HAL
open science

Exploration des mécanismes inflammatoires impliqués dans la physiopathologie de la maladie de Fabry et la réponse à l'enzymothérapie substitutive

Wladimir Mauhin

To cite this version:

Wladimir Mauhin. Exploration des mécanismes inflammatoires impliqués dans la physiopathologie de la maladie de Fabry et la réponse à l'enzymothérapie substitutive. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS610 . tel-03153269

HAL Id: tel-03153269

https://theses.hal.science/tel-03153269v1

Submitted on 26 Feb 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Sorbonne Université

ED515 Complexité du Vivant

Centre de Recherche en Myologie /

Equipe Muscle Inflammatoire et Thérapies Innovantes Ciblées

Exploration des mécanismes inflammatoires impliqués dans la physiopathologie de la maladie de Fabry et la réponse à l'enzymothérapie substitutive

Par Wladimir Mauhin

Thèse de doctorat d'Immunologie

Dirigée par Olivier Benveniste

Présentée et soutenue publiquement le 15 octobre 2018

Devant un jury composé de :

- M. Olivier BENVENISTE	Directeur de thèse
- Me Soumeya BEKRI	Rapporteur
- Me Roselyne GARNOTEL	Rapporteur
- Me Hélène MAILLARD	Examinateur
- M. Bruno FAUTREL	Examinateur
- M. Olivier BOYER	Examinateur

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

à Isabelle,

à Georges

Remerciements :

Monsieur le Professeur Olivier Benveniste, merci de m'avoir accueilli dans votre équipe, merci de m'avoir proposé ce travail, de m'avoir soutenu et de m'avoir fait confiance tout au long de ce projet.

Madame le Professeur Soumeya Bekri, Madame le Docteur Roselyne Garnotel, Monsieur le Professeur Olivier Boyer, Monsieur le Professeur Bruno Fautrel, Madame Hélène Maillard, merci d'avoir accepté d'évaluer et juger ce travail.

A Damien, Louiza, Gaelle et l'ensemble de l'équipe : merci de m'avoir accueilli et épauler dans ce travail.

A Leandro et Xavi pour votre soutien, votre aide et votre humour.

A Nadine, Fred, Mohamed, Mélanie, Solène, Solenne ainsi qu'à Sonia Berrih-Aknin et Rozen Le Panse : Merci pour votre aide essentielle.

A Olivier Lidove, merci pour ta confiance, ton aide, ton soutien, tes relectures...

A l'ensemble des patients, médecins et ARC ayant permis la réalisation de ce projet.

A l'association VML qui a rendu ce travail possible.

A Pauline, Cyril et leurs familles ainsi qu'à Claire, Éric, Victoria, Clara, Yohann, Charles : merci pour vos encouragements et vos sourires.

A Louisette : Mila Esker !

A Janine, Michel, Cécile et Gavino : merci de votre aide et de vos encouragements.

A mes Parents et mon frère merci de votre soutien indéfectible.

A Isabelle, merci pour la patience, l'aide, le soutien et l'Amour quotidien, merci pour Georges.

A Georges, merci pour la Joie que tu répands.

Abréviations :

3NT	3 nitrotyrosine
AAV	Adeno-associated virus
ATP	Adénosine Triphosphate
AVCi	Accident vasculaire cérébral ischémique
CCTIRS	Comité consultatif sur le traitement de l'information en matière de recherche scientifique
CD	Cluster de differenciation
CHO	Chinese Hamster Ovary = ovaire de hamster chinois
CLN	Céroïdes lipofuscinoses neuronales
CMH-I/II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I/II
CNIL	Commission Nationale Informatique et Libertés
COX2	Cyclooxygenase 2
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
CPP	Comité de Protection des Personnes
CRIM	Cross-Reactive Immunological Material
CyTOF	Cytometry by Time of Flight = Mass cytometry
DAMPs	Danger-associated molecular patterns
eGFR	Débit de filtration glomérulaire estimé
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
Gb3 = CD77	Globotriaosylcéramide
GLA	Alpha-galactosidase A
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule 1
Ig	Immunoglobuline
IL-(1-17)	Interleukine (1-17)
iNKT	Cellule invariant Natural killer
IRM	Imagerie par résonnance magnétique
LPS	Lipopolysacharide
LysoGb3	Globotriaosylsphingosine
M6P	Mannose 6 Phosphate
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease Study
MPS	Mucopolysaccharidoses
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
MSSI	Mainz Severity Score Index
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MyD88	Myeloid-Differentiation-primary-response-88
NAGA	α-N-acetylgalactosaminidase = alpha-galactosidase B
NFkB	Nuclear factor-kappa-B
NK	Cellule Natural killer
NKT	Cellule natural killer T
NLRP (1-5)	Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (1-5)
NO	Oxyde nitrique

PAI-1	Activateur du plasminogène 1
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PNDS	Protocole national de diagnostic et de soins
PRR	Pattern recognition receptors
ROS	Reactive oxygen species
S1P	Sphingosine-1-phosphate
S1PR1-5	Récepteurs du S1P (1 - 5)
TCR	Récepteur des lymphocytes T
TGFb	Transforming Growth Factor beta
Th	T-helper
TLR	Toll-like-receptor
TNF-alpha	Tumor Necrosis Factor alpha
UPLC	Ultra Performance Liquid chromatography
VCAM	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Sommaire

Remerciements 2
Abréviations 3
Sommaire 5
Avant-propos 6
Introduction 7
La maladie de Fabry, une maladie lysosomale 7
Le lysosome et les maladies de surcharge lysosomales 7
Métabolisme des glycosphingolipides 9
Aspects génétiques et biochimiques 10
Manifestations cliniques et distinction phénotypique 11
Marqueurs spécifiques 18
Critères actuels de diagnostic 20
Epidémiologie 23
Traitement(s) 24
Physiopathologie et Inflammation 30
Physiopathologie de la vasculopathie Fabry 30
Stress oxydatif 31
Cytokines pro-inflammatoires 32
Implication du TLR4 32
CD1d et cellules natural killer T. 34
Un rôle pour l'inflammasome ? 36
Limites de l'enzymothérapie et immunité adaptative : anticorps anti-agalsidase 37
Objectifs 42
Résultats 43
Travail préliminaire : constitution de la base FFABRY 44
Problématique n°1 : « Deep characterization of the anti-drug antibodies developed in Fabry disease patients, a prospective analysis from the French multicenter cohort FFABRY. » 46
Problématique n°2 : « Deep immune profiling of PBMCs in Fabry disease » 70
Problématique n°3 : « Sphingosine-1-phosphate discriminates classic and non classic phenotype in Fabry disease » 102
Discussion et perspectives 116
Réponse immunitaire développée à l'encontre de l'enzymothérapie substitutive 116
Réponse humorale & anticorps anti-agalsidase 116
Réponse cellulaire 117
Réponse immune contre l'enzymothérapie et perspectives thérapeutiques 118
Phénomènes inflammatoires observés chez les patients non traités 118
Balance Sphingosine-1-phosphate / lysoGb3 en fonction des phénotypes 118
Phénotype lymphocytaire T immature 120
Diminution des lymphocytes B 121
Activation monocytaire 121
Implication des CD1d et iNKT 121
Inflammasome 122
Conclusion 123
Références 124
Table des illustrations 139
Table des tableaux 140

Avant-propos

La maladie de Fabry (OMIM #301 500) est une maladie génétique rare (gène *GLA*, Xq22.1 300644) liée à un déficit enzymatique en alpha-galactosidase A lysosomale. Les symptômes sont variés associant entre autres douleur, insuffisance rénale, cardiopathie hypertrophique et accidents vasculaires cérébraux précoces et impactent la qualité et l'espérance de vie des patients (1,2). Des traitements spécifiques sont disponibles avec deux enzymothérapies substitutives depuis 2001 et plus récemment une molécule chaperonne depuis 2017. Une partie des patients semble en tirer bénéfice, néanmoins ces traitements très onéreux semblent moins efficaces. La compréhension de la physiopathologie de la maladie de Fabry reste à ce jour lacunaire, comme l'est aussi celle des mécanismes impliqués dans l'inefficacité de l'enzymothérapie substitutive. Afin de mieux appréhender les limites des traitements actuels, nous avons cherché à mettre en évidence les mécanismes inflammatoires impliqués dans la physiopathologie de la maladie et la réponse au traitement par enzymothérapie substitutive.

Introduction

La maladie de Fabry, une maladie lysosomale

Le lysosome et les maladies de surcharge lysosomales

Le lysosome est un organite découvert par Christian de Duve en 1955 que l'on sait aujourd'hui présent chez tous les mammifères, dans toutes les cellules à l'exception des globules rouges, indispensable au cycle cellulaire dans son ensemble mais particulièrement impliqué dans les phénomènes de phagocytose, de présentation antigénique et d'autophagie (3). Limité par une membrane, le lysosome est capable de digérer la plupart des macromolécules cellulaires grâce aux hydrolases acides - plus d'une cinquantaine - qu'il contient (glycosidases, peptidases, protéases, phosphatases, nucléases, sulfatases, lipases). Ces enzymes rejoignent le lysosome grâce à des signaux d'adressage particuliers acquis au sein de l'appareil de Golgi : les résidus mannose-6-phosphate (M6P), reconnus par des récepteurs spécifiques (M6P récepteurs) au niveau de la membrane lysosomale. Le lysosome est indissociable du cycle d'endocytose : c'est la maturation de vésicules d'endocytose en endosomes précoces puis tardifs qui aboutit au lysosome qui par la fusion avec des autophagosomes devient ensuite un autolysosome capable de retourner au stade lysosome (figure 1). C'est l'acidification progressive du complexe lysosomal par l'intermédiaire de pompes H^+ ATPase membranaires qui permet la libération des complexes M6P-récepteurs/hydrolases, l'activation des enzymes et la maturation du complexe. En plus des hydrolases acides, 50 protéines matricielles et 20 protéines de membrane ont été identifiées (3). Un déficit quantitatif ou qualitatif en hydrolase ou n'importe quelle interruption du cycle peut engendrer une maladie de surcharge lysosomale caractérisée par l'accumulation intralysosomale de substrats plus ou moins spécifiques pouvant perturber l'homéostasie cellulaire. Plus d'une cinquantaine de maladies de surcharge lysosomales ont été décrites, classiquement classées en fonction de la nature du substrat en excès (tableau 1).

Tableau 1. Maladies de surcharge lysosomales (liste non exhaustive)

Lipidoses : Austin, Fabry, Farber, Gaucher (type I, II et III), Gangliosidose à GM1(Landing), Krabbe, Leucodystrophie Métachromatique, Sandhoff, Niemann - Pick (A/B et C), Schindler-Kanzaki, Tay-Sachs, Wolman, Maladies de surcharge en esters de cholestérol
Glycogénoses : Maladie de Pompe (glycogénose de type 2), Maladie de Danon (déficit en LAMP2)
Oligosaccharidoses et Glycoprotéinoses : Aspartylglucosaminurie, Fucosidose, Mannosidoses alpha et bêta, Mucolipidose type II (I Cell), Mucolipidose type III (Pseudo Hurler), Mucolipidose type IV, Sialidoses, Galactosialidoses
Mucopolysaccharidoses (MPS) : MPS I (Hurler, Hurler-Scheie, Scheie), MPS II (Hunter), MPS III (Sanfilippo A, B, C et D), MPS IV (Morquio A et B), MPS VI (Maroteaux-Lamy), MPS VII (Sly), MPS IX
Céroïde lipofuscinoses neuronales - CLN type 1 à 10

Métabolisme des glycosphingolipides

La maladie de Fabry appartient aux maladies de surcharge lysosomale en glycosphingolipides ou glycosphingolipidoses. Les sphingolipides sont des lipides complexes qui participent à la structure des membranes plasmiques. Ils ont une structure de base commune avec une base sphingoïde (amine aliphatique à longue chaine) et sont appelés céramide après acylation avec un acide gras. Ils sont spécifiques des différents types et stades de différenciation cellulaire. On retrouve ainsi par exemple les gangliosides au sein des membranes plasmiques des neurones, les galactosylcéramide et sulfatides au niveau de la myéline et des reins, les globosides au sein des organes viscéraux ou encore les céramides à très longues chaines d'acides gras et glucosylcéramides à très longues chaines d'acyl gras au niveau des kératinocytes et spermatozoïdes (3). La synthèse de novo des différents glycosphingolipides débute par la synthèse de la céramide dans le réticulum endoplasmique avant une cascade de glycosylations. Mais 50 à 90% de la synthèse des glycosphingolipides ne passe pas par la voie de novo mais passe par le recyclage des structures de base préalablement hydrolysées dans le lysosome (figure 2). La maladie de Fabry se caractérise par un déficit en alpha-galactosidase A, enzyme chargée de la dégradation des résidus alpha-D-galactosyl sur les glycoprotéines et glycolipides. Le déficit limite ainsi principalement l'hydrolyse du globotriaosylcéramide (Gb3 aussi référencé comme CD77) en lactosylcéramide mais aussi celle du digalactosylcéramide en galactosylcéramide.

Le Gb3 est retrouvé dans de nombreux tissus en l'absence de maladie de Fabry, notamment au niveau des cellules endothéliales capillaires, des tubes contournés proximaux rénaux, des cellules épithéliales gastro-intestinales, des spermatogonies et cellules de Leydig, des pneumocytes de type II et de l'épithélium ovarien (5, figure 3). Au niveau des ganglions lymphatiques, le Gb3 discrimine une population de cellules B du centre germinatif (4,5). Au niveau du radeau lipidique des lymphocytes B, le Gb3 est impliqué dans l'endocytose et le transport intranucléaire du CD19 auquel il se lie (5), par le même mécanisme, il joue le rôle de récepteur aux vérotoxines et participe ainsi à leur pouvoir pathogène dans les tissus cibles (6). Enfin, le Gb3 correspond aussi à l'antigène P^k du système P1PK du groupe sanguin.

Au cours de la maladie de Fabry, on retrouve un excès de Gb3 au niveau de toutes les structures rénales et cardiaques ainsi que dans les différentes couches de la surrénale à l'exception de la fasciculée. Au niveau cérébral, le Gb3 est retrouvé au niveau des méninges et des vaisseaux cérébraux mais uniquement au sein des gyri parahippocampiques parmi les structures neuronales (7). Cet excès de Gb3 ne se traduit pas seulement par une accumulation

intralysosomale, en effet on retrouve un excès du substrat dans le réticulum endoplasmique, la membrane plasmique elle-même ou encore le noyau (7).

Aspects génétiques et biochimiques

L'activité alpha-galactosidase est supportée par 2 isoenzymes A et B. L'alpha-galactosidase A, déficitaire dans la maladie de Fabry est responsable de la majeure partie de l'activité. L'alpha-galactosidase B (ou α-N-acetylgalactosaminidase = NAGA) est responsable d'une activité résiduelle. La maladie de Schindler, caractérisée par un lymphœdème, une épilepsie et un déficit cognitif, est liée à un déficit en NAGA. L'alpha-galactosidase A et la NAGA ont entre 46,2 et 62,7 % d'homologie en termes de séquence protéique (8). L'activité de l'alpha-galactosidase A est classiquement mesurée dans le plasma et les leucocytes en utilisant le 4-methylumbelliferyl-α-D-galactopyranoside, substrat synthétique dont l'hydrolyse par l'alpha-galactosidase libère de la methylumbelliferone fluorescente. Il est d'usage d'ajouter de la α-*N*-acetylgalactosamine pour inhiber la NAGA lors de la réaction (9).
L'alpha-galactosidase A est une glycoprotéine synthétisée sous la forme d'un précurseur de 50kDa qui mature au gré de son transport vers le lysosome (M6P dépendant) où son poids final est de 46kDa. Son activité nécessite une homodimérisation, la présence de saposin B et un pH acide (optimum entre 3,8 et 4,6) (9).
Le déficit en alpha-galactosidase A a été reconnu responsable de la symptomatologie de Fabry en 1967 par l'équipe de R.O. Brady (10). La localisation exacte du gène *GLA* au niveau du bras court du chromosome X en position 22.1 a été identifiée une dizaine d'années plus tard (11). La partie codante du gène *GLA* consiste en une séquence de 1290 paires de bases, divisées en 7 exons. Aujourd'hui, plus de 800 mutations de *GLA* pathogènes ont été décrites, de tous types et affectant tous les exons sans hot-spot mutationnel individualisé (12,13). A partir de données cristallographiques, les mutations faux-sens ont été classées en 3 catégories : la première regroupe les mutations affectant le site actif lui-même ou modifiant sa structure tridimensionnelle, la deuxième regroupe les mutations distantes du site actif mais à l'origine d'anomalie de repliement (*misfolding*) engendrant une instabilité protéique, la troisième regroupe les autres mutations ayant néanmoins un pouvoir délétère sur l'activité catabolique de l'enzyme (14). Les mutations faux-sens peuvent également être regroupées en fonction du phénotype clinique attendu : sévère classique ou moins sévère non-classique. Ainsi, les mutations engendrant des modifications structurelles des régions importantes, à l'origine d'une dysfonction ou d'une instabilité majeure, sont intuitivement rattachées au

phénotype classique. Les mutations reliées aux phénotypes moins sévères étant localisées à distance du site actif engendrent des modifications structurelles mineures n'affectant que peu voire pas les caractéristiques pharmacocinétiques de l'enzyme et conservant une activité résiduelle mais sont à l'origine d'une instabilité post traductionnelle et d'une destruction rapide de l'enzyme *in vivo* (15).

La localisation sur le chromosome X rend les hommes hémizygotes porteurs de mutation sévère, nécessairement symptomatiques. L'expression de la maladie chez les femmes dépend quant à elle du degré d'inactivation de l'X sauvage au niveau des différents tissus (16). Les femmes ont donc une expression mosaïque avec un risque théorique d'inactivation de l'X à l'échelle cellulaire égal à ½ et qui suit une loi normale centrée sur 1/2 à l'échelle tissulaire et globale (16). Une inactivation équilibrée s'accompagne néanmoins de symptômes, la production mosaïque en alpha-galactosidase des cellules à l'X sauvage ne suffit pas à corriger les anomalies. Cette absence de correction est interprétée comme un défaut quantitatif avec une sécrétion insuffisante ou un défaut d'adressage auprès des cellules adjacentes à l'X muté (16). On peut vraisemblablement ajouter à la physiopathologie l'absence de correction d'un possible *misfolding* protéique et du stress oxydatif secondaire existant dans les cellules à l'X muté.

Manifestations cliniques et distinction phénotypique

Atteinte dermatologique

En 1898, Johannes Fabry et William Anderson décrivaient indépendamment les angiokératomes, caractéristiques dermatologiques de la maladie qui gardera leur nom (18, figure 4). L'angiokératome est classiquement décrit comme une « dilatation vasculaire (…) dont la surface est kératosique à la palpation, se vidant en grande partie lors de la vitro-pression » (18). Outre leurs localisations typiques au niveau du siège, du scrotum et de la racine des membres inférieurs, ils peuvent être retrouvés au niveau du tronc, des doigts et des muqueuses (18). Ces localisations délicates peuvent être source de faux-négatifs, tandis que de nombreux faux-positifs peuvent être comptabilisés lorsque des télangiectasies, tâches rubis ou angiomes sont retrouvés chez des patients avec une mutation Fabry connue. Les angiokératomes ne sont d'ailleurs pas pathognomoniques de la maladie de Fabry puisque retrouvés au cours d'autres maladies lysosomales telles que la fucosidose, la maladie de Schindler-Kanzaki, l'α-mannosidose, l'aspartylglucosaminurie ou la galactosialidose (19), mais également au cours d'autres situations pathologiques : angiokératome solitaire post-

traumatique, angiokératomes scrotaux bénins de Fordyce ou angiokératomes acraux de Mibelli (18,20).
Les angiokératomes ne sont pas les seules manifestations dermatologiques observées au cours de la maladie de Fabry, on retrouve également de façon très inconstante un lymphœdème et des télangiectasies (21).

Atteinte rénale

L'atteinte rénale de la maladie de Fabry se rapproche de la néphropathie diabétique et les patients avec un phénotype classique non traités développent une insuffisance rénale terminale autour de 50 ans (22). Elle était ainsi la principale cause de mortalité de la maladie de Fabry avant l'ère de la dialyse et de la greffe rénale (2,23).
L'atteinte rénale est progressive au gré de l'accumulation de Gb3 notamment dans les podocytes. Elle fait se succéder une protéinurie qui témoigne d'une agression podocytaire, puis une podocyturie et une sclérose segmentaire, avant une détérioration progressive du débit de filtration glomérulaire jusqu'à l'insuffisance rénale terminale (24). Mais les lésions ne sont pas uniquement glomérulaires et l'accumulation de Gb3 se voit également au sein des cellules tubulaires, des cellules endothéliales et des cellules interstitielles. Finalement, les biopsies témoignent de l'atteinte rénale diffuse en retrouvant une glomérulosclérose avec un épaississement des parois des capillaires, une atrophie tubulaire, de la fibrose interstitielle et de la sclérose artérielle et artériolaire (22).

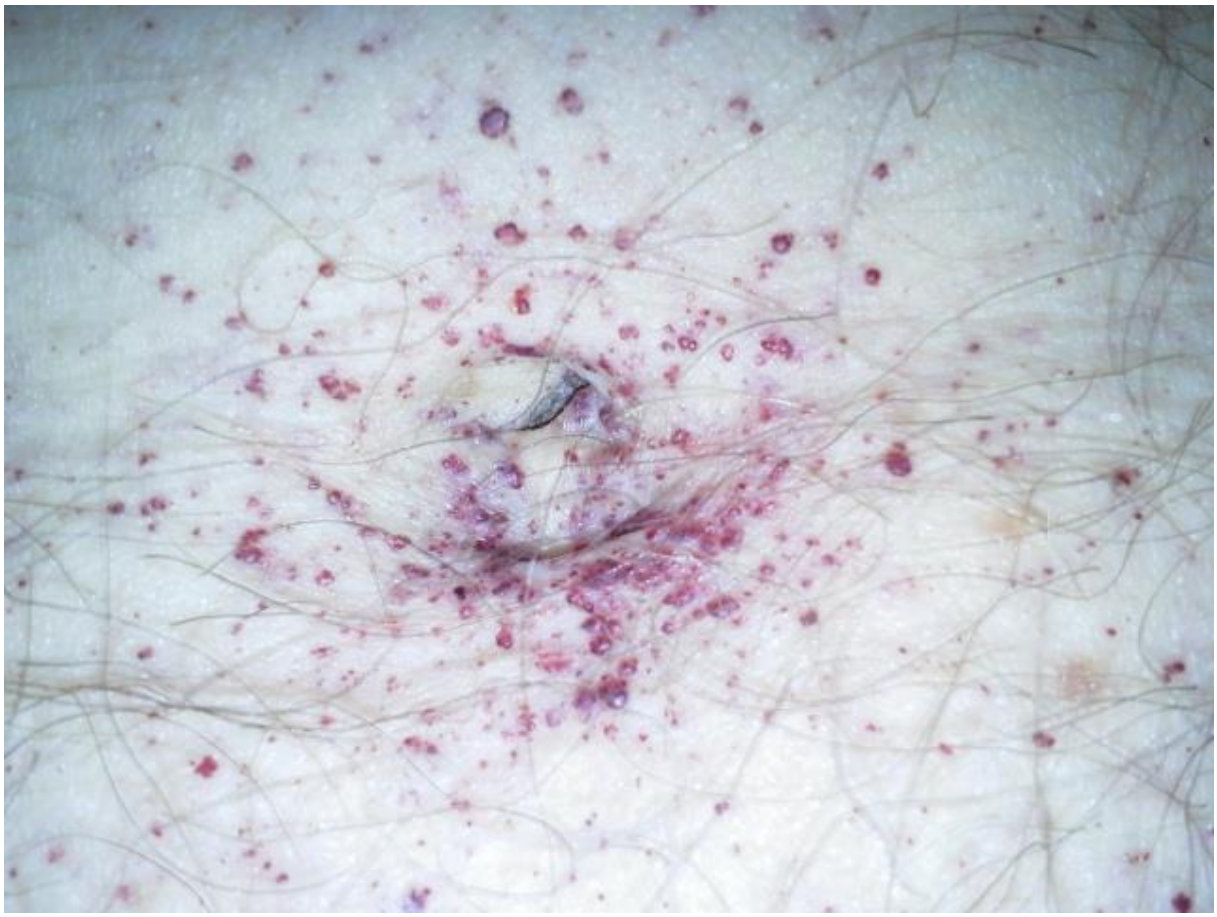


Figure 1. Angiokératomes péri-ombilicaux chez un patient atteint de maladie de Fabry, phénotype classique (remerciements au Dr O.Lidove)

Atteinte cardio-vasculaire

L'atteinte cardiaque se caractérise par une cardiopathie hypertrophique. La séquence pathologique fait se succéder hypertrophie septale isolée puis hypertrophie ventriculaire gauche concentrique prédominant sur le mur postéro-latéral, fibrose intramurale basale et postéro-latérale et enfin arythmie et troubles de la conduction avec un risque élevé de mort subite. Néanmoins, les troubles électriques observés – troubles du rythme comme troubles de la conduction de tous types – ne sont pas directement liés à l'hypertrophie mais à une atteinte spécifique et possiblement indépendante du faisceau de His. Si l'excès de glycolipides au sein du tissu de conduction est responsable d'un allongement de la période réfractaire et d'une instabilité électrique à l'origine des troubles du rythme (25), des mécanismes inflammatoires locaux semblent aussi impliqués dans la destruction du système nerveux sympathique cardiaque et la fibrose, indépendamment du degré d'hypertrophie (26–29).

L'atteinte cardiaque peut être le seul symptôme de la maladie de Fabry, caractérisant le phénotype non classique ou phénotype cardiaque. Ces formes, associées à des mutations particulières sont de plus en plus souvent diagnostiquées et représentent aujourd'hui la majorité des nouveaux diagnostics (30).

Aujourd'hui, c'est la cardiopathie qui fait le pronostic de la maladie et qui est responsable de la mortalité prématurée représentant 62% des causes de décès (1,2,31).

Atteinte neurologique périphérique

Les acroparésthesies sont des douleurs intenses des extrémités qui surviennent dès l'enfance. Elles rentrent dans le cadre nosologique des neuropathies des petites fibres et sont une des manifestations les plus étudiées. Il est aujourd'hui certain que l'atteinte des fibres C et Aδ est à l'origine des douleurs latentes alors que les ganglions de la racine dorsale, affectés par des dépôts de Gb3 seraient responsables d'élancements douloureux. Sur le plan physiopathologique, les fibres nociceptives seraient dans un état d'hyperexcitabilité secondaire à une suractivation de différents canaux ioniques ($Na_v1.8$ et TRPV1) et/ou à un influx calcique induit par le lysoGb3 en excès (32).

En plus de ces douleurs, on observe également des troubles de la sudation avec hypo voire anhidrose ou au contraire hyperhidrose toujours en lien avec une atteinte des petites fibres.

Atteinte neurologique centrale

Les registres ont identifié de 7 à 25% d'accident vasculaire ischémique (AVCi) chez les hommes et 4 à 21% chez les femmes Fabry (2,33). Ainsi, la maladie de Fabry est souvent évoquée comme cause d'AVCi du sujet de moins de 60 ans. Pourtant, les études de cohorte d'AVCi ne retrouvent que 0,9 à 3% de maladie de Fabry dans cette population (34–36). On retrouve néanmoins parfois des malformations vasculaires à type de dolichoectasie du tronc basilaire et des artères cérébrales postérieures (40, figure 5). Hormis les AVCi, on observe également des anomalies à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) avec une leucopathie vasculaire (38) et des hypersignaux T1 des pulvinars, associés à la sévérité de l'atteinte cardiaque et rénale (39), ces lésions sont asymptomatiques, bien qu'à terme des troubles cognitifs et psychomoteurs aient clairement été identifiés avec la suspicion de phénomènes dégénératifs (43, figure 5). De façon plus anecdotique des cas de méningites aseptiques ont été décrits sans que la physiopathologie n'en soit élucidée (41).

Atteinte ORL

La maladie de Fabry affecte la cochlée avec une hypoacousie notée chez 61,2% des hommes et 41,7% des femmes et des acouphènes présents chez 51,3% des hommes et 34,1% des femmes de la cohorte française (données personnelles). Près de 10% des hommes et 4% des femmes sont d'ailleurs appareillés (données personnelles). Dans la littérature, la prévalence de l'hypoacousie est estimée entre 16,7 à 85,5% chez les hommes de plus de 50 ans, 75% chez les femmes (42–44). Des acouphènes ont été retrouvés chez 27 à 50% des hommes de plus de 50 ans et des femmes de plus de 60 ans (42,44). Une atteinte vestibulaire est également observée chez 17,5 et 30% des patients avec des vertiges périphériques (45,46).
Malgré ces prévalences importantes, les mécanismes physiopathologiques n'ont pas été étudiés. Seule chose connue, l'atteinte cochléo-vestibulaire est neurosensorielle, sans lien avec une atteinte du nerf VIII, mais possiblement liée à une atteinte vasculaire (47) et/ou à une atteinte des petites fibres locales (45).

Atteinte ophtalmologique

Sur le plan ophtalmologique, on retrouve une atteinte cornéenne précoce associée au phénotype classique en faisant ainsi un facteur pronostique de sévérité de grand intérêt: la

cornée verticillée, lésion asymptomatique et uniquement révélée par un examen à la lampe à fente (51,52, figure 6). Des atteintes cristalliniennes avec développement d'une cataracte précoce avant 60 ans sont également classiquement décrites ainsi que des anomalies vasculaires avec des vaisseaux conjonctivaux et rétiniens tortueux (49).

Atteinte digestive

L'importance de l'atteinte digestive chez les patients Fabry est croissante. On observe ainsi des troubles fonctionnels intestinaux aspécifiques associant troubles du transit et symptomatologie douloureuse d'origine multifactorielle : vasculaire, neuropathique dysautonomique par atteinte des petites fibres locales et des plexus de Meisner et Auerbach mais également par une infiltration directe des cellules musculaires lisses intestinales (50).

Atteinte pulmonaire

Une atteinte pulmonaire avec des troubles ventilatoires obstructives pouvant mimer un asthme est observée chez 32 à 46% des hommes. L'hypothèse physiopathologique actuelle est celle d'un épaississement des cellules péribronchiques et péribronchiolaires secondaires à l'accumulation de glycosphingolipides (51). Cette hypothèse n'a pas été vérifiée, aucune étude histologique n'ayant à ce jour été publiée.

Phénotypes cliniques : phénotypes classiques, non-classiques et féminins

Dès les années 1950, les principales caractéristiques sémiologiques étaient déjà décrites : la maladie s'observe principalement chez les hommes, fait se succéder trois stades avec dès l'enfance, la « phase critique » caractérisée par la présence d'acroparésthesies, l'apparition progressive d'angiokératomes et d'une protéinurie, suivie d'une « phase silencieuse » asymptomatique caractérisée par une protéinurie croissante, des troubles de la sudation, une hypertension artérielle et des épisodes œdémateux, enfin une « phase accélérée » caractérisée par une insuffisance rénale et ou cardiaque s'achevant par un décès dans la troisième ou quatrième décennie (52,53).

La sémiologie a évolué dans les années 1990 avec la différenciation chez les patients hommes d'un phénotype dit « classique », de phénotypes dits « atypiques » (54). La description du phénotype classique repose sur l'association de critère biochimique avec une activité enzymatique résiduelle en alpha-galactosidase A nulle et des critères cliniques tels que la présence d'angiokératomes, d'acroparésthesies, d'une hypohidrose, d'une atteinte cornéenne

et d'une atteinte rénale puis cardiaque. A l'opposé, le phénotype atypique ou non classique est caractérisé par une activité enzymatique abaissée en alpha-galactosidase mais non nulle, associée à l'atteinte d'un organe de façon isolée ou franchement dominante, principalement le cœur (54).

Jusque dans les années 2000, les femmes, hétérozygotes, étaient considérées comme n'ayant « pas de symptômes ou une maladie bénigne et une espérance de vie normale » bien que des descriptions cliniques aient été précocement et régulièrement rapportées. Il faut attendre la commercialisation des enzymothérapies substitutives pour que la sévérité potentielle de la maladie chez les femmes soit collégialement reconnue (53,55–58). Avant les années 2000, le diagnostic de la maladie est donc avant tout clinique et biochimique, reposant sur la mesure de l'activité résiduelle de l'alpha-galactosidase A.

Malgré ces distinctions phénotypiques connues et une différence évidente en termes de prise en charge et de morbi-mortalité, aucune publication ne faisait état des phénotypes lors des descriptions de cohorte avant 2000. En l'absence de mention du phénotype, les études historiques évoquent ainsi une espérance de vie diminuée, estimée à 58,2 ans chez les hommes et 75,4 ans chez les femmes (1). Le pronostic de la maladie de Fabry était alors sombre, tout du moins celui de la forme classique vraisemblablement surreprésentée alors.

Avec la mise à disposition d'un traitement par enzymothérapie substitutive au début des années 2000, l'idée d'une prise en charge précoce avant l'apparition des symptômes change le paradigme diagnostique. Les critères deviennent avant tout génétiques et l'identification de mutations du gène *GLA* suffit à poser un diagnostic.

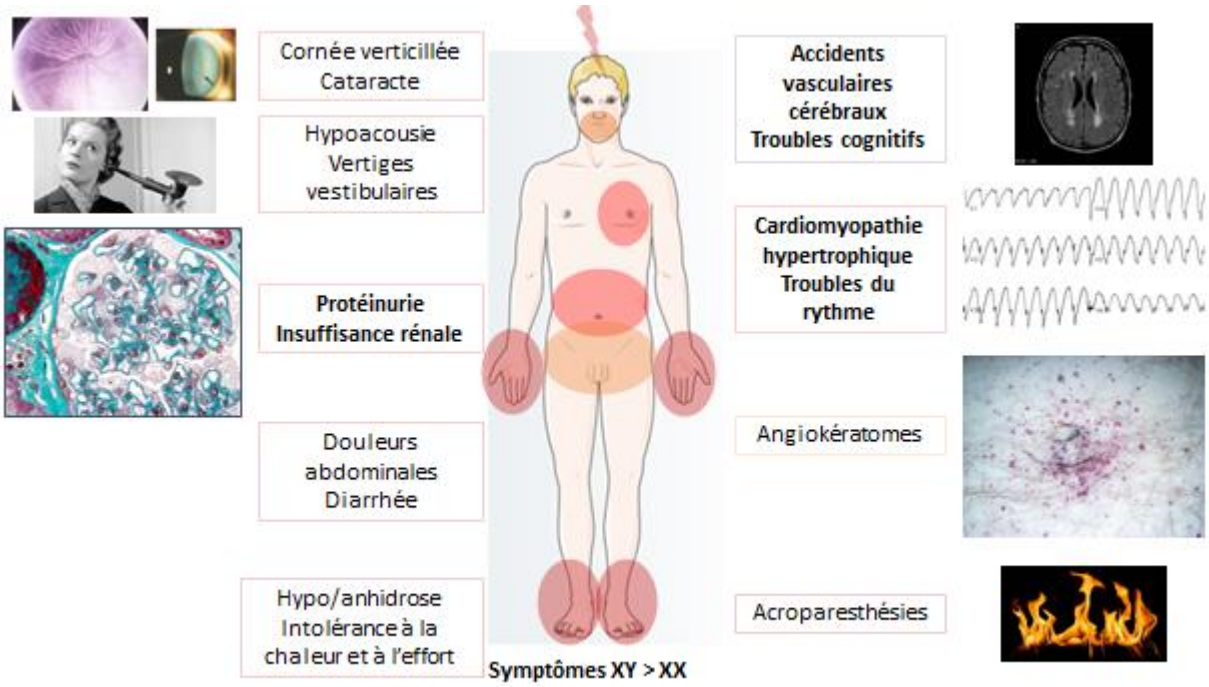


Figure 2. Principaux signes cliniques observés au cours de la maladie de Fabry

Marqueurs spécifiques

L'intérêt de marqueurs aspécifiques correspondant aux différentes atteintes d'organes observées au cours de la maladie de Fabry a été démontré : créatinine plasmatique, protéinurie, albuminurie, beta-2-microglobulinurie pour l'atteinte rénale, troponine pour l'atteinte cardiaque, 3-nitrotyrosine pour l'atteinte vasculaire (59–61). Ces marqueurs ne reflètent pas la sévérité et l'activité globale de la maladie. Depuis de nombreuses années différentes équipes recherchent de tels biomarqueurs qui permettraient un meilleur suivi. Deux composés se détachent aujourd'hui très distinctement : le Gb3 et sa forme déacétylée la globotriaosylsphingosine ou lysoGb3.

Globotriaosylcéramide ou Gb3

Le Gb3 est le substrat principal de l'alpha-galactosidase A. Historiquement, les concentrations en Gb3 plasmatique, urinaire ou tissulaire ont servi de marqueurs diagnostiques de maladie de Fabry. Le Gb3 urinaire est plus élevé chez les patients au phénotype classique sans activité résiduelle détectable mais peut, a contrario, être normal chez certaines femmes hétérozygotes (62). La mesure du Gb3 urinaire sur le sédiment des urines de 24h a initialement servi de marqueur supposé d'activité de la maladie (59). Aucune étude n'a

pourtant mis en évidence son utilité clinique dans le suivi des patients. En effet, le Gb3 urinaire ne reflète pas nécessairement la charge en Gb3 plasmatique ni celle de l'organisme. Son origine supposée est multiple, provenant de la fuite urinaire pathologique des podocytes chargés de Gb3 mais également des cellules épithéliales tubulaires et du tube collecteur (59,63). Aussi aucune corrélation entre Gb3 urinaire et atteinte rénale n'était observée chez des patients ayant pourtant la même mutation (59). Une étude récente a évalué l'intérêt de la discrimination des différentes isoformes du Gb3 dans les urines, le plasma, les leucocytes totaux, les monocytes et les lymphocytes B par chromatographie en phase liquide à haute pression *ultra performance* (Ultra performance liquid chromatography : UPLC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS/MS). Le résultat principal était la distribution constante des différentes isoformes entre patients et contrôles sains quel que soit le traitement. Aussi, seul le contenu global dans les urines permettait de discriminer de façon significative patients traités ou non et contrôles sains (64). La même équipe suggère ainsi d'ajouter le dosage du galabiosylcéramide, autre substrat de l'alpha-galactosidase A, par UPLC-MS/MS pour l'interprétation des dosages de Gb3 (65). Néanmoins, ce manque de corrélation entre Gb3 et clinique a entrainé son abandon progressif en dehors de la phase diagnostique (59,66).

Globotriaosylsphingosine ou lysoGb3

En 2008 un nouveau marqueur est décrit qui a pris depuis le pas sur le Gb3 : la globotriaosylsphingosine, forme déacétylée du Gb3 ou lysoGb3, dont l'origine est encore peu claire, de structure amphiphile mais dont un large résidu sucre le rend relativement hydrophile et soluble dans l'eau (67). L'alpha-galactosidase A est capable d'hydrolyser le lysoGb3 comme le Gb3 mais de façon 50 fois moins efficace (67). Sa concentration plasmatique mesurée par UPLC-MS/MS est significativement plus élevée chez les patients atteints de maladie de Fabry que chez les contrôles, plus élevée chez les patients de phénotype classique que chez les non-classiques, plus élevée chez les hommes que chez les femmes mais elle décroit sous traitement et est corrélée avec la sévérité de la maladie puisque indépendamment associée à la créatinine et à l'existence d'une cardiopathie hypertrophique dans un modèle multivarié (67,68). Chez les patients de phénotype non-classique spécifiquement, le taux de lyso-Gb3 est corrélé à la masse ventriculaire gauche (69). De façon intéressante, le lysoGb3, mais pas le Gb3, entraine une prolifération des cellules musculaires lisses suggérant un rôle pathogénique dans le remodelage vasculaire observé au cours de la maladie de Fabry (67).

Critères actuels de diagnostic

Depuis la mise à disposition de l'enzymothérapie substitutive, le diagnostic se veut pré-symptomatique et génétique avant tout. Une problématique nouvelle émerge : la significativité des nombreux *variants* du gène *GLA* – séquence génétique non majoritaire dans les bases de données - de pathogénicité indéterminée qui sont alors mis en évidence.

A ce jour, plus de 800 variants *GLA* ont été associés à la maladie de Fabry avec des phénotypes cliniques divers (12). Les mutations sévères (non-sens, décalages du cadre de lecture ou délétions) sont en général responsables d'une activité enzymatique résiduelle nulle et d'un phénotype classique/sévère chez les hommes (58). Les phénotypes associés aux mutations faux-sens sont plus hétérogènes et l'activité enzymatique résiduelle reste d'une aide potentielle dans ces considérations pronostiques (58).

Finalement, chez les hommes, en présence d'un variant formellement associé à une maladie de Fabry, le diagnostic est aisé. Lorsque le variant *GLA* n'est pas répertorié, en présence d'un ou de plusieurs signes classiques de la maladie que sont les acroparésthesies, la cornée verticillée ou les angiokératomes, la présence du variant du gène *GLA* associée à une activité enzymatique intraleucocytaire diminuée (<5% par rapport à la moyenne de contrôles non atteints) signent une maladie de Fabry. En l'absence de ces signes typiques, le variant en question doit être accompagné de signes caractéristiques d'atteinte d'organe associée à la maladie de Fabry (présence de surcharge en Gb3 sur biopsie rénale ou endomyocardique, critères d'IRM cardiaque (70,71)) ou doit avoir été identifié chez un apparenté atteint de la maladie avec certitude (en respectant la filiation liée à l'X de la mutation).

Chez les femmes, la démarche diagnostique est superposable, à l'exception de la possible normalité de l'activité enzymatique, des concentrations en biomarqueurs et de la possible absence de signe classique (figure 4). Ces éléments, comme les atteintes d'organes, sont en effet dépendants du degré d'inactivation variable de l'X dans les tissus concernés plus que du type de mutation (16). En l'absence d'une mutation formellement étiquetée pathogène et de ces signes classiques, le diagnostic peut donc être difficile et nécessite formellement la recherche d'antécédents familiaux ou des preuves histologiques (biopsie rénale ou endomyocardique).

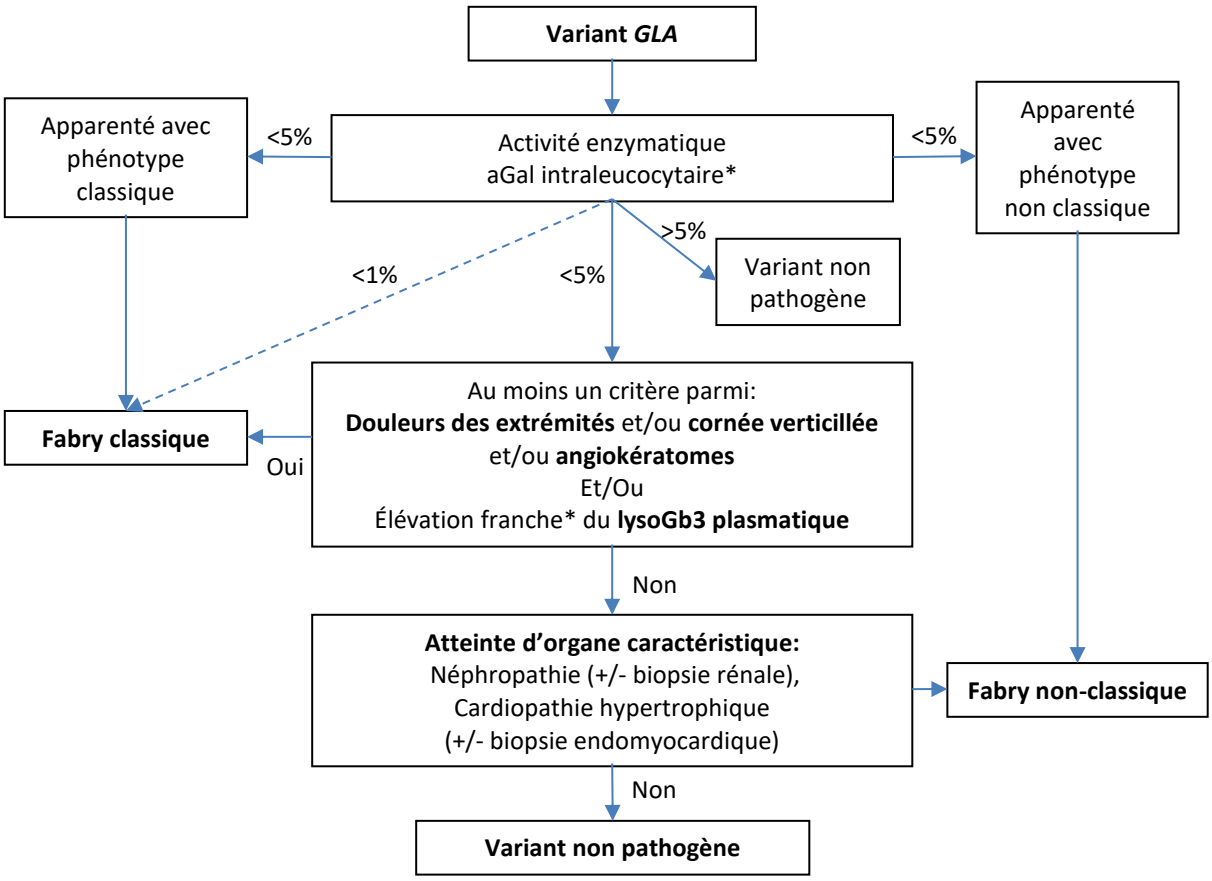


Figure 3. Algorithme de diagnostic chez l'homme (agal : alpha-galactosidase a ; *par rapport aux standards internes des differents laboratoires chez les individus non-atteints)

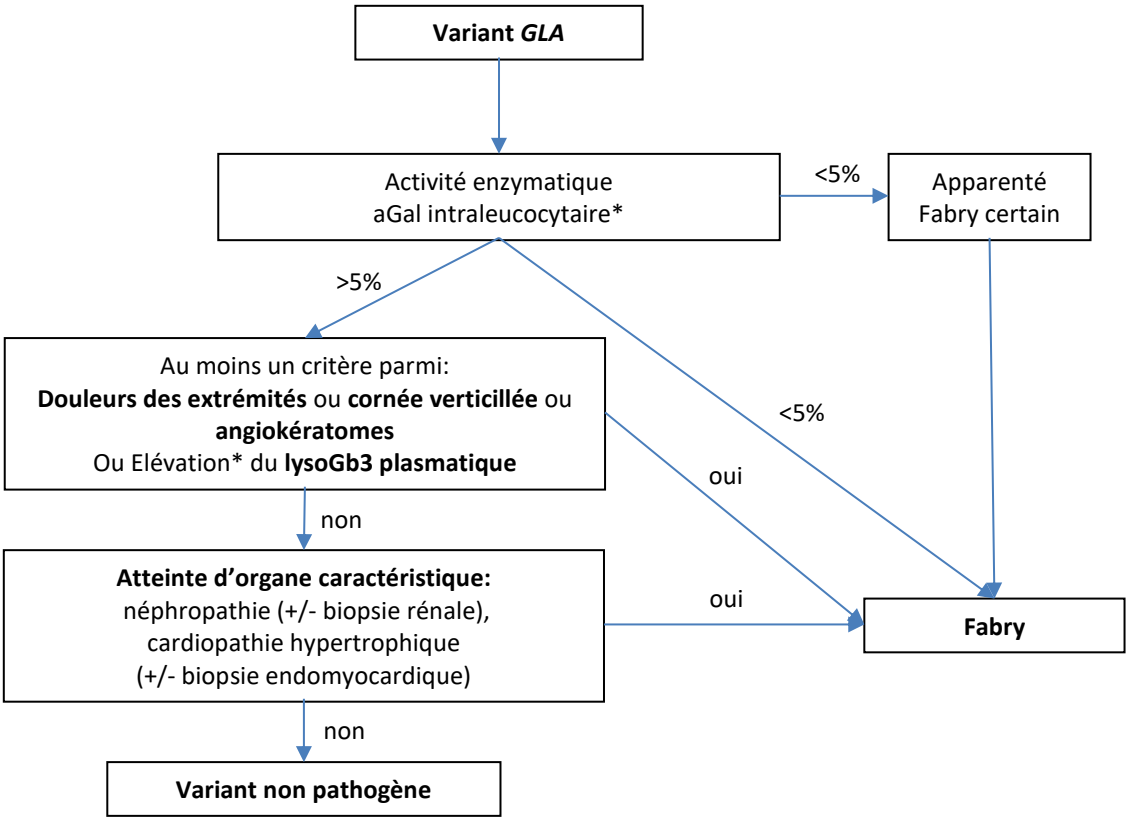


Figure 4. Algorithme consensuel de diagnostic chez la femme (aGal : alpha-galactosidase A ; * fonction des standards internes des différents laboratoires d'analyse).

Epidémiologie

La maladie de Fabry est une maladie rare dont l'épidémiologie dépend nécessairement des critères diagnostiques utilisés : cliniques, biochimiques et/ou génétiques. Une étude australienne rétrospective utilisant les données de l'ensemble des dosages enzymatiques réalisés entre 1980 et 1996 retrouvait une incidence de 1/117 000 naissances vivantes (72). A l'opposé, une étude italienne de dépistage néonatal systématique utilisant des tests enzymatiques et génétiques retrouvait une incidence de 1/4 600 naissances en 2006, chiffre qui modifiait radicalement le regard porté sur la maladie de Fabry, alors accueilli avec une certaine perplexité (30). Dans cette étude, le rapport phénotype classique / non classique (extrapolé à partir des mutations) était évalué à 1/7. Néanmoins, dans une étude de dépistage néonatal américaine étudiant les échantillons sanguins sur buvard de 219 973 nouveau-nés dans l'Illinois dans les années 2010, la maladie de Fabry s'avérait être la maladie lysosomale la plus fréquente avec une incidence de 1/8 454 en incluant toutefois une mutation (A143T) dont la pathogénicité est encore débattue (73). Le même protocole dans le Missouri retrouvait une incidence de 1/3 277 (74). Ainsi, la maladie de Fabry semble être au-moins dix fois plus fréquente qu'initialement estimée, néanmoins, les diagnostics réalisés entre 1980 et 1996 étaient fondés sur des arguments cliniques, tandis que le dépistage néonatal systématique semble identifier une majorité de formes peu sévères à début tardif (30,73). Il se pourrait ainsi que nombre de patients atteints de cardiopathie hypertrophique isolée « idiopathique » soient atteints de maladie de Fabry.

Traitement(s)

Principes généraux de la prise en charge thérapeutique

La prise en charge de la maladie de Fabry s'organise autour de 3 grands axes : la prévention individuelle et familiale, la prise en charge symptomatique et la prise en charge spécifique du déficit enzymatique. L'ensemble de cette prise en charge est reprise dans le protocole national de diagnostic et de soins (PNDS) consacré à la maladie de Fabry au titre de l'affection de longue durée n°17 (75).

Prévention

Comme dans la plupart des maladies génétiques dégénératives, la prévention passe à la fois par un diagnostic précoce, une surveillance adéquate et l'introduction de thérapeutiques visant à corriger ou retarder les atteintes d'organes. Le rôle du conseil génétique est primordial pour permettre le dépistage ciblé et précis de l'entourage des patients déjà diagnostiqués. Aujourd'hui le phénotype attendu d'un patient se réfère à celui de l'apparenté diagnostiqué, mais il est connu qu'au sein d'une même famille différents phénotypes s'expriment (76). Ceci est d'autant plus vrai chez les femmes où l'importance des atteintes est sous la dépendance du degré d'inactivation de l'X porteur du variant *GLA*. L'élaboration de scores pronostiques pourrait aider à la classification du risque et une prise en charge préventive (Cf. infra, (77)). En dehors des thérapeutiques spécifiques, aucune évaluation ni recommandation n'est à ce jour disponible quant à l'introduction précoce pré-symptomatique de traitements symptomatiques classiquement administrés lors d'atteintes d'organe telles qu'observées au cours de la maladie de Fabry (insuffisance rénale et inhibiteur de l'enzyme de conversion / antagoniste du système rénine angiotensine, troubles du rythme, prévention des AVC et antiagrégants plaquettaires ou anticoagulants, cardiopathie et statines, etc.).

Prise en charge symptomatique :

Qu'il s'agisse de la prise en charge des acroparésthesies (32), des douleurs abdominales, de l'atteinte rénale (78), cardio- ou cérébro-vasculaire, la prise en charge symptomatique ne diffère pas de celle des patients non atteints de maladie de Fabry. Les seules restrictions éventuelles concernent l'usage de l'amiodarone et de la chloroquine qui sont susceptibles d'atténuer l'efficacité d'une enzymothérapie substitutive concomitante par modification du pH lysosomal (79,80).

Traitements spécifiques

Depuis 2017, trois traitements spécifiques de la maladie de Fabry sont disponibles : 2 enzymothérapies substitutives et une molécule chaperonne.

Enzymothérapie substitutive : agalsidase alfa et beta

Depuis l'identification de l'enzyme défaillante, l'idée d'une enzymothérapie substitutive a émergé et les premiers essais ont été publiés en 1973 : l'enzyme de substitution provenait initialement de placenta humain (81), de greffe rénale (82) ou de figuier (83). Une vingtaine d'années auront été nécessaires à la production d'une enzymothérapie à l'échelle industrielle et sa validation pharmacologique (84,85).

Ainsi on dispose aujourd'hui de deux enzymothérapies substitutives administrées par voie intraveineuse tous les 14 jours : l'agalsidase alfa (Replagal®, Shire HGT®) ou l'agalsidase beta (Genzyme®, Sanofi-Genzyme®) qui disposent d'une autorisation de mise sur le marché depuis 2001 en Europe et sont ainsi devenues la pierre angulaire du traitement de la maladie de Fabry (85,86).

L'agalsidase alfa est produite par activation du gène *GLA* dans des lignées de cellules humaines avant purification par 5 étapes de chromatographie. L'enzyme finalement produite est la forme mature homodimérisée de 100kDa correspondant, composée de 2 sous unités de 398 acides aminés chacune. La forme purifiée à 99,5% est commercialisée dans un tampon de sodium-phosphate (pH 5,8-6,2) avec du polysorbate 20 et du NaCl 0,9% (86). Les études de phase I ont montré l'efficacité de l'enzyme sur la clairance du Gb3 dans les urines et le foie sans courbe dose-effet (84). Dans l'essai de phase III contrôlé contre placebo ayant permis l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché, le critère principal d'efficacité était la douleur sans néanmoins de prise en compte de nombreux antalgiques classiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les morphiniques (86). Le dosage validé par les autorités de santé est de 0,2mg/kg/14j. Mais aucun calcul de dose n'a été réalisé pour valider ce dosage puisque les essais préalables utilisaient des doses échelonnées entre 0,07 et 0,11mg/kg (87). L'agalsidase alfa n'est à ce jour pas commercialisée aux Etats-Unis.

L'agalsidase beta est produite par co-transfection de plasmides recombinants contenant l'ADNc codant pour l'alpha-galactosidase A humaine dans des cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO). Après une filtration et 4 étapes de purification en colonne de chromatographie, l'enzyme finalement produite est lyophilisée. Les excipients présents dans le produit final sont du mannitol, du phosphate de sodium et de l'eau pour injection. Après

une perfusion, l'élimination plasmatique a été mesurée entre 119 et 345 ml/min et la demi-vie d'élimination moyenne entre 80 et 120 minutes (EMA Fabrazyme). Trois doses 0,3 , 1 et 3mg/kg administrées tous les 2 ou 14j ont été étudiées en phase I pour conserver un schéma validé à 1mg/kg/14j dans les essais ultérieurs. La déplétion en Gb3 était pourtant dose-dépendante dans tous les tissus étudiés (88). Dans l'essai de phase III ayant conduit à la mise sur le marché du produit, le critère principal de jugement, atteint, n'était pas clinique mais histologique, à savoir la clairance du Gb3 de l'endothélium vasculaire sur des échantillons de biopsies rénales (85).

En dehors de quelques sites de glycosylations différents liés à leur mode de production différent - lignée cellulaire humaine pour l'agalsidase alfa et cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) pour agalsidase beta - ces deux molécules sont biochimiquement similaires (89,90). Finalement les deux traitements ont principalement été validés sur la clairance des dépôts intra-endothéliaux de Gb3 et l'amélioration de la douleur contre placebo (4,5,49). La plupart des études ultérieures n'étaient pas comparatives ou comparaient les cohortes actuelles traitées avec des cohortes historiques non traitées. Cette approche s'avérait doublement biaisée : non seulement les patients diagnostiqués aujourd'hui sont différents avec une prépondérance de phénotypes non-classiques mais encore on ne tenait pas compte des progrès réalisés en matière de traitements symptomatiques néphrologiques (anti-protéinuriques, antihypertenseurs) et cardio-vasculaires. Néanmoins une méta-analyse a récemment conclu en une incidence plus faible d'événements rénaux, cardio- et cérébro-vasculaires sous agalsidase beta en comparaison à un placebo (92). Cette même méta-analyse faisait état d'un risque d'événement cérébro-vasculaire plus faible sous agalsidase beta comparée à agalsidase alfa mais spécifiait également l'absence de distinction entre les phénotypes des patients inclus dans la grande majorité des études, limitant l'interprétation des observations (92). Aucune étude comparative randomisée n'a, à ce jour, comparé l'efficacité des deux enzymothérapies. Une étude, rétrospective, a récemment comparé agalsidase alfa et agalsidase beta aux dosages autorisés. Le premier constat était la différence de prise en charge entre les phénotypes : les patients de phénotype classiques – plus sévères - étant plus fréquemment traités par agalsidase beta, et donc à des posologies plus élevés que les patients sous agalsidase alfa ($n=387$, $p<0,05$). Aussi, il était observé une meilleure décroissance du biomarqueur lysoGb3 sous agalsidase beta mais pas de réduction de l'incidence des événements cliniques avec un critère composite comprenant mise sous dialyse, greffe rénale, passage du débit de filtration glomérulaire estimé en deçà de 15ml/min/1,73m², pose de défibrillateur automatique implantable ou de pacemaker, occurrence d'AVCi ou d'accident ischémique transitoire et

décès (93). Enfin, une étude d'une cohorte allemande de 40 patients sous agalsidase beta (31 hommes et 9 femmes) a rapporté les limites en termes d'efficacité de l'enzymothérapie substitutive avec la survenue sous traitement de 7 décès, 4 entrées en insuffisance rénale terminale et 4 AVCi mais aussi la progression de la fibrose myocardique chez certains patients et de l'insuffisance rénale chez la plupart (94).
Le coût des enzymothérapies est identique, soit pour un patient de 70 kg, 12 749,7€/28j TTC (soit 166 315,2€/an) hors coûts annexes liés à la perfusion hospitalière ou à domicile (source de l'Observatoire du médicament, des dispositifs médicaux et de l'innovation thérapeutique (OMEDIT) du Pays de Loire, janvier 2017). L'enjeu socio-économique est véritable et ne peut être perdu de vue lors des études de dépistages néonataux systématiques et de la discussion de la prise en charge des formes pauci-symptomatiques.

Molécule chaperonne : migalastat

En 2017, une thérapie per os a été mise à disposition : le migalastat (Galafold®, Amicus Therapeutics®) qui correspond à une présentation galénique particulière de 1-deoxygalactonojirimycin, iminosucre inhibiteur compétitif de l'alpha-galactosidase A in vitro (95,96). Le migalastat est une molécule chaperonne pharmacologique : elle se lie à l'alpha-galactosidase déficiente endogène, la stabilise et/ou lui fait obtenir sa structure tridimensionnelle normale, évitant ainsi l'activation des mécanismes de dégradation associés au réticulum endoplasmique qui résulte en l'ubiquitination des protéines malformées et leur dégradation par le protéasome (97). La molécule chaperonne permet ainsi l'acheminement de l'enzyme et la restauration de sa fonction intra-lysosomale. La limite inhérente à l'usage de ce traitement est qu'il ne s'adresse qu'aux seuls patients ayant une mutation dite *amenable* (95). Ce terme définit les mutations de *GLA* associées à la persistance de la synthèse d'une protéine qui conserve des propriétés enzymatiques fonctionnelles mais dont l'instabilité chimique empêche l'acheminement intra-lysosomal nécessaire à la fonction enzymatique. Ce caractère *amenable* a été déterminé par le laboratoire Amicus Therapeutics®. Les mutations connues faux-sens, les mutations non-sens proches de l'extrémité C-terminale, les insertions de petite taille et les délétions qui ne modifiaient pas le cadre de lecture ont ainsi été testées par transfection de chacun des ADNc *GLA* mutés au sein de cellules de lignée Human embryonic kidney 293 (HEK-293). La correction de l'activité enzymatique avec migalastat était ensuite évaluée qualifiant ou non la mutation comme « amenable » à la molécule pharmacologique (98).

Chez les patients avec mutation *amenable*, le migalastat a montré des bénéfices notamment sur le plan rénal avec une diminution des dépôts de Gb3 au sein des capillaires interstitiels rénaux contre placebo (95), et une amélioration de la cardiopathie hypertrophique attestée par une diminution de la masse ventriculaire gauche contre enzymothérapie substitutive (les patients contrôles recevaient l'agalsidase alfa à 0,2mg/kg/14j (n= 13 patients, 62%) ou de l'agalsidase beta 1mg/kg/14j (n=8, 38%)). Après 18 mois de traitement, il n'y avait pas de différence sur les paramètres rénaux ni sur les biomarqueurs (99). Un des avantages attendus de la molécule chaperonne était son aptitude à passer la barrière hémato-encéphalique chez la souris, aucun effet notable n'a pour autant été observé dans les essais (100).

Des études ont déjà observé les bénéfices potentialisés de l'association enzymothérapie substitutive et migalastat qui pourrait alors en théorie être co-administrés à l'ensemble des patients (101,102). Des considérations économiques de santé publique sont néanmoins nécessaires puisque le prix public du migalastat est de 16 067,7€/28j TTC soit 209 597,41€/an (source : vidal.fr, mai 2017). L'arrivée de cette nouvelle molécule, dont l'administration aujourd'hui est limitée aux patients avec mutations amenable - correspondant le plus souvent à des patients avec une activité enzymatique résiduelle non nulle - a eu le mérite de mettre en lumière la nécessité de comparer des patients en fonction de leur phénotype clinique.

Molécules et concepts thérapeutiques à venir

Hormis les combinaisons des produits sus-cités, deux principales options thérapeutiques sont en cours d'exploration : les réducteurs de substrat et la thérapie génique.

Avec l'ouverture d'un essai de phase III concernant le lucerastat (Idorsia Ltd) en monothérapie en mai 2018, la stratégie de réduction de substrat devient une réalité dans la prise en charge de la maladie de Fabry. Le lucerastat (Idorsia Ltd) et la molécule Genz-682452 (Sanofi-Genzyme) sont des inhibiteurs de la glucosylcéramide synthase, intervenant donc en amont de la synthèse de Gb3 (103,104). Les études préliminaires ont montré que l'association enzymothérapie et Genz-682452 entrainait une réduction significative des taux de Gb3, lysoGb3 et des effets bénéfiques sur la neuropathie périphérique chez la souris (103). Pour le lucerastat, l'association avec une enzymothérapie substitutive (agalsidase alfa 0,2mg/kg/14j ou agalsidase beta 1mg/kg/14j) permettait une réduction continue des taux de Gb3, sans effet clinique évident (104). Un des avantages espérés de ces molécules comme des molécules chaperonnes est leur aptitude à franchir la barrière hémato-encéphalique (103).

La thérapie génique est également une voie thérapeutique à l'étude dans la maladie de Fabry. Différentes options sont actuellement en cours de développement. Une équipe développe

actuellement la thérapie génique par greffe de cellules souches hématopoïétiques « corrigées » après transduction du gène *GLA* sauvage par un vecteur lentiviral. Dans un modèle murin Fabry avec déficit immunitaire combiné sévère, le transfert de cellules hématopoïétiques transduites permettait de corriger transitoirement le déficit enzymatique au niveau plasmatique, splénique et hépatique et de diminuer la charge en Gb3 splénique et hépatique mais pas au niveau cardiaque ni rénal (105). Cette équipe annonce néanmoins l'ouverture d'un essai clinique chez l'Homme. Une autre approche utilisant cette fois un vecteur de type adeno-associated virus (AAV) de sérotype 2/8 a été comparée à l'agalsidase beta 1mg/kg/14j dans un modèle murin Fabry non immunodéficient (106). En dépit d'une inflammation hépatique mineure, une injection de $2x10^{12}$ particules virales permettait l'obtention à 6 semaines d'une activité enzymatique significativement supérieure et des taux de Gb3 similaires aux niveaux hépatique, rénal, splénique, cardiaque et cérébral par rapport à l'enzymothérapie. L'activité enzymatique se maintenait dans les organes jusqu'à 60 semaines après le transfert. De plus, l'étude histologique révélait l'absence totale de lésion rénale chez les souris recevant la thérapie génique contrairement aux souris sous enzymothérapie (106). Une troisième méthode de transfert a été testée en utilisant des nanoparticules lipidiques au lieu des vecteurs viraux. La méthode permettait une augmentation significative de l'activité enzymatique intracellulaire de lignées de carcinomes hépatocellulaires humains (Hep G2) après transfection (107).

Physiopathologie et Inflammation

Comme le laisse supposer son spectre clinique, la maladie de Fabry est une vasculopathie (108,109). Les mécanismes conduisant le déficit enzymatique lysosomal en alpha-galactosidase A à cette vasculopathie diffuse sont encore peu clairs mais l'engorgement cellulaire ne suffit pas à expliquer les lésions observées. De plus, comme précédemment évoqué, l'enzymothérapie substitutive, principal traitement actuel de la maladie de Fabry n'a pas fait la preuve de ses bénéfices chez tous les patients (94). Une des raisons évoquées est le développement d'une réaction humorale à l'encontre de l'enzymothérapie chez certains patients bien que ses conséquences en termes cliniques soient discutées. Aussi, les mécanismes physiopathologiques ne semblent pas se limiter à un simple déficit enzymatique dont la correction permettrait le retour à un phénotype normal. Des mécanismes inflammatoires sont indéniablement impliqués dans la physiopathologie de la maladie et dans la réponse au traitement.

Physiopathologie de la vasculopathie Fabry

L'atteinte de l'appareil vasculaire au cours de la maladie de Fabry n'est plus à démontrer avec le constat d'une accumulation endothéliale de Gb3 (4), d'une prolifération des cellules musculaires (67), d'une augmentation de l'épaisseur intima-média des artères (110), d'une réactivité vasculaire anormale (111), d'une élévation des marqueurs d'activation endothéliale avec un phénotype pro thrombotique avec augmentation de l'expression de molécules d'adhésion comme l'InterCellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), la vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) et l'E-selectin (112) ou de facteurs de coagulation comme le facteur tissulaire soluble ou l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1) (109) et d'une diminution de la synthèse d'oxyde nitrique (NO) (109). Cependant, les mécanismes à l'origine de ces modifications et dysfonctions restent lacunaires. Tout d'abord, l'implication des dépôts de Gb3 dans la pathogénèse est discutée : pour certains ils ne sont pas directement impliqués dans la pathogénèse puisque c'est le lysoGb3 ou la sphingosine-1-phosphate (S1P), et non le Gb3, qui ajoutés au milieu de culture engendrent la prolifération de cellules musculaires lisses (29,67). Cette hypothèse est en accord avec le fait qu'on ne retrouve pas de dépôts chez les femmes symptomatiques ou les patients présentant une forme cardiaque isolée (113). Les partisans de cette hypothèse suggèrent que l'ensemble des anomalies observées survient au décours de cette prolifération musculaire, notamment par des processus de fibrose

intimale engendrant des modifications de la compliance vasculaire avec augmentation des contraintes de cisaillement conduisant nécessairement à une augmentation de l'activité du système rénine-angiotensine, elle-même entrainant la sécrétion de radicaux libres, l'activation du Nuclear Factor-kappa B (*NFkB*) puis la diminution du NO (114, figure 10).

On a cependant ensuite montré que l'excès de Gb3 dans des cellules endothéliales KO pour le gène *GLA* suffisait à induire une diminution de l'enzyme endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) avec pour conséquence une sécrétion accrue de 3 nitrotyrosine, marqueur de stress oxydatif et de la formation de radicaux libres (64, figure 11). L'hypothèse est celle d'un découplage et de l'inactivation de eNOS suite aux perturbations induites par l'excès de Gb3 à la surface membranaire, au niveau des cavéoles, radeaux lipidiques des cellules endothéliales participant aux mécanismes de signalisation cellulaire : le Gb3 en excès empêche l'oligomérisation de la cavéoline 1 et déstabilise la cavéole qui ne peut plus jouer son rôle (61,114).

Stress oxydatif

En plus de la diminution d'eNOS, d'autres mécanismes ont été impliqués dans le stress oxydatif observé au cours de la maladie de Fabry. Parmi eux, le stress du réticulum endoplasmique induit par le mauvais repliement des protéines d'alpha-galactosidase A mutées est théoriquement présent chez les patients avec mutation faux-sens. Ce mécanisme peut être ciblé et corrigé par l'usage de molécule chaperonne (115). Enfin, comme dans la plupart des maladies lysosomales, des perturbations de l'autophagie ont été observés pouvant in fine accroître le stress oxydatif (116–118). Au niveau des podocytes Fabry, on observait ainsi un processus d'autophagie incomplet avec une augmentation du nombre d'autophagosomes sans fusion finale et une diminution de l'activation des voies inhibitrices de l'apoptose du *mammalian target of rapamycin* (mTOR) et d'Akt (116). L'autophagie est un mécanisme fondamental de régulation de l'inflammation : elle participe directement à l'élimination des microorganismes pathogènes, elle rend possible la présentation antigénique sur le complexe d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) et elle freine les réactions inflammatoires en détruisant d'une part les signaux danger initiaux - qu'il s'agisse de signaux exogènes microbiens ou endogènes provenant d'organites défectueux - mais également les différentes molécules et signaux impliqués dans les cascades inflammatoires, notamment les molécules de l'inflammasome (119). Lorsque l'autophagie est perturbée, on observe une accumulation de métabolites pro-inflammatoires qui ne sont plus éliminés et favorisent le stress oxydatif

(119). Mais on peut également prévoir une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires du fait de la perte de régulation de l'inflammasome.

Cytokines pro-inflammatoires

Au cours de la maladie, l'élévation de différentes cytokines pro-inflammatoires a été mise en évidence. Les concentrations en Gb3 urinaires étaient ainsi fortement corrélées à une élévation de l'interleukine 6 (IL-6) plasmatique ($r = 0,971$, $p < 0,01$) (120). Dans une autre étude, IL-6 et IL-1beta étaient significativement augmentées dans le surnageant de leucocytes Fabry et les cellules dendritiques des patients sécrétaient davantage de Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-alpha) et d'IL-1beta que les contrôles (121). Enfin, dans le sérum de patients Fabry on a observé des taux significativement plus élevés d'IL-18, taux qui corrélaient avec l'hypertrophie cardiaque (122). De façon intéressante, les sécrétions d'IL-1beta et de TNF-alpha revenaient à des taux normaux lorsqu'un anticorps inhibiteur du toll-like-receptor 4 (TLR 4) était ajouté au milieu de culture (121).

Implication du TLR4

Les TLR appartiennent aux *pattern recognition receptors* (PRR), récepteurs de l'immunité innée capables de reconnaitre des motifs moléculaires structurellement associés aux microorganismes pathogènes (ou pathogen-associated molecular patterns ou PAMPs, par exemple le lipopolysacharide (LPS) bactérien ou l'ADN viral) mais aussi des signaux de dangers endogènes provenant de cellules détériorées (ou Danger-associated molecular patterns, DAMPs, par exemple l'ATP, les cristaux d'acide urique ou les heat shock proteins 70 et 90)(123). Les TLR sont des récepteurs membranaires présents sur les leucocytes mais aussi les podocytes, les cellules endothéliales ou épithéliales notamment tubulaires rénales. Les TLR sont répartis en différentes familles TLR 1 à 10 chez l'Homme, reconnaissant chacunes des motifs particuliers. Ils font le pont entre immunité innée et acquise en permettant entre autre la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules innées à l'origine de la polarisation des cellules adaptatives vers différentes voies inflammatoires. Le TLR4, à la surface de la membrane plasmique, reconnait entre autres le LPS des bactéries Gram-négative (124). Son activation aboutit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires via l'activation de la voie du nuclear factor-kappa-B (*NFkB*) par des voies dépendantes et indépendantes du *Myeloid-Differentiation-primary-response-88* (*MyD88*) (130,131, figure

13). L'abolition de la sécrétion cytokinique par un inhibiteur du TLR4 suggère son activation directe par le Gb3. L'activation directe du TLR4 par des glycosphingolipides endogènes a déjà été évoquée avec l'observation d'une réponse inflammatoire dépendante du TLR4 induite par les gangliosides (126). Néanmoins, une étude a révélé l'amplitude des modifications des radeaux lipidiques observées lors de nombreuses glycosphingolipidoses et les perturbations de la signalisation des TLR qui en découlaient : dans la majorité des pathologies le réseau des lipides membranaires des macrophages était modifié en induisant un phénotype hyper-inflammatoire avec des concentrations d'IL-6 décuplées lors de l'activation du TLR4 par le LPS par rapport à des macrophages contrôles. De façon très intéressante, les lipides seuls n'engendraient pas de sécrétion cytokinique et c'est la désorganisation des radeaux lipidiques qui semblait à l'origine de l'état pro-inflammatoire (127). Ces résultats suggèrent l'absence d'activation directe du TLR4 par le Gb3 mais rappellent le rôle majeur des perturbations des radeaux lipidiques, déjà évoqués avec l'inhibition de l'eNOS dans la pathogénèse de la vasculopathie (61,114).

Alors que la vasculopathie et la néphropathie de la maladie Fabry se rapprochent du diabète (108), il est intéressant de noter que l'activation du TLR4 a été impliquée dans la physiopathologie de la néphropathie diabétique et que les souris diabétiques $TLR4^{-/-}$ développent moins de lésions glomérulaires et tubulaires et moins de fibrose (128). La fibrose rénale induite par l'activation du TLR4 observée au cours du diabète passe par l'augmentation de l'expression du Transforming Growth Factor beta (TGFb) (129). Une production analogue de TGFb a été observée par les podocytes Fabry, avec une sécrétion dose-dépendante avec le lysoGb3 ajouté au milieu de culture (130).

CD1d et cellules natural killer T.

Si le Gb3 endogène ne semble pas activer directement le TLR4, on sait qu'il peut néanmoins être présenté par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) par l'intermédiaire du cluster de différenciation 1d (CD1d) (131). Le CD1d est relié aux protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) et a pour caractéristique la présentation d'antigènes lipidiques aux cellules *natural killer T (NKT)* (131). Les cellules *NKT* représentent entre 0,5 e 1% des leucocytes circulants chez l'homme (132). Elles sont divisées en 2 familles selon leur récepteur T (TCR) (133). Les cellules NKT de type 1 dépendante du CD1d sont également appelées *invariant* NKT (iNKT) du fait de leur TCR invariant unique composé de la chaîne alpha (Vα24-Jα18 chez l'homme)(133). Dans le modèle de souris Fabry, on a observé une diminution du nombre de ces cellules iNKT, diminution qui était corrigée par l'administration d'enzymothérapie substitutive (134–136). En reconnaissant des glycolipides exogènes présentés par les CPA, les cellules iNKT participent à la défense antimicrobienne et relient immunité innée et adaptative en sécrétant de nombreuses cytokines inflammatoires (137). Plusieurs sous-populations de cellules iNKT ont été identifiées avec chacune un profil de sécrétion cytokinique particulier, on observe ainsi des profil T-helper (Th) de type 1, Th2, Th17 (138). Les conditions de la polarisation de la sécrétion de ces cellules sont encore mal comprises (143, figures 14). Il est admis que les cellules iNKT peuvent également reconnaitre des glycolipides endogènes. On sait également que le contenu lipidique des membranes plasmiques est modifié avec l'activation des TLR (127,139). Il est ainsi supposé que les lipides endogènes présentés par les CPA après activation des TLR permettraient l'activation secondaire des iNKT dans ce contexte (127,139,140). Au cours de la maladie de Gaucher, autre maladie lysosomale liée à un déficit en bêta-glucocérébrosidase, il a été montré que l'excès en Bêta-glucosylcéramide (22 :0) et en glycosylsphingosine engendrait une réponse lymphocytaire B médiée par l'activation des iNKT (141). Au cours de la maladie de Fabry, le Gb3 en excès entre en compétition avec les autres lipides au niveau du CD1d mais n'active pas les iNKT. Au contraire, on observe une inhibition par compétition avec des lipides activateurs et in fine une perte de l'activation des iNKT (131). L'impact de ces perturbations des iNKT au cours de la maladie de Fabry n'est pas encore clair. Lorsque les leucocytes circulants de patients avaient été étudiés en cytométrie de flux (sang frais, n=22 hommes), il n'avait pas été observé de différence quantitative concernant les iNKT hormis une diminution des cellules iNKT CD4+ au profit d'une augmentation du pool CD4 CD8 double négatif par rapport aux contrôles. Il était par ailleurs noté une diminution des monocytes (3,7 vs 6,9%, p

= 0,001), une augmentation des lymphocytes B (16,6 vs 12,6%, p=0,004), une diminution des Lymphocytes T CD8+ (19,0 vs 26,2%, p= 0,01), une diminution des cellules dendritiques (0,17 vs 0,44%, p= 0,007) (135,142,143).

Un rôle pour l'inflammasome ?

Finalement, les différentes études ont permis d'observer des perturbations de l'autophagie, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires notamment d'IL-1b et d'IL-18 et l'implication du TLR4. L'ensemble de ces indices suggère l'implication de l'inflammasome NLRP3 dans la physiopathologie de la maladie de Fabry (119,144–146). L'inflammasome NLRP3 est un complexe protéique essentiel à la réaction inflammatoire qui permet la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1b et IL-18 à partir de l'activation des PRR par les PAMPs comme les DAMPs (144,146). Pour être activé, le complexe a besoin de deux signaux (150,152, figure 15). Le premier provient classiquement de l'activation du TLR4 qui par la voie du *MyD88* permet la transcription de *NFkB* et la production de pro-IL1b et de pro-IL18. Pour aboutir à la production d'IL-1b et d'IL-18 matures, le complexe NLRP3/Pro-caspase 1/ASC doit être activé par un second signal pour activer la caspase 1 qui viendra cliver les pro-interleukines en interleukines matures. Le second signal peut être d'origine divers provenant notamment de la production de *reactive oxygen species* (ROS) secondaire à un stress oxydatif ou à des lésions mitochondriales (119,144–146). Les perturbations de l'autophagie peuvent intervenir à différentes étapes de l'activation de l'inflammasome : d'une part la production de pro-IL1b et de pro-IL18 est régulée négativement par l'autophagie qui contrôle la quantité de molécules intracellulaires et amplifie le premier signal, d'autre part, une autophagie défectueuse favorise la production de ROS et le maintien d'organites lésés au sein de la cellule engendrant un second signal qui permettra l'achèvement du processus (119,144,146). Une telle activation de l'inflammasome n'a pas encore été prouvée dans la physiopathologie de la maladie de Fabry, mais à la fois les signaux nécessaires inauguraux et la sécrétion d'IL-1b et d'IL18 finales l'ont été. De plus, l'implication de l'inflammasome a déjà été observée dans la physiopathologie d'autres maladies lysosomales comme la maladie de Gaucher (147). L'intérêt de l'identification de l'inflammasome dans la physiopathologie est son accessibilité à des traitements ciblés spécifiques (119,144,146).

Limites de l'enzymothérapie et immunité adaptative : anticorps anti-agalsidase

L'enzymothérapie substitutive semble avoir amélioré le pronostic global de la maladie de Fabry, permettant un ralentissement de l'évolution de l'atteinte rénale et de l'atteinte cardiaque notamment (92). Néanmoins, certains patients ne semblent pas en bénéficier et les effets paraissent limités (148,149). Il semble ainsi que l'enzymothérapie ne corrige pas complètement l'ensemble des anomalies observées. On peut supposer en effet que certaines mutations de *GLA* engendrent un stress oxydatif induit par le misfolding protéique dont la correction est peu accessible à l'enzymothérapie mais possiblement amélioré par l'usage de molécule chaperonne (150). Aussi, il a été décrit que l'enzymothérapie n'a pas d'efficacité sur les processus de fibrose et ne peut donc pas corriger des lésions déjà installées (108). Enfin parmi les facteurs évoqués pour expliquer la perte d'efficacité de l'enzymothérapie, le développement d'une réponse immunitaire adaptative humorale à l'encontre de l'enzyme de substitution a très rapidement été évoqué (85,86,151). En effet, l'enzymothérapie consiste en l'injection de protéines recombinantes, initialement défaillantes chez le receveur. Le développement d'une réponse humorale à l'encontre d'un tel produit recombinant avec la formation d'anticorps inhibiteurs avait déjà été observé de longue date, notamment à l'encontre du facteur VIII recombinant administré au cours de l'hémophile A (152). Ce problème est aussi connu dans d'autres maladies de surcharge lysosomale, notamment au cours de la maladie de Pompe infantile au cours de laquelle une proportion significative de jeunes patients – ceux ne produisant aucune enzyme, qualifiés de *cross-reactive immunologic material* (CRIM) négatifs – développent une importante réaction humorale avec la production d'anticorps inhibiteurs mettant en jeu l'efficacité du traitement à court terme et ainsi leur pronostic vital (153). Si la recherche d'anticorps inhibiteurs a été réalisée dès le développement des enzymothérapies par les deux laboratoires pharmaceutiques dans la maladie de Fabry, aucun laboratoire indépendant ne réalise le dépistage en routine (86,88).

Les deux laboratoires impliqués, Genzyme-Sanofi et Shire n'établissent par ailleurs un statut sérologique que pour les patients recevant leur enzyme, en utilisant des protocoles expérimentaux différents, sans comparaison possible en termes de titres, sans information quant à la sensibilité et à la spécificité de chacun des tests et sans information aucune sur une éventuelle réaction croisée (154,155). Pourtant, hormis dans les travaux de l'équipe hollandaise d'Aerts, Linthorst et al. qui a utilisé un test ELISA *maison*, l'ensemble des essais et études de cohorte visant à étudier la réponse IgG anti-agalsidase s'est basé sur les rendus sérologiques des deux laboratoires pharmaceutiques (151,155–161). En 2015, une équipe japonaise a proposé une méthode de détection rapide immunochromatographique des anticorps dirigés contre les 2 enzymes alors testée sur 29 sérums (90). Bien qu'attrayante et développée de façon indépendante, cette technique n'a pas encore été diffusée ni réutilisée.

Réactions à la perfusion et différences de séroprévalence entre molécules

Les essais publiés par les laboratoires ont rapidement mis en évidence une différence de séroprévalence entre les 2 molécules : les patients sous agalsidase alfa développaient moins d'IgG que les patients sous agalsidase beta mais aussi ne développaient pas d'IgE contrairement aux seconds (155). En 2012, les rapports post-marketing faisaient ainsi état d'une séroprévalence IgG de 24 % chez les patients sous agalsidase alfa contre 73% sous agalsidase beta (155,161,162). Des IgE n'ont été décrits que chez des hommes sous agalsidase beta, sporadiquement, accompagnés alors de réactions anaphylactoïdes et urticariennes caractéristiques (163,164). Alors même que les protocoles de dépistage des anticorps étaient différents entre les deux laboratoires et les séroprévalences non comparables *stricto sensu*, différentes hypothèses ont été émises pour expliquer l'immunogénicité accrue de l'agalsidase beta, notamment par son dosage plus important (160) et surtout son mode de production dans des cellules CHO avec un profil de glycosylations et de phosphorylations différent (89,156,165,166). De façon intéressante, les études réalisées avec les tests indépendants ne

montraient pas de différence de séroprévalence entre les molécules mais également une réactivité croisée parfaite (90,160).

Différence entre les sexes et les mutations

On a également observé une différence entre les sexes : les femmes développent moins d'anticorps, probablement du fait de leur statut hétérozygote avec une activité enzymatique résiduelle (151,158,160). Les anticorps semblent d'ailleurs plus fréquents chez les patients avec mutations non-sens que les patients avec mutation faux-sens (161), mais cette corrélation avec le génotype reste débattue (151).

Les séroconversions semblent survenir dans les 6 premiers mois de traitement avec une médiane à 6 semaines (167,168). Les anticorps peuvent devenir indétectables chez certains patients avec un taux faible initial, sans caractère pronostique particulier (160,161).

Effets des anticorps anti-agalsidase in vitro

En 2004 et 2013, l'équipe de Linthorst et al. décrit 11 puis 19 patients (sans information sur les patients inclus dans les deux études à la fois) ayant développé des anticorps anti-agalsidase dont les sérums ont tous un pouvoir inhibiteur de l'alpha-galactosidase A de 65 à 95% *in vitro* (151,167). A partir de 2013, cette même équipe suivie par d'autres a alors fondé ses recherches d'anticorps sur des tests d'inhibition enzymatique par le sérum (167,169). Cette approche uniquement basée sur l'inhibition est cependant discutable puisqu'elle ne considère que les anticorps dirigés contre le site actif de l'enzyme, ne prenant pas en compte les éventuels anticorps dirigés à proximité du mannose-6-phosphate, indispensable à l'adressage lysosomal, ou bien encore ceux dirigés contre tous les autres épitopes qui malgré l'absence de retentissement enzymatique évident témoigneraient d'une réponse immune (153). Il n'y a d'ailleurs que peu d'information sur l'effet des anticorps sur l'activité enzymatique intracellulaire. Une figure peu commentée dans l'article de Linthorst et al. de 2004 suggérait

un bénéfice apporté par les anticorps, avec une activité enzymatique intraleucocytaire augmentée après incubation avec du sérum de patient « séropositif » (151). A l'opposé, dans d'autres études, l'activité enzymatique observée au sein de fibroblastes de patients Fabry était diminuée lorsque mis en culture avec du sérum positif et les dépôts de Gb3 intra-endothéliaux étaient significativement corrélés aux titres des anticorps IgG (156,158).

Effets des anticorps anti-agalsidase in vivo

In vivo, la présence d'anticorps anti-agalsidase a été associée à une augmentation du Gb3 urinaire sans effet évident sur le Gb3 plasmatique (67,164,170). Une étude basée sur des tests d'inhibition au sein d'une population de patients classiques faisait par ailleurs observer que les taux de lysoGb3 plasmatiques étaient significativement plus élevés chez les patients dont le sérum avait un pouvoir inhibiteur défini comme une perte d'activité de plus de 50% (160). De façon intéressante, parmi les patients avec sérum inhibiteur, Gb3 et lysoGb3 plasmatiques diminuaient lorsqu'on augmentait la posologie de 0,2mg/kg/14j d'agalsidase alfa à 1mg/kg/14j d'agalsidase beta, suggérant le dépassement d'un éventuel seuil de saturation.

L'augmentation pathologique des marqueurs que sont le Gb3 et le lysoGb3 laissait à supposer un effet délétère des anticorps sur l'évolution de la maladie sous traitement. Pourtant, les différentes études observationnelles sous agalsidase alfa comme beta n'ont pas rapporté de corrélation entre anticorps et détérioration du débit de filtration glomérulaire estimé (eGFR), augmentation de la masse ventriculaire gauche ou apparition de lésions cérébrales à l'IRM (158,160,170). Les seuls événements cliniques observés ont été de rares mais sévères réactions à la perfusion ayant nécessité des hospitalisations chez des patients avec sérum inhibiteur (167).

Finalement, le caractère délétère des anticorps sur le pronostic clinique est difficilement appréhendable alors que l'efficacité même du traitement est difficilement mise en évidence,

que la comparabilité des traitements est discutée et que les tests de dépistage des anticorps sont en très grande majorité réalisés par les laboratoires pharmaceutiques eux-mêmes.

Objectifs :

Des mécanismes inflammatoires sont impliqués dans la physiopathologie de la maladie de Fabry mais aussi dans la réponse à l'enzymothérapie substitutive. L'ampleur de ces mécanismes n'a que très peu été appréhendée dans la littérature et les traitements actuels pourraient n'avoir qu'une efficacité limitée dans ce contexte.

La majeure partie de la littérature concernant l'immunité au cours de la maladie de Fabry se concentre sur les anticorps anti-agalsidase alors qu'aucun outil ne permet la mise en évidence et la quantification de ces anticorps de façon indépendante des laboratoires pharmaceutiques. Le **premier objectif** de notre travail a été l'élaboration d'un tel outil et l'étude de l'impact clinique et biologique des anticorps identifiés.

Bien que l'inflammation soit aujourd'hui consensuellement impliquée dans la physiopathologie de la maladie, une seule étude a étudié les caractéristiques des leucocytes circulants au cours de la maladie de Fabry. Notre **deuxième objectif** était la description fine des phénotypes cellulaires observés au cours de la maladie et l'impact du traitement et des anticorps sur les différentes populations.

A ce jour, le lysoGb3 est le marqueur d'activité de la maladie de Fabry, facilitant son dépistage et permettant un suivi individuel des patients. Le lysoGb3 est directement impliqué dans la physiopathologie de la maladie de Fabry, pourtant certains patients symptomatiques ont des taux quasi-normaux de ce métabolite. Le lysoGb3 ne semble donc pas idéal pour surveiller l'activité de la maladie et l'efficacité thérapeutique. Notre **troisième objectif** était la mise en évidence d'autres marqueurs susceptibles de nous informer sur l'activité de la maladie, notamment sur le « statut inflammatoire » des patients. Nous avons ainsi évalué la pertinence clinique de la mesure de la sphingosine-1-phosphate (S1P) et du vascular endothelial growth factor (VEGF), deux médiateurs inflammatoires rapportés dans la littérature.

Résultats

Travail préliminaire : constitution de la base FFABRY

Un préalable nécessaire à nos travaux a été la constitution d'une base de données adossée à une biobanque : le projet FFABRY (French FAbry Biobank and RegistrY). FFABRY est un travail collaboratif multicentrique et national regroupant les patients femmes et hommes de plus de 15 ans ayant un diagnostic enzymatique et/ou génétique de maladie de Fabry, pris en charge en France métropolitaine, quel que soit leur traitement ou leurs symptômes. Les données cliniques ont été recueillies par l'intermédiaire d'un formulaire électronique automatisé rempli directement par les praticiens prenant en charge les patients ou à partir des données cliniques issues des comptes rendus d'hospitalisation et dossiers médicaux examinés au sein de chaque site. Les formulaires électroniques sont accessibles en ligne par les praticiens après connexion sécurisée à un site internet dédié développé avec la société Epiconcept®. Le consentement écrit de tous les patients a été recueilli avant toute inclusion dans la base FFABRY. La base FFABRY a reçu les autorisations de la Commission Nationale Informatique et Libertés (CNIL : DR-2014-506) le 28/11/2014), du Comité de Protection des Personnes (CPP) Ile-de-France IV le 03/04/2014 et du comité consultatif sur le traitement de l'information en matière de recherche scientifique (C.C.T.I.R.S. ; n°14.324bis) le 18/06/2014.

Données cliniques

Selon les modalités des *études en soins courants* applicables au projet FFABRY, aucun examen clinique ou paraclinique ne pouvait être demandé dans le seul but de l'inclusion. Le formulaire automatisé reprenait l'ensemble des variables nécessaires à l'élaboration du score MSSI (37). En l'absence de mention particulière ou de thérapie évocatrice retrouvée dans les dossiers cliniques, les événements suivants ont été considérés absents : accident vasculaire cérébral, épilepsie, troubles du comportement, trouble cognitif, syndrome extrapyramidal, transplantation rénale, dialyse, pose de stimulateur ou défibrillateur cardiaque, insuffisance cardiaque, cardiopathie ischémique, transplantation cardiaque. Pour toutes les autres variables l'absence d'information a été considérée comme valeur manquante. L'évaluation de la cardiopathie hypertrophique était laissée à la considération du praticien prenant en charge le patient en l'absence de compte rendu d'échographie ou d'IRM cardiaque récentes disponible. Dans le cas contraire, une épaisseur du septum interventriculaire (SIV) supérieure ou égale à 13mm définissait une cardiopathie hypertrophique (171,172). Le débit de filtration glomérulaire (eGFR) était défini selon l'équation du groupe *Modification of Diet in Renal*

Disease Study (MDRD) (173). La présence d'une protéinurie significative était définie comme une protéinurie supérieure 0,3g/24h ou un ratio protéinurie/ créatininurie > 50mg/mmol (174). La définition des stades de la maladie rénale chronique suivait la classification internationale en vigueur (175). La variable *acroparésthesies* était considérée positive lorsqu'un antécédent de douleur des extrémités était noté, lorsque les douleurs étaient présentes au moment de la visite ou lorsqu'un traitement antalgique des douleurs neuropathiques était prescrit en dehors de toute autre cause mentionnée. Le score MSSI était calculé automatiquement pour tous les patients.

Prélèvements biologiques

Les prélèvements sanguins étaient acheminés par un transporteur au sein de notre unité Inserm U974 à Paris pour permettre l'isolement des cellules et leur congélation dans les 24h. Les leucocytes circulants étaient isolés à partir de tubes héparinés BD Vacutainer™ par la méthode de gradient de centrifugation avec Ficoll-Hypaque™ avant congélation à -80°C dans du sérum de veau fœtal (Life Technologies, Saint-Aubin, France, Catalogue # 10270106) supplémenté avec 10% de Dimethyl Sulfoxide puis transfert le lendemain dans des cuves d'azote liquide. Sérum et plasma étaient isolés par centrifugation respectivement de tubes secs BD Vacutainer™ avec silice et tubes héparinés BD Vacutainer™ avant congélation et conservation à -80°C.

Problématique n°1 : « Deep characterization of the anti-drug antibodies developed in Fabry disease patients, a prospective analysis from the French multicenter cohort FFABRY. »

Caractérisation des anticorps anti-agalsidase développés au cours de la maladie de Fabry, analyse prospective issue de la cohorte multicentrique FFABRY
Article accepté dans Orphanet Journal of Rare Diseases, le 31 juillet 2018 ; 13(1):127.
doi: 10.1186/s13023-018-0877-4.

Dans cette étude, il s'agissait de décrire les caractéristiques des anticorps anti-agalsidase développés par certains patients, leur potentiel inhibiteur enzymatique et leur retentissement en étudiant les caractéristiques cliniques et biologiques des patients ayant développé ces anticorps. Pour ce faire, différents tests ont été mis au point : un test ELISA permettant la mise en évidence simultanée des anticorps anti-agalsidase alfa et beta, et des tests d'inhibition enzymatique dans le sérum et en intracellulaire *ex vivo*. Aussi, en collaboration avec le Dr F. Lamari (Département de Biochimie métabolique, hôpital de la Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Paris, France), des dosages de lysoGb3 plasmatiques ont été réalisés sur une majorité des prélèvements.
L'étude a été conduite sur les 103 patients alors inclus dans le projet FFABRY (53 hommes et 50 femmes). Aucun des patients non exposés antérieurement à une des molécules d'agalsidase n'avait développé d'anticorps. Parmi les exposés, 40% des hommes (18/45) et 8% des femmes (2/25) avaient développé des anticorps qui avaient une réactivité croisée parfaite envers les 2 molécules d'agalsidase. Ces anticorps se développaient sur un terrain particulier : préférentiellement chez les patients avec mutation du gène *GLA* non-sens (risque relatif 2,88, $p = 0.006$) et/ou avec un phénotype clinique classique (58.6% (17/29) vs 6.7% (1/16), $p=0.0005$). Les anticorps anti-agalsidase étaient le plus souvent des IgG1 (16/18 chez les hommes) mais les concentrations les plus élevées étaient retrouvées avec les IgG4 (médiane 1,89 µg/ml, [IQR : 0.41-12.24]). Le titre des IgG totales corrélait avec l'inhibition dans le sérum ($r = 0,67$, $p < 0,0001$), plus encore les titres d'IgG4 ($r = 0,75$, $p = 0,0005$) et d'IgG2 ($r = 0,72$, $p = 0,001$). Le pouvoir inhibiteur était également observé en intracellulaire (médiane d'activité relative: 42,0% vs 75.6, $p = 0,04$). Les concentrations en lysoGb3 plasmatiques étaient corrélées au titre total d'IgG anti-agalsidase ($r=0,66$, $p=0,001$). Cependant, en dépit d'une augmentation significative du lysoGb3, aucune manifestation clinique n'était associée à la présence des anticorps après stratification sur le phénotype clinique.
Au final, nous avons pu mettre en évidence l'importance de la dissociation des phénotypes cliniques avec des patients *classiques* présentant une maladie intrinsèquement plus sévère ayant davantage de risque de développer des anticorps inhibiteurs. Les hommes *non-classiques* et les femmes avaient une maladie moins sévère et un risque ajouté de développer des anticorps plus faible. Il n'y a pas de *hotspot* antigénique évident et les anticorps développés sont polyclonaux. Hormis une élévation du lysoGb3 plasmatique, aucune manifestation clinique n'accompagnait la présence de ces anticorps.

Deep characterization of the anti-drug antibodies developed in Fabry disease patients,

a prospective analysis from the French multicenter cohort FFABRY.

Characteristics of anti-drug antibodies in Fabry disease

Mauhin W, Lidove O, Amelin D, Lamari F, Caillaud C, Mingozzi F, Dzangué-Tchoupou G, Arouche-Delaperche L, Douillard C, Dussol B, Leguy-Seguin V, D'Halluin P, Noel E, Zenone T, Matignon M, Maillot F, Ly KH, Besson G, Willems M, Labombarda F, Masseau A, Lavigne C, Froissart R, Lacombe D, Ziza JM, Hachulla E, Benveniste O.

ABSTRACT

Background:

Fabry disease (OMIM #301500) is an X-linked disorder caused by alpha-galactosidase A deficiency with two major clinical phenotypes: classic and non-classic of different prognosis. From 2001, enzyme replacement therapies (ERT) have been available. We aimed to determine the epidemiology and the functional characteristics of anti-drug antibodies. Patients from the French multicenter cohort FFABRY (n=103 patients, 53 males) were prospectively screened for total anti-agalsidase IgG and IgG subclasses with a home-made enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), enzyme-inhibition assessed with neutralization assays and lysoGb3 plasma levels, and compared for clinical outcomes.

Results:

Among the patients exposed to agalsidase, 40% of men (n= 18/45) and 8% of women (n= 2/25) had antibodies with a complete cross-reactivity towards both ERTs. Antibodies developed preferentially in men with non-missense *GLA* mutations (relative risk 2.88, p=0.006) and classic phenotype (58.6% (17/29) vs 6.7% (1/16), p=0.0005). Specific anti-agalsidase IgG1 were the most frequently observed (16/18 men), but the highest concentrations were observed for IgG4 (median 1.89 µg/ml, interquartile range (IQR) [0.41-12.24]). In the men exposed to agalsidase, inhibition was correlated with the total IgG titer (r=0.67, p<0.0001), especially IgG4 (r=0.75, p=0.0005) and IgG2 (r=0.72, p=0.001). Inhibition was confirmed intracellularly in Fabry patient leucocytes cultured with IgG-positive versus negative serum (median: 42.0% vs 75.6, p=0.04), which was correlated with IgG2 (r=0.67, p=0.017, n= 12) and IgG4 levels (r=0.59, p=0.041, n=12). Plasma LysoGb3 levels were correlated with total IgG (r=0.66, p=0.001), IgG2 (r=0.72, p=0.004), IgG4 (r=0.58, p=0.03) and IgG1 (r=0.55, p=0.04) titers. Within the classic group, no clinical difference was observed but lysoGb3 levels were higher in antibody-positive patients (median 33.2 ng/ml [IQR 20.6-55.6] vs 12.5 [10.1-24.0], p= 0.005).

Conclusion

Anti-agalsidase antibodies preferentially develop in the severe classic Fabry phenotype. They are frequently associated with enzyme inhibition and higher lysoGb3 levels. As such, they could be considered as a hallmark of severity associated with the classic phenotype. The distinction of the clinical phenotypes should now be mandatory in studies dealing with Fabry disease and its current and future therapies.

BACKGROUND

In Fabry disease (FD, OMIM #301500), mutations in the *GLA* gene (Xq22.1 300644) lead to a defect in alpha-galactosidase A with a subsequent accumulation of glycosphingolipids, notably globotriaosylceramide (Gb3) and globotriaosylsphingosine (*lyso*Gb3). Two major phenotypes have been distinguished according to the residual enzyme activity. The classic phenotype occurs below 1% of residual activity, with symptoms observed from childhood such as typical acral pain, cornea verticillata or angiokeratomas and prognosis dominated from the third decade by renal insufficiency, cardiac hypertrophy and cerebrovascular involvement [1,2]. Above 1%, the non-classic late-onset phenotype is characterized by an almost exclusive cardiopathy without pain, ophthalmological or cutaneous lesions [2]. Women can be affected with a mild to severe phenotype depending on the X-inactivation status in each organ [3]. Among the known *GLA* mutations, deletions, frameshifts and nonsense mutations have been clearly associated with the classic phenotype, whereas the phenotype-genotype correlation is less obvious for missense mutations [4]. Currently, enzyme replacement therapy (ERT) with agalsidase alfa (Replagal™, Shire Plc) or agalsidase beta (Fabrazyme®, Genzyme-Sanofi Corp.) is widely accepted to provide benefits in terms of cardiac hypertrophy and renal disease, at least when therapy is initiated in the early stage of the disease [5–7]. However, in some patients, the disease progresses despite ERT [8]. Although neutralizing anti-agalsidase antibodies have been identified, few studies have investigated the clinical impact of these antibodies [9]. We aimed to determine the significance of anti-agalsidase antibodies and their effects on enzyme activity and the associated clinical manifestations.

PATIENTS AND METHODS

Patients and blood samples

The multicenter cohort FFABRY prospectively gathers clinical data and biological samples from patients with an enzymatic and/or genetic diagnosis of FD. The patients were sorted according to their phenotype : patients with a missense mutation and the absence of acral pain or cornea verticillata were referred to as *non-classic* Fabry patients, others were referred to as *classic*. Legal authorizations were obtained from the *Comité consultatif sur le traitement de l'information en matière de recherche dans le domaine de la santé (n°14.324bis*) according to the relevant French legislation. Clinical data were prospectively collected through a standardized online form. Blood samples were collected at the time of inclusion. The samples were centralized in our research unit for isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using Ficoll-Hypaque™ gradient centrifugation technique before congelation at -80°C in fetal-calf-serum (Life Technologies, Saint-Aubin, France, Catalog # 10270106) supplemented with 10% Dimethyl Sulfoxide at -80°C. Serum and plasma were isolated by centrifugation using BD Vacutainer™ serum tubes with increased silica act clot activator and BD Vacutainer™ heparin tubes respectively, before congelation at -80°C.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA plates (96-well Nunc® Maxisorp, Denmark) were coated with 5 µg/ml of agalsidase alfa (Replagal™, Shire) or beta (Fabrazyme®, Sanofi-Genzyme) or with intravenous immunoglobulin (Clairyg®, LFB Biomédicaments Corp) as a control. The intrinsic background of each serum sample was controlled with *uncoated* wells filled with Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS). The plates were blocked with 2% DPBS-bovine serum albumin (DPBS-BSA) and filled with either patient sera (1:100 and subsequent serial two-fold dilutions if positive) or a polyclonal rabbit anti-alpha-galactosidase A antibody (Proteintech®, Manchester, UK) as a control. Goat anti-human IgG (1:20,000 dilution, Novex®, Thermo Scientific™, France) or goat anti-rabbit IgG (1:10,000 dilution, Jackson ImmunoResearch Lab®, USA) both coupled to horseradish peroxidase were used as secondary antibodies for the positive control wells. After incubation with tetramethyl benzidine (TMB, Biolegend®), the reaction was stopped (1 M H_3PO4), and the absorbance was measured with the Spark 10M® reader (Tecan Trading AG, Switzerland). Thresholds were determined as an absorbance > the mean +3 SD of the results from sera obtained from 83 healthy subjects.

For the IgG1-4 subclasses, protocols were adapted using specific secondary monoclonal mouse anti-human IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 biotin-conjugated antibodies (Sigma-Aldrich) and HRP-streptavidin (Biolegend®, USA).

Neutralizing assay in serum

Microplate wells (optiplate-96 black, Perkin Elmer®) were filled with 30 µl of 4% BSA-H_2O, 10 µl of agalsidase (2.5 ng/µl) and 10 µl of patient sera or 10 µl of additional 4% BSA-H_2O. After 10 minutes incubation, 1 mM 4-methylumbelliferyl-alpha-D-galactopyranoside (Sigma M7633) was added, and fluorescence readings were obtained under kinetic conditions at 37°C for 1 h in a microplate reader. The residual relative activity (RRA) obtained with sera was defined as the ratio of agalsidase activity measured in sera to the activity measured with only 4% BSA-H_2O. The basal activities of all sera (without agalsidase) were controlled. All measurements were performed in duplicate. Patients treated with migalastat (Amicus Therapeutics®) were excluded due to the potent enzymatic inhibition by this compound observed *in vitro*.

Neutralizing assay in leukocytes

Frozen patient peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were thawed, resuspended and separated into two tubes with agalsidase (5 ng/ml). Fifty microliters of patient sera (related to the patient PBMCs) or 50 µl of fetal bovine serum was added for the RRA determination. The tubes were incubated for 4 h (37°C, 5% CO_2). The cells were washed twice in ice-cold phosphate-buffered saline. Viability was assessed with Trypan blue staining before sonication. The protein concentration was determined by bicinchoninic acid (BCA) assay before measuring the enzyme activity. The measurements were performed in duplicate.

Alpha-N-acetylgalactosaminidase (NAGA) neutralizing assay

Human recombinant NAGA (2.5 and 5 ng/µl, R&D Systems®) was incubated with sodium citrate buffer (pH 4.0) and then patient sera. 4-Nitrophenyl-N-acetyl-alpha-D-galactosaminide (2 mM, Sigma-Aldrich®) was added, and the incubation was continued for 10 more min before the addition of NaOH. The absorbance was read at 402 nm. The measurements were performed in duplicate.

Plasma *lyso*Gb3

The lysoGb3 concentration was measured in available plasma samples by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). In *GLA*ss tubes, EDTA-plasma was mixed with glycine-lysoGb3 (100 ng/ml) as an internal standard. Proteins were precipitated with methanol:acetone 1:1 (v/v), sonicated and vortexed. After centrifugation, the supernatant was transferred into new tubes and dried. For UPLC-LCMS/MS analysis, the residue was redissolved in methanol. Quantitative analysis of lysoGb3 was performed on a TQD mass spectrometer coupled to an Acquity UPLC system (Waters®) and equipped with an Acquity BEH-C18 column. Elution was achieved by mobile phase A, consisting of 37% methanol, 63% water containing 1 mM ammonium formiate and 0.1% formic acid, and mobile phase B, consisting of 100% methanol containing 1 mM ammonium formiate and 0.1% formic acid. A calibration curve was generated by a serial dilution of lysoGb3 (Matreya-LLC) in methanol, with concentrations ranging from 100 to 1.56 ng/ml. LysoGb3 isoforms were not evaluated.

Statistical analysis

The estimated glomerular filtration rate (eGFR) according to the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) equation [10] was analyzed using linear regression for the assessment of correlations and analysis of covariance (ANCOVA) for comparisons. The non-parametric Spearman test, Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney test and Fisher's exact t test were used for other variables, such as the concentrations of the interventricular septum thickness, *lyso*Gb3

plasma levels, IgG subclass concentrations and RRA. Logistic regression was used to assess correlations between binary variables and age or time of exposure to agalsidase. Kaplan-Meier analysis with the log-rank test was used for the survival analysis. Missing values were not included in the analyses. GraphPad Prism 5.0 and the EZR plugin version 1.35v [11] packages for the R software were used.

RESULTS

Patients

From December 2014 to January 2017, 103 patients (53 males) with 42 different mutations from 17 different centers were prospectively included in the FFABRY cohort. Among the 50 women, 25 had been exposed to agalsidase (mean age = 52.5 y.; mean cumulated exposure to agalsidase = 6.1 y.), 25 were untreated (mean age = 47.9 y.). Among the men, 8 had not been exposed to agalsidase (mean age 33.2y.) including 5 classic and 3 non-classic patients. Forty-five men had been exposed at least once to ERT, including 29 classic (mean age 40.1 y.; mean cumulated exposure to agalsidase = 8.5 y.) and 16 non-classic Fabry patients (mean age 54.9 y.; mean cumulated exposure = 4.4 y.). As expected, the classic male patients were younger ($p<0.001$), had longer exposure to agalsidase ($p<0.004$), worse eGFR evolution (excluding already transplanted patients, ANCOVA, $p=0.008$, figure 1a), higher risk for renal transplantation (log-rank test, hazard ratio (HR) for renal transplantation: 7.9, $p=0.005$, figure 1b) and higher lysoGb3 plasma levels than the non-classic patients (currently treated men only: median 21.1 ng/ml [Interquartile range (IQR) 11.6-37.2] vs 4.5 ng/ml [IQR 2.3-11.3], Mann-Whitney test, $p=0.0005$). Additionally, hypertrophic cardiomyopathy (HCM) occurred earlier in the classic patients (log rank test, median survival HCM-free 46.3 vs 59.1 y, HR 3.96, $p=0.001$, figure 1c), but the incidence of implantable cardiac devices was not different between the groups (log-rank test, $p=0.69$).

Antibodies, genotype and phenotype (table 1)

Antibodies were prospectively screened in all the patients at the time of inclusion whatever their exposure to agalsidase or their current treatment. In men exposed to agalsidase, 18 (40%) had anti-agalsidase total IgG without any difference in the type of molecules that the men were exposed to either at the time of sampling or previously (alfa 30.8%, beta 44.4%, alfa and beta 42.9%, Kruskal-Wallis test, p=0.73). The cross reactivity was complete (figure 1d). Antibody positivity was not dependent on the time of exposure to agalsidase (logistic regression, odds ratio (OR) = 1.1, p=0.09).

Considering phenotypes, antibodies were observed in 58.6% (17/29) of the classic and 6.7% of the non-classic Fabry patients (1/16; Fisher's exact test, p=0.0005). The non-classic phenotype remained correlated with a lower risk of antibodies when including the time of exposure to agalsidase (logistic regression, Ab positivity OR 0.05, p=0.009). Among the classic patients, there was no difference between the Ab-positive and Ab-negative men concerning the age (Mann-Whitney test, median 43.3 y., [IQR 32.3-48.7] vs 44.4 y. [34.0 – 46.3] p=0.96) or the time of exposure to agalsidase (Mann-Whitney test, median 11.2 y, [IQR 4.8-13.1] vs 5.9 [4.0-14.1] p=0.81).

Antibodies were specifically associated with 14 different mutations (figure 2, table 2). Mutations leading to truncated alpha-galactosidase proteins (MTPs), including deletions, nonsense and frameshift mutations (6/13), were more frequently associated with antibodies than missense mutations (55.6% vs 12.0%, p=0.006, table 2). In the classic men, the association between MTPs and antibodies disappeared (Fisher's exact test, OR 2.7, p=0.41).

The IgG subclasses were determined in the 18 Ab-positive men, with samples from 17 IgG-negative treated patients used as controls. All the different IgG subclasses were concomitantly observed in 10/18 cases (table 2). IgG1 antibodies were the most frequently observed (16/18 men), but the highest concentrations were found for IgG4 (median 1.89 µg/ml, IQR [0.41-12.24]).

Two of the 25 women treated with agalsidase developed anti-agalsidase IgG (8%) 1.8 and 10.8 months after the introduction of agalsidase alfa (titer 1/12,800) and beta (titer 1/6400), respectively. Among the 44/50 available genotypes in the females, both seropositive women carried missense mutations that were not located on exon 6.

Any of the 33 untreated patients had detectable antibodies.

Biological and clinical outcomes

Among the classic men (n=29)

The renal outcomes did not differ according to their Ab status. No difference was found in the eGFR slopes between Ab-positive (linear regression, slope -3.0 ml/min/y, r^2=0.75, p<0.001) and Ab-negative non-renal-transplanted patients (linear regression, slope -3.3, r^2= 0.71, p=0.002; ANCOVA for comparison, p=0.29, figure 3a). No difference was found in the incidence of renal transplantation (log-rank test, p=0.32). Antibody positivity was not correlated with cardiac hypertrophy (logistic regression including age at the visit, p=0.20), stroke (logistic regression including age, p=0.77) or T2-flair-weighted hyperintensities on cerebral magnetic resonance imaging (logistic regression including age, p=0.91). Finally, anti-agalsidase IgGs were not reported to be associated with infusion-related events (anaphylaxis, flu-like syndrome and/or rash; Fisher's exact test, OR=4.2, p=0.32).

The lysoGb3 plasma levels were higher in the Ab-positive patients (Mann-Whitney test, median 33.2 ng/ml [IQR 20.6-55.6] vs 12.5 [10.1-24.0], p=0.005, figure 3b). LysoGb3 levels were correlated with the total IgG (Spearman's test, r=0.66, p=0.001), IgG2 (Spearman's test, r=0.72, p=0.004), IgG4 (r=0.58, p=0.03) and IgG1 (r=0.55, p=0.04) titers.

Among the non-classic men (n=16)

Anti-agalsidase antibodies were observed in only one non-classic patient who did not appear as an outlier in the non-classic group in terms of the clinical presentation or lysoGb3 plasma level (10.8 ng/ml in the Ab-positive patient compared to a median level of 3.2 ng/ml [IQR 2.2-11.5] in the Ab-negative patient, figure 3b).

Among women treated with agalsidase (n=25)

Anti-agalsidase antibodies were observed in two women without any clinical specificity compared to the Ab-negative women.

Inhibition

The neutralizing assay in serum was performed in all the men. In the men exposed to agalsidase, the enzyme RRA was correlated with the antibody titer (Spearman's test, r=-0.67, p<0.0001, figure 4a). When considering the Ab-positive serum alone, the RRA was correlated with all subclasses, especially IgG4 (Spearman's test, r=-0.75, p=0.0005) and IgG2 (Spearman's test, r=-0.72, p=0.001, figure 4b and table 2). Inhibition was confirmed intracellularly with decreased enzymatic activities in Fabry patient PBMCs cultured with agalsidase when IgG-positive serum (Ab titers 100 – 1638400) was added (Mann-Whitney test, median: 42.0 (n=7) vs 75.6 (n=9), p=0.04, figure 4c). Whereas the alpha-galactosidase B also known as alpha-N-acetylgalactosaminidase (NAGA) enzyme shares 46 to 62% homology

in its amino acid sequence with alpha-galactosidase A [12], no difference in NAGA activity was found after incubation with either IgG-positive or IgG-negative sera (Mann-Whitney test, p = 0.44, figure 4d), suggesting the specificity of the inhibition.

In the men currently treated with agalsidase, the correlation between lysoGb3 plasma levels and RRA was almost significant (Spearman's test, r=-0.34, p=0.056, n=33); the trend remained when focused on the classic phenotype alone (Spearman's test, r=-0.43, p=0.055, n=21) but not when focused on the non-classic phenotype (Spearman's test, r=-0.004, p=0.99, n=12). No inhibition (RRA >74%) was detectable in 7 Ab-positive men and the two Ab-positive women. Although the antibody titers were lower in the inhibition-negative/Ab-positive men (median 1/800 [IQR 1/600-1/103,200], n=7) than in the inhibition-positive/Ab-positive men (1/1,229,000 [1/281,600-1/1,638,000], n=11, Mann-Whitney test, p=0.01), the lysoGb3 plasma levels were not different (Mann-Whitney test, median 20.0 ng/ml [IQR 16.0-68.4] vs 44.5 [24.5-55.6], n= 4 and 7 respectively, p=0.26).

When only the inhibition-negative classic patients were considered, there was a trend towards higher *lyso*Gb3 plasma levels in the Ab-positive patients than in the Ab-negative patients from the classic clusters only (Mann-Whitney test, median: 20.0 ng/ml, IQR [16.0-68.4], n=4 vs 11.6 [9.4-19.8], n=10, p=0.076, figure 4d) despite the absence of differences in the cumulative exposure to agalsidase (p=0.7).

No inhibition was observed in the women exposed to agalsidase (n=25) including the 2 Ab-positive patients.

DISCUSSION

This study presents one of the largest independent cohorts of patients screened for anti-agalsidase antibodies. Morerover, we used an anti-agalsidase specific ELISA which is a more sensitive approach than serum inhibition assays that have been used in the very recent literature [13,14]. LysoGb3 has been implicated in FD pathophysiology and is actually the best biomarker for FD severity [15–17]. Higher lysoGb3 plasma levels have been observed in classic phenotype and in Ab-positive patient separately [13,17]. Regardless of the agalsidase molecule administered (alfa or beta), we show that antibodies are more likely to develop in men with classic phenotype. In these classic patients, lysoGb3 plasma levels remain higher in Ab-positive patients. This suggests that antibodies are associated with a more severe disease. Interestingly, six of the eight transplanted patients had antibodies, a prevalence that can be underestimated since the patients have immunosuppressants. However, whether the antibodies are directly involved in the disease severity or simply accompany the severe phenotype is unknown.

Antibodies have been suggested to worsen the prognosis by inhibiting the ERT [13,14]. Indeed we observe a clear correlation between inhibition and antibody titers, nevertheless the correlation between inhibition and lysoGb3 was not significant and inhibition was undetectable in some Ab-positive serum despite high lysoGb3 levels. Hence inhibition-assays alone clearly lack sensitivity for assessing the humoral immune response: we share the findings of Lenders et al. in the higher IgG4 levels associated with inhibition, nevertheless, by using specific anti-agalsidase IgG subclasses ELISA, we can affirm that IgG1, IgG2 and IgG3 are also observed, moreover we did not observe inhibition in some IgG4-positive patients [14]. The polyclonality, reflected by the different existing IgG subclasses, suggests that antibodies can target different epitopes of the agalsidase with multiple and unpredictable consequences [18]. IgG4 that were well correlated with Ab-titers, can bind an epitope such as agalsidase, and result in possible inhibition; however, their physical properties lead this IgG subclass to form bispecific Abs that are functionally monovalent, unable to form large immune complexes and incapable of activating the classical complement pathway [19]. To our knowledge, moreover, no immune complexes or complement deposits have been observed with antibodies in renal biopsies of Fabry patients. Finally, despite benefits from anti-IgG4 antibodies in vitro in rescuing enzyme activity in ERT inhibition positive patients [14], benefits from immunosuppressive drugs have been unobvious in terms of Gb3 clearance and enzyme activity recovering in Fabry mice [20] as well as in patients in vivo: Lenders et al. recently reported that despite a decrease in antibodies under immunosuppressants for renal transplant, the *lyso*Gb3 levels remained stable [21]. The immune response developed towards ERT cannot be limited to a quantitative enzymatic approach.

Another concept links antibodies to clinical phenotype with a qualitative approach: the men with classic phenotypes have the lowest residual enzymatic activities, having therefore higher lysoGb3 levels and being more prompt to develop antibodies. Thus, antibodies would be a hallmark for Fabry disease severity.

The epidemiology of Fabry disease is changing with a higher proportion of non-classic presentations [22]. Severity and prognosis differ according to these clinical phenotypes [23]. There is an urgent need to assess the benefits of ERT according to the clinical phenotypes. Anti-agalsidase antibodies, as a hallmark of severity, could play a role in the stratification of the groups. Because decreasing antibody titers is not sufficient to improve the prognosis in the severe Ab-positive patients [21], other therapeutic approaches should be evaluated, such as increasing the dose of agalsidase [14] or adding chaperone molecule.

The main limitation of this study was the retrospective analysis of clinical data, although the standardized form with automated scoring did limit this bias. Also, antibodies are known to develop within the first six months of ERT [24] and then disappear in some tolerant patients [24,25], we studied only a single time point and thus could not comment on immunotolerance (either natural or induced by immunosuppressants). Also, we did not perform the neutralizing test in all the women, as we did not observe inhibition in any of the 34 women tested including all the treated patients. Whereas these findings were in accordance with the literature [13], we did not apply the inhibition assay to the rest of the untreated women cohort.

CONCLUSION

Anti-agalsidase antibodies almost exclusively develop in men with a severe classic Fabry phenotype and are associated with higher lysoGb3 plasma levels. Despite being frequently inhibitor, anti-agalsidase antibodies have no obvious clinical impact although their association with lysoGb3 levels could be considered as a hallmark of severity associated to the classic phenotype.

List of abbreviations

Ab	Antibody
ANCOVA	Analysis of covariance
BSA	Bovine Serum Albumin
CRIM	Cross-reactive immunologic material
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
eGFR	Estimated glomerular filtration rate
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERT	Enzyme Replacement Therapy
FD	Fabry disease
Gb3	Globotriaosylceramide
HCM	hypertrophic cardiomyopathy
HR	Hazard ratio
HRP	Horseradish Peroxidase
IQR	Interquartile range
LysoGb3	Globotriaosylsphingosine
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
MTPs	Mutations leading to truncated alpha-galactosidase proteins
NAGA	Alpha-N-acetylgalactosaminidase
OR	Odds ratio
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
RRA	Residual relative activity
UPLC-MS/MS	Ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

References

1. Schiffmann R, Warnock DG, Banikazemi M, Bultas J, Linthorst GE, Packman S, et al. Fabry disease: progression of nephropathy, and prevalence of cardiac and cerebrovascular events before enzyme replacement therapy. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc. 2009;24:2102–11.

2. Mehta A, Hughes DA. Fabry Disease. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJ, et al., editors. GeneReviews(®) [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2016 Jan 7]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1292/

3. Echevarria L, Benistan K, Toussaint A, Dubourg O, Hagege AA, Eladari D, et al. X-chromosome inactivation in female patients with Fabry disease. Clin Genet. 2016;89:44–54.

4. Pan X, Ouyang Y, Wang Z, Ren H, Shen P, Wang W, et al. Genotype: A Crucial but Not Unique Factor Affecting the Clinical Phenotypes in Fabry Disease. PloS One. 2016;11:e0161330.

5. Schiffmann R, Ries M, Timmons M, Flaherty JT, Brady RO. Long-term therapy with agalsidase alfa for Fabry disease: safety and effects on renal function in a home infusion setting. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc. 2006;21:345–54.

6. Germain DP, Waldek S, Banikazemi M, Bushinsky DA, Charrow J, Desnick RJ, et al. Sustained, long-term renal stabilization after 54 months of agalsidase beta therapy in patients with Fabry disease. J Am Soc Nephrol JASN. 2007;18:1547–57.

7. Beck M, Hughes D, Kampmann C, Larroque S, Mehta A, Pintos-Morell G, et al. Long-term effectiveness of agalsidase alfa enzyme replacement in Fabry disease: A Fabry Outcome Survey analysis. Mol Genet Metab Rep. 2015;3:21–7.

8. Weidemann F, Niemann M, Störk S, Breunig F, Beer M, Sommer C, et al. Long-term outcome of enzyme-replacement therapy in advanced Fabry disease: evidence for disease progression towards serious complications. J Intern Med. 2013;274:331–41.

9. Linthorst GE, Hollak CEM, Donker-Koopman WE, Strijland A, Aerts JMFG. Enzyme therapy for Fabry disease: neutralizing antibodies toward agalsidase alpha and beta. Kidney Int. 2004;66:1589–95.

10. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. Ann Intern Med. 1999;130:461–70.

11. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software “EZR” for medical statistics. Bone Marrow Transplant. 2013;48:452–8.

12. Wang AM, Desnick RJ. Structural organization and complete sequence of the human alpha-N-acetylgalactosaminidase gene: homology with the alpha-galactosidase A gene provides evidence for evolution from a common ancestral gene. Genomics. 1991;10:133–42.

13. Lenders M, Stypmann J, Duning T, Schmitz B, Brand S-M, Brand E. Serum-Mediated Inhibition of Enzyme Replacement Therapy in Fabry Disease. J Am Soc Nephrol JASN. 2016;27:256–64.

14. Lenders M, Schmitz B, Brand SM, Foell D, Brand E. Characterization of drug-neutralizing antibodies in patients with Fabry disease during infusion. J Allergy Clin Immunol. 2018; 141:2289-2292.e7.

15. Namdar M, Gebhard C, Studiger R, Shi Y, Mocharla P, Schmied C, et al. Globotriaosylsphingosine accumulation and not alpha-galactosidase-A deficiency causes endothelial dysfunction in Fabry disease. PloS One. 2012;7:e36373.

16. Sanchez-Niño MD, Sanz AB, Carrasco S, Saleem MA, Mathieson PW, Valdivielso JM, et al. Globotriaosylsphingosine actions on human glomerular podocytes: implications for Fabry nephropathy. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc. 2011;26:1797–802.

17. Nowak A, Mechtler TP, Desnick RJ, Kasper DC. Plasma LysoGb3: A useful biomarker for the diagnosis and treatment of Fabry disease heterozygotes. Mol Genet Metab. 2017;120:57–61.

18. Kishnani PS, Dickson PI, Muldowney L, Lee JJ, Rosenberg A, Abichandani R, et al. Immune response to enzyme replacement therapies in lysosomal storage diseases and the role of immune tolerance induction. Mol Genet Metab. 2016;117:66–83.

19. Trampert DC, Hubers LM, van de Graaf SFJ, Beuers U. On the role of IgG4 in inflammatory conditions: lessons for IgG4-related disease. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis [Internet]. 2017 [cited 2017 Sep 19]; Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443917302739

20. Sato Y, Ida H, Ohashi T. Anti-BlyS antibody reduces the immune reaction against enzyme and enhances the efficacy of enzyme replacement therapy in Fabry disease model mice. Clin Immunol Orlando Fla. 2017;

21. Lenders M, Oder D, Nowak A, Canaan-Kühl S, Arash-Kaps L, Drechsler C, et al. Impact of immunosuppressive therapy on therapy-neutralizing antibodies in transplanted patients with Fabry disease. J Intern Med. 2017;282:241–53.

22. Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tukel T, Thiagarajan G, Sakuraba H, et al. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. Am J Hum Genet. 2006;79:31–40.

23. Arends M, Wanner C, Hughes D, Mehta A, Oder D, Watkinson OT, et al. Characterization of Classical and Nonclassical Fabry Disease: A Multicenter Study. J Am Soc Nephrol JASN. 2017;28:1631–41.

24. Wilcox WR, Linthorst GE, Germain DP, Feldt-Rasmussen U, Waldek S, Richards SM, et al. Anti-α-galactosidase A antibody response to agalsidase beta treatment: data from the Fabry Registry. Mol Genet Metab. 2012;105:443–9.

25. Rombach SM, Aerts JMFG, Poorthuis BJHM, Groener JEM, Donker-Koopman W, Hendriks E, et al. Long-Term Effect of Antibodies against Infused Alpha-Galactosidase A in Fabry Disease on Plasma and Urinary (lyso)Gb3 Reduction and Treatment Outcome. PLOS ONE. 2012;7:e47805.

Figure Titles and Legends:

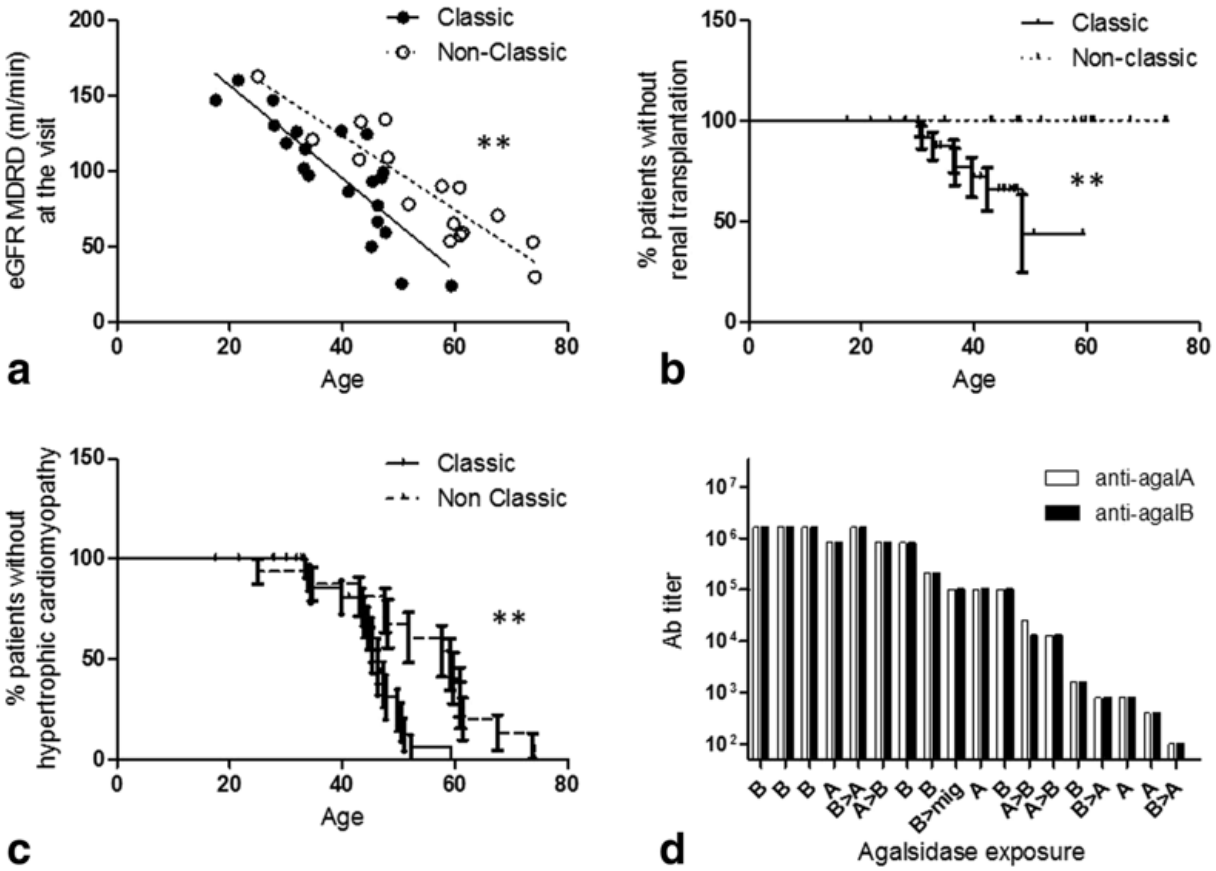


Figure 1. a: Distribution of the estimated glomerular filtration rates of the treated men according to the classic or non-classic phenotype (linear regression, p<0.001) ; b: Risk of renal transplantation according to the phenotype (log-rank test, hazard ratio (HR) classic phenotype=7.9, p=0.005) ; c: Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy (HCM; log-rank test, median survival HCM-free 46.3 y in classic patients vs 59.1 y in non-classic patients, HR=3.96, p=0.02) ; d : Antibody titers according to the chronology of the specific treatment received (A: agalsidase alfa; B: agalsidase beta, mig: migalastat). Complete cross reactivity against agalsidase alfa and beta observed for anti-agalsidase antibodies.

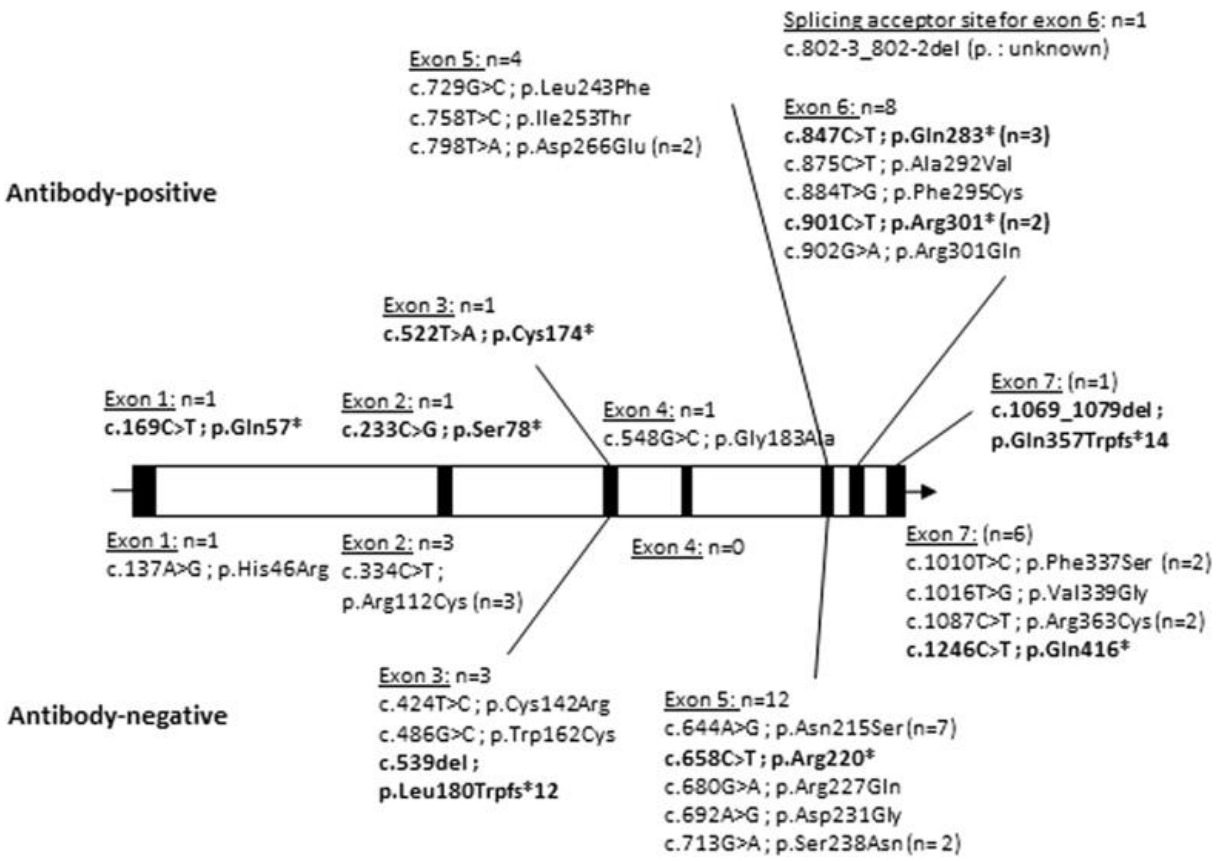


Figure 2. Distribution of *GLA* mutations observed in men treated with agalsidase; mutations leading to truncated proteins (MTPs) are shown in bold. The genotype was not available for two antibody-negative men.

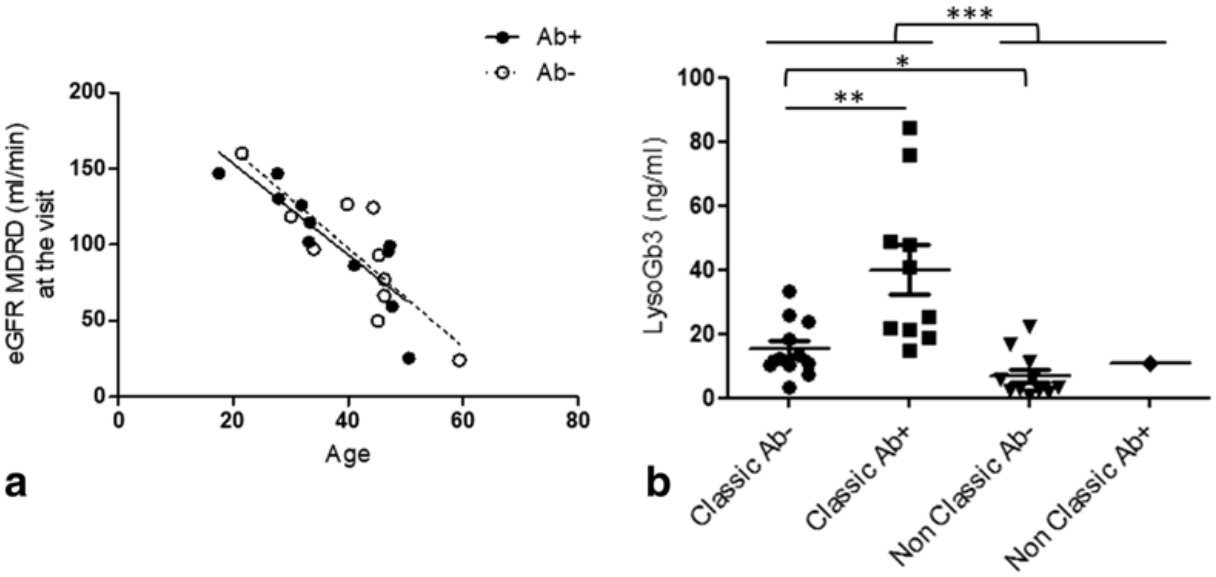


Figure 3. a: Distribution and linear regression of the estimated glomerular filtration rates of classic patients over the age according to the antibody status; antibody-positive patients: slope -3.0 ml/min/y, r^2=0.75, p<0.001) vs antibody-negative patients (slope -3.3, r^2=0.71, p=0.002; no difference between curves, p=0.79); b: The lysoGb3 plasma levels in men currently treated with agalsidase according to their phenotype and antibody status. The lysoGb3 levels are higher in classic patients (median 21.1 ng/ml [IQR 11.6-37.2] (n=21) vs 4.5 ng/ml [IQR 2.3-11.3] (n=12), Mann-Whitney test, p=0.0005). This difference is confirmed when considering antibody-negative patients only (median 12.5ng/ml in classic patients (n=11) vs 3.2ng/ml in non-classic patients (n= 11) ; p=0.01). Among classic patients only, the lysoGb3 levels are higher in antibody-positive patients (Mann Whitney test, median 33.2 ng/ml [IQR 20.6-55.6] vs 12.5 [10.1-24.0], p=0.005) despite the lack of difference in the time of exposure to agalsidase (Mann Whitney test, median 11.2 y [IQR 4.8-13.1] vs 5.9 [4.0-14.1] p=0.81; data not shown).

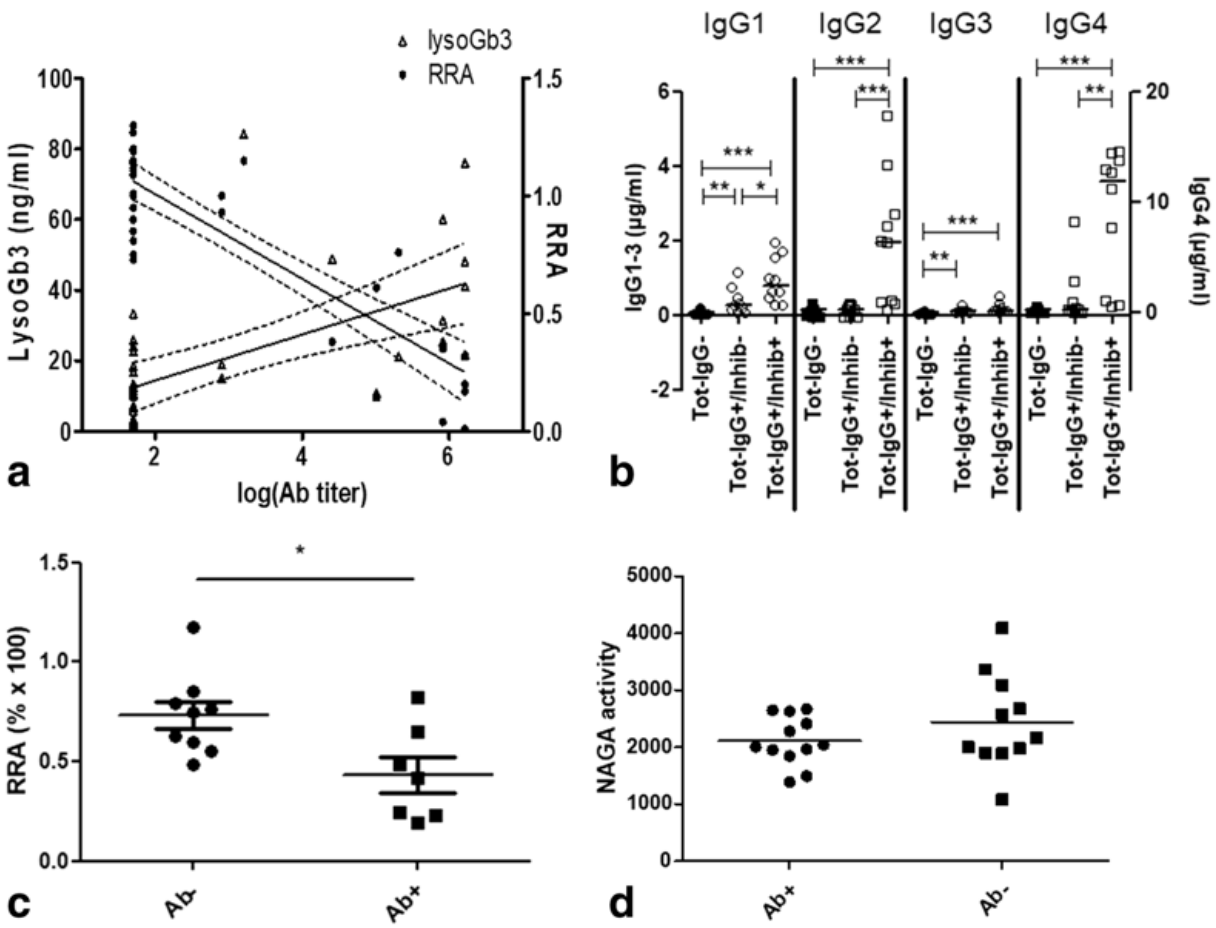


Figure 4. a: Antibody titers are correlated with the *lyso*Gb3 plasma levels (Spearman r=0.63, p<0.0001) and inversely correlated with the residual enzymatic activity (RRA% x100) of agalsidase in sera (Spearman r=-0.74, p<0.0001). b: IgG1-4 subclasses levels (µg/ml) depending on total IgG status (Tot-IgG) and inhibition (inhib+ corresponding to RRA < 0,74), Mann-Whitney test (*: p<0,05; **: p<0,01; ***:p<0,001). c. Alpha-galactosidase A activity is lower in leucocytes cultured with Ab-positive compared to Ab-negative serum (Mann-Whitney test, median: 42.0 (n=7) vs 75.6 (n=9), p=0.04). d. Anti-agalsidase antibodies have no effect on alpha-galactosidase B (NAGA): there is no difference in NAGA enzyme activity when incubated with Ab-positive or Ab-negative serum (n= 12 and 11 respectively, unit in pmol/min/µg; Mann-Whitney test, p = 0.44)

	Ab-positive	Ab-negative	n*	*p-value*
N	18	27	45	-
Age visit (y.)	43.7 [32.8 – 49.2]	46.3 [41.4 – 59.6]	45	*0.12*£
Age diag (y.)	28.8 [20.1 – 41.5]	41.1 [28.1 – 53.7]	45	*0.09*£
Agalsidase exposure A/B/AB	4/8/6	9/11/7	45	*0.70*
Current migalastat	1	1	45	*1*$
Cumul. Exp. (y.)	10.6 [3.3 – 12.2]	4.3 [3.2 – 7.0]	45	*0.22*£
MTP/Missense	10/8	3/21	42#	*0.006*$
RRA (%)**	0.38 [0.25 – 1.0]	1.10 [0.95 – 1.1]	43	*0.0003*£
LysoGb3* (ng/ml)**	25.4 [18.9 – 48.8]	10.2 [3.1 – 17.1]	33	*0.0005*£
Mainz score total	23.5 [14.0-32.5]	22.0 [15.5-27]	45	*0.74*£
Mainz cardiovascular score	2.5 [0.0 – 9.8]	9.0 [2.5 – 12.5]	45	*0.14*£
Mainz renal score	8.0 [0 – 18]	0.0 [0.0 – 8.0]	45	*0.22*£
Mainz neurological score	5.5 [2.3 – 8.8]	5.0 [1.5 – 8.0]	45	*0.65*£
Mainz general score	4.5 [2.5 – 6.8]	4.0 [1.5 – 6.5]	45	*0.33*£
Dialysis or kidney transplant	6	1	45	*0.012*$
Classic/ Non classic phenotype	17/1	12/15	45	*0.0005*$

Table 1. Clinical characteristics of men exposed to agalsidase (n* : number of patients included in the analysis; median [IQR]; RRA**: patients under migalastat were excluded from the analysis; LysoGb3***: available plasma of patients under agalsidase only, patients under migalastat were excluded from the analysis; MTPs: mutations leading to a truncated protein (deletion, frameshift or non-sense mutations); MSSI: Mainz severity score index; IQR: interquartile range; RRA: relative residual activity; £ : Mann-Whitney test; $: Fischer's exact test; # : the genotype was unavailable for 3 patients).

	Age (y.)	Mutation		ERT		Ab Titer ag. alfa	Ab Titer ag. beta	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	RRA alfa	RRA beta	*lyso*Gb3 (ng/ml)	Renal event	Clinical phenotype	MSSI				
				Exposure													total	cardio-vasc	general	neuro	renal
				Type	Time (months)																
1M	43.8	c.233C>G	p.Ser78*	B	182.0	1638400	1638400	++++	++++	++++	++++	4%	1%	41.0	yes	Classic	45	15	7	5	18
2M	33.4	c.847C>T	p.Gln283*	B	159.3	1638400	1638400	+++	++++	++++	++++	42%	32%	48.0		Classic	14	9	2	3	0
3M	47.7	c.522T>A	p.Cys174*	B	3.2	1638400	1638400	++++	+++	+++	+	20%	17%	21.7		Classic	12	0	4	0	8
4M	46.1	c.901C>T	p.Arg301*	A	78.2	819200	819200	++++	++++	++++	++++	41%	35%	60.0		Classic	28	3	11	14	0
5M	33.2	c.548G>C	p.Gly183Ala	A/B	157.4	1638400	1638400	++++	++++	+	++++	20%	20%	76.0		Classic	11	0	9	2	0
6M	43.3	c.169C>T	p.Gln57*	A/B	170.4	819200	819200	++++	++++	++++	++++	3%	4%	31.3	yes	Classic	45	17	4	6	18
7M	47.3	c.847C>T	p.Gln283*	B	156.2	819200	819200	++++	++++	++	++++	46%	36%	25.4		Classic	12	10	2	0	0
8M	50.6	c.802-3_802-2del	unknown	B	16.0	204800	204800	++++	++	+++	++++	98%	76%	na		Classic	38	18	5	7	8
9M	32.7	c.884T>G	p.Phe295Cys	B	46.6	102400	102400	++++	no	no	no	mig	mig	10.0	yes	Classic	29	0	2	9	18
10M	59.1	c.758T>C	p.Ile253Thr	A	7.8	102400	102400	++++	no	++	++	75%	61%	10.8		Non classic	23	13	1	1	8
11M	17.5	c.902G>A	p.Arg301Gln	B	5.1	102400	102400	++++	++	+	++++	40%	29%	NA		Classic	14	0	6	8	0
12M	27.7	c.901C>T	p.Arg301*	A/B	69.3	25600	12800	+++	+++	++	++++	54%	38%	48.8		Classic	19	2	6	11	0
13M	52.1	c.798T>A	p.Asp266Glu	A/B	116.1	12800	12800	++++	++	++	no	99%	103%	na	yes	Classic	34	0	8	8	18
14M	49.8	c.847C>T	p.Gln283*	B	133.5	1600	1600	++++	+	+	no	144%	115%	84.2	yes	Classic	31	7	4	2	18
15M	41.1	c.1069_1079del	p.Gln357Trpfs*14	A/B	146.3	800	800	no	no	+++	++++	142%	100%	18.9		Classic	24	2	9	5	8
16M	31.9	c.875C>T	p.Ala292Val	A	135.7	800	800	+++	no	++	++++	114%	93%	15.0		Classic	8	3	2	3	0
17M	51.0	c.798T>A	p.Asp266Glu	A	120.5	400	400	+	no	no	no	136%	106%	na	yes	Classic	33	0	5	10	18
18M	27.9	c.729G>C	p.Leu243Phe	A/B	151.0	100	100	no	no	++	no	141%	110%	na		Classic	18	0	4	14	0
19F	65.3	c.695T>C	p.Ile232Thr	A	1.8	6400	6400	no	no	+	no	120%	110%	1.5		NA	19	15	4	0	0
20F	43.2	c.486G>C	p.Trp162Cys	B	10.2	12800	50	+	no	no	no	126%	113%	4.3		NA	13	0	1	8	4

Table 2. Characteristics of the antibody-positive patients (M: males; F: female; A: agalsidase alfa; B: agalsidase beta; na: not available; NA: not applicable; Ab titers observed against agalsidase alfa (ag. alfa) or beta (ag. beta); Renal event defined as estimated glomerular filtration rate below 15ml/min/1.73m² and/or kidney transplant and/or dialysis; MSSI: Mainz Severity Score Index with total, cardiovascular (cardio-vasc), general, neurological (neuro) and renal scores). RRA was considered not informative in the patient #9 under migalastat (mig).

Problématique n°2 : « Deep immune profiling of PBMCs in Fabry disease »

Caractérisation phénotypique approfondie des leucocytes circulants au cours de la maladie de Fabry

Alors que l'implication de mécanismes inflammatoires dans la physiopathologie de la maladie de Fabry est aujourd'hui admise, les leucocytes circulants n'avaient été étudiés qu'au cours d'une seule étude sans caractérisation des sous-populations leucocytaires. Grâce à la cytométrie de flux couplée à la spectrométrie de masse (CyTOF®) qui permet l'étude simultanée d'une trentaine de marqueurs, nous avons cherché à décrire en profondeur les caractéristiques phénotypiques des populations et sous-populations leucocytaires, ainsi que l'impact éventuel de l'enzymothérapie, des anticorps anti-agalsidase ou encore l'influence des phénotypes cliniques.

Vingt-neuf patients (classiques n=16, non-classiques n=13) ont ainsi été comparés à 10 contrôles non malades avec une approche statistique double : tout d'abord l'usage de tests non supervisés tels Spade pour le *gating*, Citrus et FlowSOM pour l'identification de phénotypes spécifiquement différents au cours de la maladie puis un contrôle manuel avec un *gating* bivarié séquentiel classique.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence :

- Une diminution significative des lymphocytes T CD4+ CD45RA+CCR7- et des perturbations dans la maturation des lymphocytes T CD4 et CD8 chez les patients Fabry traités ou non. Les cellules CD45RA+/-CCR7- avaient une expression accrue de CD27 et une diminution symétrique de CD57. Les lymphocytes T CD4 CD45RA+/-CCR7- CD57+ en nombre restreints exprimaient par ailleurs d'avantage le CD95, faisant suspecter une apoptose accrue. L'expression de CCR7 était inversement corrélée aux concentrations de lysoGb3 et de sphingosine-1-phosphate chez les patients Fabry.

- Un phénotype monocytaire activé avec augmentation de l'expression de CD11b et augmentation quasi-significative de l'expression du HLA-DR

- Une diminution quasi-significative des lymphocytes B chez les patients non traités, sans différence chez les patients traités, sans influence des anticorps anti-agalsidase au sein des patients traités. Il n'y avait pas de différence significative au sein des sous-populations lymphocytaires B.

- Une augmentation significative du pourcentage de cellules NK chez les patients traités par agalsidase beta par rapport aux patients non traités, traités par agalsidase alfa ou aux contrôles non malades.

- L'absence de différence dans l'expression du CD1d des monocytes et cellules NK et l'absence de spécificité des cellules invariant Natural Killer T qu'aurait suggéré l'augmentation du Gb3.

- L'absence de différence phénotypique leucocytaire associée à la présence d'anticorps anti-agalsidase.

Deep immune profiling of PBMCs in Fabry disease

Mauhin W, Dzangue-Tchoupou G, Amelin A, Corneau A, Douillard C, Dussol B, Leguy-Seguin V, D'Halluin P, Noel E, Zenone T, Matignon M, Maillot F, Ly KH, Besson G, Willems M, Labombarda F, Masseau A, Lavigne C, Froissart C, Lacombe D, Ziza JM, Hachulla E, Lidove O, Benveniste O

(Nota bene: the present version of the manuscript has not been validated by all the co-authors)

Introduction:

Fabry disease is an X-linked disorder characterized by defects in the alpha-galactosidase A enzyme activity that leads to a ubiquitous accumulation of glycosphingolipids, mainly of globotriaosylceramide (Gb3). The clinical spectrum of Fabry disease is wide, with two main phenotypes (1). The *classic* disease is characterized by acral pains, progressive renal failure, cerebral strokes and hypertrophic cardiopathy whereas the *non-classic* phenotype is almost exclusively characterized by a cardiac involvement (1). Enzyme replacement therapy (ERT) has been the historical treatment of Fabry disease, credited with benefits concerning renal and cardiac disease progression (2). Nevertheless some patients seem not to benefit from the treatment and the development of a humoral response has been observed in the more severe phenotype (3,4). The physiopathology of Fabry disease is not elucidated but numerous clues incline to think that inflammatory processes are involved in, as observed in several lysosomal storage diseases (5,6). Hence, secretion of pro-inflammatory cytokines (7), pro-inflammatory modifications of the lipid rafts (8), oxidative stress (9), autophagic dysfunctions (10) have been described or hypothesized in Fabry disease. The characteristics of leucocytes in Fabry disease have only been investigated in an only study using conventional flow-cytometry, which revealed a decrease in monocytes expressing lower CD1d but higher HLA-DR, and a decrease in CD8+ cells and myeloid dendritic cells (11).

Taking advantage of the mass cytometry that allows a simultaneous screening of 36 markers at the single cell level, we aimed to describe more precisely the immune phenotype of leucocytes in Fabry disease patients and study the impact of anti-agalsidase antibody, treatment and clinical phenotype on leucocytes immune profile.

Patients and methods

Patients

Twenty-nine male Fabry patients from the FFABRY cohort were included in the study (table 1). The multicenter cohort FFABRY prospectively gathers clinical data and biological samples from patients with an enzymatic and/or genetic diagnosis of Fabry disease. The patients were sorted according to their phenotype: patients without acral pain or cornea verticillata were referred to as *non-classic* Fabry patients (n = 13, median age 47.7y., [minimum 17.1 – maximum 74.2y.]), others were referred to as *classic* (n = 16, median age 32.3y. [17.5 – 52.1y.]). Heparinized blood sampled from healthy donors (n = 10, median age 42.0y. [29.0 – 55.0]) was obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS) at the Pitié-Salpêtrière University Hospital. Legal authorizations were obtained from the *Comité consultatif sur le traitement de l'information en matière de recherche dans le domaine de la santé (n°14.324bis*) according to the relevant French legislation. Clinical data had been prospectively collected through a standardized online form.

Samples

Heparinized blood samples were collected at the time of inclusion and centralized in our research unit for isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using Ficoll-Hypaque™ gradient centrifugation technique before congelation at -80°C in fetal-calf-serum (FCS, Life Technologies, Saint-Aubin, France, Catalog # 10270106) supplemented with 10% Dimethyl Sulfoxide at -80°C. Plasma was isolated by centrifugation using BD VacutainerTM heparin tubes, before congelation at -80°C.

Anti-agalsidase antibodies

Anti-agalsidase antibodies were screened in all patients as previously described (12). Briefly, ELISA plates (96-well Nunc® Maxisorp, Denmark) were coated with 5 µg/ml of agalsidase alfa (Replagal™, Shire) or beta (Fabrazyme®, Sanofi-Genzyme). Plates were blocked with 2% DPBS-bovine serum albumin (DPBS-BSA) and filled with patient sera (1:100 and subsequent serial two-fold dilutions if positive). Goat anti-human IgG (1:20,000 dilution, Novex®, Thermo Scientific™, France) coupled to horseradish peroxidase was used as secondary antibody. After incubation with tetramethyl benzidine (TMB, Biolegend®), the reaction was stopped (1 M H3PO4), and the absorbance was measured with the Spark 10M® reader (Tecan Trading AG, Switzerland).

LysoGb3 and Sphingosine-1-phosphate (S1P) determination

LysoGb3 and S1P were determined respectively in plasma and serum when available. The lysoGb3 concentration was measured in available plasma samples by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) as previously described (12). Sphingosine-1-phosphate serum concentrations were determined with a Human S1P ELISA kit (catalog E-EL-H2583 - Elabscience, Houston, USA) as mentioned in the technical note. Briefly, 100µl of plasma were added in each well for 90min at 37°C, plasma were removed and 100µl of biotinylated Ab were added 1hour at 37°C. After washes, Horse radish-peroxidase (HRP) conjugate was added for 30min at 37°C before new washes. The substrate reagent was incubated for 15min at 37°C then the reaction stopped. Optical density was read at 450nm with a Spark 10M® reader (Tecan Trading AG, Switzerland) and concentrations determined with a standard curve.

Mass cytometry

Thirty-six metal conjugated antibodies, viability staining and Iododeoxyuridine (IdU) were obtained from Fluidigm (Les Ulis, France) (supplementary table 1). Immunostaining and data acquisition were performed as previously described with slight modifications (13). Briefly, PBMCs (minimum 3.10^6 per patient) were thawed at 37°C in a water bath then washed twice with 10 ml of RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Saint Quentin, France, Catalog # R8758) supplemented with 10% FCS in 50 ml polypropylene conical tubes. Cells were washed in RPMI-1640 alone then incubated with 50µM Cell-ID^{TM} Iododeoxyuridine (IdU, Catalog # 201127, Fluidigm, Les Ulis, France) for 25min and incubated with 5µM Cell-ID^{TM} Cisplatin (Catalog # 201064, Fluidigm, Les Ulis, France) 5min. Cells were washed in staining buffer (SB = Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) plus 0.05% bovine serum albumin) and counted before incubation with metal conjugated antibodies. Incubation was performed in 2 steps: first with anti-CCR7, anti-CXCR5 and anti-CD45RA antibodies for 15min, then with all other cell surface antibodies for 30min more. Cells were washed twice in SB and maximum 3.10^6 cells were resuspended in BD Cytofix Cytoperm buffer for 20min. Cells were washed twice in BD Wash/Perm buffer then incubate with respective barcodes for 30min. Barcoded cells were washed 3 times with SB and mixed in an only 5ml polypropylene tube before 1h incubation in BD Wash/Perm buffer. After 2 washes with BD Wash/Perm buffer, cells were resuspended with the mix of intracellular markers in BD Wash/Perm buffer for 1h. After 2 washes in BD Wash/Perm buffer and one wash in SB, cells were resuspended in 125nM solution of Cell-ID^{TM} Intercalator Ir overnight at 4°C.

Data acquisition

Cellular events were acquired on the Helios (Fluidigm). Cells were acquired at a speed of 300 events per second, with a cell length threshold between 10 and 150 pushes. The 4 elements EQ beads were used to normalize files using the Matlab compiler software cell normalizer. Data files were obtained in the FCS file format and analyzed using Cytobank cloud based platform and the *cytofkit* package for R (14). Beads and debris were gated out using the following gates: 133Cs/131Xe, 138Ba/137Ba, 140Ce/139La and 115In/120Sn. Cisplatin-positive were gated out as dead cells. CD45+ viable singlets events were selected for the analysis of the different cell populations. We performed two different gating strategies. First an unsupervised strategy using Spade analyses (downsampled events target 10%, target number of node = 200) with the following clustering channels CD3 (T lymphocytes), CD4, CD8, CD19 (B cells), CD138 (plasma cells), CD14 (Monocytes), CD56 (NK cells), CD16, Valpha24J18 (invariant Natural Killer T (iNKT) cells) then CD3+CD4+ (CD4 T lymphocytes) and CD3+CD8+ (CD8 T lymphocytes) subpopulations were analyzed using another Spade analysis with the following parameters (downsampled events target : 10%, target number of node : 200, clustering channels : CD27, CD28, CD127, CD95, CCR7, CD45RA, CXCR5, CD57, CD25) to further investigate the CD45RA+CCR7+ (Naive), CD45RA-CCR7- (Effector Memory or EM), CD45RA-CCR7+ (Central Memory or CM) and CD45RA+CCR7- (terminally differentiated effector memory cells re-expressing CD45RA or TEMRA) subsets. All these populations were separately analyzed using Citrus algorithm to identify differences in abundance between groups of patients (parameters as follows with clustering markers : CD24, CD25, CD27, CD28, CD56, CD57, CD95, CD127, CCR7, CD45RA, CXCR5, RORgamma-t, CRTh2, Tbet, FoxP3, HLA-DR ; groups : Classic Fabry, Non Classic Fabry patients and controls ; association models: Nearest Shrunken Centroid (PAMR) ; predictive cluster characterization: Abundance ; event Sampling: Equal ; minimum cluster size 5%). FlowSOM algorithm was also used to compare groups of patients and identify cluster specificities (k=20). Secondly, we performed a classical manual sequential bivariate gating strategy on Cytobank platform (see supplementary data 2).

Statistical analysis

Mass cytometry experiments were performed during four different days, using a constant ratio of Fabry patient to controls samples during the four days and using two identical iterative controls (IC). In the non-supervised strategy, data from the two IC acquired at day 2, 3 and 4 were excluded. In the supervised classical strategy, mean data (day 1 to 4) from IC were used.

Two-sided non parametric tests were used to assess differences between groups (Kruskall-Wallis (KW) and Mann-Whitney (MW)) and correlation (Spearman). Two-sided parametric tests (ANOVA, t-tests, linear regression, Pearson correlation tests) were used after day-correction using the following transformation: $Y_{i,\ day\ D} = [X_{i,\ day\ D} - \text{mean}\ (X_{IC,\ Day\ D})]\ /$ standard deviation $(X_{IC,\ Day\ D})$ to limit possible bias from cell preparation and data acquisition between days. The risk alpha for significance was established at 0.05. GraphPad Prism 5.0 and the EZR plugin version 1.35v [11] packages for the R software were used for statistics.

Results

Analysis of the principal PBMCs subpopulations: CD4+ TEMRA and B cells are decreased in Fabry patients

Using unsupervised clustering as well as classical bivariate gating, we did not observe significant differences between Fabry patients and control in the percentages of CD14+ monocytes (respective median [interquartile (IQR)] 31.30% [24.07-39.46] vs 29.60 [23.23-37.98]; p= 0.6), CD56+ Natural Killer (NK) cells (7.44% [5.73-12.45] vs 5.71% [4.06-8.15]; p=0.1), Valpha24J18 invariant NK T cells (0.05% [0.03-0.07] vs 0.06% [0.04-0.08], p=0.5), CD3+ T lymphocytes (43.07% [37.17-49.46] vs 46.16% [38.04-54.40]; p=0.5), CD4+ T cells (21.34% [20.61-28.87] vs 27.78% [24.02-35.07]; p=0.1) and CD8+ T cells (12.89% [11.08-17.67] vs 14.17% [11.74-24.34]; p=0.6). Also we did not observe differences between both Fabry phenotypes or between antibody-positive (Ab+) and antibody-negative (Ab-) Fabry patients.

Concerning the percentage of CD19+ B cells among CD45+ singlets, there was a trend for a decrease in Fabry patients (Fabry = 4.47% [3.05-6.03]; control = 6.15% [4.50-7.75]; p=0.09). Untreated Fabry patients had lower percentage of B cells, without difference between phenotypes (untreated 3.72% [2.42-4.82], treated 5.30%, [3.68-7.19], controls 6.15% [4.50-7.75]; KW p = 0.04; MW treated vs untreated p = 0.06, figure 1). There was a trend for a lower percentage of naïve cells (CD19+CD27-IgD+) among B cells in untreated compared to treated patients (median 47.25% [33.42-60.27] vs 60.87% [47.90-71.21]; p<0.1)

Concerning subpopulations of CD4 T cells, we observed a significant decrease in CD45+CCR7- TEMRA cells among CD4+ T cells in Fabry patients (median 2.00% [1.41-3.64] vs 4.34% [2.69-7.31]; p = 0.03; figure 1), which was confirmed with day-corrected data (p=0.03), not correlated with the age (p=0.7) and independent from the Fabry phenotype. We observed the same trend for TEMRA cells in the CD8+ T cells compartment that principally affects the classic patients but the difference was only due to the age in a multivariate regression model. We did not observe any difference in the naïve, EM or CM CD4 or CD8 subsets.

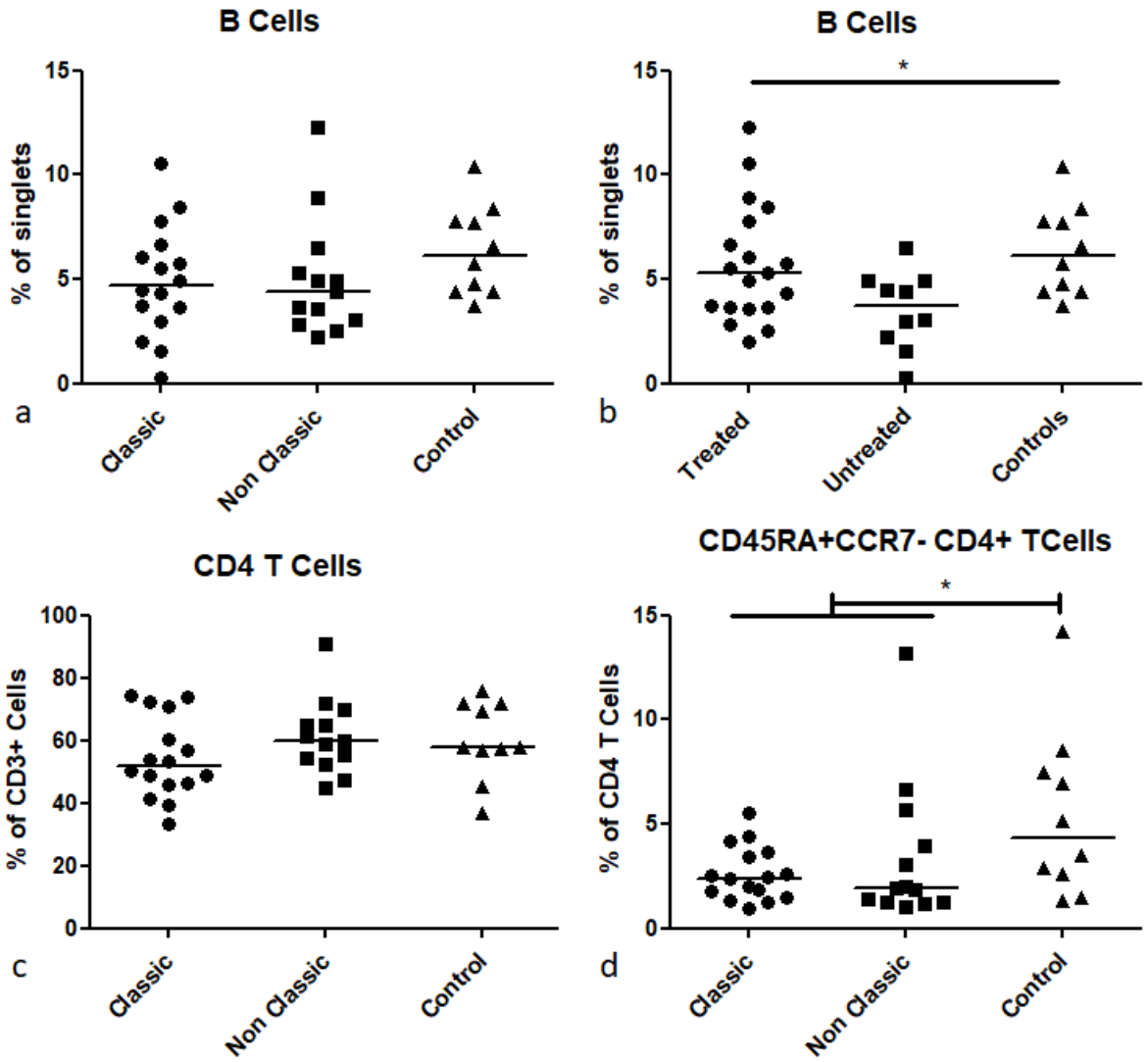


Figure 2. Percentages among CD45+ singlets of B cells (a, b), CD4 T Cells (c) and CD45RA+CCR7- CD4 T Cells (d); * $p < 0.05$

Unsupervised analysis of CD4 T cells subsets (Naïve, EM, EM and TEMRA)

Whereas we observed a significant decrease in the percentage of CD4+ TEMRA cells in Fabry patients, we investigated whether the CD4+ different subpopulations expressed specific phenotypes during the disease. The FlowSOM analysis of CD4+ cells (k = 20; clustering marker CD45RA, CCR7, FoxP3, RORgamma-t, CRTh2, Tbet, CD27, CD28, CD127, CD56, CD57, CD25, CD95, CD38 and CXCR5) identified eight clusters increased in Fabry patients (Fabry classic > Fabry non-classic > controls). Among them, 3 concerned the EM (CD45RA-CCR7-) population and were CD27+/-CD127+/-CD28+CD57-CD95+. The 8 other increased clusters belonged to the CM (CD45RA-CCR7+) population and were CD27+CD28+CD127+CD57-.

Five clusters were decreased in Fabry patients (Fabry classic < Fabry non-classic < controls). Among them, one concerned the TEMRA (CD45RA+CCR7-) subset being CD28-CD27-CD127-CD57+CD95+. Another concerned the naïve (CD45RA-CCR7-) subset being CD28+CD27-CD127+CD57-CD95+. Three other naive clusters (CD45RA+CCR7+) were CD28-CD27+CD127+CD95-CD57- (see supplementary data 3).

Because the 20 different clusters identified by FlowSOM may not be representative enough of the CD4+ cells diversity, we performed Citrus analyses on the different CD4+ main subsets (Naïve, CM, EM and TEMRA).

Concerning the CD45RA+CCR7- TEMRA population, 31 different clusters were then identified. Of them, the abundance of nine was increased and 11 decreased in Fabry patients compared to controls. The nine increased clusters could be separated into 3 main phenotypes: CD27+CD28-CD127- CD57low, CD27-CD28intCD127+CD57- and CD27-CD28-CD127+CD57-. Conversely and in accordance with the FlowSOM analysis, the 11 clusters decreased in Fabry patients were all CD27-CD28-CD127-CD57+ (figure 2).

Concerning EM, CM and Naïve subsets, Citrus analyses were not concluding because of a high false discovery rate.

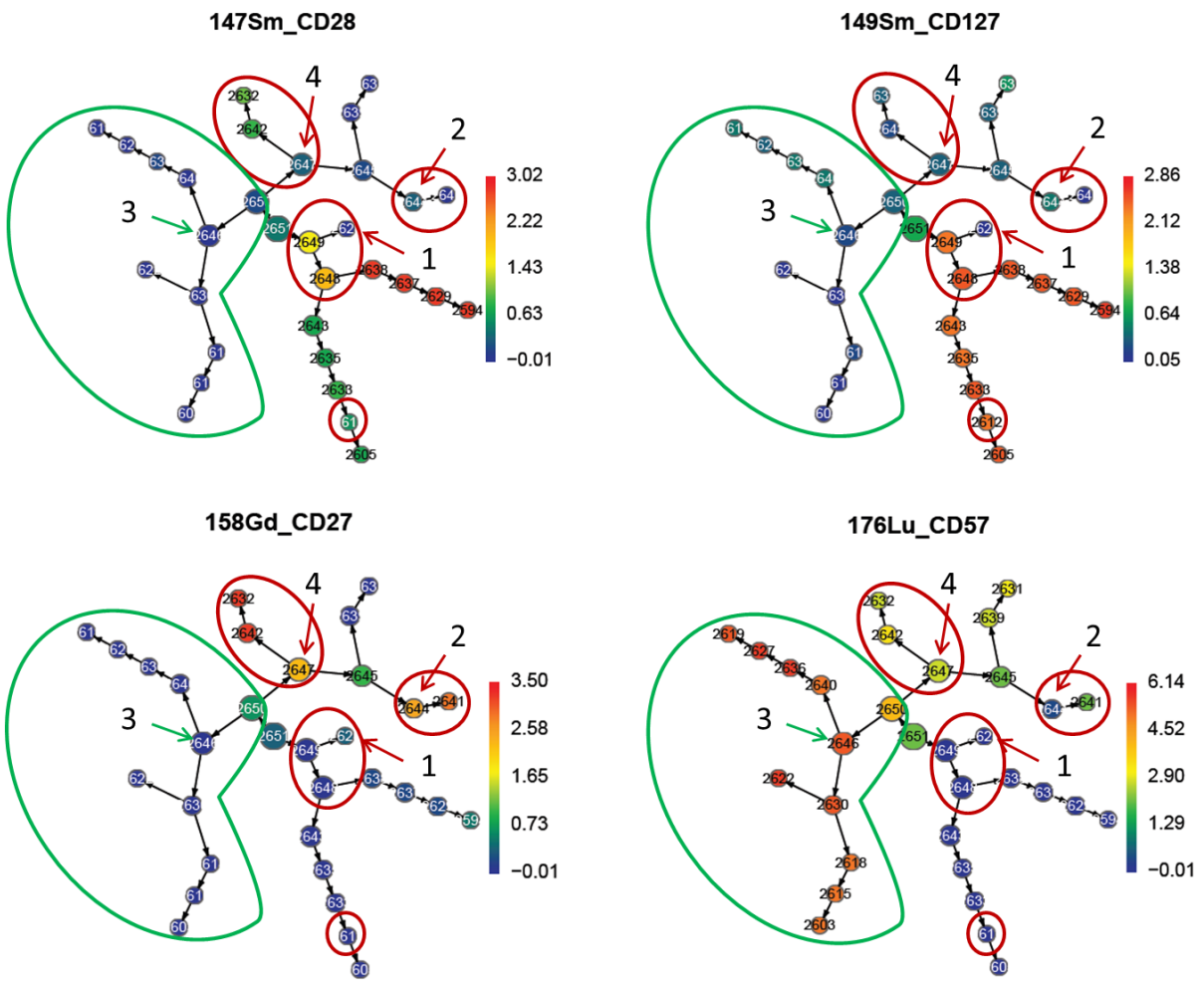


Figure 3. CD27, CD28, CD57 and CD127 expression in the clustered nodes identified by Citrus in the CD45RA+CCR7- CD4 population: red circles identify clusters increased in Fabry patients, green circle identify clusters decreased in Fabry patients

Classical bivariate gating confirmed the increased ratio of CD27+ / CD57+ cells in CCR7- CD4 T cells in Fabry patients.

We first focused on the expression of the co-stimulatory markers CD27 and CD28 (15) highlighted with the unsupervised approach. Percentage of CD27-CD28- among CD4+ cells were decreased in Fabry patients whatever their phenotype (median [IQR] in classic 1.86% [0.86-2.60], non-classic 1.95% [1.14-7.57], controls 5.32% [2.44-12.93]; KW p = 0.04; all Fabry 1.95% [1.11-3.91] MW p = 0.03, trend confirmed with day-corrected data, t-test p = 0.1). Percentage of CD27+ among TEMRA and EM cells were significantly increased in Fabry (respectively 64.18% [56.45-74.27] vs 28.78% [17.52-44.42], MW p = 0.006, day-corrected data p = 0.002 for TEMRA and 61.08% [53.10-69.24] vs 47.05% [42.23-53.18], MW p =0.009, day-corrected data p < 0.01 for EM; figure 3). Also, percentages of CD28-CD127- cells among TEMRA and EM populations were significantly decreased (respectively

8.92% [5.70-20.03] vs 35.40% [11.97-43.48], MW p = 0.04, day-corrected data p = 0.009 for TEMRA and 4.68% [3.94-9.78] vs 12.91% [8.59-18.06], MW p = 0.004, day-corrected data p = 0.01 for EM). Inversely, percentages of CD28+CD127+ cells in TEMRA population were higher in Fabry classic patients (classic 72.32% [61.67-81.47], non-classic 63.16% [31.73-70.41], controls 39.45% [27.15-69.12], KW p = 0.006, day-corrected data ANOVA p = 0.0008) and significantly increased for both Fabry phenotypes compared to controls in EM population (71.63% [61.36- 77.30] vs 57.96% [52.64- 63.26], MW p = 0.01, day-corrected data p = 0.03).

CD27 and CD28 expressions are supposed to be mutually exclusive with the one of the replicative senescence marker CD57 (15). Indeed, we observed an increased ratio of CD27+ to CD57+ cells in Fabry CD3+ cells (Fabry classic 35.81 [16.72-53.62], non-classic 10.25 [4.26-22.04], controls 5.37 [3.84-12.53], KW p < 0.009, MW Fabry vs control p = 0.052), CD4+ cells (Fabry classic 661.7 [465.1-778.2], non-classic 235.5 [15.2-493.6], control 23.1 [7.5-225.7], KW p = 0.006, MW Fabry vs controls p < 0.03), CD4 EM (classic 181.8 [83.4-247.5], non-classic 21.0 [2.1-41.8] controls 2.1 [1.2-39.7], KW p = 0.0003, MW Fabry vs controls p < 0.02) and CD4 TEMRA (classic 52.1 [18.1-72.3], non-classic 3.8 [0.4-29.2], controls 0.5 [0.2-12.7], KW p = 0.0006, MW Fabry vs controls p < 0.02; figure 3). Interestingly we observed increased percentages of CD127+CD28+ among CD27-CD57+ TEMRA and EM CD4 cells in classic Fabry patients compared to non-classic and controls (respectively, in CD27-CD57+ TEMRA classic 44.95% [7.06-56.28], non-classic 13.08% [2.79-22.30], controls 5.07% [2.90-27.65], KW < 0.02, ANOVA on day-corrected data p < 0.003 ; in EM classic 55.76% [40.05-66.13], non-classic 24.21% [11.64-46.25], controls 15.84% [6.71-33.98], KW < 0.02, ANOVA on day-corrected data p = < 0.007). These different results were not correlated with the age of the patients (Spearman test on raw data, multivariate linear regression on day-corrected data).

CD95 expression is increased in CD57+CD27- TEMRA and EM CD4 cells

Whereas TEMRA CD4 subset was decreased in Fabry patients, we focused on the expression of the death-inducing receptor CD95 (16). The expression of CD95 was increased in TEMRA CD4 from Fabry patients (mean MMI 59.3 +/- 16.7 vs 42.5 +/- 18.8, t-test p = 0.01). Also, as the CD57+ population appeared decreased among CD4 T cells of Fabry patients, we studied the expression of CD95 in CD57+CD27- CD4 T cells and observed an increase in Fabry patients (mean MMI 58.8 +/- 28.1 vs 32.3 +/- 14.6, t-test p = 0.007, figure 3).

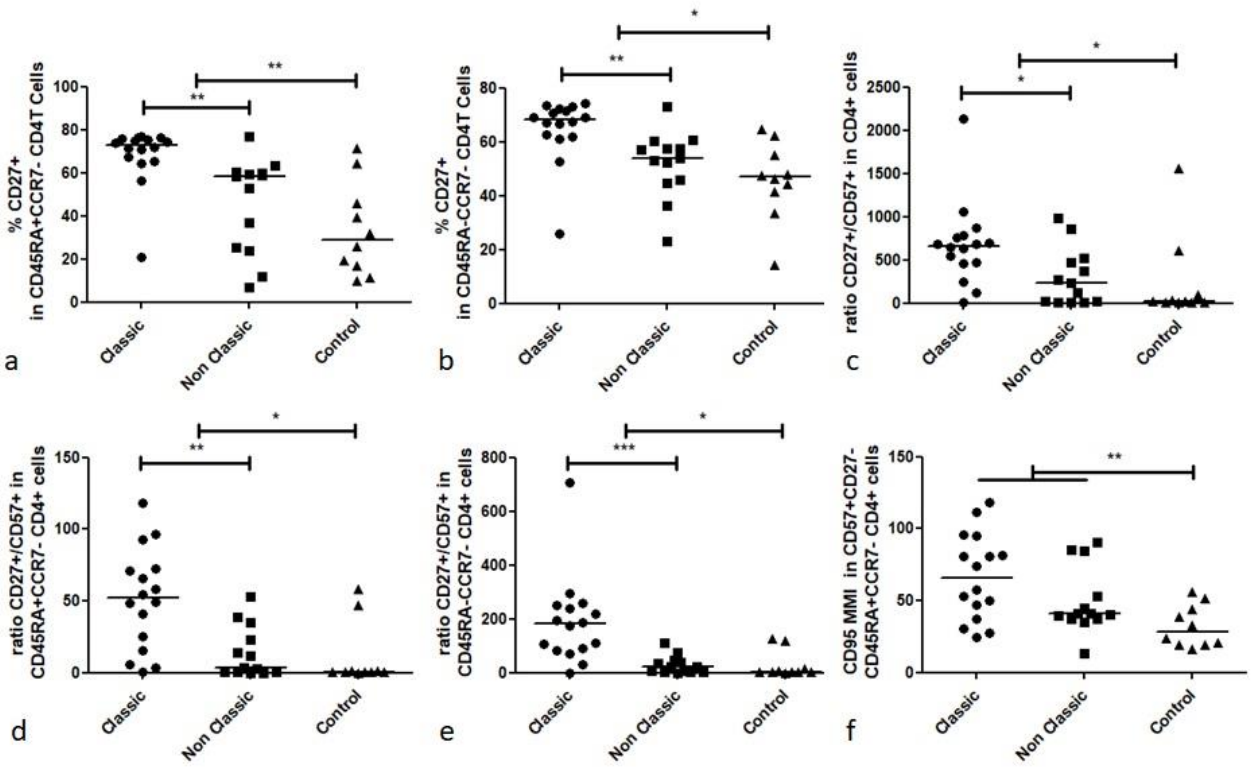


Figure 4. Percentage of CD27+ cells are increased in TEMRA (a) and EM (b) CD4 T cells of Fabry patients, the ratio CD27/CD57 is increased in CD4 T Cells (c), especially in TEMRA (d) and EM (e) CD4 T Cells of Fabry patients, CD95 expression is increased in CD57+ cells in Fabry patients (f). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

LysoGb3 and Sphingosine-1-phosphate concentrations correlate with the expression of CCR7 in CD4+ cells

Because the main disturbances were observed in CCR7- cells, we investigated the possible association between S1P, lysoGb3 and the expression of CCR7. Because S1P receptors and CCR7 have antagonistic functions and lysoGb3 could theoretically mimic and compete S1P thanks to its sphingoid base (17,18), we analyzed lysoGb3 and S1P together compared to their respective normal values observed in literature for healthy controls (mean lysoGb3 = 0.31ng/ml, mean S1P = 161pg/ml (19,20)), and defined the sphingoids burden such as log(*sphingoids*) = log(lysoGb3/0.31) + log (S1P/161). The log(*sphingoids*) highly correlated with the percentages of CD4+ CCR7+ and CCR7- cells (% CCR7+ cells, r = -0.61 p = 0.01; % CCR7- cells, r = 0.65 p = 0.006; supplementary data 4). Log(*sphingoids*) correlated with the raw CD4 naïve cell count (Spearman, r = -0.54 p < 0.03) whereas there was no significant correlation with CD4 total cells and other CD4 subpopulations suggesting that the positive correlation observed with CCR7- was mainly due to the decreased of naïve cells. We did not observe significant correlation with the expression of CD27 or CD57.

Tbet expression is decreased in Fabry TEMRA CD4 cells

We investigated the expressions of Tbet, crTh2 and RORgamma-t to assess the Th1, Th2 or Th17 polarizations respectively. We noticed a trend towards decreased percentages of Tbet+ CD4 in Fabry patients (median 1.4% [0.9-3.6] vs 5.2% [1.5-10.5], MW p = 0.064) whereas the decrease was significant in CD4 TEMRA cells (median 11.8% [6.1-25.1] in Fabry patients vs 45.5% [31.4-64.1], MW p < 0.01). Also, the mean mass intensities was decreased in TEMRA CD4 cells (median 13.6U [8.9-23.0] vs 37.3U [25.9-51.6], MW p < 0.02). We observed no difference in percentages of positive cells, as well as in mean mass intensities for crTh2 and RORgamma-t.

Unsupervised analysis of CD8 T cells subsets (Naïve, EM, CM and TEMRA)

In the same approach we studied the CD8+ T cell populations. First using the FlowSOM algorithm (k=20, clustering markers: CD45RA, CCR7, FoxP3, RORgamma-t, CRTh2, Tbet, CD27, CD28, CD127, CD56, CD57, CD25, CD95, CD38, CXCR5). Seven clusters appeared increased in both classic and non-classic patients compared to controls, all being CD27+CD57-. Six clusters were decreased in Fabry patients, all CD45RA+CCR7-CD27-CD57+CD95high (See supplementary data 5).

Then, we applied the Citrus algorithm to the main CD8+ subpopulations (naïve, CM, EM and TEMRA) with the following parameters: downsampled events target 10%; target number of node = 200; clustering channels: CD27, CD28, CD127, CD95, CCR7, CD45RA, CXCR5, CD57, CD25). Differences were observed for the CD45RA+CCR7- (TEMRA) and the CD45RA-CCR7- (EM) populations only. Concerning the TEMRA CD8, 32 clusters were identified: seven were increased preferentially in Fabry classic patients (classic > non-classic > controls), all clusters were CD27+CD28-CD127+CD57-. Inversely, nine clusters were decreased in Fabry compared to controls, all CD27-CD28-CD57+ (figure 4). Concerning the EM CD8 cells, Citrus identified 30 clusters. Three clusters were decreased preferentially in Classic Fabry patients (classic < non-classic < controls), all were CD27-CD28-CD127-CD57+. Inversely, two clusters were increased, both were CD27+CD28+CD127+CD57- (see supplementary data 3).

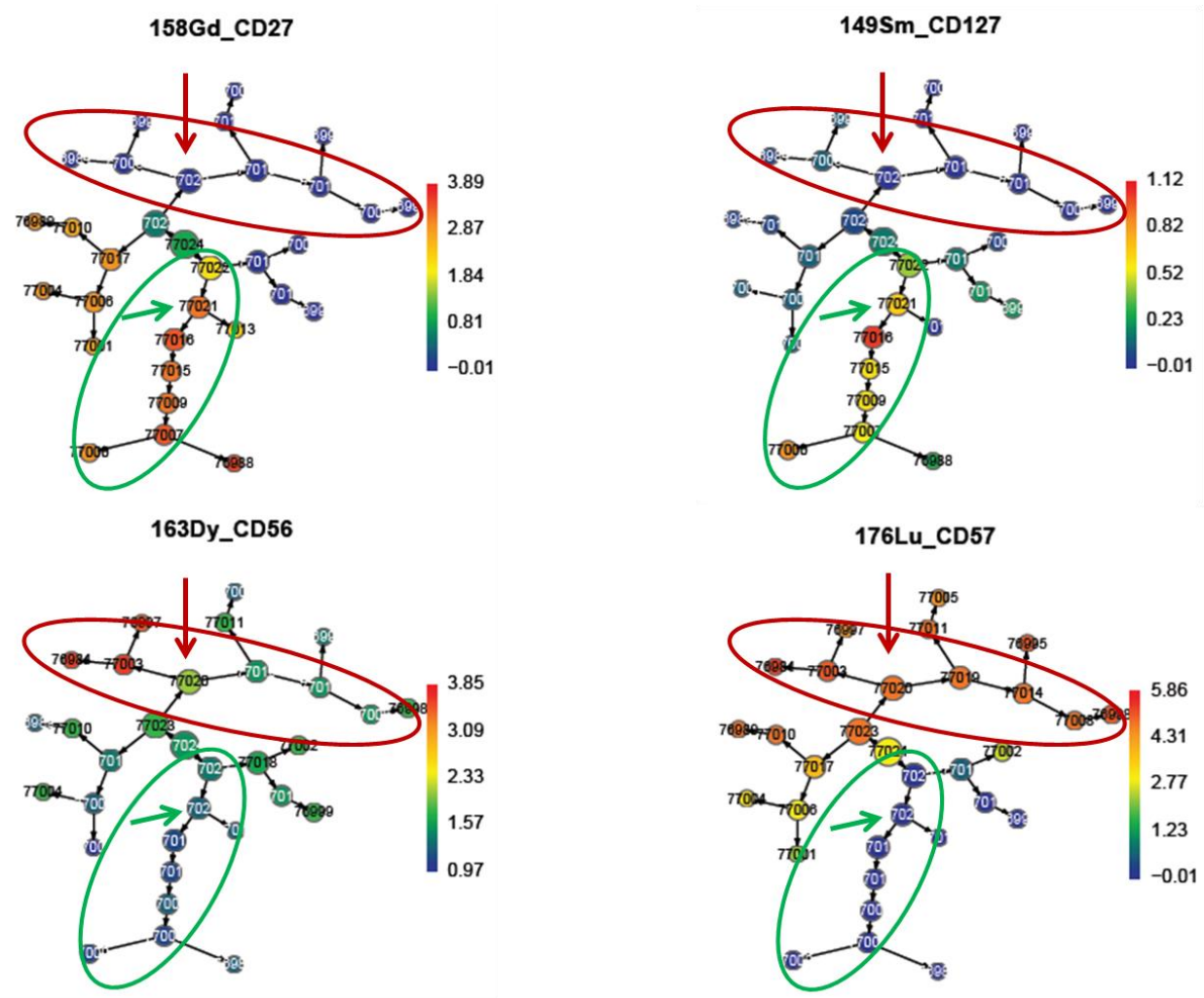


Figure 5. CD27, CD56, CD57 and CD127 expression in the clustered nodes identified by Citrus in the CD45RA+CCR7- CD8 population: red circles identify clusters increased in Fabry patients, green circle identify clusters decreased in Fabry patients

Classical bivariate gating confirmed the increased ratio of CD27+ to CD57+ cells in CCR7- CD8 T cells in Fabry patients (figure 5).

The expression of CD27 was increased in Fabry TEMRA CD8 and EM CD8 independently from the age in a multivariate regression model (median [IQR] % of CD27+ in TEMRA from classic Fabry 66.76% [57.77-75.79], non-classic 45.81% [26.21-61.87], controls 33.84% [20.49-56.85], KW $p = 0.005$, MW Fabry vs controls $p < 0.05$, t-test on day-corrected data $p = 0.1$; median % of CD27+ in EM from Fabry classic 83.61% [78.32-85.60], non-classic 65.76% [58.43-77.41], controls 59.93% [52.46-74.42], KW $p= 0.001$, MW Fabry vs controls $p = 0.003$; day-corrected data t-test $p = 0.03$; multivariate linear regression including the age $p = 0.02$). Symmetrically, percentages of CD57+ populations in TEMRA and EM CD8 cells

were significantly decreased (median [IQR] % of CD57+ in TEMRA CD8 cells from classic patients 40.24% [30.38-52.52], non-classic 62.52% [45.73-69.43], controls 73.96% [43.74-76.52], KW p = 0.004, MW Fabry vs controls p = 0.04, day-corrected data t-test p < 0.003; % CD57+ in EM CD8 from classic patients 12.64% [10.94-17.07], non-classic 33.27% [15.36-36.90], control 24.46% [16.06-41.65], KW p = 0.0034, MW Fabry vs controls p = 0.07, t-test on day-corrected data p < 0.002) and the ratio of CD27+/CD57+ in CD8+ cells was increased in Fabry patients : median in Fabry classic 13.21 [5.96-31.57], non-classic 2.81 [1.89-6.88], controls 2.86 [1.29-5.35], KW p = 0.001, MW Fabry vs controls p < 0.05). In the different CD8 subsets, the expression of CD95 was not different between Fabry and control cells.

Unsupervised analysis of B cells, NK cells, iNKTs and monocytes revealed no difference between Fabry and controls.

Using Citrus algorithm respectively on the CD19+ B cells (clustering markers: IgD, CD5, CD24, CD25, CD27, CD38, CD138, CXCR5, CD1d), NK cells (clustering markers : HLA-DR, CD16, CD56, CD4, CD8, CD27, CD11b, CD1d, CD57, CD24), Valpha24-J18+ iNKT cells (clustering markers CD4, CD8, CD45RA, CCR7, CD27, CD28, CD57) and CD14+ monocytes (clustering markers CD16, CD57, HLA-DR, CD1d) firstly gated with Spade, we did not identify any significant difference between Fabry patients and controls. We did not observe differences with the classical bivariate gating. Interestingly, there was no difference between Ab+ and Ab- patients.

Expression of CD1d on monocytes and NK cells

Antigen presenting cells (APC) can present glycolipids to the Valpha24J18 invariant specific receptor of iNKT cells thanks to the CD1d protein (21). We did not observe significant difference in CD1d expression on monocytes and NK cells between Fabry and controls (figure 5).

Expression of the activation marker HLA-DR and CD11b on monocytes

A pro-thrombotic phenotype has been described in Fabry patients with higher expression of CD11b on monocytes (22). Indeed we observed a significant increase in the CD11b expression in monocytes of Fabry patients (median mean mass intensity (MMI) in non-classic = 221U, classic = 190U, controls = 185; Kruskall Wallis p=0.04; untreated = 230U, treated 198U, control 185U, KW p = 0.058; Mann-Whitney Fabry vs control p=0.09; figure 5). The difference between all the Fabry patients and controls was confirmed with day-corrected data (p<0.04).

We also observed a trend for a higher expression of HLA-DR on monocytes in untreated patients (MMI in untreated = 98.7U, treated = 84.8U, control = 84.9U; KW p = 0.065), confirming an activated phenotype (11,23).

Increased absolute number of NK cells under agalsidase beta

Concerning NK cells, we observed an unexpected difference depending on the treatment the patients received. Patients under agalsidase beta had significantly higher percentages of NK cells (median % [IQR] among CD45+ singlets: 12.45% [8.70-15.46] n = 11) than other Fabry patients under agalsidase alfa (6.46% [4.74-8.83] n=10), migalastat (2.23%, n=1), untreated (6.23% [5.31-9.01] n = 7) and controls (5.71% [3.94-8.62] n = 10; KW p < 0.01; MW agalsidase alfa vs beta p = 0.01; figure 5).

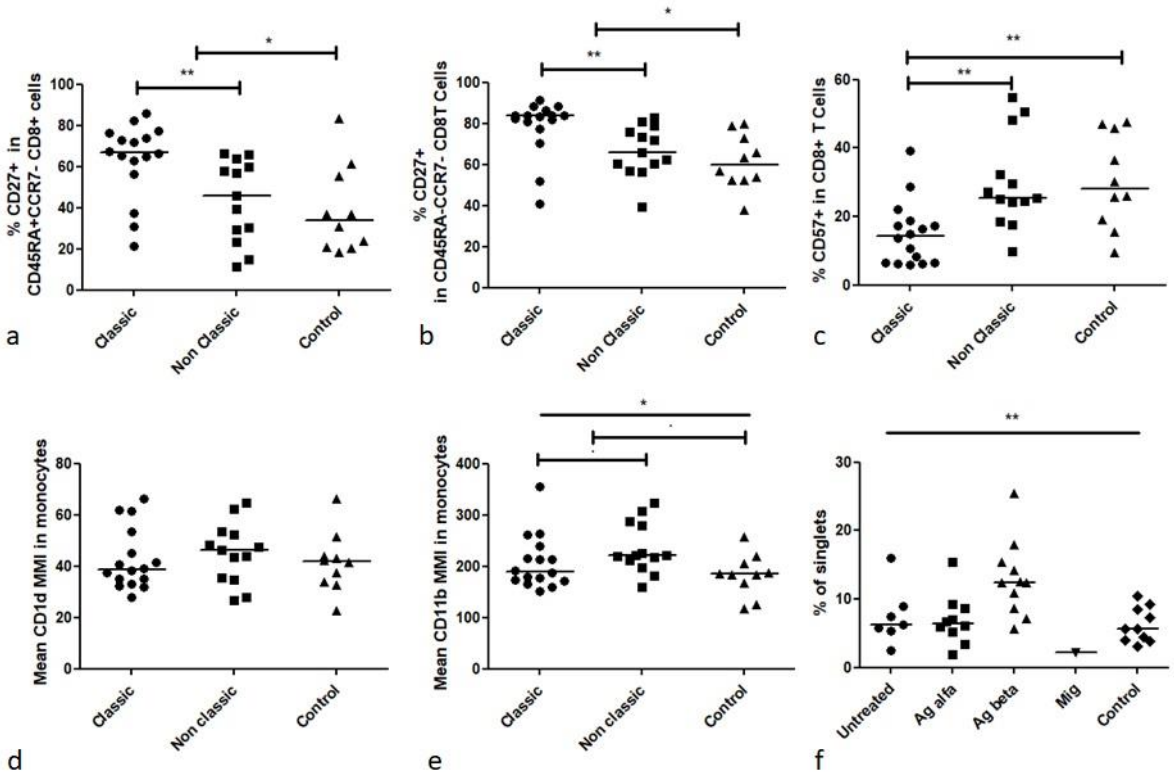


Figure 6. Percentage of CD27+ cells was increased in Fabry TEMRA (a) and EM (b) CD8 cells, inversely percentage of CD57+ cells was decreased in Fabry CD8 T cells (c). CD1d expression was not different in monocytes between Fabry patients and controls (d). Expression of CD11b was different between classic, non-classic Fabry patients and controls (e). Fabry patients under agalsidase (Ag) beta had higher percentages of NK cells compared to patients under Ag alfa or migalastat (Mig) or untreated patients or controls (f). (. p<0.1; * p < 0.05; **p < 0.01).

Discussion:

Although Fabry disease has long been suggested as a pro-inflammatory condition, few studies have investigated the characteristics of leucocytes in the disease (5–7,11,21,22). Taking advantage of the mass cytometry technology and the possible simultaneous analysis of 36 different markers, we identified several disturbances in the leucocytes of Fabry patients. The main observation concerned the imbalance of CD27+ and CD57+ expression in both CD4 and CD8 CD45RA+CCR7- and CD45RA-CCR7- T cells and the decrease in the percentage of CD45RA+CCR7- CD4 T cells in Fabry patients. Since the development of flow cytometry, CD45RA and CCR7 markers have allowed the definition of different differentiation states of T cells. A continuum has first been described in CD8+ T cells then applied to CD4 T cells: the naïve CD45RA+CCR7+ cells encounters their respective antigen acquiring the central memory (CM) phenotype CD45RA-CCR7+ with a high proliferative potential but poor effector function, then the effector memory (EM) CD45-CCR7- with immediate effector functions but limited proliferative potential, then finally the terminally differentiated effector memory cells re-expressing CD45RA (TEMRA) CD45RA+CCR7- with high cytotoxicity but lower proliferative capacity (15,24). TEMRA cells are classically associated with a decreased expression of CD27 and CD28 (15). The expression of the co-stimulatory markers CD27 and CD28 has been described mutually exclusive with the one of the CD57, a marker of immunosenescence (15,24). CD27+CD28+CD57- cells are known to have longer telomeres and release more interferon upon antigenic stimulation (24). Some authors suggest that CD27+CD28+/- CD8 TEMRA cells have an intermediate phenotype between naïve and effector cells whereas CD27-CD28- CD8 TEMRA would consist in late differentiated highly cytotoxic T cells (25). Healthy aging and chronic infections, notably by cytomegalovirus are known to increase the CD57+ populations (15,26,27). The phenomenon has been explained by the chronic antigenic stimulations (15,27). Whereas we could not check for the CMV status of the patients and controls, we carefully take in account the influence of the age in our study. Hence we observed a decrease of the late-differentiated CD57+ T cells and the expansion of less-well differentiated CD27+CD28+/- CD45RA+CCR7- and CD45RA-CCR7- populations. The physiologic significance of abnormally low proportions of CD27- T cells expressing CD57 in Fabry disease remains unclear. However, the unique condition that has previously been described with such disturbance is the early stage of HIV infection where low proportions of CD28-CD8+ T cells expressing CD57 have been described in untreated patients and correlated with increased mortality (26,28,29). The disturbance was corrected

with early introduction of anti-retroviral treatment (29). Glycosphingolipids microdomains have been involved in the fusion of HIV-1 with the plasma membrane of CD4. Indeed, the Gp120 viral protein recognizes the Gb3 and the ganglioside GM3 on the CD4 T cell surface, stabilizing the attachment of the virus and facilitating the conveying to the appropriate co-receptors CCR5 and CXCR4 (30). Interestingly, an accumulation of Gb3 has been observed in CD4 T cells from HIV-1 recently infected patients and was associated with the development of anti-Gb3 antibodies (31). Hence, the Gb3 accumulation may directly explain the imbalance of CD27/CD57 expressions in T cells. The higher expression of the apoptotic marker CD95 in the CD57+ CD4 T cells suggests higher apoptosis-induced cellular death to explain the decrease of CD57+ cells. We could also hypothesize that the excess of Gb3 in the surface membrane disturb the lipid rafts integrity, and so the cell signaling and finally impair the maturation and the activation of T cells (32). Lastly, we were surprised to observe disturbances in the CCR7- T cell populations, knowing that sphingosine-1-phosphate has been implicated in Fabry disease pathophysiology (19), that sphingosine-1-phosphate receptors are known to have antagonistic functions with the CCR7 (17) and that and lysoGb3 could theoretically mimic and compete S1P thanks to its sphingoid base (18). We could therefore hypothesize that immature cells egress from lymphoid organs due to a CCR7/Sphingosine-1-phosphate receptor signal imbalance. This last hypothesis is in accordance with our findings as we observed that lysoGb3 and S1P taken together correlate with a decrease of CD4+ CCR7+ cells. But this hypothetical mechanism would be independent from the imbalance in CD27/CD57 as we did not observe correlation between the sphingoids and the CD27/CD57 ratio neither with the CD8 compartment. Functional studies are necessary to confirm these hypotheses.

Unlike the only previous study on leucocytes in Fabry patients that identified higher percentages of B lymphocytes in Fabry patients (11), we observed lower percentages of B cells in untreated patients that mainly affects the naïve compartment. In B cells, Gb3 is also known as the germinal center B-cell differentiation antigen CD77 and has been implicated in the CD19 internalization leading to apoptosis after anti-CD77 antibodies binding (33). As previously mentioned, such anti-Gb3 antibodies have been described in HIV infected patients accompanying the increase of Gb3 density in the surface membrane (31). To our knowledge, the existence of anti-Gb3 antibodies has never been investigated in Fabry disease. However, such anti-glycolipid antibodies have been described in Gaucher disease, another lysosomal storage disease characterized by the increase of glucosylceramide (34). Thus we could hypothesize that anti-Gb3 antibodies are developed in Fabry disease, and could be involved in

the trend for lower percentage of B cells in the disease due to apoptosis. This hypothesis needs obviously further studies.

CD1d are non-classical major histocompatibility complex (MHC) proteins involved in the presentation of lipid antigens to NKT cells (21). In Fabry disease, the excess of Gb3 has been involved in the inhibition of invariant NKT cells activation by competing for CD1d binding with other endogenous and exogenous lipid antigens (21). A previous study using fresh blood identified lower CD1d expression in monocytes from Fabry patients compared to controls (11). Using frozen PBMCs and a different anti-CD1d Ab clone, we did not observe any difference in the expression of CD1d in monocytes or other cell type between Fabry patients and controls whatever the phenotype and the treatment of the Fabry patients. Also, we did not observe any specific phenotype of iNKT cells in Fabry disease, although the use of frozen PBMCs may not be the more efficient approach.

Monocytes from Fabry patients have also been described with higher expressions of HLA-DR and CD11b (11,22). We confirmed the higher expression of the integrin CD11b and observed a high trend for higher expression of HLA-DR in untreated patients suggesting an activated phenotype consistent with the pro-thrombotic state observed in Fabry disease (22).

The development of an immune response against the recombinant ERT in Fabry disease has been demonstrated with the existence of anti-agalsidase antibodies and anaphylactic reactions (6,30). To our knowledge, the existence of a cellular response induced by ERT has not been investigated. In this study, we observed that most of the disturbances observed in T cells during the disease were partially corrected under enzyme replacement therapy or migalastat. Nevertheless, Fabry patients treated with agalsidase beta but not with agalsidase alfa had significantly higher percentages of NK cells. Two major differences have to be noticed between agalsidase proteins: agalsidase alfa is produced in human cell line and administered at the dose of 0.2 mg/kg/14 days whereas agalsidase beta is produced in Chinese Hamster Ovary and administered at 1.0 mg/kg/14 days (6). The two proteins have different glycosylation profiles (35). The difference observed in the NK cells count may reflect an immune reaction developed agalsidase beta.

The principal limits of this study came from the use of frozen PBMCs that may have modify the cellular phenotypes and limit the possible investigation on invariant NKT cells. Also we did not perform functional analysis and could not fully interpreter the intracellular interferon levels.

Finally we identified a decrease in the percentage of CD45RA+CCR7- CD4 T cells and the expansion of less-well differentiated T cell subsets characterized by increased percentages of

CD27+ cells and decreased percentages of CD57+ in CD45RA+CCR7- and CD45RA-CCR7- CD4 and CD8 T cells, which suggests an impaired maturation of T cells in Fabry disease due to the Gb3 accumulation, as observed during HIV infection. The expression of CCR7 was inversely correlated with the sphingosine-1-phosphate and lysoGb3 in CD4 cells. We also observed activated monocytes with higher expression of CD11b and a high trend for higher HLA-DR in monocytes. Enzyme replacement therapy was not associated with any obvious specific immune reaction except the increase of NK cells under agalsidase beta.

n°	age	Mutation	phenotype	CKD stage	Cardiopathy	Stroke	Ab titer	lysoGb3	S1P	MSSI total	MSSI cardiac	MSSI general	MSSI neuro	MSSI kidney	current therapy	Day
1	17.5	c.902G>A	Classic	0	NO	NO	102400	na	210.2	14	0	6	8	0	B	3
2	20.2	nd	Classic	0	NO	NO	50	123.9	na	4	2	0	2	0	0	4
3	20.3	c.486G>C	Classic	0	NO	NO	50	na	92.2	2	0	1	1	0	0	2
4	21.5	c.137A>G	Classic	0	NO	NO	50	10.6	152.0	14	1	5	8	0	A	4
5	22.2	nd	Classic	0	NO	NO	50	79.7	na	6	0	3	3	0	0	4
6	27.7	c.901C>T	Classic	0	NO	NO	12800	48.8	158.5	19	2	6	11	0	A	4
7	30.1	c.1246C>T	Classic	0	NO	NO	50	10.2	63.0	17	0	10	7	0	B	3
8	31.9	c.875C>T	Classic	0	NO	NO	800	15.0	170.1	8	3	2	3	0	A	4
9	32.7	c.884T>G	Classic	5	NO	NO	102400	10.0	107.8	29	0	2	9	18	MIG	1
10	33.2	c.548G>C	Classic	0	NO	NO	1638400	76.0	22.2	11	0	9	2	0	A	2
11	39.9	c.539del	Classic	0	YES	YES	50	13.4	na	30	11	3	16	0	B	4
12	44.4	nd	Classic	1	NO	NO	50	10.1	144.3	7	2	1	0	4	A	1
13	44.5	nd	Classic	5	YES	YES	50	25.8	na	52	11	10	13	18	A	1
14	49.2	c.802-3_802-2del	Classic	4	YES	NO	50	109.3	125.6	35	17	4	6	8	0	2
15	50.6	c.802-3_802-2del	Classic	4	YES	NO	204800	21.1	na	38	18	5	7	8	B	1
16	52.1	c.798T>A	Classic	5	YES	NO	12800	na	85.2	34	0	8	8	18	0	2
17	17.1	c.802-3_802-2del	NonClassic	0	NO	NO	50	73.0	268.1	7	0	2	5	0	0	3
18	33.4	c.847C>T	NonClassic	0	YES	NO	1638400	48.0	199.1	14	9	2	3	0	B	2
19	34.7	c.644A>G	NonClassic	0	YES	NO	50	2.7	290.3	20	13	1	6	0	B	2
20	35.0	c.337T>C	NonClassic	0	NO	NO	50	3.0	191.4	0	0	0	0	0	0	1
21	43.0	c.692A>G	NonClassic	2	YES	YES	50	16.7	200.3	26	12	9	5	0	B	2
22	47.6	c.644A>G	NonClassic	0	YES	NO	50	na	187.0	28	7	7	14	0	A	3
23	47.7	c.522T>A	NonClassic	2	YES	NO	1638400	21.7	202.9	12	0	4	0	8	B	4
24	58.1	c.644A>G	NonClassic	0	YES	NO	50	8.5	227.9	26	14	4	8	0	0	2
25	59.1	c.758T>C	NonClassic	3	YES	NO	102400	10.8	197.3	23	13	1	1	8	A	3
26	68.6	c.486G>C	NonClassic	1	YES	NO	50	22.5	na	8	6	2	0	0	B	3
27	69.3	c.644A>G	NonClassic	0	YES	NO	50	na	na	18	16	2	0	0	0	3
28	72.7	c.644A>G	NonClassic	3	YES	NO	50	na	na	23	13	2	0	8	0	1
29	72.4	c.644A>G	NonClassic	3	YES	NO	50	6.7	273.2	34	15	6	5	8	B	1

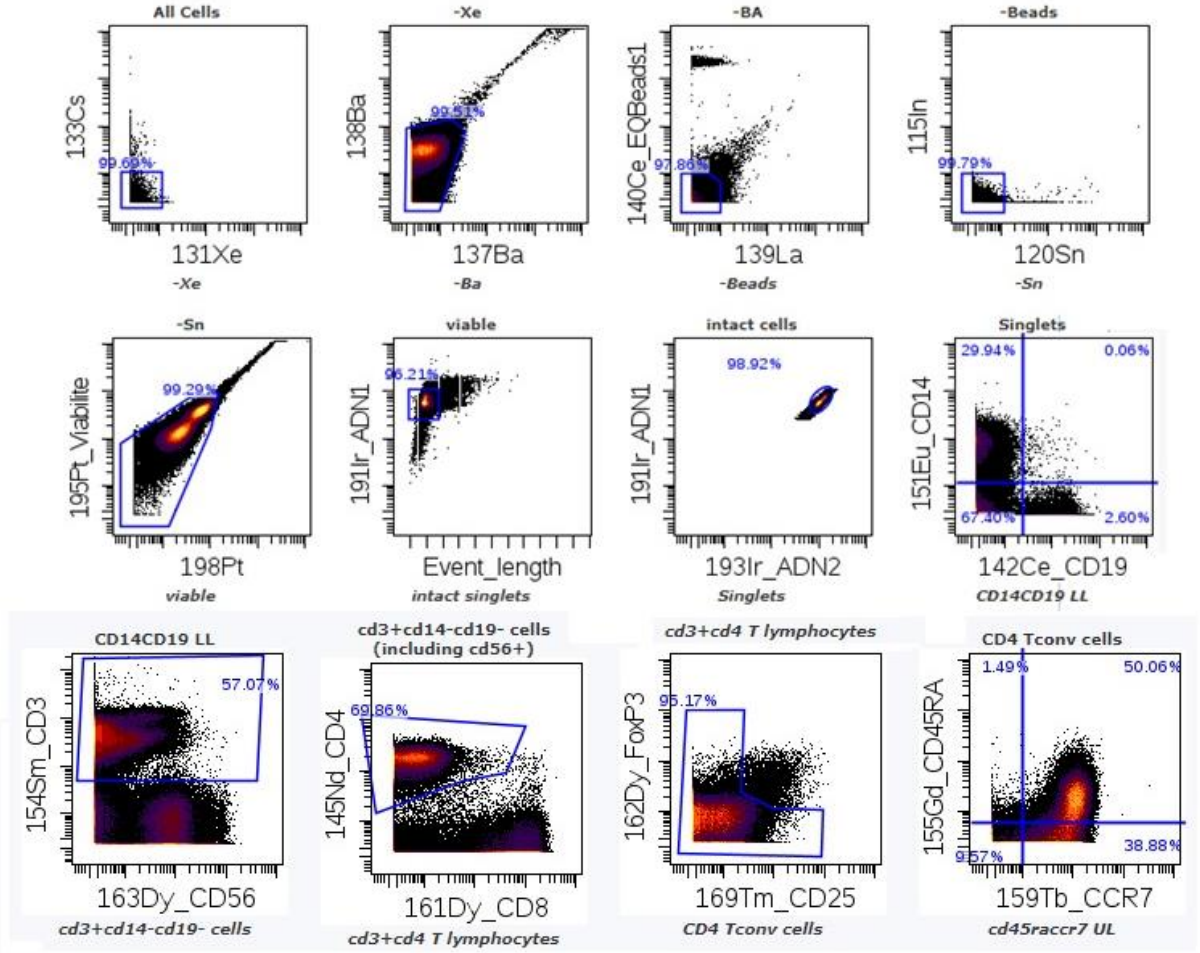
Table 1: Characteristics of patients: CKD refers to the chronic kidney disease classification (36); Antibody (Ab) titer refers to anti-agalsidase antibody, a titer of 50 being negative; lysoGb3 and S1P in ng/ml determined in available plasma samples; Mainz severity score index (MSSI) scores (37); current therapy: agalsidase alfa (A), agalsidase beta (B), migalastat (MIG) or absence of treatment (0); Day refers to the day of mass cytometry experiment; na : not available.

Supplementary data 1: Panel of metal-conjugated antibodies obtained from Fluidigm (Les Ulis, France)

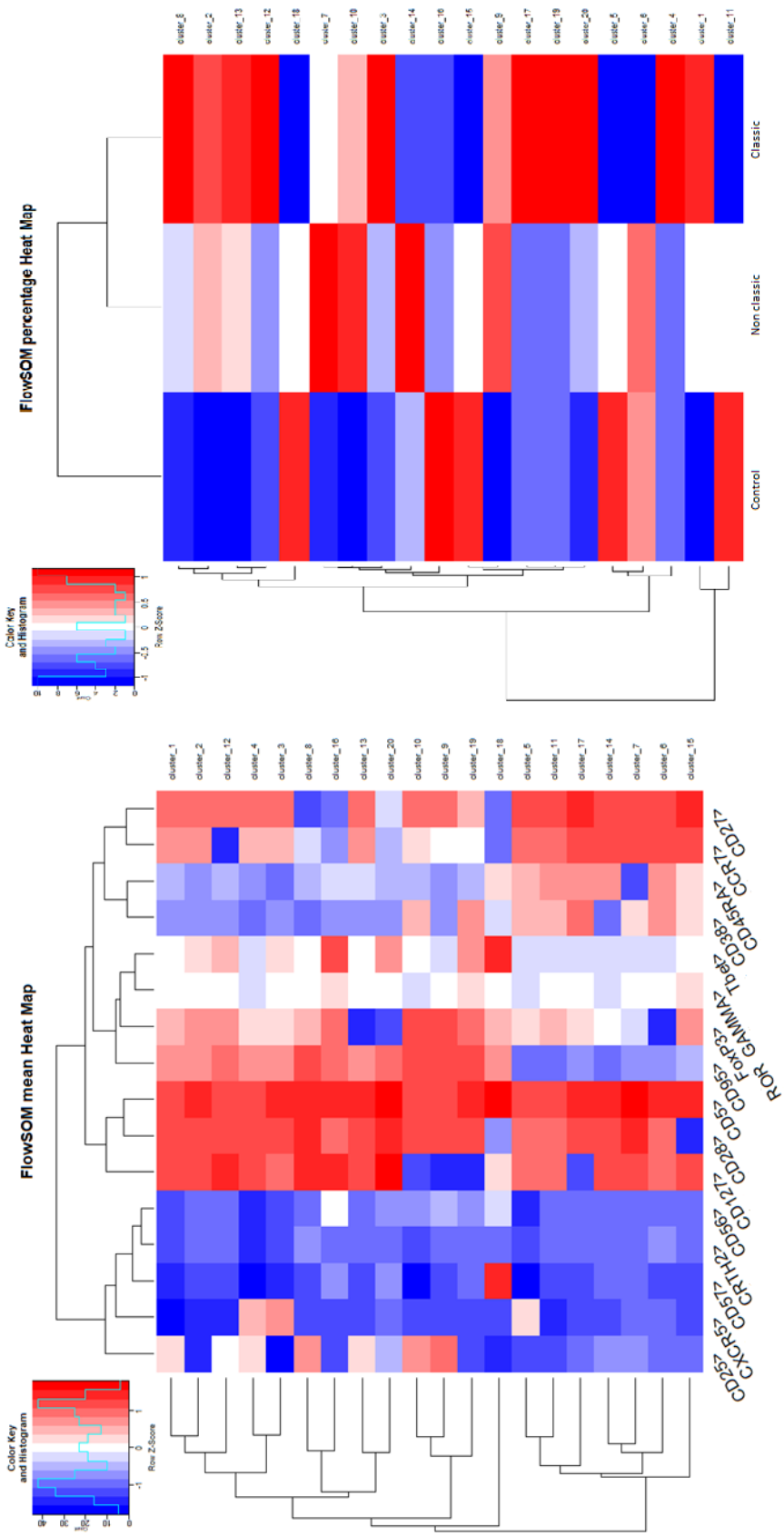
Catalog reference	Marker	Clone	metal
3089003B	Anti-Human CD45	HI30	Y89
3142001B	Anti-Human CD19	HIB19	142Nd
3143007B	Anti-Human CD5	UCHT2	143Nd
3145001B	Anti-Human CD4	RPAT4	145Nd
3146005B	Anti-Human IgD	IA6-2	146Nd
3148004B	Anti-Human CD16	3G8	148Nd
3149011B	Anti-Human CD127/IL-7Ra	A019D5	149Sm
3150013A	Anti-pRb	J112-906	150Nd
3151009B	Anti-Human CD14	M5E2	151Eu
3152005A	Anti-pAkt	D9E	152Sm
3153005A	Anti-pStat1	4a	153Eu
3154003B	Anti-Human CD3	UCHT1	154Sm
3155011B	Anti-Human CD45RA	HI100	155Gd
3158010B	Anti-Human CD27	L128	158Gd
3159003A	Anti-Human CD197/CCR7	G043H7	159Tb
3160010B	Anti-Human/Mouse Tbet	4B10	160Gd
3162024A	Anti-Human FoxP3	259D/ C7	162Dy
3163007B	Anti-Human CD56	NCAM16.2	163Dy
3164010A	Anti-CyclinB1	GNS-1	164Dy
3165002B	Anti-Human IFNg	B27	165Ho
3166007B	Anti-Human CD24	ML5	166Er
3168009B	Anti-Human CD138/ Syndecan-1	DL-101	168Er
3169003B	Anti-Human CD25	2A3	169Tm
3170015B	Anti-Human Invariant NKT	6B11	170Er
3171014B	Anti-Human CD185/CXCR5	RF8B2	171Yb
3172007B	Anti-Human CD38	HIT2	172Yb
3175012A	Anti-pHistone H3	HTA28	175Lu
3176019B	Anti-Human CD57	HCD57	176Yb
3209003B	Anti-Human CD11b/Mac-1	ICRF44	209Bi
Antibody Conjugation by Fluidigm	Anti-Human HLA-DR	L243	141Pr
	Anti-Human CRTh2	BM16	174Yb
	Anti-Human CD28	CD28.2	147Sm
	Anti-Human CD1d	51.1	156Gd
	Anti-Human CD8a	RPA-T8	161Dy
	Anti-Human CD95	DX29	167Er
	Anti-Human RORgamma-t	600214	173Yb

Supplementary data 2

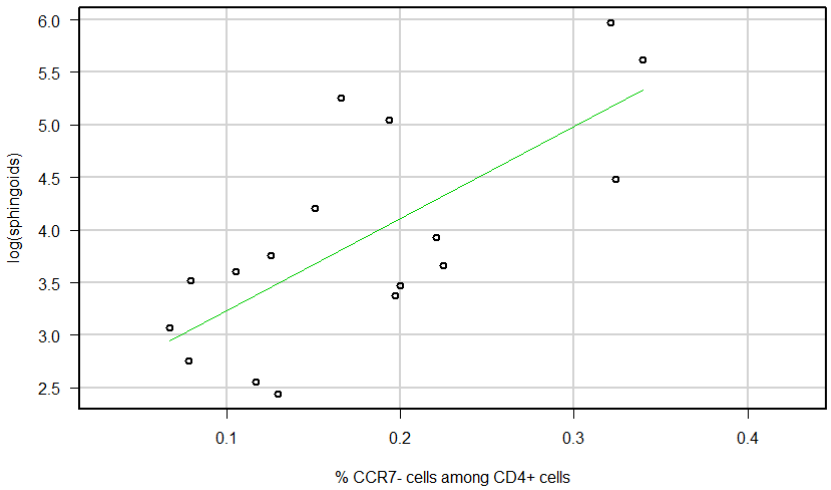
Gating strategy for the CD45RA/CCR7 CD4 T cells

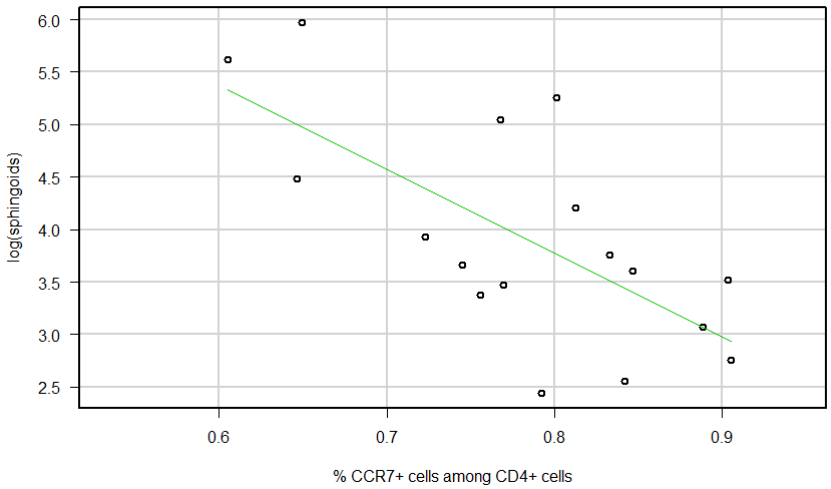


Supplementary data 3
<u>FlowSOM results on CD4+ population (k=20) expressed with heatmaps</u>



Supplementary data 4

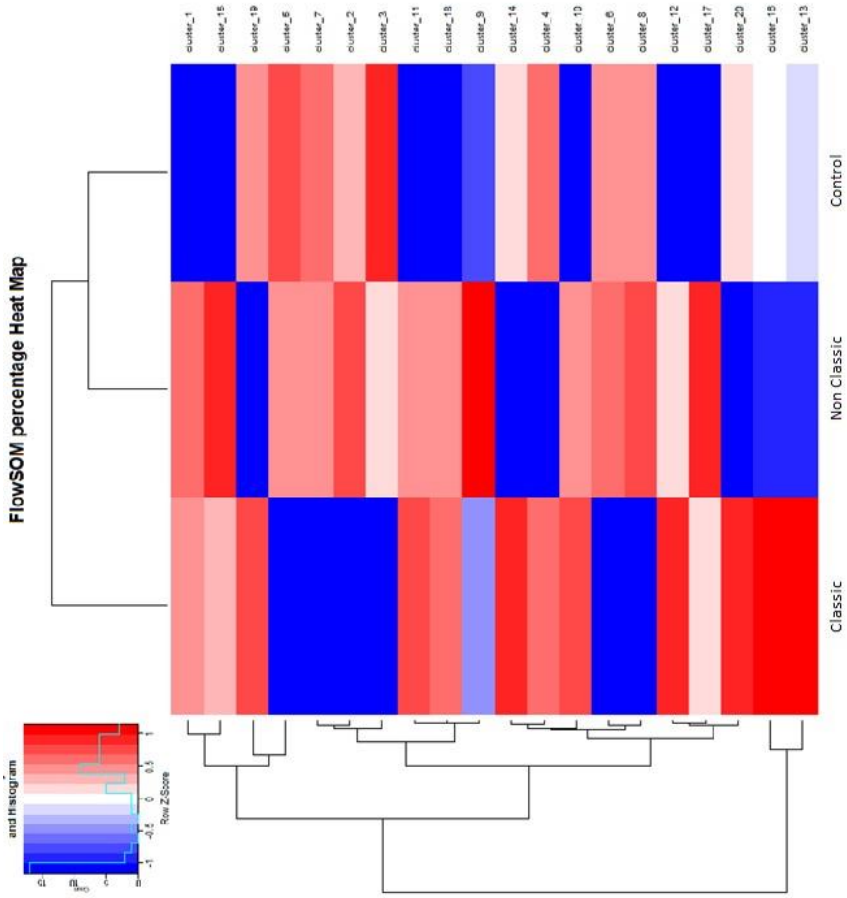


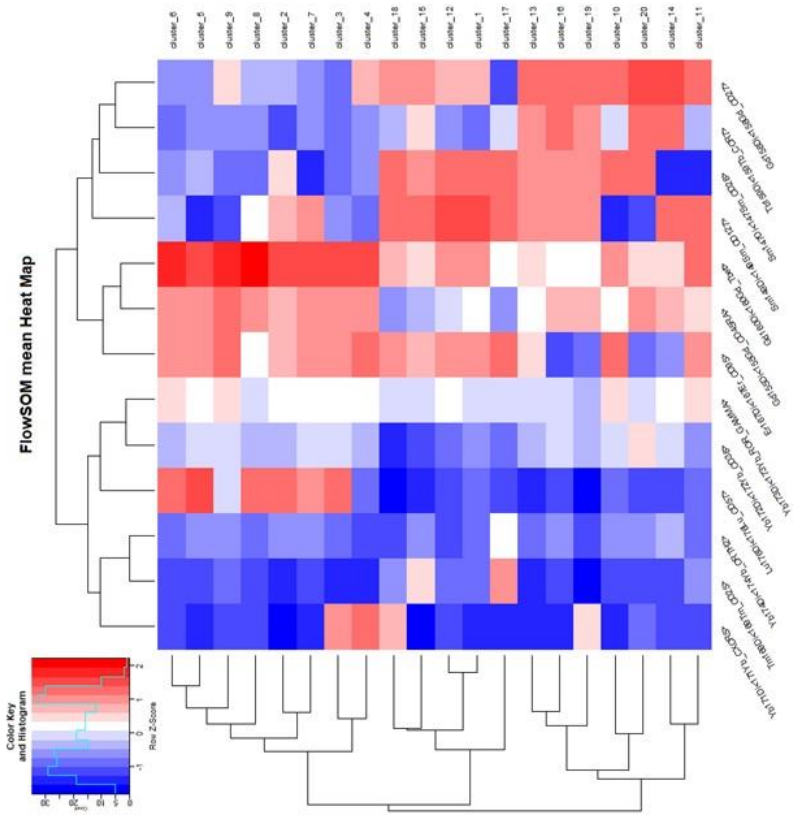


Correlation between log(sphingoids) and percentages of CCR7- (up) and CCR7- (down) cells among CD4+ T Cells. Log(sphingoids) is defined as [log(lysoGb3/0.31) + log(S1P/161)].

Supplementary data 5

<u>FlowSOM results on CD8+ population (k=20) expressed with heatmaps</u>





References

1. Brady RO, Schiffmann R. Clinical features of and recent advances in therapy for Fabry disease. JAMA. 6 déc 2000;284(21):2771-5.

2. El Dib R, Gomaa H, Ortiz A, Politei J, Kapoor A, Barreto F. Enzyme replacement therapy for Anderson-Fabry disease: A complementary overview of a Cochrane publication through a linear regression and a pooled analysis of proportions from cohort studies. PloS One. 2017;12(3):e0173358.

3. Weidemann F, Niemann M, Störk S, Breunig F, Beer M, Sommer C, et al. Long-term outcome of enzyme-replacement therapy in advanced Fabry disease: evidence for disease progression towards serious complications. J Intern Med. oct 2013;274(4):331-41.

4. Linthorst GE, Hollak CEM, Donker-Koopman WE, Strijland A, Aerts JMFG. Enzyme therapy for Fabry disease: neutralizing antibodies toward agalsidase alpha and beta. Kidney Int. oct 2004;66(4):1589-95.

5. Rozenfeld P, Feriozzi S. Contribution of inflammatory pathways to Fabry disease pathogenesis. Mol Genet Metab. 13 sept 2017;

6. Mauhin W, Lidove O, Masat E, Mingozzi F, Mariampillai K, Ziza J-M, et al. Innate and Adaptive Immune Response in Fabry Disease. JIMD Rep. 18 févr 2015;

7. De Francesco PN, Mucci JM, Ceci R, Fossati CA, Rozenfeld PA. Fabry disease peripheral blood immune cells release inflammatory cytokines: role of globotriaosylceramide. Mol Genet Metab. mai 2013;109(1):93-9.

8. Shu L, Vivekanandan-Giri A, Pennathur S, Smid BE, Aerts JMF, Hollak CEM, et al. Establishing 3-nitrotyrosine as a biomarker for the vasculopathy of Fabry disease. Kidney Int. 8 janv 2014;

9. Biancini GB, Vanzin CS, Rodrigues DB, Deon M, Ribas GS, Barschak AG, et al. Globotriaosylceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. Biochim Biophys Acta. févr 2012;1822(2):226-32.

10. Chévrier M, Brakch N, Céline L, Genty D, Ramdani Y, Moll S, et al. Autophagosome maturation is impaired in Fabry disease. Autophagy. juill 2010;6(5):589-99.

11. Rozenfeld P, Agriello E, De Francesco N, Martinez P, Fossati C. Leukocyte perturbation associated with Fabry disease. J Inherit Metab Dis. déc 2009;32 Suppl 1:S67-77.

12. Mauhin W, Lidove O, Amelin D, Lamari F, Caillaud C, Mingozzi F, et al. Deep characterization of the anti-drug antibodies developed in Fabry disease patients, a prospective analysis from the French multicenter cohort FFABRY. Orphanet J Rare Dis. 1 déc 2018;13(1):127.

13. Dzangué-Tchoupou G, Corneau A, Blanc C, Benveniste O, Allenbach Y. Analysis of cell surface and intranuclear markers on non-stimulated human PBMC using mass cytometry. PloS One. 2018;13(3):e0194593.

14. Chen H, Lau MC, Wong MT, Newell EW, Poidinger M, Chen J. Cytofkit: A Bioconductor Package for an Integrated Mass Cytometry Data Analysis Pipeline. PLoS Comput Biol. sept 2016;12(9):e1005112.

15. Larbi A, Fulop T. From « truly naïve » to « exhausted senescent » T cells: when markers predict functionality. Cytom Part J Int Soc Anal Cytol. janv 2014;85(1):25-35.

16. Peter ME, Budd RC, Desbarats J, Hedrick SM, Hueber A-O, Newell MK, et al. The CD95 receptor: apoptosis revisited. Cell. 4 mai 2007;129(3):447-50.

17. Mendelson K, Evans T, Hla T. Sphingosine 1-phosphate signalling. Dev Camb Engl. 1 janv 2014;141(1):5-9.

18. Ferraz MJ, Marques ARA, Appelman MD, Verhoek M, Strijland A, Mirzaian M, et al. Lysosomal glycosphingolipid catabolism by acid ceramidase: formation of glycosphingoid bases during deficiency of glycosidases. FEBS Lett. mars 2016;590(6):716-25.

19. Brakch N, Dormond O, Bekri S, Golshayan D, Correvon M, Mazzolai L, et al. Evidence for a role of sphingosine-1 phosphate in cardiovascular remodelling in Fabry disease. Eur Heart J. janv 2010;31(1):67-76.

20. Gold H, Mirzaian M, Dekker N, Joao Ferraz M, Lugtenburg J, Codée JDC, et al. Quantification of globotriaosylsphingosine in plasma and urine of fabry patients by stable isotope ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clin Chem. mars 2013;59(3):547-56.

21. Pereira CS, Sa-Miranda C, De Libero G, Mori L, Macedo MF. Globotriaosylceramide inhibits iNKT-cell activation in a CD1d-dependent manner. Eur J Immunol. janv 2016;46(1):147-53.

22. DeGraba T, Azhar S, Dignat-George F, Brown E, Boutière B, Altarescu G, et al. Profile of endothelial and leukocyte activation in Fabry patients. Ann Neurol. févr 2000;47(2):229-33.

23. Belge K-U, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. J Immunol Baltim Md 1950. 1 avr 2002;168(7):3536-42.

24. Verma K, Ogonek J, Varanasi PR, Luther S, Bünting I, Thomay K, et al. Human CD8+ CD57- TEMRA cells: Too young to be called « old ». PloS One. 2017;12(5):e0177405.

25. Rufer N, Zippelius A, Batard P, Pittet MJ, Kurth I, Corthesy P, et al. Ex vivo characterization of human CD8+ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions. Blood. 1 sept 2003;102(5):1779-87.

26. Lee SA, Sinclair E, Hatano H, Hsue PY, Epling L, Hecht FM, et al. Impact of HIV on CD8+ T cell CD57 expression is distinct from that of CMV and aging. PloS One. 2014;9(2):e89444.

27. Focosi D, Bestagno M, Burrone O, Petrini M. CD57+ T lymphocytes and functional immune deficiency. J Leukoc Biol. janv 2010;87(1):107-16.

28. Cobos Jiménez V, Wit FWNM, Joerink M, Maurer I, Harskamp AM, Schouten J, et al. T-Cell Activation Independently Associates With Immune Senescence in HIV-Infected Recipients of Long-term Antiretroviral Treatment. J Infect Dis. 15 2016;214(2):216-25.

29. Lee SA, Sinclair E, Jain V, Huang Y, Epling L, Van Natta M, et al. Low proportions of CD28- CD8+ T cells expressing CD57 can be reversed by early ART initiation and predict mortality in treated HIV infection. J Infect Dis. 1 août 2014;210(3):374-82.

30. Fantini J, Hammache D, Piéroni G, Yahi N. Role of glycosphingolipid microdomains in CD4-dependent HIV-1 fusion. Glycoconj J. avr 2000;17(3-4):199-204.

31. Fantini J, Tamalet C, Hammache D, Tourrès C, Duclos N, Yahi N. HIV-1-induced perturbations of glycosphingolipid metabolism are cell-specific and can be detected at early stages of HIV-1 infection. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology Off Publ Int Retrovirology Assoc. 1 nov 1998;19(3):221-9.

32. Xavier R, Brennan T, Li Q, McCormack C, Seed B. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. Immunity. juin 1998;8(6):723-32.

33. Khine AA, Firtel M, Lingwood CA. CD77-dependent retrograde transport of CD19 to the nuclear membrane: functional relationship between CD77 and CD19 during germinal center B-cell apoptosis. J Cell Physiol. août 1998;176(2):281-92.

34. Pandey MK, Burrow TA, Rani R, Martin LJ, Witte D, Setchell KD, et al. Complement drives glucosylceramide accumulation and tissue inflammation in Gaucher disease. Nature. 02 2017;543(7643):108-12.

35. Lee K, Jin X, Zhang K, Copertino L, Andrews L, Baker-Malcolm J, et al. A biochemical and pharmacological comparison of enzyme replacement therapies for the glycolipid storage disorder Fabry disease. Glycobiology. avr 2003;13(4):305-13.

36. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found. févr 2002;39(2 Suppl 1):S1-266.

37. Whybra C, Kampmann C, Krummenauer F, Ries M, Mengel E, Miebach E, et al. The Mainz Severity Score Index: a new instrument for quantifying the Anderson-Fabry disease phenotype, and the response of patients to enzyme replacement therapy. Clin Genet. avr 2004;65(4):299-307.

Problématique n°3 : « Sphingosine-1-phosphate discriminates classic and non classic phenotype in Fabry disease »

La sphingosine 1 phosphate permet l'identification des patients Fabry non-classiques

Le lysoGb3 est actuellement le marqueur de choix pour le dépistage et le suivi de la maladie de Fabry. Néanmoins, son taux peut être normal chez des patients au phénotype non-classique bien que symptomatiques. Alors que l'implication de mécanismes inflammatoires est admise dans la physiopathologie de la maladie de Fabry, nous avons cherché à évaluer l'utilité dans le suivi de la maladie des dosages en Sphingosine-1-phosphate (S1P) et *vascular endothelial growth factor* (VEGF), deux médiateurs de l'inflammation qui ont été impliqués dans la physiopathologie de la maladie.

S1P et VEGF ont ainsi été mesurés dans le sérum grâce à des kits ELISA chez 43 patients (phénotype classique n=22, non-classique n=21) et comparés aux données cliniques et biologiques.

Nous avons mis en évidence une augmentation significative des concentrations en S1P chez les patients non-classiques indépendamment de l'âge et de l'atteinte cardiaque. Aussi, le ratio S1P/lysoGb3 permettait de meilleurs résultats dans le classement phénotypique des patients que le lysoGb3 seul. Le VEGF n'était corrélé qu'à l'âge, sans caractéristique clinique associée évidente.

Avec cette étude, nous avons ainsi identifié un marqueur du phénotype non-classique. Cette découverte suggère l'existence de mécanismes physiopathologiques propres au cours du phénotype non-classique et l'implication possible du lysoGb3 dans le métabolisme de la sphingosine-1-phosphate.

Sphingosine-1-phosphate discriminates classic and cardiac phenotype in Fabry disease.

Mauhin W, Amelin A, Lamari F, Dzangue-Tchoupou G, Douillard C, Dussol B, Leguy-Seguin V, D'Halluin P, Noel E, Zenone T, Matignon M, Maillot F, Ly KH, Besson G, Willems M, Labombarda F, Masseau A, Lavigne C, Froissart C, Lacombe D, Ziza JM, Hachulla E, Lidove O, Benveniste O

(Nota bene: the present version of the manuscript has not been validated by all the co-authors)

Introduction

Fabry disease is an X-linked disorder characterized by defects in the alpha-galactosidase A enzyme activity that lead to a ubiquitous accumulation of glycosphingolipids, mainly of globotriaosylceramide (Gb3) and globotriaosylsphingosine (lysoGb3). Two main phenotypes have been described. The historical classic disease is associated with markedly reduced or absent enzyme activity and characterized by acral neuropathic pains, progressive renal failure, white matter lesions, cerebral stroke and hypertrophic cardiomyopathy. The non-classic phenotype is observed in patients with low but detectable enzyme activity and characterized by an almost exclusive cardiomyopathy (1). Plasma sphingosine-1-phosphate (S1P) has been controversially associated with the Fabry cardiomyopathy (2,3). S1P is a fashionable molecule implicated in immune regulation and whose metabolism is targeted in multiple sclerosis with fingolimod (4,5). The vascular endothelial growth factor (VEGF) is a mediator of angiogenesis and inflammation that has also been implicated in the pathophysiology of the Fabry disease vasculopathy (6–9). Whereas the existence of a pro-inflammatory condition in Fabry disease has now been accepted (10,11), we aimed to determine whether these two molecules could be of interest in Fabry disease management. We measured S1P, VEGF and lysoGb3 in serum and plasma from males of the French multicenter cohort FFABRY and assessed statistical correlations with clinical data.

Methods

The multicenter cohort FFABRY prospectively gathers clinical data and biological samples from patients with an enzymatic and/or genetic diagnosis of FD (characteristics in table 1). Patients were sorted according to their clinical phenotype: patients without acral pain or cornea verticillata were referred to as non-classic Fabry patients. Legal authorizations were obtained from the *Comité consultatif sur le traitement de l'information en matière de recherche dans le domaine de la santé (n°14.324bis*) according to the relevant French legislation. Clinical data had been prospectively collected through a standardized online form. Mainz severity score index (MSSI) was calculated automatically according to the scoring system established by Whybra et al. (12). Hypertrophic cardiomyopathy was assessed by cardiac magnetic resonance imagery or echocardiography (interventricular septum thickness > 13mm). The estimated glomerular filtration rate (eGFR) was assessed with the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) equation (13). Patients referred to as *treated* underwent enzyme replacement or migalastat therapy.

Blood samples were collected at the time of inclusion and centralized in our research unit for isolation of serum and plasma separated by centrifugation of BD Vacutainer™ serum tubes with increased silica act clot activator and BD Vacutainer™ heparin tubes respectively, before congelation at -80°C.

We used Human S1P ELISA kit (catalog E-EL-H2583 - Elabscience, Houston, USA) to determine serum S1P concentration as mentioned in the technical note. Briefly, 100µl of plasma were added in each well for 90min at 37°C, plasma were removed and 100µl of biotinylated Ab were added 1hour at 37°C. After washes, Horse radish-peroxidase (HRP) conjugate was added for 30min at 37°C before new washes. The substrate reagent was incubated for 15min at 37°C then the reaction stopped. Optical density was read at 450nm with a Spark 10M® reader (Tecan Trading AG, Switzerland) and concentrations determined with a standard curve.

VEGF serum concentrations were determined with a Human VEGF ELISA kit (catalog KHG0111/112; Novex Life Technologies, Frederick, USA) as mentioned in the technical note. Briefly, wells were filled with 50µl incubation buffer, 50µl standard diluent buffer and 50µl plasma then incubated for 2h at room temperature (RT). After washes, Human VEGF biotin conjugate solution was added and incubated for 1h RT. After washes, streptavidin-HRP was added and incubated for 30min RT. After washes, tetramethylbenzidine solution was added and incubated in the dark for 30min RT. The reaction was stopped and absorbance read

at 450nm with a Spark 10M® reader (Tecan Trading AG, Switzerland) and concentrations determined with a standard curve.

The lysoGb3 concentration was measured in available plasma samples (n=36) by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) as previously described (14).

Anti-agalsidase antibodies were screened in all patients as previously described (14).

After verification for normal distribution and equality of variances with Shapiro-Wilk and Levene tests respectively, we used parametric tests such as t-test +/- Welch's correction for unequal variances, Pearson correlation and linear regression for Gaussian values, or non-parametric tests such as Kruskall-Wallis (KW) and Mann-Whitney (MW) comparison tests and Spearman correlation test. We used logistic regression with stepwise selection based on p-value for discrete variables and Fisher's exact t test for contingency. The p value for the alpha-risk in all tests was 0.05. GraphPad Prism 5.0 and the EZR plugin version 1.35v (15) packages for the R software were used.

Table 1. Characteristics of patients. (median [interquartile range]; eGFR = estimated Glomerular filtration rate according to the MDRD equation; MSSI for Mainz severity score index according to the reference from Whybra et al.; *number of patients with brain MRI < 1 year)

	Classic			**Non-classic**			**All**		
Treatment	**No**	**Treated**	**All**	**No**	**Treated**	**All**	**No**	**Treated**	**All**
n	**4**	**18**	**22**	**3**	**18**	**21**	**7**	**36**	**43**
Age at diagnosis	31.1 [18.5-44.0]	27.2 [18.2-37.7]	27.2 [18.2-39.9]	17.0 [14.6-24.6]	49.2 [36.0-55.7]	45.4 [32.2-55.3]	20.0 [15.5-37.2]	36.7 [24.1-52.0]	34.2 [20.7-48.1]
Age at sampling	38.6 [26.0-50.0]	42.3 [32.1-46.2]	42.2 [30.5-46.3]	35.0 [26.0-41.6]	54.7 [45.8-60.5]	48.1 [43.0-59.8]	35.0 [24.1-48.7]	46.2 [33.9-74.2]	46.1 [33.3-51.9]
eGFR (ml/min/1.73m²)	68.7 [21.1-115.7]	91.7 [9.8-122.9]	91.7 [9.8 - 11.9]	132.1 [120.5-138.9]	89.6 [60.9-112.9]	93.0 [65.3-115.7]	110.9 [67.7-131.2]	89.6 [58.8-116.4]	93.1 [58.4-119.7]
Ischemic stroke (n=)	1	1	2	0	1	1	1	2	3
White-matter lesions (n=)	1/3*	3/9*	4/12*	na	1/3*	1/3*	1/3*	4/12*	5/15*
MSSI	26.0 [14.0-35.3]	22.0 [14.0-30.5]	22.0 [14.0-32.5]	7.0 [3.5-14.0]	20.0 [14.0-25.5]	20.0 [12.0-24.0]	18.0 [4.5-27.5]	20.0 [14.0 - 27.3]	20.0 [13.0-27.5]
MSSI general	5.0 [4.0-8.5]	4.0 [3.3-5.0]	5.0 [4.0-7.8]	2.0 [1.0-4.5]	2.0 [1.0-4.0]	2.0 [1.0-4.0]	4.0 [1.5-5.5]	4.0 [2.0-6.0]	4.0 [2.0-6.0]
MSSI neurological	7.0 [4.8-9.5]	6.5 [2.3-9.8]	6.0 [2.3-9.8]	5.0 [2.5-6.5]	2.0 [0.0-5.0]	2.0 [0.0-5.0]	6.0 [3.0-8.0]	40 (1.8-8.0)	5.0 [1.5-8.0]
MSSI cardiological	0.0 [0.0-4.3]	2.0 [0.3-5.3]	2.0 [0.0-5.3]	0.0 [0.0-3.0]	11.0 [4.0-13.0]	9.0 [2.0-13.0]	0.0 [0.0-3.0]	4.5 [1.0-12.3]	3.0 [0.0-11.0]
MSSI kidney	4.0 [0.0-10.5]	6.0 [0.0-15.5]	6.0 [0.0-15.5]	0.0 [0.0-0.0]	0.0 [0.0-8.0]	0.0 [0.0-8.0]	0.0 [0.0-4.0]	0.0 [0.0-8.0]	0.0 [0.0-8.0]

Results

Plasma LysoGb3 in treated patients (n=32)

Plasma lysoGb3 concentrations did not follow a normal distribution. LysoGb3 was higher in classic patients compared to non-classic (median [interquartile (IQR)] in treated patients (n= 16) 18.65ng/ml [10.5-43.0] vs 6.9 [2.4-18.0], (n = 16), MW p = 0.005, figure 1a), which is consistent with the correlation with the MSSI general score that take in account cornea verticillata and angiokeratoma (Spearman, r = 0.39, p < 0.03). Among treated patients with available plasma lysoGb3, classic patients were younger than non-classic (43.3 [32.7-46.3] vs 48.1 [39.0-60.3], MW p < 0.03). Hence a trend was observed for a correlation with age (Spearman, r = -0.31, p < 0.09) that disappeared after stratification by phenotype. LysoGb3 was not different in patients with cardiomyopathy (MW, p = 0.4) and was not correlated with eGFR (Spearman, p = 0.3). As already described elsewhere (14), lysoGb3 was higher in Ab-positive patients independently from their phenotype (in classic (n = 9/16) 41.0ng/ml [18.9-60.0] vs 10.6 [10.2-15.5], MW p=0.02; in non-classic (n = 4/16) 23.6ng/ml [13.5-42.4] vs 4.3 [2.1-8.2], MW p = 0.01, figure 1b).

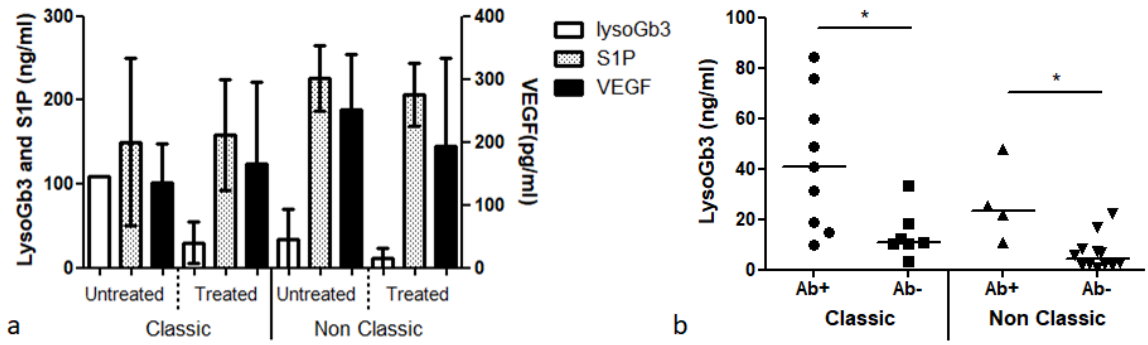


Figure 7. (a) Concentrations of lysoGb3, S1P and VEGF depending on Fabry phenotype and treatment : (a and b) LysoGb3 is higher in classic patients compared to non-classic (median [interquartile (IQR)] in treated patients (n= 16) 18.65ng/ml [10.5-43.0] vs 6.9 [2.4-18.0], (n = 16), MW p = 0.005); S1P is significantly higher in non-classic patients (mean +/- standard deviation (SD) 209.8ng/ml +/- 37.4 (n=21) vs 157.0 +/- 70.9 (n=22), t-test with Welch correction, p = 0.004). Serum VEGF is not different between patients among their phenotype (t-test, p = 0.9) or their treatment (t-test, p = 0.9). (b) LysoGb3 is higher in Ab-positive patients (in classic (n = 9/16) 41.0ng/ml [18.9-60.0] vs 10.6 [10.2-15.5], MW p=0.02; in non-classic (n = 4/16) 23.6ng/ml [13.5-42.4] vs 4.3 [2.1-8.2], MW p = 0.01)

Serum S1P concentrations (n=43)

Serum S1P concentrations followed a normal distribution. S1P was not influenced by the treatment (p=1.0) or the delay from sampling blood to thawing serum (Spearman p = 0.5). S1P was significantly higher in non-classic patients (mean +/- standard deviation (SD) 209.8ng/ml +/- 37.4 vs 157.0 +/- 70.9, t-test with Welch correction, p = 0.004, figure 1a and 2a). S1P levels in non-classic patients were not significantly different from levels observed by Brakch et al. in their Fabry cohort (mean +/- SD = 213 +/- 31ng/ml in males, t-test p = 0.7) but our classic patients had lower levels than their male cohort (t-test, p = 0.001) being non-significantly different from their healthy control cohort (t-test, p = 0.8) (2). Whereas non-classic patients were older (t-test p= 0.007) with higher rate of cardiomyopathy (10/22 vs 18/21, Fisher exact t test, p=0.006). We checked both conditions: S1P was not different among the cardiomyopathy status (191.9ng/ml +/- 54.9 (n=28) vs 165.7 +/- 73.4 (n=15), t-test p = 0.2) and was not correlated with the age (Pearson, p = 0.3). Moreover, the phenotype was the only factor that significantly influenced the S1P concentration in a multivariate regression model including phenotype, age and interventricular septum thickness (IST). Hence, the trend observed for S1P correlation with the IST assessed with echocardiography (Pearson $r^2 = 0.4$, p = 0.06, n= 22 patients) was mainly due to the phenotype (figure 1d). S1P was not correlated with any of the MSSI scores (table 2). S1P was not different among the presence of white-matter lesions on cerebral MRI (t-test, p = 0.2, n=15). We did not observe any correlation between S1P and lysoGb3 (Spearman's test in treated patients, p = 0.7). We compared the likelihood ratio (LR) obtained by performing ROC curves with S1P, lysoGb3 and the ratio S1P/lysoGb3 to sort non-classic from classic treated patients: the best results were obtained with the ratio S1P/lysoGb3 with a threshold of 16.76 (sensitivity (Se) 68.8% , specificity (Spe) 93.8%, LR 11.0, p = 0.001) better than lysoGb3 alone (threshold = 9.3ng/ml, Se 62.5%, Spe 93.8%, LR 10.0, p = 0.006) and S1P alone (threshold 201.9ng/ml, Se 50%, Spe 81.3, LR 2.67, p = 0.02).

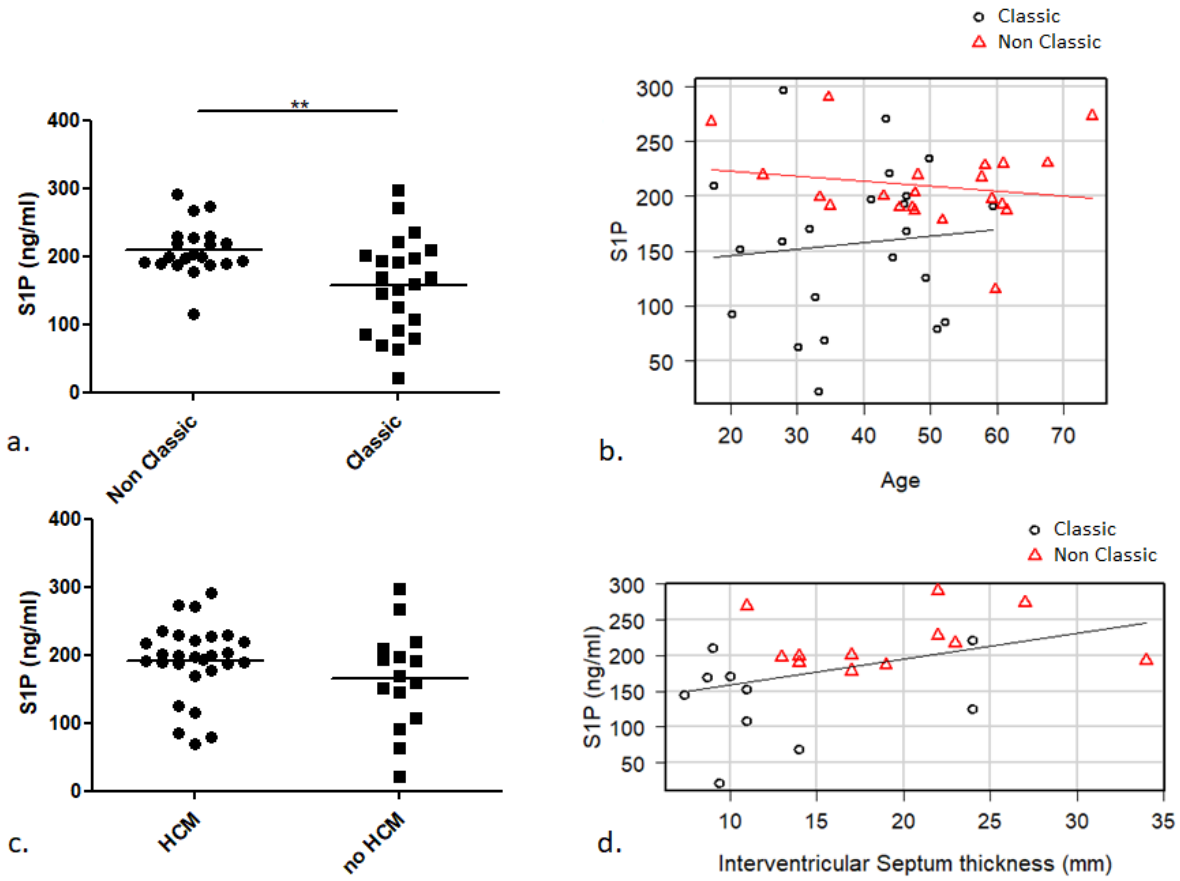


Figure 2. (a and b) S1P is significantly higher in non-classic patients (mean +/- standard deviation (SD) 209.8ng/ml +/- 37.4 vs 157.0 +/- 70.9, t-test with Welch correction, p = 0.004), independently from the age (Pearson; p = 0.3). (c) S1P is not different in patients among the presence of hypertrophic cardiomyopathy (HCM), (d) the trend observed for S1P correlation with the interventricular septum thickness assessed with echocardiography (Pearson $r^2 = 0.4$, p = 0.06, n= 22 patients) is mainly due to the different phenotypes.

Serum VEGF concentrations (n=43)

Serum VEGF concentrations followed a normal distribution. The mean value was 180.5 pg/ml +/- 126.6, which is much lower than concentrations observed in a previous study on Fabry patients (485.27 ± 273.76 pg/ml (6)). We observed a correlation with the age (Pearson, $r^2 = 0.32$, $p < 0.04$, n=43) and a trend with eGFR (Pearson, $r^2 = -0.3$, $p = 0.07$; exclusion of renal transplanted patients n= 37). We also observed an almost significant increase of VEGF in patients with cardiomyopathy (t-test with Welch correction, 203.3pg/ml +/- 144.4 vs 137.8 +/- 69.7, $p = 0.052$). In a multivariate regression model including age, eGFR and cardiomyopathy, the age was the only significant factor ($p = 0.02$). Serum VEGF was not different between patients among their phenotype (t-test, $p = 0.9$), the presence of angiokeratoma (t-test with Welch correction, p=0.5), the treatment (t-test, $p = 0.9$) or the existence of anti-agalsidase antibodies (t-test, $p = 0.3$). VEGF was not correlated with any of the MSSI scores (table 2). VEGF was not correlated with lysoGb3 (Spearman's test in treated patients, $p = 0.4$) or S1P (Spearman's test, $p = 0.6$).

Table 2. Correlation matrix between biomarkers and MSSI scores and estimated glomerular function (eGFR).

Spearman correlation (p)	**LysoGb3**	**S1P**	**VEGF**
MSSI total	0.5	0.4	0.7
MSSI general	**0.02**	0.4	0.6
MSSI neurological	0.2	0.9	0.3
MSSI cardiological	0.4	0.3	0.9
MSSI kidney	0.9	0.4	1.0
eGFR (ml/min/1.73m²)	0.8	0.3	0.6

Discussion

In this study, we discovered that S1P is particularly increased in non-classic Fabry patients. Unlike Brakch et al., S1P level was not correlated with the cardiac disease in our study after stratification on clinical phenotype (2). In the study of Brakch et al., the 17 Fabry patients involved were heterogeneous (9 males and 8 females with heterogeneous cardiac involvement) (2). The correlations between S1P and left ventricular mass and the intima media thickness could have resulted from the patients' heterogeneity as we observed for interventricular septum thickness in the present study (figure 2d). The clinical phenotypes of the patients were not noticed, but S1P levels in male were the same as in our non-classic group suggesting non-classic patients, which could explain the association observed in absence of stratification. Another study from Mirzaian et al., conducted with classic Fabry patients did not report obvious increase in plasma S1P and suggested that the variability observed between Fabry patients and controls could come from the heterogeneity in collecting, handling and storing the samples (3). In our protocol, the conditions for sampling, handling and storing the serum were identical between patients and controls. Although one important limit in our study was the lack of healthy controls, there was no difference in S1P levels between our classic Fabry group and the healthy controls from Brakch et al. (2). So, we affirm that S1P is higher in non-classic Fabry patients than in classic patients. This finding is important as it suggests that the non-classic phenotype involves different pathophysiological pathways from the classic one and would not just consist in a disease continuum. Disturbances in S1P have been observed in several other lysosomal storage diseases with unobvious pathophysiological mechanisms (3). S1P comes from the phosphorylation of sphingosine by the sphingosine kinases SK1 and SK2 (16). The levels of S1P are also regulated by degradative enzymes such as S1P phosphatase and S1P lyase (17). S1P has been involved in local vascular inflammation (18). S1P gradient in lymphatic endothelial cells has also been involved in immune T cells trafficking by favoring their egress through the S1P-receptor-1 activation, an antagonistic mechanism of the chemokine receptor CCR7 (17). Hence, numerous mechanisms can explain the pathological effects of S1P. It is more unobvious to suggest explanations of the S1P dissociation between classic and non-classic phenotype. It has been suggested that theoretically, all the sphingoid bases, and so lysoGb3, might act as structural mimics of S1P (19). Although we did not observe clear relationship between lysoGb3 and S1P, it appears essential to further study the effect of the lysoGb3/S1P balance on sphingosine kinases and S1P receptors.

Also, we found that the ratio S1P/lysoGb3 can help in sorting non-classic from classic patients and may be useful to screen the non-classic disease in patients with low lysoGb3 levels. To date, lysoGb3 has become the marker of choice to screen patients suspected of Fabry disease (20). In untreated Fabry patients, higher concentrations are observed in classic patients. Usually, non-classic patients still have higher levels than controls but some can present normal concentrations (19–21). This is more true in treated patients whereas lysoGb3 decreases under enzyme replacement therapy or migalastat (22,23).

VEGF appears as a key cytokine in the Fabry disease vasculopathy as it participates in the inflammation processes through the regulation of angiogenesis, endothelial permeability, immune cells recruitment and the maintenance of tissue barrier functions (9). VEGF has first been described in Fabry with a proteomic study (8), then confirmed with ELISA on frozen plasmas, where higher levels were associated with angiokeratomas and sweating abnormalities (6). We did not observe any significant correlation, except with the age. The main limit was once more the lack of healthy controls to interpret the differences observed with the published reference.

Conclusion

Plasma S1P was higher in non-classic than in classic Fabry patients, independently from the age and the cardiac disease, which suggests possible independent pathophysiological mechanisms. S1P/lysoGb3 ratio offered a higher sensitivity than lysoGb3 alone to sort non-classic from classic patients. VEGF in plasma was not clinically informative. Further studies are needed to investigate the role of lysoGb3 in S1P metabolism.

Reference

1. Brady RO, Schiffmann R. Clinical features of and recent advances in therapy for Fabry disease. JAMA. 6 déc 2000;284(21):2771-5.

2. Brakch N, Dormond O, Bekri S, Golshayan D, Correvon M, Mazzolai L, et al. Evidence for a role of sphingosine-1 phosphate in cardiovascular remodelling in Fabry disease. Eur Heart J. janv 2010;31(1):67-76.

3. Mirzaian M, Wisse P, Ferraz MJ, Marques ARA, Gabriel TL, van Roomen CPAA, et al. Accurate quantification of sphingosine-1-phosphate in normal and Fabry disease plasma, cells and tissues by LC-MS/MS with (13)C-encoded natural S1P as internal standard. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 1 août 2016;459:36-44.

4. Baer A, Colon-Moran W, Bhattarai N. Characterization of the effects of immunomodulatory drug fingolimod (FTY720) on human T cell receptor signaling pathways. Sci Rep. 19 juill 2018;8(1):10910.

5. Ward MD, Jones DE, Goldman MD. Overview and safety of fingolimod hydrochloride use in patients with multiple sclerosis. Expert Opin Drug Saf. juill 2014;13(7):989-98.

6. Zampetti A, Gnarra M, Borsini W, Giurdanella F, Antuzzi D, Piras A, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF-a) in Fabry disease: association with cutaneous and systemic manifestations with vascular involvement. Cytokine. mars 2013;61(3):933-9.

7. Lee MH, Choi EN, Jeon YJ, Jung S-C. Possible role of transforming growth factor-β1 and vascular endothelial growth factor in Fabry disease nephropathy. Int J Mol Med. déc 2012;30(6):1275-80.

8. Moore DF, Krokhin OV, Beavis RC, Ries M, Robinson C, Goldin E, et al. Proteomics of specific treatment-related alterations in Fabry disease: a strategy to identify biological abnormalities. Proc Natl Acad Sci U S A. 20 févr 2007;104(8):2873-8.

9. Shaik-Dasthagirisaheb YB, Varvara G, Murmura G, Saggini A, Potalivo G, Caraffa A, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF), mast cells and inflammation. Int J Immunopathol Pharmacol. juin 2013;26(2):327-35.

10. Rozenfeld P, Feriozzi S. Contribution of inflammatory pathways to Fabry disease pathogenesis. Mol Genet Metab. nov 2017;122(3):19-27.

11. Mauhin W, Lidove O, Masat E, Mingozzi F, Mariampillai K, Ziza J-M, et al. Innate and Adaptive Immune Response in Fabry Disease. JIMD Rep. 18 févr 2015;

12. Whybra C, Kampmann C, Krummenauer F, Ries M, Mengel E, Miebach E, et al. The Mainz Severity Score Index: a new instrument for quantifying the Anderson-Fabry disease phenotype, and the response of patients to enzyme replacement therapy. Clin Genet. avr 2004;65(4):299-307.

13. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. Ann Intern Med. 16 mars 1999;130(6):461-70.

14. Mauhin W, Lidove O, Amelin D, Lamari F, Caillaud C, Mingozzi F, et al. Deep characterization of the anti-drug antibodies developed in Fabry disease patients, a prospective

analysis from the French multicenter cohort FFABRY. Orphanet J Rare Dis. 1 déc 2018;13(1):127.

15. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software « EZR » for medical statistics. Bone Marrow Transplant. mars 2013;48(3):452-8.

16. Snider AJ, Orr Gandy KA, Obeid LM. Sphingosine kinase: Role in regulation of bioactive sphingolipid mediators in inflammation. Biochimie. juin 2010;92(6):707-15.

17. Mendelson K, Evans T, Hla T. Sphingosine 1-phosphate signalling. Dev Camb Engl. 1 janv 2014;141(1):5-9.

18. Mahajan-Thakur S, Böhm A, Jedlitschky G, Schrör K, Rauch BH. Sphingosine-1-Phosphate and Its Receptors: A Mutual Link between Blood Coagulation and Inflammation. Mediators Inflamm. 2015;2015:831059.

19. Ferraz MJ, Marques ARA, Appelman MD, Verhoek M, Strijland A, Mirzaian M, et al. Lysosomal glycosphingolipid catabolism by acid ceramidase: formation of glycosphingoid bases during deficiency of glycosidases. FEBS Lett. mars 2016;590(6):716-25.

20. Nowak A, Mechtler TP, Desnick RJ, Kasper DC. Plasma LysoGb3: A useful biomarker for the diagnosis and treatment of Fabry disease heterozygotes. Mol Genet Metab. févr 2017;120(1-2):57-61.

21. Smid BE, van der Tol L, Biegstraaten M, Linthorst GE, Hollak CEM, Poorthuis BJHM. Plasma globotriaosylsphingosine in relation to phenotypes of Fabry disease. J Med Genet. avr 2015;52(4):262-8.

22. van Breemen MJ, Rombach SM, Dekker N, Poorthuis BJ, Linthorst GE, Zwinderman AH, et al. Reduction of elevated plasma globotriaosylsphingosine in patients with classic Fabry disease following enzyme replacement therapy. Biochim Biophys Acta. janv 2011;1812(1):70-6.

23. Young-Gqamana B, Brignol N, Chang H-H, Khanna R, Soska R, Fuller M, et al. Migalastat HCl reduces globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3) in Fabry transgenic mice and in the plasma of Fabry patients. PloS One. 2013;8(3):e57631.

Discussion et perspectives

Notre travail a permis de caractériser les phénomènes inflammatoires participant à la physiopathologie propre de la maladie de Fabry mais également ceux ayant cours lors de son traitement par enzymothérapie substitutive.

Réponse immunitaire développée à l'encontre de l'enzymothérapie substitutive

Réponse humorale & anticorps anti-agalsidase

Lors de notre première étude, nous avons élaboré un outil de dépistage des anticorps anti-agalsidase indépendant, permettant la comparaison des titres développés contre l'agalsidase alfa et beta. Alors qu'on a longtemps supposé l'agalsidase beta plus immunogène du fait de sa production au sein de cellules de hamster et de sa posologie plus importante (176), nous n'avons pas observé de différence en termes de prévalence de séropositivité entre les patients traités par agalsidase alfa et ceux traités par agalsidase beta. Aussi, nous avons pu confirmer la réactivité croisée parfaite envers les deux molécules déjà observée par différentes équipes (90,151). C'est davantage le terrain qui semble dicter la réponse humorale. Ainsi, nous avons pu observer une réponse humorale plus fréquente chez les hommes et plus particulièrement chez les hommes de phénotype classique. Ces derniers ont en général une activité résiduelle en alpha-galactosidase A effondrée voire nulle contrairement aux patients de phénotype non-classiques (58). On peut dès lors supposer que l'enzymothérapie recombinante déclenche une réaction allo-immune chez les patients de phénotype classique. Ce phénomène a depuis longtemps été décrit et pris en compte dans la maladie de Pompe où le statut CRIM définit la présence de *matériel immunogène résiduel* correspondant à l'activité enzymatique résiduelle (177).

Si en analyse univariée, on observait un pronostic rénal péjoratif associé à la présence d'anticorps, ce risque accru disparaissait lorsqu'on prenait en compte les phénotypes cliniques. Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'impérieuse nécessité de prendre en compte ces phénotypes dans les analyses concernant la maladie de Fabry.

Si aucun événement clinique n'était donc associé à la présence d'anticorps anti-agalsidase, nous avons quand même observé des taux de lysoGb3 supérieurs chez les patients avec

anticorps, indépendamment des phénotypes cliniques et surtout le caractère inhibiteur de ces anticorps. Sachant que les taux de lysoGb3 sont corrélés avant traitement au pronostic global de la maladie de Fabry (178), on peut supposer que les patients avec anticorps inhibiteurs aient un pronostic péjoratif. Notre protocole d'étude ne nous permettait néanmoins pas de statuer sur le lien de causalité entre anticorps et pronostic ne connaissant pas le taux initial de lysoGb3 prétraitement. Une analyse récente semble montrer que les taux de lysoGb3 sont indépendants du titre d'anticorps puisque le lysoGb3 reste stable malgré une diminution du titre après introduction d'un traitement immunosuppresseur dans le cadre de greffe rénale (179). Nous avons d'ores et déjà prévu un suivi longitudinal des patients pour permettre de répondre à cette question.

Nous avons également pu mettre en évidence que les anticorps développés sont polytypiques avec des IgG1 plus fréquentes mais des IgG4 particulièrement élevées et corrélées au pouvoir inhibiteur lorsque présents. Cette inhibition était confirmée en intracellulaire suggérant l'absence d'effet chaperonne des anticorps. Cette inhibition n'affectait pas l'alpha galactosidase B, ouvrant la porte à l'usage de cette dernière enzyme pour une substitution dans la maladie de Fabry (180).

Réponse cellulaire

Si le développement d'une réponse humorale contre l'enzymothérapie est certain, l'existence d'une réponse cellulaire n'a jamais été investiguée. Lors de notre 2e étude, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les patients en fonction de leur statut anticorps. Les patients traités présentaient davantage des caractéristiques cellulaires intermédiaires entre les patients non-traités et les contrôles non malades suggérant une correction partielle des perturbations. Cette absence de différence est possiblement liée à l'absence de stimulation antigénique opérée dans notre protocole.

Si nous n'observions pas de différence en termes de pourcentage de cellules T cytotoxiques, nous avons cependant mis en évidence une augmentation significative du pourcentage de cellules NK chez les patients sous agalsidase beta. Cette augmentation suggère le développement d'une réaction spécifique chez les patients traités par agalsidase beta. Les différences de glycosylation entre les molécules d'agalsidase (89) pourraient expliquer cette réaction dont l'impact reste inconnu.

Réponse immune contre l'enzymothérapie et perspectives thérapeutiques

En l'absence d'effets délétères propres évidents des anticorps anti-agalsidase, l'usage de thérapeutiques immunosuppressives qui viseraient à réduire le titre de ces anticorps ne semble aujourd'hui pas indiqué chez les patients traités par enzymothérapie.
Les molécules chaperonnes sont aujourd'hui disponibles, leur association à l'enzymothérapie substitutive pourrait permettre d'échapper aux réactions immunitaires en modifiant la conformation de l'enzyme et donc possiblement les épitopes. Alors que ces thérapies combinées sont à l'étude (101), il serait intéressant d'étudier la réponse immunitaire dans ce contexte.
L'avenir est aussi au développement de thérapies géniques spécifiques - qui permettraient la production d'alpha-galactosidase A à des taux beaucoup plus importants que ceux administrés aujourd'hui par enzymothérapie substitutive classique. Une surveillance rapprochée de la réponse humorale chez les patients de phénotype classique mais aussi d'une éventuelle réponse NK s'avèrerait indispensable. Efficacité et sécurité cliniques sont en jeu. Or jusqu'à ce jour, les protocoles de thérapies géniques publiés chez la souris n'ont pas surveillé cette réponse : un premier protocole avec lentivirus a été conduit sur des souris immunodéficientes (105), un autre utilisant un AAV a montré une diminution progressive du transgène qui suggérait l'existence d'une réaction immune, mais aucun dosage n'avait été réalisé (106). Avec notre travail, nous proposons des protocoles simples d'identification de ces anticorps ainsi que des mesures d'inhibition susceptibles d'être utilisées lors de prochaines études.

Phénomènes inflammatoires observés chez les patients non traités

Balance Sphingosine-1-phosphate / lysoGb3 en fonction des phénotypes

Notre travail a permis la mise en évidence d'une augmentation significative des concentrations de S1P chez les patients non classiques et la compréhension des incohérences observées entre les deux seules précédentes études ayant étudié la S1P dans la maladie de Fabry. En effet, une première étude de Brakch et al. avait mis en évidence une augmentation significative de la S1P chez des patients Fabry avec cardiopathie sans mention du phénotype, alors que les femmes Fabry sans cardiopathie avaient des taux de S1P normaux (29). Une deuxième étude de Mirzaian et al. réalisée chez des patients classiques n'avait quant à elle pas pu conclure, l'absence de différence significative avec les contrôles ayant été mise sur le

compte d'un conditionnement différent des échantillons contrôles (181). En analyse multivariée, nous avons montré que la S1P n'était pas corrélée à la cardiopathie ni à l'âge des patients mais bien au phénotype clinique. Cette découverte est importante puisqu'elle suggère que la physiopathologie de la maladie chez les patients non classiques emprunte, en partie tout du moins, des voies métaboliques différentes par rapport aux patients de phénotype classique. Il ne s'agirait donc pas « simplement » d'un continuum physiopathologique lié uniquement à l'activité enzymatique résiduelle en alpha-galactosidase A.

La S1P est issue de la phosphorylation de la sphingosine par les sphingosine kinases 1 et 2. Elle peut être dégradée par la S1P lyase ou la S1P phosphatase (182). La S1P peut se lier à cinq récepteurs différents S1PR1-5, expliquant sa pléiotropie (183). La S1P est ainsi impliquée dans la régulation de l'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire au niveau des tissus vasculaires, participant à la perméabilité nécessaire aux phénomènes inflammatoires locaux, mais aussi au développement embryonnaire de l'endoderme et du développement cardiaque (182). La S1P est impliquée dans la carcinogénèse, induisant une résistance aux chimiothérapies en inhibant l'apoptose et en facilitant l'émergence de métastases (184). Via le S1P1, le gradient de S1P entre les vaisseaux lymphatiques et le compartiment sanguin favorise la sortie des cellules immunitaires hors des organes lymphoïdes, avec une action contraire au CCR7, participant ainsi à l'acheminement des cellules inflammatoires sur leurs sites d'action (182,185). Ce mécanisme est ciblé par le fingolimod dans le traitement de la sclérose en plaques (185,186). Enfin, la S1P et les sphingosine kinases sont directement impliquées dans l'inflammation locale puisque nécessaires à la production de la cyclooxygénase 2 (COX2) et des prosta*GLA*ndines E2 induites par le TNF-alpha et participant à la sensibilité cellulaire à l'IL-1, l'IFN-gamma ou encore au fragment C5a du complément (187). On comprend ainsi le potentiel pathogène d'un excès de S1P. C'est l'asymétrie entre les phénotypes classiques et non-classiques qui pose ici question. En faisant un parallèle avec l'asymétrie observée entre les phénotypes avec le lysoGb3 (178), sachant que la base sphingoïde du lysoGb3 lui permet théoriquement de mimer la S1P (188), on peut supposer que le lysoGb3 en grand excès dans le phénotype classique entre en compétition avec la S1P, aboutissant potentiellement aux mêmes cascades de signalisation mais favorisant aussi potentiellement un rétrocontrôle négatif sur la S1P. Il est désormais primordial de réaliser des études fonctionnelles pour connaître l'impact du lysoGb3 sur les récepteurs de la S1P mais aussi des sphingosine kinases, alors que des thérapeutiques sont déjà disponibles pour cibler ces voies (184,186).

Phénotype lymphocytaire T immature

Grâce à l'étude CyTOF, nous avons identifié un phénomène jusque-là inconnu dans la physiopathologie de la maladie de Fabry, à savoir des modifications dans les phénotypes lymphocytaires T. On observait ainsi une diminution du pourcentage de cellules CD4+ CCR7+ et une augmentation des cellules CD4+ CCR7- symétrique, fortement corrélées aux taux de lysoGb3 et S1P couplés, ce qui conforte l'hypothèse d'une activation des récepteurs de la S1P. On observait de plus une augmentation du ratio cellulaire CD27+/CD57+ dans les populations lymphocytaires T CD45RA+/-CCR7- CD4 et CD8 indépendamment de l'âge, du phénotype clinique et des taux de lysoGb3 ou de S1P. L'expression des marqueurs de co-stimulation CD27 et du CD28, le plus souvent co-exprimés, caractérisent des stades de différenciation plus précoces que celle du marqueur d'immuno-sénescence CD57 (189). Les cellules CD27+ ont des télomères plus longs, et donc un pouvoir de prolifération plus important, et un potentiel de sécrétion en interféron après stimulation antigénique plus important que les cellules CD27- (189). Les cellules CD57+ sont classiquement décrites comme sénescentes avec des seuils d'activation aux stimulations antigéniques plus élevés (189). CD27, comme CD28, ne sont classiquement pas co-exprimés avec CD57 (190). L'âge et les stimulations antigéniques à répétition – comme l'infection par le CMV - entrainent en général une diminution du ratio CD27+(ou CD28+)/CD57+ (191). Une diminution des cellules CD57+CD28- n'a jusque-là été rapportée que dans une seule condition : l'infection par le virus VIH (191–193). Ceci n'est pas anodin puisque l'organisation membranaire avec des radeaux lipidiques riches en glycosphingolipides est primordiale pour la fusion du VIH-1 au lymphocyte T CD4 : la protéine virale Gp120 reconnait le Gb3 (ou le ganglioside GM3) à la surface, ce qui permet la stabilisation de l'attachement du virus et facilite l'acheminement jusqu'aux corécepteurs appropriés CCR5 et CXCR4 grâce à la mobilité des radeaux lipidiques (194). Aussi, l'infection par le VIH s'accompagne d'une augmentation de la densité en Gb3 sur les surfaces membranaires des lymphocytes CD4 (195). C'est donc possiblement à cause de l'excès en Gb3 que la balance CD27/CD57 est modifiée dans le VIH, comme dans la maladie de Fabry. Comme dans le VIH, nous avons observé une expression plus importante du marqueur apoptotique CD95 par les cellules CD57+ suggérant une mort cellulaire accrue de cette population (191). Des études fonctionnelles sur lymphocytes de sujet sains permettraient de clarifier ces mécanismes.

Diminution des lymphocytes B

Chez les patients non traités, nous avons observé une diminution quasi-significative du pourcentage en lymphocytes B. Cette diminution affectait tous les sous-types cellulaires B et n'était pas influencée par le statut anticorps. Cette diminution n'était pas observée dans l'étude précédente de Rozenfeld et al. (142). En l'absence d'étude fonctionnelle, notre constat est d'interprétation délicate. Le Gb3, plus souvent nommé CD77 dans l'immunologie de la cellule B est un marqueur de différenciation des cellules du centre germinatif. Des anticorps anti-CD77 ont été impliqués dans une mort cellulaire accrue secondaire à l'internalisation du CD19 (5). L'existence de tels anticorps n'a à notre connaissance jamais été recherchée au cours de la maladie de Fabry. Pourtant des anticorps anti-glycolipides ont déjà été décrits dans la maladie de Gaucher (196), et des anticorps anti-Gb3 ont été décrits au cours de l'infection par le VIH accompagnant l'augmentation en Gb3 précédemment abordée (195). La recherche de tels anticorps semble aujourd'hui importante pour la compréhension de la physiopathologie de la maladie de Fabry.

Activation monocytaire

Comme précédemment décrit par DeGraba et al., nous avons observé une augmentation de l'expression du CD11b et une tendance quasi-significative à une surexpression du HLA-DR à la surface des monocytes chez les patients non traités suggérant une activation monocytaire et un état pro-thrombotique (197). De façon intéressante, les patients traités avaient des expressions de CD1d et de CD11b quasi-normales suggérant une correction par le traitement.

Implication des CD1d et iNKT

A l'inverse de Rozenfeld et al., nous n'avons pas mis en évidence de diminution de l'expression du CD1d à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (142). Grâce à leur TCR invariant spécifique, les cellules iNKT sont susceptibles de reconnaître un antigène lipidique présenté par le CD1d des cellules présentatrices d'antigènes. Le Gb3 a été impliqué dans l'inhibition des cellules iNKT par compétition du Gb3 avec les lipides antigéniques sur le CD1d (131). On pourrait donc s'attendre à une diminution de la présentation de CD1d libre et une augmentation de la présentation de CD1d couplé au Gb3 sur les cellules présentatrices d'antigènes de patients Fabry. Ceci expliquerait les résultats obtenus par Rozenfeld et al. Nous avons utilisé un clone d'anticorps anti-CD1d différent de celui utilisé par Rozenfeld et

al., on peut dès lors supposer que notre clone ait reconnu le CD1d indépendamment de sa liaison au Gb3. Au cours d'une étude sur sang frais, Pereira et al. ont rapporté l'absence de différence en termes de pourcentages d'iNKT totales chez les patients Fabry, néanmoins, les iNKT CD4+ étaient diminuées et les doubles négatives CD4-CD8- augmentées (143). Nous n'avons mis en évidence aucune différence significative en termes de pourcentage total ou de phénotype. Notre protocole sur cellules congelées n'est vraisemblablement pas le plus adapté à l'étude de cette population rare et fragile.

Inflammasome

Les indices laissant à penser une implication de l'inflammasome dans la physiopathologie de la maladie de Fabry sont multiples (Cf. introduction). Les différentes expériences menées dans ce travail n'avaient pas pour objectif principal l'identification de ce processus. On n'observait pas de modification dans l'expression de RORgamma-t, facteur de transcription majeur de la lignée Th17 augmentée lors de l'activation de l'inflammasome (146,198). Cela ne remet cependant pas l'hypothèse en question, les leucocytes n'étant pas les cellules les plus affectées par la surcharge en Gb3 et l'inflammasome pouvant être localement activé au niveau endothélial ou rénal (199,200). Il semble ainsi important d'étudier cette voie dans ces deux tissus cibles dans la maladie de Fabry.

Conclusion

Avec ce travail, nous avons abordé et caractérisé différentes facettes de la réaction immunitaire ayant lieu au cours de la maladie de Fabry.

Concernant la réaction développée en réaction à l'enzymothérapie, nous avons élaboré un outil de dépistage fiable des anticorps anti-agalsidase. Ces anticorps, principalement les IgG4, ont un pouvoir inhibiteur enzymatique, ont une réactivité croisée parfaite contre les deux enzymothérapies disponibles et sont préférentiellement développés chez les patients de phénotype classique. La présence d'anticorps n'est pas associée à la survenue d'événement clinique particulier mais à des concentrations de lysoGb3 plus élevées. Si la prévalence des anticorps n'était pas différente selon le traitement des patients, les patients traités par agalsidase beta avaient un nombre significativement plus élevé de cellules Natural Killer suggérant une réaction spécifique.

Concernant les mécanismes physiopathologiques inflammatoires, nous avons identifié des perturbations phénotypiques dans les lignées lymphocytaires T. Les lymphocytes T CCR7- CD4 comme CD8, ayant préférentiellement un phénotype atypique immature CD27+CD57- jusque-là observé uniquement au cours de l'infection par le VIH. Aussi, l'expression du CCR7 était corrélée aux concentrations de lysoGb3 et de sphingosine-1-phosphate dans les lymphocytes T CD4 suggérant une activation des récepteurs à la sphingosine-1-phosphate dans la maladie. Par ailleurs, nous avons confirmé le phénotype activé et pro-inflammatoire des monocytes chez les patients non traités et une correction partielle observée sous traitement. Enfin, nous avons observé une diminution quasi-significative du pourcentage des lymphocytes B totaux chez les patients.

Ces travaux donnent des outils nécessaires à l'élaboration prochaine de thérapies géniques spécifiques mais il ouvre également de nombreuses pistes de recherches, notamment l'exploration des voies métaboliques de la sphingosine-1-phosphate et la recherche d'anticorps anti-Gb3 dans la maladie de Fabry ou encore l'étude de la maturation des lymphocytes T associée à l'excès de Gb3 dans la maladie de Fabry comme dans l'infection par le VIH.

Références

1. Waldek S, Patel MR, Banikazemi M, Lemay R, Lee P. Life expectancy and cause of death in males and females with Fabry disease: findings from the Fabry Registry. Genet Med Off J Am Coll Med Genet. nov 2009;11(11):790-6.

2. Mehta A, Clarke JTR, Giugliani R, Elliott P, Linhart A, Beck M, et al. Natural course of Fabry disease: changing pattern of causes of death in FOS - Fabry Outcome Survey. J Med Genet. août 2009;46(8):548-52.

3. Schulze H, Sandhoff K. Sphingolipids and lysosomal pathologies. Biochim Biophys Acta. mai 2014;1841(5):799-810.

4. Oosterwijk E, Kalisiak A, Wakka JC, Scheinberg DA, Old LJ. Monoclonal antibodies against Gal alpha 1-4Gal beta 1-4Glc (Pk, CD77) produced with a synthetic glycoconjugate as immunogen: reactivity with carbohydrates, with fresh frozen human tissues and hematopoietic tumors. Int J Cancer. 30 juill 1991;48(6):848-54.

5. Khine AA, Firtel M, Lingwood CA. CD77-dependent retrograde transport of CD19 to the nuclear membrane: functional relationship between CD77 and CD19 during germinal center B-cell apoptosis. J Cell Physiol. août 1998;176(2):281-92.

6. Bauwens A, Betz J, Meisen I, Kemper B, Karch H, Müthing J. Facing glycosphingolipid-Shiga toxin interaction: dire straits for endothelial cells of the human vasculature. Cell Mol Life Sci CMLS. févr 2013;70(3):425-57.

7. Askari H, Kaneski CR, Semino-Mora C, Desai P, Ang A, Kleiner DE, et al. Cellular and tissue localization of globotriaosylceramide in Fabry disease. Virchows Arch Int J Pathol. oct 2007;451(4):823-34.

8. Wang AM, Desnick RJ. Structural organization and complete sequence of the human alpha-N-acetylgalactosaminidase gene: homology with the alpha-galactosidase A gene provides evidence for evolution from a common ancestral gene. Genomics. mai 1991;10(1):133-42.

9. Winchester B, Young E. Biochemical and genetic diagnosis of Fabry disease. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, éditeurs. Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS. Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006

10. Brady RO, Gal AE, Bradley RM, Martensson E, Warshaw AL, Laster L. Enzymatic defect in Fabry's disease. Ceramidetrihexosidase deficiency. N Engl J Med. 25 mai 1967;276(21):1163-7.

11. Hamers MN, Westerveld A, Khan M, Tager JM. Characterization of alpha-galactosidase isoenzymes in normal and Fabry human-Chinese Hamster somatic cell hybrids. Hum Genet. 10 mai 1977;36(3):289-97.

12. Saito S, Ohno K, Sakuraba H. Fabry-database.org: database of the clinical phenotypes, genotypes and mutant α-galactosidase A structures in Fabry disease. J Hum Genet. juin 2011;56(6):467-8.

13. Gal A, Schäfer E, Rohard I. The genetic basis of Fabry disease. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, éditeurs. Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS. Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006

14. Garman SC, Garboczi DN. The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase. J Mol Biol. 19 mars 2004;337(2):319-35.

15. Matsuzawa F, Aikawa S, Doi H, Okumiya T, Sakuraba H. Fabry disease: correlation between structural changes in alpha-galactosidase, and clinical and biochemical phenotypes. Hum Genet. août 2005;117(4):317-28.

16. Echevarria L, Benistan K, Toussaint A, Dubourg O, Hagege AA, Eladari D, et al. X-chromosome inactivation in female patients with Fabry disease. Clin Genet. janv 2016;89(1):44-54.

17. Fabry J. Ein Beitrag zur Kenntnis der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa haemorrhagica Hebrae). Arch Dermatol Syph. 1898;43:187-200.

18. Cuny J-F. L'angiokératome dans le diagnostic de la maladie de Fabry. Médecine/sciences. 21:40-2.

19. Linthorst GE, De Rie MA, Tjiam KH, Aerts JMFG, Dingemans KP, Hollak CEM. Misdiagnosis of Fabry disease: importance of biochemical confirmation of clinical or pathological suspicion. Br J Dermatol. mars 2004;150(3):575-7.

20. Schiller PI, Itin PH. Angiokeratomas: an update. Dermatol Basel Switz. 1996;193(4):275-82.

21. Orteu CH, Jansen T, Lidove O, Jaussaud R, Hughes DA, Pintos-Morell G, et al. Fabry disease and the skin: data from FOS, the Fabry outcome survey. Br J Dermatol. août 2007;157(2):331-7.

22. Del Pino M, Andrés A, Bernabéu AÁ, de Juan-Rivera J, Fernández E, de Dios García Díaz J, et al. Fabry Nephropathy: An Evidence-Based Narrative Review. Kidney Blood Press Res. 2018;43(2):406-21.

23. Branton M, Schiffmann R, Kopp JB. Natural history and treatment of renal involvement in Fabry disease. J Am Soc Nephrol JASN. juin 2002;13 Suppl 2:S139-143.

24. Tøndel C, Kanai T, Larsen KK, Ito S, Politei JM, Warnock DG, et al. Foot process effacement is an early marker of nephropathy in young classic Fabry patients without albuminuria. Nephron. 2015;129(1):16-21.

25. Frustaci A, Morgante E, Russo MA, Scopelliti F, Grande C, Verardo R, et al. Pathology and function of conduction tissue in Fabry disease cardiomyopathy. Circ Arrhythm Electrophysiol. août 2015;8(4):799-805.

26. Marian AJ, Braunwald E. Hypertrophic Cardiomyopathy: Genetics, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Therapy. Circ Res. 15 sept 2017;121(7):749-70.

27. Rozenfeld P, Feriozzi S. Contribution of inflammatory pathways to Fabry disease pathogenesis. Mol Genet Metab. 2017 Nov;122(3):19-27

28. Imbriaco M, Pellegrino T, Piscopo V, Petretta M, Ponsiglione A, Nappi C, et al. Cardiac sympathetic neuronal damage precedes myocardial fibrosis in patients with Anderson-Fabry disease. Eur J Nucl Med Mol Imaging. déc 2017;44(13):2266-73.

29. Brakch N, Dormond O, Bekri S, Golshayan D, Correvon M, Mazzolai L, et al. Evidence for a role of sphingosine-1 phosphate in cardiovascular remodelling in Fabry disease. Eur Heart J. janv 2010;31(1):67-76.

30. Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tukel T, Thiagarajan G, Sakuraba H, et al. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. Am J Hum Genet. juill 2006;79(1):31-40.

31. Baig S, Edward NC, Kotecha D, Liu B, Nordin S, Kozor R, et al. Ventricular arrhythmia and sudden cardiac death in Fabry disease: a systematic review of risk factors in clinical practice. Eur Eur Pacing Arrhythm Card Electrophysiol J Work Groups Card Pacing Arrhythm Card Cell Electrophysiol Eur Soc Cardiol. Europace. 2018 Sep 1;20(FI2):f153-f161;

32. Politei JM, Bouhassira D, Germain DP, Goizet C, Guerrero-Sola A, Hilz MJ, et al. Pain in Fabry Disease: Practical Recommendations for Diagnosis and Treatment. CNS Neurosci Ther. 2016;22(7):568-76.

33. Sims K, Politei J, Banikazemi M, Lee P. Stroke in Fabry disease frequently occurs before diagnosis and in the absence of other clinical events: natural history data from the Fabry Registry. Stroke. mars 2009;40(3):788-94.

34. Fazekas F, Enzinger C, Schmidt R, Grittner U, Giese A-K, Hennerici MG, et al. Brain magnetic resonance imaging findings fail to suspect Fabry disease in young patients with an acute cerebrovascular event. Stroke. juin 2015;46(6):1548-53.

35. Goeggel Simonetti B, Mono M-L, Huynh-Do U, Michel P, Odier C, Sztajzel R, et al. Risk factors, aetiology and outcome of ischaemic stroke in young adults: the Swiss Young Stroke Study (SYSS). J Neurol. sept 2015;262(9):2025-32.

36. Romani I, Borsini W, Nencini P, Morrone A, Ferri L, Frusconi S, et al. De novo Diagnosis of Fabry Disease among Italian Adults with Acute Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack. J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc. nov 2015;24(11):2588-95.

37. Uçeyler N, Homola GA, Guerrero González H, Kramer D, Wanner C, Weidemann F, et al. Increased arterial diameters in the posterior cerebral circulation in men with Fabry disease. PloS One. 2014;9(1):e87054.

38. Gavazzi C, Borsini W, Guerrini L, Della Nave R, Rocca MA, Tessa C, et al. Subcortical damage and cortical functional changes in men and women with Fabry disease: a multifaceted MR study. Radiology. nov 2006;241(2):492-500.

39. Burlina AP, Manara R, Caillaud C, Laissy J-P, Severino M, Klein I, et al. The pulvinar sign: frequency and clinical correlations in Fabry disease. J Neurol. mai 2008;255(5):738-44.

40. Löhle M, Hughes D, Milligan A, Richfield L, Reichmann H, Mehta A, et al. Clinical prodromes of neurodegeneration in Anderson-Fabry disease. Neurology. 7 avr 2015;84(14):1454-64.

41. Lidove O, Chauveheid M-P, Caillaud C, Froissart R, Benoist L, Alamowitch S, et al. Aseptic meningitis and ischaemic stroke in Fabry disease. Int J Clin Pract. nov 2009;63(11):1663-7.

42. Germain DP, Avan P, Chassaing A, Bonfils P. Patients affected with Fabry disease have an increased incidence of progressive hearing loss and sudden deafness: an investigation of twenty-two hemizygous male patients. BMC Med Genet. 11 oct 2002;3:10.

43. Suntjens EB, Smid BE, Biegstraaten M, Dreschler WA, Hollak CEM, Linthorst GE. Hearing loss in adult patients with Fabry disease treated with enzyme replacement therapy. J Inherit Metab Dis. mars 2015;38(2):351-8.

44. Keilmann A, Hegemann S, Conti G, Hajioff D. Fabry disease and the ear. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, éditeurs. Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS. Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006

45. Carmona S, Weinschelbaum R, Pardal A, Marchesoni C, Zuberbuhler P, Acosta P, et al. Neuro-Otological and Peripheral Nerve Involvement in Fabry Disease. Audiol Res. 18 juill 2017;7(2):176.

46. Sergi B, Conti G, Paludetti G, Interdisciplinary Study Group On Fabry Disease. Inner ear involvement in Anderson-Fabry disease: long-term follow-up during enzyme replacement therapy. Acta Otorhinolaryngol Ital Organo Uff Della Soc Ital Otorinolaringol E Chir Cerv-facc. avr 2010;30(2):87-93.

47. Kaminsky P, Noel E, Jaussaud R, Leguy-Seguin V, Hachulla E, Zenone T, et al. Multidimensional analysis of clinical symptoms in patients with Fabry's disease. Int J Clin Pract. févr 2013;67(2):120-7.

48. van der Tol L, Sminia ML, Hollak CEM, Biegstraaten M. Cornea verticillata supports a diagnosis of Fabry disease in non-classical phenotypes: results from the Dutch cohort and a systematic review. Br J Ophthalmol. janv 2016;100(1):3-8.

49. Pitz S, Kalkum G, Arash L, Karabul N, Sodi A, Larroque S, et al. Ocular signs correlate well with disease severity and genotype in Fabry disease. PloS One. 2015;10(3):e0120814.

50. Wilcox WR, Feldt-Rasmussen U, Martins AM, Ortiz A, Lemay RM, Jovanovic A, et al. Improvement of Fabry Disease-Related Gastrointestinal Symptoms in a Significant Proportion of Female Patients Treated with Agalsidase Beta: Data from the Fabry Registry. JIMD Rep. 17 mai 2017;38:45-51.

51. Franzen DP, Nowak A, Haile SR, Mottet D, Bonani M, Dormond O, et al. Long-term follow-up of pulmonary function in Fabry disease: A bi-center observational study. PloS One. 2017;12(7):e0180437.

52. Rahman AN, Simeone FA, Hackel DB, Hall PW, Hirsch EZ, Harris JW. Angiokeratoma corporis diffusum universale (hereditary dystopic lipidosis). Trans Assoc Am Physicians. 1961;74:366-77.

53. Burda CD, Winder PR. Angiokeratoma corporis diffusum universale (Fabry's disease) in female subjects. Am J Med. févr 1967;42(2):293-301.

54. von Scheidt W, Eng CM, Fitzmaurice TF, Erdmann E, Hübner G, Olsen EG, et al. An atypical variant of Fabry's disease with manifestations confined to the myocardium. N Engl J Med. 7 févr 1991;324(6):395-9.

55. Chieregato G. [THE FIRST CASE OF DIFFUSE ANGIOKERATOMA (FABRY TYPE) APPEARING IN A FEMALE SUBJECT]. Minerva Dermatol. juill 1963;38:229-36.

56. Broadbent JC, Edwards WD, Gordon H, Hartzler GO, Krawisz JE. Fabry cardiomyopathy in the female confirmed by endomyocardial biopsy. Mayo Clin Proc. oct 1981;56(10):623-8.

57. Castro LH, Monteiro ML, Barbosa ER, Scaff M, Canelas HM. Fabry's disease in a female carrier with bilateral thalamic infarcts: a case report and a family study. Sao Paulo Med J Rev Paul Med. déc 1994;112(4):649-53.

58. Brady RO, Schiffmann R. Clinical features of and recent advances in therapy for Fabry disease. JAMA. 6 déc 2000;284(21):2771-5.

59. Schiffmann R, Waldek S, Benigni A, Auray-Blais C. Biomarkers of Fabry disease nephropathy. Clin J Am Soc Nephrol CJASN. févr 2010;5(2):360-4.

60. Tanislav C, Guenduez D, Liebetrau C, Giese AK, Eichler S, Sieweke N, et al. Cardiac Troponin I: A Valuable Biomarker Indicating the Cardiac Involvement in Fabry Disease. PloS One. 2016;11(6):e0157640.

61. Shu L, Vivekanandan-Giri A, Pennathur S, Smid BE, Aerts JMF, Hollak CEM, et al. Establishing 3-nitrotyrosine as a biomarker for the vasculopathy of Fabry disease. Kidney Int. 8 janv 2014;

62. Auray-Blais C, Cyr D, Ntwari A, West ML, Cox-Brinkman J, Bichet DG, et al. Urinary globotriaosylceramide excretion correlates with the genotype in children and adults with Fabry disease. Mol Genet Metab. mars 2008;93(3):331-40.

63. Chatterjee S, Gupta P, Pyeritz RE, Kwiterovich PO. Immunohistochemical localization of glycosphingolipid in urinary renal tubular cells in Fabry's disease. Am J Clin Pathol. juill 1984;82(1):24-8.

64. Toupin A, Lavoie P, Arthus M-F, Abaoui M, Boutin M, Fortier C, et al. Analysis of globotriaosylceramide (Gb3) isoforms/analogs in unfractionated leukocytes, B lymphocytes and monocytes from Fabry patients using ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Anal Chim Acta. 26 juill 2018;1015:35-49.

65. Boutin M, Menkovic I, Martineau T, Vaillancourt-Lavigueur V, Toupin A, Auray-Blais C. Separation and Analysis of Lactosylceramide, Galabiosylceramide, and Globotriaosylceramide by LC-MS/MS in Urine of Fabry Disease Patients. Anal Chem. 19 déc 2017;89(24):13382-90.

66. Vedder AC, Linthorst GE, van Breemen MJ, Groener JEM, Bemelman FJ, Strijland A, et al. The Dutch Fabry cohort: diversity of clinical manifestations and Gb3 levels. J Inherit Metab Dis. févr 2007;30(1):68-78.

67. Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, Donker-Koopman WE, Strijland A, Ottenhoff R, et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 26 févr 2008;105(8):2812-7.

68. Nowak A, Mechtler TP, Desnick RJ, Kasper DC. Plasma LysoGb3: A useful biomarker for the diagnosis and treatment of Fabry disease heterozygotes. Mol Genet Metab. févr 2017;120(1-2):57-61.

69. Auray-Blais C, Lavoie P, Boutin M, Ntwari A, Hsu T-R, Huang C-K, et al. Biomarkers associated with clinical manifestations in Fabry disease patients with a late-onset cardiac variant mutation. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. mars 2017;466:185-93.

70. Smid BE, van der Tol L, Cecchi F, Elliott PM, Hughes DA, Linthorst GE, et al. Uncertain diagnosis of Fabry disease: consensus recommendation on diagnosis in adults with left ventricular

hypertrophy and genetic variants of unknown significance. Int J Cardiol. 15 déc 2014;177(2):400-8.

71. van der Tol L, Cassiman D, Houge G, Janssen MC, Lachmann RH, Linthorst GE, et al. Uncertain diagnosis of fabry disease in patients with neuropathic pain, angiokeratoma or cornea verticillata: consensus on the approach to diagnosis and follow-up. JIMD Rep. 2014;17:83-90.

72. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. JAMA J Am Med Assoc. 20 janv 1999;281(3):249-54.

73. Burton BK, Charrow J, Hoganson GE, Waggoner D, Tinkle B, Braddock SR, et al. Newborn Screening for Lysosomal Storage Disorders in Illinois: The Initial 15-Month Experience. J Pediatr. nov 2017;190:130-5.

74. Hopkins PV, Klug T, Vermette L, Raburn-Miller J, Kiesling J, Rogers S. Incidence of 4 Lysosomal Storage Disorders From 4 Years of Newborn Screening. JAMA Pediatr. 2018 Jul 1;172(7):696-697.

75. Haute Autorité de Santé. Maladie de Fabry Protocole national de diagnostic et de soins. 2010.

76. Tuttolomondo A, Simonetta I, Duro G, Pecoraro R, Miceli S, Colomba P, et al. Inter-familial and intra-familial phenotypic variability in three Sicilian families with Anderson-Fabry disease. Oncotarget. 22 sept 2017;8(37):61415-24.

77. Hughes DA, Malmenäs M, Deegan PB, Elliott PM, Ginsberg L, Hajioff D, et al. Fabry International Prognostic Index: a predictive severity score for Anderson-Fabry disease. J Med Genet. mars 2012;49(3):212-20.

78. Warnock DG, Thomas CP, Vujkovac B, Campbell RC, Charrow J, Laney DA, et al. Antiproteinuric therapy and Fabry nephropathy: factors associated with preserved kidney function during agalsidase-beta therapy. J Med Genet. déc 2015;52(12):860-6.

79. Shire HGT. Agalsidase alfa. Annexe 1 -Résumé des caractéristiques du produit (EMA) Disponible sur: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2016/20161006136213/anx_136213_fr.pdf

80. Sanofi-Genzyme. Agalsdiase beta. Annexe 1 - Résumé des caractéristiques du produit (EMA) Disponible sur: http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000370/WC500020547.pdf

81. Brady RO, Tallman JF, Johnson WG, Gal AE, Leahy WR, Quirk JM, et al. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified ceramidetrihexosidase in Fabry's disease. N Engl J Med. 5 juill 1973;289(1):9-14.

82. Philippart M. Fabry disease: kidney transplantation as an enzyme replacement technic. Birth Defects Orig Artic Ser. mars 1973;9(2):81-7.

83. Dawson G, Matalon R, Li YT. Enzyme replacement in Fabry disease: treatment of cultured skin fibroblasts with a purified alpha-galactosidase from ficin. Birth Defects Orig Artic Ser. mars 1973;9(2):97-101.

84. Schiffmann R, Murray GJ, Treco D, Daniel P, Sellos-Moura M, Myers M, et al. Infusion of alpha-galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 4 janv 2000;97(1):365-70.

85. Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, Germain DP, Lee P, Waldek S, et al. Safety and efficacy of recombinant human alpha-galactosidase A replacement therapy in Fabry's disease. N Engl J Med. 05 2001;345(1):9-16.

86. Schiffmann R, Kopp JB, Austin HA, Sabnis S, Moore DF, Weibel T, et al. Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. JAMA. 6 juin 2001;285(21):2743-9.

87. Lidove O, Barbey F, Joly D. [Treatment of Fabry disease: Successes, failures, and expectations]. Nephrol Ther. avr 2016;12 Suppl 1:S105-113.

88. Eng CM, Banikazemi M, Gordon RE, Goldman M, Phelps R, Kim L, et al. A phase 1/2 clinical trial of enzyme replacement in fabry disease: pharmacokinetic, substrate clearance, and safety studies. Am J Hum Genet. mars 2001;68(3):711-22.

89. Lee K, Jin X, Zhang K, Copertino L, Andrews L, Baker-Malcolm J, et al. A biochemical and pharmacological comparison of enzyme replacement therapies for the glycolipid storage disorder Fabry disease. Glycobiology. avr 2003;13(4):305-13.

90. Nakano S, Tsukimura T, Togawa T, Ohashi T, Kobayashi M, Takayama K, et al. Rapid Immunochromatographic Detection of Serum Anti-α-Galactosidase A Antibodies in Fabry Patients after Enzyme Replacement Therapy. PloS One. 2015;10(6):e0128351.

91. Skrunes R, Tøndel C, Leh S, Larsen KK, Houge G, Davidsen ES, et al. Long-Term Dose-Dependent Agalsidase Effects on Kidney Histology in Fabry Disease. Clin J Am Soc Nephrol CJASN. 7 sept 2017;12(9):1470-9.

92. El Dib R, Gomaa H, Ortiz A, Politei J, Kapoor A, Barreto F. Enzyme replacement therapy for Anderson-Fabry disease: A complementary overview of a Cochrane publication through a linear regression and a pooled analysis of proportions from cohort studies. PloS One. 2017;12(3):e0173358.

93. Arends M, Biegstraaten M, Wanner C, Sirrs S, Mehta A, Elliott PM, et al. Agalsidase alfa versus agalsidase beta for the treatment of Fabry disease: an international cohort study. J Med Genet. mai 2018;55(5):351-8.

94. Weidemann F, Niemann M, Störk S, Breunig F, Beer M, Sommer C, et al. Long-term outcome of enzyme-replacement therapy in advanced Fabry disease: evidence for disease progression towards serious complications. J Intern Med. oct 2013;274(4):331-41.

95. Germain DP, Hughes DA, Nicholls K, Bichet DG, Giugliani R, Wilcox WR, et al. Treatment of Fabry's Disease with the Pharmacologic Chaperone Migalastat. N Engl J Med. 11 août 2016;375(6):545-55.

96. Guce AI, Clark NE, Rogich JJ, Garman SC. The molecular basis of pharmacological chaperoning in human α-galactosidase. Chem Biol. 23 déc 2011;18(12):1521-6.

97. Stolz A, Wolf DH. Endoplasmic reticulum associated protein degradation: A chaperone assisted journey to hell. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res. 1 juin 2010;1803(6):694-705.

98. Benjamin ER, Della Valle MC, Wu X, Katz E, Pruthi F, Bond S, et al. The validation of pharmacogenetics for the identification of Fabry patients to be treated with migalastat. Genet Med Off J Am Coll Med Genet. 2017;19(4):430-8.

99. Hughes DA, Nicholls K, Shankar SP, Sunder-Plassmann G, Koeller D, Nedd K, et al. Oral pharmacological chaperone migalastat compared with enzyme replacement therapy in Fabry disease: 18-month results from the randomised phase III ATTRACT study. J Med Genet. avr 2017;54(4):288-96.

100. Khanna R, Soska R, Lun Y, Feng J, Frascella M, Young B, et al. The Pharmacological Chaperone 1-Deoxygalactonojirimycin Reduces Tissue Globotriaosylceramide Levels in a Mouse Model of Fabry Disease. Mol Ther. janv 2010;18(1):23-33.

101. Warnock DG, Bichet DG, Holida M, Goker-Alpan O, Nicholls K, Thomas M, et al. Oral Migalastat HCl Leads to Greater Systemic Exposure and Tissue Levels of Active α-Galactosidase A in Fabry Patients when Co-Administered with Infused Agalsidase. PloS One. 2015;10(8):e0134341.

102. Xu S, Lun Y, Brignol N, Hamler R, Schilling A, Frascella M, et al. Coformulation of a Novel Human α-Galactosidase A With the Pharmacological Chaperone AT1001 Leads to Improved Substrate Reduction in Fabry Mice. Mol Ther J Am Soc Gene Ther. juill 2015;23(7):1169-81.

103. Ashe KM, Budman E, Bangari DS, Siegel CS, Nietupski JB, Wang B, et al. Efficacy of Enzyme and Substrate Reduction Therapy with a Novel Antagonist of Glucosylceramide Synthase for Fabry Disease. Mol Med Camb Mass. 30 avr 2015;21:389-99.

104. Guérard N, Oder D, Nordbeck P, Zwingelstein C, Morand O, Welford RWD, et al. Lucerastat, an Iminosugar for Substrate Reduction Therapy: Tolerability, Pharmacodynamics, and Pharmacokinetics in Patients With Fabry Disease on Enzyme Replacement. Clin Pharmacol Ther. avr 2018;103(4):703-11.

105. Huang J, Khan A, Au BC, Barber DL, López-Vásquez L, Prokopishyn NL, et al. Lentivector Iterations and Pre-Clinical Scale-Up/Toxicity Testing: Targeting Mobilized CD34+ Cells for Correction of Fabry Disease. Mol Ther Methods Clin Dev. 16 juin 2017;5:241-58.

106. Choi J-O, Lee MH, Park H-Y, Jung S-C. Characterization of Fabry mice treated with recombinant adeno-associated virus 2/8-mediated gene transfer. J Biomed Sci. 16 avr 2010;17:26.

107. Ruiz de Garibay AP, Delgado D, Del Pozo-Rodríguez A, Solinís MÁ, Gascón AR. Multicomponent nanoparticles as nonviral vectors for the treatment of Fabry disease by gene therapy. Drug Des Devel Ther. 2012;6:303-10.

108. Weidemann F, Sanchez-Niño MD, Politei J, Oliveira J-P, Wanner C, Warnock DG, et al. Fibrosis: a key feature of Fabry disease with potential therapeutic implications. Orphanet J Rare Dis. 6 août 2013;8:116.

109. Rombach SM, Twickler TB, Aerts JMFG, Linthorst GE, Wijburg FA, Hollak CEM. Vasculopathy in patients with Fabry disease: current controversies and research directions. Mol Genet Metab. févr 2010;99(2):99-108.

110. Boutouyrie P, Laurent S, Laloux B, Lidove O, Grunfeld JP, Germain DP. Arterial remodelling in Fabry disease. Acta Paediatr Oslo Nor 1992 Suppl. 2002;91(439):62-6.

111. Park JL, Whitesall SE, D'Alecy LG, Shu L, Shayman JA. Vascular dysfunction in the alpha-galactosidase A-knockout mouse is an endothelial cell-, plasma membrane-based defect. Clin Exp Pharmacol Physiol. oct 2008;35(10):1156-63.

112. Shen J-S, Meng X-L, Moore DF, Quirk JM, Shayman JA, Schiffmann R, et al. Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. Mol Genet Metab. nov 2008;95(3):163-8.

113. Rombach SM, Smid BE, Linthorst GE, Dijkgraaf MGW, Hollak CEM. Natural course of Fabry disease and the effectiveness of enzyme replacement therapy: a systematic review and meta-analysis : Effectiveness of ERT in different disease stages. J Inherit Metab Dis. 4 févr 2014;

114. Shu L, Shayman JA. Glycosphingolipid Mediated Caveolin-1 Oligomerization. J Glycomics Lipidomics. 18 févr 2012;Suppl 2:1-6.

115. Boyd RE, Lee G, Rybczynski P, Benjamin ER, Khanna R, Wustman BA, et al. Pharmacological chaperones as therapeutics for lysosomal storage diseases. J Med Chem. 11 avr 2013;56(7):2705-25.

116. Liebau MC, Braun F, Höpker K, Weitbrecht C, Bartels V, Müller R-U, et al. Dysregulated autophagy contributes to podocyte damage in Fabry's disease. PloS One. 2013;8(5):e63506.

117. Chévrier M, Brakch N, Céline L, Genty D, Ramdani Y, Moll S, et al. Autophagosome maturation is impaired in Fabry disease. Autophagy. juill 2010;6(5):589-99.

118. Lieberman AP, Puertollano R, Raben N, Slaugenhaupt S, Walkley SU, Ballabio A. Autophagy in lysosomal storage disorders. Autophagy. 1 mai 2012;8(5):719-30.

119. Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. Nat Rev Immunol. oct 2013;13(10):722-37.

120. Biancini GB, Vanzin CS, Rodrigues DB, Deon M, Ribas GS, Barschak AG, et al. Globotriaosylceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. Biochim Biophys Acta. févr 2012;1822(2):226-32.

121. De Francesco PN, Mucci JM, Ceci R, Fossati CA, Rozenfeld PA. Fabry disease peripheral blood immune cells release inflammatory cytokines: role of globotriaosylceramide. Mol Genet Metab. mai 2013;109(1):93-9.

122. Chien Y, Chien C-S, Chiang H-C, Huang W-L, Chou S-J, Chang W-C, et al. Interleukin-18 deteriorates Fabry cardiomyopathy and contributes to the development of left ventricular hypertrophy in Fabry patients with *GLA* IVS4+919 G>A mutation. Oncotarget. 27 déc 2016;7(52):87161-79.

123. Anders H-J, Banas B, Schlöndorff D. Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease. J Am Soc Nephrol JASN. avr 2004;15(4):854-67.

124. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. Semin Immunol. févr 2004;16(1):3-9.

125. Maglione PJ, Simchoni N, Cunningham-Rundles C. Toll-like receptor signaling in primary immune deficiencies. Ann N Y Acad Sci. nov 2015;1356:1-21.

126. Jou I, Lee JH, Park SY, Yoon HJ, Joe E-H, Park EJ. Gangliosides trigger inflammatory responses via TLR4 in brain glia. Am J Pathol. mai 2006;168(5):1619-30.

127. Köberlin MS, Snijder B, Heinz LX, Baumann CL, Fauster A, Vladimer GI, et al. A Conserved Circular Network of Coregulated Lipids Modulates Innate Immune Responses. Cell. 2 juill 2015;162(1):170-83.

128. Ma J, Chadban SJ, Zhao CY, Chen X, Kwan T, Panchapakesan U, et al. TLR4 activation promotes podocyte injury and interstitial fibrosis in diabetic nephropathy. PloS One. 2014;9(5):e97985.

129. Qian Y, Feldman E, Pennathur S, Kretzler M, Brosius FC. From fibrosis to sclerosis: mechanisms of glomerulosclerosis in diabetic nephropathy. Diabetes. juin 2008;57(6):1439-45.

130. Sanchez-Niño MD, Sanz AB, Carrasco S, Saleem MA, Mathieson PW, Valdivielso JM, et al. Globotriaosylsphingosine actions on human glomerular podocytes: implications for Fabry nephropathy. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc. juin 2011;26(6):1797-802.

131. Pereira CS, Sa-Miranda C, De Libero G, Mori L, Macedo MF. Globotriaosylceramide inhibits iNKT-cell activation in a CD1d-dependent manner. Eur J Immunol. janv 2016;46(1):147-53.

132. Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. J Clin Invest. nov 2004;114(10):1379-88.

133. Nishioka Y, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. CD1d-Restricted Type II NKT Cells Reactive With Endogenous Hydrophobic Peptides. Front Immunol. 2018;9:548.

134. Balreira A, Macedo MF, Girão C, Rodrigues LG, Oliveira JP, Sá Miranda MC, et al. Anomalies in conventional T and invariant natural killer T-cell populations in Fabry mice but not in Fabry patients. Br J Haematol. nov 2008;143(4):601-4.

135. Macedo MF, Quinta R, Pereira CS, Sa Miranda MC. Enzyme replacement therapy partially prevents invariant Natural Killer T cell deficiency in the Fabry disease mouse model. Mol Genet Metab. mai 2012;106(1):83-91.

136. Gadola SD, Silk JD, Jeans A, Illarionov PA, Salio M, Besra GS, et al. Impaired selection of invariant natural killer T cells in diverse mouse models of glycosphingolipid lysosomal storage diseases. J Exp Med. 2 oct 2006;203(10):2293-303.

137. Kohlgruber AC, Donado CA, LaMarche NM, Brenner MB, Brennan PJ. Activation strategies for invariant natural killer T cells. Immunogenetics. 2016;68(8):649-63.

138. Coquet JM, Chakravarti S, Kyparissoudis K, McNab FW, Pitt LA, McKenzie BS, et al. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. Proc Natl Acad Sci U S A. 12 août 2008;105(32):11287-92.

139. Salio M, Speak AO, Shepherd D, Polzella P, Illarionov PA, Veerapen N, et al. Modulation of human natural killer T cell ligands on TLR-mediated antigen-presenting cell activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 18 déc 2007;104(51):20490-5.

140. Brennan PJ, Tatituri RVV, Brigl M, Kim EY, Tuli A, Sanderson JP, et al. Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals. Nat Immunol. 30 oct 2011;12(12):1202-11.

141. Nair S, Boddupalli CS, Verma R, Liu J, Yang R, Pastores GM, et al. Type II NKT-TFH cells against Gaucher lipids regulate B-cell immunity and inflammation. Blood. 19 févr 2015;125(8):1256-71.

142. Rozenfeld P, Agriello E, De Francesco N, Martinez P, Fossati C. Leukocyte perturbation associated with Fabry disease. J Inherit Metab Dis. déc 2009;32 Suppl 1:S67-77.

143. Pereira CS, Azevedo O, Maia ML, Dias AF, Sa-Miranda C, Macedo MF. Invariant natural killer T cells are phenotypically and functionally altered in Fabry disease. Mol Genet Metab. avr 2013;108(4):241-8.

144. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. Cell. 22 mai 2014;157(5):1013-22.

145. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee S-J, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. Nat Immunol. mars 2011;12(3):222-30.

146. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. Nature. 18 janv 2012;481(7381):278-86.

147. Aflaki E, Moaven N, Borger DK, Lopez G, Westbroek W, Chae JJ, et al. Lysosomal storage and impaired autophagy lead to inflammasome activation in Gaucher macrophages. Aging Cell. févr 2016;15(1):77-88.

148. Rombach SM, Smid BE, Bouwman MG, Linthorst GE, Dijkgraaf MGW, Hollak CEM. Long term enzyme replacement therapy for Fabry disease: effectiveness on kidney, heart and brain. Orphanet J Rare Dis. 2013;8:47.

149. West M, Nicholls K, Mehta A, Clarke JTR, Steiner R, Beck M, et al. Agalsidase alfa and kidney dysfunction in Fabry disease. J Am Soc Nephrol JASN. mai 2009;20(5):1132-9.

150. Siekierska A, De Baets G, Reumers J, Gallardo R, Rudyak S, Broersen K, et al. α-Galactosidase aggregation is a determinant of pharmacological chaperone efficacy on Fabry disease mutants. J Biol Chem. 17 août 2012;287(34):28386-97.

151. Linthorst GE, Hollak CEM, Donker-Koopman WE, Strijland A, Aerts JMFG. Enzyme therapy for Fabry disease: neutralizing antibodies toward agalsidase alpha and beta. Kidney Int. oct 2004;66(4):1589-95.

152. Lusher JM, Arkin S, Abildgaard CF, Schwartz RS. Recombinant factor VIII for the treatment of previously untreated patients with hemophilia A. Safety, efficacy, and development of inhibitors. Kogenate Previously Untreated Patient Study Group. N Engl J Med. 18 févr 1993;328(7):453-9.

153. Kishnani PS, Dickson PI, Muldowney L, Lee JJ, Rosenberg A, Abichandani R, et al. Immune response to enzyme replacement therapies in lysosomal storage diseases and the role of immune tolerance induction. Mol Genet Metab. févr 2016;117(2):66-83.

154. Schellekens H. The immunogenicity of therapeutic proteins and the Fabry antibody standardization initiative. Clin Ther. 2008;30 Suppl B:S50-51.

155. Lidove O, West ML, Pintos-Morell G, Reisin R, Nicholls K, Figuera LE, et al. Effects of enzyme replacement therapy in Fabry disease--a comprehensive review of the medical literature. Genet Med Off J Am Coll Med Genet. nov 2010;12(11):668-79.

156. Ohashi T, Iizuka S, Ida H, Eto Y. Reduced alpha-Gal A enzyme activity in Fabry fibroblast cells and Fabry mice tissues induced by serum from antibody positive patients with Fabry disease. Mol Genet Metab. juill 2008;94(3):313-8.

157. Vedder AC, Breunig F, Donker-Koopman WE, Mills K, Young E, Winchester B, et al. Treatment of Fabry disease with different dosing regimens of agalsidase: effects on antibody formation and GL-3. Mol Genet Metab. juill 2008;94(3):319-25.

158. Bénichou B, Goyal S, Sung C, Norfleet AM, O'Brien F. A retrospective analysis of the potential impact of IgG antibodies to agalsidase beta on efficacy during enzyme replacement therapy for Fabry disease. Mol Genet Metab. janv 2009;96(1):4-12.

159. Rombach SM, Dekker N, Bouwman MG, Linthorst GE, Zwinderman AH, Wijburg FA, et al. Plasma globotriaosylsphingosine: diagnostic value and relation to clinical manifestations of Fabry disease. Biochim Biophys Acta. sept 2010;1802(9):741-8.

160. Rombach SM, Aerts JMFG, Poorthuis BJHM, Groener JEM, Donker-Koopman W, Hendriks E, et al. Long-term effect of antibodies against infused alpha-galactosidase A in Fabry disease on plasma and urinary (lyso)Gb3 reduction and treatment outcome. PloS One. 2012;7(10):e47805.

161. Wilcox WR, Linthorst GE, Germain DP, Feldt-Rasmussen U, Waldek S, Richards SM, et al. Anti-α-galactosidase A antibody response to agalsidase beta treatment: data from the Fabry Registry. Mol Genet Metab. mars 2012;105(3):443-9.

162. Keating GM. Agalsidase alfa: a review of its use in the management of Fabry disease. BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther. 1 oct 2012;26(5):335-54.

163. Tanaka A, Takeda T, Hoshina T, Fukai K, Yamano T. Enzyme replacement therapy in a patient with Fabry disease and the development of IgE antibodies against agalsidase beta but not agalsidase alpha. J Inherit Metab Dis. déc 2010;33 Suppl 3:S249-252.

164. Banikazemi M, Bultas J, Waldek S, Wilcox WR, Whitley CB, McDonald M, et al. Agalsidase-beta therapy for advanced Fabry disease: a randomized trial. Ann Intern Med. 16 janv 2007;146(2):77-86.

165. Deegan PB. Fabry disease, enzyme replacement therapy and the significance of antibody responses. J Inherit Metab Dis. mars 2012;35(2):227-43.

166. Bekri S. Importance of glycosylation in enzyme replacement therapy. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, éditeurs. Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS. Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006

167. Smid BE, Hoogendijk SL, Wijburg FA, Hollak CEM, Linthorst GE. A revised home treatment algorithm for Fabry disease: influence of antibody formation. Mol Genet Metab. févr 2013;108(2):132-7.

168. Wilcox WR, Banikazemi M, Guffon N, Waldek S, Lee P, Linthorst GE, et al. Long-Term Safety and Efficacy of Enzyme Replacement Therapyfor Fabry Disease. Am J Hum Genet. juill 2004;75(1):65-74.

169. Lenders M, Schmitz B, Brand SM, Foell D, Brand E. Characterization of drug-neutralizing antibodies in patients with Fabry disease during infusion. J Allergy Clin Immunol. 2018 Jun;141(6):2289-2292.e7.

170. Schiffmann R, Ries M, Timmons M, Flaherty JT, Brady RO. Long-term therapy with agalsidase alfa for Fabry disease: safety and effects on renal function in a home infusion setting. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc. févr 2006;21(2):345-54.

171. Dubourg O, Isnard R, Hagège A, Jondeau G, Desnos M, Sacrez A, et al. Doppler echocardiography in familial hypertrophic cardiomyopathy: the French Cooperative Study. Echocardiogr Mt Kisco N. mai 1995;12(3):235-41.

172. Authors/Task Force members, Elliott PM, Anastasakis A, Borger MA, Borggrefe M, Cecchi F, et al. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J. 14 oct 2014;35(39):2733-79.

173. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. Ann Intern Med. 16 mars 1999;130(6):461-70.

174. Haute Autorité de Santé. Rapport d'évaluation technologique: évaluation du rapport albuminurie/ créatininurie dans le diagnostic de la maladie rénale chronique chez l'adulte. 2011.

175. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found. févr 2002;39(2 Suppl 1):S1-266.

176. Mauhin W, Lidove O, Masat E, Mingozzi F, Mariampillai K, Ziza J-M, et al. Innate and Adaptive Immune Response in Fabry Disease. JIMD Rep. 2015;22:1-10.

177. Bali DS, Goldstein JL, Banugaria S, Dai J, Mackey J, Rehder C, et al. Predicting cross-reactive immunological material (CRIM) status in Pompe disease using GAA mutations: lessons learned from 10 years of clinical laboratory testing experience. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 15 févr 2012;160C(1):40-9.

178. Nowak A, Mechtler TP, Hornemann T, Gawinecka J, Theswet E, Hilz MJ, et al. Genotype, phenotype and disease severity reflected by serum LysoGb3 levels in patients with Fabry disease. Mol Genet Metab. 2018 Feb;123(2):148-153.

179. Lenders M, Oder D, Nowak A, Canaan-Kühl S, Arash-Kaps L, Drechsler C, et al. Impact of immunosuppressive therapy on therapy-neutralizing antibodies in transplanted patients with Fabry disease. J Intern Med. sept 2017;282(3):241-53.

180. Tajima Y, Kawashima I, Tsukimura T, Sugawara K, Kuroda M, Suzuki T, et al. Use of a modified alpha-N-acetylgalactosaminidase in the development of enzyme replacement therapy for Fabry disease. Am J Hum Genet. nov 2009;85(5):569-80.

181. Mirzaian M, Wisse P, Ferraz MJ, Marques ARA, Gabriel TL, van Roomen CPAA, et al. Accurate quantification of sphingosine-1-phosphate in normal and Fabry disease plasma, cells and tissues by LC-MS/MS with (13)C-encoded natural S1P as internal standard. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 1 août 2016;459:36-44.

182. Mendelson K, Evans T, Hla T. Sphingosine 1-phosphate signalling. Dev Camb Engl. 1 janv 2014;141(1):5-9.

183. Mahajan-Thakur S, Böhm A, Jedlitschky G, Schrör K, Rauch BH. Sphingosine-1-Phosphate and Its Receptors: A Mutual Link between Blood Coagulation and Inflammation. Mediators Inflamm. 2015;2015:831059.

184. Lewis CS, Voelkel-Johnson C, Smith CD. Targeting Sphingosine Kinases for the Treatment of Cancer. Adv Cancer Res. 2018;140:295-325.

185. Cyster JG, Schwab SR. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. Annu Rev Immunol. 2012;30:69-94.

186. Baer A, Colon-Moran W, Bhattarai N. Characterization of the effects of immunomodulatory drug fingolimod (FTY720) on human T cell receptor signaling pathways. Sci Rep. 19 juill 2018;8(1):10910.

187. Snider AJ, Orr Gandy KA, Obeid LM. Sphingosine kinase: Role in regulation of bioactive sphingolipid mediators in inflammation. Biochimie. juin 2010;92(6):707-15.

188. Ferraz MJ, Marques ARA, Appelman MD, Verhoek M, Strijland A, Mirzaian M, et al. Lysosomal glycosphingolipid catabolism by acid ceramidase: formation of glycosphingoid bases during deficiency of glycosidases. FEBS Lett. mars 2016;590(6):716-25.

189. Larbi A, Fulop T. From « truly naïve » to « exhausted senescent » T cells: when markers predict functionality. Cytom Part J Int Soc Anal Cytol. janv 2014;85(1):25-35.

190. Verma K, Ogonek J, Varanasi PR, Luther S, Bünting I, Thomay K, et al. Human CD8+ CD57- TEMRA cells: Too young to be called « old ». PloS One. 2017;12(5):e0177405.

191. Lee SA, Sinclair E, Hatano H, Hsue PY, Epling L, Hecht FM, et al. Impact of HIV on CD8+ T cell CD57 expression is distinct from that of CMV and aging. PloS One. 2014;9(2):e89444.

192. Cobos Jiménez V, Wit FWNM, Joerink M, Maurer I, Harskamp AM, Schouten J, et al. T-Cell Activation Independently Associates With Immune Senescence in HIV-Infected Recipients of Long-term Antiretroviral Treatment. J Infect Dis. 15 2016;214(2):216-25.

193. Lee SA, Sinclair E, Jain V, Huang Y, Epling L, Van Natta M, et al. Low proportions of CD28- CD8+ T cells expressing CD57 can be reversed by early ART initiation and predict mortality in treated HIV infection. J Infect Dis. 1 août 2014;210(3):374-82.

194. Fantini J, Hammache D, Piéroni G, Yahi N. Role of glycosphingolipid microdomains in CD4-dependent HIV-1 fusion. Glycoconj J. avr 2000;17(3-4):199-204.

195. Fantini J, Tamalet C, Hammache D, Tourrès C, Duclos N, Yahi N. HIV-1-induced perturbations of glycosphingolipid metabolism are cell-specific and can be detected at early stages of HIV-1 infection. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology Off Publ Int Retrovirology Assoc. 1 nov 1998;19(3):221-9.

196. Pandey MK, Burrow TA, Rani R, Martin LJ, Witte D, Setchell KD, et al. Complement drives glucosylceramide accumulation and tissue inflammation in Gaucher disease. Nature. 02 2017;543(7643):108-12.

197. DeGraba T, Azhar S, Dignat-George F, Brown E, Boutière B, Altarescu G, et al. Profile of endothelial and leukocyte activation in Fabry patients. Ann Neurol. févr 2000;47(2):229-33.

198. Uchiyama R, Yonehara S, Taniguchi S, Ishido S, Ishii KJ, Tsutsui H. Inflammasome and Fas-Mediated IL-1β Contributes to Th17/Th1 Cell Induction in Pathogenic Bacterial Infection In Vivo. J Immunol Baltim Md 1950. 01 2017;199(3):1122-30.

199. Chang A, Ko K, Clark MR. The emerging role of the inflammasome in kidney diseases. Curr Opin Nephrol Hypertens. mai 2014;23(3):204-10.

200. Martin-Rodriguez S, Caballo C, Gutierrez G, Vera M, Cruzado JM, Cases A, et al. TLR4 and NALP3 inflammasome in the development of endothelial dysfunction in uraemia. Eur J Clin Invest. févr 2015;45(2):160-9.

Table des illustrations

Figure 1. Angiokératomes péri-ombilicaux chez un patient atteint de maladie de Fabry, phénotype classique 13
Figure 2. Principaux signes cliniques observés au cours de la maladie de Fabry 18
Figure 3. Algorithme de diagnostic chez l'homme 21
Figure 4. Algorithme consensuel de diagnostic chez la femme 22

Table des tableaux

Tableau 1. Maladies de surcharge lysosomales (liste non exhaustive) 8

La maladie de Fabry est une maladie lysosomale liée à l'X, due à des mutations du gène *GLA* codant pour l'alpha-galactosidase A, caractérisée par une accumulation en glycosphingolipides, principalement en globotriaosylcéramide (Gb3). L'enzymothérapie substitutive (ES) par agalsidase alfa ou beta, a une efficacité inégale selon les patients. Ce travail a exploré les mécanismes inflammatoires impliqués dans la réponse à l'ES et dans la physiopathologie propre de la maladie.
Après élaboration d'un test ELISA permettant le dépistage concomitant des anticorps (Ac) anti-agalsidase alfa et beta, nous avons mis en évidence un risque accru de développer ces Ac chez les patients de phénotype classique, sans retentissement clinique évident mais associé à des taux de lysoGb3 plasmatiques plus élevés suggérant un pronostic péjoratif. Ces Ac, notamment les IgG4, avaient un pouvoir inhibiteur enzymatique dose-dépendant. Alors que la réactivité croisée entre les deux ES était totale et que le risque de développer des Ac n'était pas lié à l'enzymothérapie reçue, l'analyse des leucocytes circulants a mis en évidence une élévation du pourcentage de cellules NK chez les patients traités par agalsidase beta suggérant une immunogénicité accrue de cette dernière. Indépendamment du traitement, nous avons identifié des perturbations phénotypiques avec des lymphocytes T CD4 et CD8 CCR7- ayant un profil atypique immature CD27+ et CD57-. Aussi, l'expression du CCR7 était inversement corrélée aux concentrations de lysoGb3 et de sphingosine-1-phosphate (S1P) dans les lymphocytes T CD4+. Enfin, on observait une augmentation significative de la S1P chez les patients de phénotype non-classique.
Notre travail met ainsi à disposition des outils et des connaissances indispensables au développement futur de thérapies géniques et ouvre également de nombreuses pistes de recherche sur la maturation lymphocytaire T et les voies de la S1P.

Mots clés : maladie de Fabry, Gb3, lysoGb3, sphingosine-1-phosphate, anticorps anti-agalsidase, inflammation.

Inflammatory mechanisms involved in the pathophysiology of Fabry disease and the clinical response to enzyme replacement therapy

Abstract :
Fabry disease (FD) is an X-linked disorder due to mutations in the *GLA* gene that lead to defects in alpha-galactosidase A enzyme activity and subsequent accumulation of glycosphingolipids, mainly of globotriaosylceramide (Gb3). A pro-inflammatory condition has been described in FD, but very few studies have investigated the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Enzyme replacement therapy (ERT) has been the historical treatment of FD and has shown inconstant benefits. In the present work, we investigated the inflammatory mechanisms involved in the response to ERT and in the pathophysiology of the disease.
We first developed an ELISA that allows the detection of anti-agalsidase antibodies (Abs) developed against both available ERT. We showed that the prevalence of Abs depends on the clinical phenotype of the patients and not on the treatment received. The cross-reactivity towards both ERT was complete. Abs, notably the IgG4, had a dose-dependent inhibitory effect on ERT. Abs were not associated with clinical events, but higher lysoGb3 levels suggesting a poorer associated prognosis. In PBMCs, we observed higher percentages of NK cells in Fabry patients under agalsidase beta, suggesting its higher immunogenicity.
In Fabry patients, whatever their treatment, we observed disturbances in T cell maturation with higher percentages of CD27+ and lower percentages of CD57+ cells among the CCR7- populations. Also, the expression of CCR7 was inversely correlated with the concentrations of lysoGb3 and sphingosine-1-phosphate (S1P) in CD4 T cells. We showed that S1P was significantly higher in non-classic patients and that S1P/lysoGb3 ratio offered a higher sensitivity than lysoGb3 alone to sort non-classic from classic patients.
Hence we developed essential tools in the perspective of the future gene therapies. This work also suggests new topics of research such as the role of S1P signaling or the specific T-cell maturation in FD.

Keywords: Fabry disease, Gb3, lysoGb3, sphingosine-1-phosphate, anti-agalsidase antibodies, inflammation