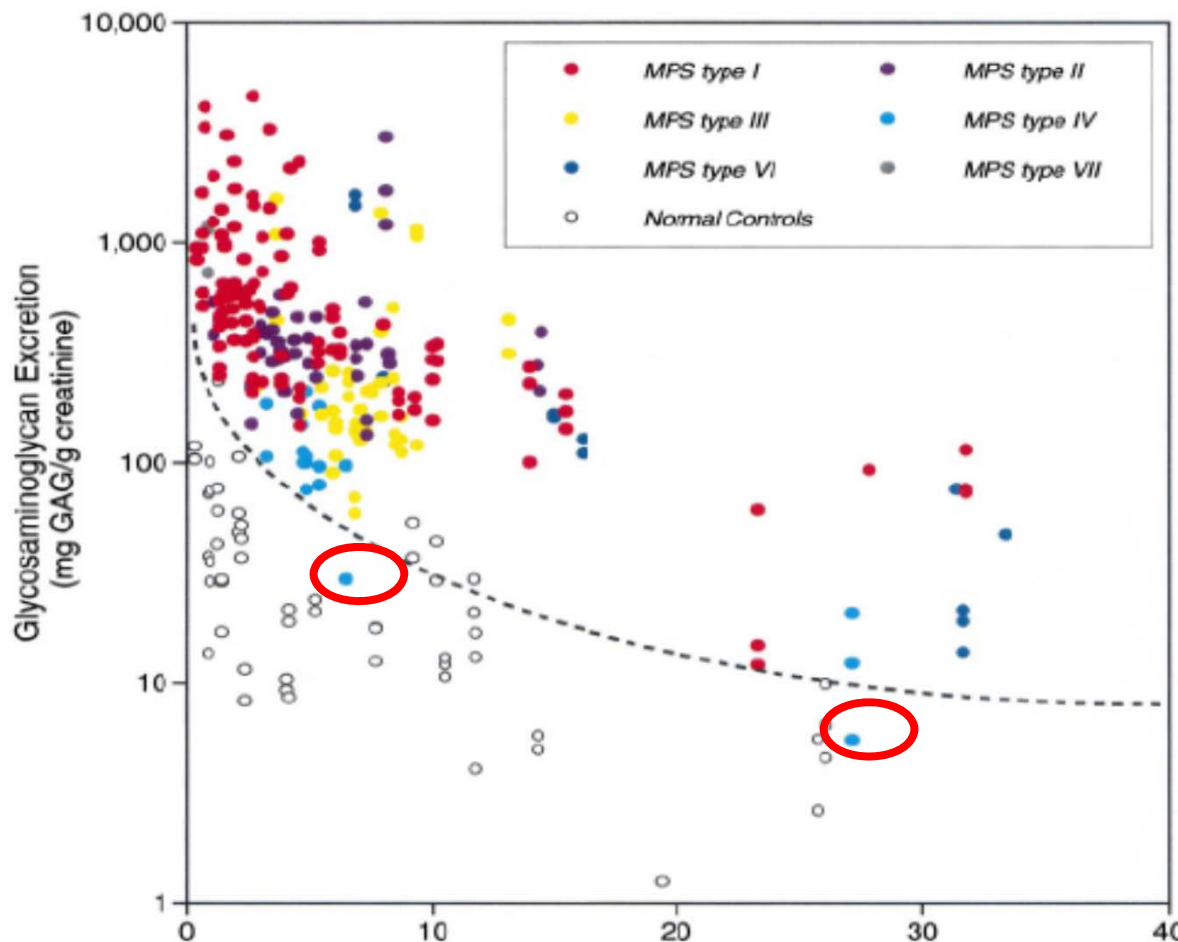
Complexes DMB-GAG: 520 nm

- résultats rapportés à la créatinine U
- doivent tenir compte de l'âge du patient
- [GAG] diminue avec l'âge
- Peuvent être normaux (formes atténuées et adultes)
- faux négatif (KS)



Diagnostic d'orientation: GAGs urinaires (Mucopolysaccharidoses)

Dosage quantitatif des GAG urinaires (DMB-GAG test)



Mucopolysaccharidosis Subject Population

Diagnostic group	Individuals (number)	Specimens (number)
Mucopolysaccharidosis		
MPS I	45	113
MPS II	19	46
MPS III	19	43
MPS IV	6	17
MPS VI	6	14
MPS VII	1	3
Total	96	236
Normal individuals	24	60

Note. Excludes patients who have undergone bone marrow transplantation.

Faux négatifs

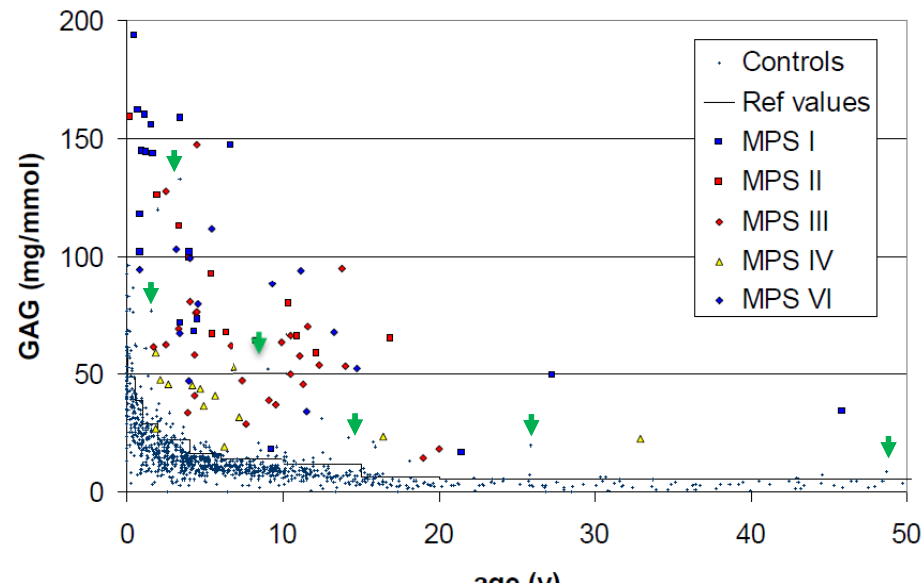
Whitley et al *Molecular Genetics and Metabolism* 75, 56-64 (2002)



Diagnostic d'orientation: GAGs urinaires (Mucopolysaccharidoses)

Diagnostic quantitatif: GAG urinaires dans les MPS

DMB test; normal controls vs. MPS



- ▼ Faux positifs
- ▼ Héparine, arthrite rhumatoïde, Lupus...

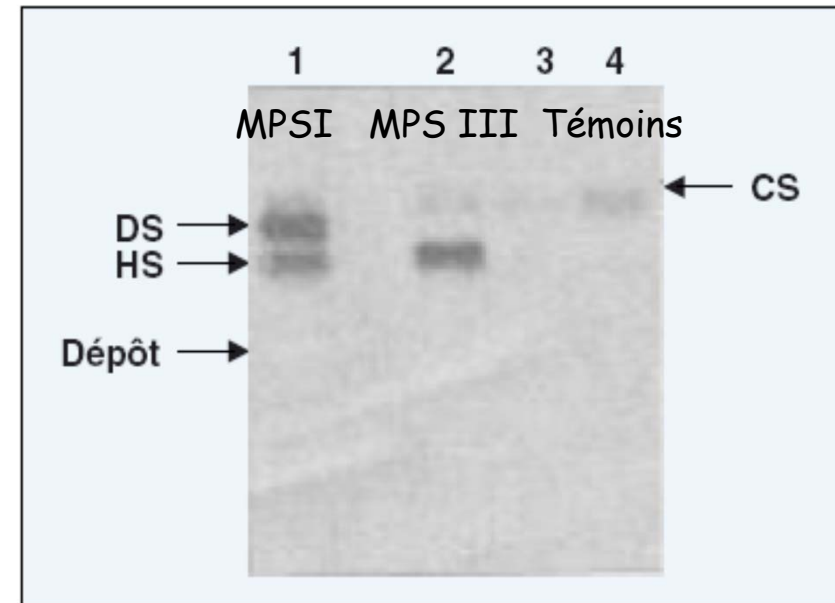


Diagnostic d'orientation: GAGs urinaires (Mucopolysaccharidoses)

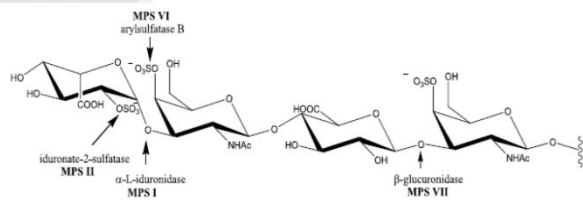
Diagnostic qualitatif : Typage de MPS

- Electrophorèse monodimensionnelle sur acétate de cellulose des GAG purifiés, qui sont révélés par le DMB

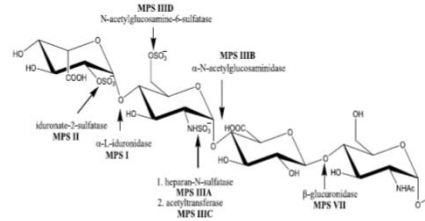
- Séparation des 4 types de GAG
 - Chondroïtine sulfate
 - Kératane sulfate
 - Dermatan sulfate
 - Héparane sulfate
- Normalement, la chondroïtine sulfate est la seule fraction visible
- Héparane sulfate peut être visible avant 1 an



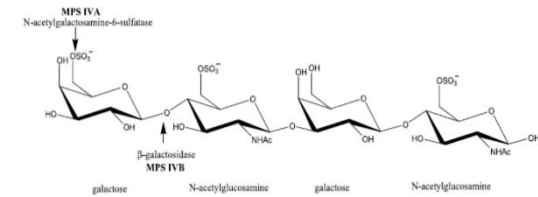
Quantification des différents types de glycoaminoglycanes (GAG) par MS/MS



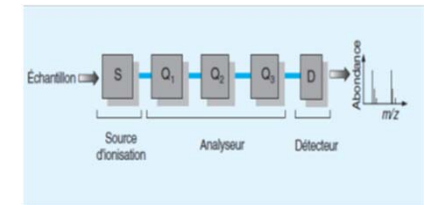
Dermatane sulfate (DS)



Héparane sulfate (HS)



Kéراتane sulfate (KS)



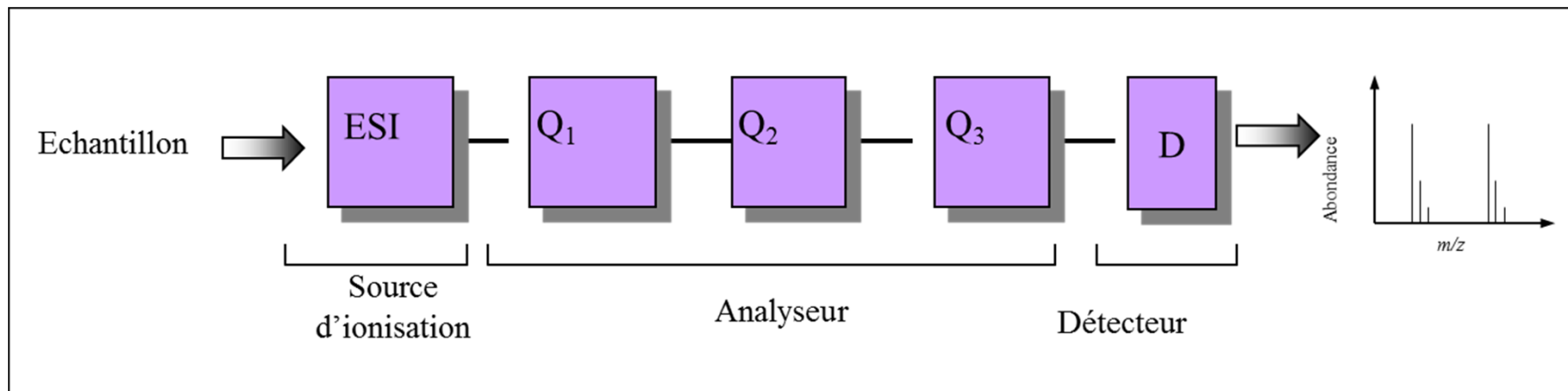
Spectrométrie de masse en tandem



Spectrométrie de masse en tandem

Application au diagnostic des maladies du lysosome

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



Avantages :

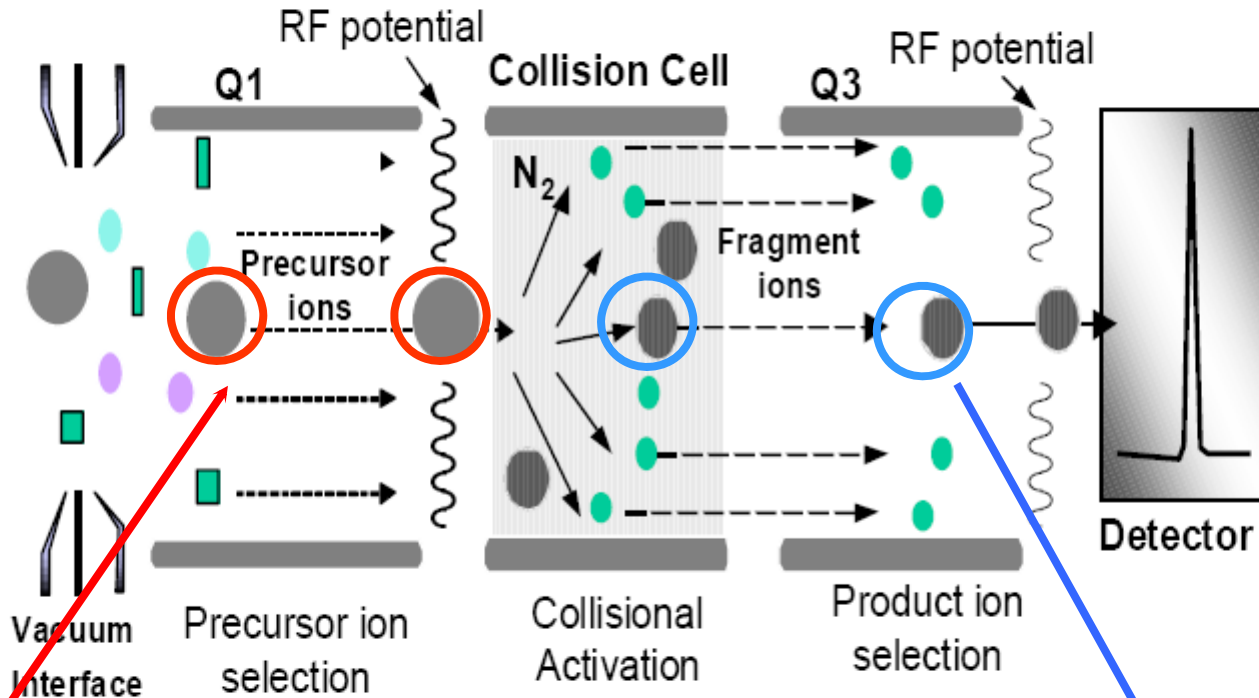
- Analyse multiple sur une tache de sang
- Analyse de nombreux échantillons
- Rapidité de l'analyse (2-3 min)
- Sensibilité et spécificité

Inconvénients :

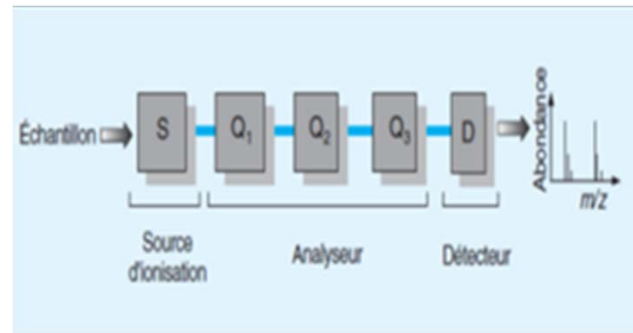
- Etapes pré-analytiques
- Coût de l'appareil et des réactifs
- Formation des personnels

Mass Analysis

Multiple Reaction Monitoring (MRM)



Ion parent

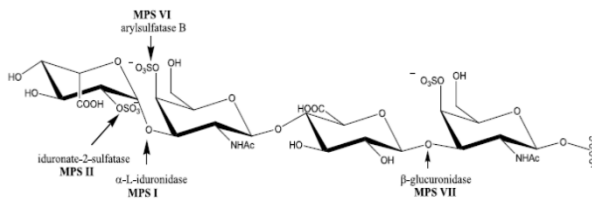


Ion fils

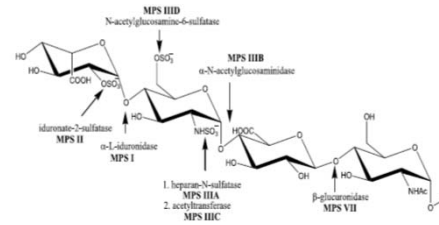


Quantification des différents types de glycoaminoglycanes (GAG) par MS/MS

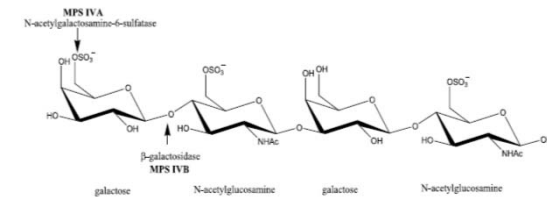
molécules complexes = copolymères d'unités disaccharidiques



Dermatane sulfate (DS)



Héparane sulfate (HS)

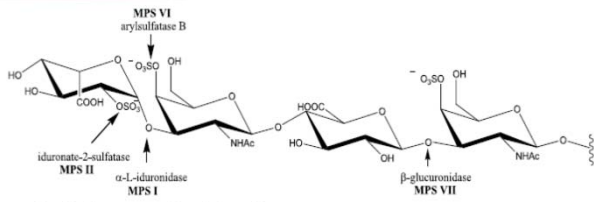


Kéراتane sulfate (KS)

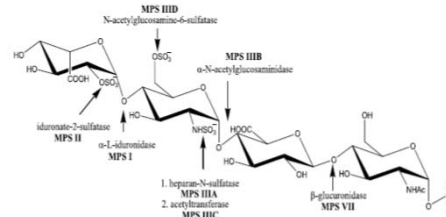




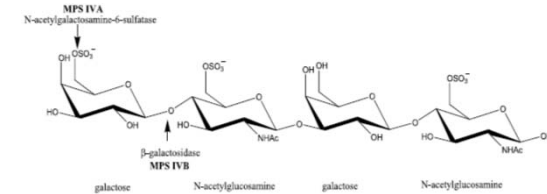
Quantification des différents types de glycoaminoglycanes (GAG) par MS/MS



Dermatane sulfate (DS)



Héparane sulfate (HS)



Kératane sulfate (KS)

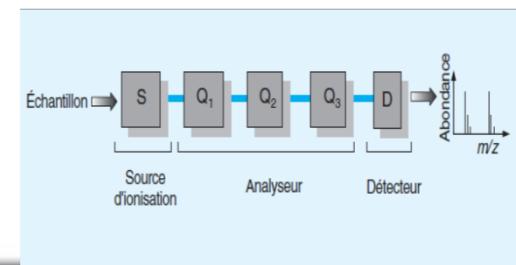
Dégradation enzymatique

Degradation chimique (methanolyse)

molécules simples = unités disaccharidiques

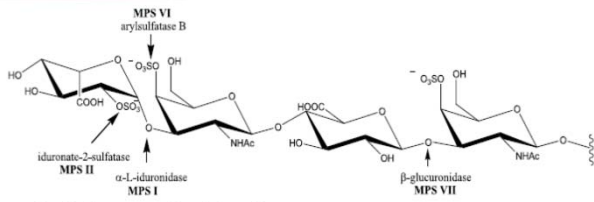


Quantification par LC-MS/MS

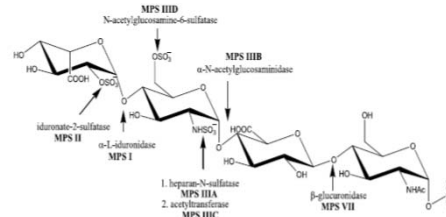




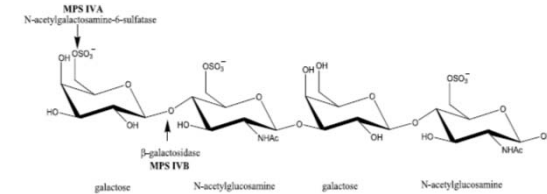
Quantification des différents types de glycoaminoglycanes (GAG) par MS/MS



Dermatane sulfate (DS)



Héparane sulfate (HS)



Kératane sulfate (KS)

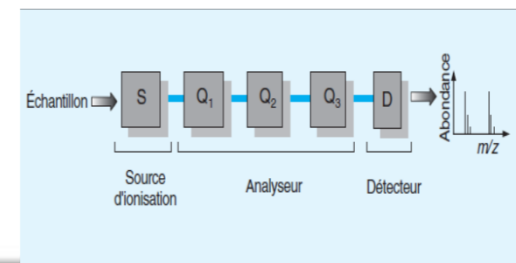
Dégradation enzymatique

Degradation chimique (methanolyse)

molécules simples = unités disaccharidiques



Quantification par LC-MS/MS



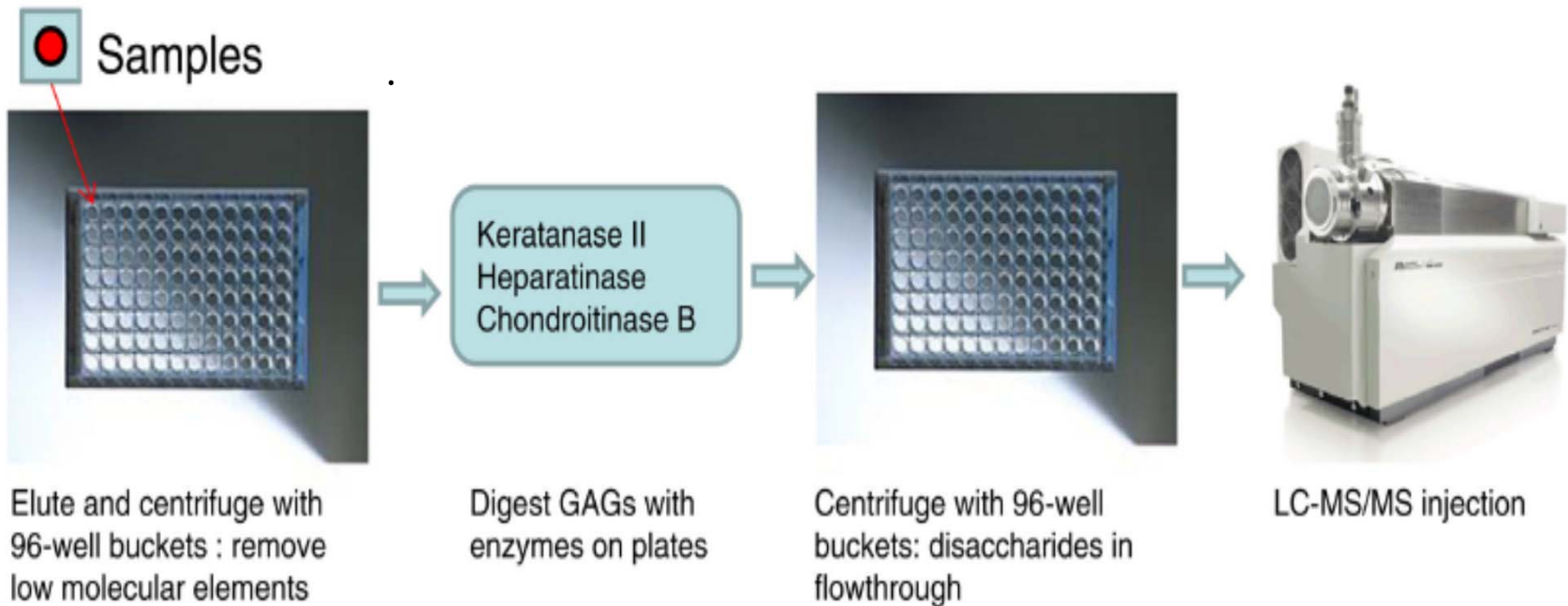


Quantification des différents types de glycoaminoglycanes (GAG) par MS/MS

Application au dépistage néonatal

Shunji Tomatsua , Mol Genet Metab. 2013

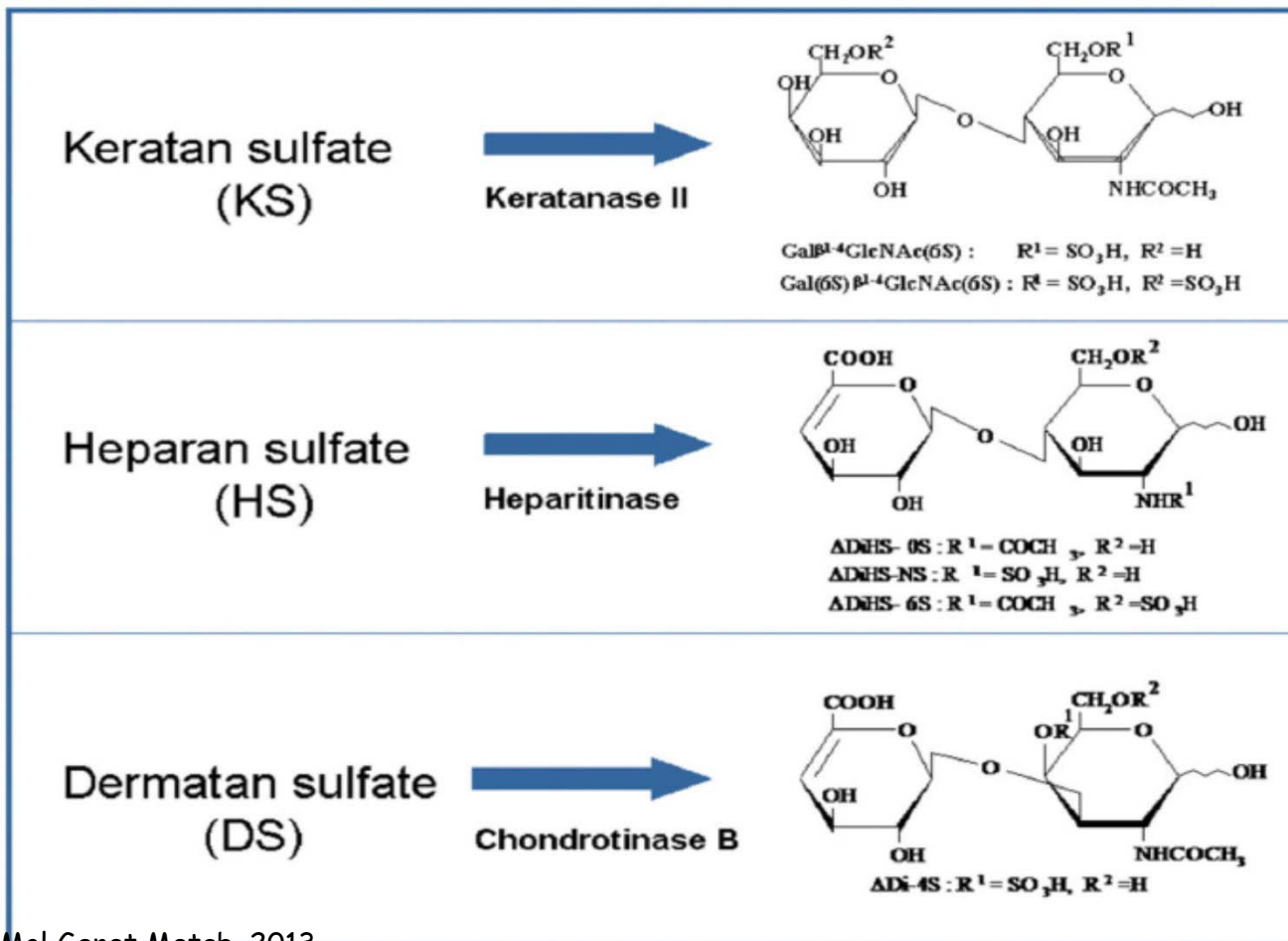
Dégradation enzymatique





Quantification des différents types de glycoaminoglycanes (GAG) par MS/MS

Dégradation enzymatique

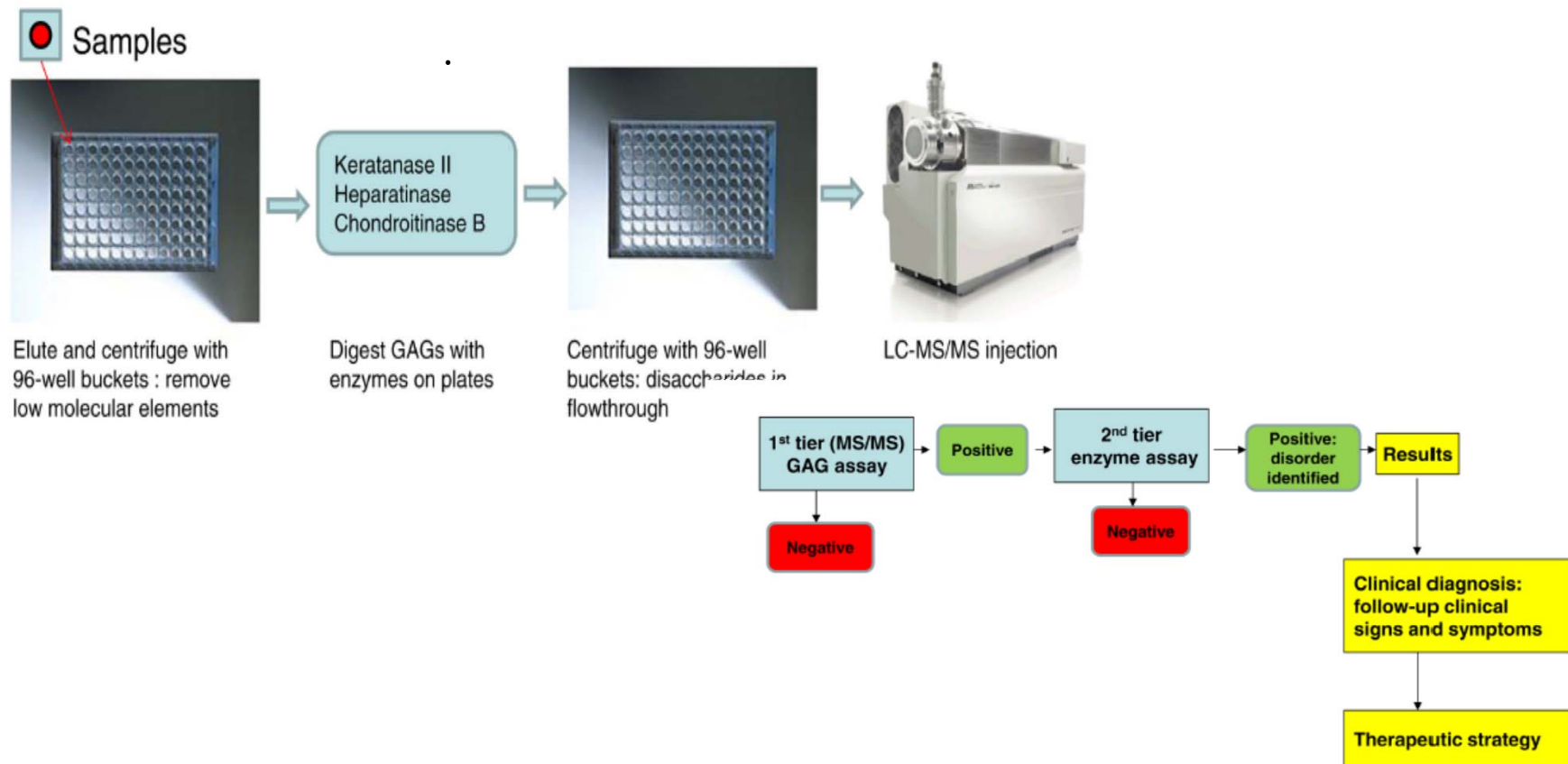


Quantification des différents types de glycoaminoglycanes (GAG) par MS/MS

Application au dépistage néonatal

Shunji Tomatsua , Mol Genet Metab. 2013

Dégradation enzymatique



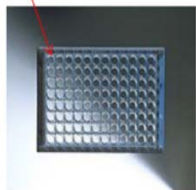
Quantification des différents types de glycoaminoglycanes (GAG) par MS/MS

Application au dépistage néonatal

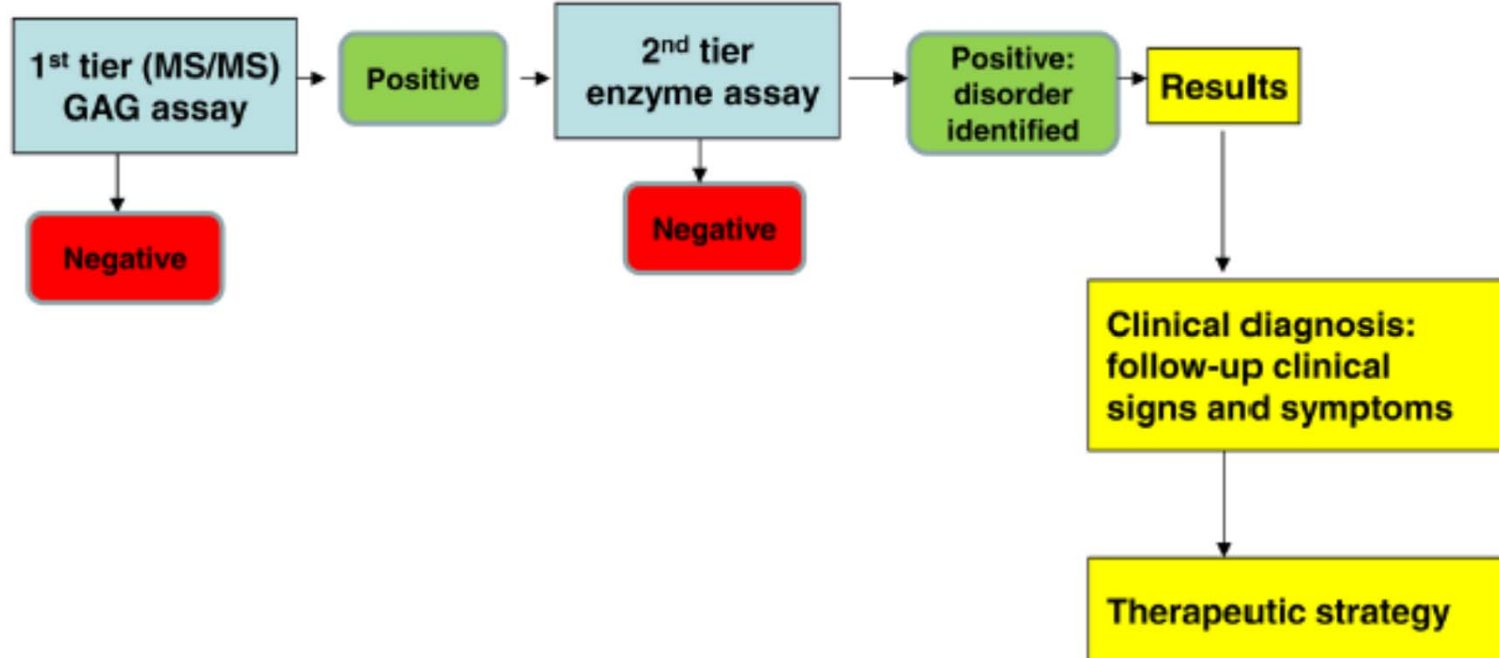
Shunji Tomatsua, Mol Genet Metab. 2013

Dégradation enzymatique

Samples

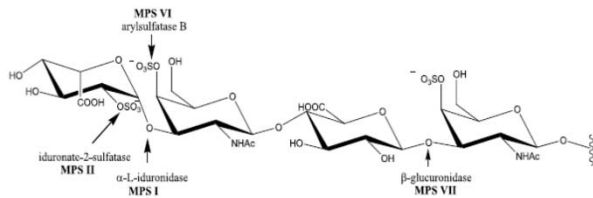


Elute and centrifuge with 96-well buckets : remove low molecular elements

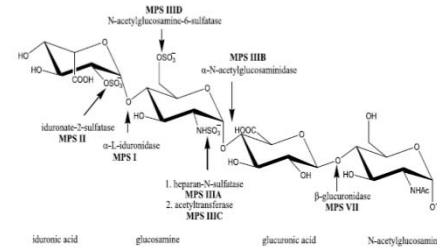




Quantification des différents types de glycoaminoglycanes (GAG) par MS/MS



Dermatane sulfate (DS)



Héparane sulfate (HS)

75 min à 65°C

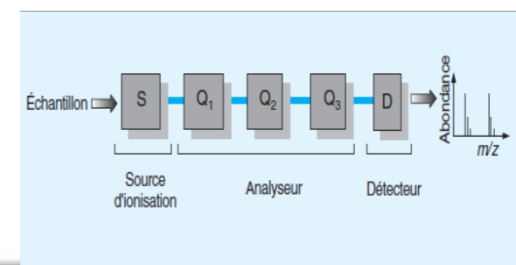
méthanolyse (HCl dans MeOH)

Degradation chimique (méthanolyse)

molécules simples = unités disaccharidiques



Quantification par LC-MS/MS



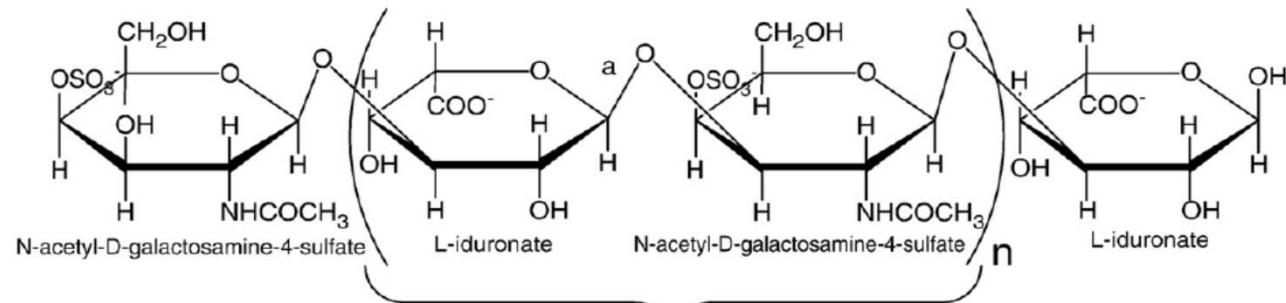


Quantification des différents types de glycoaminoglycanes (GAG) par MS/MS

Dégradation chimique

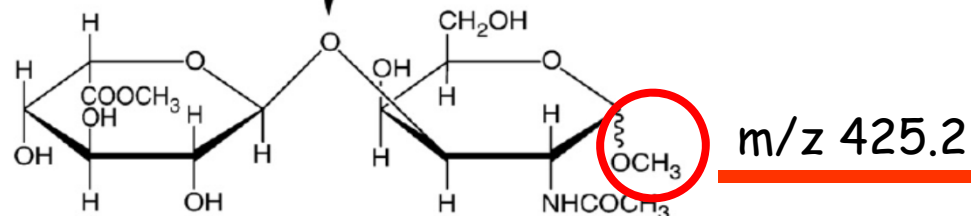
A)

DERMATAN SULFATE



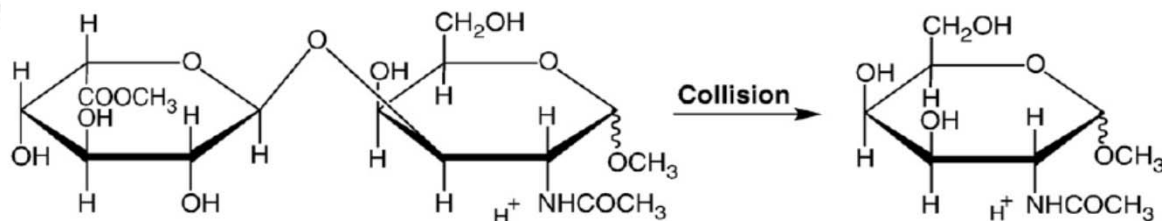
75 min à 65°C

méthanolyse (HCl dans MeOH)



$C_{17}H_{31}NO_{11}$
Compound mass: 425.2

B)



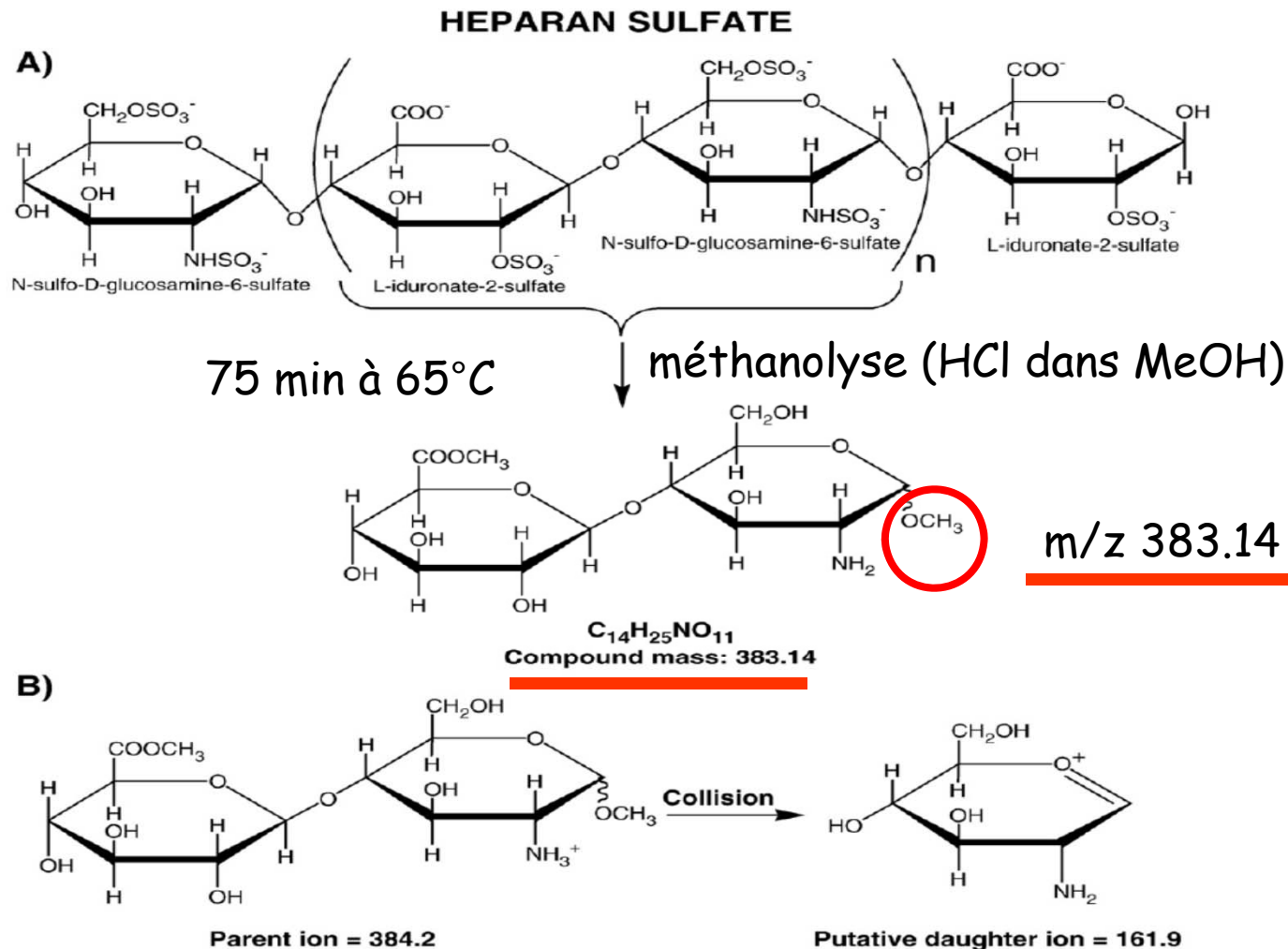
Parent ion: 426.2

Putative daughter: 236.1



Quantification des différents types de glycoaminoglycanes (GAG) par MS/MS

Dégradation chimique

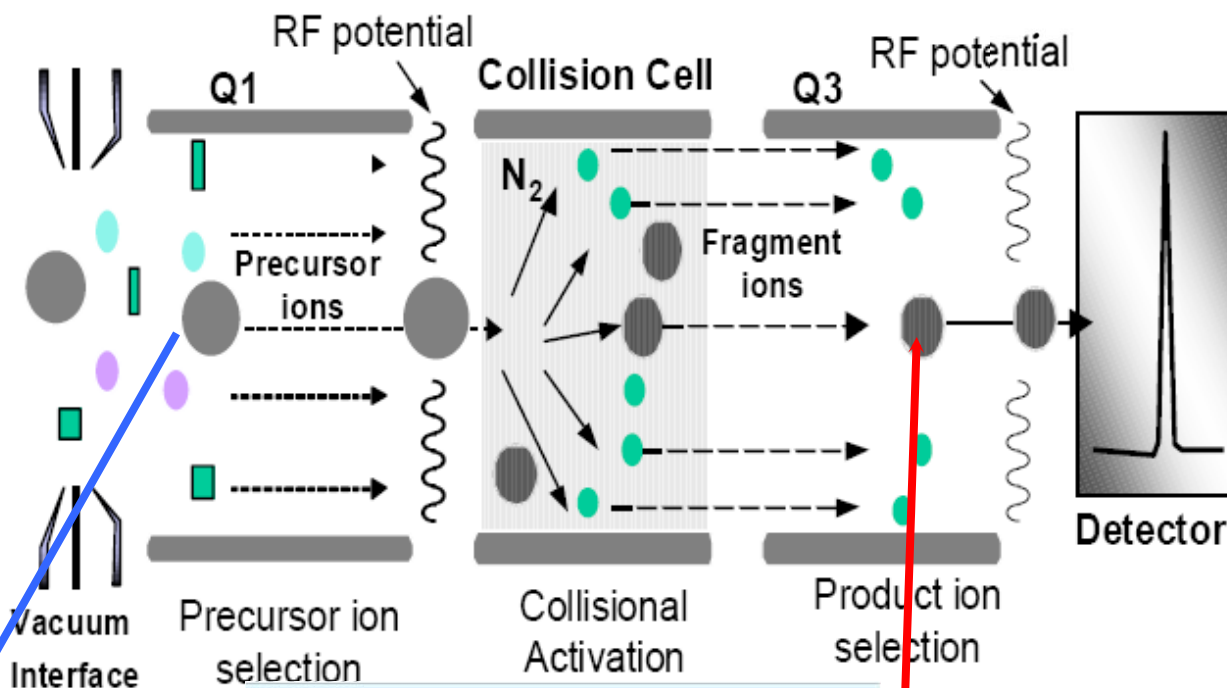


Quantification de l'héparane sulfate (GAG) par MS/MS

Mass Analysis

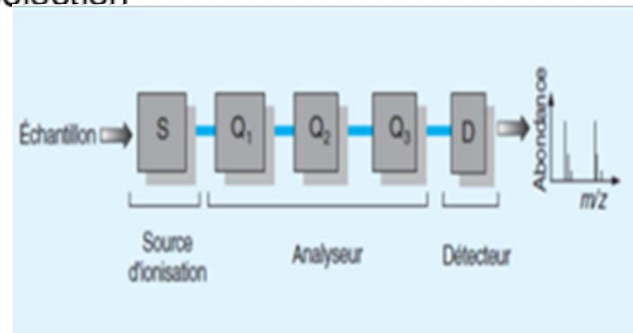
Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Dégradation chimique



m/z 384,2

Ion parent

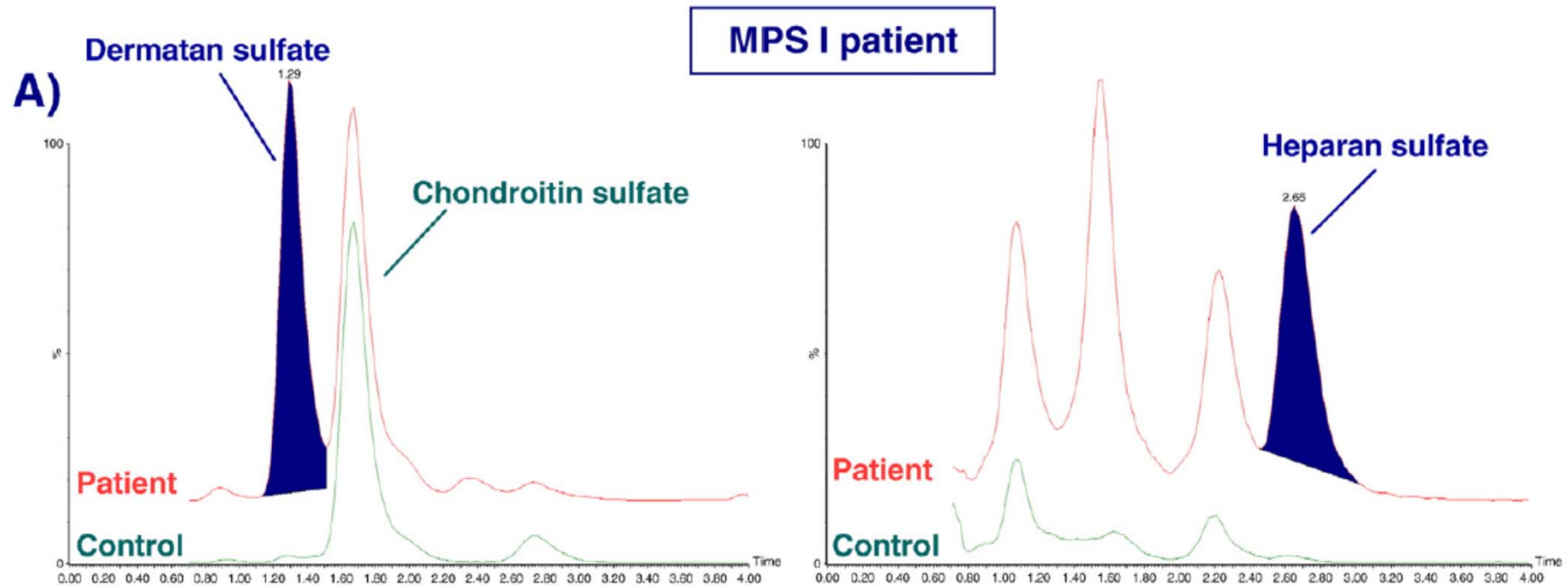


m/z 161,9

Ion fils



Chromatogrammes (MRM) des disaccharides méthylés obtenus par méthanolyse des GAG (DS et HS)



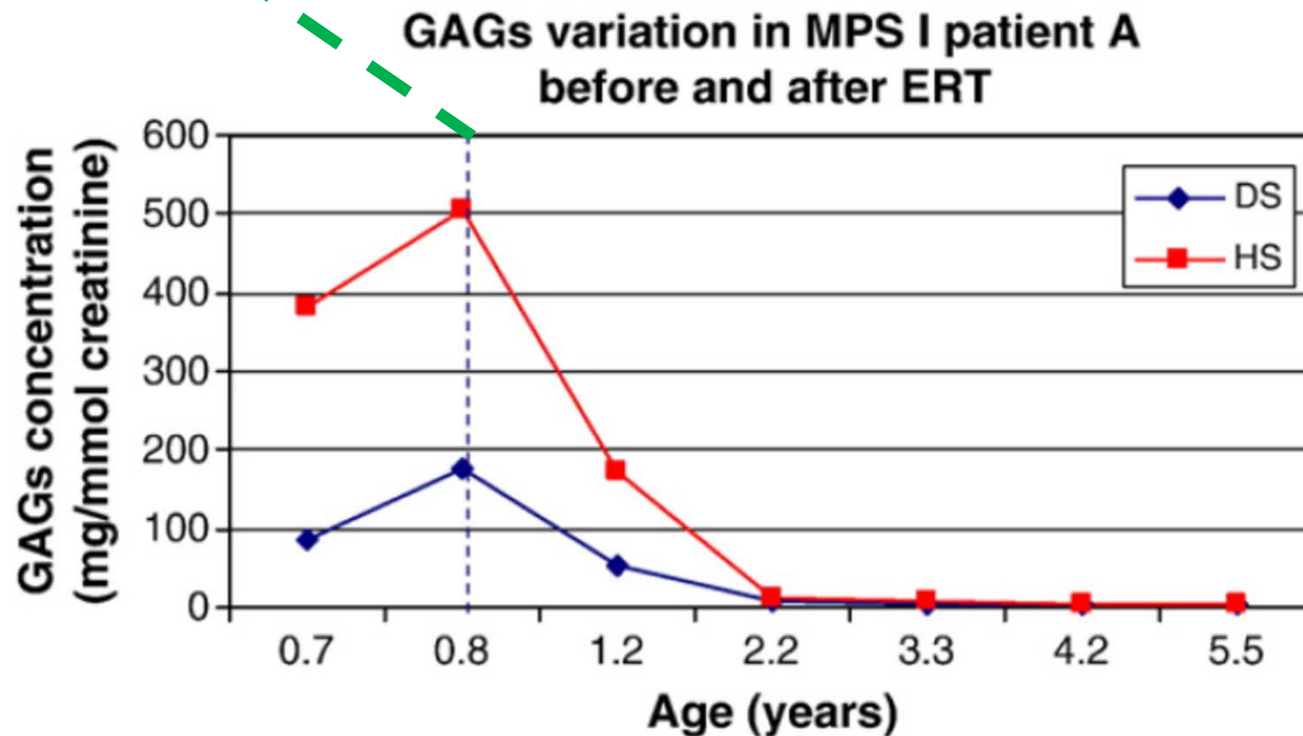
(A) Urine d'un enfant de 8 ans MPS I vs urine contrôle



Quantification des différents types de glycoaminoglycanes (GAG) par MS/MS : Suivi thérapeutique

Début de l'enzymothérapie

C. Auray-Blais et al. / *Molecular Genetics and Metabolism* 102 (2011) 49-56



Variation du dermatane sulfate et héparane sulfate urinaires chez un patient MPS I sous enzymothérapie



Diagnostic des Mucopolysaccharidoses

Diagnostic cytologique : surcharge

-Frottis sanguin : lymphocytes vacuolés
Anomalies ni constantes ni spécifiques

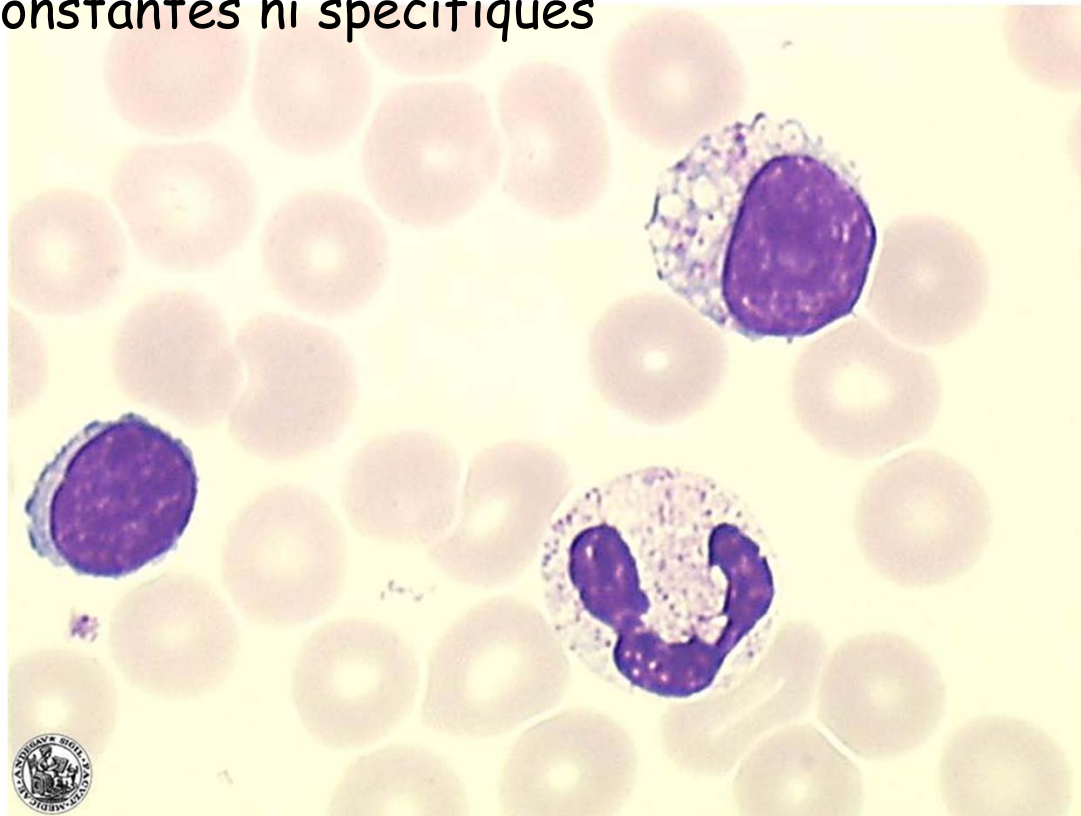
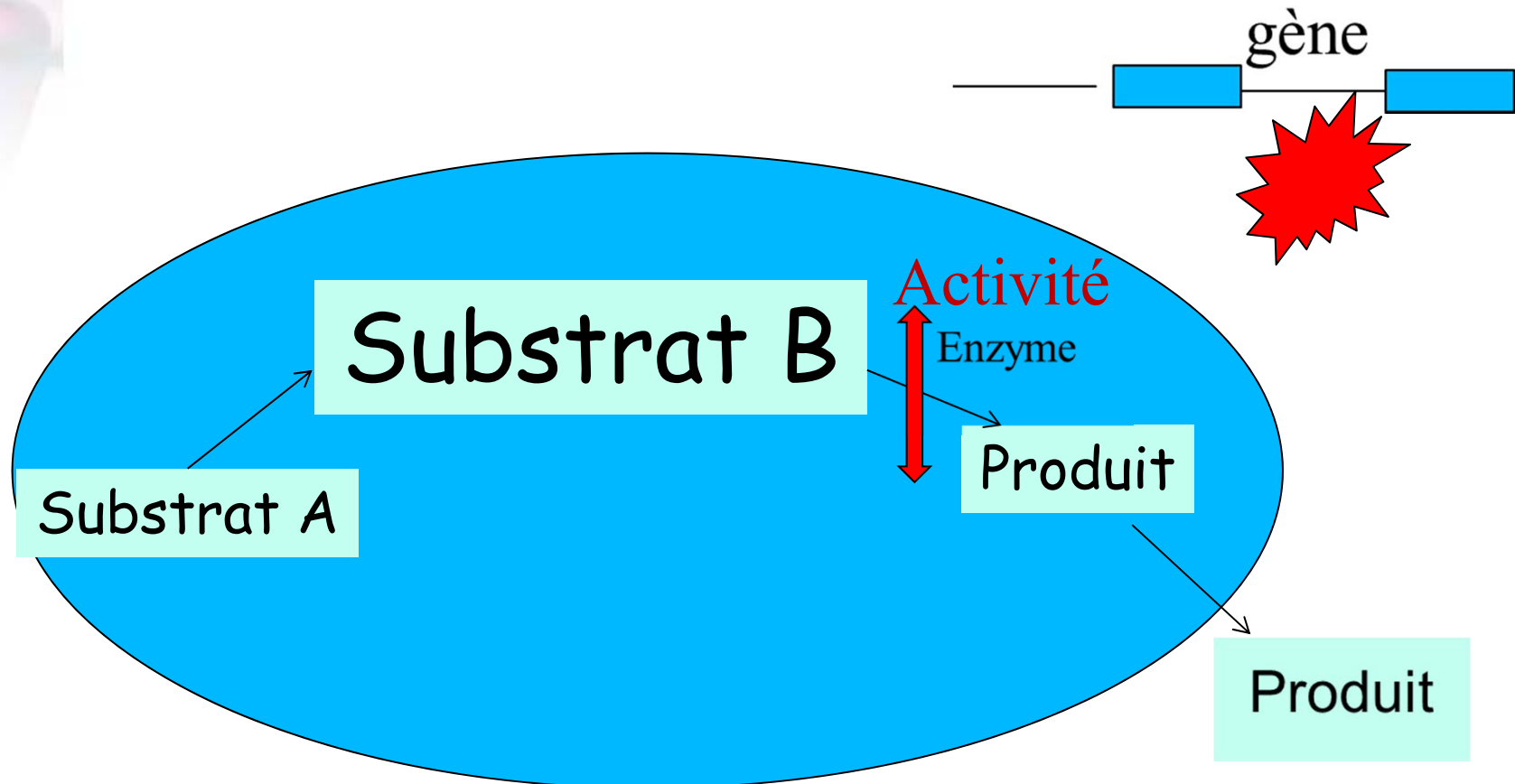


Figure 2. Cellule de Gasser. Lymphocyte vacuolé dont les vacuoles sont centrées par une inclusion plus ou moins volumineuse, de teinte violet-noir à la coloration de May-Grünwald-Giemsa, caractéristique des mucopolysaccharidoses excepté le type IV.



Mucopolysaccharidoses: comment explorer ?





Diagnostic biologique des MPS

Diagnostic d'orientation

Analyse quantitative des *GAG* urinaires
Analyse qualitative des *GAG* urinaires: séparation des types de *GAG*



Mesure d'activités enzymatiques

Leucocytes, fibroblastes, DBS,...





Mesure d'activités enzymatiques lysosomales

1- Approche classique (leucocytes, fibroblastes) :

2- Dosage à partir de sang séché sur papier buvard

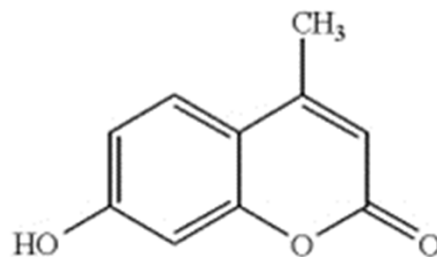




Mesure d'activités enzymatiques lysosomales

1- Approche classique (leucocytes, fibroblastes) : Fluorimétrie

- Utilisation de substrats spécifiques
- Substrats synthétiques couplés à la 4-méthylumbelliférolone (4MU) spécifiques pour chaque enzymes



(4MU)





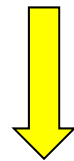
Mesure d'activités enzymatiques

Exemple : GALNS

1- Approche classique (leucocytes, fibroblastes): Fluorimétrie

- Exemple du dosage de l'activité β -D galactoside-6-sulfatase (GALNS)

4-methylumbelliferyl- β -D galactoside-6-sulfate
(MU- β Gal-6S)

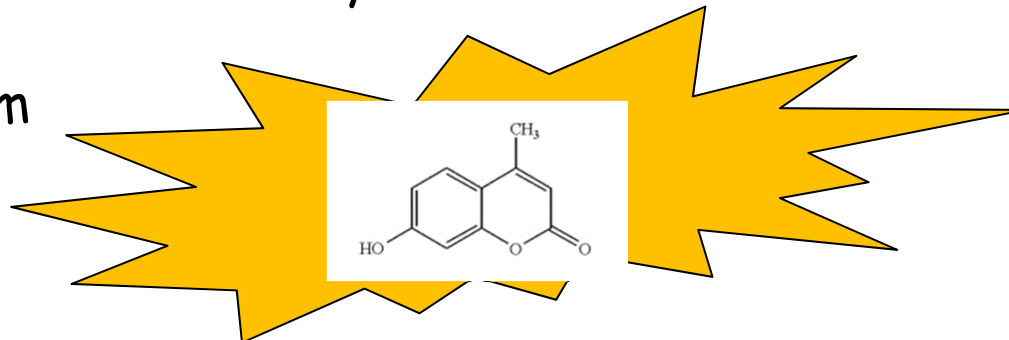


(GALNS)

4-methylumbelliferone

λ emi 442 nm

λ exc 366 nm





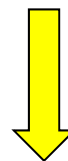
Mesure d'activités enzymatiques

Exemple : GALNS

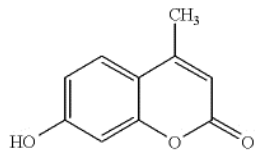
1- Approche classique (leucocytes, fibroblastes): Fluorimétrie

- Exemple du dosage de l'activité β -D galactoside-6-sulfatase (GALNS)

4-methylumbelliferyl- β -D galactoside-6-sulfate
(MU- β Gal-6S)



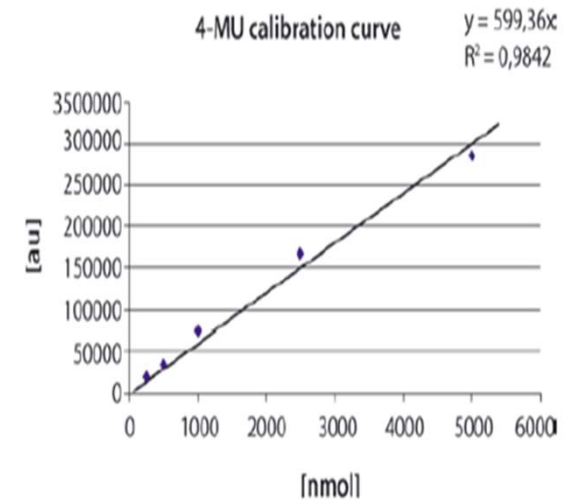
(GALNS)



4-methylumbelliferone

λ exc 366 nm

λ emi 442 nm





Mesure d'activités enzymatiques lysosomales



2- Dosage à partir de sang séché sur papier buvard

- Fluorimétrie
- LC-MS/MS (multiplex)
- Application au dépistage néonatal (DNN)
- Avantage du sang séché sur papier buvard
 - faible volume échantillon
 - facilité de transport
 - application au DNN
 - confirmation par une approche classique

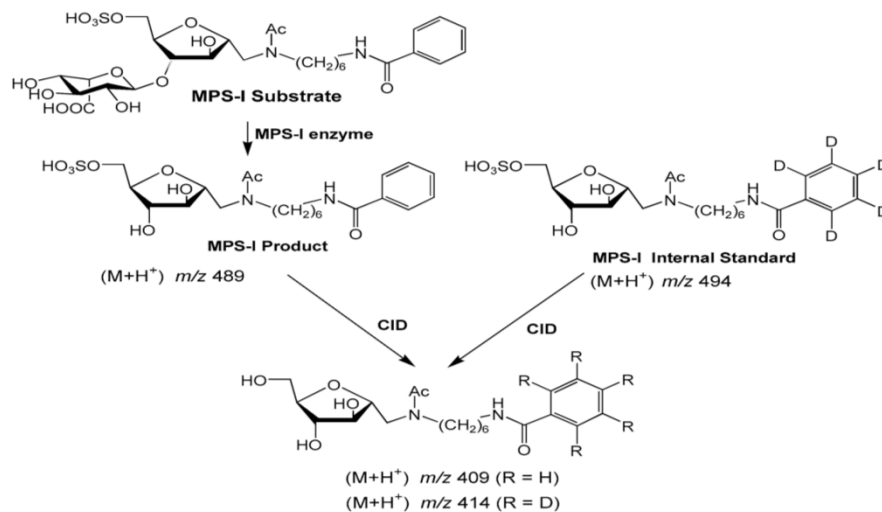


Mesure d'activités enzymatiques lysosomales par MS/MS

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

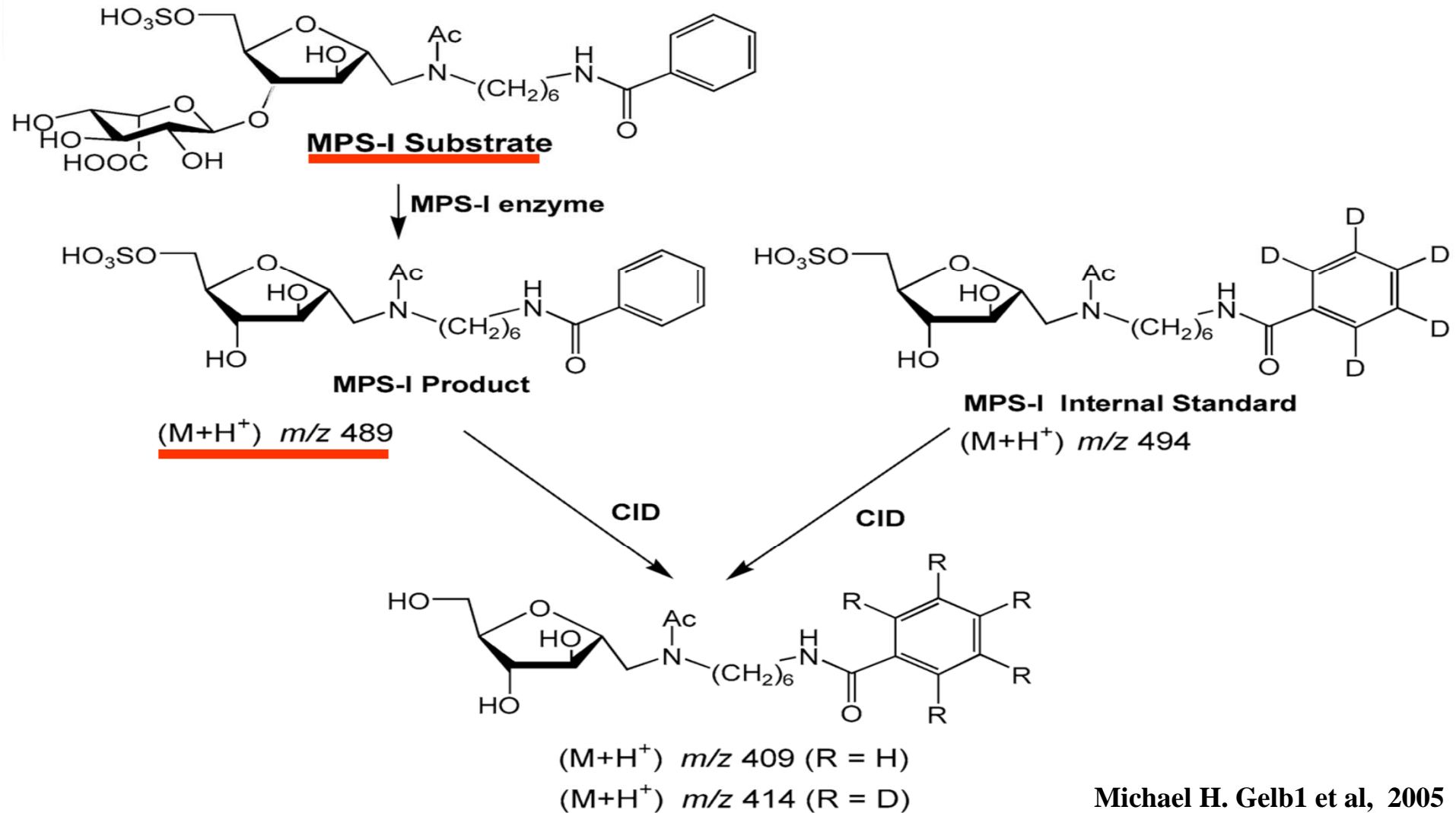
Exemple : Application au dosage de l'activité enzymatique α -L-iduronidase

- Diagnostic de la mucopolysaccharidose de Type I (Hurler).



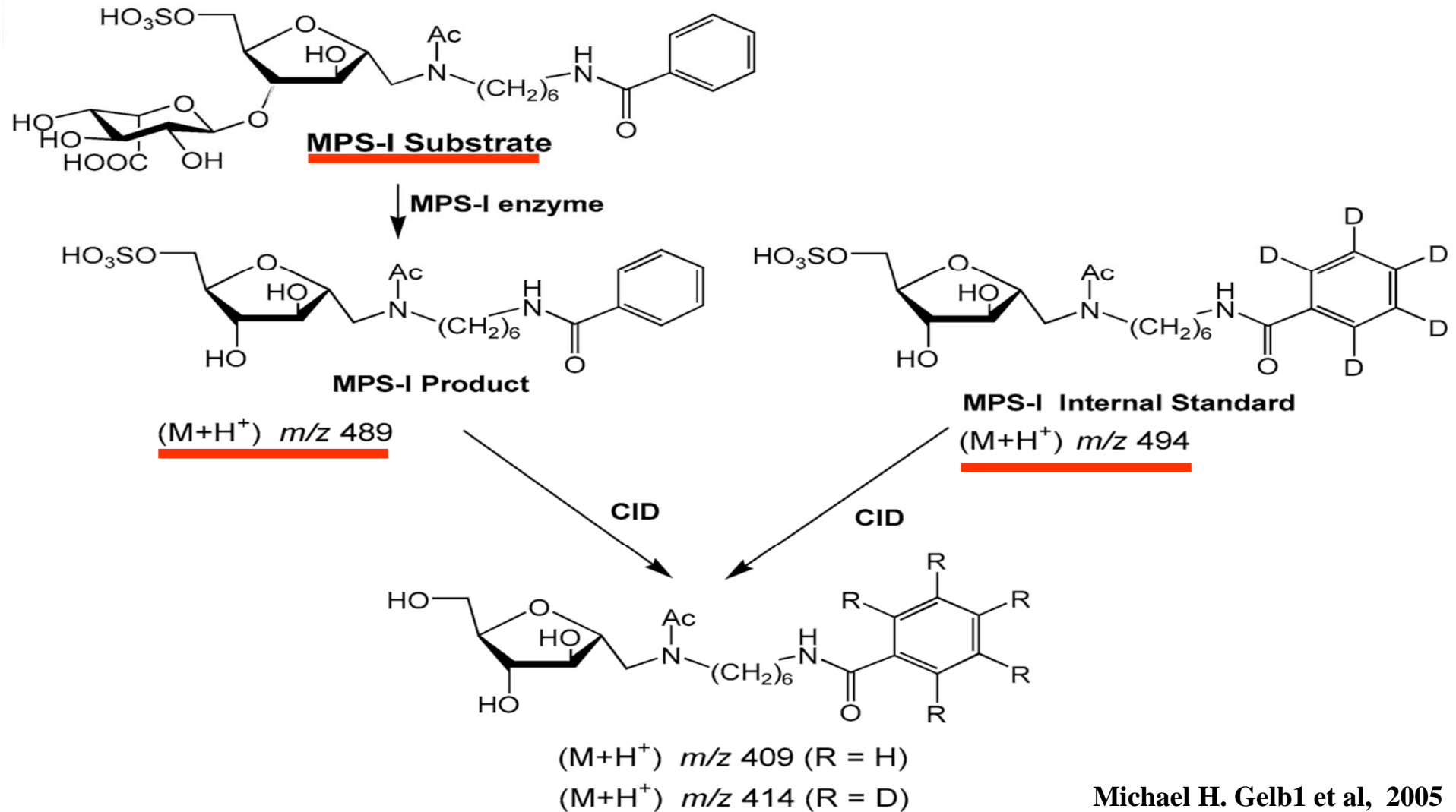


Mesure d'activités enzymatiques lysosomales par MS/MS



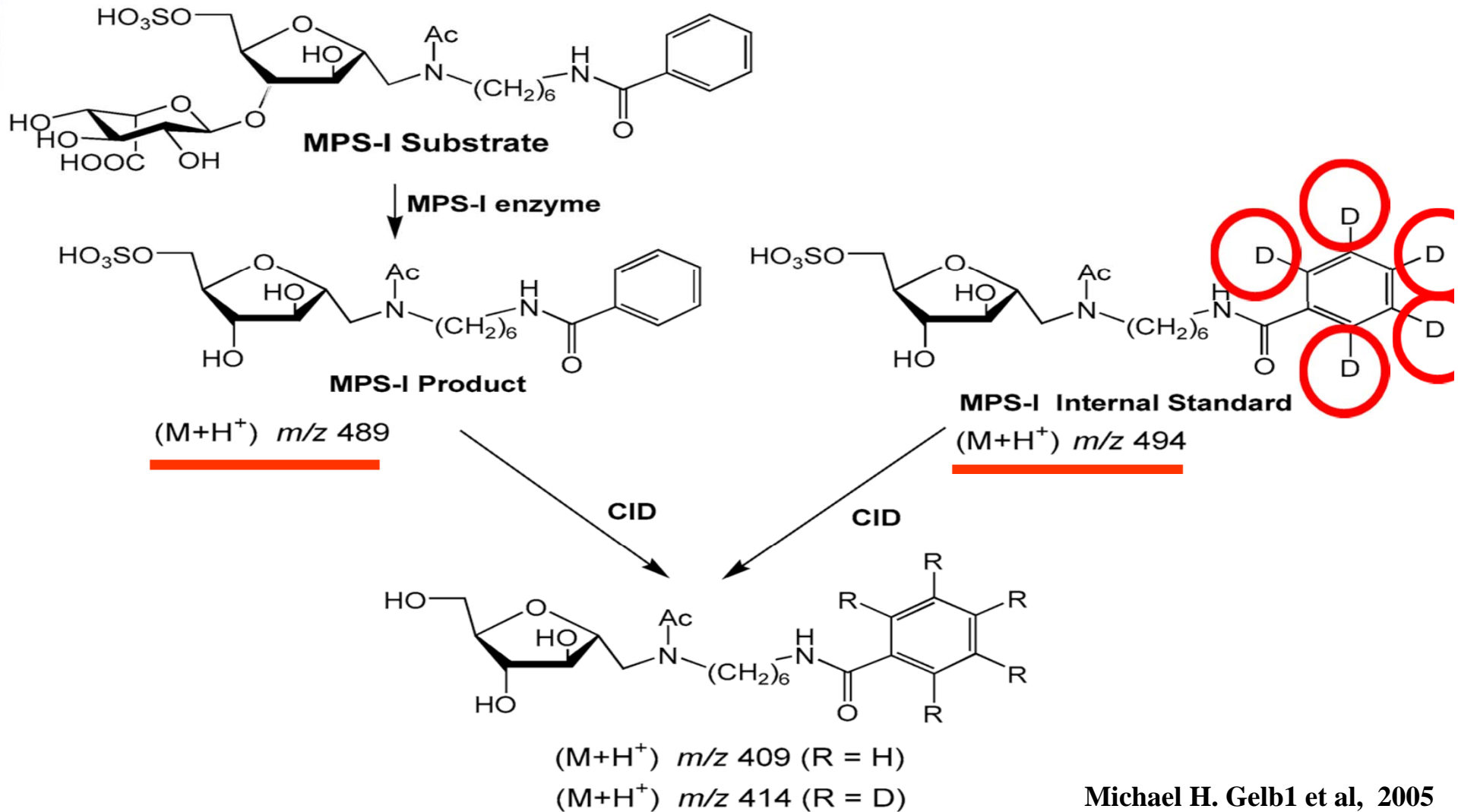


Mesure d'activités enzymatiques lysosomales par MS/MS



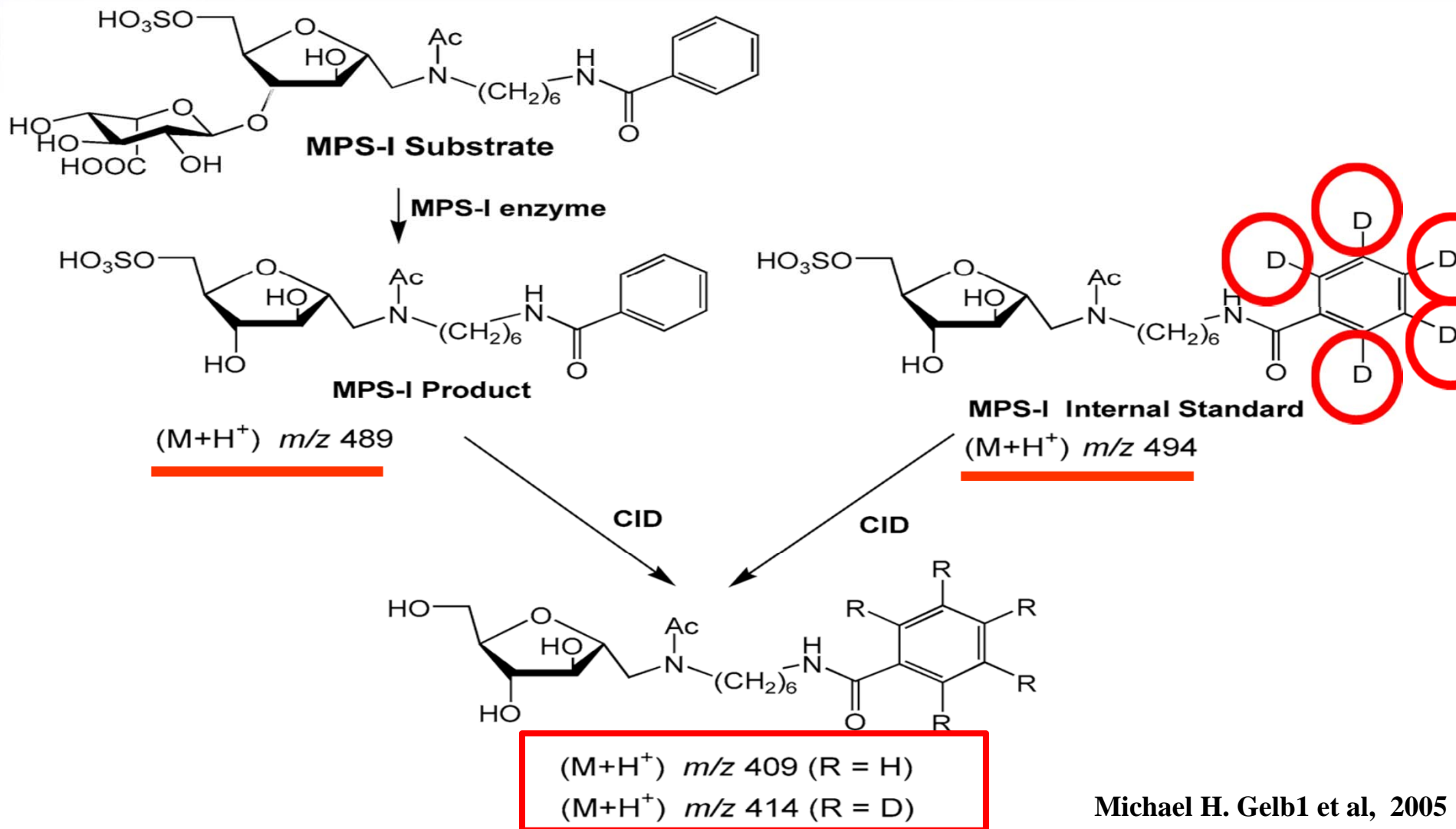


Mesure d'activités enzymatiques lysosomales par MS/MS



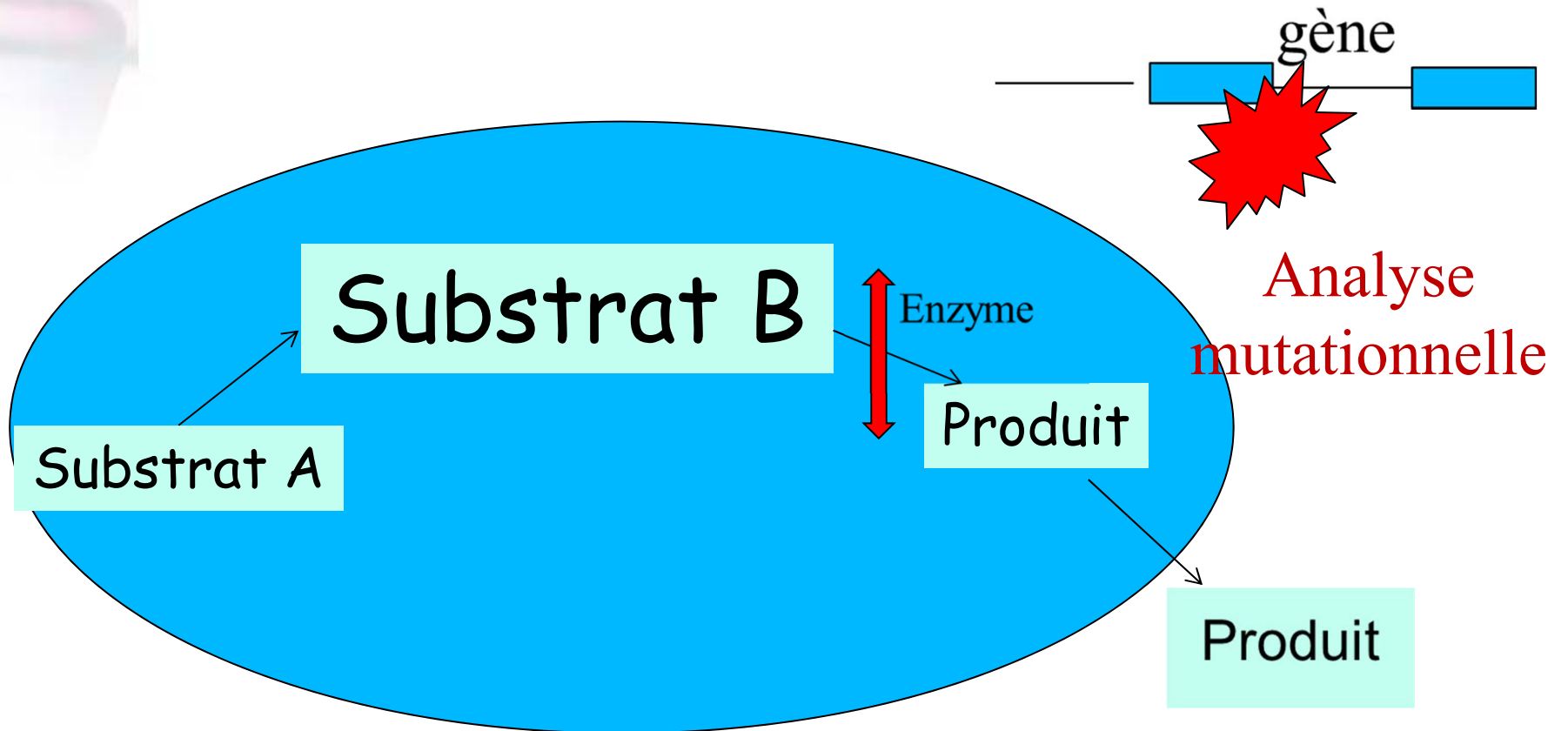


Mesure d'activités enzymatiques lysosomales par MS/MS





Mucopolysaccharidoses: comment explorer ?





Diagnostic biologique des MPS

Screening urinaires

Analyse quantitative des *GAG* urinaires
Analyse qualitative des *GAG* urinaires: séparation des types de *GAG*



Mesure d'activités enzymatiques

Leucocytes, fibroblastes, DBS,...



Analyses moléculaires



Les Mucopolysaccharidoses

Analyses moléculaires

Tableau I.
Les MPS : enzymes déficientes, métabolites accumulés et gènes impliqués.

MPS	Nom courant	Enzyme déficiente	Glycosaminoglycane(s) accumulé(s)	Nom du gène	Localisation du gène
MPS I	Hurler/Scheie	α -L-iduronidase	Dermatane sulfate Héparane sulfate	<i>IDUA</i>	4p16.3
MPS II	Hunter	Iduronate-2-sulfatase	Dermatane sulfate Héparane sulfate	<i>IDS</i>	Xq28
MPS III A	Sanfilippo A	Héparane N-sulfatase	} Héparane sulfate	<i>SGSH</i>	17q25.3
MPS III B	Sanfilippo B	α -N-acétylglucosaminidase		<i>NAGLU</i>	17q21
MPS III C	Sanfilippo C	Acétyl-CoA: α -glucosaminide-N-acétyltransférase		<i>HGSNAT</i>	8p11.1
MPS III D	Sanfilippo D	N-acétylglucosamine-6-sulfatase		<i>GNS</i>	12q14
MPS IV A	Morquio A	Galactose-6-sulfatase	Kératane sulfate Chondroïtine sulfate	<i>GALNS</i>	16q24.3
MPS IV B	Morquio B	β -galactosidase	Kératane sulfate	<i>GLB1</i>	3p21-33
MPS VI	Maroteaux-Lamy	Arylsulfatase B (N-acétylgalactosamine 4-sulfatase)	Dermatane sulfate Chondroïtine sulfate	<i>ARSB</i>	5q11-q13
MPS VII	Sly	β -glucuronidase	Dermatane sulfate Héparane sulfate Chondroïtine sulfate	<i>GUS</i>	7q21.11
MPS IX		Hyaluronidase	Acide hyaluronique	<i>HYAL1</i>	3p21.3-p21.2



Les Mucopolysaccharidoses

Analyses moléculaires

Tableau I.
Les MPS : enzymes déficientes, métabolites accumulés et gènes impliqués.

- sur sang total (ADN génomique)
- sur cellules en culture
- sur trophoblaste

- Hétérogénéité moléculaires
- Corrélation génotype-phénotype difficiles

- Intérêt :
 - Étude familiale
 - Conseil génétique
 - Dic anténatal

Nom du gène	Localisation du gène
<i>IDUA</i>	4p16.3
<i>IDS</i>	Xq28
<i>SGSH</i>	17q25.3
<i>NAGLU</i>	17q21
<i>HGSNAT</i>	8p11.1
<i>GNS</i>	12q14
<i>GALNS</i>	16q24.3
<i>GLB1</i>	3p21-33
<i>ARSB</i>	5q11-q13
<i>GUS</i>	7q21.11
<i>HYAL1</i>	3p21.3-p21.2



Lana née le 12/05/2011



Lana, née le 12/05/2011

4 ans

Née à terme à 40SA
PDN=3450g,

2e enfant de la fratrie

Grossesse et accouchement RAS

Allaitement maternel exclusif jusqu'à 3 mois et demi
Relai par Lait 1age sans réaction

Diversification alimentaire débutée à 6 mois sans réaction



Lana, née le 12/05/2011

4 ans

Admise aux urgences pédiatrique pour un tableau digestif pseudo-occlusif



Lana, née le 12/05/2011

4 ans

Admise aux urgences pédiatrique pour un tableau digestif pseudo-occlusif

Limitation articulaire multiples, enraidissements articulaires multiples au niveau des doigts, des articulations inter-phalangiennes proximales et distales avec un aspect débutant des mains en griffe



Copyright © Medical Education Corpus



Copyright © Medical Education Corpus



Lana, née le 12/05/2011

4 ans

Dysmorphie
ensellure nasale marquée
narines un peu large et antéversées
Lèvres un peu épaisses

Abdomen proéminent, hypotonique,
hernie ombilicale

Otites séro-muqueuses à répétition





Lana, née le 12/05/2011

Diagnostic MPS type 1 H/S

MPS urinaires

MALADIES HEREDITAIRES DU METABOLISME

DEPISTAGE NEONATAL ET NUTRITION

Dr I. Redonnet-Vernhet Dr S. Mesli Dr B. Rucheton Tel 20155

Dosage des mucopolysaccharides urinaires

(Par technique spectrophotocolorimétrique au DMB)

CREATININE urinaire 1,91 mmol/L

AU - Beckman-Coulter

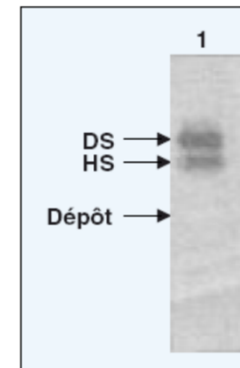
MUCOPOLYSACCHARIDES 66,7 mg/l

Prélèvement expédié à Toulouse (Pr Levade) pour électrophorèse.

Taux élevé en faveur d'une mucopolysaccharidose.

Soit * 34,92 mg/mmol cr N: 10,00 - 13,00

Dermatane et héparane sulfate



Electrophorèse monodimensionnelle
sur acétate de cellulose des GAG purifiés

α -L-Iduronidase Leucocytaire

Effondrée

Confirmation par analyse moléculaire du gène *IDUA*



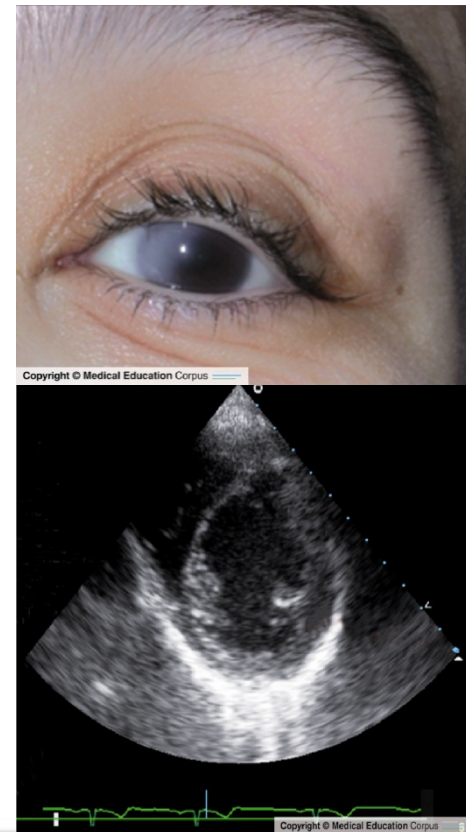
Lana, née le 12/05/2011

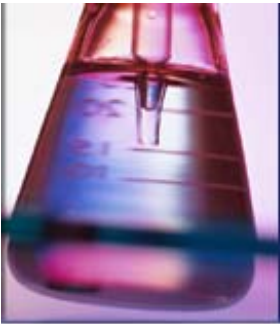
4 ans

Canal carpien bilatéral (électromyogramme)

Opacité cornéenne

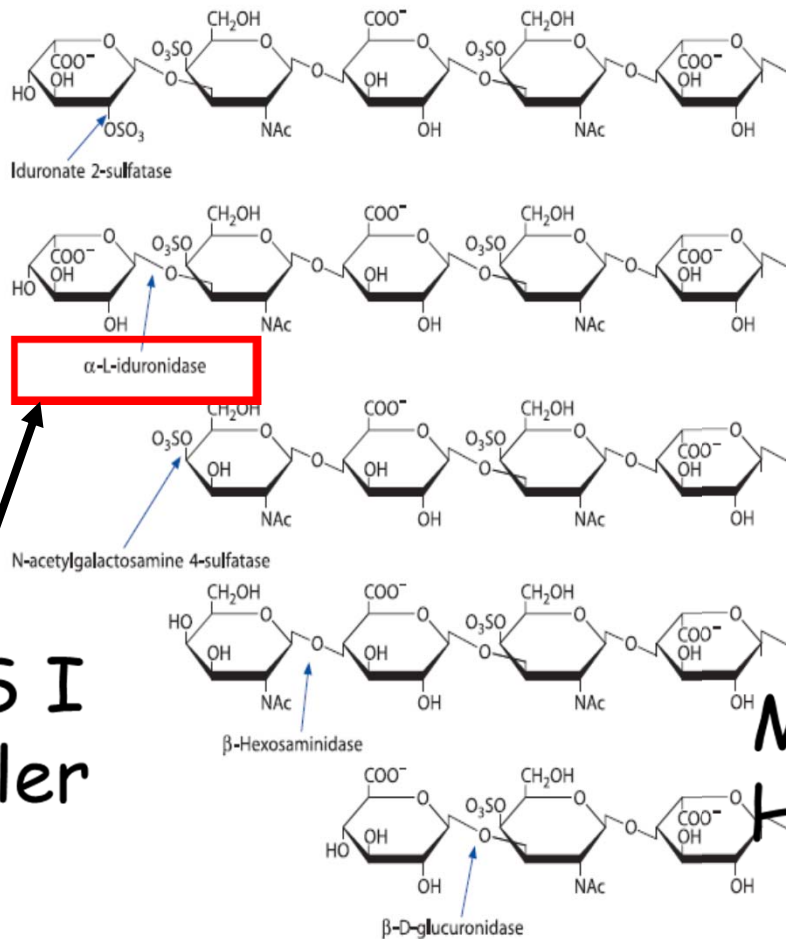
Epaississement de la valve mitrale





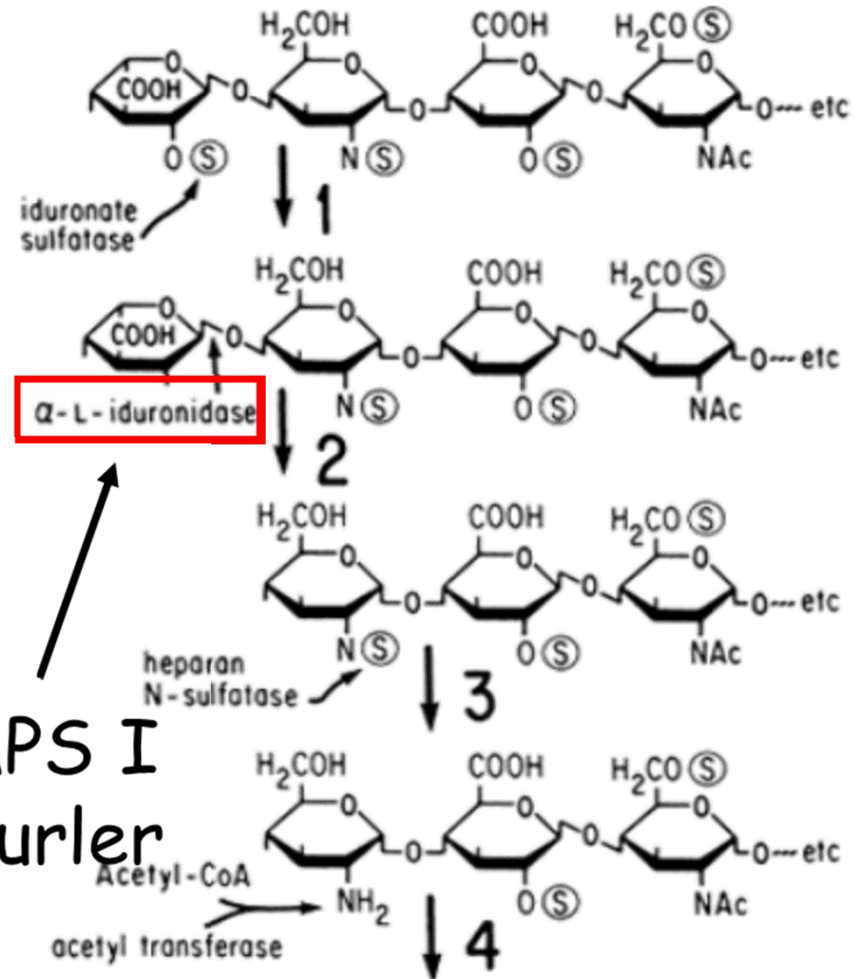
Catabolisme du Dermatane sulfate et Héparane sulfate

Dermatane sulfate



MPS I
Hurler

Héparane sulfate



MPS I
Hurler



Lana, née le 12/05/2011

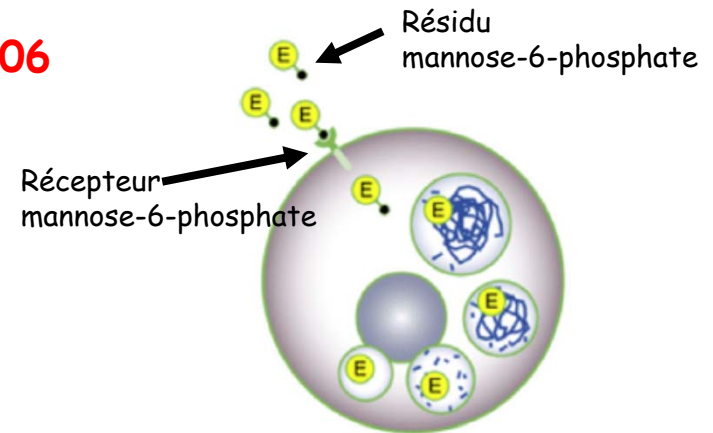
Enzymothérapie substitutive par perfusions hebdomadaires
(**ALDURAZYME**), débutée en juin 2015



MPS : traitements disponibles

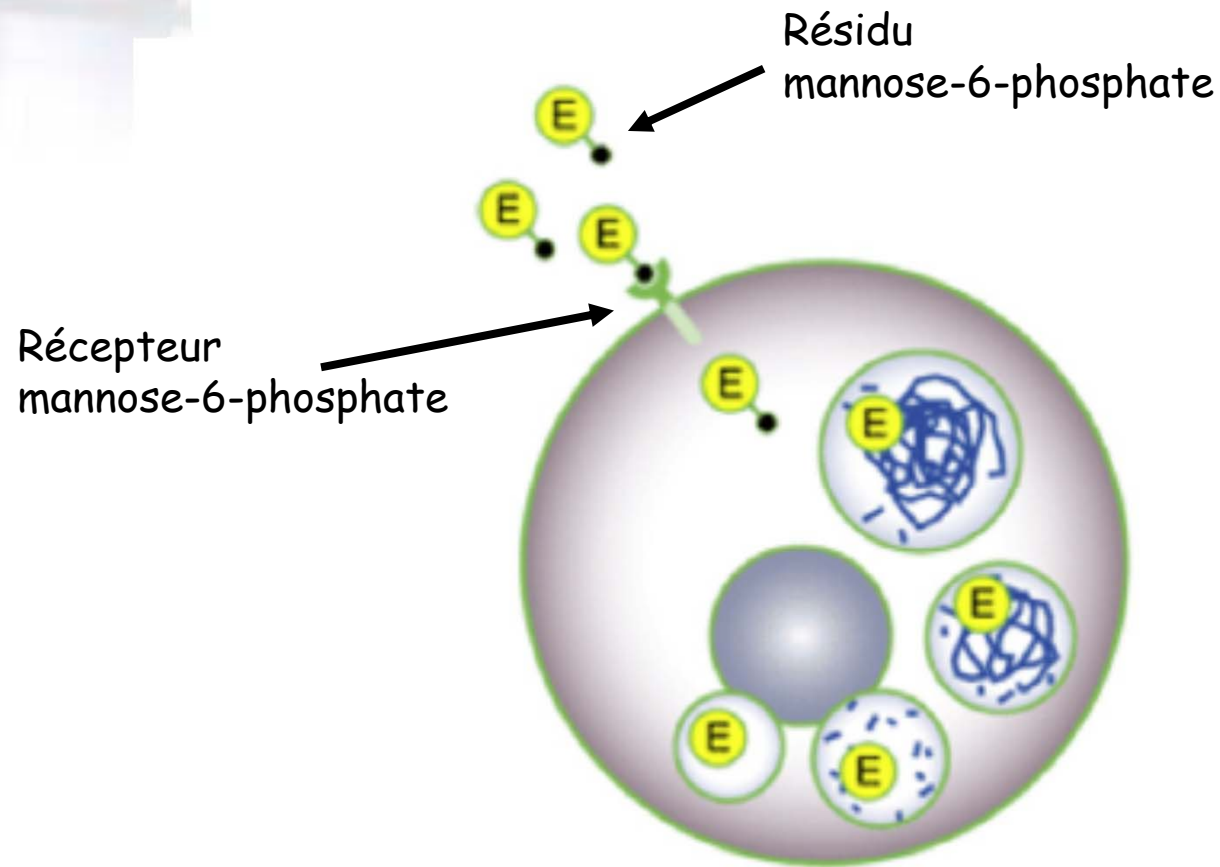
Traitement par enzymothérapie est disponible pour :

- Maladie de Hurler/Scheie (MPS I) : **2003**
- Maladie de Maroteaux-Lamy (MPS VI) : **2005-2006**
- Maladie de Hunter (MPS II) : **2006 2007**
- Maladie de Morquio A (MPS IVA) : **2014**





Principe de fonctionnement de l'enzymothérapie substitutive





Lana, née le 12/05/2011

Enzymothérapie substitutive par perfusions hebdomadaires
(**ALDURAZYME**), débutée en juin 2015

Séances de kinésithérapie afin de lutter contre les rétractions
articulaires

Suivi en consultation multidisciplinaire des maladies lysosomales
annuelle

ORL, consultation cardiaque, bilan ophtalmologique et également
radiographie du rachis.



Effacité de l'enzymothérapie débutée précocement : Exemple de la MPS I





Fatma, née le 04/09/2009



Fatma, née le 04/09/2009

4 ans

3° enfant

Parents cousins germains

Motif de la Consultation

- Genu valgum
- Cyphose dorso-lombaire

Grossesse, accouchement RAS
2kg560 à la naissance.

Hospitalisée à 3 mois pour
bronchiolite

Deux frères 7 et 5 ans en bonne
santé





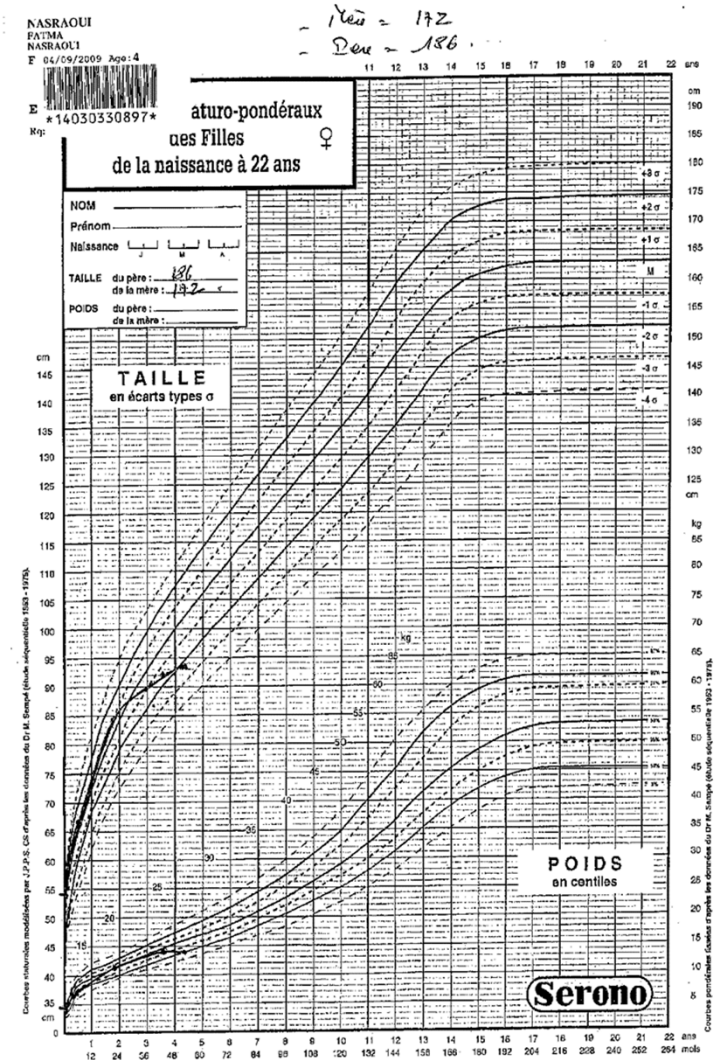
Fatma, née le 04/09/2009

Cassure staturo-pondérale

Retard de langage

Dysmorphie

- Traits discrètement épaissis
- hypertélorisme
- ensellure nasale aplatie
- cou enfoncé dans les
- épaules





Fatma, née le 04/09/2009

Anomalies orthopédiques

Cypho-scoliose

Cage thoracique déformée

Pectus excavatum

Genu valgum





Fatma, née le 04/09/2009

Diagnostic MPS type 4: Morquio

MPS urinaires

Dosage des mucopolysaccharides urinaires
(Par technique spectrophotocolorimétrique au DMB)

CREATININE urinaire: 1,85 mmol/l

MUCOPOLYSACCHARIDES 37,0 mg/l

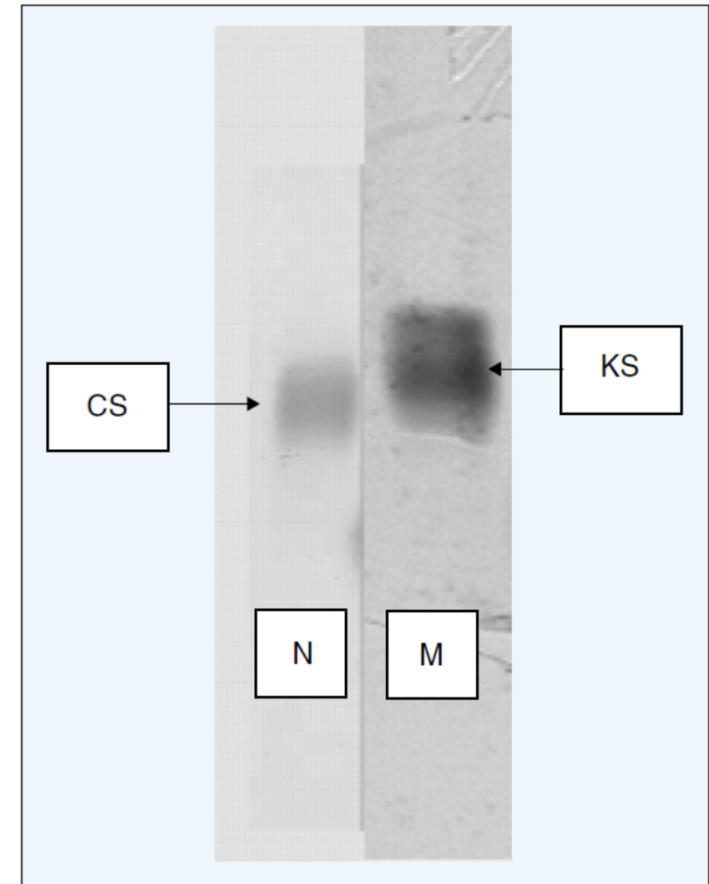
Taux augmenté des mucopolysaccharides: diagnostic de MPS.
Prélèvement expédié à Toulouse (Pr Levade) pour analyse qualitative.
Soit * 20,00 mg/mmol cr N: 10,00 - 13,00

Kératane sulfate +++

N-acétylgalactosamine-6-sulfate
sulfatase : Effondrée

Arylsulfatase B : Normale (éliminer
déficit multiple en sulfatases)

Analyse moléculaire du gène *GALNS*

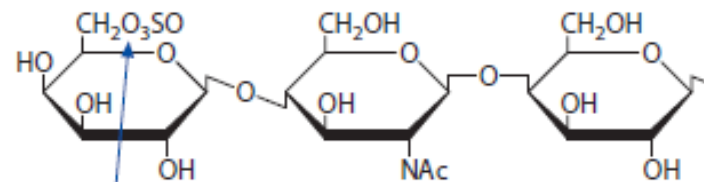
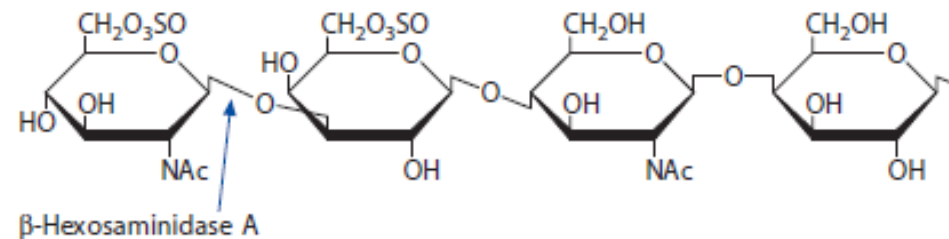


Electrophorèse monodimensionnelle sur
acétate de cellulose des GAG purifiés



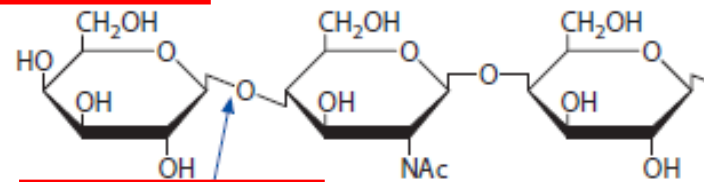
Défaut de Catabolisme du Kératane sulfate

Catabolism of keratan sulfate



MPS IV
Morquio A

Galactose 6-sulfatase
(Morquio syndrome A, MPS IVA)



beta-Galactosidase
(Morquio syndrome B, MPS IVB)

MPS IV
Morquio B



Fatma, née le 04/09/2009

Enzymothérapie substitutive par perfusions hebdomadaires de **VIMZIM** débutée en avril 2014

Séances de kinésithérapie afin de lutter contre les rétractions articulaires

Cyphose segmentaire appareillée depuis février 2015

Surdité bilatérale appareillée depuis février 2015

Suivi en consultation multidisciplinaire des maladies lysosomales annuelle (ORL, consultation cardiaque, bilan ophtalmologique...)



Evolution

7 ans, 99 cm/17 kgs, CE1

Stabilisation de la maladie sous enzymothérapie
Vimizim[®] - élosulfase alfa
Une fois / semaine

Dernière IRM 06/2017

Stabilité des aspects morphologiques osseux et des rétrécissements canaux étagés prédominant au niveau cervical.

Absence d'argument en faveur d'une compression médullaire



LES MALADIES LYSOSOMALES

LIPIDOSES

- Maladie d'Austin
- Maladie de Fabry
- Maladie de Farber
- Maladie de Gaucher
- Maladie de Landing (GM1)
- Maladie de Tay-Sachs et Sandhoff (GM2)
- Maladie de Krabbe
- Leucodystrophie métachromatique
- Maladies de Niemann-Pick type A/B
- Maladie de Niemann-Pick C
- Maladie de Wolman

CEROIDE-LIPOFUSCHINOSES

DEFICIT TRANSPORTEURS

- Cystinose
- Maladie de Danon
- Maladie de Salla

GLYCOGENOSE

- Maladie de Pompe (Glycogénose type 2)

MUCOPOLYSACCHARIDOSES

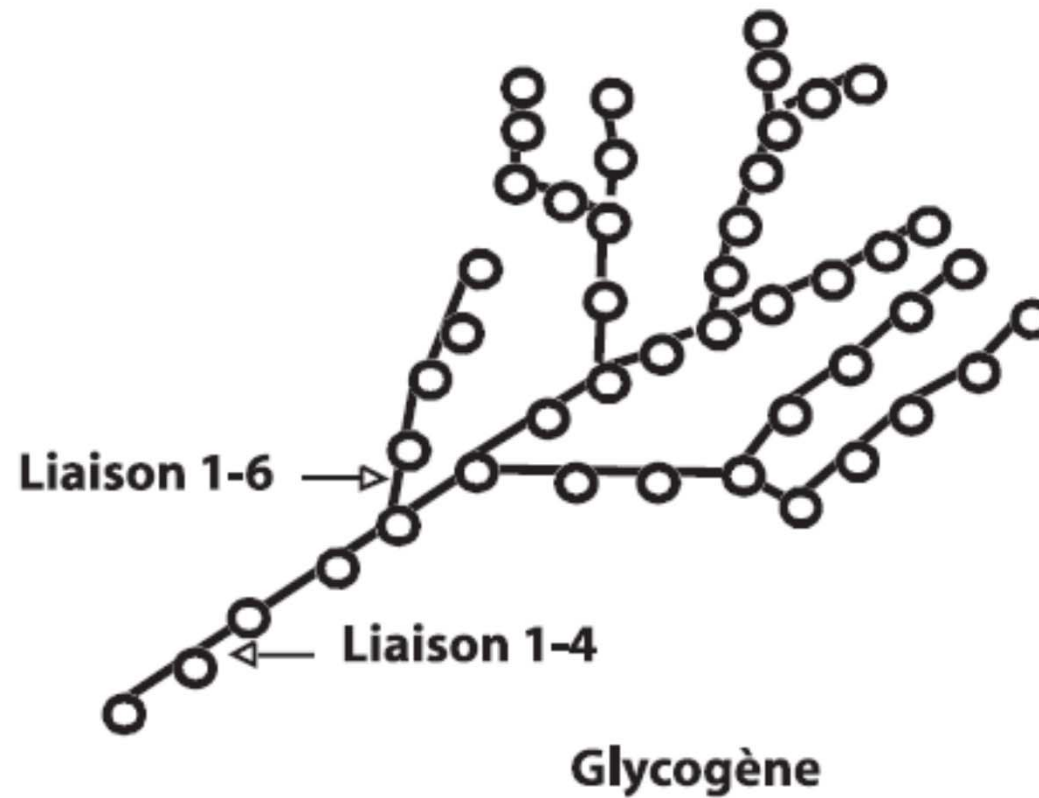
- Maladie de Hurler/Scheie (MPS IH/S)
- Maladie de Hunter (MPS II)
- Maladie de Sanfilippo (MPS III A, B, C, D)
- Maladie de Morquio A (MPS IVA)
- Maladie de Maroteaux-Lamy (MPS VI)
- Maladie de Sly (MPS VII)
- Mucopolysaccharidose de type IX

GLYCOPROTEINOSES

- Aspartylglucosaminurie
- Fucosidose
- a mannosidose
- b mannosidose
- Sialidose et galactosialidose
- Maladie de Schindler et Kanzaki
- Mucopolysaccharidose type II et III
- Mucopolysaccharidose de type IV

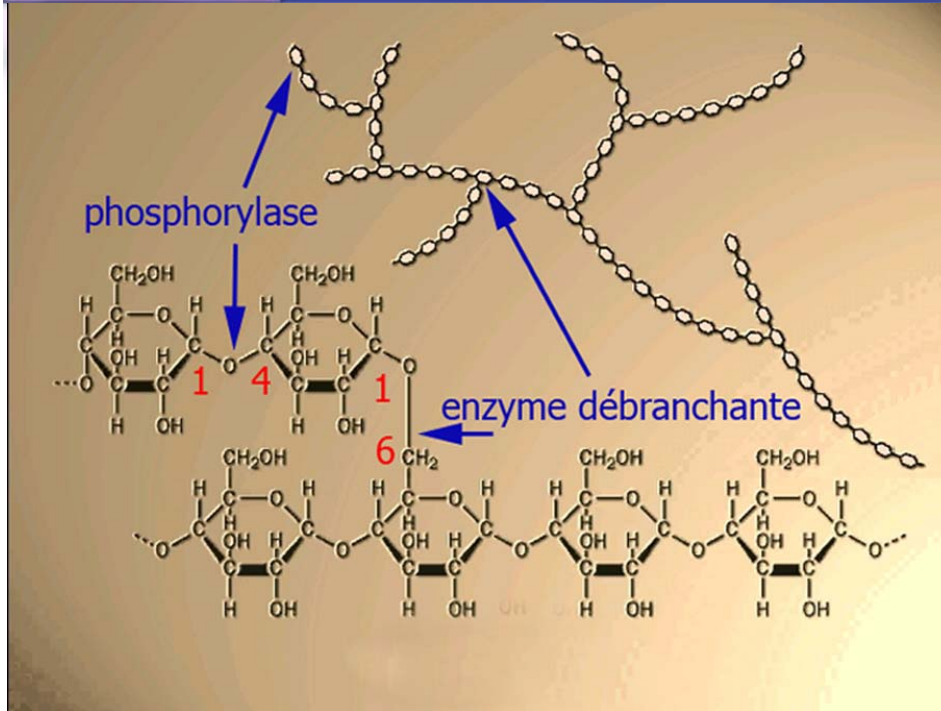


Glycogène



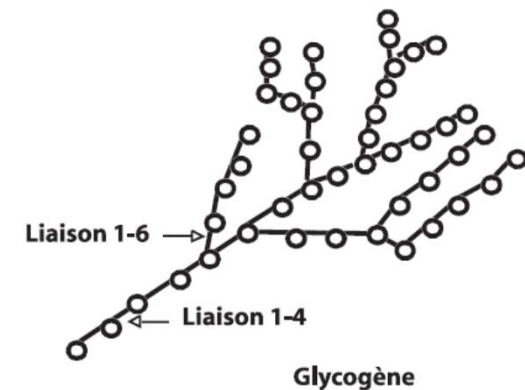


Glycogénolyse



Dégradation du glycogène

3% : autophagie du glycogène
dans le lysosome puis dégradation
Par l'alpha-glucosidase acide



97% : cytoplasme

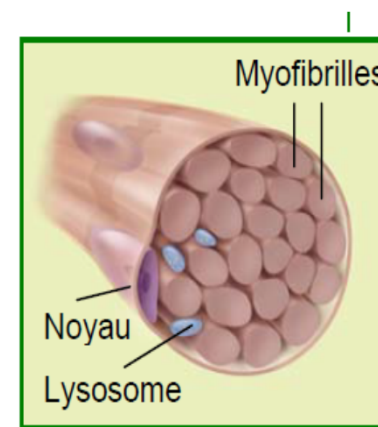
Coupe 1-4 : phosphorylase: Déficit : maladie de Mc Ardlé

Puis coupe 1-6 : amylo 1-6 glucosidase : Déficit : maladie de Forbes

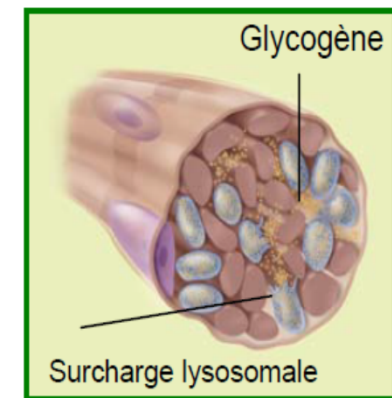


Maladie de Pompe

- La glycogénose de type II ou maladie de Pompe:
- Du nom du médecin néerlandais qui l'a décrite pour la première fois en 1932
 - Filles âgée de 7 mois
 - Hypotonie sévère
 - Cardiomyopathie hypertrophique
- Transmission AR
- Incidence 1/40000
- 1/14000 population afro américaines
- Glycogénoses musculaires et
- C'est aussi une maladie lysosomale
- Déficit en alpha-glucosidase acide
- ou maltase acide (GAA)
- Accumulation excessive de glycogène dans les lysosomes
- des cellules de différents organes (cœur, foie, muscle...).



Fibre musculaire normale (cellule)



Fibre musculaire affectée (cellule)



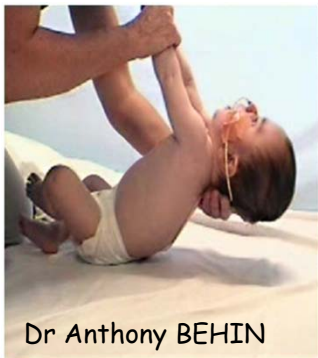
Glycogénose de type II / maladie de Pompe : Spectre clinique

Activité résiduelle de α -glucosidase acide (GAA)

GAA < 1%

Maladie de Pompe
(forme infantile)

- début avant 5 mois
- cardiomyopathie,
- hypotonie,
- hépatomégalie
- macroglossie
- décès d'insuffisance cardio-respiratoire < 1 an



Dr Anthony BEHIN



GAA 2 à 6%

Forme juvénile

- début dans l'adolescence
 - myopathie \pm cardiomyopathie
- GAA 2 to 6%



GAA 7-23 %

Forme adulte

- début après l'âge de 20 ans
 - myopathie des ceintures \pm ins. respiratoire
- GAA 7-23 %





Diagnostic biologique de la maladie de Pompe

1- CK

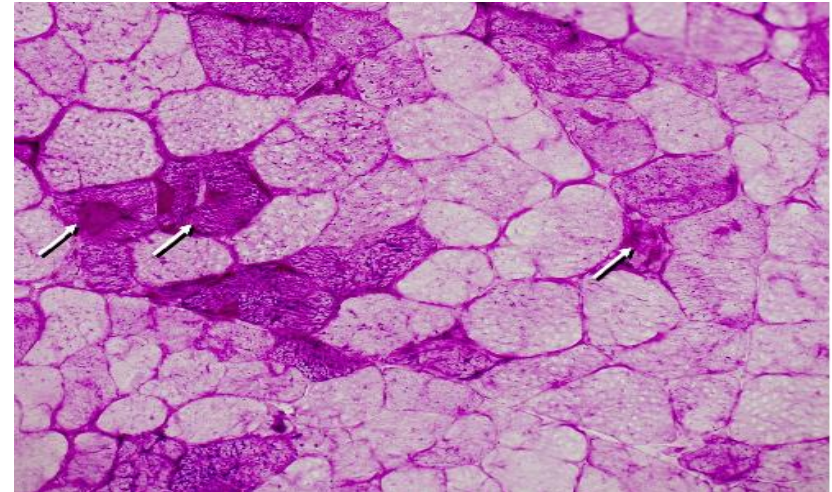
- Élevées (95%)
- inférieur à 5 fois les valeurs normales

2- Histologie musculaire

- Vacuoles : 2/3 cas seulement
- Surcharge en glycogène

3- Activité enzymatique alpha-glucosidase acide (GAA) (Biopsie musculaire leucocytes, lymphocytes, fibroblastes et DBS)

- Mesure de l'activité à pH acide (3.8-4.0),
- Substrat synthétique (jusqu' 2 mM)
- 4-methylumbelliferyl- α -d-glucoside.
- présence d'acarbose (3-9 μ M) pour inhiber l'isoenzyme maltase-glucoamylase.
- Mesure d'une activité enzymatique de reference/ qualité de l'échantillon



Biopsie musculaire (quadriceps, coloration PAS) : nombreux myocytes vacuolisés colorés par le PAS (flèches).

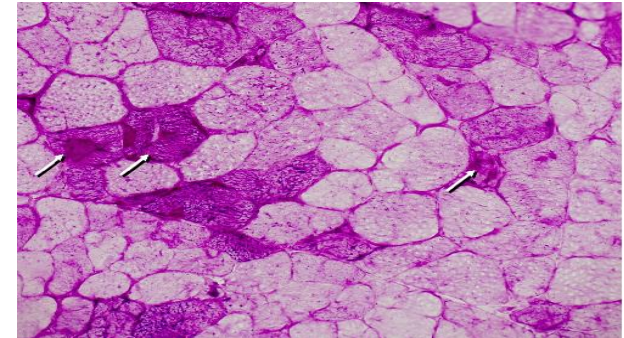


Diagnostic biologique de la maladie de Pompe

- CK
 - Élevées (95%)
 - inférieur à 5 fois les valeurs normales
- Histologie musculaire
 - Vacuoles : 2/3 cas seulement
 - Surcharge en glycogène
 - Parfois aspécifique

Activité enzymatique alpha-glucosidase
acide (GAA) (Biopsie musculaire
leucocytes, lymphocytes, fibroblastes et
DBS)

- Mesure de l'activité à pH acide (3.8-4.0),
- Substrat synthétique (jusqu' 2 mM)
- 4-methylumbelliferyl- α -d-glucoside.
- présence d'acarbose (3-9 μ M) pour inhiber l'isoenzyme maltase-glucoamylase.
- Mesure d'une activité enzymatique de référence/ qualité de l'échantillon



Biopsie musculaire (quadriceps, coloration PAS) : nombreux myocytes vacuolisés colorés par le PAS (flèches).



Diagnostic biologique de la maladie de Pompe

B. Winchester, Molecular
Genetics and Metabolism 93
(2008)

Acarbose
Inhibition de la MGA
(maltase gluco amyase)

Echantillon

Avantages

Inconvénients

DBS

Non invasive
Faible échantillonnage
Transport facile
Application au DNN
Interférence de la MGA

Oui

Leucocytes

Non invasive
Simple prélèvement
sanguin
Interférence de la MGA

Isolation des
leucocytes
Diminution de
l'activité
enzymatique >
48H

Oui

Lymphocytes

Non invasive
Simple prélèvement
sanguin

Etapes
supplémentaires
de purification

Recommandée
Cas de contamination par
des neutrophiles



Diagnostic biologique de la maladie de Pompe

B. Winchester, Molecular
Genetics and Metabolism 93
(2008)

Echantillon

Avantages

Inconvénients

Acarbose
Inhibition de la
MGA (maltase
gluco amylose)

Fibroblastes

Lignée cellulaire pour
génotypage et examens
complémentaires
Absence d'interférence
de la MGA

Invasive (Biopsie de
peau)
Résultats entre 4 et 6
semaines
Equipements spécifiques

Non

Biopsie
musculaire

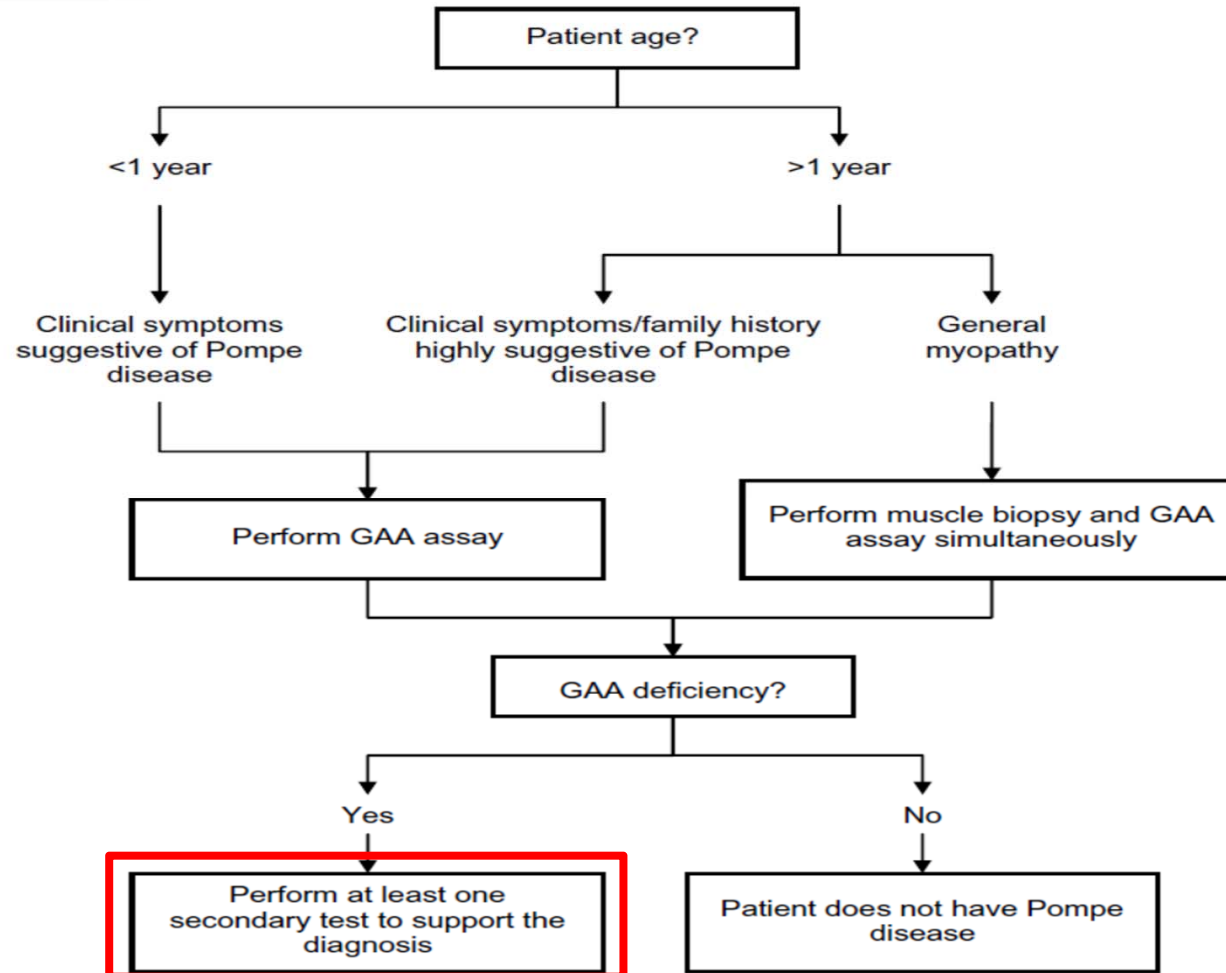
Permet également
l'étude histologique et
Le Diagnostic des
autres pathologies
musculaires
Absence d'interférence
de la MGA

Invasive sous anesthésie
Azote liquide
Transport dans
carboglance
Absence de surcharge
glycogénique n'élimine
pas la maladie de Pompe

Non



Diagnostic biologique de la maladie de Pompe



Protocole National de
Diagnostic et de Soins
(PNDS)

Maladie de Pompe

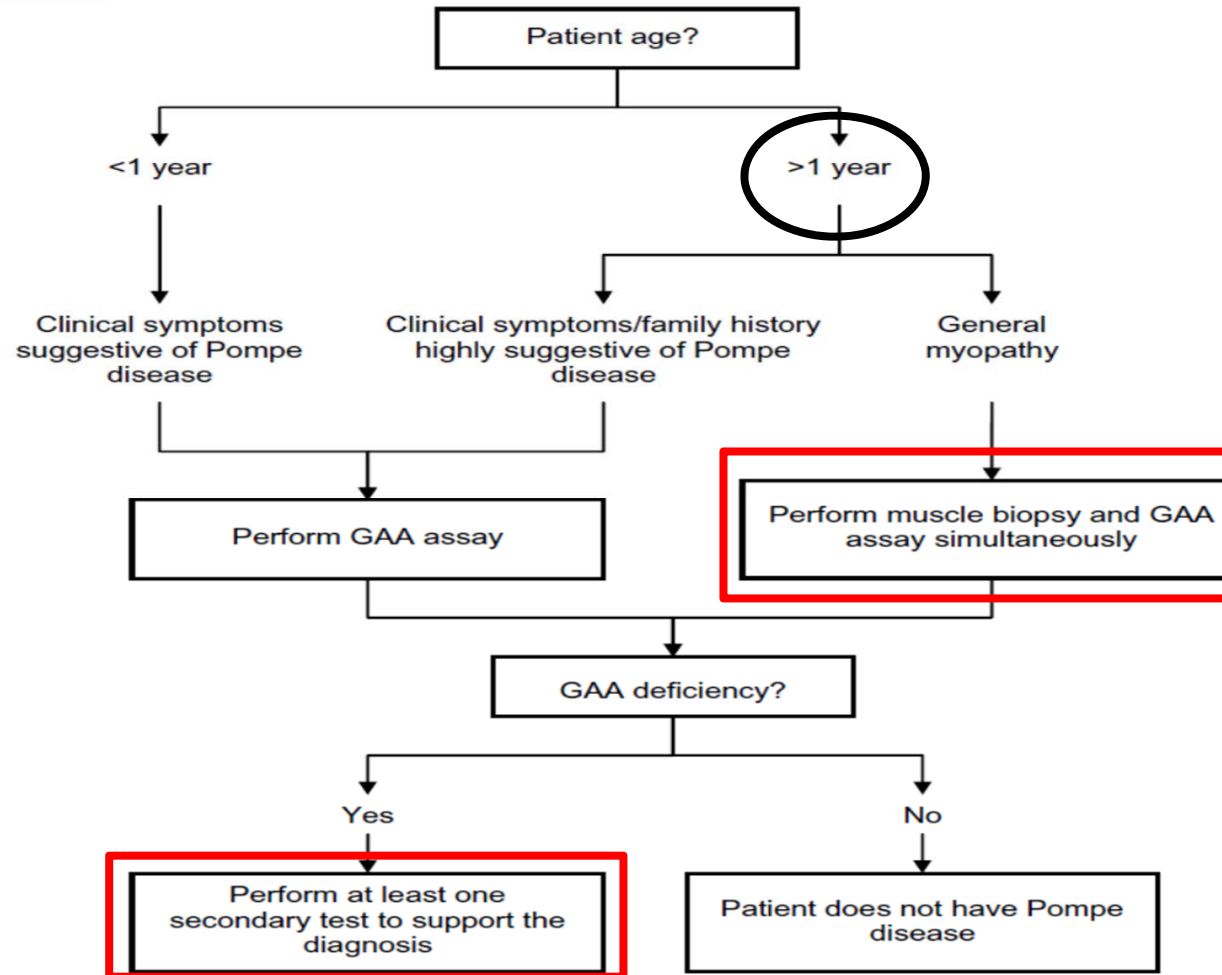
Filières de Santé Maladies Rares
FILNEMUS et G2M



B. Winchester, Molecular Genetics and
Metabolism 93 (2008)



Diagnostic biologique de la maladie de Pompe



Protocole National de
Diagnostic et de Soins
(PNDS)

Maladie de Pompe

Filières de Santé Maladies Rares
FILNEMUS et G2M



B. Winchester, Molecular Genetics and
Metabolism 93 (2008)



Diagnostic biologique de la maladie de Pompe

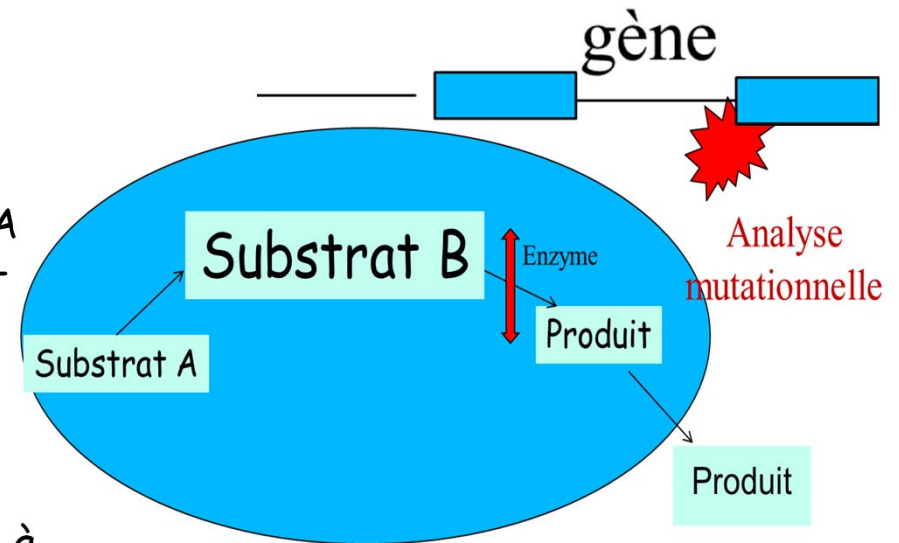
Le diagnostic de la maladie de Pompe devra être confirmé par le séquençage du gène *GAA* situé sur chromosome 17 codant pour l'alpha-glucosidase acide.

Plus de 450 mutations décrites

Corrélation génotype/phénotype est difficile à établir

Pseudo déficits

Allèles (1726A; 2065A) responsable de Pseudo déficits: 3,9% japon, 1% au USA, 0,027% Taiwan





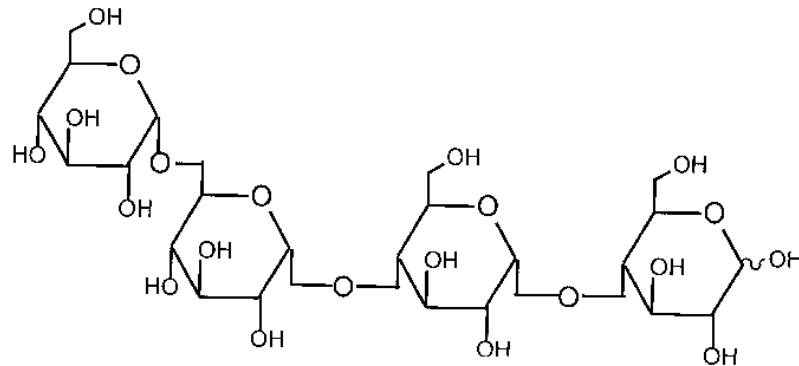
Biomarqueurs de la Maladie de Pompe

- Biomarqueurs enzymatiques
 - CK, CK-MB, LDH, ASAT et ALAT
 - Marqueurs de dommages tissulaires
 - Non spécifiques
- Biopsie musculaire : surcharge en glycogène
 - invasive
 - distribution hétérogène
- Biomarqueur : Hexose tetrasaccharides (GLC4)



Glc4 urinaire : Biomarqueur de la Maladie de Pompe

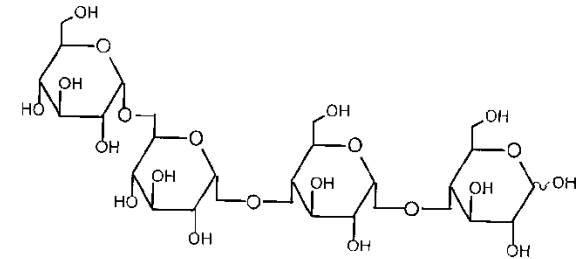
- Hexose tetrasaccharides
- Tétra glucose Oligomer : Glca1-6 Glca1-4 Glca1-4Glc (Glc4).





Glc4 urinaire : Biomarqueur de la Maladie de Pompe

- Hexose tetrasaccharides (Hex 4)
- Tétra glucose Oligomer : Glca1-6 Glca1-4 Glca1-4Glc (Glc4).
- Patients Pompe :
- Valeur augmentée de *GLC4* urinaire et plasmatique
- Quantification par ESI-MS/MS
- Quantification par HPLC-ECD
- Différencier un pseudo déficit d'un vrai déficit
- Monitoring thérapeutique

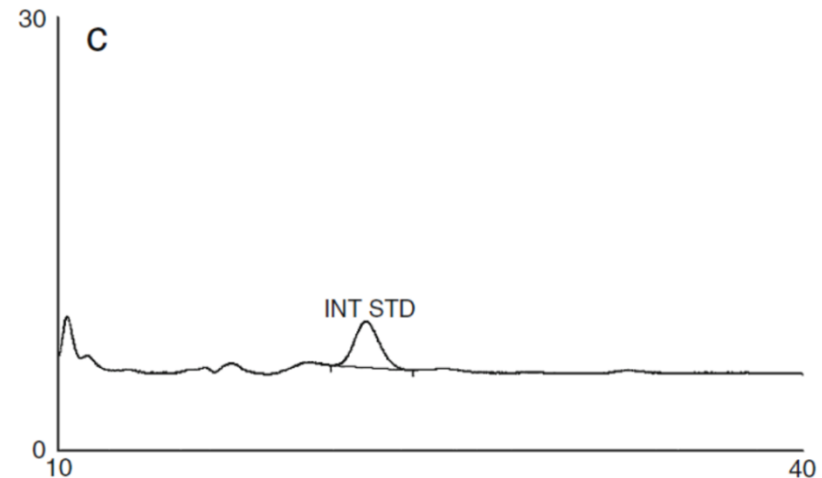
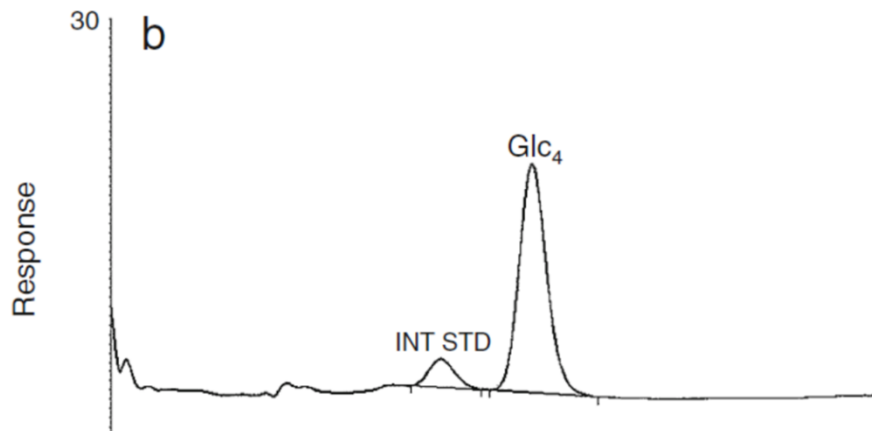
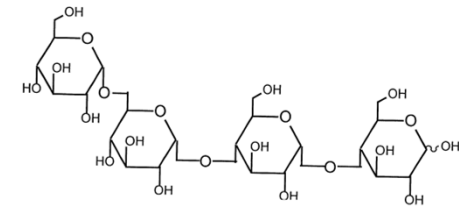




Glc4 urinaire : Biomarqueur de la Maladie de Pompe

- Tétra glucose Oligomer : Glca1-6 Glca1-4 Glca1-4Glc (Glc4).

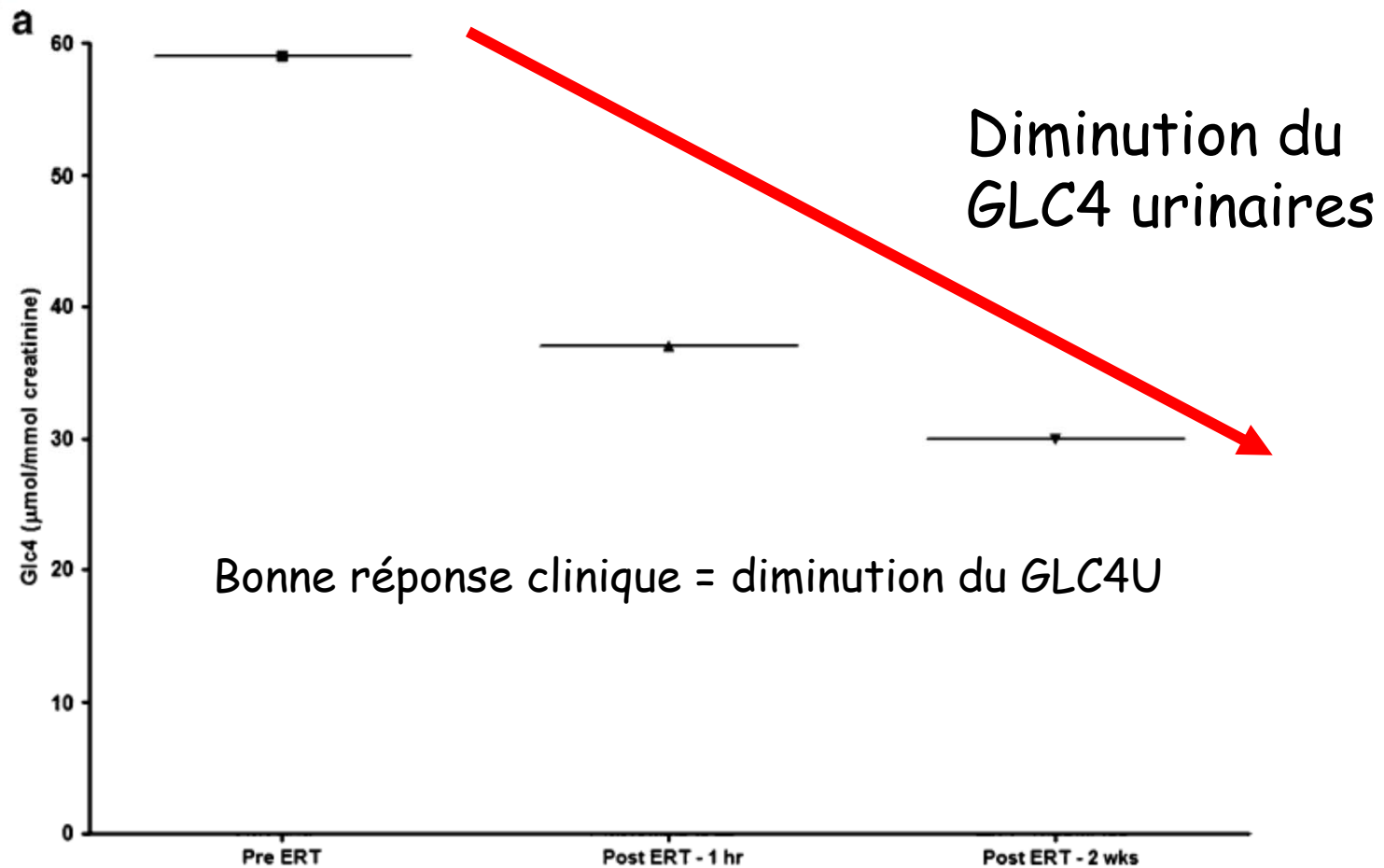
- Séparation et quantification par
- HPLC-ECD
- Colonne (échangeuse d'anions)
- Ampéromètre Dionex
- Standard interne pentaose (C5)



Chromatogramme urinaire: (b) patient Pompe et patient contrôle (c)

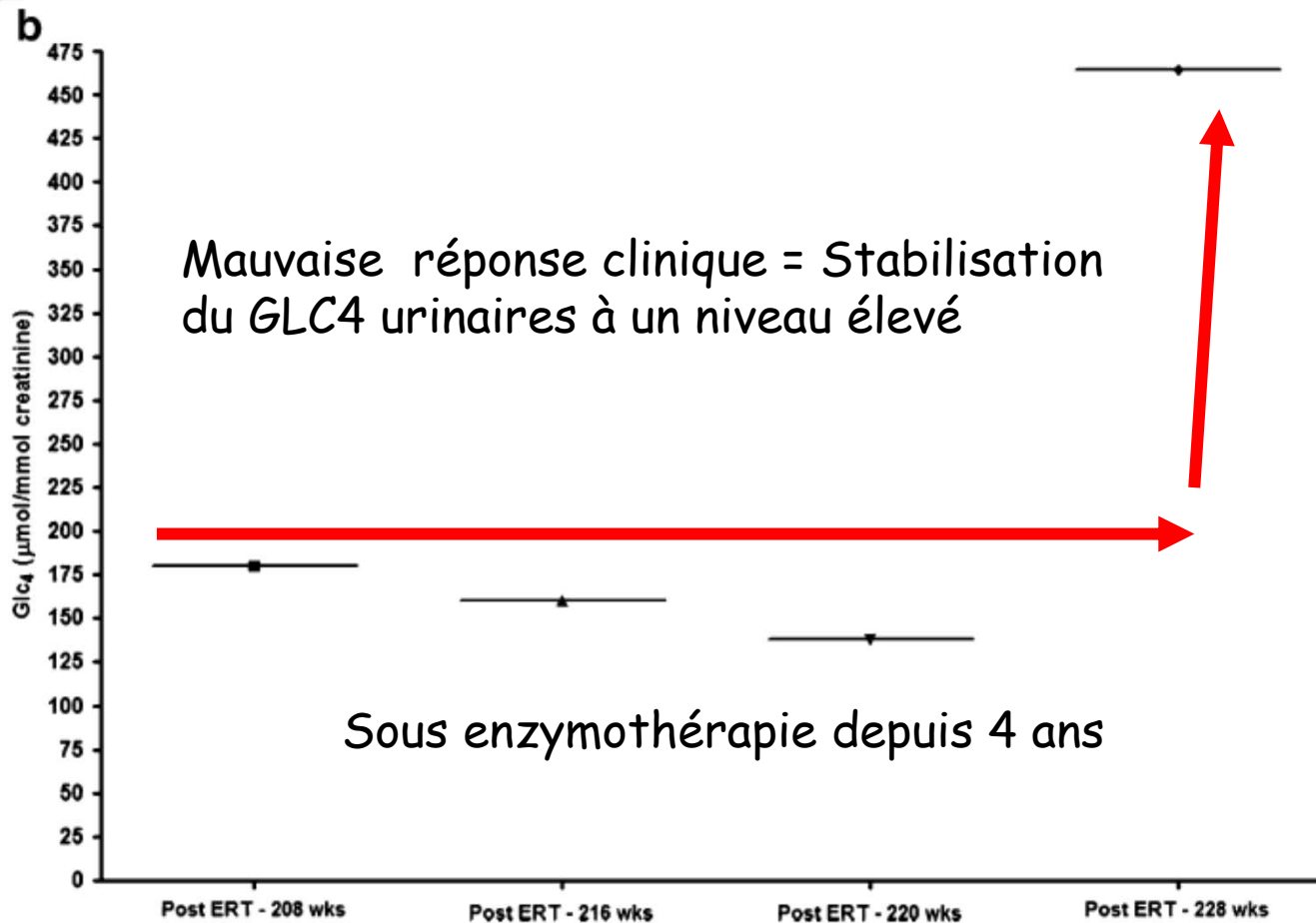


Cinétique du GLC4 sous enzymothérapie : Suivi thérapeutique





Cinétique du GLC4 sous enzymothérapie : Suivi thérapeutique



Glycogénose de type II

Effet de l'enzymothérapie



Début TRT à 4 mois



Après 19 mois de TRT





FIONA, née le 07/07/2008



FIONA, née le 07/07/2008

Née à terme 40SA
PDN = 2940 par application de ventouse

Examen Neurologique perturbée à naissance (tonus axial moyen, trémulations, mauvaise succion...)

dysmorphie faciale avec une macroglossie

Elle est hospitalisée quelques mois après pour cassure de la courbe pondérale

-hépatomégalie, cytolyse hépatique et myolyse

Bilan métabolique (CAA plasma et urines, CAO_u, REDOX...)
Etudes quantitative et qualitative Mucopolysaccharides urinaires

Progressivement est apparue une Cardiomyopathie hypertrophique ventriculaire gauche



FIONA, née le 07/07/2008

Diagnostic Maladie de Pompe

MPS urinaires	Normaux
Chromatographie des acides aminés plasmatiques	Normale
Chromatographie des acides organiques urinaires	Normale
Point REDOX (lactate, pyruvate...)	Normaux
alpha-1,4-glucosidase acide, Leucocytaire	Effondrée
Confirmée par l'analyse moléculaire du gène <i>GAA</i>	



FIONA, née le 07/07/2008

Enzymothérapie substitutive : traitée par cure de myozyme tous les 15 jours (débutée en juillet 2009)

- Stabilité de la macroglossie
- Stabilité de l'hypertrophie cardiaque ventriculaire gauche.
- Pas de signe d'insuffisance cardiaque
- Pas d'organomégalie.

- En mai 2017, Echocoeur et EFR normaux

- Fiona est actuellement scolarisée en CE1 avec l'aide d'une AVS.



Conclusion (1)

Le Diagnostic des MLS est difficile

- Hétérogénéité clinique, biochimique et moléculaire
- Démarche rationnelle pour arriver au diagnostic
 - Éviter la multiplication des examens
 - Coût élevé (15 enzymes lysosomes = BHN 1000)
- Collaboration étroite entre cliniciens et biologistes



Conclusion (2)



Filière G2M

Groupement des **M**aladies Héréditaires du **M**étabolisme



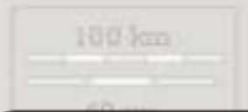
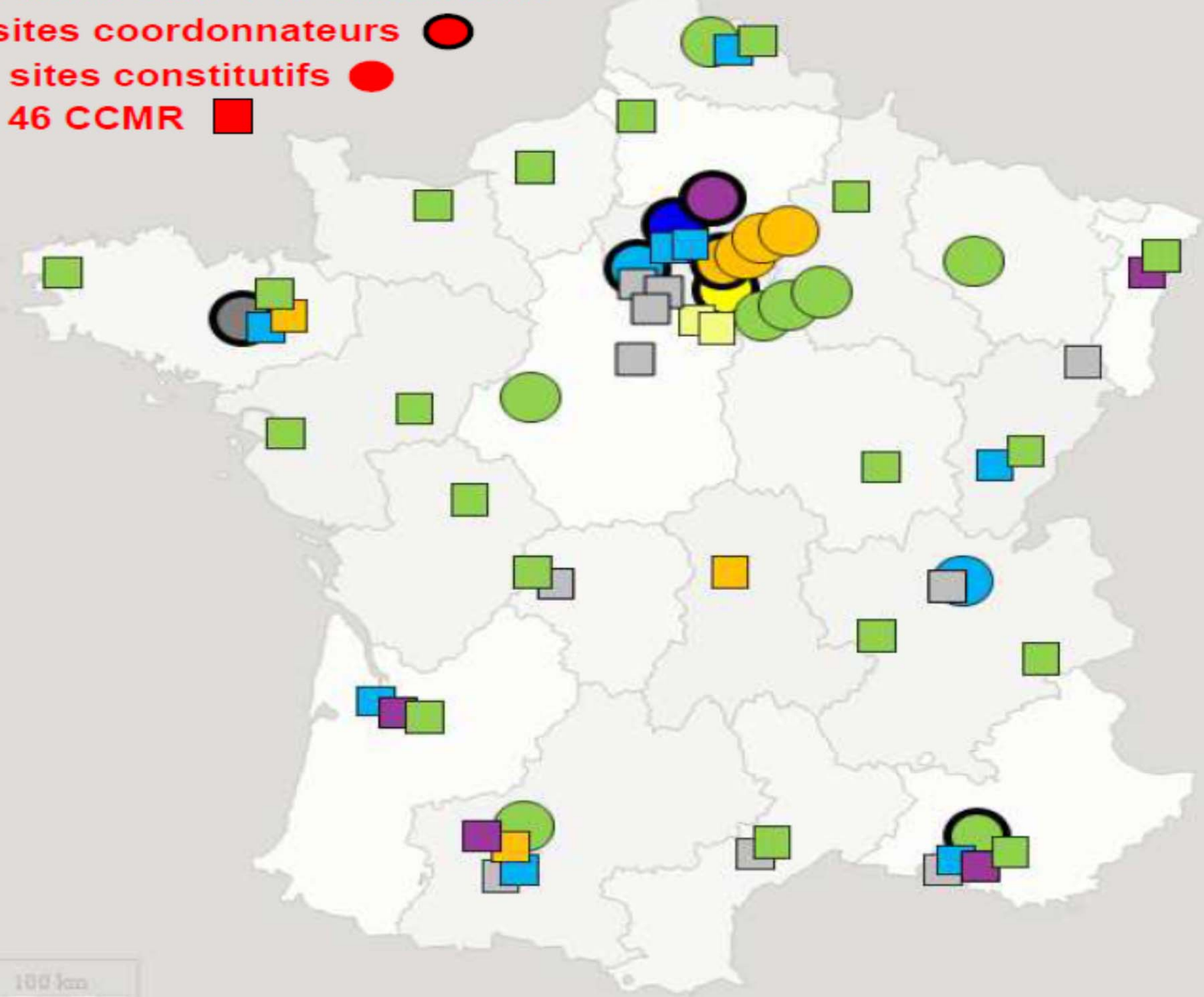
centre de compétences



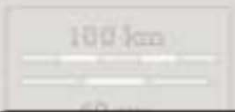
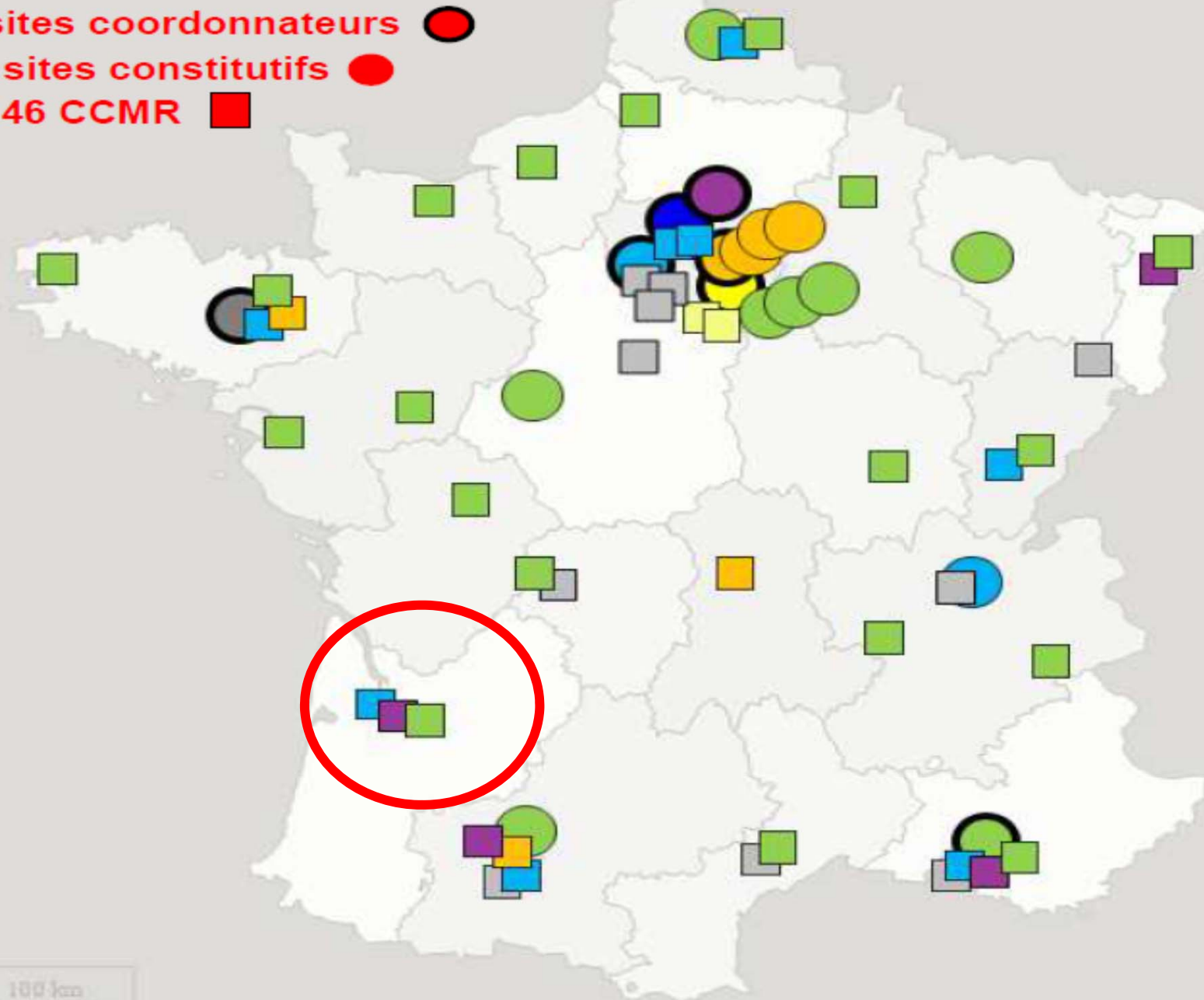
centre de référence



La filière G2M : 18 CRMR dont
7 sites coordonnateurs ●
11 sites constitutifs ●
Et 46 CCMR ■



La filière G2M : 18 CRMR dont
7 sites coordonnateurs ●
11 sites constitutifs ●
Et 46 CCMR ■





Merci de votre attention !