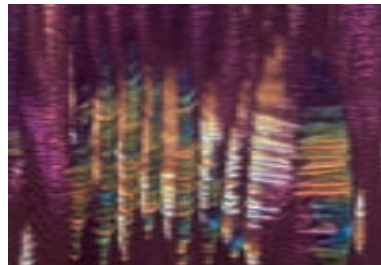


Dosage du globotriaosylcéramide dans l'urine

Monique Piraud, Fanny de Goiffon,
Roseline Froissart, Irène Maire, Marie-Thérèse Vanier

> La maladie de Fabry est une maladie de surcharge due à un déficit de l' α -galactosidase A. Un traitement par enzyme de substitution est désormais possible. Le dosage du globotriaosylcéramide dans l'urine peut être effectué par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Cette technique, particulièrement sensible et spécifique, est décrite, ainsi que les résultats chez des patients atteints, des femmes hétérozygotes et des malades traités par enzyme de substitution. <



M. Piraud, F. de Goiffon,
R. Froissart, I. Maire : Laboratoire de Biochimie Pédiatrique, Hôpital Debrousse, 29, rue Sœur Bouvier, 69322 Lyon Cedex 05, France.

M.T. Vanier : Fondation Gillet Mérieux, Centre Hospitalier Lyon-Sud, chemin Grand Revoyet, 69310 Pierre-Bénite, France.
monique.piraud@chu-lyon.fr

La maladie de Fabry est due au déficit d'une enzyme lysosomale, l' α -galactosidase A. Son substrat principal est un sphingolipide, le globotriaosylcéramide (Gb3), qui ne peut être dégradé. Il va donc s'accumuler dans les lysosomes des tissus de l'organisme. Dans l'urine, le Gb3 provient de la desquamation des cellules tubulaires rénales et se trouve principalement dans le sédiment urinaire. Le dosage du Gb3 urinaire était jusqu'à présent réalisé sur le sédiment urinaire obtenu à partir d'une diurèse complète par chromatographie couche mince (CCM) ou par HPLC (*high performance liquid chromatography*). L'avènement de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), technique particulièrement sensible et spécifique, a permis le développement du dosage du Gb3 sur de plus petits échantillons d'urine (simple miction), pourvu que ceux-ci ne soient pas dépourvus du sédiment qui contient les membranes cellulaires (homogénéité du prélèvement). Dans cette technique, la détection des molécules se fait selon leur masse. Le Gb3 présente une hétérogénéité due aux différentes espèces moléculaires d'acides gras (variations de la longueur de la chaîne, du degré de saturation, présence d'une fonction hydroxyle ou non...) et dans un moindre degré des bases sphingoides entrant dans sa constitution. Le Gb3 total est la somme de chacune des isoformes.

Procédure

Le Gb3 est extrait par le chloroforme-méthanol en présence d'un étalon interne (C_{17} -Gb3*, isoforme artificielle du Gb3) à partir d'un millilitre d'un échantillon

d'urine soigneusement homogénéisé, puis purifié par passage sur une colonne de silice- C_{18} [1]. Après évaporation de l'éluat, l'échantillon est repris et directement injecté dans l'appareil MS/MS (temps d'analyse 3 minutes). Le résultat du Gb3 total est ensuite rapporté à la créatinine urinaire.

Résultats et discussion

Chez les sujets témoins adultes, les valeurs observées sont inférieures à 3 nmol/mmol de créatinine. Chez les enfants, les valeurs sont d'autant plus élevées que l'enfant est plus jeune. Il est nécessaire de tenir compte de l'âge du patient pour l'interprétation du résultat. Dans notre expérience, les patients hémizygotés présentent tous des taux très élevés au moment du diagnostic (> 250 nmol/mmol de créatinine, 6 cas), à l'exception d'un patient porteur de la mutation p.N215S, décrite comme étant caractéristique d'un variant cardiaque (1 cas). Des résultats similaires ont été rapportés chez 32 hémizygotés dont 6 étaient porteurs de la mutation p.N215S [2]. Une excrétion de Gb3 très franchement pathologique avait également été observée chez 39 hémizygotés antérieurement étudiés au laboratoire par CCM. Il est à noter que les patients atteints de maladie de Fabry ayant bénéficié d'une greffe de rein (trois cas personnels) présentent une excrétion urinaire normale de Gb3, en bon accord avec l'origine du Gb3 dans l'urine. Chez les patients hémizygotés traités par enzymothérapie substitutive (17 cas), nous avons observé une nette

diminution du Gb3 urinaire dans 11 cas après 1 à 5 ans de traitement (< 72 nmol/mmol de créatinine). Dans les six autres cas, le Gb3 reste très élevé après 3 à 5 ans de traitement (> 206 nmol/mmol de créatinine). Il a été suggéré que cette différence de réponse pouvait être liée au développement d'anticorps anti-enzyme [3], et nous avons effectivement observé dans quatre de ces six cas un taux élevé d'anticorps. Toutefois, le taux d'anticorps n'a pu être documenté que dans 10 de nos cas. Après normalisation de l'excrétion urinaire de Gb3, deux patients de la littérature [3] porteurs de la mutation p.R227X ont présenté une ré-élévation de cette excrétion, en même temps que l'apparition d'anticorps, tandis que chez un de nos patients, porteur de la même mutation, l'excrétion s'est presque normalisée, sans ré-élévation après 5 ans de traitement (sans apparition d'anticorps). Seule l'évaluation du Gb3 urinaire en parallèle avec le taux d'anticorps au cours du temps permettrait de montrer l'existence d'un lien entre ces deux paramètres. Par ailleurs, la persistance d'une excrétion élevée de Gb3 urinaire n'est pas le reflet exact de l'efficacité thérapeutique, puisqu'on observe une disparition de la surcharge au niveau de la biopsie de peau chez la plupart des patients après plusieurs mois de traitement [4].

Dans le passé, les hétérozygotes étaient considérées principalement comme des conductrices. Depuis que l'attention a été attirée sur la symptomatologie présentée par de nombreuses femmes hétérozygotes, les demandes de diagnostic chez des femmes en particulier non apparentées à des hommes atteints de maladie de Fabry sont en augmentation. La détermination de l'activité α -galactosidase A dans les leucocytes ne permet pas d'exclure un statut de conductrice, l'inactivation du chromosome X pouvant être déséquilibrée. Notre expérience ancienne (technique CCM) avait démontré chez 17 des 18 conductrices étudiées une excrétion pathologique de Gb3 dans le sédiment urinaire nous permettant de proposer ce test pour le dépistage de conductrices dans la population générale. L'étude plus récente par MS/MS confirme et étend ces données. Les patientes hétérozygotes confirmées (porteurs d'une mutation délétère sur le gène de l' α -galactosidase A) et non traitées (8 cas, 10 échantillons) présentent une excrétion urinaire de Gb3 plus modérément augmentée, entre 12 et 42 nmol/mmol de créatinine. Lorsqu'elles sont traitées (6 cas), l'excrétion de Gb3 peut se normaliser complètement (3 cas). Dans notre expérience, chez les femmes, une excrétion urinaire de Gb3 supérieure à 12 nmol/mmol de créatinine indique un statut quasi certain d'hétérozygote. Pour des valeurs comprises entre 6 et 12 nmol/mmol de créatinine, un statut d'hétérozygote doit être recherché. Le statut d'hétérozygote devra dans tous les cas être confirmé par la recherche d'une mutation sur le gène de l' α -galactosidase A. Dans la littérature [2], une augmentation de l'excrétion urinaire de Gb3 a été observée chez 37/38 hétérozygotes, tandis qu'elle était normale chez une hétérozygote confirmée (non porteuse de la mutation p.N215S).

Les hémizygotés porteurs de la mutation p.N215S (1 cas de notre série, 6 cas dans la littérature [2]) présentent tous une excrétion urinaire de Gb3 normale ou sus-normale. Chez quatre patientes hétérozygotes pour cette même mutation, l'excrétion urinaire de Gb3 est normale [2]. Cette mutation a été décrite comme responsable d'une forme

de la maladie à prédominance cardiaque. Toutefois, notre patient porteur de cette mutation a présenté une protéinurie de découverte fortuite dès l'âge de 21 ans, qui a été à l'origine du diagnostic (biopsie rénale caractéristique). La maladie cardiaque n'est apparue que plus tardivement. L'accumulation de Gb3 chez les patients porteurs de cette mutation est-elle différente de celle observée chez les patients porteurs d'autres mutations (surcharge des cellules tubulaires rénales) ? Ces patients présentent une activité α -galactosidase A résiduelle non négligeable (10,5 % dans les leucocytes de notre patient). Il est possible que cette activité résiduelle soit suffisante pour éviter une accumulation de Gb3 dans certains types cellulaires comme les cellules tubulaires rénales, mais insuffisante pour l'éviter dans d'autres (cellules de l'endothélium vasculaire, cardiaques, podocytaires, glomérulaires rénales...).

La subdivision en variants (classique, cardiaque, rénal) est probablement trop schématique, car les patients peuvent présenter avec une chronologie variable une atteinte préférentielle d'un tissu. Dans notre expérience, nous avons pu mettre en évidence la mutation p.M42R dans une famille dont le cas index présentait à l'âge de 27 ans une myocardiopathie hypertrophique sans atteinte de la fonction rénale. L'activité α -galactosidase A dans ses leucocytes était inférieure à 1 %. Sa mère présentait la même symptomatologie. Deux oncles maternels étaient décédés à 47 et 53 ans de pathologie cardiaque ; en revanche, une tante maternelle était décédée à 73 ans d'ischémie cérébro-vasculaire après transplantation rénale. À noter que les mutations p.M42V et p.M42T ont été décrites dans la littérature chez des patients atteints de la forme classique de la maladie de Fabry.

Conclusion

Chez les patients hémizygotés (sauf ceux porteurs de la mutation p.N215S) le dosage du Gb3 urinaire permet donc la confirmation du diagnostic. L'étude d'autres paramètres tels que le digalactosylcéramide [5], également accumulé dans la maladie de Fabry, ou de certaines isoformes du Gb3 [6, 7] n'ont pas apporté, à ce jour, de meilleures informations. Mais l'intérêt du dosage du Gb3 chez les hémizygotés concerne surtout le suivi thérapeutique. Chez les patients traités par thérapie enzymatique substitutive, l'excrétion urinaire de Gb3 permet de suivre l'évolution de la surcharge au niveau des cellules tubulaires rénales. La ré-élévation du Gb3 urinaire chez certains patients n'exclut pas une clairance du Gb3 dans la plupart des autres tissus. Pour les hétérozygotés, un diagnostic fiable n'est pas

possible par mesure de l'activité enzymatique α -galactosidase A. En revanche, le dosage du Gb3 urinaire représente un apport primordial au dépistage, puisque la grande majorité des femmes hétérozygotes confirmées présentent une excrétion très significativement augmentée. \diamond

SUMMARY

Globotriaosylceramide measurement in urine

Fabry disease is an X-linked lysosomal storage disorder resulting from a deficiency of the lysosomal hydrolase, α -galactosidase A, for which enzyme replacement therapy is now available. Globotriaosylceramide measurement in urine samples may be used for the diagnosis and management of patients affected with Fabry disease and heterozygote women. The method by electrospray ionization tandem mass spectrometry, very accurate and specific, is described. \diamond

REMERCIEMENTS

Nous remercions la société Genzyme pour le don de l'étalon interne de C_{17} -Gb3 et le financement du temps technique pour la réalisation de ce travail.

RÉFÉRENCES

1. Kirkland T. Introduction to modern liquid chromatography. *Lipids* 1987 ; 22 : 274-7.
2. Young E, Mills K, Morris P, et al. Is globotriaosylceramide a useful marker in Fabry disease ? *Acta Paediatr* 2005 ; 94 : 51-4.
3. Mills K, Vellodi A, Morris P, et al. Monitoring the clinical and biochemical response of enzyme replacement therapy in three children with Fabry disease. *Eur J Pediatr* 2004 ; 163 : 595-603.
4. Wilcox W, Banikazemi M, Guffon N, et al. Long-term safety and efficacy of enzyme replacement therapy for Fabry disease. *Am J Hum Genet* 2004 ; 75 : 65-74.
5. Mills K, Morris P, Lee P, et al. Measurement of urinary CDH and CTH by tandem mass spectrometry in patients hemizygous and heterozygous for Fabry disease. *J Inherit Metab Dis* 2005 ; 28 : 35-48.
6. Kitagawa T, Ishige N, Suzuki K, et al. Non-invasive screening method for Fabry disease by measuring globotriaosylceramide in whole urine samples using tandem mass spectrometry. *Mol Gen Metab* 2005 ; 85 : 196-202.
7. Fuller M, Sharp PC, Rozaklis T, et al. Urinary lipid profiling for the identification of fabry hemizygotes and heterozygotes. *Clin Chem* 2005 ; 51 : 688-94.

TIRÉS À PART

M. Piraud

