

# THESE

## POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE SPECIALITE BIOLOGIE MEDICALE

Présentée et soutenue publiquement  
par

**Nicolas LAFONT**

### *Dosage des oligosaccharides urinaires par spectrométrie de masse en tandem associée à la chromatographie liquide (LC-MS/MS)*

Le 13 octobre 2023

Directeur de thèse : Professeur Jérôme AUSSEIL

#### JURY :

Madame le Professeur Peggy GANDIA

Présidente

Monsieur le Professeur Jérôme AUSSEIL

Assesseur

Madame le Docteur Frédérique SABOURDY

Assesseur

Monsieur le Docteur Julien MAQUET

Assesseur

**PERSONNEL ENSEIGNANT**  
**du Département des Sciences Pharmaceutiques de la Faculté de santé**  
**au 20 février 2023**

**Professeurs Emérites**

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

**Professeurs des Universités**

**Hospitalo-Universitaires**

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B. (Directrice-adjointe)	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

**Universitaires**

Mme BERNARDES-GENISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiolog
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Doyen-directeur)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutiqu
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiolog
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique

## Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. DELCOURT N.	Biochimie	Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique	Mme AUTHIER H.	Parasitologie
Mme KELLER L.	Biochimie	M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique	Mme BON C. (*)	Biophysique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique	M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique	M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme SALABERT A.S.	Biophysique	Mme CABOU C.	Physiologie
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie	Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	Mme CHAPUY-REGAUD S. (*)	Bactériologie - Virologie
		Mme COLACIOS C.(*)	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		Mme DERAËVE C. (*)	Chimie Thérapeutique
		Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
		Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F.	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
		Mme GADEA A.	Pharmacognosie
		Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
		Mme LEFEVRE L.	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C. (*)	Pharmacognosie
		M. LE NAOUR A.	Toxicologie
		M. LEMARIE A.	Biochimie
		M. MARTI G.	Pharmacognosie
		Mme MONFERRAN S	Biochimie
		M. PILLOUX L.	Microbiologie
		M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
		Mme TOURRETTE-DIALLO A.	Pharmacie Galénique
		(*)	Pharmacognosie
		Mme VANSTEELANDT M.	Mathématiques
		Mme WHITE-KONING M. (*)	

(\*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

## Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires		Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)	
M. AL SAATI A	Biochimie	M. TABTI Redouane	Chimie thérapeutique
Mme BAKLOUTI S.	Pharmacologie	Mme HAMZA Eya	Biochimie
Mme CLARAZ P.	Pharmacie clinique	Mme MALLI Sophia	Pharmacie galénique
Mme CHAGNEAU C.	Microbiologie		
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie		
Mme STRUMIA M.	Pharmacie clinique		
Mme DINTILHAC A.	Droit Pharmaceutique		
Mme ROGOLOT L	Bio cellulaire,immuno		

## Serment de Galien

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;
- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;
- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;
- De coopérer avec les autres professionnels de santé.

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

# Remerciements

## Remerciements à mon jury

Au Professeur Jérôme AUSSEIL, pour m'avoir encadré sur ce projet, d'avoir été à mon écoute, de m'avoir aiguillé sur la réflexion de ce travail plus titanesque que prévu. Merci aussi de la confiance que vous m'avez portée pour m'avoir proposé ce travail.

Au Professeur Thierry LEVADE, pour tout ce que vous m'avez instruit sur les maladies métaboliques, l'envie d'en apprendre plus sur ce sujet passionnant. Merci aussi de votre aide sur l'éclaircissement des maladies et des analyses étudiées ici.

Au Professeur Peggy GANDIA, d'avoir accepté d'être la présidente de mon Jury, et pour ce semestre en Pharmacologie-Toxicologie inoubliable. Les nombreuses heures passer à discuter et réfléchir de cas PK-PD tordus mais enrichissants, ainsi que ces recherches bibliographiques à faire rapidement pour répondre aux questions des cliniciens, m'ont beaucoup appris sur l'analyse de données expérimentales et littéraires, utile pour ce projet.

Au Docteur Frédérique SABOURDY, pour les explications sur de nombreuses maladies métaboliques et les analyses biologiques associées, ainsi que de votre encadrement pendant mes stages au laboratoire de Biochimie.

Au Docteur Julien MAQUET pour votre collaboration dans ce travail, notamment des éclaircissements apportés sur ces maladies.

## **Remerciements aux personnes ayant contribué directement ou indirectement à ce travail :**

Au Docteur Stéphanie TRUDEL et à Madame Jessie FOY pour votre implication dans la mise en place de cette méthode d'analyse. Sans vous, nous n'aurions pas pu avancer autant et aussi efficacement.

A toute l'équipe du laboratoire de Biochimie, générale ou spécialisée, Biologistes comme Techniciens, qui m'a vu passé deux semestres dans ce milieu passionnant, qui m'a vu évoluer en tant qu'interne pendant la routine journalière ou pendant mes gardes la nuit. Ce fut un plaisir de travailler avec vous ces trois dernières années.

A toute l'équipe du laboratoire d'Hématologie, hémostase et cytologie, Biologistes et Techniciens, qui m'a vu arriver en tant que bébé interne à mon premier semestre, et qui me voit passer ma thèse aujourd'hui. J'ai commencé ici, je finis (ma thèse) ici, la boucle est bouclée. Tout comme avec la Biochimie, vous m'avez vu grandir en tant qu'interne. Ce fut un réel plaisir d'avoir ces trois dernières années avec vous.

A toute l'équipe de Pharmacologie-Toxicologie, notamment aux Docteur Sarah BAKLOUTI, Docteur Thomas LANOT et Docteur Michel LAVIT, avec qui, comme avec le Professeur GANDIA, j'ai passé de nombreuses heures dans l'interprétation des dosages médicamenteux, et au développement d'analyses biologiques. C'est grâce à ce semestre chez vous que j'ai compris comment fonctionnait vraiment un laboratoire qui se développe, sans quoi je n'aurais pas pu réaliser ce projet correctement.

## Remerciements à ma famille, mes amis et co-internes

A ma mère, Alexandra LAFONT, pour tout ce que tu m'as apporté ces 26 années de mon existence. Tu ne taris pas d'éloges à mon égard auprès de tes amis, en disant que je suis « presque parfait » (bien que je pense que tu veux dire « *plus* que parfait »), comme le dirait toute maman, mais je peux te retourner ce compliment. Tu as réussi à m'élever toute seule, à t'occuper de moi du mieux que tu pouvais malgré les soucis financiers, familiaux et médicaux qui t'ont accablée, à ce que je ne manque de rien (même si j'aurais voulu avoir plus de cartes Pokémon quand j'étais petit). Sans ta présence rassurante et ton dévouement lors de mes études, principalement pendant la PACES et le concours de l'Internat, je ne serais pas là où je suis, à passer ma thèse devant toi. Encore merci mille fois pour tout, je t'aime, et j'espère t'avoir encore dans mes pattes pour de nombreuses années, même avec une canne à la main prête à me taper les fesses quand je ferai une bêtise.

A ma grand-mère Astrid LAFONT, ma tante Rachel MALLET, mon oncle Stéphane MALLET, et ma cousine Neige MALLET, de l'aide que vous avez apportée et que vous apportée encore à ma mère. C'est aussi grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui.

A toute la famille PARADIS : Martine, Christian, Laurine et Corentin. Vous êtes dans ma vie depuis aussi loin que je me souviens. Vous êtes comme une deuxième famille pour moi, avec qui tous mes soucis sont oubliés. Merci à vous pour votre bonne humeur à chaque fois que je vous vois, et un merci spécial à Martine pour tous ces repas copieux et succulents dont toi seule as le secret.

Corentin, te connaître est une grande fierté pour moi, et ta force herculéenne est un objectif que je compte dépasser un jour. Même si dans le futur on risque de se voir moins souvent, j'espère qu'on continuera à se retrouver à la salle pour une bonne séance peccs à base de cocktail druidesque, puis s'exploser le bide avec un bon gros burger.

Au Docteur Benjamin TROUCHE-ESTIVAL, mon grand-frère jumeau diabolique (ou c'est moi le diabolique ?) qui en aura mis du temps pour accéder à ce titre. Tu es une des rencontres les plus belles que j'ai faites à Toulouse, surtout grâce à une soirée péniche inoubliable. Qui aurait cru que je trouverais quelqu'un d'aussi similaire que moi, sur autant de sujets (sauf pour les hiboux) ? Cela fait 3 ans qu'on se connaît, j'ai l'impression que ça fait une éternité. Mon frère d'âme, mon camarade écuyer, mon co-partageur de neurone, mon jumeau goblin, le daron d'une grande fratrie, tu m'as été d'une grande aide et un excellent conseiller sur tellement d'aspects de la vie, et j'espère avoir pu contribuer, ne serait-ce qu'un peu, à te renvoyer l'appareil.

Petite mention spéciale à tes trois comparses Anaïs TARAIRE, Pierre FABBRO et Robin NONAMEE, ce fut un plaisir de vous rencontrer, et j'espère faire d'avantage d'activités avec vous, notamment en tant que DM.

A Rima CHATILA, la petite-sœur plus âgée que moi (vas savoir), beaucoup trop gentille, consciencieuse et perfectionniste pour ton bien, un peu trop émotive pour le nôtre. Ta gentillesse, ta générosité et ton sérieux te perdront un jour si on ne reste pas près de toi. Il est vrai qu'on ne pourra plus passer des heures entières à faire les fous dans la chambre de garde, mais on continuera de le faire ailleurs (de préférence loin des regards des autres, qu'on ne nous mette pas en asile psychiatrique). Benji et moi sommes maintenant docteurs, on n'attend plus que toi (et les autres aussi).

Merci aussi du travail que tu as fourni pour m'aider à finaliser cette thèse, je t'en suis éternellement reconnaissant.

Au Docteur Justine MADAULE (ou Docteur Maboule pour les intimes), la première d'entre nous à être docteur. Je peux réitérer les compliments que j'ai faits aux deux autres zigotos et que tu m'as donnés dans tes remerciements : tu es aussi une des rencontres les plus formidables de cet internat, et tu es une véritable amie, en qui j'ai une confiance totale et inébranlable. Passer du temps avec toi est toujours un plaisir et une source d'hilarité (grâce à ton premier degré légendaire), à se chamailler comme frère et sœur (c'est toi la petite sœur, tu l'as avoué toi-même !). J'espère qu'on continuera à se faire des marathons



filmographiques, des sorties gastronomiques et d'autres activités avec le groupe encore longtemps (ainsi qu'à se trouver des surnoms plus stupides les uns que les autres).

A Bryan ZAMONARO, l'enfant prodige d'Hémo-cytologie, aussi appelé le boss des cellules ou encore Bboy le maître du Oué, pour ces conflits que tu adores instiguer entre Justine et moi puis à regarder de loin, le popcorn à la main. J'ai passé de bons moments à discuter avec toi sur des sujets captivants comme sur du n'importe quoi, et j'espère que ça continuera encore longtemps.

Petit clin d'œil à Juliette AMICHOT, pour réussir à supporter notre brin de folie.

A Marion GARCIA (et non Manon), la bobo bordelaise du groupe. J'ai appris à te connaître au fil des semestres, ce qui fut un réel plaisir. Peut-être un peu moins pour toi, maintenant que tu es devenue ma nouvelle cible des taquineries. C'est toujours un plaisir de te voir pendant une astreinte le samedi matin ou dans la chambre de garde pendant une de tes RCP de parasito-myco, et j'espère pouvoir te voir encore plus souvent ailleurs qu'au labo. Et encore désolé pour l'incident du bitlocker.

A Roxane BONAFE et Camille GUYON, l'aveyronnaise perdue dans ce milieu à prédominance albigeoise, et la bordelaise d'une bonté folle. Vous formez un duo inséparable depuis la cohabitation à l'internat de pharmacie, irradiant d'une bonne humeur légendaire et d'une sympathie inébranlable.

Roxane, tout comme pour toi, tu es la première personne que j'ai rencontré dans cet internat, et ce fut le coup de foudre amical. Tu as su faire face aux difficultés de ta première année d'internat avec une telle férocité de vie que tu en es devenue un exemple à suivre que tout est possible. Tu es un vrai rayon de soleil dans nos vies, et j'espère pouvoir continuer à parler avec toi de sujets aussi bien sérieux que ridicules.

Camille, tu débordes tellement d'énergie positive qu'être en ta présence est mieux que n'importe quel antidépresseur. Je te souhaite un bon courage pour continuer à canaliser un peu l'autre folle citée plus haut, surtout en présence de Juju.

A Florence LEGRAND et à Sarah DECHEIVER, qui avec Justine forment un trio explosif que je prends un malin plaisir à embêter (un peu trop peut-être ?). C'est toujours un plaisir d'être en votre compagnie, que ce soit au soleil ou au milieu de la mousse.

Félicitations à Floflo pour la réussite de sa thèse, Mme le Docteur !

Bientôt ton tour Sarah, on a tous hâtes d'y être !

A Joséphine BONAVITA la muteuse professionnelle et Blandine DALL'ARMI la féminazi. Vous étiez la petite surprise inattendue de mon semestre en pharmaco-tox. Et ces petites FFI sont maintenant devenues internes. Bien qu'on ne se voie que très peu maintenant, j'espère pouvoir passer encore du temps avec vous. Et j'ai hâte de vous voir devenir docteurs à votre tour.

A Matthieu CATHALA, Vincent LAMBERT et Antoine CHARRIER. Les albigeois et le bordelais. Les chevaliers du fiel et champions de joute. C'est toujours un plaisir de vous voir, et de taquiner les autres membres du groupe avec vous. Aux futurs marathons filmographiques et soirées alcoolisées en votre compagnie.

A Fatma BEN HADJ HASSINE et Mehdi DIOURI (nouvellement docteur depuis ce matin), le couple le plus fou que je connaisse.

Fatma, tu es la petite sœur que j'aurai aimé avoir. Tu es beaucoup trop innocente et naïve pour ton bien, heureusement que tu as su t'entourer de personnes d'exception qui te rattrapent dans tes bêtises. Tu es un vrai rayon de soleil, toujours à mettre le sourire sur les lèvres des autres, à dégager une énergie débordante de joie. Apprends à respirer correctement et tu seras parfaite.

Mehdi, je t'ai découvert une première fois à notre première année, lors de la cohabitation à l'internat de pharmacie, comme un garçon fou toujours en train de faire la fête, et je t'ai de nouveau découvert en deuxième année, en tant qu'homme plus posé, réfléchi, mûre (mais toujours aussi fou). La seule chose qui n'a pas changé chez toi pendant ces 3 années, c'est ton envie d'apporter de la joie chez tes amis.

A Jessica BERTRAND-ZOKPE, la définition même de la *Fast Life*. Je ne sais pas d'où te vient toute cette énergie, j'en suis même jaloux. C'est toujours un plaisir de te revoir en retour de vacances, le téléphone dégainé, la galerie ouverte, prête à nous partager tes souvenirs et tes expériences de ces contrées lointaines.

A Silvia MARTINEZ RIVEIRA, notre espagnole préférée. La plus posée dans ce groupe de dégénérées que tu formes avec Jess, Fat et Rims, littéralement leur grande sœur (ou leur daronne). Maintenant que nos thèses sont finies, c'est l'heure de faire plus de soirées jeux ensemble.

A Alexandre STAMBOULI, notre petit protégé geek à Benji et moi. Plus je discute avec toi, et plus je découvre des facettes de toi qui me fascinent. A nos futures parties de JDR ensemble, avec toute la clique.

A Guillaume LABARTHE, le tarnais 1<sup>er</sup> degré et mon coéquipier de babyfoot préféré. On réussira un jour à finir champion du tournoi un jour.

A Sami ZOUITINA, le *chill* à l'état pur, pour toutes ces discussions enrichissantes, et de m'avoir fait découvrir l'escalade.

A Louis CARRE, probablement mon N1 préféré (désolé les autres, ce n'est pas contre vous). Tu as été la plus grande surprise de cette année. Tu es un personnage complètement atypique et loufoque, aux hobbies inattendus mais passionnants, ce qui te rend unique et très attachant. C'est toujours une véritable joie de passer des moments avec toi, autour d'un cidre, d'un babyfoot ou d'une table de JDR, et j'espère que ça continuera encore longtemps.

A Mathieu ALONZO, le chef de la radiopharmacie qu'on voit un peu trop souvent au babyfoot entre midi et deux. Malgré moi, j'ai beaucoup appris à contrôler mes émotions face

à ton management positif. Maintenant c'est à toi de contrôler ta rage face à tes gobelins préférés.

A mes co-internes niveau 2 et docteur junior de ce semestre d'hématologie : Maëlys CROLLE, Pauline SOTTIL, Bryan ZAMORANO, Linda BEN SAÏD, Houda ATIK, Mathias CHEA, Sophie LEGRAND, Camille GONDRAN. Merci de votre patience, de votre sérieux et de votre sympathie durant ce semestre. Et bravo à ceux qui comme moi ont passé leur thèse cette année, on l'a fait !

Aux internes de première année dont j'ai eu la chance d'encadrer cette année en Biochimie et/ou en Hématologie : Yoann FLUHR, Louis CARRE, Aurore GUILLEBASTRE, Clara PETIT, Manon FERNANDEZ, Anouk VAILLANT, Angie ARANGO RAMIREZ, Clarisse MOREL. Ce fut un réel plaisir de vous côtoyer cette année, vous avez tous fait preuve d'une intelligence, d'une vivacité d'esprit, d'un sérieux et d'une sympathie incroyables.

Bravo à Angie pour ton bébé, hâte de voir des photos de lui.

Petit mot spécial pour Aurore : sois moins stressée, tu es compétente, ne doute pas de toi, j'ai confiance en toi.

Et à tous les autres internes que j'ai eu comme co-internes ou que j'ai côtoyé de près ou de loin ces trois dernières années : Dorian LOURBET, Delphine PARRAUD, Caroline CARLE, Jean MINES, Pierre-Luc MARIGNAC, Thibaut CAZENEUVE, Mathilde MARLAS, Anne-Marie COMBO, Joy et Elie AB MOANES, Gauthier LIGNIER (bravo pour le mariage !), Germain BAMINI, Lucie FELETTI, Apolline LELARD, Christina GUILLAUME, Pauline PEREZ, Clément VIGUIER, Pauline NEGRE, Suzanne BUREL, Emilie et Lucie THENE, Léa CELA, Lamia TRABULSI, Vallauris MESLE, Candice POLLANI, Clément BURGUY, Ophélie VIENET, Ines CHAOUI, Hajar EL IDRISSE, Morgane ANDREOLETTI, Mélanie LECRAC, Emma JONCOUR, Nicolas RAIMONDO, Laure BADIER...

Merci à vous tous pour ces moments partagés ensemble, ces discussions sérieuses et ces franches rigolades, ces soirées, ces parties de babyfoot, bref pour ces 3 années passées ensemble. Et désolé de ne pas pouvoir faire une phrase pour vous tous, ça fait trop de monde à remercier !

# Table des matières

I. Les oligosaccharides .....	18
1. Biosynthèse .....	20
2. Dégradation.....	24
3. Rôles physiologiques .....	26
1. Rôles en pathologie :.....	28
II. Les oligosacchariduries.....	34
1. Physiopathologie .....	37
2. Présentation clinique.....	43
3. Diagnostic .....	45
4. Traitement.....	48
III. Matériel et Méthode .....	51
Matériel .....	51
Méthodes .....	55
IV. Résultats .....	57
V. Discussion .....	61
VI. Conclusion .....	67
Annexe.....	68
Bibliographie .....	69

## Liste des figures

- Figure 1 Structure des N-glycanes
- Figure 2 Schéma d'une mucine
- Figure 3 Les gangliosides
- Figure 4 Dol-PP- Glc3Man9GlcNAc2
- Figure 5 Synthèse des gangliosides
- Figure 6 Exemple de la dégradation d'un N-glycane complexe
- Figure 7 Dégradation des gangliosides
- Figure 8 Représentation du fonctionnement des GBP
- Figure 9 Pénétration cellulaire par les virus de la grippe
- Figure 10 Altération des glycanes favorisant la dissémination de métastases
- Figure 11 Représentation de la fonction de dégradation des lysosomes
- Figure 12 Dysfonctionnement mitochondrial dans la neurodégénérescence associée à une MSL
- Figure 13 Absence de présentation du complexe CMH II - peptide par les cellules dendritiques aux lymphocytes T
- Figure 14 CCM des oligosaccharides d'échantillons urinaires
- Figure 15 Spectres des MRM de quantification des OS testées par la méthode LC-MS/MS
- Figure 16 Analyse du profil oligosaccharidique d'un patient faux positifs en CCM

## Liste des tableaux

- Tableau 1 Résumé des symptômes pour les OS étudiées
- Tableau 2 Résumé des urines incluses dans le protocole
- Tableau 3 Paramètres MS pour l'ionisation et la fragmentation des oligosaccharides
- Tableau 4 Transitions MS utilisées pour la détection et le dosage des oligosaccharides
- Tableau 5 Gradient de la LC pour la séparation des oligosaccharides
- Tableau 6 Répétabilité du dosage des oligosaccharides urinaires par LC-MS/MS
- Tableau 7 Résumé des MSL mentionnées comprises dans les DNN cités.

## Liste des abréviations

AAV	Virus adéno-associé
Asn	Asparagine
Asp	acide aspartique
ATP	Adiosine triphosphate
$\beta$ -HCG	Hormone $\beta$ -gonadotrophine chorionique humaine
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDG	Congenital Disorders of Glycosylation
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMP	Cytosine-5'-monophosphate
CrU	Créatinine urinaire
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
DAMPS	Motifs moléculaires associés aux dégâts
DNN	Dépistage néonatal
Dol-PP	Dolichol-pyrophosphate
ERT	Thérapie de Remplacement Enzymatique
ESI + / -	Mode electrospray positif / négatif
Fuc	Fucose
GAG	Glycosaminoglycanes
Gal	Galactose
GalNAc	N-acetylgalactosamine
GBP	Protéines de liaison aux glycanes
Glc	Glucose
GlcCer	Glucosylcéramide
GlcNAc	N-acétylglucosamine
GlcNA <sub>sn</sub>	Aspartylglucosamine
GnT / MGAT	N-acétylglucosaminyltransférase
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosine triphosphate
Hex	Hexose



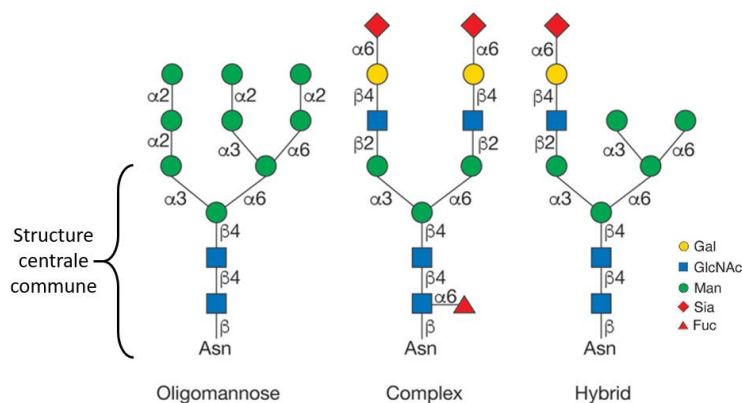
HexNAc	N-acetylhexosamine
IFN $\gamma$	Interféron $\gamma$
IL-1 $\alpha/\beta$	Interleukine-1 $\alpha/\beta$
IR	Récepteur de l'insuline
IS-Glc <sub>7</sub>	Standard interne maltoheptaose
LacCer	Lactosylcéramide
LC-MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem couplée à la Chromatographie Liquide
M6P	Mannose-6-Phosphate
Man	Mannose
ML	Mucopolysaccharidoses
MPS	Mucopolysaccharidoses
MS	Spectrométrie de masse
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
MSL	Maladies de surcharge lysosomale
NCAM	Molécules d'adhésion des cellules neurales
NGS	Séquençage de « nouvelle génération »
OS	Oligosacchariduries
OST	Oligosaccharyltransférase
PAMP	Motifs moléculaires associés aux agents pathogènes
RE	Réticulum Endoplasmique
<i>resp/CrU</i>	<i>Response/Créatininurie</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SAMP	Motifs moléculaires auto-associés
SCN	Système nerveux central
Ser	Sérine
Sia	Acide sialique
TCSH	Transplantation de Cellules Souches Hématopoïétiques
Thr	Thréonine
TLR	Récepteurs Toll-like
TNF $\alpha$	Facteur de nécrose tumorale $\alpha$
UTP	Uridine triphosphate
VEGF	Facteur de croissance endothélial vasculaire

# I. Les oligosaccharides

Les oligosaccharides sont définis comme des oligomères de 3 à 10 monosaccharides. Ils peuvent être retrouvés à l'état libre, ou liés à une structure centrale (appelés alors glycanes). Les classes courantes de glycanes sont principalement définies selon la nature de la liaison à l'aglycone (protéine ou lipide) **(1,2)**.

Une glycoprotéine est un glycoconjugué dans lequel une protéine porte un ou plusieurs glycanes, liés de manière covalente à un squelette polypeptidique en position N (N-glycane) ou O (O-glycane) **(1,2)**.

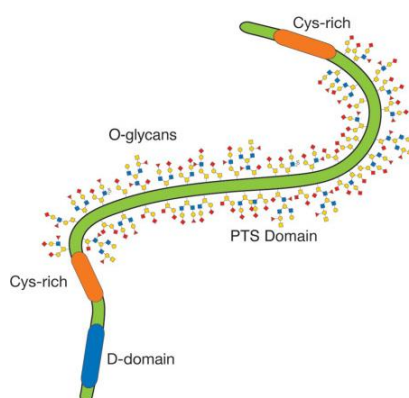
Un N-glycane est lié de façon covalente à une protéine sur un résidu asparagine (Asn) d'une séquence peptidique Asn-X-Ser/Thr (où X est un acide aminé quelconque à l'exception de la proline) grâce à un résidu N-acétylglucosamine (GlcNAc). Tous les N-glycanes eucaryotes partagent une séquence centrale commune,  $\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1$  (ou  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ), et sont classés en trois types (**Figure 1**) : (1) oligomannose, dans lequel seuls les résidus mannoses (Man) étendent le noyau ; (2) complexe, dans lequel des ramifications initiées par GlcNAc prolongent le noyau ; et (3) hybride, dans lequel le Man prolonge le bras  $\text{Man}\alpha 1-6$  du noyau et une ou deux antennes initiées par GlcNAc prolongent le bras  $\text{Man}\alpha 1-3$  **(7)**.



**Figure 1** : Structure des N-glycanes. D'après (7)

Gal : Galactose ; GlcNAc : N-acétylglucosamine ; Man : Mannose ; Sia : Acide sialique ; Fuc : Fucose

Un O-glycane est fréquemment lié au polypeptide par l'intermédiaire d'une N-acétylgalactosamine (GalNAc) à un résidu sérine (Ser) ou thréonine (Thr) et peut être étendu à différentes classes structurales centrales. Parmi eux, la mucine, une glycoprotéine de grande taille, transporte de nombreux O-glycanes regroupés grâce à leurs larges domaines répétitifs de Ser et Thr (**Figure 2**). Cette glycosylation peut toutefois être effectuée sur toute protéine subissant un passage par la voie de sécrétion. Plusieurs autres types d'O-glycanes existent également (par exemple, le fucose, le glucose ou le mannose liés à l'Oxygène). Les O-glycanes des mucines ont quatre structures centrales principales appelées noyaux 1 à 4. Chaque noyau peut être prolongé par une variété de résidus de sucre pour donner des chaînes linéaires ou ramifiées qui ressemblent à celles des N-glycanes et des glycolipides. Les déterminants de groupes sanguins se trouvent couramment dans la structure des mucines située aux extrémités non réductrices des glycanes O-GalNAc (**1,17**).

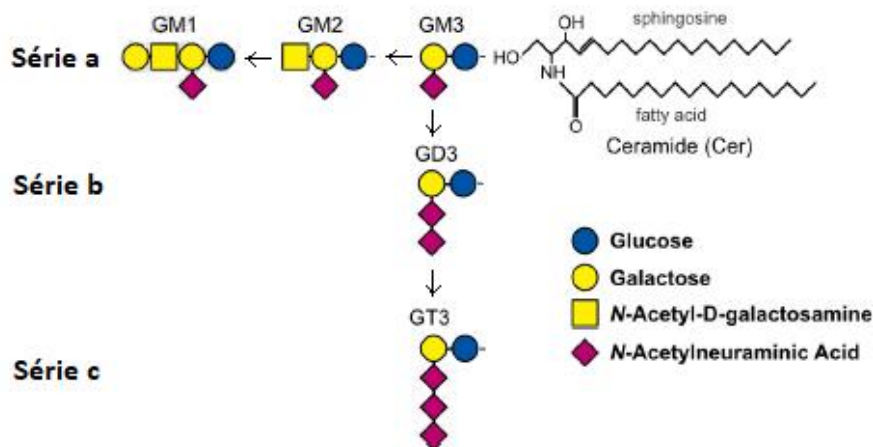


**Figure 2** : Schéma d'une mucine. PTS Domain : domaine riche en Pro, Thr, Ser. D'après (8)

Ces glycanes ne seront toutefois que peu évoqués ici car non exploités dans nos travaux.

Les glycosphingolipides sont synthétisés à partir d'un céramide, constitué d'une base sphingoïde liée à un acide gras par liaison amide via l'amine en C2. Les gangliosides sont des glycosphingolipides sialylés (Sia), retrouvés principalement dans la membrane plasmique des cellules de la substance grise du cerveau. Indépendamment de l'état d'allongement de la structure centrale, les gangliosides sont caractérisés par le nombre et les positions de Sia qui définissent leur classification en 0, M, D, T, Q et P (zéro à cinq acides sialiques) et série a, b,

et c (un, deux ou trois résidus Sia sur le résidu Gal interne) ; le chiffre correspondant à leur degré de migration par chromatographie sur couche mince (**Figure 3**) (**9,19**).



**Figure 3** : Les Gangliosides. D'après (22)

Les glycanes eux-mêmes représentent de nombreuses possibilités combinatoires, générées par une variété de glycosidases et de glycosyltransférases concurrentes et agissant de manière séquentielle, ainsi que les mécanismes de « chaîne d'assemblage » sous-compartmentés de la biosynthèse des glycanes dans l'appareil de Golgi. Les structures qui en découlent ne sont donc pas codées directement dans le génome mais sont des produits géniques secondaires (**1,2**).

## 1. Biosynthèse

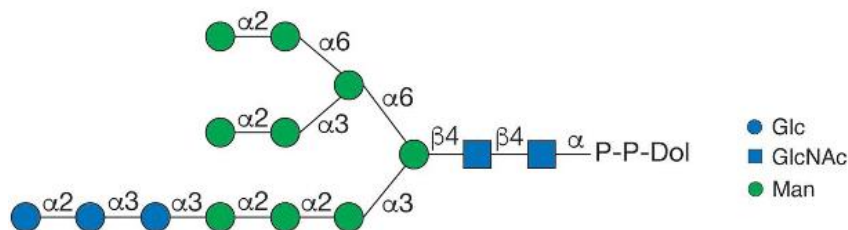
La biosynthèse des glycanes s'effectue principalement dans le Réticulum Endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi. La plupart des protéines de surface cellulaire ou sécrétées sont transloquées de manière cotraductionnelle dans le RE où elles sont repliées, modifiées et soumises à des mécanismes de contrôle de qualité au cours de leur migration dans ces deux organites. Les protéines de la voie de sécrétion peuvent être N-glycosylées, O-glycosylées et/ou modifiées avec l'ajout d'ancres de glycosylphosphatidylinositol (GPI), ou de séquences de Glycosaminoglycanes (GAG). Les enzymes impliquées dans chacune de ces voies de modification sont distinctes. Les N-glycanes sont préassemblés avant d'être transférés aux protéines puis modifiés. L'assemblage par étapes des glycanes ainsi que la glycosylation des

lipides impliquent des réactions à la fois dans le RE et dans l'appareil de Golgi. La majorité des enzymes de glycosylation de l'appareil de Golgi sont d'ailleurs des protéines membranaires, leur site catalytique étant orienté dans la lumière de l'organite.

Les réactions de glycosylation utilisent des formes activées de monosaccharides. Ces donneurs à haute énergie pour les glycosyltransférases sont formés dans le cytosol à partir de l'addition d'un glycosyl-1-Phosphate (monophosphaté) à un nucléoside triphosphate (uridine triphosphate (UTP) ou guanosine triphosphate (GTP)), ou dans certains cas liés à des lipides-phosphates (tels que le dolichol-pyrophosphate, ou Dol-PP ; un polyisoprénoïde composé d'unités isoprène à cinq carbones). Les acides sialiques sont les seuls monosaccharides activés en tant que CMP-mononucléotides (cytosine-5'-monophosphate). L'origine de ces monosaccharides est en général alimentaire (exogène), mais peut aussi venir de la récupération des sucres après dégradation des glycanes dans les lysosomes (source endogène) (1-5,7). On distingue la biosynthèse des N-glycanes et celle des gangliosides.

#### a. N-glycanes :

La biosynthèse des N-glycanes se déroule en deux phases, la première se produisant au niveau de la membrane du RE via l'oligosaccharyltransférase (OST). Un oligosaccharide de séquence  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  assemblé sur le Dol-PP est transféré par l'OST au résidu d'Asn dans le motif Asn-X-Ser/Thr. La deuxième phase commence par le traitement des N-glycanes via les glycosidases et les glycosyltransférases dans la lumière du RE. Elle se poursuit dans l'appareil de Golgi d'une manière spécifique à l'espèce, au type de cellule et à son état physiologique, ainsi qu'à la protéine elle-même. Les glycosidases, dont certaines étant bien connues dans la littérature pour leur rôle dans la dégradation des glycanes dans le lysosome, sont aussi impliquées dans la formation d'intermédiaires utilisés comme substrats des glycosyltransférases. Ainsi, l'oligosaccharide  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  (Figure 4) nouvellement greffé est coupé par des glycosidases ainsi que par des mannosidases. L'objectif est de générer des substrats ciblés par les glycosyltransférases, afin de produire des N-glycanes élaborés complexes ou hybrides. Il est possible d'obtenir un vaste répertoire de N-glycanes matures et complexes via d'autres additions de sucres, via une addition directe sur le noyau de N-glycane, ou via l'allongement des résidus GlcNAc ramifiés, le "coiffage" ou encore la "décoration" de branches allongées (sialylation, fucosylation...).



**Figure 4 :** *Dol-PP- Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. D'après (7)*  
*Glc : Glucose ; GlcNAc : N-acétylglucosamine ; Man : Mannose*

Les glycoprotéines ont généralement une gamme de N-glycanes différents sur un motif de séquence peptidique particulier, conduisant à une hétérogénéité des glycanes sur chaque site. Les glycoprotéines qui ne diffèrent que par leur complément N-glycane sont ainsi appelées glycoformes. Cette variation des N-glycanes d'une même glycoprotéine peut être due à la conformation protéique affectant la disponibilité du substrat pour les enzymes, le métabolisme des sucres nucléotidiques, le taux de transport de la glycoprotéine à travers la lumière du RE et de l'appareil de Golgi, et la proximité d'un résidu Asn à un domaine transmembranaire. En outre, la localisation des glycosyltransférases dans les sous-compartiments de l'appareil de Golgi peut déterminer le choix des enzymes rencontrant les accepteurs de N-glycane. En effet, les enzymes de glycosylation sont souvent en compétition pour le même accepteur et la plupart nécessite les actions préalables d'autres glycosyltransférases et glycosidases avant de pouvoir agir (7).

#### **b. Gangliosides :**

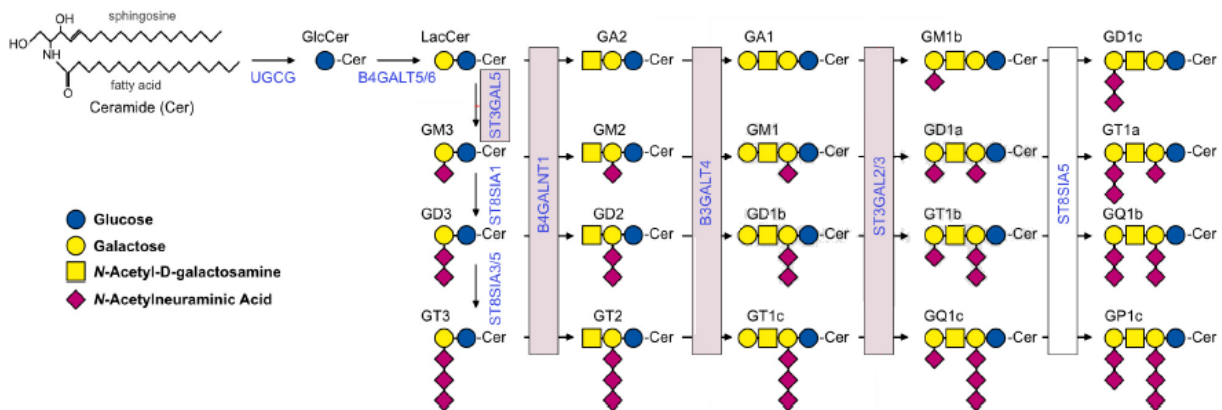
Les gangliosides, quant à eux, sont synthétisés par toutes les cellules. Les concentrations de leurs différentes formes varient toutefois beaucoup selon le type cellulaire.

Le début de leur synthèse est commun. En effet, la première étape est la synthèse du céramide dans le RE, qui se dirige ensuite vers l'appareil de Golgi où il subira l'action de transférases pour devenir un glycosphingolipide. La première modification que subit le céramide est le transfert d'un glucose (Glc) par la céramide- $\beta$ -D-Glc-transférase (ou glucosylcéramide (GlcCer) synthase), suivi d'un galactose (Gal) par la glucosylcéramide- $\beta$ 1,4-

Gal-transférase, pour finalement devenir un lactosylcéramide (LacCer), le précurseur des gangliosides, et de la série 0.

Ce précurseur est modifié par une GM3 synthase (une Sia-transférase) pour former le premier ganglioside de la série a (1 Sia greffé). Ce dernier peut servir de substrat à la GD3 synthase (une autre Sia-transférase) pour entrer dans la série b (2 Sia greffés). Si le résultat de la réaction précédente est mis en présence d'une GT3 synthase (également une Sia-transférase), elle forme le premier ganglioside de la série c (3 Sia greffés). A noter qu'une fois une série commencée, la réaction est irréversible. L'élongation des gangliosides des différentes séries se poursuit par les mêmes enzymes. Ainsi, la formation de GA2, GM2, GD2 et GT2 se fait par la même GalNAc-transférase (GM2/GD2 synthase), puis l'action d'une Gal-transférase (GM1a/GD1b synthase) permet la formation des gangliosides GA1, GM1a, GD1b et GT1c. Ces derniers peuvent subir successivement l'action d'une Gal-transférase, d'une Sia-transférase et d'une GalNAc-transférase pour compléter la famille des gangliosides (**Figure 5**).

Chez l'Homme, les acides sialiques se présentent exclusivement sous la forme d'acide N-acétylneuraminique et de ses dérivés O-acétylés. Ils peuvent être en outre modifiés par O-acétylation ou élimination du groupe N-acétyl, pour générer un groupe amine libre (**9,19,20**).



**Figure 5 : Synthèse des gangliosides. D'après (22)**

## 2. Dégradation

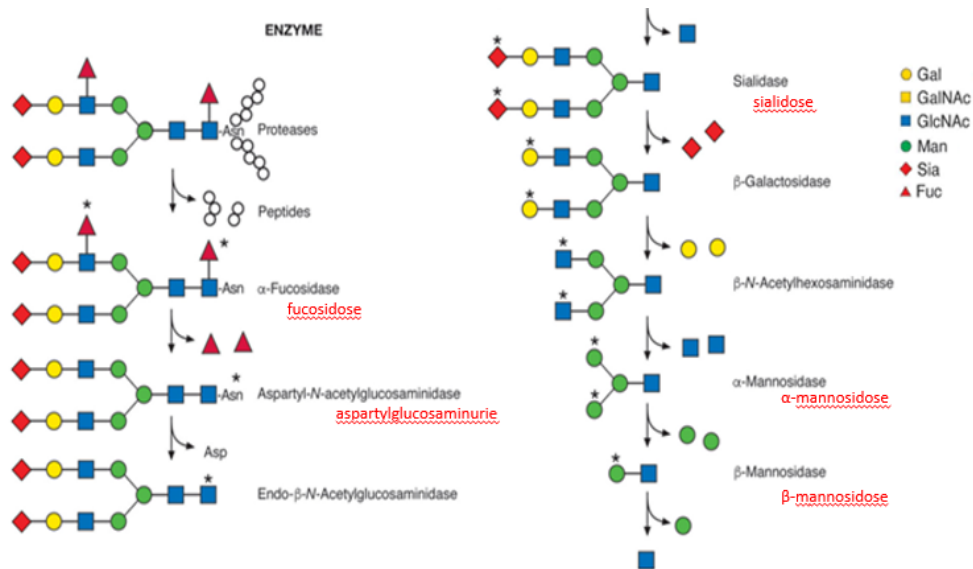
La majeure partie de la dégradation permettant le renouvellement des glycoconjugués se déroule dans les endosomes puis les lysosomes. La première étape est l'endocytose (qui comprend la phagocytose) : les endoglycosidases présentes dans les endosomes sont les initiateurs via le clivage des glycanes en interne. Ainsi, sont produits des dérivés pour les exoglycosidases (qui dégradent les glycanes à partir de l'extrémité non réductrice) dans le lysosome. Une fois décomposés, les monosaccharides individuels sont ensuite exportés du lysosome vers le cytoplasme par diffusion passive ou via l'action de différents transporteurs, afin de pouvoir être réutilisés **(4)**. Les exoglycosidases et leurs étapes de dégradation sont différentes selon la nature du sucre impliqué.

### a. N-glycanes :

Concernant les N-glycanes, une grande partie de la protéine initiale est préalablement dégradée par les protéases avant le début du catabolisme des N-glycanes par endo et exoglycosidases. Ce dernier est initié par l'élimination de tout résidu de fucose lié aux branches externes de la chaîne du glycanes. La glycosylasparaginase (aspartyl-N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase) clive ensuite la liaison GlcNAc- $\beta$ -Asn, produisant une glucosamine et un acide aspartique Asp (et non une asparagine). La chitobiase (une endo- $\beta$ -N-acétylglucosaminidase) élimine le GlcNAc réducteur, laissant l'oligosaccharide avec un seul résidu GlcNAc terminal. La chaîne oligosaccharidique est ensuite séquentiellement dégradée par les sialidases, suivies par la  $\beta$ -galactosidase, la  $\beta$ -N-acétylhexosaminidase et les  $\alpha$ -mannosidases. Le Man $\beta$ 1-4GlcNAc restant est clivé par la  $\beta$ -mannosidase en mannose et GlcNAc (ou chitobiose) **(Figure 6) (14)**.

La sialidase (neuraminidase) lysosomale, la  $\beta$ -galactosidase et une sérine carboxypeptidase appelée protéine protectrice / cathepsine A forment un complexe dans le lysosome qui est nécessaire pour une dégradation efficace des glycoconjugués sialylés. La cathepsine A protège la  $\beta$ -galactosidase d'une dégradation rapide et active également le précurseur de la sialidase, mais son rôle protecteur du complexe ne dépend pas de l'activité catalytique intrinsèque de la cathepsine A **(14)**.

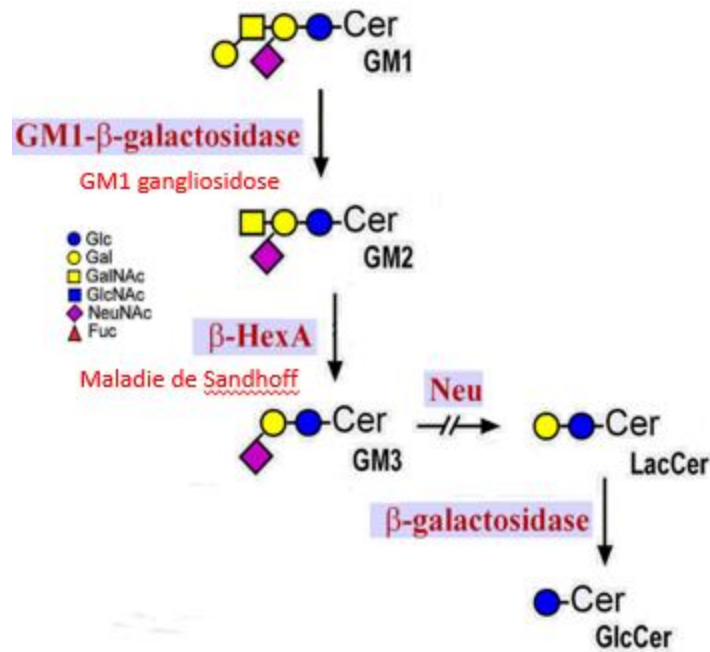




**Figure 6** : Exemple de la dégradation d'un N-glycane complexe. D'après (14)  
*Gal* : Galactose ; *GlcNAc* : N-acétylglucosamine ; *GalNAc* : N-acétylgalactosamine ; *Man* : Mannose ;  
*Sia* : Acide sialique ; *Fuc* : Fucose

### b. Gangliosides :

Dans le cas des gangliosides, leur dégradation séquentielle commence avec l'élimination des unités terminales de Sia par des neuraminidases pour générer du GM1. La dégradation du GM1 se poursuit avec l'élimination du Gal terminal par la GM1- $\beta$ -galactosidase pour donner le GM2. Ensuite, le résidu GalNAc terminal est libéré par la  $\beta$ -hexosaminidase A à l'aide de la protéine activatrice GM2 pour former GM3, qui peut être dégradé en LacCer par une  $\alpha$ -neuraminidase. Une  $\beta$ -galactosidase dégrade le LacCer en GlcCer, dont le résidu Glc est éliminé par la  $\beta$ -glucocérébrosidase (**Figure 7**). Enfin, le céramide est clivé par la céramidase acide en base sphingoïde (principalement la sphingosine) et en acide gras libre. La voie de « récupération » (ou recyclage) utilise des produits de dégradation lysosomale pour la biosynthèse de sphingolipides. Par exemple, la sphingosine est utilisée pour la formation de sphingosine-1-phosphate, un lipide mitogène et angiogénique. Cette voie joue un rôle important dans de nombreuses cellules (**20**).



**Figure 7 :** Dégradation des gangliosides. D'après (20)

### 3. Rôles physiologiques

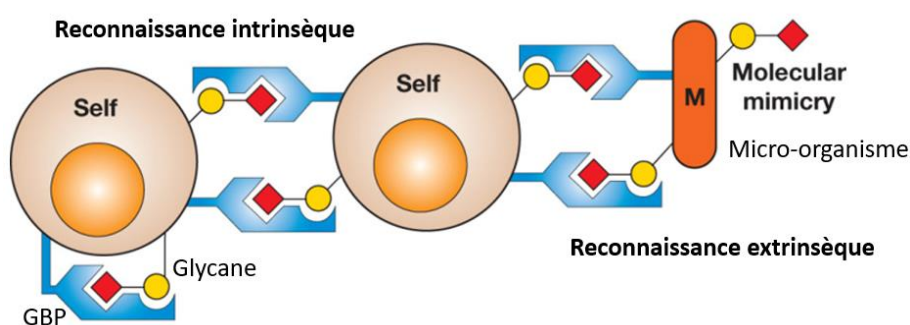
Les différentes fonctions des glycanes sont multiples et essentielles au fonctionnement de l'être vivant. Elles comprennent entre autres le développement, la croissance, le maintien et la survie de l'organisme. Cependant, les fonctions spécifiques ne sont pas encore élucidées pour de nombreux glycanes. De même, un glycanes peut avoir à lui seul des fonctions différentes selon l'aglycone (protéine ou lipide) auquel il est attaché, selon le tissu qui l'a synthétisé ou bien selon le contexte environnemental.

Elles ont comme principales fonctions biologiques :

- Une contribution structurelle, où les glycanes agissent comme échafaudages extracellulaires ou de barrière physique. Un exemple typique est le rôle des mucines qui, grâce à leur nombreux O-glycanes fortement hydrophiles, contribuent à l'hydratation, à la viscosité et à l'adhésivité du mucus qu'elles constituent. Ceci permet une protection des surfaces épithéliales contre les dommages physico-chimiques et infectieux, tout en interagissant avec le microbiote local. Un autre exemple est la fonction des N-glycanes principalement dans le bon repliement des protéines nouvellement synthétisées dans le RE, ainsi qu'à leur solubilité et au maintien de leur conformation (6,10-12) ;

- Un chaînon dans la transmission de signaux, en interagissant dans certains cas avec des ligands tels que des facteurs de croissance en permettant la reconnaissance de leur récepteur ou en masquant l'accès à ces derniers. Un exemple est l'hormone  $\beta$ -gonadotrophine chorionique humaine ( $\beta$ -HCG) qui a besoin d'être glycosylée afin d'activer l'adénylate cyclase, même si elle se lie à son récepteur. Dans d'autres cas, les glycanes peuvent eux-mêmes agir en tant que ligands des protéines de liaison aux glycanes (GBP ; par exemple les lectines). Ces GBP peuvent être séparées selon leur reconnaissance des glycanes **(6,8,10-12,17)** :

- Les GBP intrinsèques, qui reconnaissent les glycanes du même organisme, médiant généralement les interactions cellule-cellule ou reconnaissant les molécules extracellulaires. Un prototype est représenté par les récepteurs du Mannose-6-Phosphate (M6P), impliqués dans le système d'adressage des hydrolases lysosomales aux lysosomes. Un autre exemple concerne les sélectines, des protéines de surface cellulaire agissant comme molécules d'adhésion et servant entre autres comme médiation entre les cellules endothéliales des vaisseaux et les cellules sanguines ;
- Les GBP extrinsèques, telles que les adhésines, les agglutinines, ou encore les toxines bactériennes, qui reconnaissent les glycanes d'un autre organisme (vu plus en détail dans la prochaine partie) (**Figure 8**).



**Figure 8** : Représentation du fonctionnement des GBP. D'après (6)

Il est intéressant de noter la fonction très particulière des O-glycanes en tant que porteurs des antigènes des groupes sanguins et tissulaires, importants pour les interactions hôte-pathogène, à la tolérance aux auto-antigènes et la circulation des cellules immunitaires **(8,17)**.

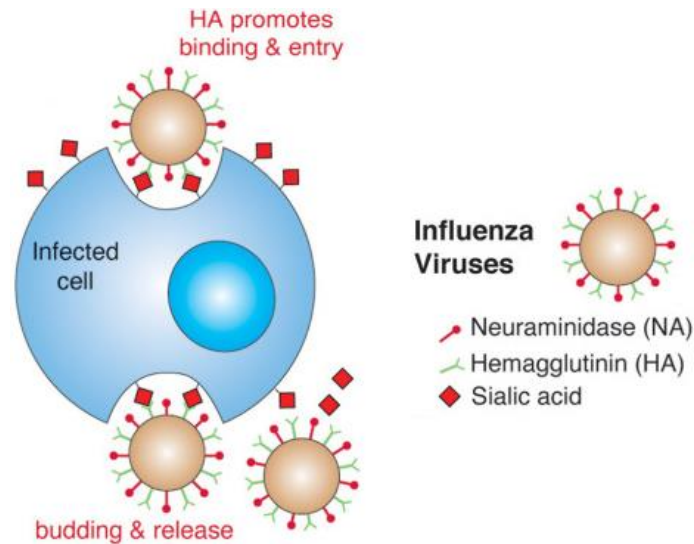
Les gangliosides sont quant à eux majoritairement retrouvés dans le tissu nerveux (où les plus abondants sont GM1, GD1a, GD1b et GT1b). Il a été démontré que dans ce milieu, ils ont une importance dans le maintien structurel cérébral, la transmission neuronale, le développement neurologique et la régénération neurale. En outre, le GM3 et ses dérivés sont impliqués dans la maturation fonctionnelle de la cochlée au cours du développement précoce. GD1a et GT1b interviennent dans les interactions axone-myéline par association avec la glycoprotéine associée à la myéline, contribuant ainsi à assurer la stabilisation axone-myéline à long terme, la protection axonale et la régénération **(19,21,22)**.

## 1. Rôles en pathologie :

Malgré leurs effets bénéfiques avérés, la littérature a montré que ces derniers ont également de nombreux effets néfastes dans diverses pathologies plus ou moins fréquentes.

### a. Infections

De nombreux glycanes sont spécifiquement reconnus et engagés par divers virus, bactéries et parasites, ou par leurs toxines. Compte tenu de l'évolution rapide des agents pathogènes et de la sélection continue, il existe généralement une excellente spécificité de reconnaissance pour la séquence des glycanes impliqués. Par exemple, les hémagglutinines de nombreux virus reconnaissent spécifiquement le type de Sia hôte, ses modifications et sa liaison glycosidique à la chaîne glucidique sous-jacente. Il en va de même avec le virus de la grippe humaine qui reconnaît les Sia liés en  $\alpha$ 2-6 au Gal des gangliosides **(Figure 9)**. Certaines bactéries utilisent également des lectines aux extrémités des *pili* ou *fimbriae* afin d'adhérer à la surface des cellules hôtes, comme *Escherichia coli* pour coloniser les voies urinaires. Également, diverses toxines se lient avec une grande spécificité à certains gangliosides mais pas aux mêmes épitopes des glycanes présents sur les protéines **(7,19)**.



**Figure 9** : Pénétration cellulaire par les virus de la grippe. D'après (13)

Pour contrer ces conséquences délétères, certains organismes ont développé la capacité de masquer ou de modifier les glycanes reconnus par les micro-organismes ou les toxines. Ainsi, les séquences de glycanes sur les glycoconjugués solubles, tels que les mucines sécrétées, agissent comme des leurres pour les pathogènes (7).

De nombreux motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (*Pathogen-Associated Molecular Patterns* ou PAMP) sont principalement composés de glycanes étrangers et/ou de modèles de glycanes qui sont reconnus par les cellules immunitaires innées et sont donc détectés par des récepteurs spécifiques tels que les *Toll-Like Receptors* (TLR ; récepteurs de reconnaissance dans le système immunitaire inné) et les récepteurs de type C des lectines. Enfin, les mécanismes immunitaires innés sont régulés *in vivo* grâce à la reconnaissance de motifs moléculaires auto-associés (SAMP) (7).

Certaines bactéries utilisent également le mimétisme moléculaire des structures communes des glycanes de l'hôte pour échapper au système immunitaire adaptatif. Ainsi, le méningocoque de type B se pare d'une capsule de Sia liés en  $\alpha 2-8$  identique à un motif présent sur les molécules d'adhésion des cellules neurales (NCAM) trouvées dans les tissus neuraux humains, rendant la bactérie non immunogène. Ce phénomène peut toutefois générer une réponse immune de l'hôte face aux antigènes du soi suite à une infection par une bactérie présentant ce type de mécanisme. C'est le cas de l'infection par *Campylobacter*

*jejuni*, qui exprime une variété de gangliosides humains reconnus par les cellules dendritiques. Ces cellules présentatrices d'antigènes stimulent alors les lymphocytes B pour la production d'anticorps qui seront dirigés contre des antigènes du soi. Il en résulte la déclaration d'une pathologie, le syndrome de Guillain-Barré, une polyradiculonévrite aiguë entraînant une quadriplégie aiguë **(13)**.

#### a. Maladies chroniques

De plus en plus d'études démontrent l'implication des oligosaccharides dans de nombreuses maladies chroniques, ce qui peut s'expliquer par la très grande variété des fonctions biologiques de ces sucres **(15,16,18)**.

Le fibrinogène plasmatique est fortement sialylé et les Sia sont impliqués dans la liaison du calcium. Certains troubles génétiques du fibrinogène sont associés à une sialylation altérée, conduisant à un dysfonctionnement de la coagulation. Les patients atteints de troubles hépatiques peuvent également manifester une augmentation de la ramification et/ou du nombre de N-glycanes sur le fibrinogène, entraînant une augmentation globale de la teneur en Sia, et potentiellement entraîner cliniquement un trouble hémorragique. Les patients atteints de CDG (*Congenital Disorders of Glycosylation*) qui se définissent par un ensemble de troubles monogéniques affectant la biosynthèse des N-glycanes, peuvent également présenter des signes thrombotiques ou hémorragiques s'expliquant en partie par une altération de la glycosylation des facteurs de la coagulation et/ou des plaquettes **(15)**.

Les gangliosides sont majoritairement retrouvés dans le tissu nerveux, mais sont également présents dans de nombreux autres tissus, comme dans les adipocytes où le GM3 interagit avec le récepteur de l'insuline (IR). Il a été démontré que des niveaux accrus de GM3 dans ces tissus entraînent sa liaison avec l'IR, perturbant son interaction avec la cavéoline, ce qui entraîne à son tour l'internalisation du récepteur et donc l'inhibition de la signalisation de l'insuline. Ce mécanisme expliquerait en partie la résistance à l'insuline dans le diabète de type 2 **(19)**.

Diverses maladies sont associées à des anticorps circulants dirigés contre des molécules de glycane spécifiques enrichies dans le système nerveux, provoquant des lésions neurales auto-immunes. De tels anticorps peuvent survenir via des mécanismes pathogènes distincts. Par exemple, les patients atteints de tumeurs bénignes ou malignes à cellules B sécrètent

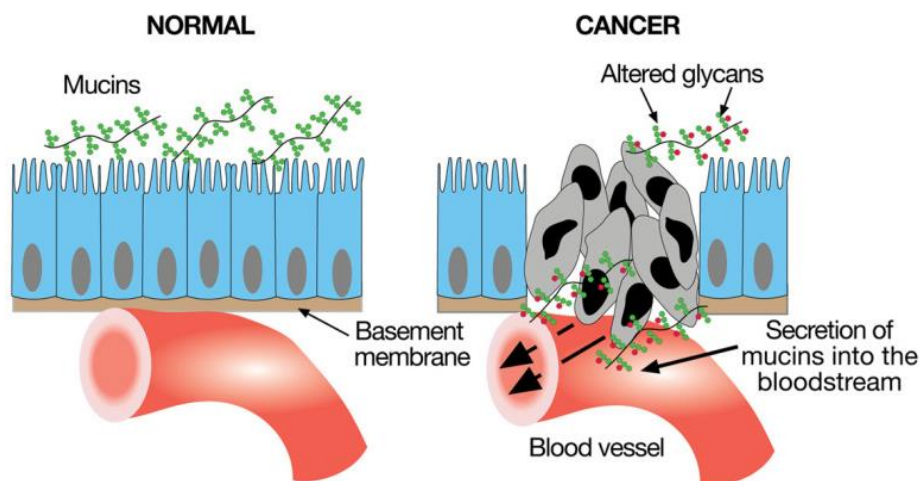
des anticorps monoclonaux IgM ou IgA spécifiques des gangliosides ou, plus couramment, contre les glucuronosyl glycanes sulfatés. Ces anticorps réagissent avec des glycolipides et contre les N-glycanes sur une variété de glycoprotéines du système nerveux central (SNC) qui portent la même séquence terminale. La neuropathie démyélinisante périphérique qui en résulte peut parfois être plus dommageable que la maladie primaire elle-même. Une réaction immunitaire au mimétisme moléculaire des structures neurales de gangliosides par les lipo-oligosaccharides de bactéries telles que *Campylobacter jejuni* est observée suite à une infection intestinale par ces pathogènes, des anticorps circulants à réaction croisée contre les gangliosides sont alors produits. Ceux-ci sont associés à l'apparition de symptômes de neuropathie démyélinisante impliquant les nerfs périphériques ou crâniens **(15,16)**.

#### **b. Cancers**

Les oligosaccharides auraient également un rôle significatif dans la physiopathologie des maladies cancéreuses. Les modifications des glycanes dans les cellules malignes peuvent prendre diverses formes : perte d'expression ou expression excessive de certains glycanes, augmentation de l'expression de glycanes incomplets ou tronqués et, moins fréquemment, apparition de nouveaux glycanes. Cependant, ceci n'est pas la conséquence d'une biosynthèse désordonnée dans les cellules tumorales mais d'un sous-ensemble de changements corrélé à la transformation maligne et à la progression tumorale, soulignant un rôle fonctionnel potentiel dans la biologie tumorale. Étant donné que le cancer est un processus «microévolutif» dans lequel seules les cellules les plus aptes survivent et que les tumeurs sont sous pression de surveillance immunitaire, il est probable que ces modifications spécifiques des glycanes soient sélectionnées au cours de la progression tumorale **(15)**. A titre d'exemples, nous allons citer ci-après les principaux mécanismes décrits dans la littérature pour lesquels ils participent activement.

En premier lieu, la perte des jonctions d'adhérence et de la topologie des cellules épithéliales malignes détruisent la polarisation, permettant ainsi aux mucines de pénétrer dans l'espace extracellulaire et dans le sang **(Figure 10)**. Les mucines peuvent ainsi agir comme anti-adhésines pour favoriser le déplacement d'une cellule de la tumeur primitive lors de l'initiation de la métastase. Les mucines tumorales portant des ligands de sélectine facilitent plusieurs aspects de la progression du cancer. Elles pourraient également interférer

avec la reconnaissance des cellules immunitaires et bloquer ou masquer la présentation des peptides antigéniques par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (15).



**Figure 10** : Altération des glycans favorisant la dissémination de métastases. D'après (16)

Comme deuxième exemple, il a été démontré qu'une augmentation de la ramification  $\beta$ 1-6 des N-glycanes, conséquence directe d'une expression accrue de la N-acétylglucosaminyltransférase V (GnT-V, MGAT5 entraînant une augmentation de la taille des glycoprotéines des cellules tumorales.). Cette surexpression de MGAT5 (et de MGAT4 pour les ramifications  $\beta$ 1-4) dans les cellules tumorales s'accompagne d'une fréquence accrue de métastases chez la souris. De même, les cellules cultivées *in vitro* ont un phénotype plus fréquemment transformé. Ceci serait notamment dû à la formation importante de réseaux avec des GBP conduisant à une signalisation prolongée des facteurs de croissance (16).

La sialylation jouerait également un rôle. En effet, elle est généralement augmentée dans les cellules tumorales, à la fois sur les N-glycanes et sur les O-glycanes. La sialylation des N-glycanes sert de mécanisme de régulation pour plusieurs récepteurs tyrosine kinases afin d'améliorer la motilité cellulaire médiée par l'intégrine et de protéger les cellules contre l'apoptose induite par les galectines, mais aussi par les ligands des récepteurs de mort et par les médicaments chimiothérapeutiques. De plus, cette sialylation facilite la liaison des N-



glycanes au facteur H (protéine inhibitrice de la voie du complément), ce qui limite l'activation du complément et avec l'immunité antitumorale **(16)**.

Du côté des gangliosides, de plus en plus de données suggèrent qu'ils modulent l'angiogenèse qui a un rôle majeur dans la croissance tumorale. Il a été rapporté que GM3 et GD1a avaient un effet opposé sur la réactivité des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine vis-à-vis du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF). Ce dernier est connu pour favoriser la survie, la croissance et la migration des cellules endothéliales. En effet, le GM3 est d'un côté un suppresseur naturel de l'angiogenèse et de l'autre, le GD1a, qui est excrété de la surface de certaines cellules tumorales, stimule au contraire l'angiogenèse **(19)**.

Ainsi, plusieurs antigènes de type glycane sont utilisés pour détecter et surveiller les tumeurs. Un test sérologique classique pour CA19-9, qui détecte SLea, est utilisé pour surveiller la charge tumorale, la réponse clinique au traitement et la rechute de la maladie chez les patients atteints notamment de cancer gastrique, colorectal ou pancréatique. De même, le CA125 reconnaît le MUC16 et est utilisé dans le suivi du cancer de l'ovaire. L' $\alpha$ -foetoprotéine core-fucosylée est quant à elle un biomarqueur circulant sensible et spécifique pour le diagnostic précoce du carcinome hépatocellulaire **(15)**.

Parallèlement à leur rôle de biomarqueurs, les glycanes peuvent être des cibles importantes pour certaines thérapies ciblées anti-cancéreuses, comme le dinutuximab bêta, un anticorps monoclonal contre le GD2, utilisé pour le traitement du neuroblastome pédiatrique **(15)**.

## II. Les oligosacchariduries

Les oligosaccharides peuvent-être retrouvés dans les urines, on parle alors d'oligosaccharidurie. Des pathologies, d'origine congénitale, impliquent soit une accumulation (défaut de dégradation), soit une réduction (défaut de synthèse) des oligosaccharides au niveau systémique. Dans le premier cas, cela se traduit justement par la présence d'oligosacchariduries. C'est pourquoi nous nous concentrerons essentiellement sur l'étude du premier type dans cette partie.

Il existe un groupe d'erreurs innées du métabolisme, appelées maladies de surcharge lysosomale (MSL), causées par le déficit de l'activité d'une enzyme lysosomale impliquée dans la dégradation des macromolécules endogènes. Ce groupe de maladies est ainsi caractérisé par l'accumulation de substrat(s) non dégradé(s) dans les lysosomes, entraînant un dysfonctionnement de ces organites, ainsi que des atteintes cellulaires, tissulaires, organiques et systémiques. Il en existe un grand nombre, environ soixante-dix actuellement décrites, qui sont rares individuellement mais qui collectivement ont une incidence combinée entre 1/5000 et 1/8000 nouveau-nés vivants. On peut retrouver par exemple les Mucopolysaccharidoses (MPS ; accumulation de GAG), les Sphingolipidoses (comprenant les gangliosidoses) ou encore les Oligosaccharidoses. Hormis quelques rares exceptions, les MSL sont principalement transmises de manière autosomique récessive **(24)**.

Parmi ces MSL, les principales pathologies qui excrètent des oligosaccharides dans les urines sont :

- **L' $\alpha$ -mannosidose**, causée par des mutations du gène *MAN2B1* codant pour l' $\alpha$ -mannosidase, et provoquant l'accumulation d'oligosaccharides riches en mannose. Cette maladie est subdivisée en 3 formes cliniques (type 1 légère ; type 2 modérée ; type 3 sévère), la majorité des patients étant de type 2. Il s'agit de l'oligosaccharidose la plus courante dans le monde, avec une prévalence d'environ 1/500.000 **(25-27)** ;
- **La  $\beta$ -mannosidose**, causée par des mutations du gène *MANBA* codant pour la  $\beta$ -mannosidase, et provoquant l'accumulation de substrats contenant du mannose (Man-1,4-GlcNAc). Cette pathologie est très rare, ne comptant qu'une vingtaine de cas chez l'Homme (premièrement décrite chez les chèvres), avec une clinique relativement bénigne **(28,29)** ;

- **L'aspartylglucosaminurie**, causée par des mutations du gène *AGA* codant pour la glycosylasparaginase, et provoquant l'accumulation d'aspartylglucosamine. C'est l'oligosaccharidose à l'incidence la plus élevée en Finlande, la majorité des patients (plus de 80%) étant d'origine finlandaise, dont 98% possèdent la même variation ponctuelle (héritage de la maladie finlandaise, variant  $AGU_{Fin}$ ) **(37,38)** ;
- **La fucosidose**, causée par des mutations du gène *FUCA1* codant pour l' $\alpha$ -L-fucosidase, et provoquant l'accumulation de substrats contenant du fucose (dont les antigènes H et X du groupe sanguin). Cette maladie est subdivisée en 2 sous-types (type 1 sévère ; type 2 bénigne) **(39-41)** ;
- **La sialidose**, causée par des mutations du gène *NEU1* codant pour la neuraminidase 1, et provoquant l'accumulation de substrats contenant de l'acide sialique. Cette maladie est subdivisée en 2 types (type 1 légère, non neuropathique et normomorphique ; type 2 sévère, dysmorphique) **(35,36)** ;
- **La galactosialidose**, exceptionnelle, causée par des mutations du gène *PPCA/CTSA* codant pour la cathepsine A qui permet de stabiliser la neuraminidase *NEU1* (déficit total secondaire) et la  $\beta$ -galactosidase *GLB1* (déficit partiel secondaire), et provoquant ainsi l'accumulation de substrats contenant de l'acide sialique. Cette maladie est subdivisée en 3 formes (type 1 infantile précoce, la plus sévère ; type 2 infantile tardive, la plus légère ; type 3 juvénile/adulte, sans atteinte cognitive), la majorité des patients étant du type 3, qui sont eux-mêmes principalement japonais **(37,38)** ;
- **La GM1-gangliosidose**, causée par des mutations du gène *GLB1* codant pour la  $\beta$ -galactosidase lysosomale (mutation allélique de la maladie de Morquio B / MPS IVB), et provoquant l'accumulation de substrats contenant du ganglioside GM1 ainsi que d'oligosaccharides. Cette maladie est subdivisée en 3 formes cliniques (type 1 infantile précoce, sévère ; type 2 infantile tardive/juvénile ; type 3 adulte/chronique), la majorité des patients, atteints du type 3, étant japonais **(39-41)** ;
- **La maladie de Sandhoff**, une GM2-gangliosidose, causée par des mutations du gène *HEXB* codant pour la sous-unité  $\beta$  des  $\beta$ -hexosaminidases (forme HexA composée des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , et forme HexB composée de 2 sous-unités  $\beta$ ), et provoquant l'accumulation de divers substrats dont le ganglioside GM2. Cette maladie est subdivisée en 3 sous-types (type 1 infantile aigu, sévère ; type 2 juvénile subaigu ; type 3 tardif) **(42,43)**. Une autre GM2-gangliosidose est la maladie de Tay-Sachs,

causée par des mutations du gène *HEXA* codant pour la sous-unité  $\alpha$  des  $\beta$ -hexosaminidases. Toutefois, la maladie de Tay-Sachs n'induit pas une oligosaccharidurie **(44)**.

- **Les mucopolysaccharidoses (ML)** de type II et III sont causées par des mutations sur le gène *GNPTAB* (ML II et III) et/ou *GNPTG* (ML III) codant pour les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  de l'enzyme GlcNAc-1-phosphotransférase, qui sert à la première étape de la synthèse du résidu Mannose-6-Phosphate (M6P) sur les hydrolases lysosomales. Le M6P correspond à un signal de transport pour ces enzymes vers le lysosome. En son absence, ces hydrolases se retrouvent sécrétées dans le secteur extracellulaire, et une accumulation de divers substrats s'opère dans les lysosomes. La clinique de la ML II est plus sévère que celle de la ML III, et on peut aussi voir une oligosaccharidurie **(45)**.
- **La maladie de Pompe**, aussi appelée maladie du stockage du glycogène de type II ou encore déficit en maltase acide, est causée par des mutations du gène *GAA* codant pour l' $\alpha$ -glucosidase acide, qui décompose le glycogène dans le lysosome. Le déficit en cette enzyme entraîne une accumulation de glycogène, et avec une myopathie grave. On retrouve dans les urines des patients atteints un oligosaccharide caractéristique, le Glc<sub>4</sub> **(46)**.
- **La maladie de Schindler** est causée par un déficit en  $\alpha$ -N-acétylgalactosaminidase (gène *NAGA*), aussi connue sous le nom d' $\alpha$ -galactosidase B. Cette enzyme est impliquée dans la dégradation de sphingolipides, principalement des personnes du groupe sanguin A. **(47)**.
- **La maladie de Salla et la maladie de stockage de l'acide sialique libre (ISSD ; de phénotype plus sévère)** sont des troubles alléliques rares caractérisés par l'accumulation de Sia monosaccharide chargé (acide N-acétylneuraminique) dans les lysosomes, causée par l'incapacité de transporter le Sia hors des lysosomes. Ceci est dû à la mutation du gène *SLC17A5* codant pour la protéine de transport sialine. A noter que ces maladies sont principalement retrouvées en Finlande, avec une mutation pour Salla et une pour l'ISSD retrouvées chez tous les malades finlandais. **(47)**.

Pour la suite de ce travail, nous avons regroupé sous le terme d'Oligosacchariduries (OS) les pathologies que nous avons étudiées, c'est-à-dire **l' $\alpha$  et la  $\beta$ -mannosidose,**

**l'aspartylglucosaminurie, la fucosidose, la sialidose, la GM1-gangliosidose et la maladie de Sandhoff (Figures 6 et 7).**

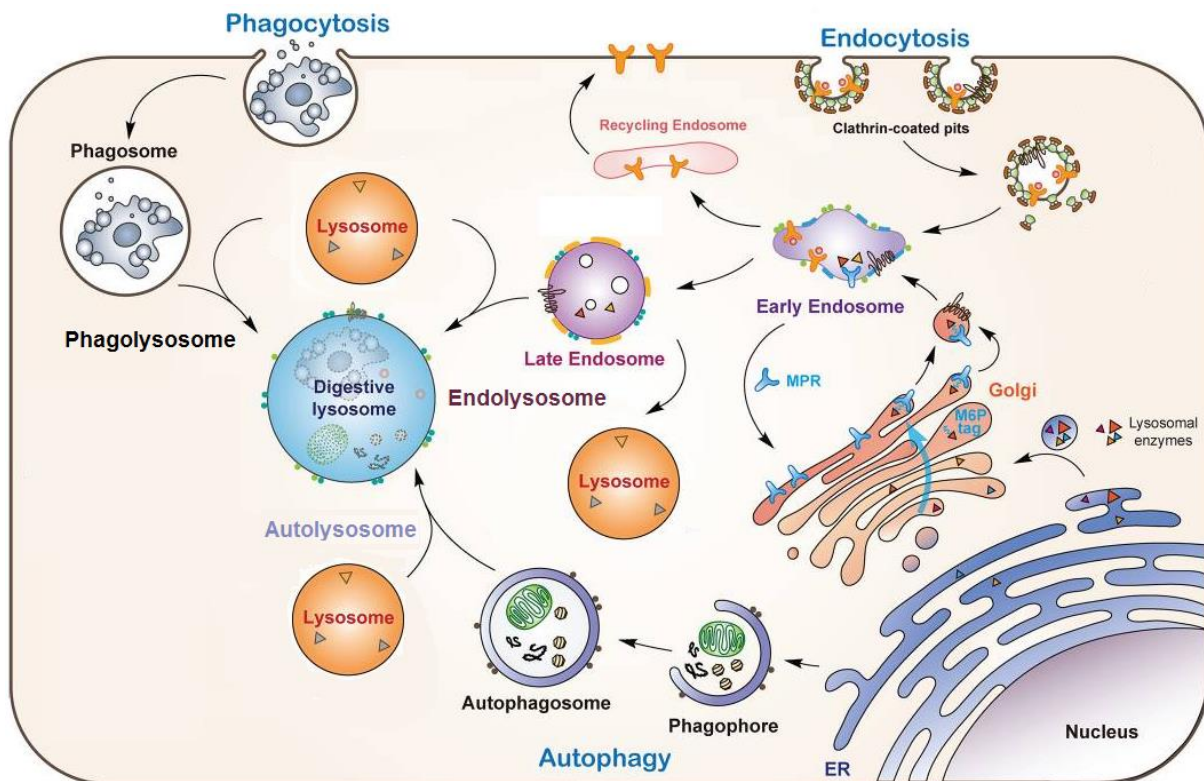
## 1. Physiopathologie

Les OS étant des pathologies très rares, la plupart n'ont été que très peu étudiées. C'est pourquoi, hormis pour la GM1-gangliosidose et la maladie de Sandhoff, nous n'avons que peu de données à leur sujet. Compte tenu de la complexité des présentations cliniques et du large éventail de macromolécules accumulées dans les MSL (dont beaucoup sont encore inconnues), il est difficile de définir des voies pathogéniques potentiellement communes à tous les troubles. Néanmoins, ces pathologies partagent comme point commun principal l'accumulation de substrats dans les lysosomes, ce qui permet de déduire un certain mécanisme commun entre elles, bien qu'il existe des différences notables selon le type de substrat touché. En effet, l'expression des glycosphingolipides, par exemple, est variable dans le SNC ; ainsi certaines populations neuronales ne peuvent pas stocker ces molécules et sont épargnées dans les MSL associées, tandis que d'autres neurones stockeront ces macromolécules, entraînant des dommages neuronaux irréversibles **(48)**.

Nous pouvons catégoriser les principaux mécanismes de physiopathologie en cinq grands points importants.

### a. Accumulation lysosomale

En effet, la physiopathologie des MSL est assez complexe, du fait du dysfonctionnement des lysosomes par accumulation des substrats non dégradés. En effet, les lysosomes sont le centre de la dégradation cellulaire et jouent un rôle important dans l'homéostasie, le développement, le vieillissement cellulaires ainsi que dans la défense de l'hôte face aux micro-organismes **(24,48,49)**. De fait, en tant qu'organite de la dégradation, leur mission est de digérer le contenu des endosomes, des phagosomes, des vésicules de l'autophagie (contenant entre-autres des mitochondries altérées) après fusion de ces derniers (donnant des endolysosomes, des phagolysosomes et des autolysosomes ; **Figure 11) (24,49,51)**.



**Figure 11** : Représentation de la fonction de dégradation des lysosomes. D'après (49)

Ainsi, quand une des multiples enzymes chargées de cette dégradation des macromolécules est mutée et devient non fonctionnelle, le(s) substrat(s) qu'elle est censée cataboliser se retrouve(nt) accumulé(s) dans l'organe, parfois aussi dans d'autres compartiments. Cette accumulation de substrats peut initier une cascade d'effets secondaires, conduisant à des lésions cellulaires irréversibles, à la mort cellulaire ainsi qu'à un dysfonctionnement et à une dégénérescence tissulaire. Cependant, de manière générale, plusieurs voies communes sont dérégulées, notamment les déficits du transport et de la dégradation cellulaire, le stress du RE, l'autophagie, l'homéostasie calcique, le stress oxydant, les réponses immunitaires inflammatoires et innées et les voies de mort cellulaire. De plus, les mécanismes généraux de progression de la maladie comprennent l'inflammation chronique, y compris la neuro-inflammation par activation de la microglie (48,52-54). Un des facteurs de cette inflammation est l'accumulation secondaire de mitochondries anormales due au dysfonctionnement de l'autophagie. Comme observée dans des souris atteintes de GM1-gangliosidose, ces mitochondries petites, fragmentées, gonflées ou circulaires présentent une chaîne respiratoire altérée, ce qui favorise le stress oxydant (par fuite d'électrons,

produisant des espèces réactives de l'oxygène ou ROS), l'inflammation et la mort cellulaire, et serait un des mécanismes sous-jacents à la neurodégénérescence **(48,52,53,55)**.

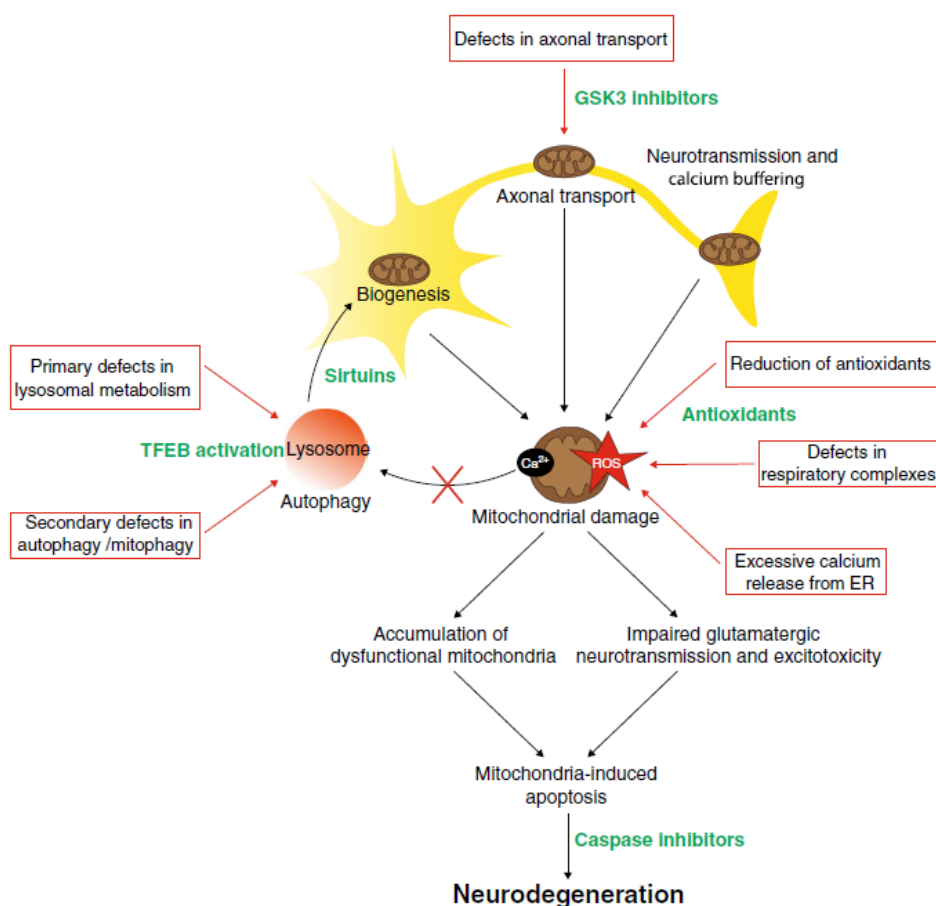
### **b. Atteinte neurologique**

L'atteinte du SNC est courante dans de nombreuses MSL, et la neurodégénérescence peut survenir dans plusieurs régions du cerveau, notamment le thalamus, l'hippocampe, le cortex et le cervelet. La neuropathologie dans ces maladies produit des changements temporels et spatiaux uniques, qui impliquent souvent une neurodégénérescence et une inflammation précoces spécifiques à la région avant l'implication des régions cérébrales globales **(56)**.

Le processus inflammatoire induit par le dysfonctionnement des lysosomes serait un des facteurs de la neurodégénérescence chez les patients atteints de MSL **(57)**. En effet, des TLR présents à la surface de la microglie du SNC, sont activés par les motifs moléculaires associés aux dégâts (AMPS) qui sont des signaux de stress cellulaire, et libérés par les neurones endommagés ou mourants **(54)**. Ces TLR induisent la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'Interleukine-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ). De plus, les cellules du SNC répondent à l'accumulation de substrats en générant une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) et l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), comme démontré dans des modèles animaux ainsi que des patients atteints de GM2 ou GM1-gangliosidoses. Ces médiateurs pro-inflammatoires endommagent la barrière hémato-encéphalique (BHE), indispensable à l'homéostasie du système nerveux **(43,58,59)**. Les monocytes du sang périphérique sont alors recrutés, passent à travers la BHE perturbée et migrent sur le site de l'inflammation (le SNC) où ils se différencient en microglie inflammatoire, amplifiant la réponse inflammatoire locale. La libération de molécules oxydantes d'attaque (SO et NO) qui en résulte endommage les neurones environnants, conduisant à la neurodégénérescence, pouvant aussi provoquer une démyélinisation active suite à la mort des oligodendrocytes myélinisants (fréquemment observée dans les formes infantiles de GM2-gangliosidoses) **(43,48,54,59)**.

Comme dit précédemment, le dysfonctionnement des lysosomes entraîne la perte d'une autophagie efficace, avec elle l'accumulation de protéines mal repliées (qu'on retrouve dans d'autres pathologies, telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington), et de mitochondries **(51,54)**. La réduction d'ATP qui en découle, au

niveau des sites synaptiques, pourrait contribuer à une altération de la neurotransmission et à la mort neuronale (51,53). Le stress oxydant résultant du dysfonctionnement mitochondrial aurait ainsi pour conséquences une perte neuronale et une astrogliose (activation des astrocytes pour la cicatrisation gliale), conduisant à une excroissance neuronale aberrante (49,56,58,59). De plus, la survie des neurones et l'activité synaptique dépendent fortement d'une régulation précise du calcium, en lien avec les mitochondries. En effet, ces dernières absorbent le calcium cytoplasmique et du RE par l'intermédiaire d'uniports (52). Ainsi, une réduction du tampon calcique mitochondrial expose les cellules à une augmentation du calcium cytoplasmique par fuite mitochondriale, ayant un effet pro-apoptotique (Figure 12) (51-53).



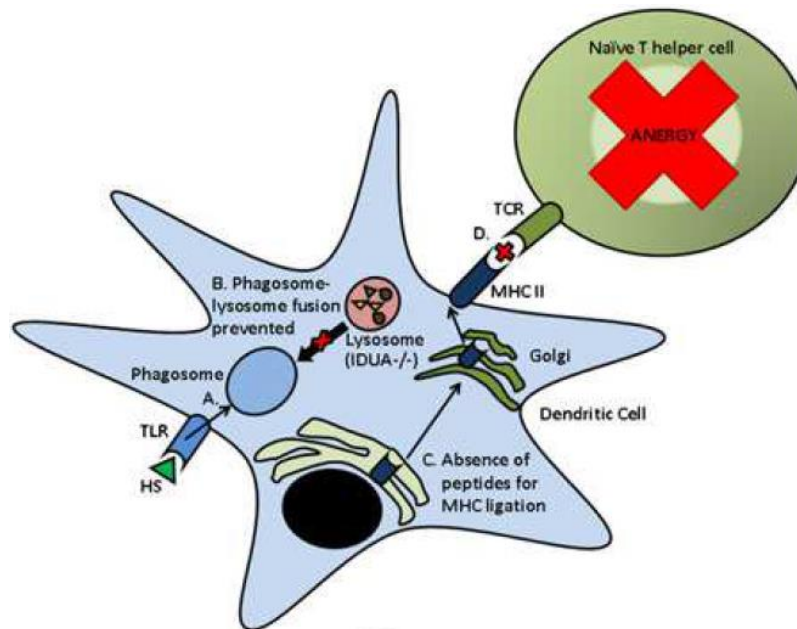
**Figure 12** : Dysfonctionnement mitochondrial dans la neurodégénérescence associée à une MSL. D'après (53)



Un autre mécanisme étudié est l'altération des fonctions du peroxysome, en conséquence du dysfonctionnement lysosomal. En effet, les lysosomes réguleraient le métabolisme des lipides et le statut d'oxydoréduction cellulaire grâce à leur action sur l'activité des peroxysomes, et il a été constaté que l'inhibition de l'activité lysosomale entraînait une diminution de la biogenèse des peroxysomes. De plus, tout comme pour les mitochondries, il existerait une accumulation de peroxysomes fonctionnellement compromis, avec un déséquilibre entre la génération de peroxyde d'hydrogène et de ROS et leur activité enzymatique catalase antioxydante, ce qui peut éventuellement majorer le stress oxydant cellulaire. Enfin, certains défauts des peroxysomes peuvent entraîner une altération de la biosynthèse des plasmalogènes, de phospholipides aux propriétés antioxydantes, ce qui peut réduire la capacité de la cellule à détoxifier les ROS, rendant le SNC plus vulnérable aux dommages oxydatifs **(56)**.

### c. Dysimmunité

Les infections chroniques que subissent certains patients atteints d'une MSL, en plus d'une possible malformation des voies respiratoires souvent retrouvée, pourraient aussi être causées par une immunodéficiences due à une entrave de l'assemblage du complexe CMH II avec le peptide à présenter nécessaire pour l'activation des lymphocytes T. En effet, cet assemblage, réalisé dans les cellules présentatrices d'antigènes (monocytes circulants, macrophages tissulaires et cellules dendritiques) nécessite un traitement phagosomal et lysosomal préalable. Or, la fusion entre le phagosome et le lysosome étant restreinte (comme expliquée précédemment), leur contenu ne peut être digéré. Par conséquent, le CMH II ne serait pas capable de se lier à son peptide. En l'absence de complexe CMH II-peptide, les lymphocytes T auxiliaires naïfs ne peuvent être activés et restent donc anergiques **(Figure 13) (54,48)**.



**Figure 13** : Absence de présentation du complexe CMH II - peptide par les cellules dendritiques aux lymphocytes T D'après (54)

#### d. Stockage secondaire

L'accumulation secondaire de substrats non apparentés et hétérogènes a été largement documentée dans plusieurs MSL. Par exemple, il a été démontré qu'il existait une accumulation de gangliosides GM2 et GM3 dans le tissu nerveux de modèles animaux de MPS de types I, II, IIIA, VI et VII, de maladie de Niemann-Pick de type A et C1, et d' $\alpha$ -mannosidose (48,55). Il a été émis comme hypothèse que ce stockage secondaire pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie des MSL. En effet, dans certains modèles animaux, il a été démontré que ces substrats secondaires peuvent se localiser dans les zones cérébrales les plus touchées et que la suppression de cette surcharge (par exemple, du GM3 dans le modèle de souris Niemann-Pick de type C1) entraîne une amélioration de la neuropathologie et des manifestations de la maladie (55).

Cette physiopathologie se manifeste par des symptômes plus ou moins communs pour ces MSL.

## 2. Présentation clinique

Comme pour la plupart des MSL, les OS présentent une clinique dite progressive. En effet, les patients naissent asymptomatiques, les premiers symptômes apparaissant au cours du temps, entre les premiers mois de vie à l'âge adulte en fonction de la sévérité, et leur santé se détériore au cours du temps, plus ou moins vite selon la gravité de la maladie. Néanmoins, certaines formes de MSL particulièrement sévères peuvent se manifester dès la période anténatale (notamment sous la forme d'anasarque).

Les caractéristiques principales de la clinique des OS sont une neurodégénérescence (déficience intellectuelle, atteintes psychiatriques, déclin des compétences acquises, ataxie, convulsions, myoclonies, neuropathies,...), des atteintes ostéo-musculaires (dysostose multiple, dysmorphie faciale, myopathie, scoliose...), ainsi que des atteintes viscérales et systémiques (viscéromégalie, angiokératome, dysimmunité, infections récurrentes des voies respiratoires supérieures, perte auditive et visuelle, cardiopathies, néphropathies,...). Toutefois, les patients ne présentent pas obligatoirement tous ces symptômes, mais plutôt un certain nombre et avec une gravité plus ou moins importante selon la sévérité de la maladie. C'est pourquoi, historiquement, chaque maladie avait été subdivisée en plusieurs sous-types selon la gravité des signes et l'âge d'apparition des premiers symptômes. Cependant, des études cliniques récentes montrent plutôt l'existence d'un continuum des manifestations cliniques de gravité variable. De fait, l'hétérogénéité clinique importante de ces maladies, parfois au sein d'une même famille, et le manque fréquent de corrélations entre le génotype et le phénotype, rendent la progression de la maladie difficile à prévoir **(25-43)**.

Le tableau suivant (**Tableau 1**) résume les principaux signes cliniques des OS étudiées ici.

**Tableau 1: Résumé des symptômes pour les OS étudiées (25-43).**

<b>Atteintes neurologiques</b>					
<b>Pathologies</b>	<b>Retard/régression mental</b>	<b>Ataxie cérébelleuse</b>	<b>Convulsions</b>	<b>Déficiência intellectuelle</b>	<b>Atteintes psychiatriques</b>
α-mannosidose		+ / ++ (type 2) +++ (type 3)			
β-mannosidose	+				+
aspartyl-glucosaminurie	++		+	+++	+
fucosidose	+++ (type 1) ++ (type 2)		+	+++	
sialidose	++	++	++		
GM1 gangliosidose	+++	+	++	+++	
Maladie de Sandhoff	+++	+	++	++	++
<b>Atteintes du système ostéo-musculaire</b>					
<b>Pathologies</b>	<b>Retard de croissance</b>	<b>Anomalies morphologiques, dysmorphie faciale</b>	<b>Dysostose multiple</b>	<b>Myopathie</b>	
α-mannosidose			++ (type 2) +++ (type 3)	+ (type 1) ++ (type 2) +++ (type 3)	
β-mannosidose		+			
aspartyl-glucosaminurie		+++	+++		
fucosidose	+++	+++	+++		
sialidose		+++ (type 2)	+++ (type 2)		
GM1 gangliosidose		++		++	
Sandhoff					

Atteintes systémiques						
Pathologies	Angiokératome	Tache maculaire rouge cerise	Viscéromégalie	Perte visuelle	Perte auditive	Dysimmunité
$\alpha$ -mannosidose					++	
$\beta$ -mannosidose	+++				+	+
aspartyl-glucosaminurie						
fucosidose	++ (type 2)		++			+++
sialidose		++	+	+	+	
GM1 gangliosidose		++	+	++		
Sandhoff		++	++	++		

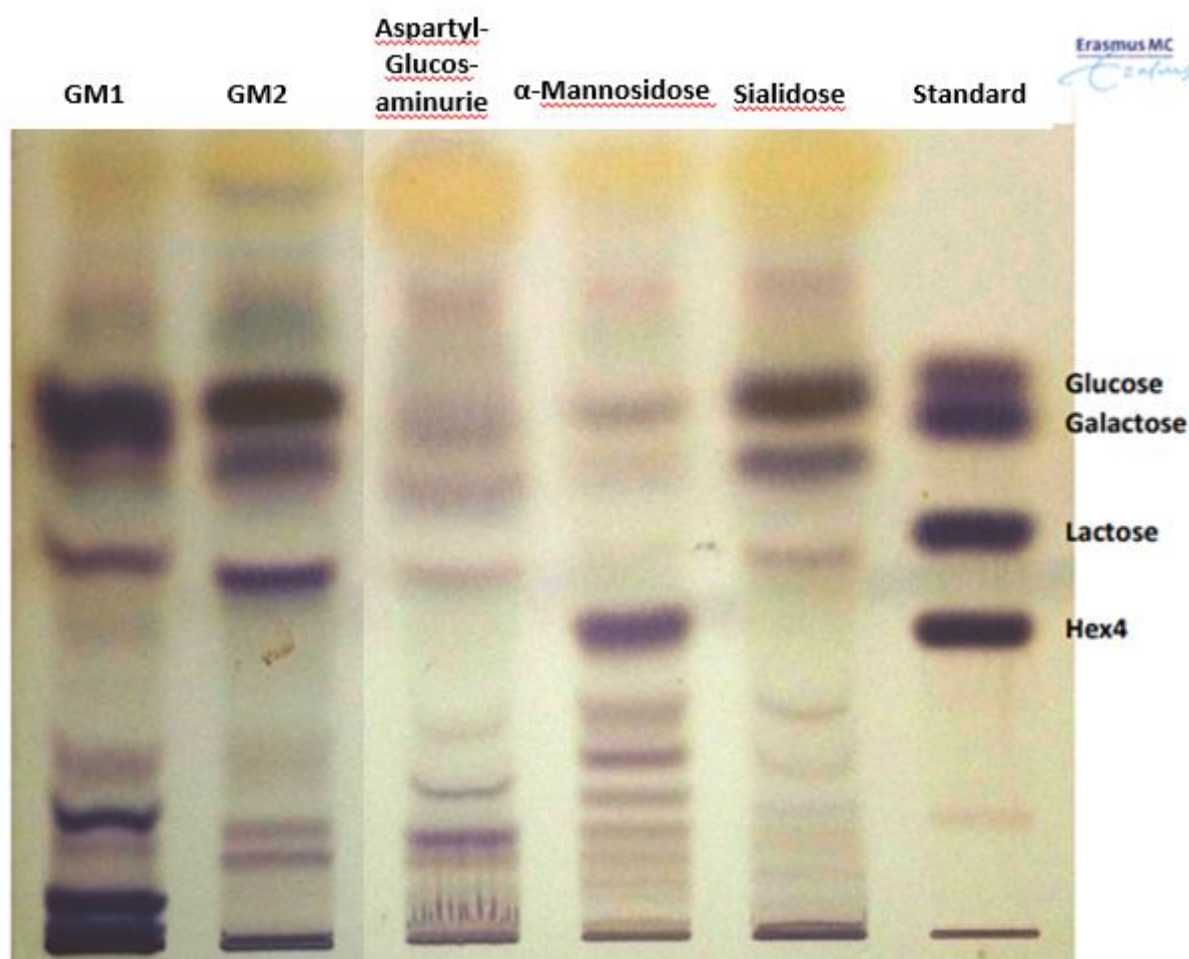
Afin de prévenir au maximum ces manifestations cliniques, il est donc nécessaire de diagnostiquer le plus rapidement possible ces maladies.

### 3. Diagnostic

L'orientation du diagnostic se fait en plusieurs étapes. En premier lieu, la clinique et les examens paracliniques (imagerie, fond d'œil, parfois myélogramme, biopsies...) sont primordiaux au moment de l'apparition de certains signes (dysmorphie faciale et/ou osseuse, retard psychomoteur, viscéromégalie...). En l'absence de signes en faveur d'une MSL en particulier, un screening des maladies est alors réalisé par une analyse biochimique, recherchant l'élévation de certains marqueurs biologiques, principalement dans les urines où s'accumulent facilement les substrats (élévation des GAG totaux pour les MPS, des Oligosaccharides totaux pour les OS...) **(24)**.

Si une élévation d'un de ces marqueurs urinaires est retrouvée, il est nécessaire de les séparer pour orienter davantage le diagnostic. Dans les cas des OS, une séparation par

chromatographie sur couche mince (CCM) de gel de silice avec révélation par l'orcinol sulfurique, la technique de référence, est alors réalisée (**Figure 14**). Ainsi, selon le profil obtenu, et grâce à l'interprétation du biologiste expert dans le domaine, il peut être possible de diagnostiquer la MSL concernée (**60**).



**Figure 14** : CCM des oligosaccharides d'échantillons urinaires

Toutefois, cette technique, bien que rapide et peu onéreuse, manque de sensibilité et de spécificité. Il existe de nombreux faux négatifs du fait d'une trop faible concentration des oligosaccharides pour une révélation correcte (**61,63**). De plus, de nombreuses interférences existent avec l'apparition de bandes non spécifiques. Ces interférences peuvent être médicamenteuses (amikacine, Dotarem®), alimentaires (lait maternel), ou même inconnues (**62,63**). Enfin, l'interprétation des bandes est subjective, dépendant fortement des connaissances et de l'expérience du biologiste, ce qui crée des biais lors de la comparaison

des résultats de différents laboratoires **(62)**. C'est pourquoi la mise en place de méthodes de dosage basées sur la spectrométrie en masse est en développement dans plusieurs centres et pays afin d'en améliorer la facilité, la sensibilité et la spécificité, et ainsi la prise en charge des patients. Une méthode développée dans les laboratoires de recherche pour son efficacité est la spectrométrie par MALDI-TOF. Cette dernière permet une détection complète des différents oligosaccharides chez les patients. Cependant, cette instrumentation n'est pas largement disponible dans les laboratoires de biologie médicale et cette technologie n'est pas adaptée à la quantification, limitant son utilisation potentielle pour le suivi de l'efficacité du traitement **(62)**. L'autre instrumentation envisagée est la spectrométrie en masse en tandem couplée à une méthode séparative, en général la chromatographie liquide (LC-MS/MS). Cette technique permet la détection simultanée d'un large éventail d'oligosaccharides, mais aussi d'autres biomarqueurs des MSL (sucres, lipides, peptides), sans forcément nécessiter au préalable un traitement des échantillons, par dérivatisation par exemple **(64)**.

Une fois le profil des oligosaccharides obtenu (ou dans le cas où la CCM est négative mais qu'une forte suspicion clinique est présente), il est nécessaire de confirmer les résultats par une mesure de l'activité des enzymes lysosomales suspectées d'être déficitaires. Cette analyse se fait en général sur les leucocytes (sang total) ou dans de rares cas sur fibroblastes en culture (biopsie). Elle consiste à déterminer la vitesse de réaction enzymatique du catabolisme d'un substrat synthétique (très souvent fluorogénique), qui libère un produit fluorescent **(24,62)**.

Enfin, la dernière étape vise à identifier précisément la ou les variant(s) causant la maladie sur le gène concerné. L'identification de variants pathogènes connus dans le gène responsable de la maladie confirme le diagnostic et, en tant que telle, fournit l'investigation de laboratoire ultime dans la trajectoire de diagnostic. Il constitue également le test de diagnostic principal lorsque le variant familial est connu et dans les cas où il n'existe pas de test biochimique efficace. La méthode largement utilisée de nos jours est le séquençage de « nouvelle génération » (NGS) qui permet de détecter des mutations sur des gènes connus. Sinon, le séquençage par Sanger est aussi réalisable **(62)**.

Une fois l'étape du diagnostic réalisé, la suivante est de mettre en place une thérapie.

## 4. Traitement

Il n'existe actuellement pas de traitement spécifique curatif pour les OS, la prise en charge demeurant symptomatique : elle consiste en général à la réduction des symptômes par médication, chirurgie, suivi psychologique ou encore suivi kinésithérapique afin d'améliorer au mieux la qualité et l'espérance de vie des patients. Toutefois, des études précliniques et cliniques ont permis la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques, déjà utilisées aujourd'hui ou qui pourront l'être dans le futur.

### a. Thérapie de Remplacement Enzymatique (ERT)

Cette stratégie, dite enzymothérapie substitutive, est actuellement la plus répandue. Elle consiste en la production d'enzymes recombinantes humaines en laboratoire puis en leur administration aux patients par voie intraveineuse, souvent toutes les 2 semaines. L'avantage de cette thérapie dans les MSL est que les enzymes recombinantes produites possèdent la séquence M6P reconnue par le récepteur M6P, ce qui permet le ciblage de ces protéines à leur site d'action, les lysosomes. Ceci a pour conséquence la réduction de l'accumulation des substrats dans l'organite, et améliore grandement les symptômes viscéraux, pulmonaires, cardiaques... **(24)**.

L'ERT n'est néanmoins pas sans inconvénient. En effet, il est nécessaire de l'administrer fréquemment et à vie, car ces enzymes ne traversent pas la BHE et atteignent moins bien l'os et le muscle qui sont les zones principalement ciblées. Il faut également préciser que le traitement ne permet au mieux que de stabiliser les symptômes (excepté pour la maladie de Gaucher ou la maladie de Wolman). Ainsi, il est nécessaire de l'administrer le plus tôt possible, à un stade pré ou pauci-symptomatique, afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique. C'est pourquoi un diagnostic rapide et efficace de ces pathologies est primordial. En outre, ce type de traitement est particulièrement onéreux **(24)**.

Actuellement, pour les OS, seule l' $\alpha$ -mannosidose possède un traitement autorisé sur le marché, le Velmanase alpha (LAMZEDE®). Les études en phase clinique ont démontré qu'une administration hebdomadaire de l'enzyme entraîne une nette amélioration au niveau biologique du taux d'oligosaccharides urinaires (diminué) et des IgG (augmenté), ainsi qu'au niveau clinique par une amélioration des capacités physiques, permettant à certains patients de s'affranchir du fauteuil roulant **(65)**.



D'autres ERT sont en cours d'étude. En effet, une forme recombinante de la PPCA/CTSA a montré des résultats prometteurs sur un modèle murin de galactosialidose. Une restauration des activités de neuraminidase et de  $\beta$ -galactosidase a été observée, notamment dans les reins et le cœur, des organes connus pour être plus difficilement traitables **(66)**.

Un moyen de permettre à l'ERT d'être efficace au niveau cérébral est de contourner la BHE par l'administration directe de l'enzyme dans le cerveau. Une équipe de recherche a testé cette solution en administrant une  $\beta$ -galactosidase recombinante (pour traiter la GM1-gangliosidose) par des injections intracérébroventriculaires chez des souris. Les résultats montraient une normalisation de l'activité enzymatique cérébrale associée à une réduction significative des niveaux cérébraux d'oligosaccharides, et un arrêt des lésions neuropathologiques secondaires installées chez ces modèles **(67)**.

#### **b. Transplantation de Cellules Souches Hématopoïétiques allogéniques (TCSH)**

Une alternative est l'administration à des patients qui sortent d'un traitement aplasiant de cellules souches hématopoïétiques (CSH) provenant de donneurs compatibles ou de sang de cordon ombilical. Ces CSH vont alors migrer dans la moelle osseuse des malades, ainsi que dans divers organes, comme le cerveau. Elles remplacent ainsi les cellules dépourvues de l'enzyme à l'origine de la pathologie (dont la microglie). Cela peut avoir pour conséquence une stabilisation, voire une amélioration, des symptômes, notamment neurologiques, qui est une limitation importante de l'ERT **(24,68)**.

Quatre inconvénients majeurs sont toutefois à noter **(24,68)** :

- 1) Le risque de décès et de complications liés à la procédure en elle-même (aplasie fébrile...);
- 2) Le risque de rejet ou de réaction du greffon contre l'hôte n'est pas nul (équivalent à celui retrouvé dans les autres types de greffes);
- 3) Le long délai de la prise de greffe, qui peut ne pas arriver à temps pour empêcher un déclin important de la fonction neurocognitive;
- 4) Le manque d'efficacité dans les organes peu vascularisés, tels que la cornée, les valves cardiaques, et les os.

La TCSH peut ainsi être associée à l'ERT afin d'améliorer les chances des patients. Un autre point à noter est, tout comme pour l'ERT, la non-réversibilité des symptômes une fois ceux-ci installés. Il est donc là-aussi nécessaire de mettre en place cette stratégie rapidement, après discussion avec l'équipe pluridisciplinaire.

Cette thérapeutique peut notamment être envisagée chez des bébés n'ayant pas encore développé de symptômes (en pré-symptomatique), mais chez qui la MSL a été diagnostiquée (soit grâce à un dépistage néonatal pratiqué dans certains pays, soit à la suite d'un diagnostic chez un autre membre de la fratrie qui déclare la pathologie). Cela permet d'éviter au mieux ou de retarder la progression de la maladie, particulièrement au niveau neurologique **(32)**.

### **c. Traitements futurs**

De nouvelles stratégies thérapeutiques sont en cours de développement avec comme espoir de guérir ces pathologies. La plus prometteuse est la thérapie génique. Elle consiste en l'injection d'une cassette contenant une copie normale du gène défectueux via un vecteur, généralement un virus adéno-associé (AAV), un lentivirus ou un système non viral. Cette injection peut être réalisée directement chez le patient (transfert génique direct), et/ou via l'implantation de cellules souches de moelle osseuse isolée du patient transfectée *in vivo* (transfert génique indirecte). Toutefois, aucune étude clinique n'est en cours pour les OS **(48)**.

Le frein majeur dans le développement de nouvelles thérapeutiques est la très faible prévalence des MLS individuellement. En effet, du fait du peu de patients atteints dans le monde, l'histoire naturelle de la plupart des MSL est méconnue. De plus, alors que le nombre de patients atteints est déjà faible, le délai entre l'apparition des symptômes et le diagnostic est excessif et la progression de la maladie est variable même au sein d'un sous-type donné. Il est donc difficile de recruter des populations de patients assez homogènes et des mesures de résultats solides font souvent défaut : c'est pourquoi les essais ont tendance à manquer de puissance statistique **(48)**.

### III. Matériel et Méthode

#### Matériel

##### Echantillons

L'ensemble des analyses a été réalisé sur des échantillons d'urine. Ces derniers proviennent de patients atteints d'OS diverses envoyés au Laboratoire de Biochimie – Maladies Métaboliques du CHU de Toulouse depuis 2009 pour diagnostic ou gracieusement fournis par le Laboratoire des Maladies Métaboliques des Hôpitaux de Lyon. Ils ont été conservés congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse.

Dans un premier temps, un profil oligosaccharidique par CCM a été réalisé sur toutes les urines. Si le profil était en faveur d'une OS, une mesure de l'activité enzymatique sur leucocytes (sang total) ou sur fibroblastes (culture de biopsies cutanées) a servi d'analyse de confirmation. Une analyse du génome par biologie moléculaire sur sang total a aussi été réalisée comme test ultime de confirmation diagnostic.

Nous avons étudié ainsi 3 groupes de patients :

- Un groupe contrôle ayant un profil en CCM négatif (n=20) ;
- Un groupe de patients atteints d'une OS avérée, confirmée par déficit enzymatique et/ou biologie moléculaire (témoin positifs ; n=11)
- Un groupe de patients ayant un profil positif mais ne possédant un déficit enzymatique confirmé, soit des faux positifs en CCM (n=5).

De plus, des urines de patients atteints de MPS type I, II, III-A, III-B, IV-A, IV-B, VI et VII, et de ML type II et III, ont été inclus dans le protocole afin d'en analyser le profil oligosaccharidique. Les détails des échantillons urinaires sont réunis dans le **tableau 2** suivant.

La concentration de créatinine urinaire (CrU, en mmol/L) a été déterminée pour chaque échantillon d'urine avec une méthode enzymatique sur un Cobas 8000 de chez Roche (Laboratoire de Biochimie Générale de l'Hôpital Purpan – CHU de Toulouse).

**Tableau 2 : Résumé des urines incluses dans le protocole**

Pathologies	Nombre de patients	Nombre d'urines correspondantes
$\alpha$ -mannosidose	2	2
$\beta$ -mannosidose	1	1
GM1 gangliosidose	4	4
Maladie de Sandhoff	1	1
Sialidose	1	1
ML II	1	1
ML III	1	1
MPS I	4	6
MPS II	3	8
MPS III-A	1	2
MPS III-B	1	1
MPS IV-A	4	7
MPS IV-B	2	2
MPS VI	3	3
MPS VII	1	3

### MS/MS

La détection a été réalisée par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), sur un modèle triple quadripôle LC-MS Xevo TQ-S Micro de chez Waters utilisé en mode MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). L'azote (gaz inerte) a été utilisé pour l'ionisation en source et comme gaz de réaction dans la chambre de collision. Le mode électrospray positif (ESI+ ; résultant à l'ajout d'un ion Sodium aux molécules, soit  $[M+Na]^+$ , ou d'un proton, soit  $[M+H]^+$ ), impliquant une ionisation douce à pression atmosphérique, a été utilisé pour la détection de toutes les maladies sauf pour la sialidose, qui a été analysée en mode électrospray négatif (ESI-; résultant à la perte d'un proton, soit  $[M-H]^-$ ). Les paramètres expérimentaux MS sont résumés dans le tableau 3 :

**Tableau 3** : Paramètres MS pour l'ionisation et la fragmentation des oligosaccharides

Paramètres	Mode ESI+	Mode ESI-
Tension capillaire source	+ 2.50 kV	- 2.50 kV
Tension cône source	+ 20 V	- 20 V
Température de désolvatation	450°C	
Débit gazeux de désolvatation	650 L/h	
Débit gazeux du cône	20 L/h	
Température source	150°C	

Les transitions spécifiques (également appelées MRM, c'est-à-dire les paires ion précurseur> ion produit) pour la fucosidose, l' $\alpha$ -mannosidose, la  $\beta$ -mannosidose, l'aspartylglucosaminurie, la GM1-gangliosidose, la maladie de Sandhoff et la sialidose, ont été sélectionnées à partir des données fournies par les Laboratoires des Maladies Métaboliques des Hôpitaux de Lyon et de Paris-Necker.

Les transitions et les oligosaccharides correspondants définies pour notre étude sont listées dans le **tableau 4** suivant, avec en gras le MRM le plus sensible utilisé pour la quantification des oligosaccharides urinaires, les autres servant à la confirmation de l'analyte détecté :

**Tableau 4 :** Transitions MS utilisées pour la détection et le dosage des oligosaccharides

Pathologies	Ion parent	m/z ion parent	m/z ions fils	Oligosaccharide correspondant
Aspartylglucosaminurie	[M+H] <sup>+</sup>	<b>336.2</b>	84.0	GlcNA <sub>sn</sub>
			<b>126.0</b>	
			143.0	
			201.0	
β-mannosidose	[M+Na] <sup>+</sup>	<b>406.1</b>	226.0	Hex-HexNac
			244.0	
			<b>305.0</b>	
α-mannosidose	[M+Na] <sup>+</sup>	<b>568.2</b>	244.0	Hex <sub>2</sub> -HexNac
			<b>347.0</b>	
			406.0	
			467.0	
Maladie de Sandhoff	[M+Na] <sup>+</sup>	<b>771.2</b>	347.2	Hex <sub>2</sub> -HexNac <sub>2</sub>
			<b>568.2</b>	
GM1-gangliosidose	[M+Na] <sup>+</sup>	<b>933.4</b>	<b>388.4</b>	Hex <sub>3</sub> -HexNac <sub>2</sub>
			550.4	
			568.4	
Fucosidose	[M+Na] <sup>+</sup>	<b>504.4</b>	<b>289.0</b>	Fuc-HexNac-Asn
			358.0	
			459.0	
Sialidose	[M-H] <sup>-</sup>	<b>1200.9</b>	289.9	NeuAc-Hex <sub>3</sub> HexNac <sub>2</sub>
			<b>1099.9</b>	
			1182.9	
Si Glc <sub>7</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	<b>1153.5</b>	<b>325.0</b>	Hex <sub>7</sub>

*Fuc: fucose; GalNac: N-acetylgalactosamine; GlcNA<sub>sn</sub>: aspartylglucosamine; Hex: hexose; HexNac: N-acetylhexosamine*

## Méthodes

### Préparation des échantillons

Les échantillons ont été préparés en mélangeant 50  $\mu\text{L}$  d'urine avec 50  $\mu\text{L}$  de standard interne maltoheptaose (SI-Glc<sub>7</sub>) à 17.3  $\mu\text{mol/L}$  et 400  $\mu\text{L}$  de diluant (ACN à 37,5 % contenant 0,2 % d'acide formique (v/v)). Des volumes de 10  $\mu\text{L}$  sont injectés pour analyse LC-MS/MS (en mode positif et négatif).

### Séparation par chromatographie Liquide

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) a été développée sur une colonne amide (Colonne XBridge BEH Amide 2,5  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 75 mm / réf # 186006090) de chez Waters. La séparation a été réalisée à un débit de 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  à 30°C sous un gradient d'élution des solvants A (acide formique 0,1% (v/v)) et B (acide formique 0,1% (v/v) dans ACN), pour une durée totale d'acquisition de 10 minutes. Les détails du gradient sont répertoriés dans le tableau 5 suivant :

**Tableau 5** : Gradient de la LC pour la séparation des oligosaccharides

Gradient	Temps (min)	% phase A	% phase B
1	0.00	15	85
2	4.00	60	40
3	8.00	90	10
4	8.10	15	85
5	10.00	15	85

### **Quantification**

Une méthode MS/MS a été construite en mode ESI+ pour l' $\alpha$ -mannosidose, la  $\beta$ -mannosidose, la GM1 gangliosidose, la maladie de Sandhoff, la fucosidose, l'aspartylglucosaminurie et une en mode ESI- pour la sialidose, contenant toutes les transitions MRM sélectionnées. L'intégration des pics a été réalisée avec le logiciel *MassLynx*, en utilisant Glc7 comme IS. Le ratio (aussi appelé *response ; resp*) de l'aire sous courbe du MRM de quantification sur l'aire sous courbe du pic de Glc7 ont été calculés pour chaque oligosaccharide. Ce ratio a été rapporté à la CrU de chaque échantillon afin de standardiser les *responses*.

### **Validation de méthode**

La validation de la méthode a été réalisée en utilisant comme échantillon d'urine positif un *Educational Oligosaccharide Kit* de chez ERNDIM, contenant un mélange de 9 maladies connues (GM1 gangliosidose ; GM2 gangliosidose ; maladie de Pompe ; Aspartylglucosaminurie ;  $\alpha$ -mannosidose ; déficit en  $\alpha$ -NAGA ; Sialidose ; Fucosidose ;  $\beta$ -mannosidose). Ce kit lyophilisé est reconstitué selon le protocole fournit par le fabricant, puis préparé comme une urine classique selon le protocole explicité précédemment.

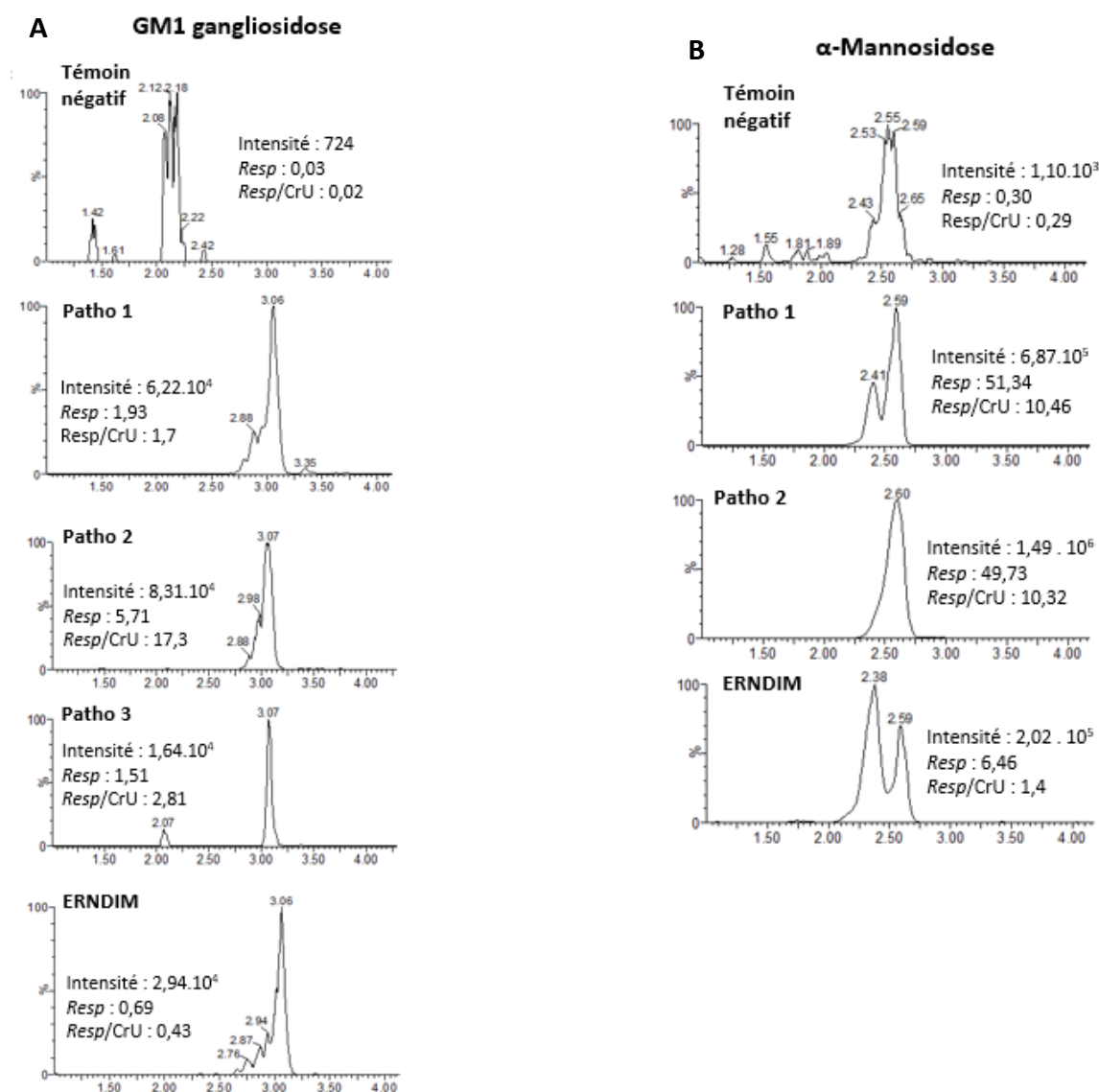
La méthode étant semi-quantitative, aucune courbe de calibration n'a été effectuée. Ainsi, la précision intra-journalière (répétabilité) a été évaluée à partir des résultats obtenus après 10 injections dans le même cycle de 10  $\mu$ L du kit préparé.



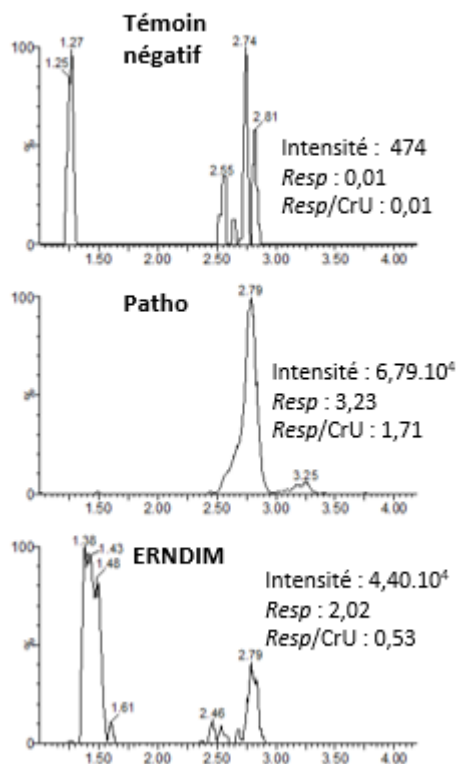
## IV. Résultats

### a. Chromatographie et spectres de masse

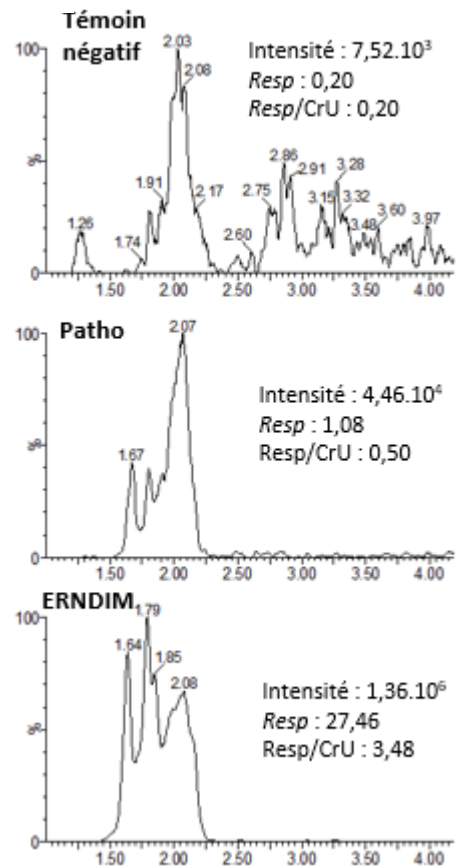
La **figure 15** montre le spectre des MRM de quantification des OS testées, avec le Kit ERNDIM comme témoin positif, une urine de contrôle comme témoin négatif, et des patients connus pathologiques, présentant un profil oligosaccharidique caractéristique (l'aspartylglucosaminurie et la fucosidose ne sont pas montrées dans cette figure). Le temps de rétention (tr) pour chaque oligosaccharide dosé est explicité dans la figure 15. Il est important de noter que l'oligosaccharide de l'aspartylglucosaminurie était retrouvé chez tous les patients testés, mais à des taux beaucoup plus réduits ( $resp < 30$ ) que dans le kit ERNDIM ( $resp > 700$ ).



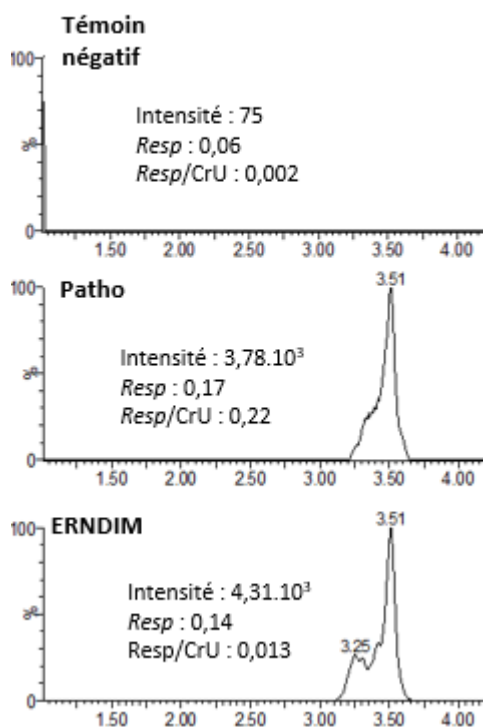
### C Maladie de Sandhoff



### D $\beta$ -Mannosidose



### E Sialidose



**Figure 15** : Spectre des MRM de quantification des OS testées par la méthode LC-MS/MS, avec :

- A : GM1 Gangliosidose (tr 3.06 +/- 0.01 min) ;
- B :  $\alpha$ -mannosidose (tr 2.59 +/- 0.01 min) ;
- C : Maladie de Sandhoff (tr 2.79 +/- 0.01 min) ;
- D :  $\beta$ -mannosidose (2.07 +/- 0.01 min) ;
- E : Sialidose (3.51 +/- 0.01 min).

Pour chaque OS ont été testés un témoin négatif, un patient pathologique (Patho) et le Kit ERNDIM. La réponse de l'oligosaccharide est exprimée en resp/CrU. Pour chaque OS positifs des Patho et du kit, les MRM de confirmation étaient tous positifs, ne montrant aucun doute sur la présence de ou des oligosaccharides dans les échantillons.

### **b. Validation de méthode**

La répétabilité s'est avérée être dans un intervalle de 6.1 % et 12.3 %, soit bien inférieure au seuil de 20% pour la conformité de l'analyse. Le détail des Coefficients de Variation (CV) est retrouvé dans le tableau 6 suivant.

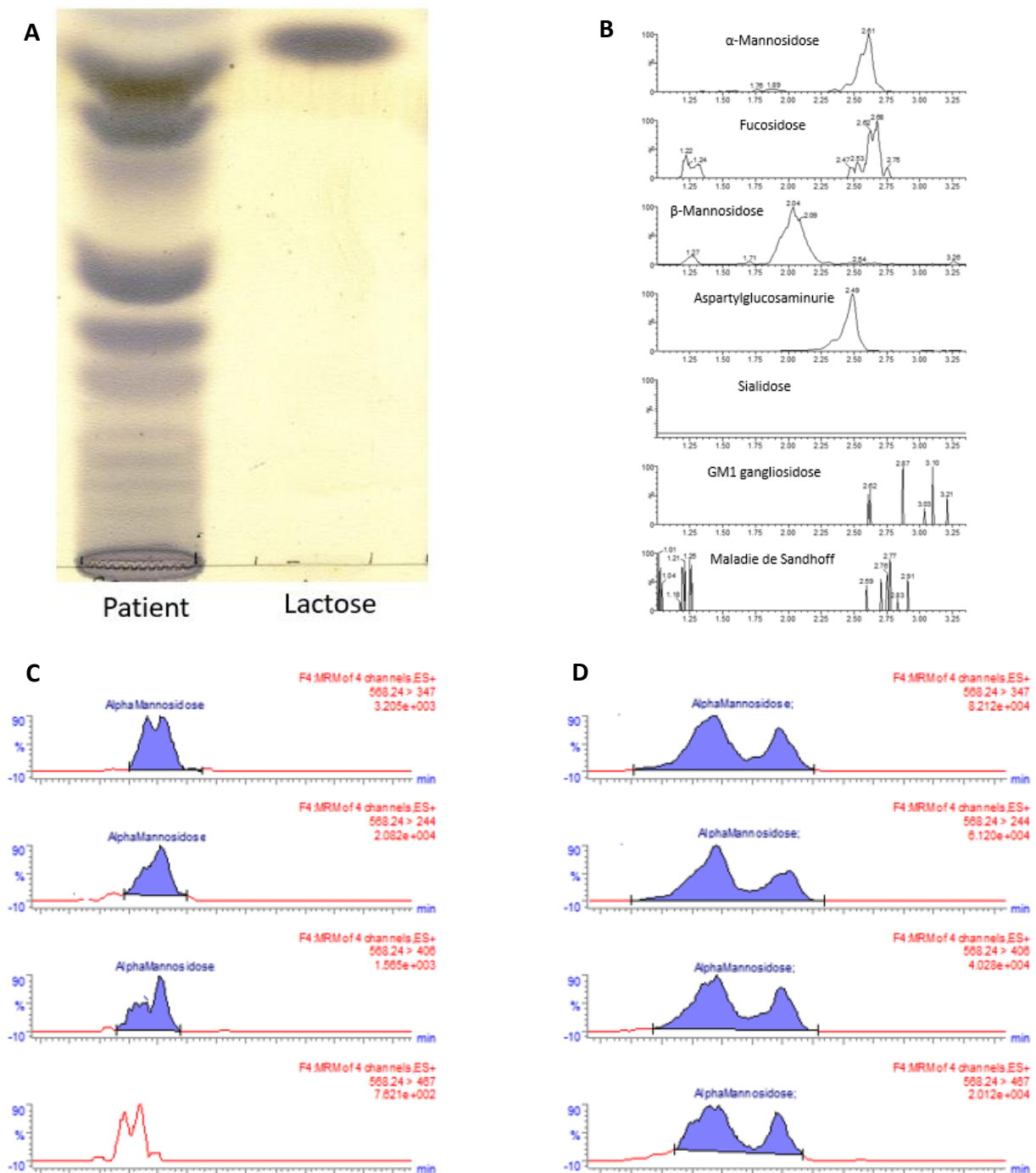
**Tableau 6** : Répétabilité du dosage des oligosaccharides urinaires par LC-MS/MS

<b>Oligosacchariduries testées</b>	<b>CV de la Répétabilité</b>
GM1 gangliosidose	8.2 %
Maladie de Sandhoff	12.3 %
Aspartylglucosaminurie	6.1 %
$\alpha$ -mannosidose	7.2 %
Fucosidose	7.1 %
$\beta$ -mannosidose	6.4 %
Sialidose	9.7 %

La répétabilité de notre méthode semi-quantitative s'est révélée excellente. Tous les MRM sélectionnés sont très spécifiques des OS correspondantes.

### **c. Analyse des performances cliniques**

Afin de tester la fiabilité de la méthode, nous avons analysé des urines de 5 patients faux positifs en CCM (**Figure 16**). Le profil oligosaccharidique en LC-MS/MS pour certains d'entre eux montrait des signaux sur certains oligosaccharides, sans pour autant dire s'ils étaient vraiment présents.



**Figure 16** : Analyse du profil oligosaccharidique d'un patient faux positifs en CCM, avec en A la CCM réalisée à l'époque de son dépistage ; en B le profil oligosaccharidique en LC-MS/MS ; en C et en D le détail des MRM de confirmation pour l' $\alpha$ -mannosidose chez le patient et chez l'ERNDIM respectivement.

A l'instar de la CCM qui montrait une succession de bandes non spécifiques, le profil en LC-MS/MS affiche de faibles signaux en MRM de quantification pour l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -mannosidose ainsi qu'en fucosidose (l'aspartylglucosaminurie est beaucoup trop faible par rapport au kit ERNDIM pour le considérer comme positif).

En parallèle, des patients atteints de MPS et de ML ont été testés afin de voir si nous retrouvions une accumulation d'oligosaccharides dans leurs urines, notamment pour des faibles taux.

Parmi les 19 patients MPS testés, seulement 3 ont montré un faible signal (1 MRM de confirmation positif, et intensité du pic de quantification peu élevée) pour des oligosaccharides : 1 MPS IV-A (2 urines) sur les 4 testés présentait un signal en  $\beta$ -mannosidose ; 1 MPS II sur les 3 testés présentait un signal en fucosidose ; et 1 MPS IV-B sur les 2 présentait un signal en GM1 gangliosidose (**Annexe 1**).

Chez les 2 ML testées (1 ML II et 1 ML III), aucun spectre ni ratios *resp*/CrU obtenus n'étaient significatifs pour tous les oligosaccharides dosés.

## V. Discussion

La technique LC-MS/MS est au moins similaire à la CCM et permet un dépistage fiable des OS. De ce fait, notre méthode a permis de confirmer le diagnostic de tous les patients. Seule l'urine du patient atteint de  $\beta$ -Mannosidose avait un ratio *resp*/CrU proche de celui du témoin négatif. Le diagnostic de ce patient datant d'il y a environ 14 ans, il est possible que l'oligosaccharide se soit dégradé dans l'échantillon, malgré la conservation à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Toutefois, l'allure des spectres obtenus pour ce patient en MRM de quantification et de confirmation (non présent chez les patients sains) restent similaire à celui du kit ERNDIM, ce qui suggère que l'aspect des spectres est un indicateur important dans l'interprétation des résultats.

Les patients faux positifs en CCM présentaient des profils oligosaccharidiques en LC-MS/MS douteux. Des signaux sortent pour plusieurs oligosaccharides sur un même patient (**Figure 16 B**), avec une quantification faible par rapport aux patients pathologiques et au kit ERNDIM. De plus, ces signaux ne semblent pas spécifiques des oligosaccharides du fait des réponses obtenues sur les MRM de confirmation (**Figure 16 C et D**). En effet, l'aspect des spectres semble bien différent, et l'intensité du signal est plus faible, par rapport aux patients pathologiques et au kit ERNDIM. Le faible nombre de patients pathologiques testés ainsi que le manque d'expérience et de recul ne nous permet pas de trancher aujourd'hui si

ces patients auraient été considérés comme sains avec juste l'analyse des oligosaccharides en LC-MS/MS.

Un point important à souligner est la présence d'un signal pour le GlcNA<sub>sn</sub>, marqueur de l'aspartylglucosaminurie, dans toutes les urines, mêmes celle des patients sains. La *response* est néanmoins beaucoup plus faible que celle du kit ERNDIM (soit chez un sujet atteint d'aspartylglucosaminurie). Il est donc nécessaire de tester d'autres patients positifs afin de le confirmer, et ainsi avoir plus d'expérience et de recul sur l'interprétation de ce paramètre.

Certaines équipes de recherche ont réussi à combiner cette méthode de dosage des oligosaccharides avec d'autres marqueurs, tels que les GAG ou les glycolipides, ce qui permettrait en une seule analyse de dépister plusieurs MSL en même temps par un profil glycomique large. Du fait du possible stockage secondaire dans certaines MSL, l'interprétation nécessite toutefois de prendre en compte le schéma global, plutôt qu'un biomarqueur unique ; une connaissance des maladies avec leurs biomarqueurs associés, ainsi que des antécédents des patients, est primordiale. Enfin, les analyses supplémentaires (dosage d'autres biomarqueurs, tels que les GAG, mesure des activités enzymatiques et étude génétique) sont absolument nécessaires pour la différenciation et la confirmation des MSL. (64,68,70).

Une des limites majeures de ce travail est le faible nombre de patients inclus dans la méthode (une urine pour la plupart des OS testées, aucune urine de patient présentant une aspartylglucosaminurie ou une fucosidose). Ceci limite fortement la puissance analytique de notre étude, notamment pour comparer les profils d'oligosaccharides des différentes formes de chaque OS, et l'évolution selon leur âge. Les ratio *resp*/CrU pourraient être légèrement plus élevés chez les très jeunes enfants ayant une créatininurie très faible. A l'inverse, les patients atteints de formes à apparition tardive devraient présenter une augmentation des oligosaccharides moins importante que chez les formes infantiles (62). Ceci est expliqué par la prévalence très faible de ces pathologies.

Un autre point à noter est le nombre de pathologies testées. En effet, des MSL pour lesquels nous retrouvons des oligosaccharides urinaires n'ont pu être intégrées dans la méthode (par exemple, la galactosialidose ou la maladie de Pompe n'ont pu être testées). Le profil des oligosaccharides que nous proposons ne comporte donc pas toutes les pathologies excréant des oligosaccharides existants. Afin de régler ce problème, il serait ainsi nécessaire d'inclure

plus de patients, et plus de pathologies, afin de pouvoir donner aux cliniciens une meilleure interprétation des données.

Une autre limitation de cette étude est la non réalisation des interférences possibles dans l'analyse urinaire. En effet, bien que la méthode par LC-MS/MS soit plus sensible et spécifique que la CCM, il n'est pas impossible que des interférences par l'alimentation (lait maternel) ou par des médicaments existent, comme l'avaient montré *Hagemeijer MC et al, J Inherit Metab Dis, 2023* (élévation des marqueurs de la sialidose et galactosialidose chez les nouveau-nés, très probablement due à la présence de sialyllactose dans le lait maternel (71)). L'expérience et le recul que nous obtiendrons en utilisant cette méthode sur une période plus longue nous permettra entre autres d'en discerner quelques-unes.

Le dernier point à souligner est la non réalisation de la reproductibilité de la méthode pour ce travail. En effet, la stabilité des échantillons utilisés à 5°C n'était pas assez bonne pour avoir une analyse correcte, avec une diminution des pics obtenus au fil des jours.

L'équipe du Dr PIRAUD du laboratoire des Maladies Métaboliques des Hôpitaux de Lyon avait remarqué que l'oligosaccharide de la sialidose était également élevé dans la galactosialidose infantiles, dans les MPS III, IVA et VII, et dans la ML II (62). Ainsi, bien qu'une très forte augmentation soit évocatrice de sialidose ou de galactosialidose, une augmentation plus modérée pourrait orienter vers une autre MSL (62). De plus, l'analyse du profil des oligosaccharides chez des patients atteints de ML II/III et de MPS IVB par l'équipe de *Mak J et al, Mol Genet Metab, 2021* a révélé une excrétion anormale mais non spécifique d'oligosaccharides, avec des schémas mixtes combinant des transitions MRM de différents troubles (64). Toutefois, comme nous l'avons montré dans nos résultats, aucun patient atteint de MPS ou de ML n'a présenté un profil d'oligosaccharides positif, ou du moins significatif. Bien que les spectres obtenus pour les 3 patients MPS semblaient correspondre à celui des pathologies, les ratios *resp/CrU* n'étaient pas suffisamment élevés par rapport aux témoins négatifs. Cela n'était donc pas suffisant pour conclure à une vraie accumulation d'oligosaccharides chez ces patients.

Il est tout de même intéressant de noter les résultats obtenus pour le patient atteint de MPS IV-B. En effet, comme dit précédemment, cette pathologie est allélique avec la GM1 gangliosidose. Cette petite différence génétique se traduit au niveau phénotypique par une accumulation de GM1 ganglioside pour l'une et de Kératane sulfate pour l'autre. De plus, au niveau clinique, la GM1 gangliosidose provoque une atteinte neurologique importante et

presque isolée, alors que la MP IV-B est uniquement malformative au niveau squelettique, sans neuropathie. Le patient en question, d'une dizaine d'années à l'époque, présentait cliniquement des atteintes neurologiques et psychomotrices peu graves, avec de légères malformations épiphysaires. Lors de son diagnostic de MPS IV-B, il avait été observé une oligosaccharidurie élevée, associée à un profil en faveur d'une GM1 gangliosidose (**Annexe 1**) et une diminution de l'activité enzymatique de la  $\beta$ -galactosidase (abaissée aussi bien dans la GM1 gangliosidose et la MPS IV-B). Bien qu'il fût diagnostiqué MPS IV-B au final au vu de l'accumulation de kératane sulfate et de symptômes squelettiques, la biologie moléculaire a révélé une mutation homoallélique potentiellement pathologique sur le gène GLB1 sans pouvoir trancher entre les deux MSL en question.

De plus en plus de preuves suggèrent que l'élévation des marqueurs de stockage par rapport aux individus en bonne santé serait liée à la pathogenèse, tandis que la gravité des troubles pourrait ne pas être bien corrélée aux niveaux de biomarqueurs. Ceci semble se confirmer avec les patients traités. En effet, lors de l'utilisation de l'ERT comme traitement, la concentration des biomarqueurs diminue généralement en réponse, sans toutefois atteindre des niveaux normaux (**72**). Ce phénomène a notamment été observé par *Huang et al, Clin Chem, 2018* qui, en utilisant une méthode d'analyse des oligosaccharides urinaires similaire à la nôtre, avaient remarqué une réduction substantielle de la réponse en oligosaccharides chez les patients atteints de fucosidose et  $\alpha$ -mannosidose après THSC, même en analyse semi-quantitative. Cela suggérerait que le test pourrait être utilisé pour surveiller l'efficacité du traitement pour les interventions thérapeutiques au fur et à mesure que des traitements sont développés pour ces pathologies (**63**).

Aucun étalon interne spécifique n'est actuellement disponible sur le marché pour les oligosaccharides anormaux, ce qui signifie que des composés structurellement similaires doivent être utilisés comme substituts (comme le maltoheptaose). Les résultats (exprimé en ratio *response/CreatU*) sont donc relatifs à l'IS utilisé. C'est pourquoi cette méthode ne peut être utilisée qu'en analyse semi-quantitative. Bien que cela soit généralement suffisant pour le diagnostic, l'utilisation de ces concentrations relatives comme évaluation de la maladie ou pour surveiller la réponse aux traitements doit être interprétée dans les limites des normes utilisées. Idéalement, un étalon interne serait un isotope (souvent la molécule dosée deutérée, soit un ion Deutére ( $^2\text{H}$ ) au lieu d'un hydrogène ( $^1\text{H}$ )) stable, tel que son comportement dans le processus analytique reflète le composé mesuré, avec une différence de masse suffisante pour la détection par spectrométrie de masse. La génération de courbes



d'étalonnage est également difficile car cela nécessiterait que l'oligosaccharide spécifique pour chaque type d'oligosaccharide soit synthétisé sous forme de composés purs à utiliser comme étalons **(61,68,70)**.

Le diagnostic des OS, et des MSL en général, est souvent difficile en raison de la présence de caractéristiques cliniques communes et d'une grande variabilité des symptômes, et nécessite une approche complexe qui comprend l'analyse de biomarqueurs cibles, la mesure des activités enzymatiques et le diagnostic de confirmation par analyse de mutation. La disponibilité de thérapies nouvelles et spécifiques pour un grand nombre de MSL a augmenté la demande de techniques de diagnostic fiables pour offrir un diagnostic précis et rapide. C'est dans cette mouvance que la question de mettre en place un programme de dépistage néonatal (DNN) efficace de ces pathologies s'est posée dans la communauté scientifique.

Le DNN fait partie d'un programme de santé publique qui a initialement été mis en œuvre pour la phénylcétonurie dans les années 1970 en France. Le DNN des MSL a commencé il y a plus de dix ans par le dépistage de la maladie de Fabry en Italie, puis à Taïwan avec l'implantation du dépistage des maladies de Fabry et de Pompe. Ce dernier pays est l'exemple le plus connu du dépistage des MSL car il a permis de grandement améliorer le taux de survie de la maladie de Pompe infantile par la mise en place de l'ERT chez les nouveau-nés atteints **(72,78)**.

Le DNN des MSL a débuté par mesure de l'activité enzymatique par méthode fluorométrique. Le principe repose sur l'utilisation d'un substrat fluorescent qui est dégradé par les enzymes testées. D'un point de vue technologique, l'activité enzymatique des MSL est stable dans les taches de sang séché sur buvard **(72)**.

Ces dernières années, certains chercheurs ont décidé de tester le DNN de certaines MSL par mesure de l'activité enzymatique avec la technologie de MS/MS, en flux d'injection directe (sans séparation) ou couplée à la LC. Pour cela, le buvard est extrait puis incubé avec des substrats et leurs étalons internes (substrats deutérés). L'avantage de la LC est sa plus grande sensibilité, avec la possibilité de détecter des analytes en plus faibles concentrations ainsi que de diminuer les interférences et le bruit de l'analyse. De plus, l'utilisation de la MS/MS permet des mesures multiplexées, c'est-à-dire de dépister plusieurs maladies en une seule analyse **(72-74)**.

La MS/MS pour le dosage simultané de plusieurs enzymes lysosomales avait montré une valeur prédictive positive au moins égale à la méthode fluorométrique tout en étant plus rapide et avec une gamme analytique plus large (valeur plus précise, principalement pour des valeurs très faibles). C'est pourquoi elle a été introduite dans de nombreux laboratoires de DNN de routine de certains pays. Les principales MSL en dépistage sont les maladies de Fabry, Pompe, Gaucher et la MPS-I. Le dépistage peut être étendu à la maladie de Niemann–Pick A/B et à la maladie de Krabbe, voire à un grand nombre de maladies en simultané, comme l'ont montré l'équipe de Hong et al en 2020 (74), en ayant mis en place un test hautement multiplexé (jusqu'à 18 maladies) (74-79).

Le DNN des MSL a gagné en importance avec l'augmentation des thérapeutiques efficaces, surtout si mise en place précocement. Une limitation majeure est l'existence de pseudo-déficit dû à des variants génétiques polymorphes, abaissant l'activité *in vitro* mais ne provoquant pas de maladie. En effet, même avec la très haute sensibilité de la MS/MS, il n'est pas impossible d'observer des faux positifs lors du dépistage, bien que moins fréquents par rapport à la fluorométrie. Dans de tels cas, des analyses biochimiques et génétiques appropriées sont nécessaires pour différencier les mutations pathogènes des polymorphismes. Toutefois, les analyses de mutation ne permettent pas toujours d'identifier le sous-type phénotypique de la maladie (apparition précoce ou tardive) et de déterminer si une mutation nouvellement reconnue est pathologique ou bénigne. C'est pourquoi une évaluation clinique du nouveau-né reste importante, bien que celui-ci est souvent asymptomatique et peut ne présenter la pathologie que bien plus tard (73,76,77).

Le manque de distinction entre les phénotypes précoces et tardifs rend le DNN des MSL controversé par certains chercheurs. En effet, le dépistage des phénotypes tardifs présente un impact non négligeable pour les médecins en termes de prise-en-charge et suivi du bébé et pour les parents au niveau psychologique. Alors qu'un traitement précoce s'avère efficace pour les pathologies infantiles à évolution rapide, l'apparition des premiers symptômes, marqueurs de la nécessité de mettre en place un traitement, pour les sous-types d'apparition tardive est variable (76,78).

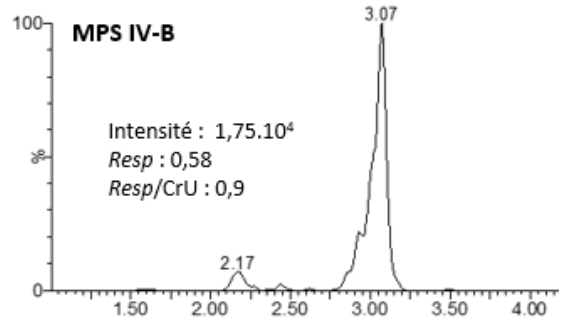
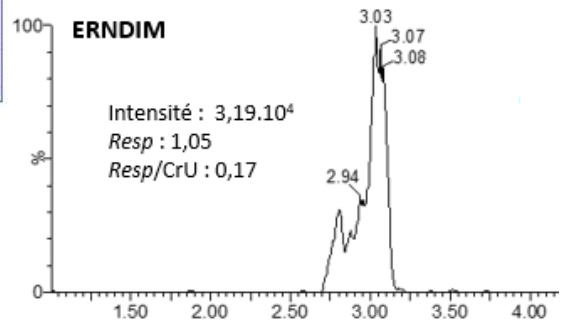
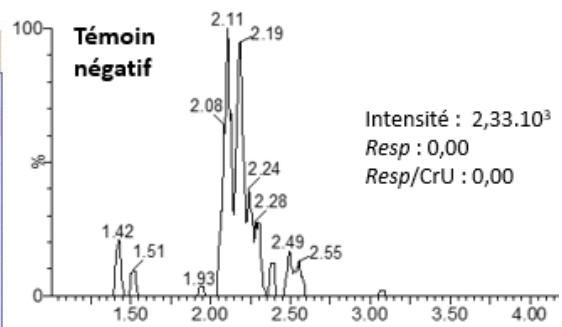
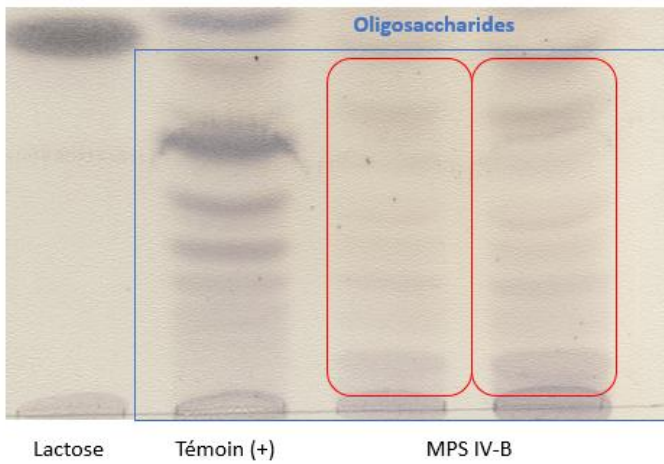
**Tableau 7** : Résumé des MSL mentionnées comprises dans les DNN cités.

MSL	Enzymes	Gènes	Substrats
Fabry	$\alpha$ -galactosidase A	GLA	Glycosphingolipides
Mucopolysaccharidose I	$\alpha$ -L-iduronidase	IDUA	Héparane et Dermatanes Sulfates (GAG)
Gaucher	glucocérébrosidase	GBA	Glucosylcéramide
Niemann–Pick A/B	sphingomyélinase acide	SMA	Sphingomyéline
Krabbe	galactocérébrosidase	GALC	Galactocérébroside

## VI. Conclusion

Cette méthode d'analyse des oligosaccharides par LC/MS/MS, sans traitement des échantillons au préalable, est nouvelle, rapide et facile à mettre en œuvre. Elle permet la détection des pathologies préalablement diagnostiquées par CCM au moins tout aussi efficacement. Cependant, au vu des résultats obtenus et du manque de recul actuel, tous patients positifs ou douteux par la méthode LC/MS/MS doivent être confirmés par des mesures enzymatiques appropriées et une analyse moléculaire afin de pouvoir poser définitivement un diagnostic. Enfin, il est primordial de tester plus de patients, pathologiques comme sains, afin d'améliorer notre expérience sur les interprétations des spectres obtenus.

## Annexe



**Annexe 1 :** Profil oligosaccharidique du patient MPS IV-B, avec à gauche la CCM réalisée au moment du diagnostic, et à droite le chromatogramme en LC-MS/MS. Dans les deux cas, on peut observer une légère accumulation de GM1 ganglioside.

# Bibliographie

- 1) Varki A, Kornfeld S. Historical Background and Overview. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology (Internet). 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 1
- 2) Lebrilla CB, Liu J, Widmalm G, et al. Oligosaccharides and Polysaccharides. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology (Internet). 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 3
- 3) Colley KJ, Varki A, Haltiwanger RS, et al. Cellular Organization of Glycosylation. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology (Internet). 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 4
- 4) Freeze HH, Boyce M, Zachara NE, et al. Glycosylation Precursors. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology (Internet). 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 5
- 5) Rini JM, Moremen KW, Davis BG, et al. Glycosyltransferases and Glycan-Processing Enzymes. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology (Internet). 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 6
- 6) Gagneux P, Hennet T, Varki A. Biological Functions of Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology (Internet). 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 7
- 7) Stanley P, Moremen KW, Lewis NE, et al. N-Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology (Internet). 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 9
- 8) Brockhausen I, Wandall HH, Hagen KGT, et al. O-GalNAc Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology (Internet). 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 10.
- 9) Schnaar RL, Sandhoff R, Tiemeyer M, et al. Glycosphingolipids. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology (Internet). 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 11.
- 10) Taylor ME, Drickamer K, Imberty A, et al. Discovery and Classification of Glycan-Binding Proteins. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology (Internet). 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 28
- 11) Molina A, O'Neill MA, Darvill AG, et al. Free Glycans as Bioactive Molecules. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology (Internet). 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 40
- 12) Sackstein R, Stowell SR, Hoffmeister KM, et al. Glycans in Systemic Physiology. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology (Internet). 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 41
- 13) Lewis AL, Szymanski CM, Schnaar RL, et al. Bacterial and Viral Infections. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology (Internet). 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 42
- 14) Freeze HH, Steet R, Suzuki T, et al. Genetic Disorders of Glycan Degradation. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology (Internet). 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 44

- 15) Sackstein R, Hoffmeister KM, Stowell SR, et al. Glycans in Acquired Human Diseases. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology (Internet)*. 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 46
- 16) Bellis SL, Reis CA, Varki A, et al. Glycosylation Changes in Cancer. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology (Internet)*. 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 47
- 17) Magalhães A, Duarte HO, Reis CA. The role of O-glycosylation in human disease. *Mol Aspects Med*. 2021 Jun;79:100964
- 18) Brockhausen I. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Dec 6;1473(1):67-95
- 19) Groux-Degroote S, Guérardel Y, Delannoy P. Gangliosides: Structures, Biosynthesis, Analysis, and Roles in Cancer. *Chembiochem*. 2017 Jul 4;18(13):1146-1154.
- 20) Sandhoff R, Sandhoff K. Emerging concepts of ganglioside metabolism. *FEBS Lett*. 2018 Dec;592(23):3835-3864
- 21) Palmano K, Rowan A, Guillermo R, Guan J, McJarrow P. The role of gangliosides in neurodevelopment. *Nutrients*. 2015 May 22;7(5):3891-913
- 22) Sipione S, Monyror J, Galleguillos D, Steinberg N, Kadam V. Gangliosides in the Brain: Physiology, Pathophysiology and Therapeutic Applications. *Front Neurosci*. 2020 Oct 6;14:572965
- 23) Yu RK, Tsai YT, Ariga T, Yanagisawa M. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides--an overview. *J Oleo Sci*. 2011;60(10):537-44.
- 24) Rajkumar V, Dumpa V. Lysosomal Storage Disease. (Updated 2022 Jul 25). In: *StatPearls (Internet)*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan
- 25) Ceccarini MR, Codini M, Conte C, Patria F, Cataldi S, Bertelli M, Albi E, Beccari T. Alpha-Mannosidosis: Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci*. 2018 May 17;19(5):1500
- 26) Malm D, Nilssen Ø. Alpha-Mannosidosis. 2001 Oct 11 (updated 2019 Jul 18). In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. *GeneReviews® (Internet)*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2023. PMID: 20301570.
- 27) Hennermann JB, et al. Mortality in patients with alpha-mannosidosis: a review of patients' data and the literature. *Orphanet J Rare Dis*. 2022 Jul 23;17(1):287
- 28) Riise Stensland HMF, Persichetti E, Sorriso C, Hansen GM, Bibi L, Paciotti S, Balducci C, Beccari T. Identification of two novel beta-mannosidosis-associated sequence variants: biochemical analysis of beta-mannosidase (MANBA) missense mutations. *Mol Genet Metab*. 2008 Aug;94(4):476-480.
- 29) Jules G Leroy, Chapter 103 - Oligosaccharidoses: Disorders Allied to the Oligosaccharidoses, Emery and Rimoin's *Principles and Practice of Medical Genetics (Sixth Edition)*, Academic Press, 2013, Pages 1-51
- 30) Arvio M, Mononen I. Aspartylglycosaminuria: a review. *Orphanet J Rare Dis*. 2016 Dec 1;11(1):162
- 31) Goodspeed K, Feng C, Laine M, Lund TC. Aspartylglucosaminuria: Clinical Presentation and Potential Therapies. *J Child Neurol*. 2021 Apr;36(5):403-414
- 32) Miano M, Lanino E, Gatti R, Morreale G, Fondelli P, Celle ME, Stroppiano M, Crescenzi F, Dini G. Four year follow-up of a case of fucosidosis treated with unrelated donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001 Apr;27(7):747-51
- 33) Stepien KM, Ciara E, Jezela-Stanek A. Fucosidosis--Clinical Manifestation, Long-Term Outcomes, and Genetic Profile--Review and Case Series. *Genes (Basel)*. 2020 Nov 22;11(11):1383
- 34) William G. Johnson, Chapter 33 - Disorders of Glycoprotein Degradation: Sialidosis, Fucosidosis,  $\alpha$ -Mannosidosis,  $\beta$ -Mannosidosis, and Aspartylglycosaminuria, *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease (Fifth Edition)*, Academic Press, 2015, Pages 369-383
- 35) Caciotti A, et al. Type I sialidosis, a normosomatic lysosomal disease, in the differential diagnosis of late-onset ataxia and myoclonus: An overview. *Mol Genet Metab*. 2020 Feb;129(2):47-58

- 36) Khan A, Sergi C. Sialidosis: A Review of Morphology and Molecular Biology of a Rare Pediatric Disorder. *Diagnostics (Basel)*. 2018 Apr 25;8(2):29
- 37) Caciotti A, et al. Galactosialidosis: review and analysis of CTSA gene mutations. *Orphanet J Rare Dis*. 2013 Aug 2;8:114
- 38) Annunziata I, d'Azzo A. Galactosialidosis: historic aspects and overview of investigated and emerging treatment options. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2017;5(2):131-141
- 39) Rha AK, Maguire AS, Martin DR. GM1 Gangliosidosis: Mechanisms and Management. *Appl Clin Genet*. 2021 Apr 9;14:209-233
- 40) Nicoli ER, Annunziata I, d'Azzo A, Platt FM, Tifft CJ, Stepien KM. GM1 Gangliosidosis-A Mini-Review. *Front Genet*. 2021 Sep 3;12:734878
- 41) Arash-Kaps L, Komlosi K, Seegräber M, Diederich S, Paschke E, Amraoui Y, Beblo S, Dieckmann A, Smitka M, Hennermann JB. The Clinical and Molecular Spectrum of GM1 Gangliosidosis. *J Pediatr*. 2019 Dec;215:152-157.e3
- 42) Xiao C, Tifft C, Toro C. Sandhoff Disease. 2022 Apr 14. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. *GeneReviews® (Internet)*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2023
- 43) Leal AF, Benincore-Flórez E, Solano-Galarza D, Garzón Jaramillo RG, Echeverri-Peña OY, Suarez DA, Alméciga-Díaz CJ, Espejo-Mojica AJ. GM2 Gangliosidosis: Clinical Features, Pathophysiological Aspects, and Current Therapies. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 27;21(17):6213
- 44) Ramani PK, Parayil Sankaran B. Tay-Sachs Disease. 2023 Jan 25. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan
- 45) Khan SA, Tomatsu SC. Mucopolysaccharidosis Overview: Past, Present, and Future. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 17;21(18):6812
- 46) Kohler L, Puertollano R, Raben N. Pompe Disease: From Basic Science to Therapy. *Neurotherapeutics*. 2018 Oct;15(4):928-942
- 47) Ferreira CR, Gahl WA. Lysosomal storage diseases. *Transl Sci Rare Dis*. 2017;2(1-2):1-71. Published 2017 May 25
- 48) Platt FM, d'Azzo A, Davidson BL, Neufeld EF, Tifft CJ. Lysosomal storage diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Oct 1;4(1):27
- 49) Yang C, Wang X. Lysosome biogenesis: Regulation and functions. *J Cell Biol*. 2021 Jun 7;220(6):e202102001
- 50) Ballabio A, Gieselmann V. Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Apr;1793(4):684-96.
- 51) Onyenwoke RU, Brenman JE. Lysosomal Storage Diseases-Regulating Neurodegeneration. *J Exp Neurosci*. 2016 Apr 5;9(Suppl 2):81-91.
- 52) Kiselyov K, Jennigs JJ Jr, Rbaibi Y, Chu CT. Autophagy, mitochondria and cell death in lysosomal storage diseases. *Autophagy*. 2007 May-Jun;3(3):259-62
- 53) Saffari A, Kölker S, Hoffmann GF, Ebrahimi-Fakhari D. Linking mitochondrial dysfunction to neurodegeneration in lysosomal storage diseases. *J Inherit Metab Dis*. 2017 Sep;40(5):631-640.
- 54) Archer LD, Langford-Smith KJ, Bigger BW, Fildes JE. Mucopolysaccharide diseases: a complex interplay between neuroinflammation, microglial activation and adaptive immunity. *J Inherit Metab Dis*. 2014 Jan;37(1):1-12.
- 55) Parenti G, Medina DL, Ballabio A. The rapidly evolving view of lysosomal storage diseases. *EMBO Mol Med*. 2021 Feb 5;13(2):e12836
- 56) Stepien KM, Cufflin N, Donald A, Jones S, Church H, Hargreaves IP. Secondary Mitochondrial Dysfunction as a Cause of Neurodegenerative Dysfunction in Lysosomal Storage Diseases and an Overview of Potential Therapies. *Int J Mol Sci*. 2022 Sep 12;23(18):10573.
- 57) Ausseil J et al. Early neurodegeneration progresses independently of microglial activation by heparan sulfate in the brain of mucopolysaccharidosis IIIB mice. *PLoS One*. 2008 May 28;3(5):e2296.

- 58) Pandey MK. Exploring Pro-Inflammatory Immunological Mediators: Unraveling the Mechanisms of Neuroinflammation in Lysosomal Storage Diseases. *Biomedicines*. 2023 Apr 1;11(4):1067
- 59) Rha AK, Maguire AS, Martin DR. GM1 Gangliosidosis: Mechanisms and Management. *Appl Clin Genet*. 2021 Apr 9;14:209-233
- 60) Humbel R, Collart M. Oligosaccharides in urine of patients with glycoprotein storage diseases. I. Rapid detection by thin-layer chromatography. *Clin Chim Acta*. 1975 Apr 16;60(2):143-5
- 61) Fuller M. Laboratory Diagnosis of Lysosomal Diseases: Newborn Screening to Treatment. *Clin Biochem Rev*. 2020 May;41(2):53-66
- 62) Piraud M, Pettazzoni M, Menegaut L, Caillaud C, Nadjar Y, Vianey-Saban C, Froissart R. Development of a new tandem mass spectrometry method for urine and amniotic fluid screening of oligosaccharidoses. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2017 Jun 15;31(11):951-963
- 63) Huang R, Cathey S, Pollard L, Wood T. UPLC-MS/MS Analysis of Urinary Free Oligosaccharides for Lysosomal Storage Diseases: Diagnosis and Potential Treatment Monitoring. *Clin Chem*. 2018 Dec;64(12):1772-1779
- 64) Mak J, Cowan TM. Detecting lysosomal storage disorders by glycomic profiling using liquid chromatography mass spectrometry. *Mol Genet Metab*. 2021 Sep-Oct;134(1-2):43-52
- 65) Lund AM, et al. Comprehensive long-term efficacy and safety of recombinant human alpha-mannosidase (velmanase alfa) treatment in patients with alpha-mannosidosis. *J Inherit Metab Dis*. 2018 Nov;41(6):1225-1233
- 66) Cadaoas J, et al. Galactosialidosis: preclinical enzyme replacement therapy in a mouse model of the disease, a proof of concept. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020 Nov 20;20:191-203
- 67) Naumchik BM, Gupta A, Flanagan-Steet H, Steet RA, Cathey SS, Bertelli M, Albi E, Beccari T. Alpha-Mannosidosis: Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci*. 2018 Maeases. Cells. 2020 Jun 5;9(6):1411
- 68) Chen JC, et al. Intracerebroventricular enzyme replacement therapy with  $\beta$ -galactosidase reverses brain pathologies due to GM1 gangliosidosis in mice. *J Biol Chem*. 2020 Sep 25;295(39):13532-13555
- 69) Semeraro M, et al. A new UHPLC-MS/MS method for the screening of urinary oligosaccharides expands the detection of storage disorders. *Orphanet J Rare Dis*. 2021 Jan 9;16(1):24
- 70) Piraud M, Pettazzoni M, Lavoie P, Ruet S, Pagan C, Cheillan D, Latour P, Vianey-Saban C, Auray-Blais C, Froissart R. Contribution of tandem mass spectrometry to the diagnosis of lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2018 May;41(3):457-477
- 71) Hagemeyer MC, van den Bosch JC, Bongaerts M, Jacobs EH, van den Hout JMP, Oussoren E, Ruijter GJG. Analysis of urinary oligosaccharide excretion patterns by UHPLC/HRAM mass spectrometry for screening of lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2023 Mar;46(2):206-219
- 72) Mashima R, Okuyama T, Ohira M. Biomarkers for Lysosomal Storage Disorders with an Emphasis on Mass Spectrometry. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 14;21(8):2704
- 73) Piraud M, Pettazzoni M, Lavoie P, Ruet S, Pagan C, Cheillan D, Latour P, Vianey-Saban C, Auray-Blais C, Froissart R. Contribution of tandem mass spectrometry to the diagnosis of lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2018 May;41(3):457-477
- 74) Hong X, Sadilek M, Gelb MH. A highly multiplexed biochemical assay for analytes in dried blood spots: application to newborn screening and diagnosis of lysosomal storage disorders and other inborn errors of metabolism. *Genet Med*. 2020 Jul;22(7):1262-1268
- 75) Liao HC, Chiang CC, Niu DM, Wang CH, Kao SM, Tsai FJ, Huang YH, Liu HC, Huang CK, Gao HJ, Yang CF, Chan MJ, Lin WD, Chen YJ. Detecting multiple lysosomal storage diseases by tandem mass spectrometry--a national newborn screening program in Taiwan. *Clin Chim Acta*. 2014 Apr 20;431:80-6
- 76) Burlina AB, Polo G, Salviati L, Duro G, Zizzo C, Dardis A, Bembi B, Cazzorla C, Rubert L, Zordan R, Desnick RJ, Burlina AP. Newborn screening for lysosomal storage disorders by tandem mass spectrometry in North East Italy. *J Inherit Metab Dis*. 2018 Mar;41(2):209-219



- 77) Elliott S, Buroker N, Cournoyer JJ, Potier AM, Trometer JD, Elbin C, Schermer MJ, Kantola J, Boyce A, Turecek F, Gelb MH, Scott CR. Pilot study of newborn screening for six lysosomal storage diseases using Tandem Mass Spectrometry. *Mol Genet Metab.* 2016 Aug;118(4):304-9
- 78) Wasserstein MP, Caggana M, Bailey SM, Desnick RJ, Edelman L, Estrella L, Holzman I, Kelly NR, Kornreich R, Kupchik SG, Martin M, Nafday SM, Wasserman R, Yang A, Yu C, Orsini JJ. The New York pilot newborn screening program for lysosomal storage diseases: Report of the First 65,000 Infants. *Genet Med.* 2019 Mar;21(3):631-640
- 79) Li R, Tian L, Gao Q, Guo Y, Li G, Li Y, Sun M, Yan Y, Li Q, Nie W, Zou H. Establishment of Cutoff Values for Newborn Screening of Six Lysosomal Storage Disorders by Tandem Mass Spectrometry. *Front Pediatr.* 2022 Mar 28;10:814461

---

**ABSTRACT**

We have established a method for semi-quantitative determination of urinary oligosaccharides by tandem mass spectrometry coupled with liquid chromatography, in order to replace the reference method of thin layer chromatography. The oligosaccharidoses tested are  $\alpha$ - and  $\beta$ -mannosidosis, fucosidosis, sialidosis, aspartylglucosaminuria, GM1 gangliosidosis and Sandhoff disease, with maltoheptaose as internal standard. This method performed at least as well as thin layer chromatography. It nevertheless remains necessary to test more patients, both pathological and healthy, to complete the validation of the method and to improve our experience with this new method, in order to be able to provide a quality interpretation of the oligosaccharide profiles obtained to clinicians.

---

# Dosage des oligosaccharides urinaires par spectrométrie de masse en tandem associée à la chromatographie liquide (LC-MS/MS)

---

**Présentée et soutenue publiquement par :** Nicolas LAFONT

## **RESUMÉ**

Nous avons mis en place une méthode de dosage semi-quantitative des oligosaccharides urinaires par spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide, afin de remplacer la méthode de référence qu'est la chromatographie sur couche mince. Les oligosaccharidoses testées sont l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -mannosidose, la fucosidose, la sialidose, l'aspartylglucosaminurie, la GM1 gangliosidose et la maladie de Sandhoff, avec le maltoheptaose comme standard interne. Cette méthode s'est avérée au moins aussi bien que la chromatographie sur couche mince. Il reste néanmoins nécessaire de tester plus de patients, pathologiques comme sains, pour compléter la validation de la méthode et d'améliorer notre expérience avec cette nouvelle méthode, afin de pouvoir rendre une interprétation des profils oligosaccharidiques obtenus de qualité aux cliniciens.

---

**TITRE ET RÉSUMÉ EN ANGLAIS :** voir au recto de la dernière page de la thèse

---

**DISCIPLINE ADMINISTRATIVE :** Biologie Médicale

---

**MOTS-CLES :** oligosaccharides urinaires, oligosaccharidoses, maladies de surcharge lysosomale, spectrométrie de masse en tandem, LC-MS/MS, validation de méthode

---

## **INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :**

Laboratoire de Biochimie – Maladies Métaboliques

CHU de Toulouse - Institut Fédératif de Biologie

330 Avenue de Grande Bretagne

31300 Toulouse

**DIRECTEUR DE THÈSE :** Jérôme AUSSEIL, Professeur