



22/11/2024

Evolution technologique vers la spectrométrie de masse du diagnostic biologique des maladies lysosomales

Dr Edouard Le Guillou
Biochimie métabolique, Hôpital Necker-Enfants malades

DÉMARCHE DIAGNOSTIQUE BIOLOGIQUE DES MALADIES DE SURCHARGE LYSOSOMALE

Cellules de surcharge

Hématologie (sang, moelle osseuse)



Profils métaboliques

Mucopolysaccharides, oligosaccharides...



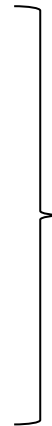
Enzymologie

Enzymes lysosomales



Génétique

Gènes des maladies lysosomales

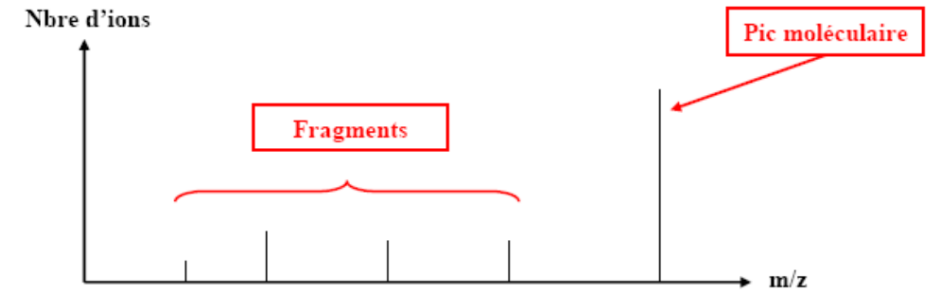


**Place de la
spectrométrie de masse ++**



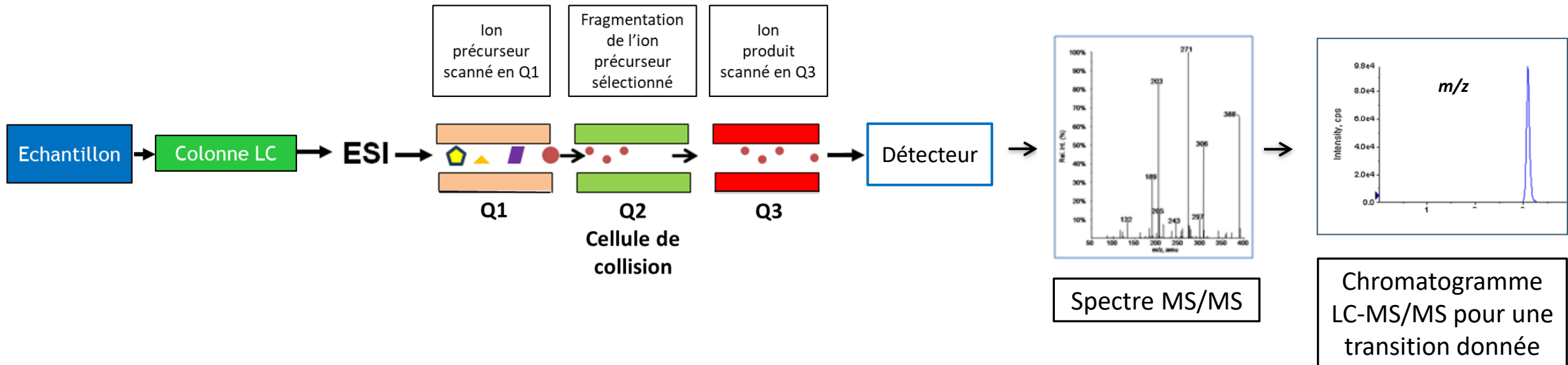
PRINCIPE DE LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE

- Mesure des **rapports masse sur charge (m/z) de molécules ionisées** et de leurs produits de fragmentation



- Fréquemment couplée à une séparation chromatographique préalable

LC-MS/MS = Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem



ACCESSIBILITÉ À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Plateforme de spectrométrie de masse
du pôle de Biologie : 10 spectromètres de masse

- 7 LC-MS/MS
- 3 GC-MS
- 4 MS/MS du CRDN



→ **Accessibilité aux spectromètre de masse de la plateforme pour le transfert technologique des techniques du secteur des maladies lysosomales**

- Avantages : méthodes **spécifiques** et **sensibles**
- Limites : contraintes d'**accessibilité**/temps machine et **maintenance** régulière

DOSAGE DE L'ACIDE SIALIQUE LIBRE URINAIRE

- Diagnostic de la maladie de surcharge en acide sialique infantile (ISSD) et maladie de Salla

- Chromatographie couche mince (CCM)
- Dosage colorimétrique (méthode de Warren..)

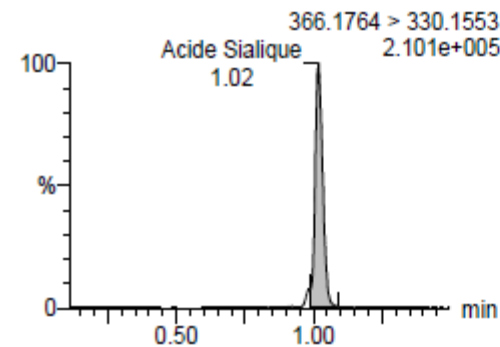
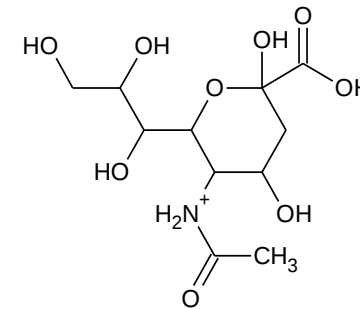


Limites : méthode longues, compliquées, manipulation d'agents toxiques

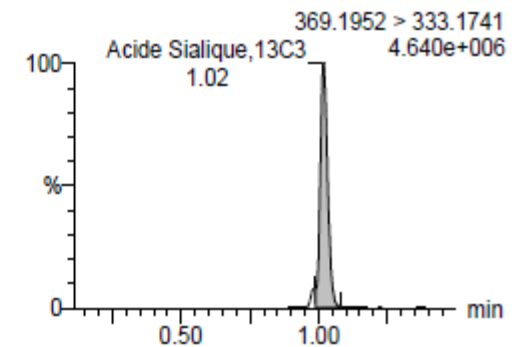
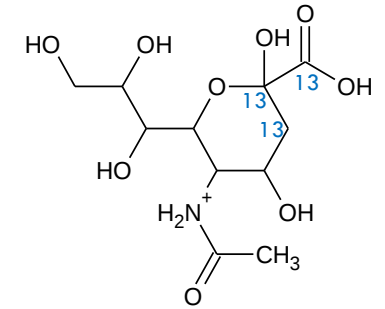
- **Dosage par LC-MS/MS**

- Méthode simple, rapide et beaucoup plus spécifique
- Dosage « simplex »
- Utilisation d'un étalon interne (isotope stable)
- +/- hydrolyse pour doser l'acide sialique totale
- Urine et liquide amniotique

Acide sialique
(N-acétyl-D-neuraminique)

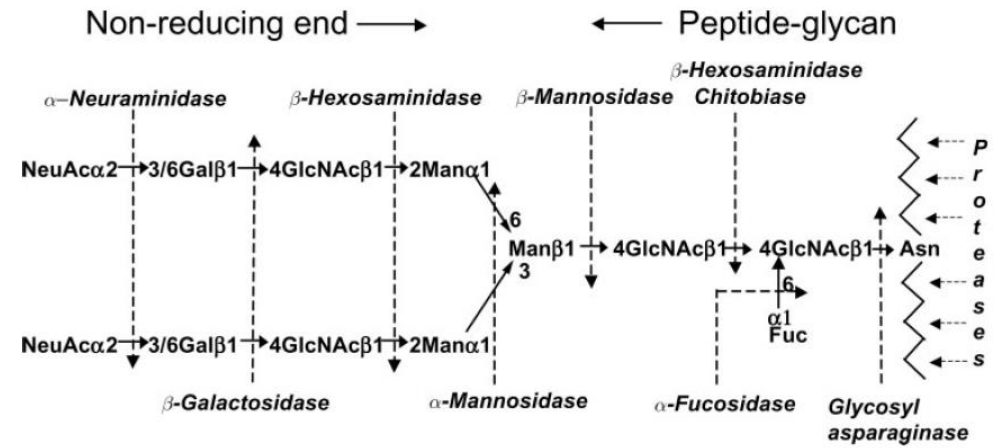


Etalon interne
Acide sialique-¹³C₃



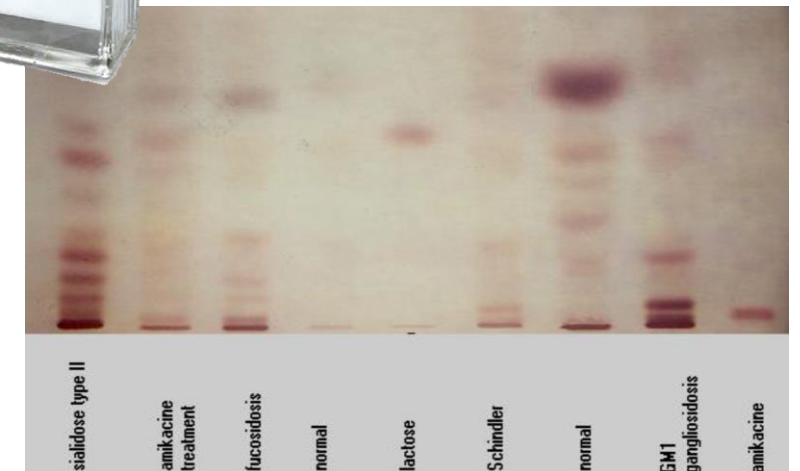
PROFIL DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES

- Excrétion de **résidus oligosaccharidiques des glycoprotéines, non dégradés dans le lysosome**



Winchester, Glycobiology, 2005

- Technique historique :**
Chromatographie sur couche mince (CCM)
 - Pas de quantification :** appréciation uniquement visuelle, expérience ++
 - β -mannosidose non détectée
 - Pas de profil typique
 - Interférences :** aminosides, lait (enrichis en polymères d'oses ou allaitement maternel)
 - Âge : excrétion difficilement visualisable chez les patients les plus âgés

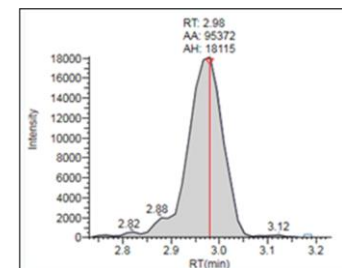


PROFIL DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES

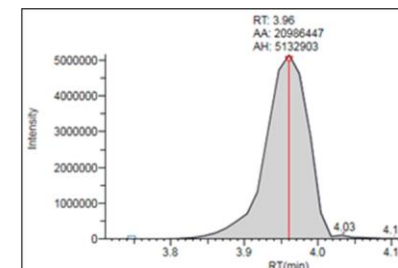
Techniques récentes par spectrométrie de masse :

▪ LC-MS/MS

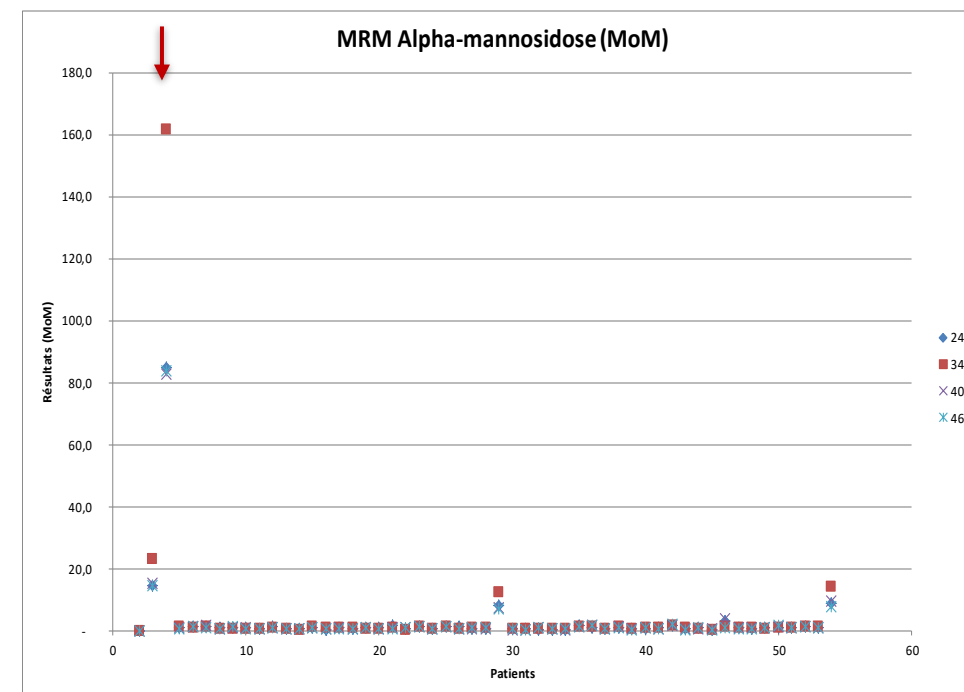
- Différentes transitions de m/z par maladie (mode MRM)
- Possibilité d'inclure acide sialique
- Limites : pas de standards ni d'étalons internes (EI) spécifiques
→ un EI commun, expression en multiple de la médiane (MoM)
- NB: aspartylglucosamine présent dans le profil des CAA (LC-MS/MS)



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



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

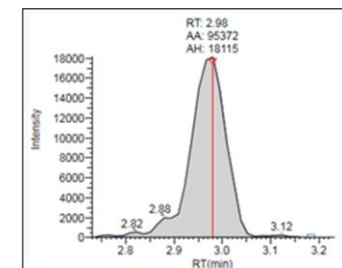


PROFIL DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES

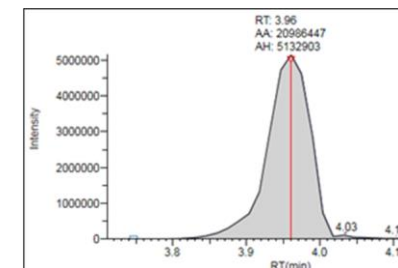
Techniques récentes par spectrométrie de masse :

▪ LC-MS/MS

- Différentes transitions de m/z par maladie (mode MRM)
- Possibilité d'inclure acide sialique
- Limites : pas de standards ni d'étalons internes (EI) spécifiques
→ un EI commun, expression en multiple de la médiane (MoM)



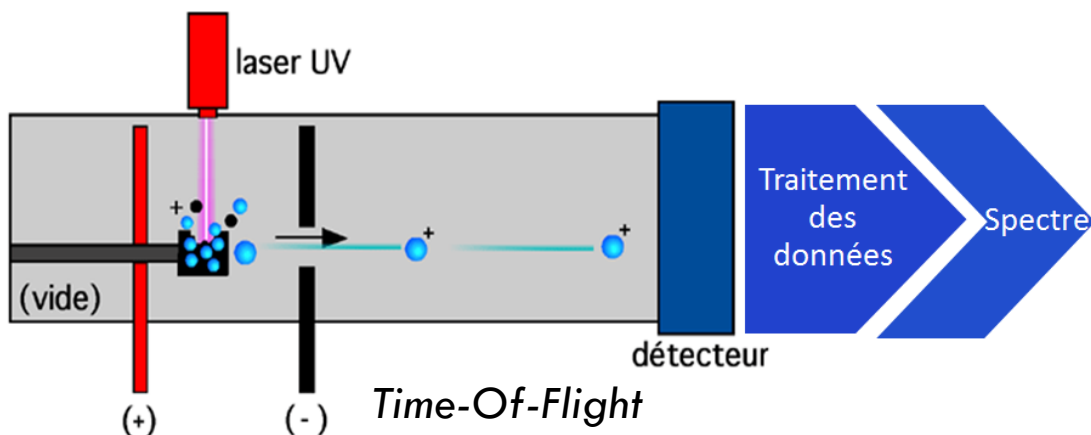
Métabolite « Alpha-mannosidose »
568,2 > 244,1



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

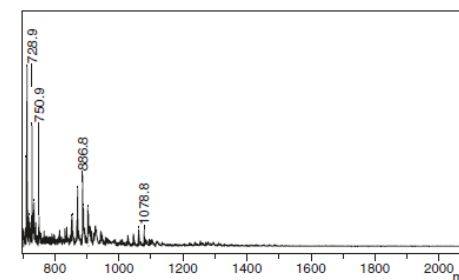
▪ MALDI-TOF-MS (et MS/MS, TOF/TOF)

Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time-Of-Flight - Mass Spectrometry

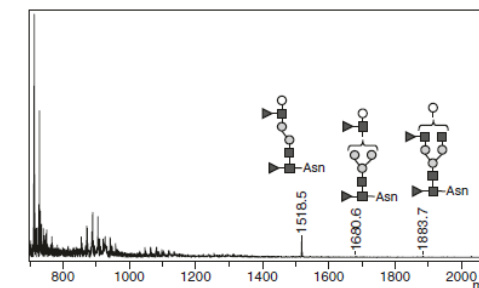


Comparaison à
des spectres de
référence
(banque de
spectres)

Normal



Fucosidose



PROFIL DES MUCOPOLYSACCHARIDES URINAIRES

Détermination quantitative : test au DMB

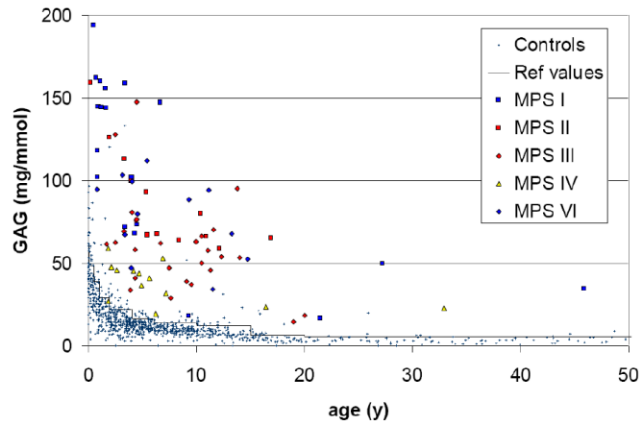
- Dosage colorimétrique
- Fonction de la créatininurie et de l'âge



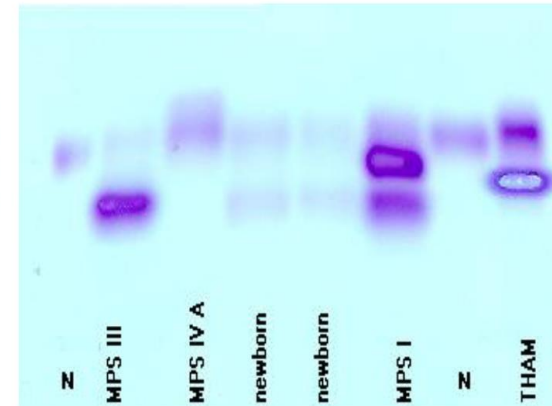
Détermination qualitative : électrophorèse des MPS

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

DMB test; normal controls vs. MPS



KS
CS
DS
HS



→ Limites :

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

PROFIL DES MUCOPOLYSACCHARIDES URINAIRES

TECHNIQUES RÉCENTES PAR LC-MS/MS

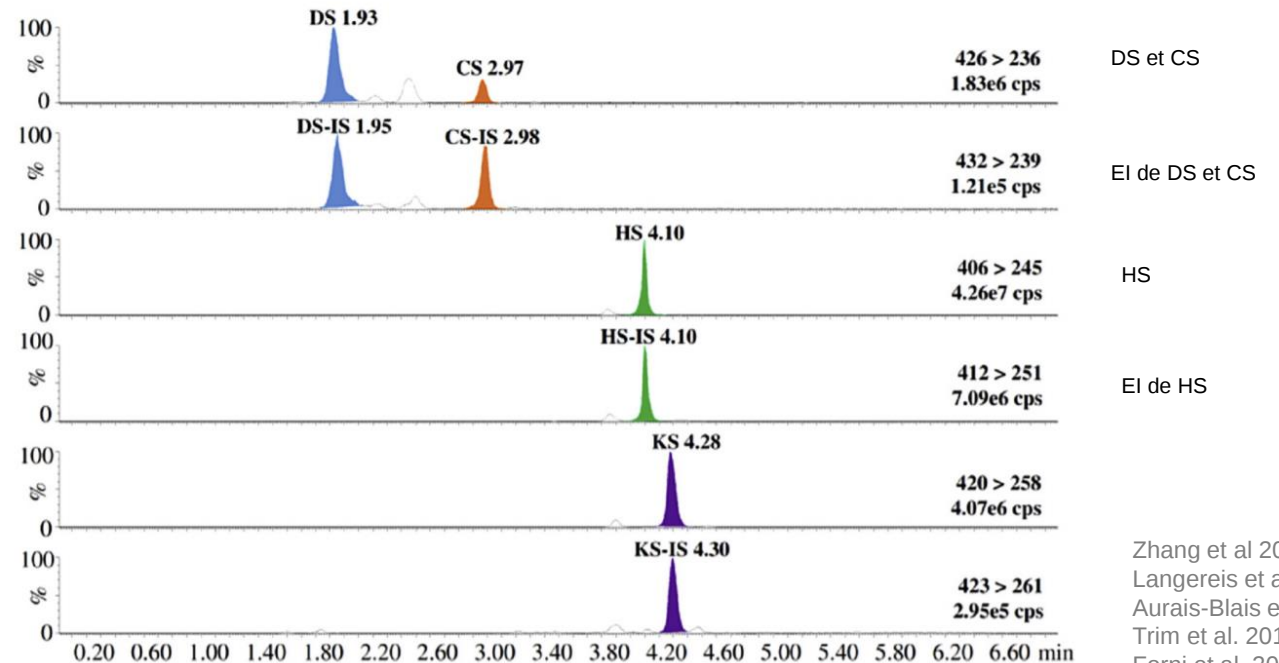
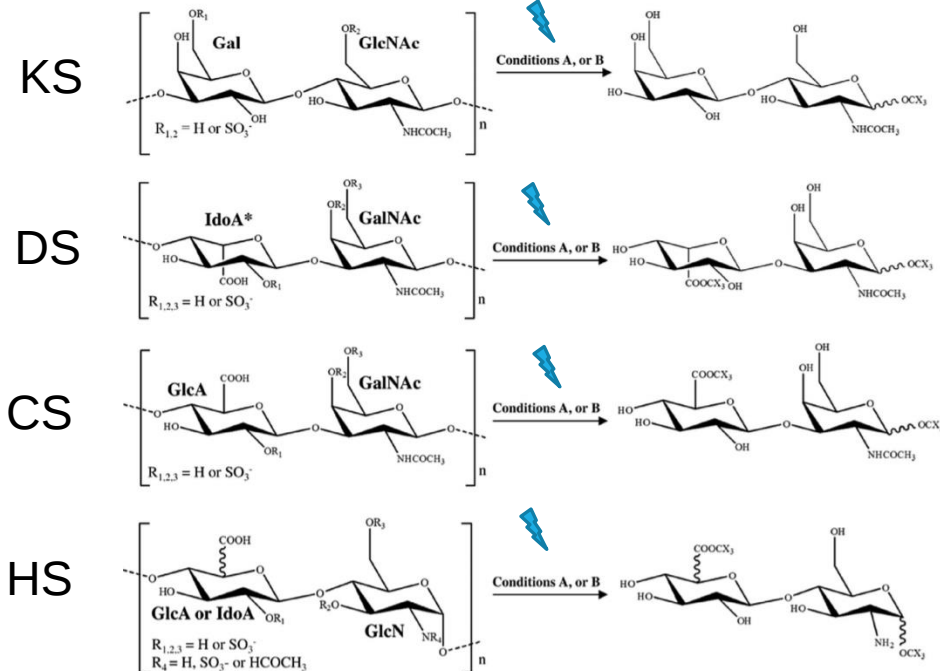
- Quantification des 4 fractions de MPS → Détecte la plupart des mucopolysaccharidoses
- Pré-traitement enzymatique (kératanase..) ou chimique (méthanolyse ou butanolyse++) → libération des disaccharides
- Quantification (standards et étalon internes générés par butanolyse-d10 à Necker)

Pré-traitement

Butanolyse



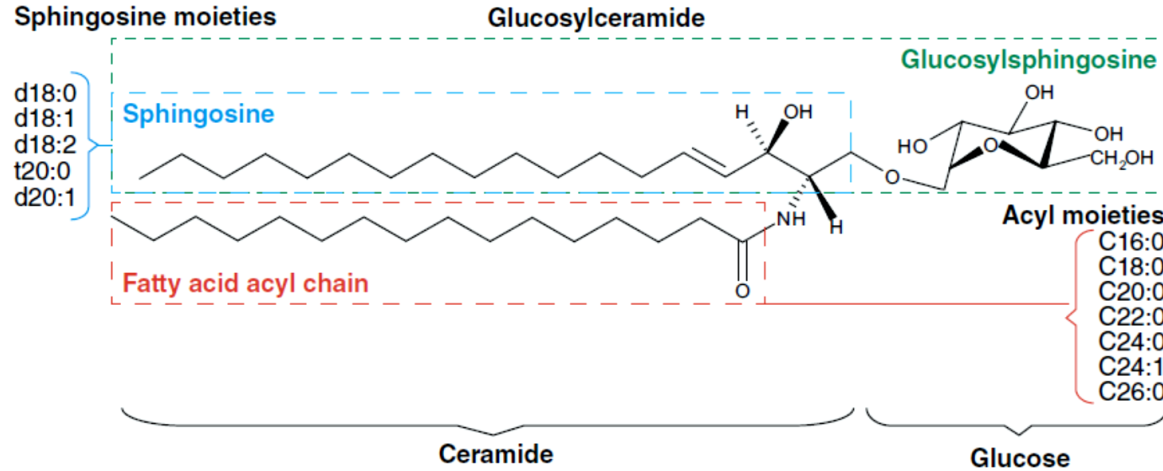
Mesure par LC-MS/MS



Zhang et al 2015
Langereis et al. 2015
Aurais-Blais et al. 2016
Trim et al. 2015
Forni et al. 2019
Zhang et al. 2023

DOSAGE DES LYSOPHINGOLIPIDES

Forme déacylée des sphingolipides



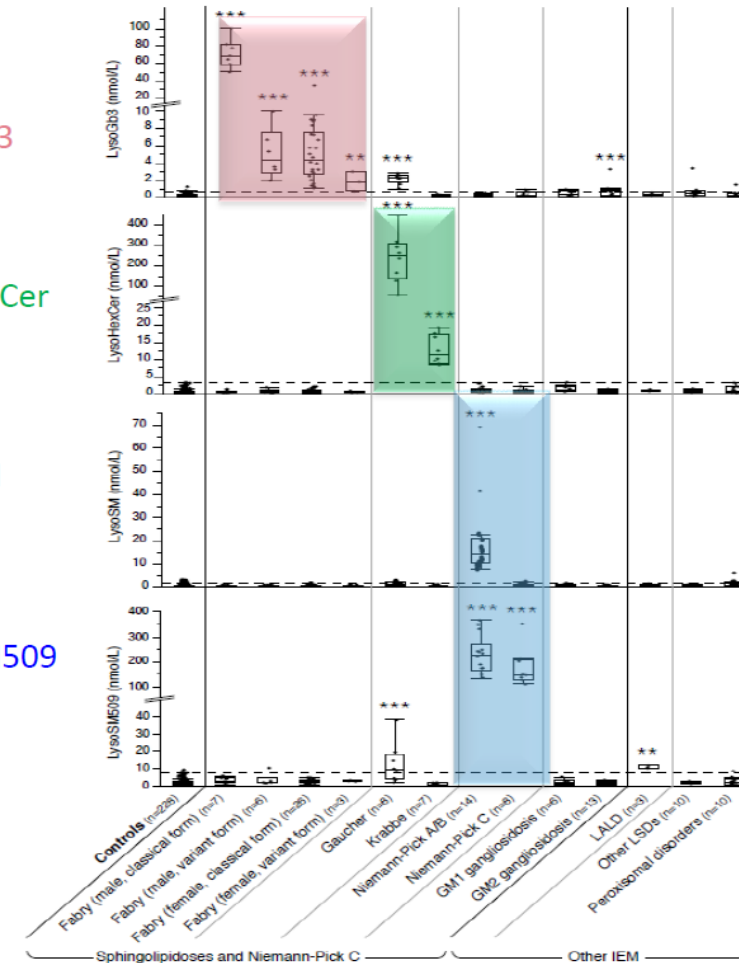
- Plasmatiques ++
- Dosage par LC-MS/MS
- Dosage ciblé ou multiplexage
- Intérêt : diagnostic et suivi des sphingolipidoses
- Perspectives : uniformisation des résultats inter-laboratoires

LysoGb3

LysoHexCer

LysoSM

LysoSM509



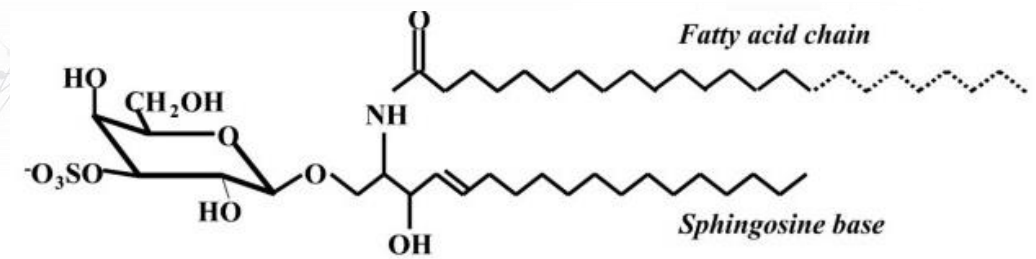
Fabry

Gaucher
Krabbe

Niemann-Pick
A, B ou C

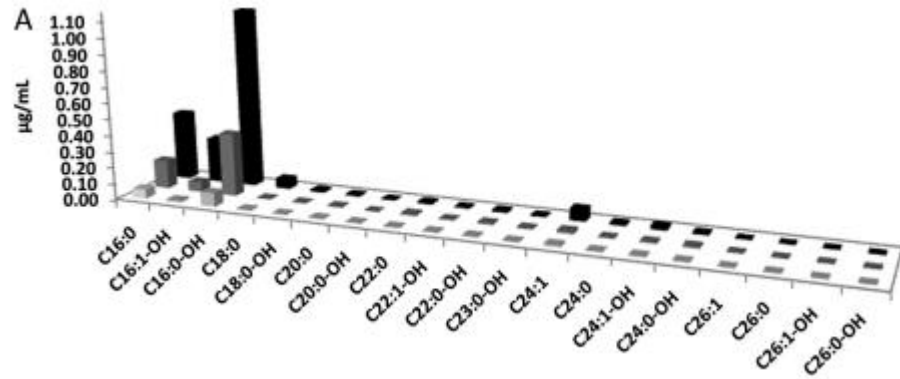
*** p<0,001
** p<0,05
* p<0,1

DOSAGE DES SULFATIDES

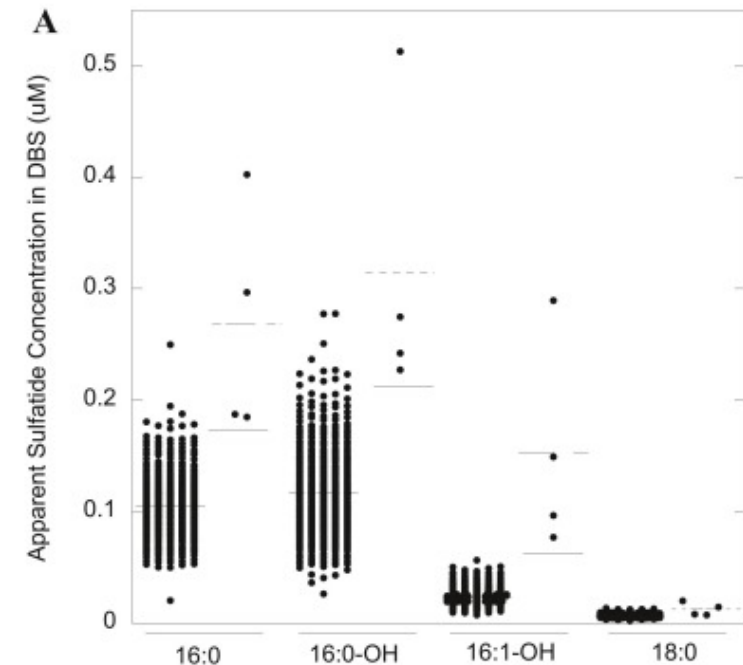
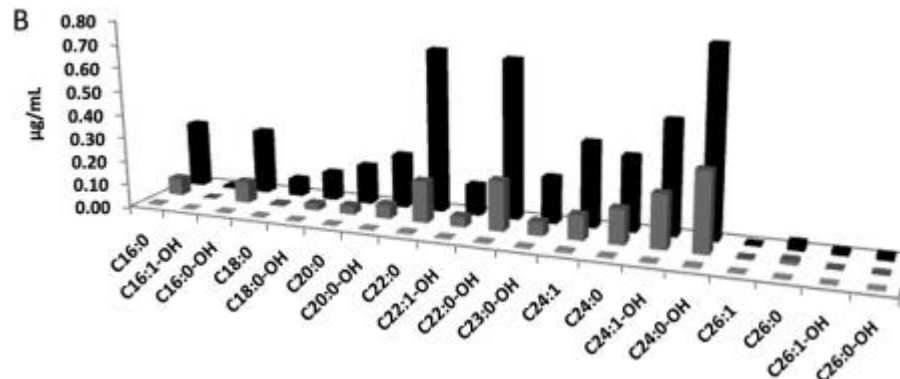


- Diagnostic de leucodystrophie métachromatique (et Austin)
- Sur urine ou sang sur buvard
- Profils des différentes longueurs de chaîne de sulfatides par LC-MS/MS :
C16:0 et totaux ++
C16:1-OH le plus spécifique sur DBS

Sang buvard



Urine



Barcenas *et al.* Clinica Chimica Acta 2014
Spacil *et al.* Clin Chem 2016
Bekri *et al.* Mol Genet Metab. 2024

DOSAGES ENZYMATIQUES

TECHNIQUES CLASSIQUES PAR FLUORIMÉTRIE

- Utilisables pour la plupart des enzymes lysosomales
- **Technique manuelle** mais relativement simple
- **Substrats synthétiques fluorogéniques** (couplés au 4 méthylumbelliferyl « 4-MU » ++)
ou parfois substrats colorimétriques (paranitrocatechol ou paranitrophenyl)
- **Pas de multiplexage possible** : tous les substrats produisent le même produit fluorescent



DOSAGES ENZYMATQUES PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

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

- **1^{er} kit commercialisé pour 6 MSL sur buvard : kit NeoLSD™ MSMS**

Technique FIA-MS/MS, kit commercial Revvity

- Envoi facile des buvards, simplification du préanalytique (pas d'extraction leucocytaire)
- Multiplexage : 1 seul punch et 1 seule incubation/patient, plaque 96 puits
- Quantification précise (substrats proches des naturels, étalons internes)
- Contrôles qualités internes et externes disponibles, méthode plus facilement accréditable

- **Autres dosages enzymatiques ciblés en MS/MS sur buvard**

- **Exemple : arylsufatase A dans le sang sur buvard ou leucocytes**

- Limite buvard : nécessité d'une chromatographie d'exclusion préalable pour éliminer les inhibiteurs naturels du sang total
- Réactifs commerciaux et accréditables disponibles

Fabry Disease

(α -galactosidase deficiency)

Gaucher Disease

(glucocerebrosidase deficiency)

Pompe Disease

(glycogen storage disease type II)

Krabbe Disease

(galactocerebrosidase deficiency)

Hurler Syndrome

(mucopolysaccharidosis I, MPS-I)

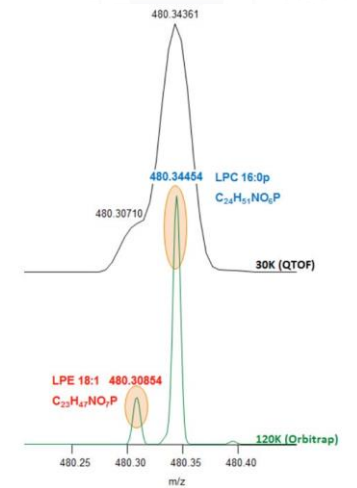
Niemann-Pick A/B Disease

(acid sphingomyelinase deficiency)
+ mucopolipidoses

PERSPECTIVES

Multiplexage des profils

- Profils des gangliosides
 - Profils étendu de sphingolipides
 - Multiplexage oligosaccharides+sialique+tétrasaccharides en (LC-)HRAM-MS (high-resolution accurate mass)
 - Métabolomique ciblée extensive ?
 - Métabolomique non ciblée ?
- } Nécessité de plateformes et technologies dédiées en routine



Kim et al. Anal Bioanal Chem. 2024
Byeon et al. Clin Chem. 2024
Hagemeijer et al. JIMD 2023

Multiplexage des dosages enzymatiques sur buvard

- 2e kit Revvity sur buvard pour 6 autres maladies (non encore commercialisé, 2025??) :
CLN2, MPS II, MPSIIIB, MPSIV, MPSVI, MPSVII
- Autres techniques de multiplexage ou ciblée : nécessité de design et d'accès aux substrats



MERCI DE VOTRE ATTENTION !

DES QUESTIONS ?

Edouard Le Guillou
Biochimie métabolique
Hôpital Necker