

Analyse intégrative des données phénomiques, protéomiques et métabolomiques des maladies lysosomales

Franklin Ducatez

▶ **To cite this version:**

Franklin Ducatez. Analyse intégrative des données phénomiques, protéomiques et métabolomiques des maladies lysosomales. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2023. Français. ⟨NNT : 2023NORMR070⟩. ⟨tel-04449497⟩

HAL Id: tel-04449497

https://theses.hal.science/tel-04449497v1

Submitted on 9 Feb 2024

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.



HAL Authorization

Normandie Université

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Analyse intégrative des données phénomiques, protéomiques et métabolomiques des maladies lysosomales

Présentée et soutenue par
FRANKLIN DUCATEZ

Thèse soutenue le 01/12/2023 devant le jury composé de		
MME LAURENCE FOIX-L'HELIAS	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., SORBONNE UNIVERSITE	Rapporteur du jury
M. FRANCOIS MAILLOT	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE DE TOURS	Rapporteur du jury
MME SOUMEYA BEKRI	PROFESSEURS DES UNIV - PRATICIEN HOSPITA, Université de Rouen Normandie	Membre du jury
MME BENEDICTE HERON	,	Membre du jury
M. STÉPHANE MARRET	PROFESSEURS DES UNIV - PRATICIEN HOSPITA, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
M. ABDELLAH TEBANI	MAITRE DE CONF UNIV - PRATICIEN HOSPITAL, Université de Rouen Normandie	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par STÉPHANE MARRET (CANCER AND BRAIN GENOMICS) et ABDELLAH TEBANI (CANCER AND BRAIN GENOMICS)

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Brain Cancer Normandy genomics

"***Oops!*** is the sound we make when we improve our beliefs and strategies; so, to look back at a time and not see anything you did wrong means that you haven't learned anything or changed your mind since then."

Rationality: From AI to Zombies
— **Eliezer Yudkowsky**

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de cette thèse. Le parcours de recherche a été une aventure exigeante, mais il a été rendu possible grâce au soutien, à l'encouragement et à la collaboration de nombreuses personnes exceptionnelles.

En premier lieu, je souhaite remercier mon directeur de thèse, le Professeur Stéphane Marret qui est également mon chef de service en réanimation pédiatrique et néonatale, néonatologie et neuropédiatrie. L'importance primordiale qu'il apporte à évaluer le patient dans sa globalité m'a fortement influencé. Grâce à son accompagnement clinique bienveillant, j'ai pu m'épanouir dans ce que j'aimais : la prise en charge des nouveau-nés et de la prématurité. Son soutien et ses conseils ont été précieux pour la réalisation de cette thèse, et je tiens à l'en remercier sincèrement.

Mon codirecteur, le docteur Abdellah Tebani mérite une mention spéciale. Il a en effet joué un rôle fondamental dans mon parcours de recherche. Sa contribution va bien au-delà de l'encadrement académique traditionnel. Il m'a fortement guidé dans le processus de recherche et m'a également initié à des domaines essentiels tels que la bio-informatique, le langage R, l'intelligence artificielle ou la biologie des systèmes. Ces compétences sont devenues des piliers de mon travail et je ne saurais assez le remercier pour cette précieuse éducation. Mais son impact a été bien plus profond. Il m'a appris à réfléchir différemment à travers une manière de penser plus juste, fortement influencée par le computational thinking. Cette approche analytique et logique, associée à une vision holistique des problèmes, restera un atout précieux pour le reste de ma carrière académique et au-delà. Ses enseignements ne se limitent pas à l'université, mais ils façonnent ma façon d'aborder les défis de ma vie professionnelle et personnelle. Je suis heureux d'avoir trouvé une personne avec qui partager cette carrière universitaire et je ne me vois pas continuer sans l'avoir à mes côtés. Son intelligence vibrante, sa gentillesse douce et sa dévotion à l'égard de ses étudiants ont créé un environnement d'apprentissage exceptionnel. Je suis honoré d'avoir eu l'opportunité de travailler sous sa direction, et je lui suis profondément reconnaissant pour tout ce qu'il a fait pour moi.

Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance envers la Professeure Soumeya Bekri, cheffe du service de Biochimie Métabolique où s'est déroulé tout ce travail de thèse. Depuis le moment où un peu stressé je lui ai fait part de mon souhait de me spécialiser dans les maladies héréditaires du métabolisme à maintenant, sa priorité a réellement été de m'aider par tous ses moyens dans mon parcours universitaire. Je crains de lui avoir peut-être fait pousser un ou deux cheveux blancs ou provoqué quelques fausses routes. Sa bienveillance dépasse largement les standards de la bienveillance académique que j'ai pu rencontrer jusqu'à présent. Son intelligence précise, son calme et sa capacité d'écoute,

d'analyse et de réflexion sont véritablement extraordinaires. J'ai conscience de l'énorme chance que j'ai eue de pouvoir compter sur son soutien. Et face à certains jaloux, je ne peux m'empêcher de citer un empereur chinois du 5e siècle : « On ne rencontre pas une femme pareille à chaque dynastie ! » (Mulan et al, 1998).

Je remercie vivement, madame le Professeur Laurence Foix-L'Hélias et monsieur le Professeur François Maillot d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Je les leur exprime ici ma profonde gratitude pour leur implication dans l'évaluation de ce manuscrit malgré leur charge de travail et les délais contraints.

Mes remerciements à madame le Docteur Bénédicte Héron d'avoir accepté de juger ce travail et de participer à ce jury.

Mes remerciements vont aussi au Dr Ivana Dabaj, co-thésard un an avant moi et neurologue pédiatre. Merci pour toutes les discussions passionnantes, les casse-têtes diagnostiques épatants et l'aide qu'elle a pu m'apporter ! Je suis heureux d'avoir pu compter sur son soutien dans les moments les plus durs de cette thèse. Sa gentillesse, son parcours et sa résilience forcent le respect et m'inspirent. Merci !

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire de Biochimie Métabolique. Tout particulièrement Carine Pilon, technicienne de laboratoire sur la fiche de poste, mais tellement plus en réalité. Tu m'as appris beaucoup de choses dont je n'avais même pas notion avant d'arriver pour la première fois dans votre laboratoire en tant qu'étudiant en master 2 ; des rudiments de base pour éviter de se faire mal dans un laboratoire (mais j'ai quand même réussi à me bruler) aux notions poussées de développement de méthode analytique en spectrométrie de masse (et aux joies du COFRAC). Grâce à toi je me suis très vite senti complètement intégré dans votre équipe et ça a toujours été un plaisir de travailler ensemble, même dans les périodes plus difficiles. Merci !

Mes remerciements vont aussi à Thomas Plichet, souffre-douleur, serviteur fidèle et pessimiste sans qui le développement du dosage des lysoshingolipides sur l'Orbitrap Exploris 120 n'aurait pas été possible. Je ne compte plus le nombre de fois où j'ai annoncé « cette fois, je le sens bien ! » suivi de ta réponse « hmm, j'attends de voir… » dans les différentes étapes de ce projet. Tu avais très souvent raison et j'ai beaucoup appris à tes côtés. Notre découverte ensemble de la spectrométrie de masse de type Orbitrap aura été une aventure épique digne d'être racontée à nos futurs petits enfants respectifs.

Je n'oublie pas Tony Perreira, ingénieur en spectrométrie de masse de la plateforme qui est d'une grande disponibilité et gentillesse. Sans toi, on en serait encore à taper sur le spectromètre de masse avec des cailloux. Tes conseils nous ont permis d'avancer un nombre incalculable de fois.

Mes remerciements vont également à tous les membres du laboratoire : Lorena, Céline, Déborah, Kenza, Nancy, Edwige et Bénédicte pour leur aide toujours présente et dans la bonne humeur.

Je tiens à adresser des remerciements chaleureux à tous les membres dévoués du service de néonatologie, qui ont dû faire face à mes absences pendant que je poursuivais mes recherches en laboratoire. Leur gentillesse et leur sollicitude ont été des sources constantes de réconfort pour moi.

Particulièrement, je tiens à saluer mon collègue, le Dr Thibault Plouchart qui a fait preuve d'une générosité et d'un engagement exceptionnels en prenant sur lui une part importante des responsabilités, me permettant ainsi de me consacrer pleinement à mes travaux de recherche en toute sérénité. Sa collaboration active a été d'une aide inestimable, et je lui en suis profondément reconnaissant.

Je souhaite également exprimer ma gratitude envers Aurélie Labarre, Gaëlle de la Villéon, Marie Benard, Caroline Lardennois, Stéphanie Torre, Alexandra Chadie, Stéphane Rondeau, Lucille Tzaroukian, Didier Pinquier et Sophie Galène-Gromez ; également Claire, Ines et Bertille nos docteurs juniors qui ont dû compenser eux aussi face à cet effectif réduit. Une pensée toute particulière revient à Gaëlle Pinto Cardoso qui a la gentillesse de s'occuper de notre planning de service.

Je tiens à reconnaître que ces personnes ne sont pas directement impliquées dans la recherche biomédicale, et qu'elles n'ont pas eu l'occasion de connaître les contraintes et le volume de travail que cela implique. Malgré cela, elles ont fait preuve d'un soutien inconditionnel, d'une compréhension et d'une patience exemplaires. Leur dévouement dans des circonstances pas toujours faciles a été remarquable, et je suis profondément reconnaissant envers chacun d'entre eux. Merci pour tous vos « ça va ? » parfois un peu inquiet. Cela m'a fait du bien à chaque fois.

Je veux dire un immense merci à deux personnes très spéciales dans ma vie, ma chérie Corina et ma petite Erin, qui n'ont pas eu la chance de me voir autant qu'elles l'auraient souhaité ces derniers temps à cause de ma thèse.

Corina, tu es ma meilleure amie, ma confidente et mon soutien infaillible. Merci d'avoir compris à quel point ce projet était important pour moi. Ta patience, ton amour inconditionnel et ta force m'ont porté à travers les moments difficiles. Je ne peux pas imaginer traverser cette aventure avec quelqu'un d'autre. Tu es la lumière de ma vie, et je t'aime plus que tout.

Erin, ma petite merveille, tu as vu moins de moi ces derniers temps, mais sache que je pense à toi en permanence. Ton rire, ta curiosité et ta présence me manquent énormément. Je suis impatient de rattraper tout ce temps perdu et de partager des moments précieux ensemble.

Un message tout spécial à ma formidable famille à Lyon, toujours curieuse de savoir quand je vais enfin finir mes études. Je n'arrête pas de leur répondre bientôt ! mais je suspecte qu'ils commencent à ne plus me croire. Ne vous inquiétez pas, je ne vais pas rester étudiant éternellement (quoique…). A ma maman qui m'a appris à écouter et à voir ce qui est important dans la vie. A mon père qui m'a appris à réfléchir et à me dépasser pour ce que j'aimais. A mes frères Raphaël, Théophile et Aymeric qui me manquent. Heureusement, qu'on fait de temps en temps des BGA grâce à Jitsii et des mini-tournois sur Lichess où on rigole toujours autant !

Pour finir, je tiens à remercier toutes les autres personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de cette thèse. Votre soutien a été précieux, que ce soit sur le plan moral, intellectuel ou logistique.

Exploration intégrative multi-omique et phénomique dans les maladies lysosomales

Résumé : Les maladies héréditaires du métabolisme (MHM) sont des affections génétiques résultant d'anomalies au sein de voies biochimiques spécifiques. Elles sont dues à un déficit d'une enzyme, de son cofacteur ou d'un transporteur. La médecine des systèmes (MS) est un moteur moderne pour la recherche biomédicale intégrant des données multimodales pour mieux comprendre les réseaux biologiques et améliorer la stratification des patients. Grâce à des stratégies basées sur la valorisation des données biomédicales et l'expertise clinique, la MS promet d'améliorer la prévention, diagnostic et le traitement des MHM. Dans cette thèse, nous avons adopté des approches multiomique et phénomique combinées à des stratégies d'apprentissage automatique et d'analyse des réseaux pour caractériser deux maladies lysosomales, maladie de Fabry (MF) et maladie de Gaucher (MD). Le premier projet a porté sur la MF et a permis d'identifier des profils omiques plasmatiques (métabolites et protéines) discriminant des patients Fabry. De plus, nous avons observé un remodelage métabolique de plusieurs processus biologiques, tels que les voies médiées par les cytokines, la matrice extracellulaire et le protéome vacuolaire/lysosomal. Nos découvertes mettent en évidence l'implication des cytokines pro-inflammatoires dans la pathogenèse de la MF, ainsi que la réorganisation de la matrice extracellulaire. Le deuxième projet a porté sur la MG de type 1. Les résultats ont révélé des empreintes biologiques plasmatiques. L'étude a révélé une perturbation significative du métabolisme des lipides, de l'inflammation et de la fonction mitochondriale, potentiellement attribuable au stress du réticulum endoplasmique, à un trafic lipidique altéré et à l'inhibition de l'autophagie. Dans le cadre de la thèse, nous avons évalué les performances analytiques d'un nouveau dispositif volumétrique de collecte de sang par micro-échantillonnage comparativement au sang séché sur buvard pour le dosage de l'activité des enzymes lysosomales. Par ailleurs, une méthode à haut débit a été développée pour évaluer les lysosphingolipides (biomarqueurs pour les sphingolipidoses). En résumé, une approche intégrative multiomique et phénomique a été utilisée pour étudier deux sphingolipidoses, révélant des empreintes plasmatiques biologiques spécifiques.

Mots clés : Maladies héréditaires du métabolisme, maladies lysosomales, sphingolipidoses, omiques, métabolomique, protéomique, spectrométrie de masse, chromatographie liquide, médecine des systèmes, intelligence artificielle

Exploration intégrative multi-omique et phénomique dans les maladies lysosomales

Abstract: Inherited metabolic diseases (IMDs) are genetic disorders arising from abnormalities within specific biochemical pathways. These disorders result from the deficiency of an enzyme, its cofactor, or a transporter. Systems medicine (SM) is advancing biomedical research and healthcare by integrating multimodal data to better understand biological networks and improve patient stratification. Through data-driven strategies, SM is promising to enhance disease diagnosis, treatment, and prevention of IMDs. In this thesis, we employed a deep multiomics and phenomics approach combined with machine learning and network-based strategies to characterize tow lysosomal diseases, a sub-group of IMDs. The first project studied Fabry disease (FD) and enabled the identification of plasma omics-based profiles (metabolites and proteins) that unambiguously separated FD patients from controls. Furthermore, we observed a tissue-wide functional remodeling of several processes, such as cytokine-mediated pathways, extracellular matrix, and vacuolar/lysosomal proteome. Our findings highlight the pro-inflammatory cytokines' involvement in FD pathogenesis along with extracellular matrix remodeling. The second project studied type 1 Gaucher disease (GD). The results showed promising plasma biological imprints in type 1 GD. The study revealed a significant disruption in lipid metabolism, inflammation, and mitochondrial function, potentially, attributed to endoplasmic reticulum stress, impaired lipid trafficking, and inhibition of autophagy. As part of this thesis, we evaluated the analytical performance of a new volumetric micro-sampling blood collection device compared with dried blood spot for the assessment of lysosomal enzyme activity. In addition, a high-throughput method was developed to assess lysosphingolipids (biomarkers for sphingolipidosis). In summary, an integrative multiomics and phenomics approach was used to investigate two sphingolipidoses, revealing distinct biological imprints.

Keywords**:** Inborn errors of metabolism, lysosomal diseases, sphingolipidoses, omics, metabolomics, proteomics, mass spectrometry, liquid chromatography, systems medicine, artificial intelligence

Table des Matières

Remerciements i
Table des Matières vi
Publications & Communications ix
Liste des figures x
Liste des tableaux x
Liste des principales abréviations xi

PARTIE I : INTRODUCTION GENERALE ..... - 1 -

Préambule ..... - 2 -

CHAPITRE I : LES MALADIES HEREDITAIRES DU METABOLISME ..... - 4 -

1. Le métabolisme ..... - 4 -
2. Définition et classification ..... - 6 -
3. Stratégies thérapeutiques ..... - 8 -
   3.1. Stratégie de réduction des substrats d'amont ..... - 8 -
      3.1.1. Prise en charge diététique ..... - 8 -
      3.1.2. Epuration artificielle ..... - 9 -
   3.2. Stratégie de restitution d'une activité enzymatique ..... - 9 -
   3.3. Stratégie de compensation des métabolites d'aval ..... - 10 -

CHAPITRE II : LES MALADIES LYSOSOMALES ..... - 11 -

1. Le système lysosomal ..... - 12 -
2. Les fonctions du lysosome ..... - 14 -
   2.1. L'endocytose ..... - 14 -
   2.2. La phagocytose ..... - 15 -
   2.3. Présentation des antigènes ..... - 15 -
   2.4. L'autophagie ..... - 15 -
   2.5. Rôle central de mTORC1 ..... - 17 -
3. Maladies lysosomales ..... - 19 -
   3.1. Classification ..... - 20 -
   3.2. Aspects cliniques ..... - 22 -
   3.3. Physiopathologie ..... - 23 -
   3.4. Diagnostic biologique ..... - 24 -
   3.5. Prise en charge thérapeutiques ..... - 25 -
      3.5.1. Thérapie de remplacement enzymatique ..... - 25 -
      3.5.2. Thérapie de réduction de substrat ..... - 26 -
      3.5.3. Thérapie de molécules chaperonnes ..... - 26 -
      3.5.4. Thérapie génique ..... - 26 -
      3.5.5. Thérapies adjuvantes ..... - 26 -

CHAPITRE III : LES SPHINGOLIPIDOSES ..... - 27 -

1. Les lipides ..... - 27 -
   1.1. Classification ..... - 27 -
   1.2. Métabolisme lipidique ..... - 29 -
   1.3. Lipides bioactifs ..... - 33 -
2. Les sphingolipides ..... - 34 -
   2.1. Structure de base ..... - 34 -
   2.2. Classifications ..... - 34 -
      2.2.1. Céramides ..... - 35 -
      2.2.2. Sphingomyélines ..... - 35 -
      2.2.3. Glycosphingolipides ..... - 36 -
         1.1.1.1. Glycosphingolipides Neutres ..... - 36 -
         1.1.1.2. Glycosphingolipides Acides ..... - 37 -
   2.3. Métabolisme ..... - 37 -
      2.3.1. Céramide ..... - 37 -
      2.3.2. Glycosphingolipides ..... - 39 -
   2.4. Fonctions ..... - 40 -
      2.4.1. Structures membranaires ..... - 40 -

2.4.2. Fonctions immunitaires et inflammatoires - 41 -
2.4.3. Prolifération cellulaire et cancérogenèse - 43 -
2.4.4. Développement du système nerveux central - 44 -
2.4.5. Autres - 45 -
2.5. Implications dans les pathologies - 46 -
3. Les Sphingolipidoses - 46 -
3.1. Epidémiologie - 46 -
3.2. Présentations cliniques - 47 -
3.3. Bases biochimiques - 47 -
3.4. Bases génétiques - 49 -
4. Maladie de Fabry - 51 -
4.1. Définition - 51 -
4.2. Epidémiologie - 52 -
4.3. Présentations cliniques - 52 -
4.3.1. Forme classique - 52 -
4.3.2. Forme non classique - 53 -
4.4. Bases biochimiques - 53 -
4.5. Bases génétiques - 55 -
4.6. Stratégies thérapeutiques - 57 -
4.6.1. Thérapie de remplacement enzymatique - 58 -
4.6.2. Molécules chaperonnes - 59 -
4.6.3. Traitements alternatifs ou expérimentaux - 59 -
4.6.4. Suivi et surveillance de la maladie de Fabry - 59 -
5. Maladie de Gaucher - 60 -
5.1. Définition - 60 -
5.2. Epidémiologie - 60 -
5.3. Présentations cliniques - 61 -
5.3.1. Gaucher Type 1 - 61 -
5.3.2. Type 2 / Type 3 - 63 -
5.3.3. Déficit en saposine C ou en prosaposine - 64 -
5.4. Bases biochimiques - 65 -
5.5. Bases génétiques - 68 -
5.6. Stratégies thérapeutiques - 69 -
5.6.1. Thérapie ciblée - Thérapie de remplacement enzymatique - 70 -
5.6.2. Thérapie ciblée - Thérapie de réduction du substrat - 72 -

CHAPITRE IV : LA BIOLOGIE DES SYSTEMES - 74 -

1. Définitions - 74 -
2. Pourquoi ? - 76 -
2.1. Paradoxe de la biologie expérimentale - 76 -
2.2. Complexité - 76 -
2.3. Emergence - 78 -
3. Comment ? - 79 -
3.1. Historique - 79 -
3.2. Technologies analytiques - 81 -
3.2.1. Supports de l'information biologique - 81 -
3.2.2. Technologies digitales - 82 -
3.3. Analyse des données - 83 -
3.4. Analyse des réseaux et théorie des graphes - 84 -
4. Propriétés des réseaux biologiques - 86 -
5. Médecine des systèmes et médecine de précision - 87 -

CHAPITRE V : OBJECTIFS DE LA THESE - 88 -

PARTIE II : TRAVAIL EXPERIMENTAL - 89 -

CHAPITRE I : MALADIE DE FABRY (ARTICLES I ET II) - 90 -

CHAPITRE II : MALADIE DE GAUCHER (ARTICLE III) - 123 -

1. Introduction - 127 -
2. Methods - 128 -
2.1. Patients and Blood Samples - 128 -
2.2. Metabolomics profiling - 128 -

2.3. Proteomics ..... - 128 -
2.4. Data analysis ..... - 128 -
3. Results ..... - 129 -
3.1. Cohort characteristics ..... - 129 -
3.2. Exploratory unsupervised analysis ..... - 129 -
3.3. Distinct biological imprint in Gaucher patients ..... - 129 -
3.4. Biological imprinting displays subgroup patterns ..... - 131 -
3.5. Omics connections to Gaucher disease clinical phenotypes ..... - 131 -
4. Discussion ..... - 132 -
4.1. The lipid profile suggests an increase in lipid remodeling and synthesis. ..... - 132 -
4.2. The immune system is more prone to chronic inflammation echoing autoimmunity patterns ..... - 133 -
4.3. Dysfunctions of the inner mitochondrial membrane ..... - 134 -
4.4. Connecting the dots: bioactive lipids overstimulate mTORC1 in GD ..... - 135 -
5. References ..... - 136 -

CHAPITRE III : DEVELOPPEMENTS ANALYTIQUES (ARTICLE IV & V) ..... - 147 -

1. Introduction ..... - 160 -
2. Materials and Methods ..... - 163 -
2.1. Reagents ..... - 163 -
2.2. Preparation of the standard solutions ..... - 163 -
2.3. Sample preparation ..... - 164 -
2.4. Liquid chromatography and mass spectrometry ..... - 164 -
2.5. Methode validation ..... - 165 -
3. Results ..... - 166 -
3.1. Method validation ..... - 166 -
3.2. Reference cut-off ..... - 168 -
3.3. Lysosphingolipids in healthy controls and patients with sphingolipidoses ..... - 169 -
4. Discussion ..... - 170 -
5. References ..... - 172 -

CONCLUSION ET PERSPECTIVES ..... - 174 -

1. Perspectives directes ..... - 175 -
1.1. Exploration comparative Gaucher *vs* Fabry ..... - 175 -
1.2. Consolidation par “bottom-up” approach ..... - 176 -
1.2.1. Suractivation de mTORC1 ..... - 176 -
1.2.2. Stress oxydatif ..... - 177 -
1.2.3. Dysfonction mitochondriale membranaire ..... - 177 -
1.2.4. Déséquilibre immunitaire ..... - 178 -
1.3. Validation des biomarqueurs ..... - 178 -
1.3.1. LysoPC a C14:0 ..... - 178 -
1.3.2. Ratio PUFA-PC / MUFA-PC ..... - 178 -
1.3.3. FGF2 ..... - 179 -
1.4. Vers un “panel biochimique” ..... - 179 -
2. Perspectives générales ..... - 180 -
2.1. Poursuite du projet MetaLys ..... - 180 -
2.2. Généralisation ..... - 180 -
2.3. De la biologie des systèmes à la biologie prédictive ..... - 181 -
3. Perspectives personnelles ..... - 182 -
3.1. Omiques et intélligence artificielle en médecine ..... - 182 -
3.1.1. Néonatologie ..... - 182 -
3.1.2. Maladies héréditaires du métabolisme ..... - 183 -
3.2. L’importance du retour au « touche à tout » ..... - 183 -

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... - 185 -

Publications & Communications

(2020 - 2023)

Publications liées à la thèse

1. Tebani A, Barbey F, Dormond O, **Ducatez F**, Marret S, Nowak A, Bekri S. Deep next-generation proteomics and network analysis reveal systemic and tissue-specific patterns in Fabry disease. Transl Res. **2023** Aug;258:47-59.
2. **Ducatez F**, Mauhin W, Boullier A, Pilon C, Pereira T, Aubert R, Benveniste O, Marret S, Lidove O, Bekri S, Tebani A. Parsing Fabry Disease Metabolic Plasticity Using Metabolomics. J Pers Med. **2021** Sep 8;11(9):898.
3. **Ducatez F**, Berger MG, Pilon C, Plichet T, Lesueur C, Berger J, Belmatoug N, Marret S, Bekri S, Tebani A. Deciphering Metabolic Shifts in Gaucher Disease: A Multi-Omics Study. *Submitted*.
4. **Ducatez F**, Pilon C, Ferey J, Marret S, Bekri S, Tebani A. Evaluation of dried-blood spots and a hematocrit-independent procedure in lysosomal diseases screening using multiplexed tandem mass spectrometry assays. Clin Chim Acta. **2023** Mar 1;542:117278.
5. **Ducatez F**, Ottaviani J, Plichet T, Pilon C, Lidove O, Wladimir Mauhin W, Fréderic Barbey F, Régine Perrichot R, Vergnaud S, Berger MG, Berger J, Belmatoug N, Nadia Belmatoug, Marret S, Bekri S, Tebani A. Dried-blood spots and plasma lysosphingolipids measurement for sphingolipidoses screening. *Submitted*.

Autres publications

1. Dabaj I, Sudrié-Arnaud B, Lecoquierre F, Raymond K, **Ducatez F**, Guerrot AM, Snanoudj S, Coutant S, Saugier-Veber P, Marret S, Nicolas G, Tebani A, Bekri S. NGLY1 Deficiency: A Rare Newly Described Condition with a Typical Presentation.
2. Gilard V, Ferey J, Marguet F, Fontanilles M, **Ducatez F**, Pilon C, Lesueur C, Pereira T, Basset C, Schmitz-Afonso I, Di Fioré F, Laquerrière A, Afonso C, Derrey S, Marret S, Bekri S, Tebani A. Integrative Metabolomics Reveals Deep Tissue and Systemic Metabolic Remodeling in Glioblastoma. Cancers (Basel). 2021 Oct 14;13(20):5157.

Communications orales

1. **Ducatez F**, Berger MG, Pilon C, Plichet T, Lesueur C, Berger J, Belmatoug N, Marret S, Bekri S, Tebani A. Etude GauchOmics : Exploration Multi-Omique Intégrative de la Maladie de Gaucher. Journée Recherche G2M. 2022.

Communications affichées

2. **Ducatez F**, Pilon C, Ferey J, Marret S, Bekri S, Tebani A. Evaluation of dried-blood spots and a hematocrit-independent procedure in lysosomal diseases screening using multiplexed tandem mass spectrometry assays. 12th ISNS European Regional Meeting, Luxembourg Going Virtual, held online, from 10 - 12 November 2021

Liste des figures

Figure I-1. Catabolisme et Anabolisme sont nécessaires afin de maintenir l'homéostasie. - 6 -
Figure II-1. Microscopie électronique en transmission de lysosomes. - 12 -
Figure II-2. La biogenèse lysosomal est régulée par TFEB. - 13 -
Figure II-3. Contacts entre lysosome avec le réticulum endoplasmique) et avec la mitochondrie. - 14 -
Figure II-4. Représentation des étapes principales de l'autophagie. - 16 -
Figure II-5. Régulations métaboliques par les lysosomes. - 18 -
Figure II-6. Cascades physiopathologiques secondaires à l'accumulation de substances intra-lysosomales dans les ML. - 24 -
Figure III-1. Représentation schématique des 8 principales classes de lipides biologiques. - 29 -
Figure III-2. Synthèse endogène des acides gras. - 31 -
Figure III-3. Le Cycle de Lands. - 32 -
Figure III-4. Représentation schématique de la structure de base d'un sphingolipide. - 34 -
Figure III-5. Synthèse et dégradation des sphingolipides dans les différentes régions cellulaires. - 39 -
Figure III-6. Modèle simplifié des radeaux lipidiques dans les membranes cellulaires. - 41 -
Figure III-7. L'homéostasie et les fonctions immunologiques des sphingolipides. - 43 -
Figure III-8. Les enzymes liées aux sphingolipides et leur relation avec les maladies humaines. - 46 -
Figure III-9. Voies métaboliques de dégradations lysosomales des sphingolipides et maladies associées. - 49 -
Figure III-10. Altérations cellulaires secondaires associées à la maladie de Fabry. - 55 -
Figure III-11. Variants clés associés au phénotype de la maladie de Fabry classique ou non classique. - 57 -
Figure III-12. Schéma simplifié de la physiopathologie de la maladie de Gaucher. - 68 -
Figure IV-1. Biologie des systèmes *vs* biologie expérimentale. - 75 -
Figure IV-2. Les propriétés de base d'un réseau. - 85 -
Figure IV-3. Les propriétés dynamiques émergentes des combinaisons de motifs de réseau. - 86 -

Liste des tableaux

Tableau II-1. Classification des maladies lysosomales. - 21 -
Tableau III-1. Classification des lipides biologiques - 28 -
Tableau III-2. Classification des sphingolipides. - 35 -
Tableau III-3. Aspects génétiques et cliniques des sphingolipidoses - 50 -
Tableau III-4. Présentations cliniques de la maladie de Gaucher. - 61 -
Tableau IV-1. Biologie des systèmes vs approche réductionniste - 75 -

Liste des principales abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AI	Artificial Intelligence
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
EIC	Extracted Ion Chromatogram
EIM	Erreurs Innées du Métabolisme
ESI	ElectroSpray Ionisation
FDR	False Discovery Rate
FD	Fabry disease
HDMS	High Definition Mass Spectrometry
HGMD	Human Gene Mutation Database
HMDB	Human Metabolome DataBase
IA	Intelligence Artificielle
LC	Liquid Chromatography
min	Minute
ML	Maladies Lysosomales
MG	Maladie de Gaucher
MS	Mass spectrometry
ms	Millisecond
MS/MS	Tandem Mass spectrometry
m/z	Rapport masse sur charge
NBS	New Born Screening
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PLSDA	Partial Least Square Discriminant Analysis
PCA	Principal Component Analysis
PC	Principal Component
PEA	Proximity Extension Assay
QC	Quality Control
RE	Réticulum Endoplasmique
RF	Random Forest
s	Second
TCSH	Transplantation de Cellules Souches Hématopoiétiques
TES	Thérapie Enzymatique Substitutive
tR	Temps de rétention
UHPLC	Ultra-High Pression Liquid Chromatography
VIP	Variable Influence on Projection

Partie I : Introduction Générale

Préambule

Les maladies héréditaires du métabolisme (MHM), également appelées erreurs innées du métabolisme, sont un groupe de troubles génétiques caractérisés par des défauts fonctionnels enzymatiques ou de transport affectant des voies métaboliques. Ces maladies sont causées par des variants génétiques pathogènes et entrainent le plus souvent l'accumulation de métabolites toxiques. La compréhension des états physiologiques et pathologiques chez les patients atteints de MHM exige une appréhension dynamique et systémique des interactions moléculaires et métaboliques. La biologie des systèmes est une approche interdisciplinaire qui explore principes avec lesquels les composants biologiques interagissent pour réguler le fonctionnement d'un organisme. L'application de la biologie des systèmes à l'étude des MHM permet d'offrir un abord fonctionnel pour mieux comprendre les perturbations métaboliques causées par ces variants génétiques. Elle contribue à dévoiler les mécanismes sous-jacents, à identifier des cibles thérapeutiques potentielles et à concevoir des thérapies plus personnalisées.

Ce travail de thèse a pour but l'utilisation des outils de la biologie des systèmes pour explorer un sous-groupe de MHM, les maladies lysosomales. Les objectifs pratiques sont déclinés comme suit :

1. Caractérisation multi-omique et phénomique de la maladie de Fabry basée sur la cohorte française FFabry et la cohorte suisse.
2. Caractérisation multi-omique et phénomique de la maladie de Gaucher basée sur l a cohorte française.
3. Evaluation des performances analytiques d'un nouveau dispositif volumétrique de collecte de sang par micro-échantillonnage comparativement au sang séché sur buvard pour le dosage de l'activité des enzymes lysosomales par spectrométrie de masse en tandem.
4. Mise en place d'une méthodologie analytique de dosage des lysosphingolipides sur sang séché sur buvard et sur plasma par spectrométrie de masse en haute résolution

Le manuscrit de cette thèse est structuré en trois parties, Introduction (**Partie I**), travail expérimental (**Partie II**) et conclusion et perspectives (**Partie III**).

L'introduction est subdivisée en cinq chapitres. Le chapitre I est une introduction générale aux MHM. Le chapitre II reprend les éléments fondamentaux et clinico-biologiques des maladies lysosomales. Le chapitre III présente la description des différentes sphingolipidoses en mettant l'accent sur les deux sphingolipidoses étudiées dans cette thèse (Maladie de Fabry et maladies Gaucher). Le chapitre IV définit la biologie des su=ystèmes et les sciences omiques. Le chapitre V présente les objectifs de ce projet de thèse et introduit la partie pratique.

La **partie II** du manuscrit présente la partie expérimentale et comporte trois chapitres. Le premier chapitre présente les résultats de l'exploration clinico-biologique et multiomique de la maladie de Fabry. Ce chapitre est basé sur deux articles publiés (**Article 1 et 2**):

1. ***Ducatez F**, Mauhin W, Boullier A, Pilon C, Pereira T, Aubert R, Benveniste O, Marret S, Lidove O, Bekri S, Tebani A. Parsing Fabry Disease Metabolic Plasticity Using Metabolomics. J Pers Med. 2021 Sep 8;11(9):898.*
2. *Tebani A, Barbey F, Dormond O, **Ducatez F**, Marret S, Nowak A, Bekri S. Deep next-generation proteomics and network analysis reveal systemic and tissue-specific patterns in Fabry disease. Transl Res. 2023 Aug;258:47-59.*

Le second chapitre présente les résultats de l'exploration clinico-biologique et multiomique de la maladie de Gaucher. Ce chapitre est basé sur un manuscrit soumis (**Article 3**) :

3. ***Ducatez F**, Berger MG, Pilon C, Plichet T, Lesueur C, Berger J, Belmatoug N, Marret S, Bekri S, Tebani A. Deciphering Metabolic Shifts in Gaucher Disease: A Multi-Omics Study. Submitted.*

Le chapitre III décrit les développements méthodologiques dans l'exploration des sphingolipidoses. Ce chapitre est basé sur un article publié et un manuscrit soumis (**Article 4 et 5**) :

4. ***Ducatez F**, Pilon C, Ferey J, Marret S, Bekri S, Tebani A. Evaluation of dried-blood spots and a hematocrit-independent procedure in lysosomal diseases screening using multiplexed tandem mass spectrometry assays. Clin Chim Acta. 2023 Mar 1;542:117278.*
5. ***Ducatez F**, Ottaviani J, Plichet T, Pilon C, Lidove O, Wladimir Mauhin W, Fréderic Barbey F, Régine Perrichot R, Vergnaud S, Berger MG, Berger J, Belmatoug N, Nadia Belmatoug, Marret S, Bekri S, Tebani A. Dried-blood spots and plasma lysosphingolipids measurement for sphingolipidoses screening. Submitted.*

La partie III résume les principaux résultats présentés dans cette thèse et les perspectives de recherches complémentaires de ce projet de thèse.

CHAPITRE I : LES MALADIES HEREDITAIRES DU METABOLISME

1. Le métabolisme

Le métabolisme est un sujet fondamental en biochimie et en physiologie qui a fasciné les scientifiques pendant plus de 150 ans. L'un des pionniers de l'étude du métabolisme, le lauréat du prix Nobel Hans Krebs, a été inspiré par son professeur d'université, le professeur Franz Knoop, qui a découvert la β-oxydation des acides gras. Krebs a décrit en détail deux processus fondamentaux du métabolisme, le cycle de l'acide citrique et le cycle de l'urée [1,2]. Le métabolisme, dérivé du mot grec **μεταβολή** (metabole) signifiant "transformation", englobe l'ensemble des réactions chimiques qui se déroulent dans la cellule et qui sont essentielles à la vie. Ces réactions chimiques peuvent être cataboliques, via la dégradation de macromolécules complexes en molécules plus simples telles que le dioxyde de carbone, l'eau et l'ammoniac, pour libérer de l'énergie. Ces réactions chimiques peuvent aussi être anaboliques et construire de nouvelles molécules complexes nécessaires au fonctionnement cellulaire telles que les acides nucléiques, les protéines, les polysaccharides et les lipides [3] (Figure I-1).

Ces réactions chimiques s'organisent de manière très précise en réseaux modulaires construisant ainsi des voies métaboliques distinctes. Cela est essentiel, car le métabolisme est profondément lié au concept de conservation de l'énergie et aux lois de la thermodynamique. Comme l'a écrit Antoine Lavoisier au 18e siècle, « Rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme. » Ainsi, pour capturer efficacement l'énergie nécessaire à la vie, il faut avant tout éviter la libération incontrôlée de cette énergie sous forme de chaleur et de lumière, comme cela se produit lors d'une combustion non régulée. Il faut aussi pouvoir minimiser la quantité d'énergie consommée lors des réactions anaboliques.

Les organismes vivants ont donc évolué de manière à libérer lentement l'énergie lors des réactions de catabolisme et à l'utiliser par l'intermédiaire dans des petites unités

biochimiques comme l'adénosine triphosphate (ATP), le guanosine triphosphate (GTP), le NAD(P)H (nicotinamide adénine nucléotide (phosphate)). La glycolyse en est un bel exemple [4]. Ces petites unités d'énergie fragiles sont ensuite rapidement consommées pour effectuer les réactions d'anabolisme. Ce qui est particulièrement impressionnant, c'est la manière dont les voies métaboliques s'organisent en plusieurs centaines de réactions chimiques simultanées au sein de la cellule. Cette coordination optimisée est rendue possible par l'action d'enzymes spécifiques et par la compartimentalisation des réactions et des enzymes à différentes échelles d'espace et de temps. Les enzymes sont des protéines qui catalysent des réactions chimiques. Chaque réaction métabolique spécifique est catalysée par une enzyme particulière. La compartimentalisation permet de séparer les réactions incompatibles et d'optimiser l'efficacité de chaque processus métabolique. Ainsi, à l'intérieur de la cellule, il existe différents organites dans le cytosol, tels que les mitochondries, le réticulum endoplasmique et le lysosome, qui abritent des réactions métaboliques spécifiques. Par exemple, les mitochondries sont le site de la phosphorylation oxydative permettant la production d'ATP [5], tandis que le réticulum endoplasmique est impliqué dans la synthèse des lipides et des protéines [6]. A l'échelle de l'organisme, cette compartimentalisation se traduit par la présence de différents organes et tissues spécialisés dans des fonctions spécifiques.

Cette extraordinaire optimisation de l'utilisation de l'énergie par le vivant impose que l'environnement biochimique immédiat au niveau cellulaire soit le plus adapté possible [7]. Ainsi, de nombreux processus d'autorégulation sont nécessaires pour établir et maintenir un certain équilibre tout en s'adaptant aux conditions extérieures changeantes. Ce processus dynamique s'appelle l'homéostasie et est impliqué à toutes les échelles de l'organisme ; du potentiel électrique des membranes plasmatiques à la capacité du sang à amener suffisant d'oxygène aux tissus. Un exemple éloquent de cette régulation se produit lors du jeûne. Lorsque l'apport alimentaire est limité, l'organisme doit puiser dans ses réserves pour maintenir la stabilité énergétique. Dans de telles situations, des signaux hormonaux, tels que le glucagon, sont libérés pour indiquer au foie de libérer du glucose dans la circulation sanguine. Ce processus permet de maintenir la glycémie à des niveaux appropriés, malgré le manque d'apport alimentaire.

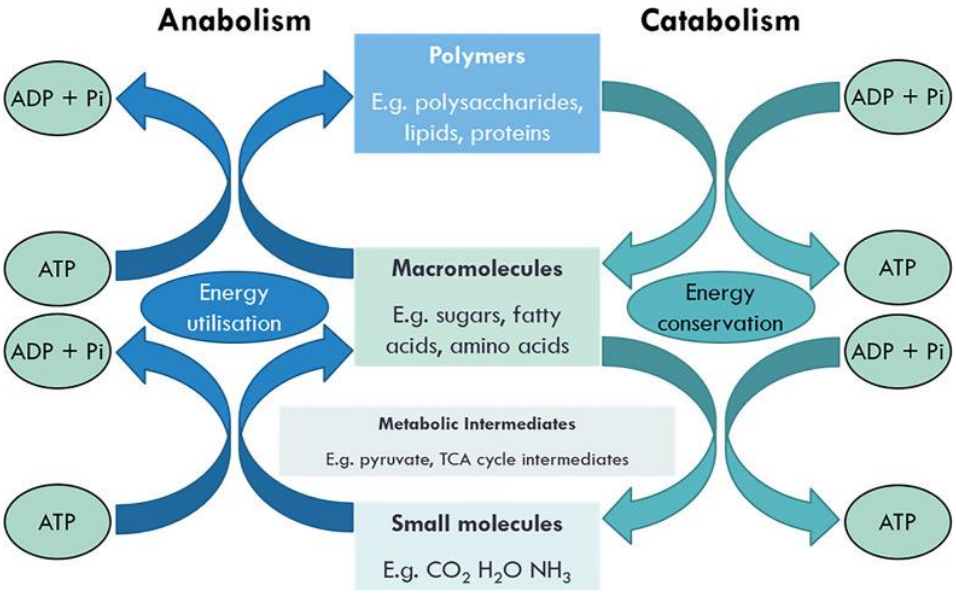


Figure I-1. Catabolisme et Anabolisme sont nécessaires afin de maintenir l'homéostasie.

[3]

Le métabolisme est donc un réseau complexe de réactions biochimiques, multidimensionnel et fortement interconnecté. Il transforme des substances endogènes et exogènes en produits essentiels au bon fonctionnement des cellules, des tissus et de l'ensemble de l'organisme. Ce réseau s'adapte dynamiquement aux changements des conditions globales afin de maintenir un équilibre précis indispensable. Ainsi, une perturbation de cet équilibre aura forcément des conséquences néfastes sur l'organisme atteint et peut être source de maladies.

2. Définition et classification

Les perturbations du métabolisme peuvent être causées par des facteurs nutritionnels, environnementaux ou génétiques. Les troubles métaboliques d'origine génétique sont appelés erreurs innées du métabolisme (EIM) ou maladies héréditaires du métabolisme (MHM). On compte plus de 1000 EIM rares, avec une incidence globale estimée à environ 1 cas sur 2500 personnes [8]. Ces maladies sont provoquées par des variants pathogènes de gènes codant pour des enzymes, des cofacteurs ou des mécanismes de transport intra- ou intercellulaire de métabolites impliqués dans des voies métaboliques spécifiques.

Les premières descriptions des EIM remontent à 1908, lorsque Sir Archibald Garrod a mentionné des affections telles que l'alcaptonurie, la cystinurie, l'albinisme et la pentosurie [9,10]. Ces maladies peuvent se manifester à tout âge, avec des symptômes pouvant apparaître dès la période anténatale ou néonatale, mais également à l'enfance ou à l'âge

adulte. Les symptômes varient considérablement d'une maladie à l'autre, ce qui rend leur diagnostic complexe. De plus, une même maladie peut se présenter de manière différente d'un individu à l'autre, parfois alors même que ces individus ont le même variant pathogène. La compréhension des EIM a fortement progressé depuis l'époque de Sir Garrod. De nouvelles EIM sont régulièrement identifiées et des progrès conséquents dans les modalités thérapeutiques ont permis d'améliorer drastiquement le devenir de nombreux patients.

Les EIM peuvent être regroupées en trois catégories sur le plan physiopathologique : celles qui provoquent des intoxications, des dysfonctionnements énergétiques ou des perturbations dans le métabolisme des molécules complexes. [11].

Les **maladies d'intoxication** comprennent les erreurs innées du métabolisme intermédiaire qui entraînent une intoxication due à l'accumulation de petites molécules en amont d'un blocage enzymatique. Parmi les exemples, citons les troubles du catabolisme des acides aminés, les aciduries organiques, les défauts du cycle de l'urée, les intolérances au sucre et les intoxications métalliques. Ces maladies présentent souvent des décompensations aiguës liées à une accumulation brutale d'un produit toxique, souvent secondaire à des facteurs déclenchants qui induisent un catabolisme. Le diagnostic repose sur l'analyse du plasma et de l'urine, et la plupart sont traitables. Le traitement repose souvent sur une thérapie nutritionnelle visant à contourner la voie métabolique altérée ainsi que sur des épurateurs des métaboliques toxiques qui s'accumulent en amont du blocage. Des supplémentations des métabolites en aval du blocage peuvent également être nécessaires.

Les **atteintes du métabolisme énergétique** résultent de déficiences dans la production ou l'utilisation de l'énergie dans divers tissus et englobent les défauts du métabolisme énergétique mitochondriale et cytoplasmique. Les présentations cliniques de ces maladies sont très hétérogènes et peuvent impliquer tous les organes qui consomment beaucoup d'énergie comme le système nerveux, la moelle osseuse, le foie, le cœur ou les muscles. Les défauts mitochondriaux sont souvent graves et intraitables. Ils englobent les déficits du cycle de Krebs ou de ces points d'entrée (comme la pyruvate déshydrogénase), les troubles de la chaîne respiratoire, les défauts de la beta oxydation des acides gras ou de la synthèse des corps cétoniques. Les défauts énergétiques cytoplasmiques sont souvent moins graves et peuvent être traitables. Ils incluent les troubles de la glycolyse, du métabolisme du

glycogène, l'hyperinsulinisme, les défauts du métabolisme de la créatine et les atteintes de la voie des pentoses phosphates.

Les **troubles impliquant des molécules complexes** affectent les organites cellulaires responsables des fonctions de synthèse, remodelage, recyclage, trafic et dégradation des molécules complexes. Il comprend les maladies lysosomales, les troubles peroxysomaux, les défauts de synthèse des lipides complexes et des acides gras. Les symptômes sont souvent permanents et progressifs sans décompensation aiguë. Récemment des thérapies innovantes comme l'enzymothérapie substitutive ou la réduction du substrat d'amont ont permis un gain dans la qualité de vie de ces patients. L'efficacité reste cependant modeste.

3. Stratégies thérapeutiques

Les EIM sont souvent des maladies systémiques qui affectent plusieurs organes. Pour assurer une prise en charge efficace et améliorer la qualité de vie des patients, il est essentiel d'adopter une approche globale et multidisciplinaire. Chaque EIM nécessite un traitement spécifique, mais il existe des principes fondamentaux comme réduire les substrats en amont du blocage enzymatique, améliorer l'activité des enzymes déficientes, et compenser en fournissant les substrats en aval qui sont devenus lacunaires.

3.1. Stratégie de réduction des substrats d'amont

3.1.1. Prise en charge diététique

Pour cette stratégie, la prise en charge diététique est souvent incontournable ; à fortiori dans les maladies d'intoxication. Elle vise à instaurer un régime particulier qui réduit fortement l'apport en certains composants non métabolisables du fait du blocage enzymatique. En bref, quatre types de régimes peuvent être envisagés : faible en protéines, restreint en glucides, riche en glucose et restreint en lipides. Une supplémentation en nutriments spécifiques, tels que les vitamines, certains cofacteurs, ou la carnitine, est également souvent nécessaire et peut permettre de restaurer une partie de l'activité enzymatique déficiente. En situation d'urgence, notamment lors d'une décompensation aiguë d'une maladie d'intoxication, la prise en charge diététique visera avant tout à favoriser l'anabolisme par le biais d'apports énergétiques importants et à bannir toute source potentielle du substrat

toxique. L'anabolisme forcé permet ainsi de réorienter les voies métaboliques vers l'utilisation des substrats d'amont et non vers leur dégradation.

3.1.2. Epuration artificielle

Des approches pharmacologiques peuvent également permettre de réduire les substrats d'amont en favorisant leurs épurations ou en les chélatant. C'est le cas par exemple du benzoate de sodium qui épure l'ammoniac ou de la pénicillamine qui chélate le zinc. Une autre approche consiste à réduire la synthèse endogène du substrat non dégradable comme avec le miglustat qui inhibe la synthèse de glucosylcéramide, le substrat qui s'accumule dans la maladie de Gaucher. En cas d'intoxication aiguë avec détresse vitale, il est parfois nécessaire d'avoir recours à l'hémodiafiltration pour retirer mécaniquement les composés toxiques accumulés.

3.2. Stratégie de restitution d'une activité enzymatique

La restitution d'une activité enzymatique préalablement déficitaire nécessite des approches innovantes comme la thérapie génique, les protéines chaperonnes, l'enzymothérapie substitutive (EST) ou l'allo-transplantation de cellules souches hématopoïétiques (TCSH). Ces approches sont en général très couteuses avec une efficacité modérée.

La TCSH consiste à administrer des cellules souches hématopoïétiques, venant de la moelle osseuse ou du sang de cordon ombilical, par voie intraveineuse après une myéloablation. Ces cellules deviennent une source d'enzyme manquante, non seulement dans la moelle osseuse, mais aussi dans le système nerveux central via les cellules microgliales [12,13]. **L'enzymothérapie substitutive** vise à remplacer les enzymes défectueuses par des enzymes exogènes administrées par voie intraveineuse, ciblées vers les lysosomes [14,15]. Elle repose sur l'internalisation des enzymes via le récepteur du mannose-6-phosphate (M6P) [16]. **La supplémentation en cofacteurs** consiste en fait à tirer profit des lois de la thermodynamique. En effet, les réactions enzymatiques dépendent des concentrations des substrats. Même en présence d'une enzyme défectueuse avec une activité résiduelle limitée, une amélioration peut parfois être obtenue en augmentant considérablement la concentration des biomolécules impliquées dans la réaction. Lorsqu'un substrat est toxique et s'accumule, il est nécessaire d'agir sur les autres substrats impliqués, notamment les

cofacteurs. Ainsi, la supplémentation en cofacteurs peut augmenter l'activité enzymatique résiduelle, comme dans le cas de la forme B12-sensible de l'acidurie méthylmalonique. Les **molécules chaperonnes** stabilisent les protéines mal repliées, facilitant leur adressage au site cible [17]. La **reprise traductionnelle** en aval d'un codon-stop prématuré est une approche qui permet la poursuite de la traduction au-delà du codon-stop prématuré, utilisant des molécules telles que la Gentamicine et le PTC124 [18,19]. Les **inhibiteurs de protéases** visent à maintenir l'homéostasie des protéines en agissant comme des régulateurs de la protéostasie, notamment les inhibiteurs du protéasome et les régulateurs du calcium [20]. Enfin, les **inducteurs de l'autophagie** peuvent être bénéfiques dans certaines maladies lysosomales en activant la voie catabolique pour se débarrasser des agrégats protéiques et des organites endommagés [21].

3.3. Stratégie de compensation des métabolites d'aval

L'approche visant à compenser le manque des produits générés normalement en aval du blocage enzymatique est très spécifique et peu utile pour beaucoup d'EIM. Cependant, quand elle est possible et disponible cette approche est souvent disruptive, un « game-changer ». Le déficit en NAGS par exemple, est très bien traité par l'acide carglumique [22]. De même, le trouble de la glycosylation type Ib est presque une « non-maladie » une fois qu'une supplémentation par mannose a été débutée [23]

CHAPITRE II : LES MALADIES LYSOSOMALES

Le lysosome est un organite cellulaire indispensable. En attestent les trois prix Nobel attribués respectivement à Ilya Ilyich Metchnikoff en 1908, Christian de Duve en 1974 et Yoshinori Ohsumi en 2016. Ces distinctions récompensent la mise en lumière du rôle crucial des vacuoles acides et des cytases dans l'immunité innée par phagocytose, l'identification du lysosome en tant qu'organelle multifonctionnel, ainsi que la compréhension des mécanismes de l'autophagie, terme introduit par de Duve [24]. Ce dernier avait saisi la nature dynamique du lysosome : son environnement acide distinctif et son rôle dans le recyclage du cargo cellulaire exogène ainsi qu'endogène. Il a également proposé que le lysosome lui-même soit le siège de déficiences génétiques - une prédiction confirmée par la suite dans la maladie de Pompe (déficience en maltase acide) par son ancien collègue Henri-Géry Hers [25].

Cependant, cette vue initiale du lysosome en tant qu'organite utilisé uniquement pour la dégradation et le recyclage n'est plus tenable. Dans les maladies lysosomales, la présence de débris macromoléculaires incomplètement dégradés, bien que souvent proéminente, n'explique de façon incomplète la pathogenèse. Les découvertes récentes apportent de nouvelles perspectives qui permettent de mieux comprendre les maladies lysosomales dans le contexte dynamique de l'homéostasie [26]. Le lysosome est un organite dont l'acidité et la mobilité peuvent varier en un éclair en fonction des besoins de la cellule grâce à des plateformes de machinerie finement régulées à sa surface. Ces adaptations homéostatiques sont particulièrement sensibles aux signaux provenant de l'intérieur de la cellule ainsi qu'aux influences extérieures, en particulier l'état nutritionnel.

1. Le système lysosomal

Le lysosome est un organite essentiel dans la cellule, délimité par une membrane lipidique, avec un pH interne acide maintenu grâce à une pompe à protons ATP-dépendante. Sa morphologie est très variable, allant de sphérique à ovoïde, voire tubulaire, et sa taille peut osciller entre 0,1 et 2 µm selon les types cellulaires (Figure III-1). Les lysosomes contiennent plus de 60 types différents d'hydrolases indispensables pour la fonction catabolique lysosomale [27]. La batterie d'enzymes hydrolytiques localisées dans la lumière lysosomale est optimalement active à un pH acide et est suffisante pour dégrader la plupart des macromolécules endo- ou exogènes.

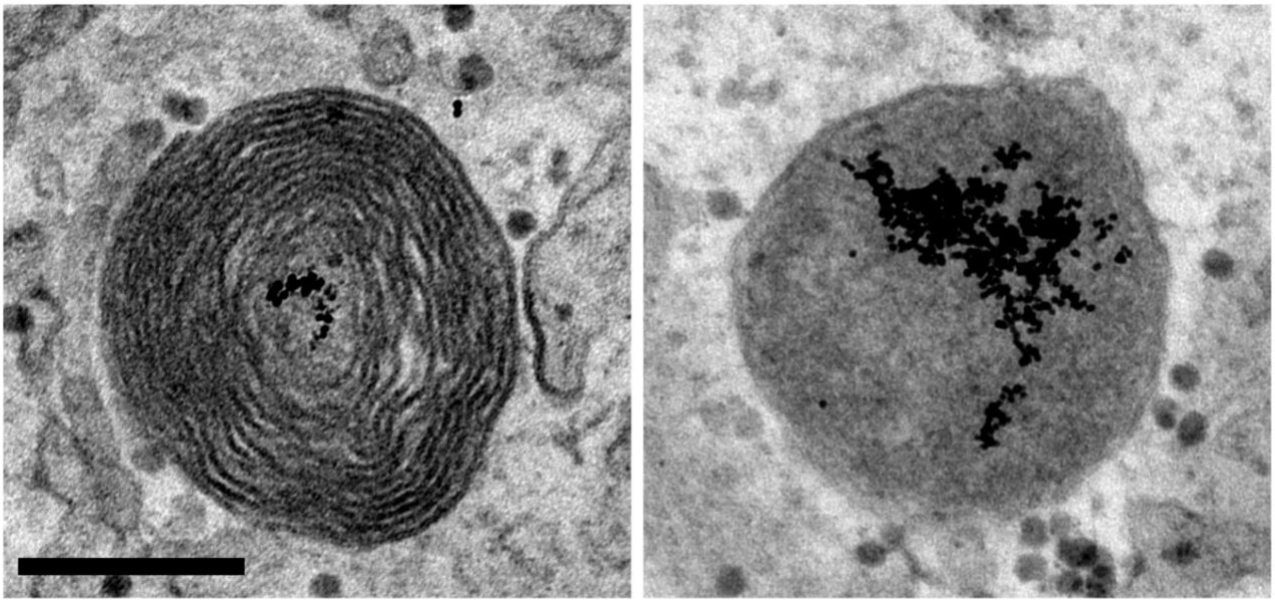


Figure II-1. Microscopie électronique en transmission de lysosomes.

Les lysosomes contiennent des particules d'or endocytées (granules noires). Les particules d'or s'agrègent dans l'environnement acide du lysosome. Les lysosomes contiennent parfois des spirales membranaires. Barre d'échelle, 200 nm [28].

Les enzymes lysosomales sont acheminées vers le lysosome en deux étapes distinctes ; les protéines nouvellement synthétisées sont d'abord transportées depuis le réticulum endoplasmique (ER) jusqu'à l'appareil de Golgi puis transférées depuis le Golgi vers les compartiments endolysosomaux. La plupart des hydrolases lysosomales acquièrent une étiquette de mannose-6-phosphate (M6P) dans l'appareil de Golgi. Cette étiquette est reconnue dans le réseau trans-Golgi par les récepteurs de mannose-6-phosphate (M6PRs) qui dirigent les hydrolases lysosomales vers la voie endolysosomale [29]. Il existe également des voies indépendantes de M6PR pour le transport des hydrolases lysosomales, tout

comme les voies de transport des protéines membranaires lysosomales (LMPs), mais elles restent principalement indéterminées. Des études récentes fournissent des preuves à la fois de sorties médiées par la clathrine et de sorties non médiées par la clathrine des LMPs depuis le réseau trans-Golgi, ce qui permettrait une livraison ciblée et opportune des LMPs vers des intermédiaires endosomaux distincts [30]. Cela est également soutenu par la présence de signaux de tri multiples dans les queues cytosoliques de certaines LMPs, l'observation que d'autres domaines que les queues cytosoliques peuvent être impliqués dans le ciblage lysosomal et la présence de modifications post-traductionnelles pouvant ajuster finement les signaux de tri.

Le facteur de transcription EB (TFEB) est le facteur de transcription maître qui régule la biogenèse lysosomale et l'autophagie [31]. Sous l'influence de stimuli externes tels que la famine, le TFEB déphosphorylé migre dans le noyau pour reconnaître spécifiquement et se lier aux éléments coordonnés d'expression et de régulation lysosomale (CLEAR) situés sur les promoteurs des gènes liés à l'autophagie et à la biogenèse lysosomale (Figure II-2). La fonction du TFEB dans le noyau est finement régulée, mais le mécanisme moléculaire n'est pas entièrement élucidé.

Le lysosome est par ailleurs en contact dynamique et permanent avec les autres organelles cellulaires, établissant des relations d'interdépendance et d'inter influences (Figure II-3) [32].

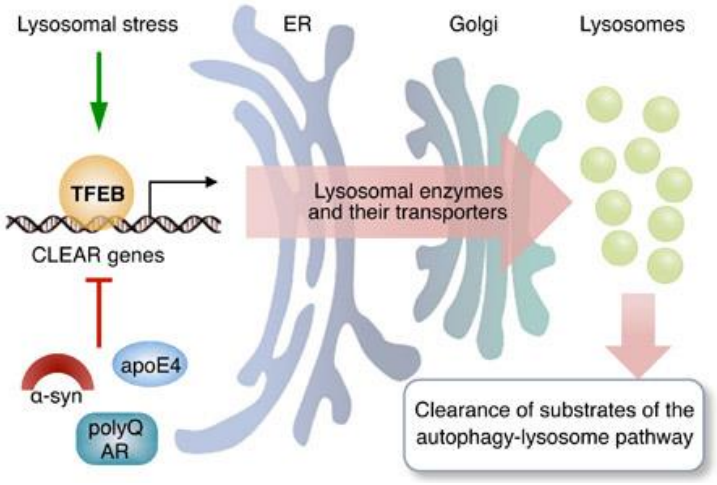


Figure II-2. La biogenèse lysosomal est régulée par TFEB.

[30]

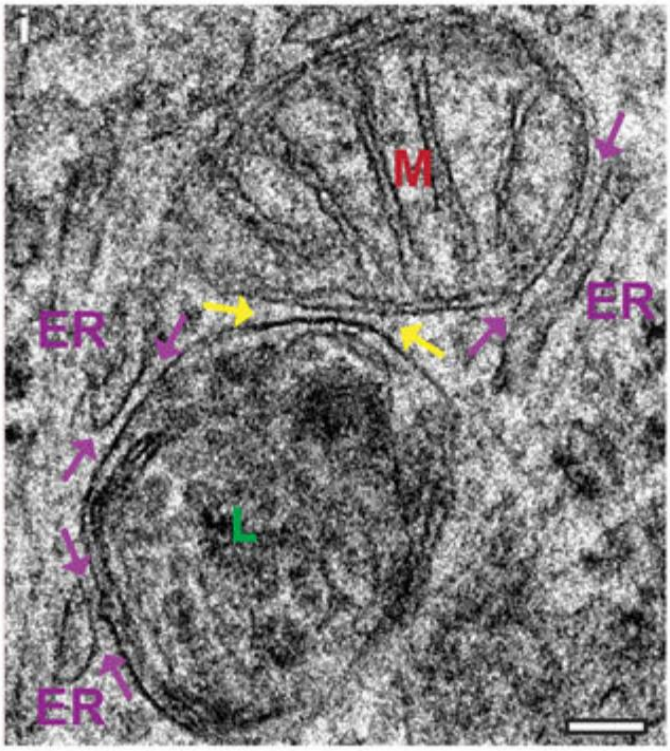


Figure II-3. Contacts entre lysosome avec le réticulum endoplasmique) et avec la mitochondrie.

L : Lysosome ; ER : Réticulum endoplasmique - flèches violettes ; M : » Mitochondrie [33].

2. Les fonctions du lysosome

Ce n'est que récemment que les lysosomes ont été identifiés comme des acteurs centraux pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. En recyclant les macromolécules via des processus divers tels que l'endocytose, la phagocytose ou l'autophagie, les lysosomes jouent en réalité un rôle clé de senseur de l'état énergétique, nutritionnel et même structurel de la cellule et de son environnement immédiat [34]. Ils sont également impliqués dans la signalisation des facteurs de croissance et des acides aminés. Les incessantes étapes de fusion membranaire et de trafic intracellulaire sont facilitées par de nombreuses composantes moléculaires, telles que les protéines Rab et SNARE [35]. Ces protéines sont localisées dans le lysosome et interagissent avec lui, contribuant ainsi au va-et-vient des substrats et des produits de digestion à travers le réseau lysosomal étendu.

2.1. L'endocytose

L'endocytose est caractérisée par l'utilisation de ligands se liant à des récepteurs situés à la surface cellulaire et étant ensuite "internalisés". Cela facilite la livraison de nutriments et d'autres molécules à l'intérieur de la cellule après la fusion avec les lysosomes, formant ainsi

l'endolysosome. Les récepteurs utilisés peuvent être directement redirigés vers la surface cellulaire comme c'est le cas pour la transferrine, ou être dégradés. Le recyclage des protéines de surface cellulaire par endocytose est permanent et rapide. Les macrophages par exemple, peuvent renouveler l'entièreté de leur membrane plasmique en une heure.

2.2. La phagocytose

Observée pour la première fois en 1882 par I.I. Metchnikov, la phagocytose est largement répandue dans le monde vivant. Elle permet l'engloutissement de bactéries, levures, débris organiques ou inorganiques, de suspensions colloïdales et de matériaux structurés, tels que la silice ou des cristaux (ex : le monosodiumurate, dans la goutte). Les lysosomes y jouent un rôle essentiel. La phagocytose nécessite des événements de fusion membranaire actifs. Elle est une caractéristique particulière des macrophages et des cellules dendritiques [36]. Les macrophages phagocytent les agents pathogènes, les emprisonnant ainsi dans des phagosomes. Ensuite, ces phagosomes fusionnent avec les lysosomes pour former des phagolysosomes, qui acquièrent alors un environnement acide et hydrolytique qui élimine les agents pathogènes.

2.3. Présentation des antigènes

Les cellules présentant l'antigène utilisent des protéinases à cystéine lysosomales, également connues sous le nom de cathepsines, pour cliver les antigènes protéiques endocytés et générer des fragments peptidiques. Ces fragments sont ensuite présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II). Cette étape est essentielle pour l'induction de la réponse immunitaire adaptative. Les déficiences ou les inhibitions des protéinases acides lysosomales, en particulier de la cathepsine S, ont été démontrées expérimentalement pour atténuer le développement de l'auto-immunité [37]. Dans les maladies lysosomales (ML), les problèmes d'auto-immunité semblent accrus et la réponse immunitaire adaptative est souvent perturbée [38].

2.4. L'autophagie

Le phénomène de l'autophagie (du grec **αυτο,** signifiant "soi-même" et **φαγειν** signifiant "manger") est omniprésent, essentiel à la survie et régulé de manière très fine. Les

mécanismes de l'autophagie se sont probablement développés au cours de l'évolution pour permettre aux cellules de survivre aux pénuries de nutriments et d'énergie, ainsi qu'aux lésions génomiques et aux agressions microbiennes. Ainsi, l'autophagie repose sur les mêmes principes dans toutes les cellules et chez tous les organismes eucaryotes [39]. L'autophagie est activée par la réponse au jeûne, les lésions de l'ADN, l'accumulation de protéines mutantes ou agrégées, le stress oxydatif, l'infection virale, la présence d'endotoxines bactériennes, le développement, la croissance et la différenciation.

L'autophagie englobe trois activités intracellulaires distinctes(Figure II-4) :

- Microautophagie : détruit des fragments de cytoplasme et des organites directement dans les lysosomes.
- Autophagie médiée par des molécules chaperonnes.
- Macroautophagie : élimine de manière sélective des organites, des complexes protéiques, des agrégats de protéines, des pathogènes phagocytés. La macroautophagie est également importante pour la génération de l'ATP en réponse au jeûne. La macroautophagie des mitochondries est appelée mitophagie.

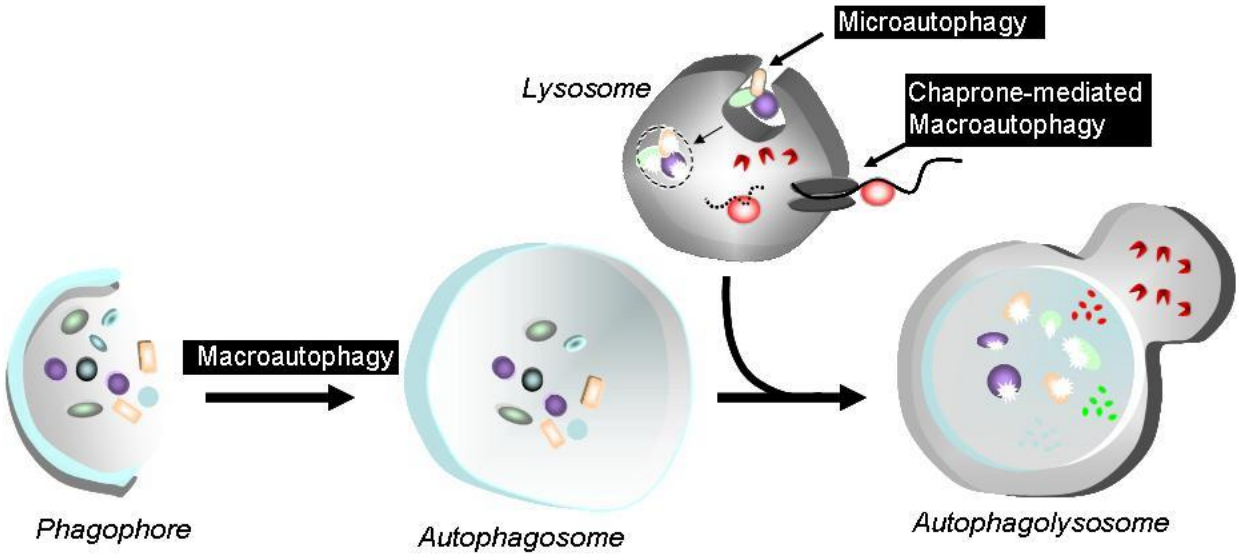


Figure II-4. Représentation des étapes principales de l'autophagie.

[40]

Le processus de macroautophagie est complexe et hautement régulé, impliquant plusieurs étapes essentielles et la formation de structures telles que l'autophagosome, l'amphisome et l'autolysosome (ou autophagolyososome). Plusieurs structures membranaires appartenant au réticulum endoplasmique, à l'appareil de Golgi, aux mitochondries ainsi qu'au

plasmalemme semblent contribuer à la formation des membranes autophagiques. De plus, des composants de la voie sécrétoire et la machinerie SNARE, notamment les protéines SNAP, sont également impliqués. Les protéines RAB5 et RAB7 jouent un rôle clé dans le trafic membranaire endolysosomal, tandis que la protéine LC3, analogue à la protéine d'autophagie de levure Atg8, est cruciale pour la formation des phagophores [41]. La fusion des endosomes tardifs acidifiés et des lysosomes avec les phagophores aboutit à la formation des autolysosomes ou autophagolysosomes, qui sont responsables de la dégradation des composants cellulaires. Des inhibiteurs de l'enzyme V-(H+) ATPase, tels que la bafilomycine, peuvent entraver cette fusion, soulignant l'importance de l'acidification dans le processus [42]. L'ubiquitination des protéines semble également jouer un rôle critique dans l'autophagie, comme le suggère l'impact de la déficience de l'enzyme ubiquitin-activating E1 sur l'élimination des vacuoles autophagiques [43].

L'autophagie permet également à la cellule de recycler des matériaux cellulaires pour répondre à ses besoins nutritionnels et énergétiques. Ce processus est activé en réponse à divers signaux, mais il atteint son pic d'activité en situation de stress métabolique, notamment lorsque les nutriments sont limités. De plus, ce processus peut également être renforcé dans divers contextes, tels que le désusage des muscles, l'involution des organes glandulaires, les réponses inflammatoires liées à la fièvre, l'action de certaines hormones comme le glucagon ou les hormones thyroïdiennes, ainsi que la stimulation sympathomimétique.

2.5. Rôle central de mTORC1

La régulation fine de l'activité lysosomale est orchestrée par le complexe mTORC1 (Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1) [44]. Lorsque les niveaux de nutriments tels que le glucose, les acides aminés et le cholestérol sont élevés, mTORC1 s'active à la surface du lysosome. Cette activation est facilitée par les Rag GTPases, sensibles aux fluctuations des niveaux d'acides aminés et de glucose. Parallèlement, lorsque des facteurs de croissance sont abondants, ils déplacent le complexe TSC (Tuberous Sclerosis Complex) loin de la surface lysosomale, levant ainsi son inhibition sur Rheb, une protéine activatrice de mTORC1. En conséquence, mTORC1 est activé en réponse à une disponibilité accrue de

nutriments et à des signaux de croissance. Une fois activé, mTORC1 régule l'activité cellulaire en phosphorylant divers facteurs de transcription, notamment TFEB, les maintenant dans le cytoplasme au lieu du noyau. Cette action réduit la biogenèse lysosomale et l'autophagie en période de nutrition suffisante (Figure II-5)..

En revanche, en cas de carence nutritionnelle, le complexe GATOR1 est recruté vers les lysosomes, ce qui entraîne l'inactivation des Rag GTPases et, par conséquent, de mTORC1. Dans ces conditions de privation nutritionnelle, TFEB est libéré et migre vers le noyau, stimulant ainsi l'expression de gènes impliqués dans la biogenèse lysosomale, l'autophagie et la régulation métabolique (Figure II-5). En situation de carence énergétique, l'augmentation du ratio AMP/ATP active l'AMPK qui inhibe mTORC1.

Il est important de noter que les mécanismes d'adaptation des lysosomes varient en fonction du type de stress et de l'état de la cellule, à travers une signalisation complexe qui est encore incomplètement comprise.

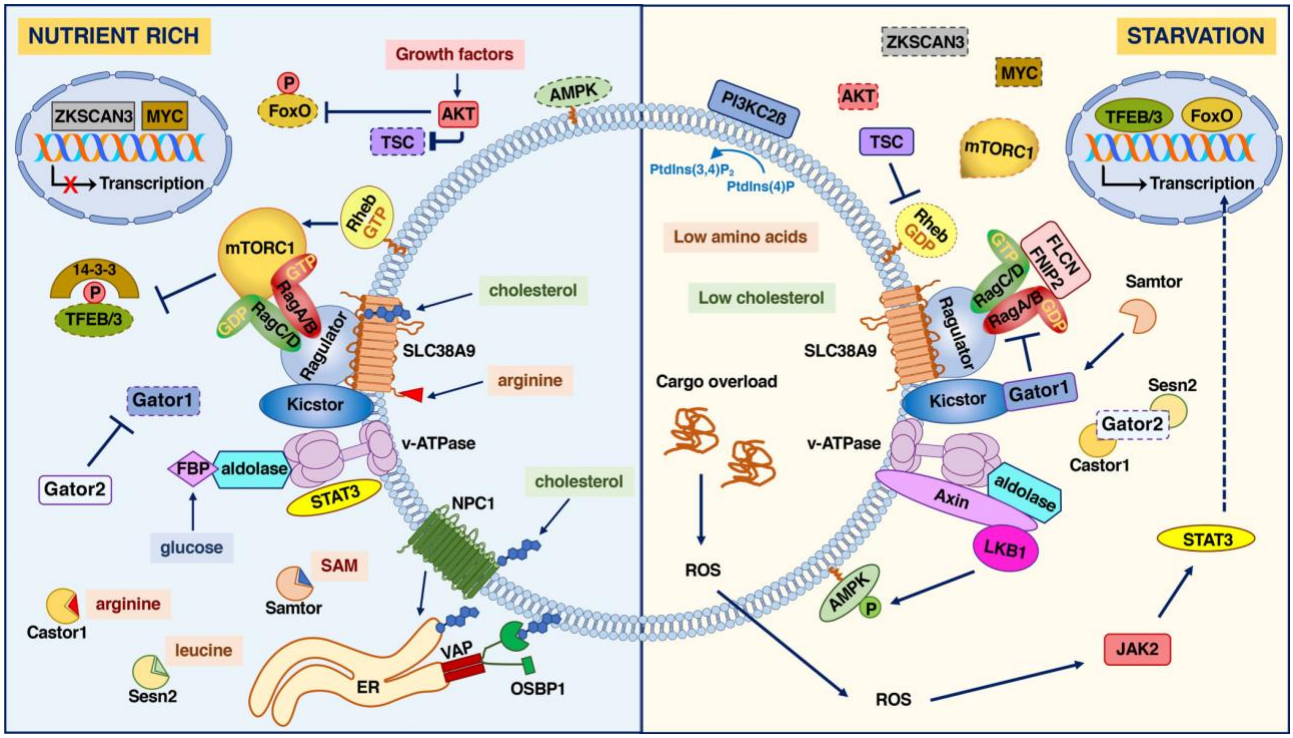


Figure II-5. Régulations métaboliques par les lysosomes.

La figure ci-dessus représente les différentes voies de signalisation assemblées à la surface du lysosome en réponse aux variations des niveaux d'acides aminés, de glucose, de facteurs de croissance et de cholestérol. Plusieurs signaux nutritifs, notamment le glucose, les acides aminés et le cholestérol, convergent pour réguler l'activité des Rag GTPases. Lorsque les niveaux de ces nutriments sont élevés (panneau de gauche), les Rag GTPases s'activent, favorisant le recrutement du complexe mTORC1 à la surface du lysosome. Dans le même temps, des niveaux élevés de facteurs de croissance provoquent le déplacement du complexe TSC de la surface lysosomale, empêchant son activité GAP envers Rheb. Rheb lié à GTP favorise ensuite l'activation de mTORC1. Plusieurs capteurs, dont Castor, Sestrin2 et Samtor, détectent les variations dans le pool cytosolique d'acides aminés, tandis que la perméase d'acides aminés lysosomaux SLC38A9

reconnaît la concentration d'acides aminés, en particulier l'arginine, à l'intérieur du lumen lysosomal. Le transfert de cholestérol de l'appareil de réticulum endoplasmique (ER) à la membrane lysosomale via OSBP1 favorise également l'activation de mTORC1. mTORC1 actif phosphoryle des membres de la famille de facteurs de transcription MiT/TFE, tels que TFEB et TFE3, favorisant leur liaison à 14-3-3 et leur séquestration cytosolique consécutive. Dans le même temps, AKT actif favorise l'inhibition de l'autophagie en phosphorylant et en inactivant beclin et les facteurs de transcription FoxO. Lorsque les nutriments se font rares (panneau de droite), GATOR1 est recruté sur les lysosomes induisant le chargement en GDP de RagA/B et l'inactivation de mTORC1. Cela permet la translocation de TFEB et TFE3 vers le noyau pour induire l'expression de multiples gènes impliqués dans la biogenèse lysosomale, l'autophagie et la régulation métabolique. L'axe autophagique/lysosomal est également modulé par l'activation de FoxO et de STAT3. De faibles niveaux de glucose entraînent le recrutement d'Axin-LKB1 sur les lysosomes et l'activation d'AMPK, qui équilibre l'homéostasie énergétique en favorisant les processus cataboliques pour restaurer les niveaux d'ATP. Les lignes en pointillés indiquent l'inactivation ; P à l'intérieur d'un cercle rouge représente la phosphorylation inhibitrice, P à l'intérieur d'un cercle vert représente la phosphorylation activatrice **[**34**]**.

3. Maladies lysosomales

Le terme « maladies de surcharge lysosomales » ou sa version récente « maladies lysosomales » (ML) font référence aux prétendues maladies monogéniques affectant la fonction lysosomale. Le terme "surcharge" fait référence à l'accumulation de macromolécules non dégradées à l'intérieur du lysosome. Le concept de a été développé en 1963, suite à la découverte de la maladie de Pompe, causée par un déficit en α-glucosidase, une enzyme lysosomale qui décompose le glycogène en glucose [45]. Lesconstituent un sous-groupe des erreurs innées du métabolisme (EIM) et résultent d'une altération spécifique d'un gène codant pour une enzyme lysosomale ou une protéine nécessaire au fonctionnement des lysosomes. La plupart des défauts enzymatiques réduisent l'activité d'une seule hydrolase, mais les activateurs ou cofacteurs dysfonctionnels, en particulier, ainsi que les transporteurs membranaires, peuvent affecter plusieurs activités lysosomales. La transmission est très souvent autosomique récessive, mais des transmissions autosomiques dominantes, liée à l'X et mitochondriale sont également décrites [46].

Il existerait plus de 80 ML génétiquement distinctes. La prévalence cumulée de ces maladies est estimée entre 1/2315 à 1/7700 naissances selon la population [47,48]. Parmi elles, les plus connues sont la maladie de Gaucher, la maladie de Pompe, la maladie de Fabry ou les mucopolysaccharidoses.

3.1. Classification

La classification historique des maladies lysosomales se base sur des aspects biochimiques qui décrivent les principaux "matériaux de moléculaires" s'accumulant dans ces maladies (Tableau II-1).

- **Mucopolysaccharidoses** : résultent de l'accumulation de glycosaminoglycanes. Ces molécules anciennement appelées mucopolysaccharides sont des polymères chargés négativement composés d'unités disaccharidiques. Ce sont des composants importants de protéines structurales complexes appelées protéoglycanes et sont présents dans presque tous les tissus [49].Les glycosaminoglycanes, dont le métabolisme est défectueux dans les mucopolysaccharidoses, sont libérés par le renouvellement actif des protéoglycanes principalement issus de la rénovation et de la réparation de la matrice tissulaire extracellulaire.
- **Sphingolipidoses :** résultent de l'accumulation de sphingolipides qui représentent une classe de lipides construits à partir de sphingosine.
- **Glycoprotéinoses (ou oligosaccharidoses) :** résultent de l'accumulation d'oligosaccharides ou de glycoprotéines, des protéines qui contiennent des chaînes d'oligosaccharides attachées de manière covalente. Le glucide est attaché à la protéine par glycosylation qui est une modification co-traductionnelle ou post-traductionnelle. Les protéines extracellulaires sécrétées sont souvent glycosylées.
- **Glycogénoses** : résultent de l'accumulation de glycogène
- **Divers / « miscellaneous »** : incluent des troubles touchant les activateurs, stabilisateurs, modificateurs post-traductionnels, protéines chaperonnes, transporteurs membranaires lysosomaux, anomalies de la biogenèse lysosomale ou des organites apparentés aux lysosomes.

Tableau II-1. Classification des maladies lysosomales.

Mucopolysaccharidoses (15)	**Sphingolipidoses (10)**	**Glycoproteinoses (6)**	**Miscellaneous (58)**
Arylsulphatase K deficiency	Anderson-Fabry	Aspartylglucosaminuria	Action myoclonus-renal failure (SCARB2-LIMP2)
Hunter (II)	Farber	Fucosidosis	Arylsulphatase G, ARSG mutations (Usher syndrome type 4)
Hurler, Scheie (I)	Gaucher	Galactosialidosis	Cathepsin B (Keratolytic winter erythema)
Hyaluronidase defy (X)	GM1 Gangliosidosis	Kanzaki/Schindler (a-N-acetylgalactosaminidase)	Cathepsin C (Papillion-Lefevre syndrome)
Maroteaux-Lamy (VI)	GM2 activator deficiency		Cathepsin D (infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis 10)
Morquio A, B (IV)	Krabbe		Cathepsin F (Kuf's disease type B, NCL 13)
Sanfillipo A-D (III)	Metachromatic Leukodystrophy	alpha-Mannosidosis	Cathepsin K (Pycnodysostosis)
Sly (VII)	Niemann-Pick (A & B)	béta-Mannosidosis	Chédiak-Higashi
	Sandhoff	Sialidosis	Cobalamin-F transporter disease (LMBRD1)
	Tay-Sachs		Cystinosis (cystine transporter (SLC17A5)
Membrane-trafficking Defects (3)	Galactosialidosis		Danon (LAMP2)
VPS33A deficiency ("MPS plus"®)	Kanzaki/Schindler		DNASE-2 (Aicardi-GoutiÃ¨res variant)
VPS33B deficiency	Acetylgalactosaminidase		Griscelli (1-3)
VPS16 deficiency (includes "MPS-plus")			H-Syndrome - hENT3 (SLC293A)
			Hermansky-Pudlak (1-10)
			I-cell disease II & III
			Kufor-Rakeb Parkinson-dementia spastic paraplegia78 (ATP13A2)
			Malignant infantile osteopetrosis (CLCN7)
			Mucolipidosis IV (MCOLN1)
			Multiple sulphatase deficiency
			Niemann-Pick C types 1 and 2
			Neuronal Ceroid Lipofuscinoses (CLN 1-9, 11-12, 14)
			Phospholipase A2
			Pompe (GSD type 2)
			Progranulin deficiency (FTD-TDP-43 dominant, others CLN 11)
			Salla (sialic acid - SLC17A5)
			Sphingolipid activator deficiencies (A-D)
			Type 5 Acid phosphatase deficiency (ACP5 - SPENCD1)
			T2-family acidic endoribonuclease (RNASET2)
			Wolman/ Cholesterol ester storage diseases

3.2. Aspects cliniques

Les maladies lysosomales sont caractérisées par une grande hétérogénéité clinique, une atteinte progressive de nombreux organes et systèmes, une complexité génétique, une variabilité de l'âge de début et une évolution sévère. Les patients atteints de maladies lysosomales présentent souvent des symptômes graves, tels que des malformations congénitales, une régression neurologique, des crises, une hépatosplénomégalie, une défaillance cardiaque, une anémie, une thrombocytopénie, une insuffisance rénale, une dystrophie musculaire, une cécité, une surdité, une stérilité, une immunosuppression, des infections fréquentes et une grande vulnérabilité aux facteurs environnementaux et alimentaires [50]. Les variants des gènes lysosomaux sont également associés à un risque accru de maladies multifactorielles et polygéniques, telles que les maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer), le diabète de type 2, l'athérosclérose, le cancer, la maladie de Crohn et la maladie coeliaque [14].

En l'absence du dépistage néonatal pour diagnostiquer précocement les ML, le rôle du clinicien devient crucial dans l'orientation diagnostique. D'autant plus que les présentations cliniques de ces affections peuvent varier considérablement d'un patient à l'autre. Certains enfants peuvent présenter des signes avant même leur naissance (ex : anasarque), tandis que d'autres peuvent ne développer des symptômes qu'à un âge plus avancé malgré la présence d'un même déficit enzymatique et les mêmes variants génétiques. Chez de nombreux patients, les premiers symptômes se manifestent au cours des premiers mois ou des premières années de leur vie. Ces signes précurseurs peuvent se manifester sous forme de ralentissement du développement psychomoteur ou d'autres anomalies neurologiques. Dans d'autres cas, une augmentation de la taille d'organes internes (hépatomégalie, splénomégalie) ou des traits du visage plus marqués peuvent être observés. La reconnaissance attentive de ces signes cliniques est d'une importance capitale, car elle guide le choix des tests diagnostiques les plus appropriés.

Il est intéressant de noter qu'un nombre croissant de diagnostics de ML sont posés chez des adultes. Dans ce groupe de patients, la présentation des symptômes peut être atypique, et il est beaucoup plus fréquent de constater des manifestations neuropsychiatriques sans caractéristiques dysmorphiques [51-53]. Cette prise de conscience souligne l'importance

d'une évaluation clinique approfondie pour tous les patients, quel que soit leur âge, afin de permettre un diagnostic précoce et précis des ML et de garantir une prise en charge adaptée. En effet, la plupart des traitements existants offrent de meilleurs résultats chez les patients qui en bénéficient au début de la maladie avant le développement de séquelles irréversibles.

3.3. Physiopathologie

Historiquement, il a longtemps considéré que les manifestations cliniques des ML étaient les conséquences directes de l'accumulation de substrats inertes dans les tissus. Par exemple, la viscéromégalie, l'épaississement de la peau, les dysmorphies squelettiques et les signes oculaires tels que les opacités cornéennes et les taches rouges de cerise étaient attribués à l'accumulation excessive de substrats non dégradés dans les cellules et la matrice extracellulaire.

Cependant, les compréhensions récentes approfondies des fonctions lysosomales remettent en question cette conception physiopathologique. En effet, Il est maintenant plus juste de penser que l'accumulation des substrats non dégradés n'est que le "déclencheur" de plusieurs événements secondaires complexes responsables des manifestations des maladies lysosomales (Figure II-6). Ces événements incluent le stockage de substrats secondaires non liés à l'enzyme défectueuse, des altérations de la composition des membranes, des problèmes de fusion et de trafic intracellulaire des vésicules, un flux autophagique perturbé, une accumulation de substrats autophagiques, une dysrégulation des voies de signalisation, une activation de l'inflammation, des anomalies de la régulation du calcium, une dysfonction mitochondriale et un stress oxydatif [54].

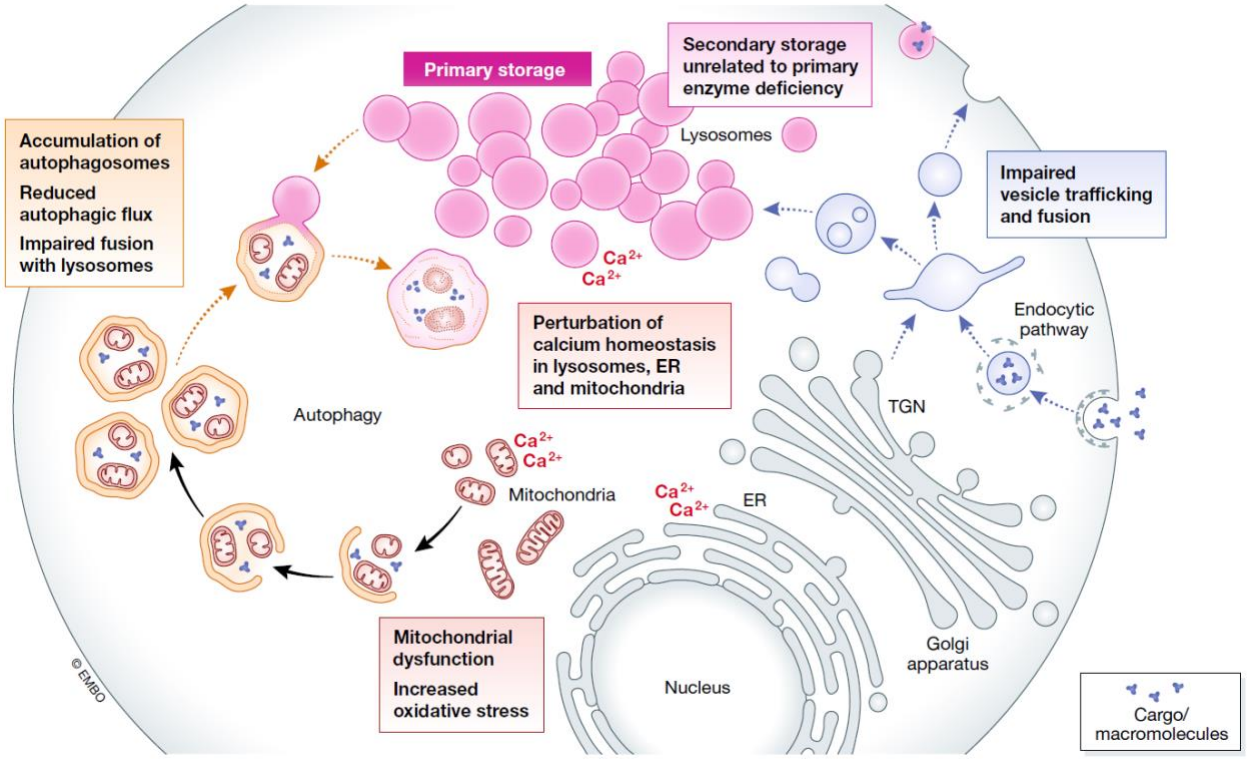


Figure II-6. Cascades physiopathologiques secondaires à l'accumulation de substances intra-lysosomales dans les ML.

[54].

3.4. Diagnostic biologique

Le diagnostic des ML nécessite des tests biochimiques et génétiques effectués dans des laboratoires spécialisés. Différents échantillons biologiques tels que le sang, l'urine, le liquide amniotique, les fibroblastes cutanés et les biopsies tissulaires peuvent être utilisés pour les analyses. Des avancées technologiques récentes permettent l'utilisation de prélèvements de sang ou d'urine séchée sur du papier buvard, facilitant leur collecte, leur transport et leur stockage. L'analyse de l'ADN à partir de sang séché est également en développement.

Les tests diagnostiques des ML peuvent être classés en trois approches principales :

- **Dosage des substrats** : il s'agit de mesurer les concentrations de substrats spécifiques tels que les oligosaccharides urinaires, les glycosaminoglycanes urinaires ou d'autres métabolites que ceux accumulés suite à un déficit primaire, mais qui peuvent être informatifs (ex : lysoGb3 dans la maladie de Fabry). Les techniques traditionnelles, telles que la chromatographie en couche mince haute performance, sont

progressivement remplacées par des méthodes plus sensibles, comme la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

- **Étude fonctionnelle** : cela implique la mesure de l'activité enzymatique, qui peut être réalisée sur différents échantillons biologiques. Les méthodes ont évolué pour inclure des techniques automatisées et des mesures par spectrométrie de masse en tandem, offrant une meilleure sensibilité.
- **Analyse moléculaire** : les tests génétiques moléculaires sont de plus en plus courants pour confirmer un diagnostic biochimique, clarifier les effets d'un pseudodéficit enzymatique, ou pour le conseil génétique. Le séquençage haut débit (Next Generation Sequencing) a révolutionné cette approche, permettant une analyse exhaustive des gènes associés aux ML pour en détecter des variants pathogènes. Il s'agit d'ailleurs de la méthode de choix pour le diagnostic prénatal.

3.5. Prise en charge thérapeutiques

Le traitement actuel et futur des maladies lysosomales comporte plusieurs approches différentes. Chacune de ces approches présente des avantages et des défis spécifiques, et leur choix dépend de la nature précise de la maladie lysosomale. Il est important de souligner que l'avenir des traitements des ML repose sur une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents et des voies métaboliques secondairement altérées dans ces maladies.

3.5.1. Thérapie de remplacement enzymatique

Cette approche consiste à remplacer l'enzyme défectueuse par une enzyme fonctionnelle. Elle est réalisée par la transplantation de cellules souches hématopoïétiques ou par des injections substitutives d'enzyme (ERT – Enzyme Replacement Therapy). Cela a prouvé son efficacité dans plusieurs ML, notamment la maladie de Gaucher, la maladie de Pompe, la maladie de Fabry et certaines mucopolysaccharidoses [55]. Cependant, l'ERT présente des limites importantes, notamment la faible efficacité sur les symptômes neurologiques, un risque d'immunisation contre les enzymes recombinantes, la nécessité d'infusions intraveineuses périodiques ou encore son cout financier important.

3.5.2. Thérapie de réduction de substrat

Une autre approche consiste à réduire le flux de substrats vers les lysosomes à l'aide d'inhibiteurs de synthèse de substrats, appelée thérapie de réduction des substrats (SRT – Substrate Reduction Therapy), ce qui permet du réduire l'accumulation intra-lysosomale. Des médicaments tels que le Miglustat ont montré leur efficacité dans certaines ML, notamment la maladie de Gaucher [56]. D'autres molécules SRT sont en développement.

3.5.3. Thérapie de molécules chaperonnes

Cette approche utilise des molécules de petite taille pour stabiliser les enzymes mutantes et tenter de récupérer ou d'augmenter l'activité résiduelle. Cette approche peut aussi tenter de favoriser leur transport vers les lysosomes. Elle est approuvée pour la maladie de Fabry, avec des médicaments tels que le Migalastat [57]. Cela permet une administration orale et une pénétration plus efficace dans divers tissus.

3.5.4. Thérapie génique

La thérapie génique est en développement avancé pour de nombreuses ML. Elle peut être réalisée in vivo à l'aide de vecteurs viraux adéno-associés (AAV) ou ex vivo en corrigeant les cellules du patient avant de les réimplanter. Cette approche permet la correction locale et croisée de divers tissus. Elle a montré des résultats prometteurs dans certaines ML, notamment la leucodystrophie métachromatique [58].

3.5.5. Thérapies adjuvantes

En raison de la complexité croissante de la pathophysiologie des ML, des approches visant à manipuler les voies secondaires altérées sont explorées. Cela comprend la modulation de l'autophagie, la réduction de l'inflammation et la correction de l'homéostasie calcique intracellulaire, entre autres [59].

CHAPITRE III : LES SPHINGOLIPIDOSES

1. Les lipides

La biologie des lipides est un domaine complexe qui implique plus de 40 000 lipides identifiés à travers les différents règnes du vivant, pourtant, notre compréhension des rôles de la plupart de ces lipides dans la biologie cellulaire et la physiologie demeure très lacunaire [60]. Les lipides jouent un rôle central en tant que composants structuraux des membranes biologiques, mais leur importance ne s'arrête pas là ; ils participent à la production de l'énergie, la modification des protéines, la fusion et la fission membranaire, et ils agissent comme messagers bioactifs régulant l'expression génique, que ce soit directement ou indirectement [61]. Cette diversité fonctionnelle résulte des différentes propriétés chimiques des lipides, et même de légères modifications, comme la présence ou l'absence d'une double liaison, peuvent avoir un impact significatif sur les cellules. Cette diversité permet également la création d'une variété impressionnante de membranes [62], qui à leur tour, forment des organites, des cellules et des tissus complexes.

1.1. Classification

La classification des lipides est complexe, car il est difficile de définir des critères objectifs pour les distinguer des autres molécules organiques. Malgré cela, huit classes de lipides sont généralement acceptées, comprenant les acides gras, les glycérides, les phosphoglycérides, les sphingolipides, les glycolipides, les polycétides, les stérols, et les prénols [63,64]. Les acides gras forment la structure fondamentale des lipides et se composent de chaînes carbonées hydrophobes qui se terminent par un groupement carboxyle hydrophile constituant ainsi une vaste gamme de molécules différentes. Les glycérolipides ou glycérides servent majoritairement à stocker l'énergie. Les phosphoglycérides et les sphingolipides sont des composants majeurs des membranes cellulaires. Les glycolipides

sont des esters d'oses et d'acides gras. Les polycétides comprennent diverses molécules biologiquement actives caractérisées par une alternance de groupe carboxyle et méthylène. Les stérols, comme le cholestérol, sont importants pour les membranes et la signalisation cellulaire. Enfin, les prénols sont synthétisés à partir de précurseurs à 5 carbones particuliers appelés terpènes et incluent des composés tels que les caroténoïdes, les quinones et les polyprénols (Tableau III-1, Figure III-1).

Tableau III-1. Classification des lipides biologiques

Classe	**Structure chimique centrale**	**Exemple**
Acides gras	Chaine hydro-carbonée + groupe carboxyle	Palmitate, acide arachidonique
Glycérolipides	Glycérol	Triglycéride
Glycérophospholipides	Glycérol + phosphate	Lécithine, cardiolipine
Sphingolipides	Sphingosine	Glucosylcéramide
Stérols	Noyau stérane (appelé aussi perhydrocyclopentanophenanthrene)	Cholesterol
Prénols	Noyau terpène	Caroténoïdes, vitamine A
Glycolipides	Ose (sucrose)	
Polycétides	Alternance de groupe carboxyle et méthylène	Doxycycline

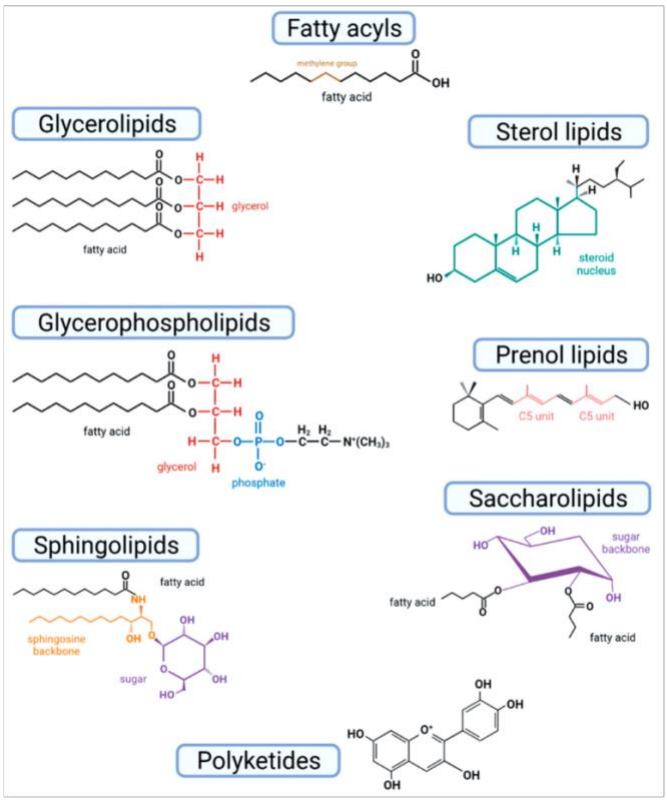


Figure III-1. Représentation schématique des 8 principales classes de lipides biologiques. [63].

1.2. Métabolisme lipidique

La synthèse, le remodelage et la dégradation des lipides sont étroitement coordonnés dans les cellules [65]. Les organites clés impliqués dans ce processus sont le réticulum endoplasmique (RE), les mitochondries, les gouttelettes lipidiques, les lysosomes et l'appareil de Golgi. À ces endroits, les lipides sont assemblés et/ou transformés à partir d'éléments constitutifs simples, notamment le glycérol, le phosphate, les acides gras, les alcools gras, la sérine, la choline, l'éthanolamine et l'inositol, pour former une multitude de lipides complexes.

Les acides gras (AG) sont les éléments constitutifs de beaucoup de lipides. Ils interagissent avec diverses enzymes métaboliques pour être incorporés dans des espèces lipidiques complexes, y compris les diacylglycérols (DAG) et les triacylglycérols (TAG), ou pour être convertis en phosphoglycérides, tels que l'acide phosphatidique (PA), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS), phosphatidylcholines (PC) et des phosphatidylinositols (PI) [66]. La grande diversité des AG détermine la diversité de ces

lipides complexes. De plus, les AG peuvent être utilisés pour la synthèse de céramides dans le RE. La synthèse des AG et des lipides en général est régulée par la famille de facteurs de transcriptions SREBP (Sterol regulatory element binding proteins) [67]. Elle est également influencée par divers facteurs comme HIF (hypoxia inducible factor), qui réprime la carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT1), réduisant ainsi le transport des AG dans les mitochondries et dirigeant les AG vers les gouttelettes lipidiques vers le stockage [68].

Lors de la synthèse endogène des AG (Figure III-2), la première étape implique la conversion du dihydroxyacétone phosphate, un intermédiaire de la glycolyse, en glycérol-3-phosphate, tandis que le citrate, un intermédiaire du cycle de Krebs, se transforme en acétyl-CoA. L'acétyl-CoA est ensuite converti en plusieurs étapes en palmitate (C16:0) par l'enzyme synthase des acides gras (FASN) dans le cytosol. Le palmitate peut ensuite être modifié par des élongases ou des désaturases pour former des acides gras plus longs, saturés, monoinsaturés (MUFAs) et polyinsaturés (PUFAs) [69,70]. Les acides gras s'associent au glycérol-3-phosphate pour permettre la synthèse de lipides complexes dans le RE, notamment les phospholipides PC, PE, PI et PS [61]. Ces voies du métabolisme des lipides sont fortement interconnectées avec les autres voies du métabolisme énergétique de la cellule. Par une voie alternative, l'acétyl-CoA peut également être utilisé pour la biosynthèse du cholestérol [71].

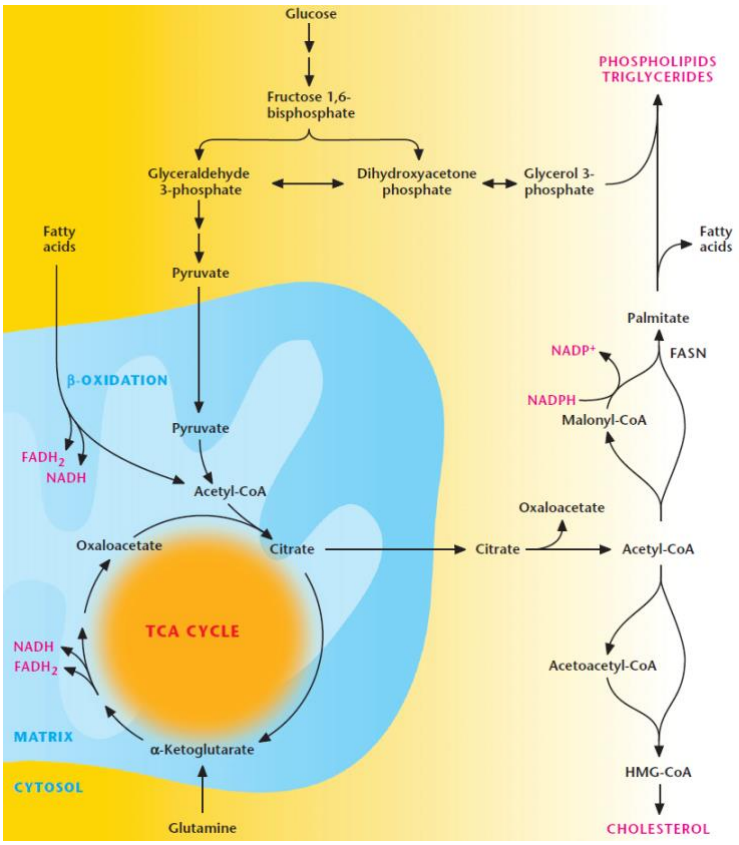


Figure III-2. Synthèse endogène des acides gras.

[61].

Lors du catabolisme en revanche, les AG sont transportés dans les mitochondries, aidés par différents systèmes protéiques. Dans les mitochondries, les lipides sont oxydés pour produire de l'acétyl-CoA par β-oxydation [72], qui est ensuite utilisé pour produire de l'ATP via le cycle de Krebs. Outre l'oxydation des acides gras à longue chaîne dans les mitochondries, les acides gras à très longue chaîne (VLCFAs) et les acides gras à chaîne ramifiée (BRCFAs) sont oxydés dans les peroxysomes [73]. La régulation du catabolisme lipidique est complexe. L'acétyl-CoA carboxylase (ACC) contrôle la synthèse des acides gras. Elle est activée par le citrate et inhibée par le palmitate. La β-oxydation des acides gras est régulée par le malonyl-CoA, qui inhibe l'activité de la carnitine acyltransférase I (CPTI), empêchant ainsi l'importation des acides gras dans la matrice mitochondriale pour la β-oxydation [72].

Le remodelage lipidique est un processus essentiel tissu-dépendant qui va au-delà des voies de biosynthèse des lipides. Il permet d'ajuster finement la composition en acides gras des lipides pour les adapter à la fonction spécifique de la cellule ou de l'organelle [74]. Ce processus est réalisé en éliminant une chaîne latérale d'acides gras d'un lipide cible à l'aide

de (phospho)lipases, ce qui forme un lysolipide. Ensuite, le lysolipide est réacylé par des acylases dépendantes de l'acyle-CoA ou par transacylation par des enzymes appelées transacylases. Les transacylases utilisent l'un des acides gras d'un lipide donneur pour réacyler le lysolipide cible, produisant ainsi un lipide acylé (à partir de la cible) et un nouveau lysolipide (à partir du donneur). Une des voies majeures du remodelage lipidique est le cycle de Lands [75].

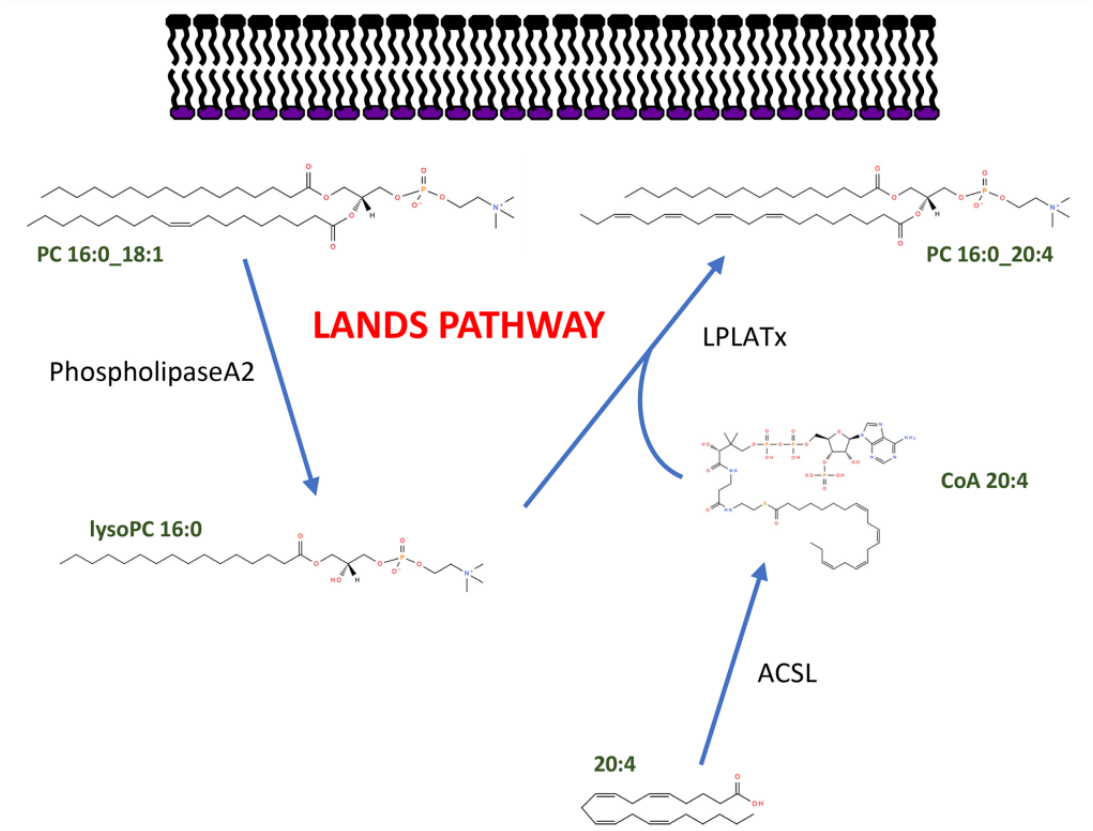


Figure III-3. Le Cycle de Lands.

Ce cycle continent un ensemble de réactions enzymatiques jouant un rôle crucial dans le remodelage lipidique ainsi que des processus importants comme l'inflammation. Le cycle de Lands repose sur deux groupes d'enzymes : (1) Les acyltransférases (LPLATx), responsables du transfert sélectif des groupes acyle des acides gras aux phospholipides, permettant ainsi de personnaliser la composition lipidique des membranes cellulaires. (2) Les phospholipases, qui libèrent les acides gras des phospholipides [75].

Les lipides pénètrent dans les cellules grâce à des protéines de transport des acides gras ou des protéines de translocation telles que FATP et CD36 [76]. Une fois à l'intérieur des cellules, les acides gras sont incorporés dans des gouttelettes lipidiques principalement sous forme de triglycérides. Les gouttelettes lipidiques maintiennent l'homéostasie lipidique en prévenant la lipotoxicité. Elles participent également à la production d'ATP en dégradant les lipides stockés en cas de stress métabolique [77]. Ce sont des nœuds régulateurs

essentiels qui intègrent les signaux physiologiques, tels que les lipides alimentaires et les stimuli lipolytiques, pour coordonner la signalisation cellulaire et le métabolisme.

Les lipides jouent également un rôle essentiel en modifiant les protéines pour en altérer leur fonction et permettre leur adhésion aux membranes lipidiques. Ainsi, des modifications telles que la N-myristoylation, la S- ou la N-palmitoylation, et la S-prénylation par exemple, ont été associées à des pathologies comme le cancer [78].

Enfin, les lipides ne sont pas seulement des composants structurels, ils agissent également comme des molécules de signalisation (ou lipides bioactifs), notamment les eicosanoïdes, les phosphoinositides et les sphingolipides [79].

1.3. Lipides bioactifs

Le concept des lipides bioactifs et son utilité pour comprendre la biologie cellulaire a évolué au cours des dernières décennies, des études sur les phosphatidylinositols (PI) dans les années 1950 aux études sur les prostaglandines dans les années 1960 et à la découverte de la bioactivité du diacylglycérol dans les années 1980. Les lipides bioactifs sont définis fonctionnellement comme des espèces lipidiques dont les niveaux répondent à des stimuli spécifiques et qui peuvent agir sur d'autres cibles spécifiques [79,80].

Ces lipides sont en fait retrouvés dans la plupart des circuits de régulation cellulaires. Ils ont également été mis en évidence dans de nombreux processus pathologiques. L'inflammation représente l'un des exemples les plus marquants. En effet, de nombreux lipides bioactifs endogènes ont été systématiquement impliqués dans l'inflammation chronique qui caractérise des pathologies telles que le cancer du poumon, le diabète, l'athérosclérose, l'asthme, ainsi que les maladies auto-immunes, neurodégénératives et les maladies inflammatoires de l'intestin [81,82].

D'autres lipides ont également été définis comme bioactifs ; par exemple le diacylglycérol, l'acide phosphatidique, les divers phosphoinositides, l'inositol trisphosphate, les céramides, le sphingosine-1-phosphate (S1P), la sphingosine, les dérivés du cholestérol, les éicosanoïdes, les leucotriènes et les endocannabinoïdes.

2. Les sphingolipides

Les sphingolipides représentent l'une des principales classes de lipides des eucaryotes. Historiquement, les premiers sphingolipides ont été isolés du cerveau à la fin du XIXe siècle par Thudicum [82], qui a introduit le nom de « sphingosine » d'après la créature mythique grecque, le Sphinx, en référence aux « nombreuses énigmes qu'elle posait à l'enquêteur ». Les approches biochimiques et chimiques au début du XXe siècle ont permis d'élucider la structure chimique à la base de toutes les sphingolipides : la sphingosine. Cette découverte a été suivie par celle des sphingolipides complexes comme les sphingomyélines, glycosphingolipides et les gangliosides.

2.1. Structure de base

La structure de base des sphingolipides est la sphingosine liée à un acide gras par une liaison amide (Figure III-4). La sphingosine est constituée d'une longue chaîne aliphatique généralement composée de 18 carbones avec un groupe amine (-NH2) sur lequel peuvent se lier d'autres groupes fonctionnels -R et un groupe hydroxyle (-OH). L'acide gras lié à la sphingosine est généralement saturé ou monoinsaturé. Cependant sa longueur et sa saturation peuvent varier parmi les différents types de sphingolipides [63].

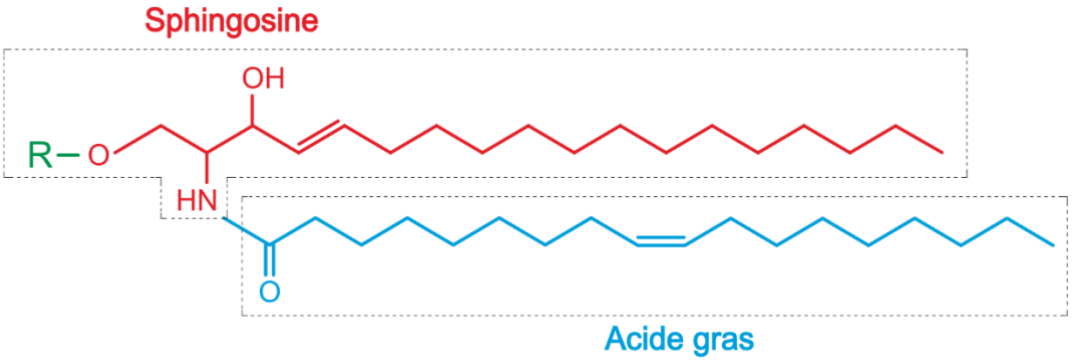


Figure III-4. Représentation schématique de la structure de base d'un sphingolipide.

2.2. Classifications

La classification des sphingolipides repose sur la nature du groupe fonctionnel -R ajouté au N-acyl-sphingosine (Tableau III-2) [83]. Lorsque -R n'est que le groupe hydroxyle de la sphingosine, la molécule est appelée céramide.

Tableau III-2. Classification des sphingolipides.

Classe	Groupe -R
Céramides	Hydroxyle
Phosphosphingolipides	Phosphate
Sphingomyélines	Phosphocholine
Glycosphingolipides	Ose (ex : glucose ou galactose)
Gangliosides	Oses + Acide sialique (acide N-acétylneuraminique)

2.2.1. Céramides

Les céramides servent de structure de base aux sphingolipides et en tant que tels, ils sont des résidents importants de la membrane plasmique des cellules eucaryotes [83]. Il existe plusieurs structures de céramides, influencées par la longueur variable de la chaîne d'acides gras et sa saturation, qui peut varier de C6 à C26, la présence initiale d'un groupe hydroxyle ou d'une double liaison dans la base sphingoïde ou encore la longueur de la base sphingoïde et la présence d'un groupe hydroxyle en position 1 [84]. Ainsi, il a été calculé en 2011 qu'il pourrait exister jusqu'à 360 structures de céramides différentes [85].

Les céramides sont intrinsèquement hydrophobes en raison des chaînes hydrocarbonées qu'elles possèdent et sont donc insolubles dans les solutions aqueuses, y compris le cytosol. Le céramide C18 est le céramide le plus abondant dans le système nerveux. Les chaînes hydrocarbonées confèrent au céramide la capacité de s'empiler en couches hautement concentrées au sein de la membrane plasmique. En conséquence, le céramide augmente la rigidité moléculaire de la membrane plasmique [86]. Ces propriétés dépendent également de la longueur de la chaîne acyle du céramide : les céramides à chaîne courte sont plus symétriques et favorisent une courbure positive dans les monocouches lipidiques, tandis que les céramides à chaîne longue adoptent une forme conique et favorisent une courbure négative de la bicouche lipidique, conduisant à des invaginations de la membrane, ce qui peut favoriser la vésiculation ou la fusion [87].

2.2.2. Sphingomyélines

La sphingomyéline (SM) est le sphingolipide le plus abondant dans la cellule, avec une distribution ubiquitaire dans les tissus mammifères, et des niveaux particulièrement élevés dans le système nerveux central (SNC) [88]. La SM est un élément essentiel de la membrane plasmique et ses niveaux sont cruciaux pour la fonction cellulaire. Le contenu en SM dans une cellule est strictement régulé par les enzymes des voies métaboliques de la SM, dont les activités créent un équilibre entre la synthèse et la dégradation de la SM. La synthèse de novo s'effectue dans l'appareil de Golgi via des sphingomyéline synthases (SMS). L'hydrolyse de la SM par les sphingomyélinases (SMases) augmente la concentration de céramide. En contrôlant les niveaux de SM et de céramide, les SMS et les SMases participent à l'homéostasie cellulaire. Les enzymes du cycle de la SM présentent des propriétés uniques et une distribution tissulaire diverse [89]. Des perturbations dans leurs activités ont été observées dans de nombreuses pathologies du SNC. La sphingomyéline est en effet un élément essentiel de la structure de la myéline, qui est la gaine de protection autour des fibres nerveuses dans le système nerveux central et périphérique. La structure cylindrique de la sphingomyéline contribue à la stabilité et à l'isolation électrique de la myéline, ce qui permet une conduction nerveuse rapide et efficace [90]. En plus de son rôle structurel dans la myéline, la sphingomyéline est également impliquée dans divers processus cellulaires et physiologiques, y compris la régulation de la fluidité membranaire, la signalisation cellulaire et la régulation de la prolifération et de l'apoptose cellulaire.

2.2.3. Glycosphingolipides

Les glycosphingolipides (GSL) sont des lipides composés d'un céramide lié de manière covalente à au moins un groupement glucidique. Chez les plantes, le groupement glucidique est souvent un simple sucre comme le glucose, tandis que chez les mammifères, le glucide peut varier d'un simple sucre à un ensemble complexe, où plusieurs glucides ou d'autres groupes peuvent être attachés. Les GSL englobent un groupe beaucoup plus vaste et diversifié de structures et sont généralement classés en fonction de leur charge en GSL neutres et acides [91,92].

1.1.1.1. Glycosphingolipides Neutres

Les GSL neutres se composent de trois lipides majeurs : la glucosylcéramide (GlcCer), la galactosylcéramide (GalCer) et la lactosylcéramide (LacCer), qui servent principalement de

précurseurs biosynthétiques simples pour des dérivés plus complexes. La GlcCer et la GalCer, également connues sous le nom de cérébrosides, sont parmi les structures de GSL les plus simples et se composent d'un groupement tête monosaccharidique attaché à la position 1-OH de le céramide. L'ajout de galactose à la GlcCer par une liaison glycosidique β-1,4 produit la LacCer qui est à la base de presque tous les GSL complexes.

1.1.1.2. Glycosphingolipides Acides

Il existe quatre principales catégories de GSL acides :

- Les gangliosides, qui possèdent un ou plusieurs groupes d'acide sialique
- Les glucuronoglycosphingolipides, qui possèdent un groupement d'acide glucuronique
- Les sulfatoglycophingolipides, qui possèdent un groupe sulfate
- Les phosphoglycosphingolipides, qui possèdent un groupe phosphate

Les gangliosides forment un groupe complexe de lipides qui peuplent principalement la face externe de la membrane plasmique des cellules neuronales. Leur squelette hydrophobe de céramide s'ancrant dans la membrane plasmique, tandis que le groupement oligosaccharidique fait saillie dans le cytosol pour les interactions moléculaires avec l'environnement extracellulaire, jouant un rôle crucial dans la signalisation [93]. La variabilité du groupement tête à base de glucides donne naissance à plus de 200 structures de gangliosides. De plus, le squelette de céramide d'un ganglioside donné peut varier en fonction de la longueur de la chaîne acyle et du degré de saturation, ajoutant ainsi à la diversité structurelle des gangliosides [92]. Les structures des gangliosides diffèrent de manière progressive, de sorte que chaque nouveau ganglioside résulte d'une étape supplémentaire de glycosylation. Les principales structures des gangliosides cérébraux sont hautement conservées chez tous les mammifères et les oiseaux. Il y a cependant des différences bien connues dans les glycolipides, notamment celles des cellules sanguines comme c'est le cas des antigènes du groupe sanguin ABO.

2.3. Métabolisme

2.3.1. Céramide

Les céramides peuvent être générés par une synthèse de novo à partir de palmitoyl-CoA et de L-sérine grâce à des réactions séquentielles catalysées par la sérine palmitoyltransférase

(SPT), la céramide synthase (CerS) et les dihydrocéramide désaturases dans la feuille cytosolique du réticulum endoplasmique (RE) [94]. Une fois transférés à l'appareil de Golgi, au lysosome et à la membrane plasmique depuis le RE, les céramides peuvent être convertis en sphingomyélines par la sphingomyéline synthase (Figure III-5). Ces sphingomyélines augmentent progressivement en concentration pour composer la majeure partie des sphingolipides de la membrane plasmique.

Les céramides peuvent aussi être régénérés par des voies de recyclage, via l'hydrolyse des sphingomyélines par différentes sphingomyélinases (SMases) [95]. Bien que les céramides eux-mêmes puissent agir comme des signaux de signalisation bioactifs dans diverses réponses physiologiques, ils peuvent être dégradés en sphingosine, puis transformés en sphingosine-1-phosphate (S1P) par l'action de la céramidase et des sphingosine kinases (SphK), ou phosphorylés par la céramide kinase (CERK) pour générer la céramide-1-phosphate (C1P). Dans une boucle de rétroaction négative, la C1P peut inhiber l'activité de la SMase, bloquant ainsi l'accumulation excessive de céramides [96]. Inversement, les céramides peuvent être récupérés à partir de C1P par la C1P phosphatase, et la sphingosine à partir de S1P par la S1P phosphatase. De manière indépendante de la SMase, la sphingomyéline peut être dégradée en sphingosylphosphorylcholine (SPC), qui peut ensuite être transformée en S1P par les actions de la sphingomyéline désacylase et de l'autotaxine (ATX).

Un aspect intéressant de ces processus est que la modulation du métabolisme des sphingolipides n'est pas exclusivement effectuée par les cellules de l'organisme [97]. Plusieurs études ont révélé que les microbiotes commensaux ou pathogènes, en particulier les Bacteroides commensaux, fournissent ou détournent les sphingolipides en tant que blocs de construction ce qui affecte le contenu en sphingolipides de l'hôte et les réponses immunitaires.

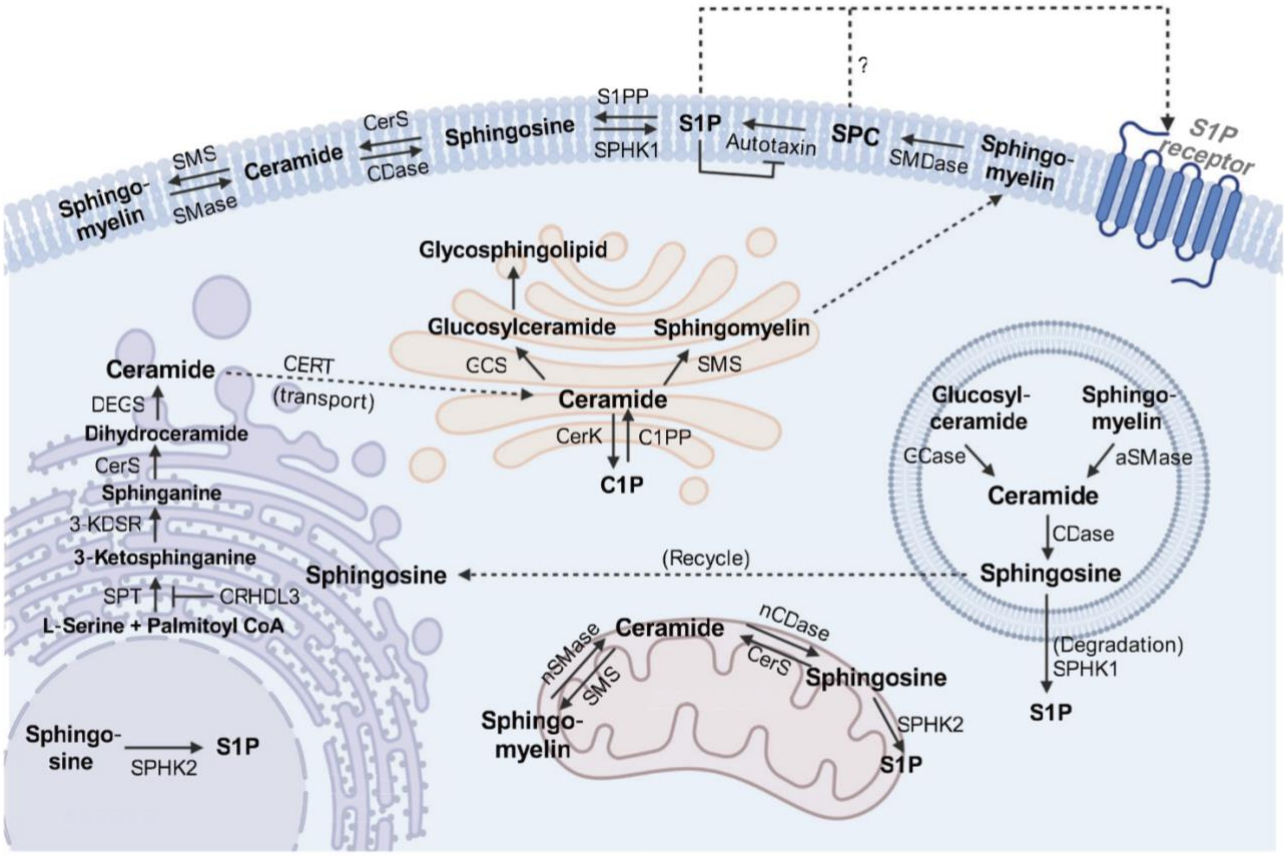


Figure III-5. Synthèse et dégradation des sphingolipides dans les différentes régions cellulaires.

Les sphingolipides, en tant que composants des membranes cellulaires et subcellulaires, peuvent être synthétisés par une série d'enzymes (via la voie de novo) et peuvent également être dégradés à partir de la sphingomyéline et du céramide pour former des sphingolipides plus petits (via la voie de récupération), agissant ainsi en tant que molécules de signalisation en fonction du contexte environnemental [98].

2.3.2. Glycosphingolipides

Les glycosphingolipides sont synthétisés de manière séquentielle dans l'appareil de Golgi. Cette biosynthèse est souvent qualifiée de "processus combinatoire", car elle crée une grande diversité de molécules à partir de réactions relativement simples [99]. Les sucres sont ajoutés un par un sur le céramide par des glycosyltransférase à partir de nucléotide-ose comme l'UDP-Glucose, l'UDP-Galactose, le CMP-acide sialique à une position spécifique sur le céramide ou à l'extrémité non réductrice de la chaîne de glucides en croissance. Au départ, il existe un nombre limité de glycosyltransférases qui ajoutent initialement du glucose ou du galactose à le céramide.

La dégradation des glycosphingolipides est réalisée dans l'environnement acide des lysosomes où des glycosidases solubles dans la lumière lysosomale décrochent un à un les sucres de la chaine glucidique. Les glycosphingolipides à chaîne glucidique courte (quatre sucres ou moins) sont moins accessibles à leurs enzymes hydrolases en raison de leur

structure membranaire. Ils nécessitent l'aide de protéines de liaison lipidique lysosomale (LLBP) telles que le GM2 activator protein (GM2AP) et les saposines (A à D) pour être solubilisés et présentés aux hydrolases lysosomales correspondantes. Ces protéines auxiliaires se lient, solubilisent et présentent les glycosphingolipides pour leur dégradation [100].

2.4. Fonctions

La multitude de fonctions désormais attribuées aux sphingolipides est immense et touche presque tous les aspects majeurs de la biologie cellulaire que ce soit en tant que lipides structurels ou lipides bioactifs [83].

2.4.1. Structures membranaires

Les microdomaines, également appelés radeaux lipidiques, ont fait l'objet de débats intenses en raison de leur composition hétérogène. Ces microdomaines se trouvent dans la membrane plasmique externe et certaines membranes intracellulaires (RE et mitochondries). Ils sont décrits comme des domaines dynamiques, de petite taille (10 à 200 nm), riches en cholestérol, sphingolipides et protéines, et ils compartimentent les processus cellulaires se déroulant au niveau membranaire [101]. On distingue deux types de radeaux, les cavéoles (riches en céramides) et les radeaux lipidiques plans (non-cavéolaires). La phase liquide ordonnée caractéristique des radeaux lipidiques est le résultat des chaînes acyles saturées des sphingolipides, qui s'associent facilement au cholestérol, créant un domaine plus visqueux que la phase moins dense (liquide-désordonnée) observée dans la majorité de la membrane plasmique [102]. La structure des différentes espèces de sphingolipides affecte la fluidité, la structure et la perméabilité des membranes où elles résident.

Le cholestérol et les sphingolipides, en particulier les sphingomyélines (SM) et les glycosphingolipides (GSL), sont présents en grande quantité dans les radeaux membranaires du système nerveux (Figure III-6) [103]. Les récepteurs et les canaux ioniques présents dans les microdomaines sont régulés par la composition de ces derniers, par des interactions directes (protéine-lipide) et indirects (modifications de la membrane physique). Les protéines présentes dans les microdomaines sont généralement acylées, palmitoylées ou

myristoylées, en raison de la préférence pour les chaines hydrocarbonées non ramifiées et saturées dans ces domaines étroitement emballés [104].

Les sphingolipides sont également impliquées dans la signalisation inter-cellulaire ou cellule pathogène. Les glycosphingolipides (GSL) sont fortement exprimés dans les domaines membranaires et facilitent diverses fonctions. Par exemple, le LacCer constitue plus de 70 % des GSL présents dans les neutrophiles humains et forme des microdomaines qui facilitent la liaison à différentes espèces de levures et de bactéries pathogènes, et leur phagocytose.

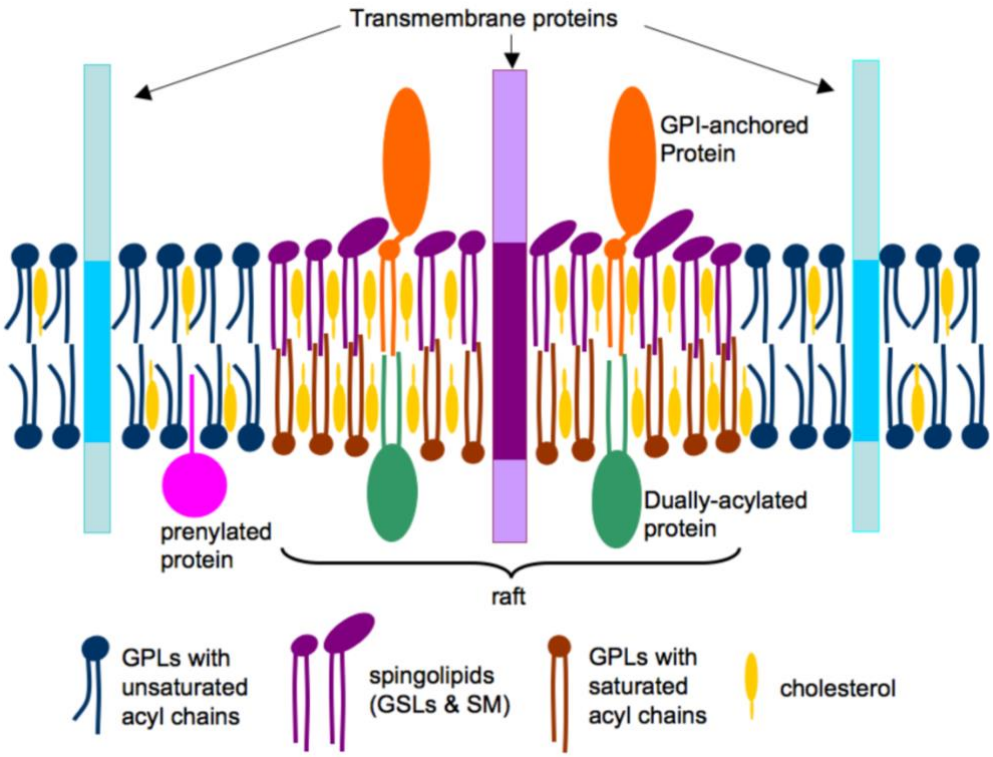


Figure III-6. Modèle simplifié des radeaux lipidiques dans les membranes cellulaires.

Les phospholipides (bleu et brun) et le cholestérol (jaune) sont distribués dans les deux feuillets, tandis que les sphingolipides (violet) sont enrichis dans le feuillet externe de la bicouche lipidique. Les chaînes acyles des lipides d'un microdomaine sont généralement longues et saturées (violet et jaune), tandis qu'elles sont plus courtes et insaturées en dehors (bleu) [105].

2.4.2. Fonctions immunitaires et inflammatoires

Les sphingolipides jouent un rôle crucial en tant que messagers secondaires dans les espaces intra- et extracellulaires. Parmi les sphingolipides, les céramides et le S1P sont les plus étudiés en ce qui concerne les fonctions des cellules immunitaires (Figure III-7).

La S1P est couramment impliquée dans des rôles inflammatoires notamment par l'induction de voies de signalisations pro-inflammatoires. Ainsi, dans un modèle de souris déficientes

en S1P lyase induisant une accumulation de S1P, il a été observé des réponses pro-inflammatoires élevées, notamment les cytokines IL-23, IL-17 et G-CSF, ainsi qu'une augmentation du nombre de neutrophiles et de monocytes sanguins [106]. Dans une autre expérience, il a été retrouvé que la S1P et la C1P pouvaient induire une production accrue de prostaglandine E2. La S1P peut stimuler l'expression de la cyclooxygénase 2, tandis que la C1P peut conduire à une augmentation des taux d'acide arachidonique (AA), libéré des phospholipides membranaires par une activité accrue de la phospholipase A2 (PLA2) [107]. L'AA est le précurseur des eicosanoïdes (prostaglandines et leucotriènes) qui interviennent dans les processus d'inflammation et de cancérogenèse [108].

La S1P a également un rôle chimiotactique. En effet, des récepteurs de S1P (S1PR1) exprimés sur les lymphocytes réagissent à la présence de S1P et à la différence de concentration entre les tissus lymphoïdes et la circulation sanguine, ce qui entraine leur migration. La sortie des lymphocytes T est donc contrôlée en partie par un gradient de S1P entre la lymphe et le plasma [109]. En fait, S1PR1 est exprimée de manière ubiquitaire par les acteurs de l'immunité innée. La migration des macrophages par exemple, qui suit le gradient S1P est dépendante de l'expression de la S1PR1 [110]. Ainsi, les composés qui ciblent les récepteurs de S1P sont d'un grand intérêt pour le traitement des maladies auto-immunes. C'est le cas du fingolimod et de sa forme phosphorylée qui sont utilisés en clinique depuis 2010 pour cibler les récepteurs S1PR1,3-5, pour le traitement de maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques en piégeant les lymphocytes dans les ganglions lymphatiques et en atténuant ainsi la migration des lymphocytes inflammatoires vers les sites atteints [111].

En revanche, paradoxalement, il a aussi été montré que la S1P pouvait avoir un effet anti-inflammatoire dans certains contextes, en réduisant la production de leucotriènes [112].

L'accumulation du céramide intracellulaire a été démontrée comme induisant un stress oxydatif inflammatoire dans la mucoviscidose et l'emphysème [113]. L'accumulation de céramide a également été reliée à la neuro-inflammation [114] et induire la mort cellulaire apoptotique.

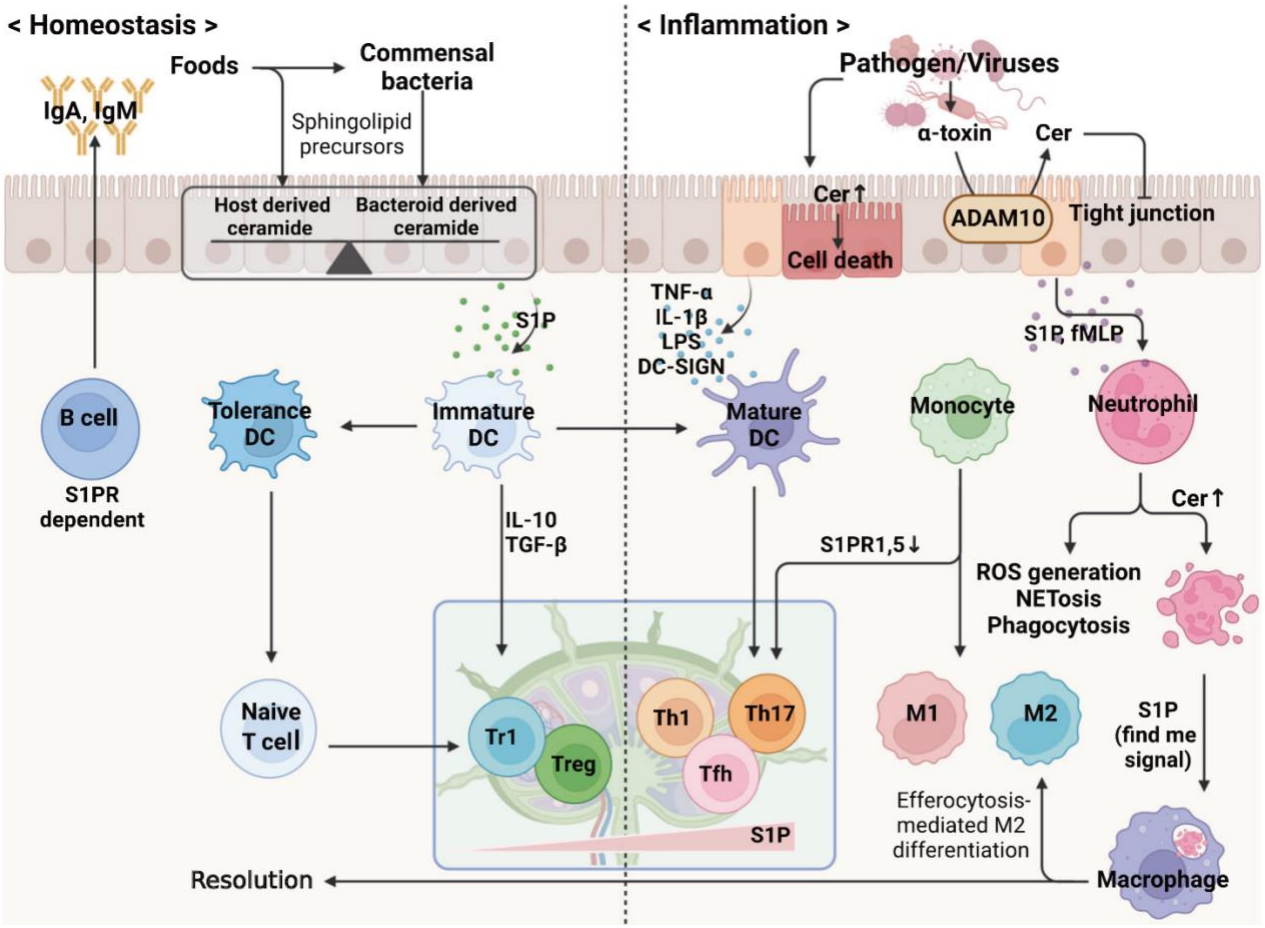


Figure III-7. L'homéostasie et les fonctions immunologiques des sphingolipides.

Les sphingolipides peuvent provenir du métabolisme de l'hôte et des métabolites alimentaires, et leur modulation peut résulter des interactions avec des bactéries commensales, contribuant ainsi au maintien de la tolérance immunitaire. L'infection par des bactéries pathogènes peut bloquer et s'emparer du métabolisme des sphingolipides de l'hôte, activant ainsi des cascades immunitaires. Les pathogènes peuvent stimuler la mort des cellules épithéliales et augmenter la concentration de céramides, favorisant ainsi la rupture de la barrière protectrice. Les cellules immunitaires innées, telles que les neutrophiles et les macrophages, détectent les signaux inflammatoires et migrent vers les sites enflammés. L'augmentation des sphingolipides intracellulaires et extracellulaires guide l'orientation de la réponse immunitaire, tandis que les pathogènes peuvent atténuer la réponse immunitaire de l'hôte. Parallèlement, les cellules présentatrices d'antigènes activent le système immunitaire adaptatif. La sphingosine-1-phosphate (S1P), en tant que signal "viens me chercher" émanant des cellules apoptotiques, favorise la résolution grâce à un processus d'efférocytose [98].

2.4.3. Prolifération cellulaire et cancérogenèse

Des compositions biaisées de sphingolipides qu'elles proviennent de l'alimentation, de l'hôte ou des microbiotes peuvent décider de la mort, prolifération, sénescence, la différenciation ou même la migration cellulaire. L'une des molécules clés impliquées dans ce processus est le céramide, qui a été identifié comme un médiateur de la mort cellulaire, en particulier de l'apoptose et de la sénescence cellulaire [115]. Cependant, la famille des

céramides est vaste et différentes espèces de céramides peuvent avoir des rôles opposés dans cette régulation cellulaire.

Un autre acteur clé dans la régulation cellulaire est la sphingosine-1-phosphate (S1P), qui agit en opposition au céramide pour déterminer le destin cellulaire. La S1P a été impliquée dans de nombreuses fonctions, notamment la prolifération cellulaire, l'induction de la mitose et la prévention de l'apoptose. Elle agit en tant qu'antagoniste de l'apoptose induite par le céramide en activant certaines voies de signalisation, notamment l'ERK, et en supprimant l'activation des JNK induite par le céramide [116]. Le tableau est cependant plus nuancé, la S1P semble en effet avoir des effets contraires en fonction des sphingosine kinases (SphK) impliquées. Par exemple, SphK1 est associée à des effets anti-apoptotiques et mitogéniques, tandis que SphK2 a été associée à un effet pro-apoptotique [117].

Le céramide-1-phosphate (C1P) joue également un rôle important en stimulant la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire, notamment des macrophages, via l'activation de mTORC1 (Mechanistic target of rapamycine 1) et des voies ERK, JNK, et PI3-K/PKB, ainsi que la phosphorylation de NF-κB et GSK-3β [118].

Les gangliosides, qui sont présents dans les membranes cellulaires, jouent également un rôle dans la régulation de la différenciation et de la prolifération cellulaire. Par exemple, le GM3 agit comme un modulateur physique des récepteurs de facteurs de croissance épidermiques (EGFR), inhibant leur autophosphorylation et entraînant ainsi l'inhibition de la prolifération cellulaire et de la croissance [119].

Les sphingolipides ont donc un rôle significatif dans la cancérogenèse. Les cellules tumorales peuvent moduler l'activité de la céramidase, de la SphK et de l'ATX pour favoriser leur survie et leur maintien, tout en bloquant le système immunitaire. Ainsi, la S1P favorise la survie des cellules tumorales, l'inflammation, l'angiogenèse et la résistance à la chimiothérapie.

2.4.4. Développement du système nerveux central

Le développement du système nerveux central (SNC) est un processus complexe qui dépend en partie d'un environnement riche en lipides, notamment les sphingolipides, qui jouent des rôles critiques dans la mise en place et le maintien du SNC. La répartition spécifique des sphingolipides dans le SNC varie non seulement en fonction des différents

types cellulaires, mais également en fonction des régions du SNC. Par exemple, la myéline et les oligodendrocytes sont fortement enrichis en sphingomyéline (SM) et en glycosphingolipides (GSL) tels que la galactocérébroside (GalCer) et le sulfatide, tandis que les neurones et la matière grise contiennent des quantités élevées de gangliosides [120].

Au cours du développement du SNC humain, le profil des sphingolipides subit de profonds changements, ce qui suggère leur rôle majeur dans la différenciation cellulaire [120]. Par exemple, au cours des deux premières années de développement postnatal, il y a un changement marqué dans le type de SM présent dans la myéline, avec une augmentation notable des SM à AG chaîne longue (C24:0 et C24:1), compensée par une diminution des SM à AG à chaîne moyenne (C18). Au contraire, dans le cortex cérébral, le ratio de SM reste relativement stable au cours des deux premières années de vie.

De même, les gangliosides qui représentent 10 à 12% de la teneur lipidique membranaire dans la matière grise subissent des changements importants au cours du développement. Ces changements sont soupçonnés de diriger la maturation du cerveau et coïncident généralement avec des étapes neurodéveloppementales telles que la différenciation neuronale, la croissance dendritique et la synaptogenèse, toutes corrélées à une augmentation de GD1a et GM1 [121].

Une étude récente a identifié les moments clés de la participation de plusieurs sphingolipides à la myélinisation au cours du développement du SNC chez les rats [122]. Les niveaux de céramide et de dihydrocéramide étaient les plus élevés au stade embryonnaire, tandis que le glucocérébroside (GlcCer) était le plus élevé au stade postnatal précoce, et le galactocérébroside (GalCer) n'apparaissait qu'à partir du 10e jour postnatal. Une tendance similaire a été observée avec la sphingosine et la sphinganine, avec un pic initial au 10e jour, suivi de niveaux plus bas au 21e jour.

2.4.5. Autres

Les sphingolipides ont également été impliquées dans d'autres circonstances, notamment dans la réponse aux dommages de l'ADN ; le syndrome métabolique où les céramides ont été associés à l'insulinorésistance, l'obésité et la stéatose hépatique ; la peau qui contient des sphingolipides spécifiques, notamment des céramides à chaînes ultra-longues, qui sont essentiels à la formation d'une barrière physique.

2.5. Implications dans les pathologies

De nombreuses études ont montré que les sphingolipides perturbés et leurs enzymes connexes sont étroitement liés à des maladies héréditaires du système nerveux, ainsi qu'à des maladies graves telles que les tumeurs et les maladies auto-immunes (Figure III-8) [98].

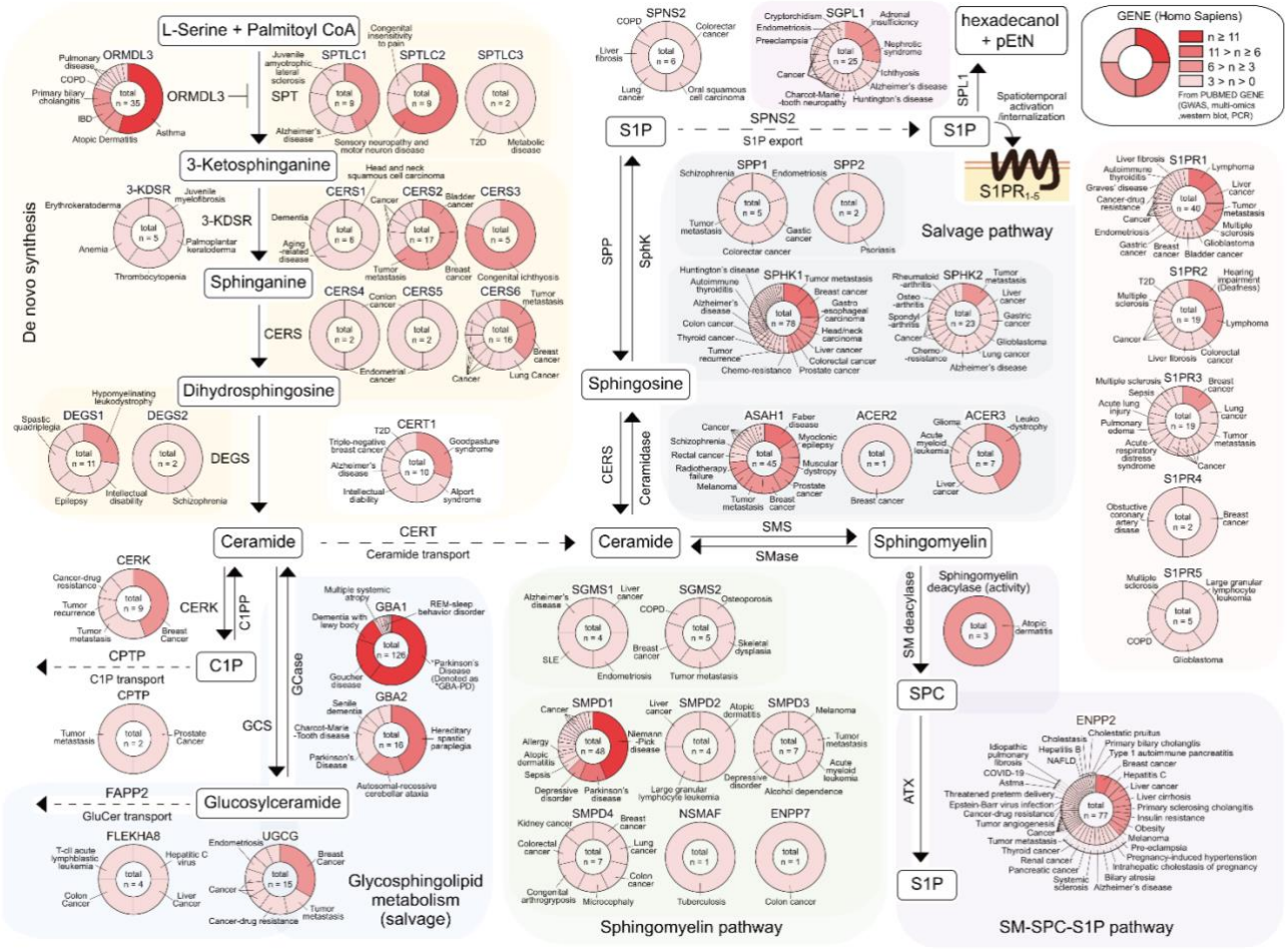


Figure III-8. Les enzymes liées aux sphingolipides et leur relation avec les maladies humaines.

Données recueillies à partir de la base de données PubMed Gene [123]. Le nombre d'études (gradient de rouge) associant un gène du métabolisme des sphingolipides avec une condition pathologique est représenté ici [98].

3. Les Sphingolipidoses

3.1. Epidémiologie

Les sphingolipidoses sont des maladies rares dont les incidences oscillent entre 1/40 000 et moins de 1/1000 000. Cependant, dans certaines populations l'incidence peut être beaucoup

plus importante. C'est le cas par exemple de la maladie de Gaucher qui a un taux d'incidence estimé à 1/850 dans la population juive ashkénaze. L'incidence cumulée de toutes ces maladies pourrait être estimée entre 1/10000 et 1/20000, mais il est à noter que des variations importantes sont possibles et population dépendante [124].

L'augmentation des pratiques de dépistage néonatal incluant ses maladies permettra à terme une évaluation épidémiologique plus précise. De la même manière, des formes frustes paucisymptomatiques sont de plus en plus décelées dans la population adulte.

Les sphingolipidoses sont considérées classiquement comme des maladies monogéniques. Cependant, un même variant pathogène peut aboutir à des phénotypes cliniques radicalement différents. Par ailleurs, de plus en plus de descriptions cliniques pointent du doigt que des altérations minimes de leur métabolisme peuvent avoir des impacts importants pour le développement de maladies chroniques complexes comme la maladie de Parkinson.

3.2. Présentations cliniques

Les altérations du métabolisme des sphingolipides sont héréditaires et peuvent affecter de nombreuses cellules, notamment les macrophages, les cellules neuronales, les cellules endothéliales et les cardiomyocytes. En conséquence, ces troubles présentent une grande variété de symptômes. Les relations génotype-phénotype sont souvent partielles, et l'âge d'apparition des symptômes peut varier en fonction du degré de pathogénicité du variant. Des facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux peuvent influencer fortement la présentation clinique de ces troubles, ce qui rend la prédiction des symptômes difficile, en particulier pour les formes tardives [124].

3.3. Bases biochimiques

Les sphingolipides sont dégradés dans l'environnement acide des lysosomes. Cette voie de dégradation implique une série d'enzymes spécifiques ainsi que des protéines activatrices comme les saposines [125].

Les principales enzymes et protéines impliquées dans cette voie de dégradation des sphingolipides sont :

- *Galactosidases* : ces enzymes sont responsables de la dégradation des glycosphingolipides en éliminant les groupes galactose des lipides. Un exemple important est la galactosidase bêta, qui joue un rôle crucial dans la dégradation du GM1 ganglioside.
- *Hexosaminidases* : ces enzymes agissent sur les glycosphingolipides en catalysant la dégradation des résidus de N-acétylhexosamine. Elles sont essentielles pour la dégradation du GM2 ganglioside, dont l'accumulation est associée à la maladie de Tay-Sachs.
- *Neuraminidase* (sialidase) : cette enzyme est impliquée dans la dégradation des gangliosides en hydrolysant les résidus d'acide sialique. Les déficiences de cette enzyme peuvent entraîner l'accumulation de gangliosides et conduire à des troubles neurologiques.
- *Glucosidases* : ces enzymes participent à la dégradation des glucosylcéramides, qui sont des composants importants des sphingolipides. Les mutations dans ces enzymes peuvent conduire à des maladies telles que la maladie de Gaucher.
- *Sphingomyélinase* (phosphodiestérase) : cette enzyme est responsable de la dégradation de la sphingomyéline en produisant du céramide. Les défauts dans cette enzyme sont associés à la maladie de Niemann-Pick A/B.
- *Sulfatase* : les sulfatases sont nécessaires pour la dégradation des sulfatides, qui sont des sphingolipides contenant des groupes sulfate. Les déficiences de ces enzymes sont associées à des maladies telles que la leucodystrophie métachromatique.
- *Ceramidase* : cette enzyme catalyse la dégradation du céramide en sphingosine et en acides gras libres. Les sphingosines résultantes peuvent être réutilisées pour la synthèse de nouveaux sphingolipides.
- *Saposines* : les saposines sont des protéines activatrices qui se lient aux hydrolases lysosomales et facilitent la dégradation des sphingolipides. Leur déficience peut entraîner des troubles de stockage des sphingolipides.

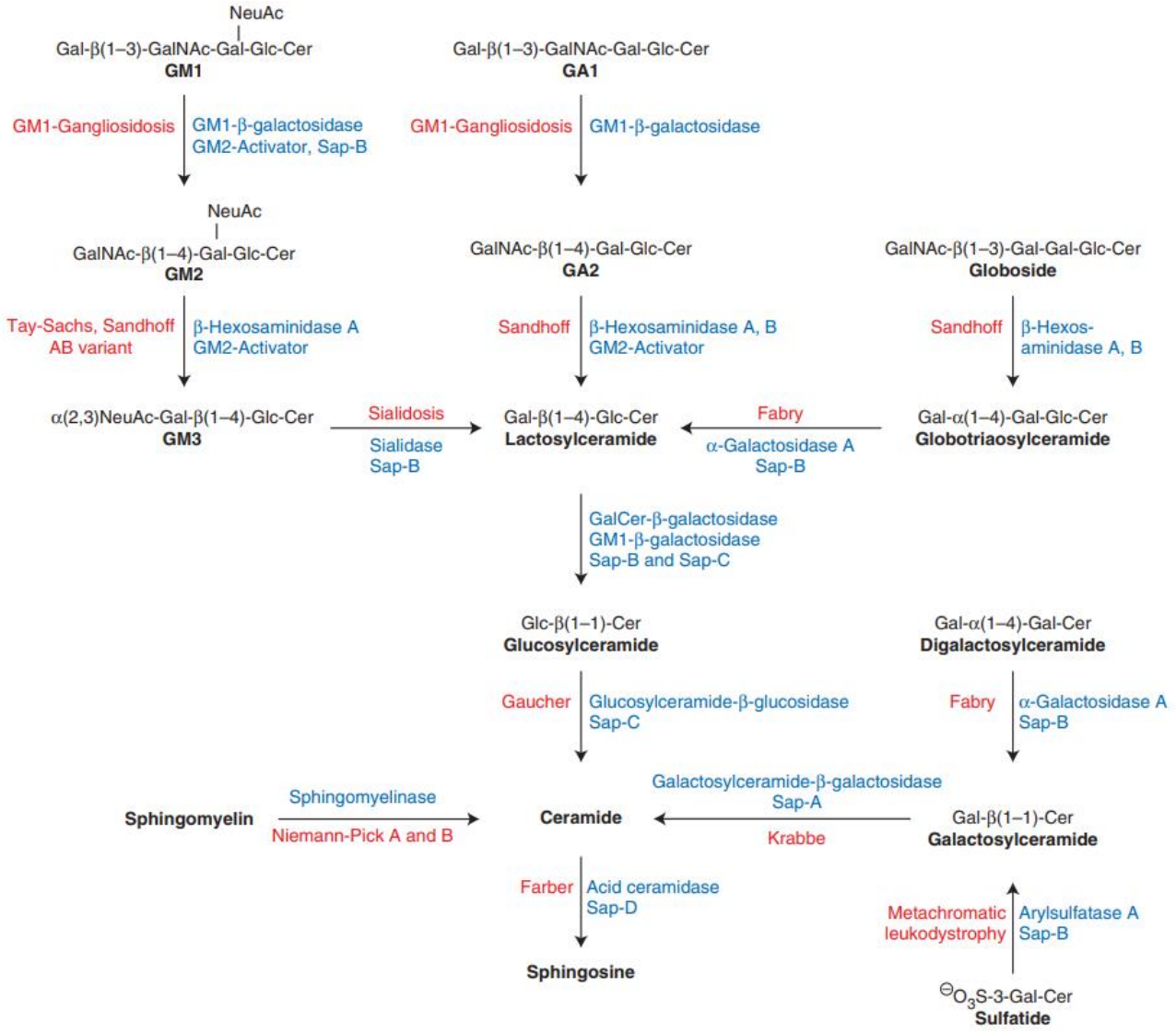


Figure III-9. Voies métaboliques de dégradations lysosomales des sphingolipides et maladies associées.

En bleu : les enzymes impliquées ; en rouge : les maladies associées [125].

3.4. Bases génétiques

La plupart de ces maladies sont de transmission autosomique récessive, à l'exception de la maladie de Fabry qui est liée au chromosome X.

Tableau III-3. Aspects génétiques et cliniques des sphingolipidoses

(selon [126]).

Disease	Transmission	Gène	OMIM	Protéine déficitaire, UNIPROT	Description
GM1-gangliosidosis	AR	*GLB1*	230500 230600 230650	β-Galactosidase 1, P16278	Atteintes prédominantes au système nerveux, divers degrés de neurodégénérescence et anomalies squelettiques.
GM2-gangliosidoses, Tay–Sachs disease	AR	*HEXA*	272800	β-Hexosaminidase A, α-subunit P06865	Atteintes prédominantes au système nerveux, divers degrés de neurodégénérescence.
GM2-gangliosidoses, Sandhoff disease	AR	*HEXB*	268800	β-Hexosaminidase A, β-subunit P07686	
AB variant of GM2-gangliosidosis	AR	*GM2A*	272750	GM2A, P17900	
Fabry disease	X	*GLA*	301500	α-Galactosidase A, P06280	Maladie multisystémique ; insuffisance rénale progressive ; lésions cutanées, cardiovasculaires et du système nerveux.
Gaucher disease	AR	*GBA1*	230800 230900 231000 231005 608013	β-Glucocerebrosidase 1, P04062	Maladie multisystémique, dommages prédominants aux cellules d'origine mononucléaire phagocytaire (cellules de Gaucher) ; degré variable d'atteintes du système nerveux ; risque élevé de développer la maladie de Parkinson.
SapC deficiency, atypical Gaucher disease	AR	*PSAP*	610539	Saposin C, P07602	
Metachromatic leukodystrophy	AR	*ARSA*	250100	Arylsulfatase A, P15289	Atteintes de la substance blanche ou de la gaine de myéline du système nerveux.
SapB deficiency, atypical metachromatic leukodystrophy	AR	*PSAP*	249900	Saposin B, P07602	

Krabbe disease	AR	*GALC*	245200	Galactocerebrosidase, P54803	Atteintes de la substance blanche ou de la gaine de myéline du système nerveux.
SapA deficiency, atypical Krabbe disease	AR	*PSAP*	611722	Saposin A, P07602	
Type A and B Niemann–Pick disease	AR	*SMPD1*	257200 607616	Sphingomyelinase, Q9NY59	Atteintes du système nerveux, moelle osseuse, rate et, dans certains cas, aux poumons.
Farber disease	AR	*ASAH1*	228000	Acid ceramidase, Q13510	Maladie multisystémique avec déformation progressive des articulations et dysfonctionnements de multiples systèmes organiques, y compris le système nerveux.
Combined saposin deficiency	AR	*PSAP*	611721	Saposins A, B, C, and D, P07602	Trouble fatal affectant le système nerveux.

AR : Autosomique Récessif

4. Maladie de Fabry

4.1. Définition

La maladie de Fabry a été décrite pour la première fois en 1898 par deux dermatologues, William Anderson et Johannes Fabry. Soixante-cinq ans plus tard, Sweeley et Klionsky ont découvert que les patients atteints de la maladie de Fabry accumulent la globotriaosylcéramide (Gb3). Roscoe Brady a ensuite montré que l'enzyme lysosomale, l'α-galactosidase A (α-Gal A), était déficiente chez ces patients.

L'accumulation de Gb3 dans les cellules, en particulier dans les parois des vaisseaux sanguins, les reins et les nerfs, participerait à une variété de symptômes comme les douleurs neuropathiques, les acroparesthésies, l'insuffisance rénale progressive et les anomalies cardiaques [127].

4.2. Epidémiologie

La maladie de Fabry est l'une des maladies lysosomales les plus fréquentes. La prévalence de la maladie de Fabry dans les populations de sexe masculin de race blanche oscille d'environ 1 cas sur 17 000 à 1 cas sur 117 000 en fonction de la population étudiée. Cependant cette prévalence est très vraisemblablement sous-estimée du fait d'un important sous-diagnostic de cette maladie. En effet, les récents efforts de dépistage néonatal révèlent des incidences beaucoup plus élevées. Ainsi, en Italie, une incidence de 1 cas sur 3 100 a été constatée, alors qu'à Taïwan, une incidence aussi élevée que 1 cas sur 1 250 a été documentée. Des études aux États-Unis font état d'incidences de 1 cas sur 5 495 et 1 cas sur 8 454 dans l'État de Washington et en Illinois, respectivement [127].

4.3. Présentations cliniques

La maladie de Fabry est caractérisée par divers symptômes cliniques tels que des douleurs neuropathiques, des acroparesthésies, une insuffisance rénale progressive, des problèmes cardiaques. Ces symptômes peuvent varier en gravité d'un patient à l'autre et apparaître à différents stades de la vie. La maladie peut être divisée en deux principaux phénotypes : la forme classique, plus sévère, et la forme non classique, généralement plus bénigne. Il est essentiel de distinguer ces deux formes, ainsi que de prendre en compte les différences entre les hommes et les femmes, car chaque sous-groupe présente une évolution de la maladie distincte [128-130].

4.3.1. Forme classique

La forme classique de la maladie se manifeste généralement chez les hommes et sans activité résiduelle de l'enzyme α-Gal A. Les symptômes comprennent des douleurs neuropathiques aux mains et aux pieds, des angiokératomes cutanés, des problèmes cardiaques à type de cardiomyopathie hypertrophique associée à des troubles du rythme cardiaque, une atteinte rénale progressive, des lésions de la substance blanche du cerveau, des pertes auditives et d'autres symptômes. Les hommes atteints de la forme classique ont une espérance de vie réduite d'environ 20 ans et une altération franche de la qualité de vie [131]. Les manifestations peuvent débuter dès l'enfance par des douleurs neuropathiques, des crises

de douleur, des problèmes de transpiration, et des opacités oculaires comme la cornée verticillata. À l'adolescence, des angiokératomes apparaissent, ainsi que des signes d'atteinte rénale tels que la protéinurie [132]. À l'âge adulte, les risques de maladie rénale en phase terminale, de troubles cardiaques et d'accidents cérébrovasculaires augmentent. La douleur neuropathique persiste chez de nombreux adultes, et certains présentent aussi des symptômes neuropsychiatriques.

4.3.2. Forme non classique

La forme non classique, en revanche, est généralement moins grave et peut être présente chez les hommes qui ont gardé une activité résiduelle en α-Gal A [128]. Les symptômes sont plus variables et peuvent se limiter à un seul organe. Les patients atteints de cette forme peuvent également présenter des douleurs neuropathiques, des problèmes cardiaques et une atteinte rénale, bien que moins sévère que dans la forme classique. Les femmes atteintes de la forme classique de la maladie de Fabry sont également touchées, bien que généralement moins gravement que les hommes, en raison du biais d'inactivation de l'X. Ainsi, la forme classique féminine est proche de la forme non classique masculine.

4.4. Bases biochimiques

Bien que l'altération moléculaire et les conséquences cliniques de la maladie de Fabry soient connues, les mécanismes qui entraînent une dysfonction cellulaire demeurent moins bien définis. L'accumulation de Gb3 est associée à l'altération de nombreux composants cellulaires, notamment la membrane plasmique et les canaux ioniques, le lysosome, la mitochondrie, l'appareil de Golgi ainsi que le réticulum endoplasmique (Figure III-10) [127]. L'accumulation de Gb3 a été observée dans la membrane plasmique des cellules déficientes en α-Gal A. Cela peut potentiellement altérer les activités de diverses protéines et canaux membranaires impactant probablement la fonction cellulaire de manière dépendante du tissu. Par exemple, l'accumulation de Gb3 est corrélée à des niveaux accrus du récepteur TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloide 1) et à des courants neuroniques modifiés, ce qui contribue au développement de la sensibilité à la douleur [133]. De plus, une activité altérée des canaux TRPA1 (Transient Receptor Potential Channel Ankyrin 1) a été signalée dans les neurones sensoriels de Fabry [134].

Comme dans de nombreuses autres maladies lysosomales, on observe également un dysfonctionnement de l'autophagie et de la mitochondrie. Cela soulève la possibilité que l'accumulation de Gb3 affecte la fonction mitochondriale, soit directement par accumulation dans la membrane mitochondriale, soit indirectement en empêchant la mitophagie [135]. Des défauts de repliements protidiques ont aussi été impliqués dans la maladie de Fabry ce qui suggère un dysfonctionnement du réticulum endoplasmique [136]. De plus, l'accumulation de Gb3 et les dommages aux organites peuvent entraîner un stress oxydatif [137]. L'accumulation de Gb3 est également corrélée à une augmentation de la libération des cytokines inflammatoires IL-1β, IL-6 et TNF-α dans le plasma des patients avec une accumulation particulièrement prononcée de TNF-α chez les patients souffrant de crises de douleur. Ensemble, la charge oxydante accrue et l'état pro-inflammatoire associé à l'accumulation de substrat contribuent probablement au développement des symptômes par plusieurs mécanismes. Les cytokines pro-inflammatoires ont été impliquées dans la maladie de Fabry comme facteurs prédisposant à la thrombose, stimulant la libération de marqueurs pro-thrombotiques solubles, tels que le facteur von Willebrand [138], et régulant à la hausse l'expression de molécules d'adhésion endothéliales. L'accumulation de Gb3 favorise également les voies de la mort cellulaire. Dans les types de cellules à capacités de régénération limitées (par exemple, les neurones, podocytes), la stimulation des voies apoptotiques par le Gb3 peut contribuer aux douleurs. Il a également été noté que les cellules souches mésenchymateuses présentent en particulier des taux d'apoptose et de sénescence accrus, l'accumulation de Gb3 dans la moelle osseuse pourrait donc également altérer l'hématopoïèse normale [139].

Le lyso-Gb3, formé via la désacylation du Gb3 par la céramidase acide lysosomale, semble également jouer un rôle important dans la pathologie de la maladie. Par exemple, son accumulation active la voie de signalisation Notch1 dans des podocytes cultivés, conduisant à des lésions des podocytes in vivo et à une fibrose rénale [140]. Les voies de signalisation de Notch1 interviennent aussi dans divers mécanismes du métabolisme énergétique, notamment la glycolyse, le cycle de Krebs, la phosphorylation oxydative et le métabolisme de la glutamine. D'autre part, l'accumulation de lyso-Gb3 provoque la prolifération des cellules musculaires lisses ; ce facteur contribue probablement à l'augmentation de l'épaisseur intima-média observée chez les patients atteints de Fabry. Le lyso-Gb3 favorise

la signalisation inflammatoire dans les podocytes cultivés et peut également sensibiliser directement les nocicepteurs [141], contribuant respectivement à la maladie rénale et à la douleur neuropathique vécues par les patients.

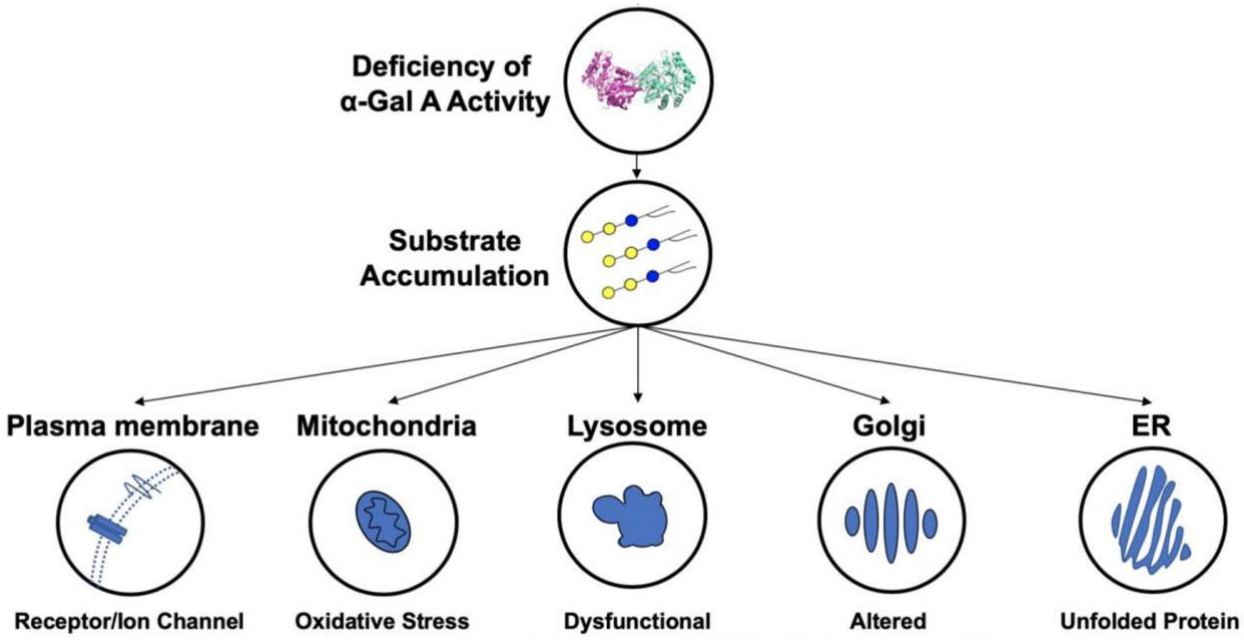


Figure III-10. Altérations cellulaires secondaires associées à la maladie de Fabry. [127].

4.5. Bases génétiques

Les corrélations génotype-phénotype dans la maladie de Fabry sont partielles en raison de la grande variabilité des manifestations cliniques observées. De plus, l'influence de facteurs génétiques et environnementaux sur l'expression de la maladie rend difficile la prédiction précise de la sévérité des symptômes à partir du génotype [142].

Les hommes atteints du phénotype classique de la maladie de Fabry peuvent présenter plusieurs types de variants pathogènes du gène *GLA*, notamment des réarrangements génétiques importants, des défauts d'épissage, ainsi que des variants faux-sens ou non-sens. Certains variants du gène *GLA*, telles que p.(Arg112His), p.(Arg301Gln) et p.(Gly328Arg), ont été identifiées chez des patients présentant soit un phénotype classique soit un phénotype cardiaque, ce qui suggère que d'autres facteurs modificateurs sont impliqués dans l'expression de la maladie. Certains variants, comme c.427G>A p.(Ala143Thr), ont été initialement considérées comme pathogènes, mais ont ensuite été reconsidérés comme bénins en fonction de données cliniques plus récentes [143].

Les individus présentant des formes atypiques de la maladie de Fabry ont généralement des variants du gène GLA qui expriment une activité résiduelle de l'enzyme α-Gal A. Par exemple, le variant p.(Asn215Ser) est associé à une maladie généralement moins sévère que les formes classiques de la maladie de Fabry, bien que des cas d'insuffisance rénale terminale aient été signalés [144,145].

Une étude de dépistage néonatal à Taiwan a révélé une prévalence élevée (~1:1 600 mâles) d'individus porteurs du variant c.640-801G>A, appelé aussi IVS4+919G>A. très fréquents également dans le sud de la Chine, il semble présenter une pénétrance réduite et a été associé à des formes cardiaques de début tardif [146]. De manière similaire, un certain nombre de variant *GLA*, tels que p.(Ala313Tyr), p.(Glu66Gln) et probablement p.(Arg118Cys), ont une prévalence plus élevée au sein de certaines populations générales par rapport aux populations de registre. Ces variants sont vraisemblablement bénins, car il n'existe aucune preuve publiée d'accumulation de substrat lysosomal dans les tissus qui les expriment. Les études de dépistage de la maladie de Fabry révèlent fréquemment la présence d'individus porteurs de variants génétiques dont la signification demeure inconnue [147].

Des exemples des principaux variants sont illustrés sur la Figure III-11.

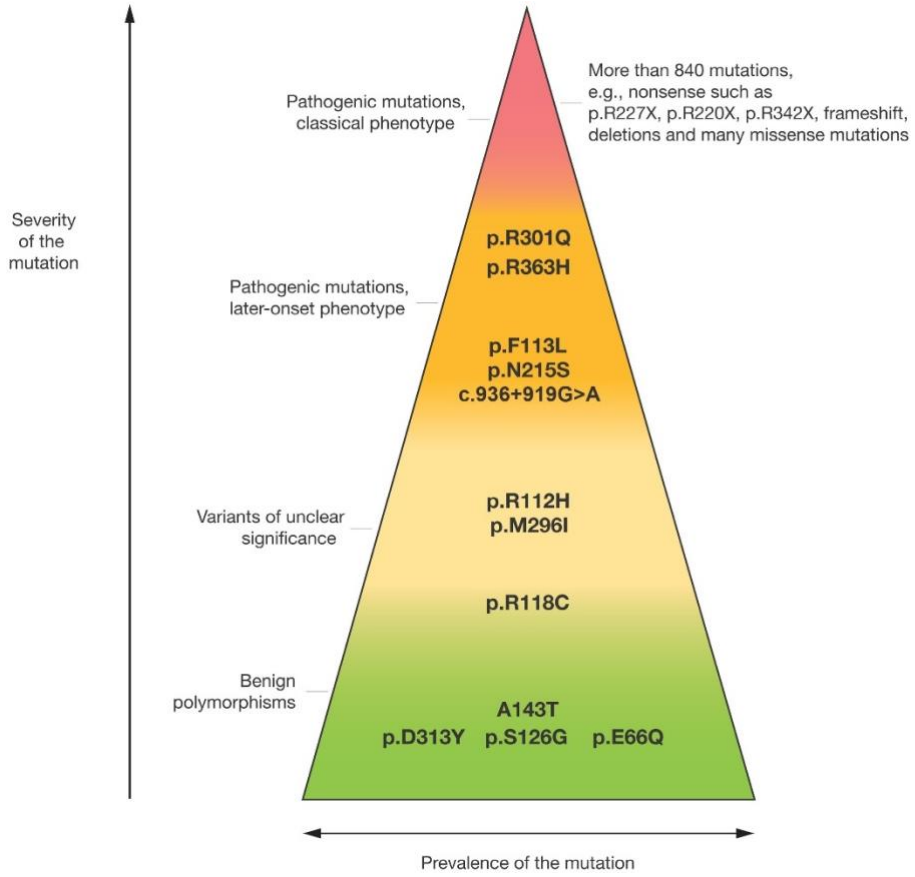


Figure III-11. Variants clés associés au phénotype de la maladie de Fabry classique ou non classique.
La forme triangulaire illustre la fréquence plus élevée des variants bénins et probablement bénins [129].

4.6. Stratégies thérapeutiques

Une prise en charge multidisciplinaire personnalisée du patient atteint de la maladie de Fabry est généralement nécessaire en raison de la complexité et de la diversité des manifestations [130]. Une gestion adéquate de la douleur et un traitement précoce par des inhibiteurs de l'ACE ou des bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine peuvent être nécessaires en cas de protéinurie ou de symptômes cardiaques. L'utilisation de l'aspirine est généralement recommandée, notamment après un AIT ou un accident vasculaire cérébral, mais l'utilisation d'une thérapie antiplaquettaire pourrait ne pas prévenir de nouvelles lésions de la substance blanche. Les facteurs de risque cardiovasculaires indépendants de la maladie de Fabry sont susceptibles d'influencer l'évolution de la maladie et méritent une identification rigoureuse et un traitement strict, notamment l'hypertension, le diabète et l'hypercholestérolémie. Les patients présentant des troubles du rythme cardiaque, fréquemment une bradycardie et des blocs auriculo-ventriculaires avec des tachycardies à échappement ventriculaire, peuvent faire des syncopes. Ces patients présentent un risque

de décès cardiaque aigu et nécessitent une surveillance cardiaque voire un pacemaker. Les patients en insuffisance rénale terminale peuvent bénéficier grandement d'une transplantation rénale. La survie de la greffe n'est pas différente de celle des autres patients en insuffisance rénale.

4.6.1. Thérapie de remplacement enzymatique

En 2001, deux enzymes de substitution ont été approuvées pour le traitement de la maladie de Fabry : l'agalsidase alpha et l'agalsidase beta, désignées sous le nom de thérapie de remplacement enzymatique (TRE). Bien que ces enzymes soient produites dans différents systèmes cellulaires, leurs propriétés biochimiques sont très similaires. Elles ont été étudiées à différentes doses : l'agalsidase beta à 1,0 mg/kg toutes les deux semaines et l'agalsidase alpha à 0,2 mg/kg toutes les deux semaines. Les premiers essais contrôlés par placebo ont montré un effet bénéfique sur la réduction de l'accumulation dans les cellules endothéliales et l'amélioration de la douleur, avec des stabilisations de la maladie rénale et cardiaque [148]. Cependant, des complications peuvent toujours survenir pendant le traitement, en particulier chez les patients atteints de la maladie avancée. La présence d'anticorps peut également influencer le résultat clinique, comme cela a été récemment démontré [149]. Les anticorps apparaissent presque exclusivement chez les patients masculins, en particulier ceux sans activité enzymatique résiduelle. Leur présence est fréquemment associée à des réactions liées à la perfusion telles que des frissons et de la fièvre. Cela peut généralement être géré par une prémédication par des corticostéroïdes et/ou en ralentissant le débit de perfusion. Les avantages de la TRE ont également été rapportés chez les enfants, mais on ne sait toujours pas si un traitement précoce peut prévenir l'apparition de complications tardives. Il existe un consensus de plus en plus grandissant selon lequel tous les patients ne bénéficieront pas du traitement, et donc des critères de début et d'arrêt ont été développés et devraient être régulièrement évalués [150].

Récemment, une nouvelle enzyme recombinante a été approuvée : le pegunigalsidase, un dimère pegylé de l'αGal-A. Cette enzyme est dérivée d'une mousse avec une glycosylation différente et donc une supposée meilleure distribution, ciblant peut-être mieux les cellules rénales tout en ayant possiblement moins d'effets secondaires immunologiques [151].

4.6.2. Molécules chaperonnes

Plus récemment, le migalastat une molécule chaperonne a été autorisé pour le traitement des patients atteints de la maladie de Fabry avec des variants sensibles au traitement [152]. Seul un sous-ensemble de patients (~30%), principalement non classiques, répond à ce critère. Cette alternative par voie orale est une option appréciable comparativement aux perfusions toutes les deux semaines. Une étude récente rapporte que Le migalastat a été bien toléré et a permis de stabiliser la fonction rénale à long terme de réduire la masse du ventricule gauche [153].

4.6.3. Traitements alternatifs ou expérimentaux

La thérapie de réduction du substrat (TRS) vise à restaurer l'homéostasie métabolique en limitant la quantité des précurseurs du substrat synthétisé (et éventuellement soumis au catabolisme) à un niveau qui peut être efficacement éliminé par l'enzyme mutée ayant une activité hydrolytique résiduelle [56].

Actuellement, le lucerastat (N-butyl déoxygalactonojirimycine) est en cours d'étude dans la maladie de Fabry et s'est révélé sûr [154]. Cette molécule a été approuvée par l'EMEA en 2023 pour une perfusion toutes les deux semaines à une dose de 1mg/kg. De plus, un nouvel inhibiteur oral de substrat, le venglustat, pourrait être utilisé non seulement pour le traitement de la maladie de Fabry, mais aussi pour la maladie de Gaucher neuropathique [155].

La thérapie génique a été utilisée avec succès dans des modèles animaux de la maladie de Fabry [58]. Des essais thérapeutiques utilisant des vecteurs viraux sont en cours chez les patients adultes atteints de la maladie de Fabry. Toutes ces avancées promettent beaucoup pour l'avenir, mais les résultats des études de sécurité et d'efficacité doivent encore être attendus.

4.6.4. Suivi et surveillance de la maladie de Fabry

Comme discuté précédemment, l'expression phénotypique de la maladie de Fabry est extrêmement variable. Par conséquent, une approche individualisée est la pierre angulaire de la prise en charge et du suivi. Le traitement spécifique est généralement initié chez les

patients symptomatiques, mais ceux qui sont asymptomatiques doivent également être suivis. Le dépistage précoce de l'insuffisance d'organes et l'initiation appropriée et opportune d'une thérapie adaptée sont importants. Les traitements spécifiques actuels sont probablement d'une efficacité limitée dans les cas avancés, et les bénéfices doivent être modulés par la charge liée à l'administration intraveineuse fréquente et les coûts [150]. Dans les cas avancés, les calendriers de suivi doivent être prolongés en fonction des dommages les plus graves aux organes terminaux.

5. Maladie de Gaucher

5.1. Définition

La maladie de Gaucher (MG) est également une des sphingolipidoses les plus courantes. Elle a été décrite pour la première fois par Philippe Gaucher en 1882 chez un patient présentant une splénomégalie massive sans leucémie. C'est une maladie génétique rare, à transmission autosomique récessive causée par des variants pathogènes dans le gène *GBA1*, situé sur le chromosome 1 (1q21), codant pour l'enzyme lysosomale glucocérébrosidase (GCase) qui hydrolyse le glucosylcéramide ou glucocérébroside (GlcCer) en céramide et glucose. Ce déficit entraine une accumulation du GlcCer et de son dérivé désacylé le lysoGb1. Plus de 300 variants du gène *GBA1* ont été décrits [156]. Très rarement, la maladie de Gaucher peut également être causée par une déficience en saposine C co-facteur de la GCase [157]. Le phénotype de la MG est variable, mais trois formes cliniques ont été identifiées : le type 1 est le plus courant et ne présente pas d'atteinte neurologique au premier plan, tandis que les types 2 et 3 se caractérisent par la présence de troubles neurologiques primaires. Cependant, ces distinctions ne sont pas absolues, et il est de plus en plus reconnu que la forme neuropathique représente un continuum phénotypique.

5.2. Epidémiologie

Dans la population générale, le taux d'incidence de la maladie de Gaucher est estimée entre 1/40 000 et 1/60 000 naissances. Mais comme pour la plupart des sphingolipidoses, l'incidence peut varier significativement selon les populations. Ainsi, une étude menée en Australie a rapporté une prévalence de la maladie de 1/57 000 [158]. Une étude similaire

menée aux Pays-Bas a rapporté une prévalence de 1,16/100 000 [159]. En République tchèque, la prévalence à la naissance a été rapportée comme étant de 1,13/100 000 [48]. La maladie de Gaucher type 1 est beaucoup plus fréquent dans la population juive ashkénaze, avec une prévalence estimée de la maladie de 1/855 avec 1/18 de porteurs hétérozygotes. La prévalence de la GD neuropathique (types 2 et 3) varie selon les groupes ethniques, mais semble être plus élevée chez ceux qui ne sont pas d'origine européenne.

5.3. Présentations cliniques

La maladie de Gaucher () présente un large éventail de manifestations cliniques, allant de la forme anténatale léthale à la forme asymptomatique. Elle est historiquement classée en trois grands types différents avec une forme léthale périnatale et une forme cardiovasculaire (Tableau III-4) [160].

Tableau III-4. Présentations cliniques de la maladie de Gaucher.

Sous-type	Age	Atteinte neurologique prédominante	Atteinte osseuse	Autres symptômes
Type 1	Adulte	Non	Oui	Splénomégalie Hépatomégalie Cytopénie Atteinte pulmonaire
Type 2 (aigüe ou infantile)	Nourrisson / petite enfance	Atteinte bulbaire Syndrome pyramidal Troubles cognitifs	Non	Splénomégalie Hépatomégalie Cytopénie Atteinte pulmonaire Atteinte cutanée
Type 3 (subaiguë ou juvénile)	Enfant	Apraxie oculomotrice Crises d'épilepsie Épilepsie myoclonique progressive	Oui	Splénomégalie Hépatomégalie Cytopénie Atteinte pulmonaire
Forme périnatale léthale	Périnatal	Syndrome pyramidal	Non	Atteinte cutanée type ichtyose ou collodion Hydrops foetalis
Forme cardiovasculaire	Forme cardiovasculaire prédominante	Apraxie oculomotrice	Oui	Calcification des valves mitrale et aortique Opacité de la cornée Légère splénomégalie

5.3.1. Gaucher Type 1

La maladie de Gaucher type I est la forme la plus courante de la maladie, caractérisée par l'absence d'atteinte neurologique au premier plan. Elle présente une variabilité phénotypique étendue, mais comporte fréquemment une hépatosplénomégalie, une

atteinte de la moelle osseuse, une thrombocytopénie et une maladie squelettique [160]. Les complications squelettiques comprennent la nécrose avasculaire, notamment de la tête fémorale, mais aussi d'autres articulations, des fractures pathologiques et des crises osseuses hyperalgiques. Ces crises ressemblent à celles observées dans la drépanocytose et ne peuvent être gérées que par des mesures similaires et l'usage d'antalgique puissant [161]. L'imagerie du squelette montre des caractéristiques spécifiques, bien que non pathognomoniques, notamment une ostéopénie, une sclérose, des déformations des fémurs en forme de flacon d'Erlenmeyer, des lésions lytiques et des fractures. Une nécrose avasculaire précoce et des infarctus peuvent également être reconnus à l'IRM. Bien que des cas de maladie grave et progressive chez les enfants et les jeunes adultes aient été décrits, à l'autre extrémité du spectre clinique, un diagnostic de maladie de Gaucher peut être posé comme une découverte fortuite chez une personne par ailleurs en bonne santé. Les patients très peu atteints ont généralement peu de progression de la maladie.

Les patients atteints de la maladie de Gaucher ont un risque accru de développer des maladies chroniques telles que la maladie de Parkinson et des hémopathies comme les gammapathies monoclonales. En effet, les lipides accumulés agissent comme antigènes, provoquant une dérégulation immunitaire. Cela peut entraîner une gammapathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) ou une expansion clonale anormale et non contrôlée des plasmocytes, caractéristique du myélome multiple (MM) [162,163]ref

Étant donné qu'une grande proportion (jusqu'à 20%) des patients adultes atteints de la maladie de Gaucher présente une protéine monoclonale, il est clair qu'il existe un risque accru et que les patients doivent être surveillés à cet égard [164].

L'autre association intrigante est celle de la maladie de Parkinson, non seulement chez les patients, mais aussi chez les porteurs sains d'un variant *GBA1* : en fait, des recherches récentes indiquent que la présence de variant pathogène du gène *GBA1* constitue le facteur de risque génétique le plus courant de la maladie de Parkinson et de la démence à corps de Lewy. Une diminution de l'activité de la GCase est associée à une augmentation de l'agrégation de l'α-synucléine. Les porteurs hétérozygotes de variants *GBA* ont 5 fois plus de risques de développer la maladie de Parkinson, tandis que les patients portant des variants *GBA* homozygotes ont 20 fois plus de risques de développer la maladie de Parkinson [165]. Le phénotype clinique ressemble à la maladie de Parkinson sporadique,

mais avec un début plus précoce et une évolution plus sévère [166]. Il a récemment été démontré que l'accumulation de glycosphingolides à chaînes longues (≥C22) induit l'agrégation de l'α-synucléine et des dysfonctionnements neurologiques [167]. Il est à noter qu'une réduction des GSLs dans les neurones des patients atteints de la maladie de Parkinson a diminué le taux d'α-synucléine agrégée [168]. De plus, l'activation de la GCase a entraîné une réduction des niveaux d'α-synucléine et une amélioration neurologique [169,170].

Ces liens entre maladies rares et maladies complexes illustrent l'importance de l'étude des mécanismes qui sous-tendent les maladies rares et l'importance de ces modèles expérimentaux pour la compréhenesion et la prise en charge de maladie plus complexes.

Par ailleurs, plusieurs cas de carcinome hépatocellulaire ont été signalés, probablement associés à une atteinte hépatique avancée [171]. Une atteinte pulmonaire à type d'hypertension pulmonaire, de pneumopathie interstitielle ou de syndrome alvéolaire [172]. Les atteintes rénales et cardiaques sont rares [173].

D'autres manifestations aspécifiques peuvent inclure une asthénie, des troubles gastro-intestinaux, tels que nausées, vomissements et diarrhée, des anomalies des valves cardiaques, une altération de la fonction rénale, d'autres anomalies sanguines, telle qu'une augmentation de la concentration sérique de fer et une diminution de la concentration sérique de vitamines B12 [174] et D, des troubles de la coagulation, tels que des ecchymoses et des saignements excessifs, un retard de croissance et une puberté retardée chez les enfants ou encore des manifestations neuropsychiatriques, notamment des problèmes de mémoire, de concentration et de comportement, ainsi que des troubles de l'humeur tels que la dépression et l'anxiété [173].

5.3.2. Type 2 / Type 3

Les maladies de Gaucher de type 2 et de type 3 sont les formes neuropathiques de la maladie de Gaucher, traditionnellement distinguées en fonction du début de la maladie neurologique et de son évolution. Les patients de type 2 présentent toujours un retard du développement très précoce et un cours rapidement fatal. Cependant, un diagnostic précoce peut également être établi chez un patient de type 3, et il existe une superposition importante des manifestations des types 2 et 3. Par conséquent, les formes neuropathiques

sont de plus en plus considérées comme un continuum phénotypique [175]. Étant donné que les décisions de prise en charge seront prises principalement en fonction de l'évolution de la maladie, il semble plus approprié d'utiliser les termes "aigu" et "chronique" au lieu de type 2 et type 3. Ainsi, la maladie de Gaucher neuropathique aiguë regrouperait les patients avec une atteinte neurologique débutant avant l'âge d'un an qu'il y ait ou non des caractéristiques neurologiques progressives associées, y compris des signes bulbaires et pyramidaux et un déficit cognitif. La forme chronique regrouperait alors toutes les formes neurologiques à début tardif (> 1 an). Ce groupe comporte plusieurs variants : le sous-type vivant dans le nord de la Suède (Norrbotten) avec des caractéristiques neurologiques relativement bénignes, mais une maladie viscérale extensive est parfois désignée comme de type 3a, pour les distinguer des patients présentant des manifestations neurologiques plus marquées, y compris une épilepsie myoclonique (type 3b).

Une autre variante atypique de la maladie neuropathique chronique est désignée comme de type 3c et a été signalée pour la première fois chez un groupe de patients arabes de Jenin qui présentaient une maladie valvulaire cardiaque avec des calcifications en plus d'une apraxie oculomotrice et d'une viscéromégalie légère. Ces patients sont tous homozygotes pour le variant p.(Asp409His) [176].

5.3.3. Déficit en saposine C ou en prosaposine

Des patients atteints de déficience en saposine C ou de déficience en prosaposine ont été décrits avec des caractéristiques cliniques de la maladie de Gaucher neuronopathique, notamment une ophtalmoplégie horizontale caractéristique, une épilepsie et des signes pyramidaux et cérébelleux, mais des variants non neuronopathiques avec une atteinte viscérale extensive ont également été décrits. Le diagnostic peut être difficile, car l'activité de la β-glucocérébrosidase est normale. La présentation clinique, la présence de cellules de Gaucher, des niveaux élevés de chitotriosidase et la surcharge en glucosylcéramide orientent vers la déficience en saposine C. L'analyse moléculaire de *PSAP* permet de confirmer le diagnostic [177].

5.4. Bases biochimiques

La déficience en glucocérébrosidase (GCase) due à des variants délétères dans le gène *GBA1* entraîne une accumulation marquée de GlcCer, le substrat de la GCase notamment dans des macrophages et des monocytes, induisant leur transformation en cellules de Gaucher. Les cellules de Gaucher sont des cellules actives atypiques dérivées de la sous-population M2, typiquement agrandies, avec des noyaux excentriques et une apparence cytoplasmique hétérogène ressemblant à du "papier froissé" [178]. Cette caractéristique est liée à la présence d'agrégats de GlcCer disposés en arrangements torsadés et fibrillaires. Ces cellules de Gaucher envahissent principalement la moelle osseuse, la rate, le foie ainsi que dans une moindre mesure les poumons et les ganglions lymphatiques et très peu le système nerveux central. La sous-population M2 des macrophages n'est pas classiquement associée à l'inflammation aiguë, mais plutôt aux réactions allergiques, au remaniement tissulaire et à la lutte contre les infections parasitaires [179]. Cependant, le profil des cytokines plasmatiques et les monocytes caractéristiques circulant dans le sang de patients atteints de la maladie de Gaucher montrent plutôt une activation des macrophages inflammatoires de type M1. Ainsi, de nombreuses cytokines, notamment l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, le TNF (facteur de nécrose tumorale), le M-CSF (facteur stimulant les colonies de macrophages), le MIP-1, l'IL-18, l'IL-10, le TGF, le CCL-18, la chitotriosidase, le CD14s et le CD163s, sont présents en quantités accrues dans le plasma [160]. Seules certaines de ces molécules sont exprimées par les cellules de Gaucher elles-mêmes. C'est le cas de la chitotriosidase et du CCL18, qui constituent ainsi des biomarqueurs spécifiques de la maladie [178]. Il est probable que ces sécrétions attirent autour des cellules de Gaucher des macrophages pro-inflammatoires qui contribuent à un état d'inflammation de bas grade chronique, d'activation de la coagulation et des voies du complément. De plus, d'un point de vue immunologique, le GlcCer a la capacité de déclencher une réaction immunitaire en agissant comme un auto-antigène [180]. Le métabolisme cellulaire développe diverses stratégies pour s'adapter à l'accumulation de GlcCer dans la maladie de Gaucher. Au sein des lysosomes, la céramidase acide retire le groupement acyle du GlcCer, le transformant ainsi en glucosylsphingosine (lyso-Gb1) qui peut être libéré dans le cytoplasme. Parallèlement, dans le cytosol, l'activité de l'enzyme GCase cytosolique (GBA2) augmente, libérant le céramide du GlcCer. La libération de

céramide au niveau cytosolique est problématique et entraine facilement de la lipotoxicité. Elle est dégradée en sphingosine par une céramidase neutre cytosolique. GBA2 joue également un rôle dans la dégradation du lyso-Gb1 en sphingosine, qui est ensuite transformée en phosphosphingosine (S1P). De manière intéressante, GBA2 semble également avoir une activité de transglycosylase, utilisant le GlcCer pour générer du glycosyl-beta-cholestérol (Glc-Chol). De plus, il y a une augmentation de la production forcée de glycosphingolipides complexes de type GM3 ce qui permet d'absorber une partie des GlcCer accumulées [160]. L'implication de GBA2 dans la physiopathologie de la maladie de Gaucher est très vraisemblable. Une étude récente sur modèle murin de type I a d'ailleurs montré une amélioration franche des symptômes de la maladie après KO du gène *GBA2* [181].

Pour rappel, toutes ces espèces lipidiques secondairement générées (céramide, sphingosine, lyso-Gb1, S1P) sont des lipides hautement bioactifs impliqués dans de nombreux processus physiopathologiques [79]. Des études in vitro suggèrent même que le lyso-Gb1 peut perturber la cytodiérèse, entraîner une hémolyse et causer des dommages sévères aux neurones [182]. Normalement absent du système nerveux, le lyso-Gb1 est détectable chez les patients atteints d'une forme neurologique de la maladie de Gaucher. De plus, son accumulation semble être corrélée à certaines gammopathies monoclonales, à l'apparition de myélomes multiples et à d'autres cancers. Une étude récente a même révélé que 33% des gammapathies monoclonales sporadiques chez les patients Gaucher présentaient des anticorps spécifiques contre le lyso-Gb1 ou certaines lysophosphatidylcholines (lysoPC) [183].

L'atteinte osseuse, caractérisée par une ostéopénie et des crises osseuses douloureuses, ainsi que l'atteinte hématologique, incluant une anémie et une thrombopénie, semblent résulter en partie de l'infiltration mécanique de la moelle osseuse par les cellules de Gaucher et de l'environnement pro inflammatoire provoquée. Par ailleurs, la sécrétion de cytokines et de chimiokines telles que l'IL-1 beta, IL-10, le TNFα et l'IL-6 contribue à l'activité ostéoclastique et à l'ostéoporose [161].

La physiopathologie de l'atteinte neurologique dans la maladie de Gaucher reste encore mal comprise. Le turnover du GlcCer est faible dans le système nerveux et l'augmentation intracérébrale du GlcCer n'est que légère dans les formes neurologiques de la maladie. Il

semble plus probable que les lipides bioactifs tels que le lyso-Gb1 exercent une toxicité directe sur les neurones. L'accumulation de GlcCer peut également perturber de manière chronique les lysosomes, entraînant l'accumulation de macromolécules et l'altération de certains processus comme la mobilité et le positionnement lysosomal, l'exocytose et l'autophagie. Dans le contexte neuronal, un positionnement correct des lysosomes en pré-synaptique et en péri-nucléaire est en effet particulièrement crucial [184]. De plus, l'accumulation de GlcCer favoriserait l'agrégation toxique de l'alpha-synucléine en corps de Lewy, ce qui est cohérent avec la prévalence accrue de la maladie de Parkinson chez les patients Gaucher et les porteurs hétérozygotes sains [185].

Cependant, la simple « surcharge » mécanique lysosomale en GlcCer qui entrainerait une dysfonction du lysosome n'explique pas tout. En réalité, de larges processus physiopathologiques secondaires sont impliqués dans la physiopathologie de la maladie de Gaucher ; notamment des altérations de l'autophagie, des fonctions mitochondriales, du trafic vésiculaire intracellulaire ou une augmentation du stress oxydant (Figure III-12) [186]. Des marqueurs de stress du RE ont également été observés dans plusieurs modèles génétiques de la maladie de Gaucher, médié par l'accumulation de protéines mal repliées au niveau du RE. En réponse au stress du RE, le système UPR (unfolded protein response) adaptatif permet aux protéines mal repliées de se replier correctement. La formation de liaisons disulfures dans le RE est aussi une source importante d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) telle que le H_2O_2. Ainsi, une formation dérégulée des liaisons disulfures peut favoriser l'accumulation de ROS et contribuer au stress oxydant. En outre, le repliement adéquat des protéines dépend d'un équilibre redox approprié, un stress oxydant accru peut compromettre la capacité de repliement du RE et ainsi contribuer à l'accumulation de protéines mal repliées, aggravant ainsi la réponse UPR, la génération de ROS et de l'inflammation. Ce cercle vicieux peut déclencher la mort cellulaire.

Une dysfonction mitochondriale (une autre source de ROS) a été également été décrite dans la maladie de Gaucher. Cette dysfonction est vraisemblablement d'origine multifactorielle. En effet, l'altération de l'autophagie implique également une inhibition de la mitophagie et donc une accumulation des mitochondries défectueuses. Il est probable aussi que le stress de l'ER et les dysrégulations des niveaux de calcium intracellulaire aient aussi un impact sur la fonction mitochondriale [187].

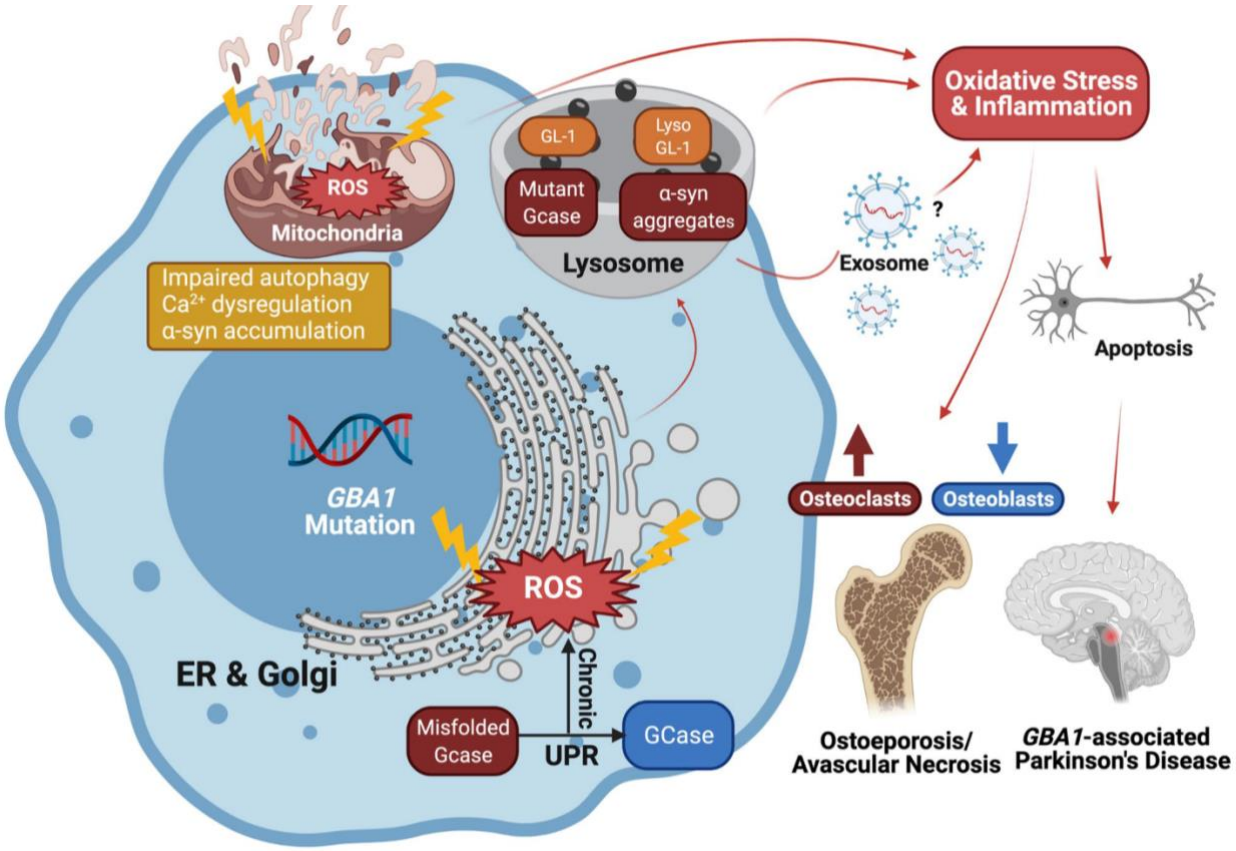


Figure III-12. Schéma simplifié de la physiopathologie de la maladie de Gaucher.

[186].

5.5. Bases génétiques

La corrélation génotype-phénotype dans les maladies de Gaucher est complexe. Il n'existe pas de corrélation parfaite entre le niveau d'activité résiduelle de l'enzyme glucocérébrosidase mesurée in vitro à partir d'extraits de cellules nucléées et le type ou la gravité de la maladie. Cela signifie que le niveau d'activité de l'enzyme ne peut pas prédire de manière fiable la présentation clinique de la maladie [173].

Dans le cas de la GD de type 1, il a été observé que les individus porteurs d'au moins un variant p.(Asn409Ser) n'ont pas de maladie neurologique primaire. Cependant, la présence de ce variant n'élimine pas le risque de maladie de Parkinson chez les personnes atteintes de GD. En général, les individus homozygotes pour les variants p.(Asn409Ser) ou p.(Arg535His) ont tendance à avoir une maladie plus bénigne.

En ce qui concerne les types 2/3, les individus homozygotes pour le variant p.(Leu483Pro) ont tendance à avoir une maladie grave, souvent avec des complications neurologiques.

Cependant, il est important de noter que certains individus avec ce génotype n'ont pas de problèmes neurologiques apparents.

La forme périnatale est caractérisée par une hétérogénéité génétique significative. Les génotypes associés à cette forme incluent l'homozygotie pour des allèles recombinants et des mutations spécifiques telles que p.(Ser235Pro), p.(Arg170Leu), p.(Arg159Trp) et p.(Arg296Gln). La forme cardiovasculaire de la maladie de Gaucher est associée à l'homozygotie pour le variant p.(Asp448His), bien que la base biochimique des caractéristiques cliniques uniques de cette forme ne soit pas complètement élucidée.

De plus, les variants pathogènes c.84dupG et c.115+1G>A semblent létaux chez les homozygotes, mais les individus composés hétérozygotes (portant les deux variant causatifs) présentent une évolution de la maladie subaiguë avec une implication pulmonaire progressive et un décès survenant dans la première ou la deuxième décennie de vie.

Un effet fondateur pour des allèles spécifiques est présent dans certaines populations :

- Chez les Juifs ashkénazes, les Espagnols et les Portugais p.(Asn409Ser)
- Chez les Suédois p.(Leu483Pro)
- Chez les Arabes de Jenin, les Grecs et les Albanais p.(Asp448His). Chez les Grecs et les Albanais, p.(Asp448His) a également été trouvé en cis avec p.(His294Gln).

5.6. Stratégies thérapeutiques

Devant la diversité des tableaux cliniques, une approche personnalisée multidisciplinaire est essentielle pour la prise en charge des patients atteints de GD. Il n'existe pas de traitement curatif de la maladie de Gaucher. Cependant, la thérapie de remplacement enzymatique – Enzyme Replacement Therapy - (TRE) et la thérapie de réduction du substrat (TRS) sont disponibles pour atténuer les manifestations. Ces thérapeutiques ont largement supplanté la greffe de moelle osseuse. Cependant les personnes atteintes de la MG neurologique chronique et d'une MG progressive malgré la TRE ou la TRS peuvent être candidates à la greffe ou à une approche multimodale combinant TRE, greffe et/ou TRS même si ces associations semblent ne pas modifier le pronostic final [188].

Par ailleurs, d'autres traitements à visée symptomatiques ont été ou peuvent être appliqués tels que :

- La splénectomie était la seule intervention possible en cas de splénomégalie et de cytopénie sévères. Il s'est avéré que la splénectomie induit et aggrave l'atteinte

osseuse et une augmentation du nombre de cellules de Gaucher dans le foie. Actuellement, la pratique de cette intervention est exceptionnelle.

- La transfusion de produits sanguins est recommandée en cas d'anémie sévère et de problèmes de coagulation. Une anémie et des problèmes de coagulation non réactifs à la TRE devraient inciter à rechercher un processus pathologique intercurrent. Une évaluation par un hématologue est recommandée avant toute intervention chirurgicale majeure ou dentaire ou avant l'accouchement.
- Analgésiques pour les douleurs osseuses. Des douleurs osseuses persistantes chez les personnes sous traitement devraient inciter à exclure la possibilité d'un problème mécanique (par exemple, fracture pathologique ou effondrement articulaire secondaire à une ostéonécrose, arthrose dégénérative).
- Chirurgie de remplacement articulaire pour soulager les douleurs chroniques et restaurer la fonction (c'est-à-dire améliorer l'amplitude articulaire). Des douleurs osseuses chez les personnes ayant subi une arthroplastie articulaire peuvent indiquer un problème avec la prothèse et la nécessité d'une révision chirurgicale.
- Supplémentations en calcium et vitamine D peuvent être bénéfiques pour les patients présentant une faible densité osseuse. Des agents anti-résorption osseuse peuvent également être indiqués ; idéalement, les évaluations et la gestion devraient être entreprises en consultation avec des spécialistes en métabolisme osseux.

Les autres symptômes de la maladie, tels que le myélome multiple, le parkinsonisme, les problèmes pulmonaires et les troubles neuropsychiatriques, doivent être pris en charge par des spécialistes qualifiés.

5.6.1. Thérapie ciblée - Thérapie de remplacement enzymatique

La TRE repose sur l'administration d'une quantité suffisante d'enzyme exogène pour surmonter le blocage de la voie catabolique et favoriser l'élimination du substrat accumulé, le GlcCer [16].

Il existe trois préparations recombinantes d'enzyme glucocérébrosidase actuellement disponibles : imiglucérase, velalglucérase alfa et taliglucérase alfa avec des efficacités comparables [189]. Des infusions intraveineuses régulières des enzymes recombinantes se

sont avérées sûres et efficaces pour inverser les caractéristiques résultant de l'atteinte hématologique, viscérale et osseuse permettant une amélioration de la qualité de vie franche chez les patients de type 1. La TRE est en général bien tolérée. Environ 10% à 15% des personnes développent des anticorps contre l'imiglucérase injecté, tandis que la formation d'anticorps a été signalée chez 1% des personnes recevant du vélaglucérase. Dans la plupart des cas, ces personnes restent asymptomatiques [190]. Les effets indésirables comme le prurit ou l'urticaire sont relativement bien contrôlés par une prémédication à l'aide d'antihistaminiques. Après un traitement prolongé, la TRE réduit le taux de perte osseuse de manière dose-dépendante [191], améliore les douleurs osseuses et réduit les crises osseuses. En revanche, la TRE n'a que peu d'effet sur les symptômes neurologiques aigus ou chroniques et ne modifie pas le pronostic final de la maladie neurologique dans la maladie de Gaucher, bien que le traitement par TRE des personnes atteintes de la maladie de Gaucher de type 3 puisse entraîner une amélioration significative de la qualité de vie associée à une amélioration des manifestations systémiques [192]. Il est probable que les modifications histologiques terminales (par exemple, la fibrose, l'infarctus) influencent la réponse à la TRE. La thrombocytopénie peut persister chez les personnes présentant une splénomégalie résiduelle et/ou la présence de nodules spléniques.

La dose optimale et la fréquence d'administration de l'enzyme substutitive ne sont pas certaines, principalement en raison des informations limitées concernant la demi-vie et la distribution tissulaire, ainsi que des limites liées aux modalités utilisées pour évaluer l'évolution clinique de la maladie. L'enzyme administrée par voie intraveineuse peut ne pas atteindre des concentrations adéquates dans certaines parties du corps (par exemple, cerveau, os et poumons). Chez la majorité des individus, le traitement est initié avec une dose de 15 à 60 unités d'enzyme par kg de poids corporel administrée par voie intraveineuse toutes les deux semaines. La dose d'enzyme peut être augmentée ou diminuée après le début du traitement et pendant la phase d'entretien, en fonction de la réponse - c'est-à-dire la reconstitution hématopoïétique, la réduction des volumes du foie et de la rate, et la stabilisation ou l'amélioration des manifestations squelettiques [173].

5.6.2. Thérapie ciblée - Thérapie de réduction du substrat

La miglustat est le premier agent oral destiné au traitement des personnes atteintes d'une maladie de Gaucher de gravité légère à modérée pour lesquelles la TRE n'est pas une option thérapeutique en raison de contraintes telles qu'une hypersensibilité au produit ou un mauvais accès veineux. Dans au moins trois études impliquant plus de 30 personnes atteintes de la maladie de Gaucher de type 1, le traitement par miglustat a entraîné une diminution significative du volume du foie et de la rate après 6 à 18 mois, avec une amélioration clinique notée sur 24 mois [193]. L'atteinte osseuse, ainsi que les valeurs plaquettaires et d'hémoglobine, sont restées stables ou se sont légèrement améliorées. Une augmentation de la densité osseuse au niveau de la colonne lombaire et du col fémoral a été observée dès six mois après le début de la monothérapie par miglustat. Les réactions indésirables les plus courantes notées lors des essais cliniques étaient une perte de poids (60% des personnes) et des troubles digestifs à type de ballonnements, flatulences et diarrhées (80%), qui semblent régresser avec une utilisation plus longue du produit.
L'eliglustat, un inhibiteur alternatif de la glucosylcéramide synthétase, a été démontré, lors d'essais cliniques, être un traitement sûr et efficace pour les personnes atteintes de la maladie de Gaucher de type 1 qui ne sont pas sous traitement, ainsi que pour celles ayant déjà été traitées par TRE [194]. L'expérience avec une administration quotidienne et une administration deux fois par jour chez les patients a permis de maintenir les valeurs moyennes pour les mesures hématologiques et viscérales dans les objectifs thérapeutiques établis lors des périodes de traitement en double aveugle et d'extension à long terme. Les patients sous eliglustat deux fois par jour ont montré une stabilité globale plus grande [195]. Les effets secondaires signalés de l'eliglustat étaient généralement bénins. L'utilisation de l'eliglustat nécessite un génotypage du cytochrome P450 2D6 et l'évitement de médicaments pouvant interagir par le biais de cette voie métabolique [196]. Cependant, l'eliglustat ne peut pas traverser la barrière hémato-encéphalique et n'est donc pas indiqué pour les formes neurologiques de la maladie.

En conclusion, la maladie de Gaucher est une maladie génétique rare, mais aux conséquences profondes pour les personnes qui en sont atteintes. Le traitement principal de

la maladie de Gaucher repose sur l'enzyme de remplacement, qui vise à corriger le déficit enzymatique. Ce traitement peut améliorer la qualité de vie des patients, réduire les symptômes, et prévenir les complications à long terme. Cependant, il est essentiel de diagnostiquer la maladie précocement pour commencer le traitement le plus tôt possible. En somme, la maladie de Gaucher reste un défi médical. La sensibilisation à cette maladie et la poursuite de travaux de recherche sont essentielles pour améliorer la prise en charge et pour permettre le développement de traitements plus efficaces, notamment sur les symptômes neurologiques.

CHAPITRE IV : LA BIOLOGIE DES SYSTEMES

La vie existe sur Terre depuis au moins 3,95 milliards d'années. Tout au long de cette période, elle a évolué avec succès de génération en génération et d'espèce en espèce, malgré de nombreuses extinctions de masse qui ont à chaque fois éliminé plus de 70 % de toutes les espèces. Face à de telles épreuves, la vie s'est adaptée en faisant preuve d'une incroyable ingéniosité. Par exemple, le moteur flagellaire bactérien exploite un flux de protons pour entraîner un mouvement rotatif, à des vitesses pouvant atteindre 100 000 tours par minute, le tout en gardant un couplage étroit [197]. Ce complexe rotatif nanoscopique parfaitement circulaire est apparu il y a environ 2.7 milliards d'années. La nature avait découvert la roue (bien avant l'homme).

Il existe de nombreuses leçons à tirer des mécanismes et structures que l'on trouve dans le règne naturel. La biologie des systèmes s'intéresse à la compréhension de ces systèmes biologiques complexes, de leur fonctionnement et de leur adaptation. Elle explore comment les composants individuels interagissent pour maintenir la vie et l'homéostasie, malgré les perturbations externes. Le mécanisme de propulsion bactérien du flagelle est un exemple concret d'application d'une approche systémique pour comprendre un système biologique complexe.

1. Définitions

Définir ce qu'est la biologie des systèmes est paradoxalement loin d'être facile. La discipline est jeune, ses contours encore flous et bon nombre de chercheurs ne parviennent pas vraiment à en apprécier pleinement l'utilité. Le consensus du NIH (National Institutes of Health) la définit comme une approche en recherche biomédicale qui vise à étudier un système biologique dans son ensemble, que ce soit au niveau de l'organisme, des tissus ou des cellules [198]. La biologie des systèmes repose sur la notion d'émergence qui implique que le comportement d'un système biologique émerge des interactions entre ses différents

composants. Comme a dit Aristote « lorsque nous considérons des objets composés de plusieurs parties, mais qui vont au-delà d'une simple collection de ces parties, il doit y avoir une raison derrière leur unité » ; phrase que plusieurs ont paraphrasé ainsi « le tout constitue plus que la somme de ses parties ».

Cette première définition peut être précisée en comparant la biologie des systèmes à la biologique expérimentale classique qui est une approche réductionniste (Tableau IV-1, Figure IV-1) [199].

Tableau IV-1. Biologie des systèmes vs approche réductionniste

Approche réductionniste	**Biologie des systèmes**
Les propriétés intrinsèques des composants	Les propriétés émergentes issues des relations entre les composants
Un seul facteur	Nombreux facteurs en parallèle. Les réseaux.
Linéarité Prédictibilité Déterminisme	Non-linéarité Chaotique Stochastique
Normalité Homéostasie Eviction des facteurs de risques	Robustesse Homéostasie adaptative

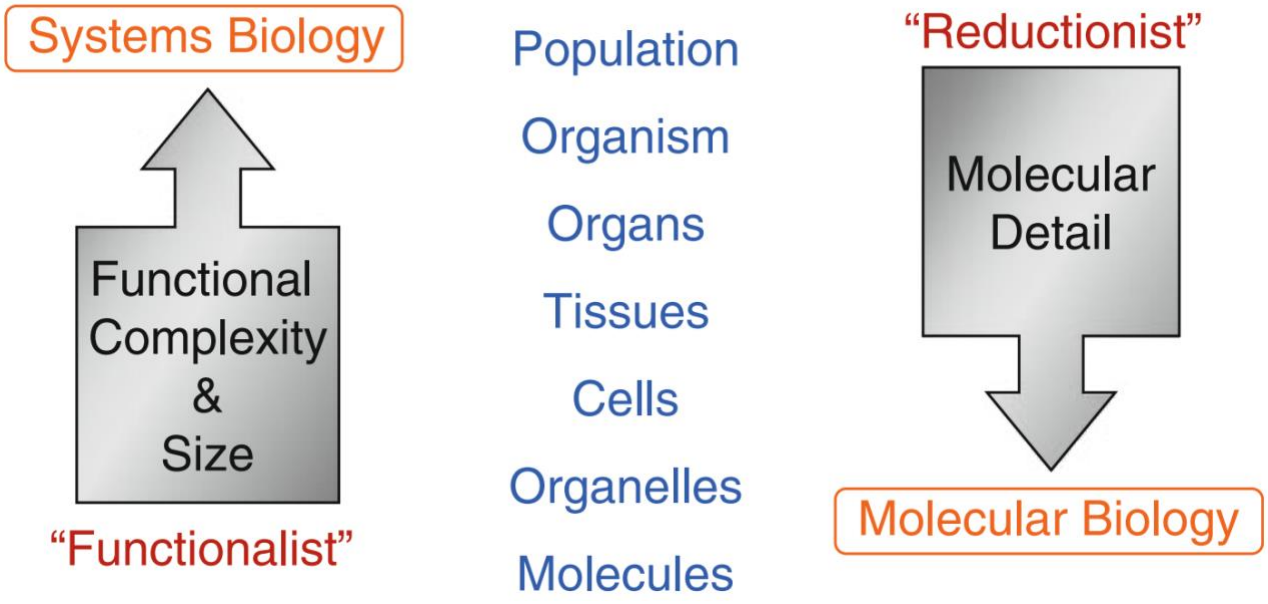


Figure IV-1. Biologie des systèmes *vs* biologie expérimentale.

Contrairement à l'approche réductionniste, la biologie des systèmes élargit son champ d'étude à différentes échelles, de la molécule à la population. [200].

2. Pourquoi ?

2.1. Paradoxe de la biologie expérimentale

Dans son article intitulé "Can a biologist fix a radio?-Or, what I learned while studying apoptosis", Yu Lazebnik décrit avec humour une certaine tendance qui se répète encore et encore au sein de la biologie expérimentale [201]. L'histoire est la suivante : un nouveau phénomène biologique est observé (ex : l'apoptose), il entraine un engouement de la communauté scientifique tel que de nombreuses découvertes s'accumulent à un rythme effréné. De nouveaux médicaments « miracles » semblent possibles et commencent à être développés. Mais paradoxalement, à un certain point, plus on découvre d'éléments sur ce phénomène et moins il a du sens. Les modèles qui semblaient complets s'effondrent. Le développement des médicaments « miracles » échoue en partie. Cela ne semble pas logique. Il parait en effet beaucoup plus intuitif qu'un phénomène soit mieux compris s'il est mieux exploré.

Pourtant, il parait également intuitif que pour comprendre le fonctionnement d'une radio il faille plus que la description (même précise) de tous ses composants. Ce paradoxe met ainsi en lumière les limites de l'approche réductionniste qui montre une difficulté à intégrer une part de hasard et probabiliste dans ses modèles. Par ailleurs, l'absence d'approche quantitative des effets et relations d'un système entraine inévitablement une impossibilité à prendre en compte les éléments suivants [202] :

- Les effets des processus moléculaires dépendent du contexte et une seule entité moléculaire peut avoir un impact sur plusieurs niveaux supérieurs.
- Les structures et processus biologiques de niveau supérieur sont souvent réalisés par différentes entités moléculaires, de sorte que plusieurs entités moléculaires peuvent contribuer à un seul niveau supérieur.

2.2. Complexité

Pour l'approche réductionniste, la modélisation d'un système devrait être possible à partir des descriptions précises des différents comportements des constituants du système [203]. Dans le cas d'un système simple, cette approche peut être viable. Les principales voies métaboliques de la biologie ont été décrites grâce à l'approche réductionniste (glycolyse,

cycle de Krebs, beta oxydation des acides gras...). Ces voies sont souvent communes et très conservées au sein du vivant et de l'évolution naturelle. Des modèles prenant en compte les caractéristiques physico-chimiques de chaque enzyme de ces voies ainsi que les conditions initiales (saccharides, protéines, oxygène…) sont ainsi capables de prédictions relativement fiables comme le taux de croissance d'une population de bactérie ou la quantité produite d'une biomolécule d'intérêt.

Cependant, la montée en complexité d'un système rend très vite inutile ce genre de modèle linéaire. Par exemple, les voies de signalisation intracellulaire et de différenciation cellulaire ne sont pas explicables par la biologie expérimentale. Ainsi, le "paysage épigénétique de Waddington" qui illustre comment les cellules se développent et se différencient au cours du développement embryonnaire, en particulier en ce qui concerne les mécanismes de régulation épigénétique, n'est pas correct [204]. Les travaux théoriques et expérimentaux récents ont effectivement remis en question cette vision simpliste et déterministe et il est devenu évident qu'au moins quatre révisions critiques sont nécessaires pour décrire correctement la dynamique cellulaire [205] :

- Dimensionnalité élevée du paysage : en réalité, le paysage est de haute dimension, défini par toutes les concentrations moléculaires intracellulaires et de multiples facteurs environnementaux pertinents. Il ne s'agit pas d'un potentiel au sens habituel. En conséquence, des flux cycliques (tourbillons) peuvent exister, déplaçant les cellules le long de trajectoires fermées dans l'espace des concentrations, même si la géographie locale est complètement uniforme.
- Influence constante du bruit moléculaire : le paysage est continuellement affecté par le bruit moléculaire omniprésent, des vibrations sismiques stochastiques de différentes amplitudes et spectres spécifiques à chaque emplacement sur le paysage. Ce bruit peut perturber les trajectoires de développement.
- Flexibilité du paysage : le paysage n'est pas rigide. Les cellules peuvent elles-mêmes remodeler la géographie en raison des interactions entre cellules et de la dépendance de la concentration des protéines vis-à-vis du taux de croissance. Cela signifie que les cellules peuvent influencer activement leur propre trajectoire de développement.
- Différences de taux de croissance : les différences de taux de croissance entre différents états cellulaires modifient le paysage. Les états cellulaires à croissance

rapide peuvent "surpeupler" certaines zones, abaissant les emplacements de haute adaptation et élevant les points de faible adaptation, approfondissant ainsi le paysage.

Cette réflexion met en lumière un élément crucial pouvant expliquer la haute complexité des systèmes biologiques et l'échec de tentative de modélisation déterministique : la notion de bruits de fond, qu'il soit génétique, métabolique ou autre introduit une part de chaos et de hasard au sein du système, le rendant plus probabiliste que déterministe. Par ailleurs, un niveau régulé de bruit et de chaos semble nécessaire au bon fonctionnement des systèmes biologiques [206].

Une autre source de complexité des systèmes biologiques vient de l'interconnexion d'éléments ayant des échelles de temps et d'espace large ; de la microseconde à plusieurs années et de l'échelle moléculaire à celle d'une population [207].

Les systèmes complexes ont une tendance générale à l'auto-organisation et à la formation de motifs complexes. Certains de ces motifs ont des symétries particulières non triviales et peuvent présenter une invariance quelle que soit l'échelle, c'est-à-dire une apparence similaire à différentes échelles de grossissement. Cette ressemblance avec les fractales a poussé la communauté scientifique à tenter de décrire la biologie en utilisant des régularités mathématiques simples. Cependant, après un enthousiasme initial, l'application des fractales en biologie a considérablement diminué. En effet, il n'y a pas de fractales rigoureuses en biologie. Tout d'abord, il existe toujours une limite inférieure et une limite supérieure au comportement fractal. Ensuite, les séries ne sont pas exactement autosimilaires. La nature semble ainsi toujours plus complexe que les abstractions mathématiques cherchant à la modéliser [208].

2.3. Emergence

L'émergence fait référence à l'idée que le monde naturel est organisé de manière hiérarchique, avec des propriétés qui ne peuvent être complètement expliquées par les seuls principes physicochimiques ou les éléments de base d'un système. De nouvelles propriétés ou entités se manifestent à mesure que la complexité du système augmente. Ce processus peut impliquer plusieurs niveaux de complexité, chacun ajoutant des niveaux de causalité supplémentaires.

Cependant, il est important de reconnaître que même dans des systèmes complexes bien étudiés, certaines observations restent inexplicables. Cette absence d'explication peut découler de la complexité des interactions entre les composants, de nos propres limites de connaissance ou de la nature intrinsèquement complexe du phénomène lui-même. Ces limites poussent à adopter des approches plus holistiques et interdisciplinaires pour mieux appréhender cette complexité.

3. Comment ?

3.1. Historique

Les approches systémiques en biologie ne sont pas nouvelles. Dès 1933, Von Bertalanffy a appliqué la théorie générale des systèmes à différents domaines scientifiques, y compris la biologie. Il avait souligné que les problèmes d'organisation de différents ordres ne peuvent pas être compris en examinant leurs parties respectives de manière isolée. En 1948, Norbert Wiener a développé la cybernétique, qui se penche sur le contrôle et la communication tant dans le domaine animal que dans celui des machines, dans le cadre d'une approche au niveau du système. Alan Turing, en plus de sa contribution pionnière à l'informatique a également été un précurseur dans l'approche systémique de la morphogenèse en biologie. L'école de Prigogine a été active dans ce domaine depuis les années 1960, en proposant le concept de "structures dissipatives" pour expliquer les oscillations biochimiques, les rythmes cellulaires et la morphogenèse. À partir des années 1970, Jean-Pierre Kernevez a travaillé sur l'analyse numérique et le contrôle des systèmes biochimiques. Cependant, même si ces approches au niveau du système existaient depuis un certain temps, les fondements de la biologie des systèmes tels que nous les connaissons aujourd'hui n'ont été réellement établis qu'au début du XXIe siècle. Ainsi, en 2001 le terme de « Biologie des Systèmes » fut introduit par Hiroaki Kitano. Ce domaine a depuis connu une croissance significative, avec l'intégration de diverses approches omiques, de modélisations mathématiques et de la collecte de données à grande échelle.

Un principe fondamental de la biologie des systèmes est que la compréhension de systèmes biologiques complexes nécessite un développement permanent de nouvelles technologies qui peuvent explorer de nouvelles dimensions de l'information biologique. De nouveaux types de données exigent souvent de nouveaux outils informatiques pour les analyser. Ainsi, la biologie stimule le développement technologique, qui à son tour alimente la création d'outils digitaux d'analyse dans une sorte de cercle vertueux qui s'auto-entretient (Figure IV-2). Au-delà des considérations théoriques, c'est surtout la convergence de multiples disciplines et technologies différentes qui a permis la biologie des systèmes. Cette discipline repose sur un environnement interdisciplinaire où des biologistes, des chimistes, des informaticiens, des ingénieurs, des mathématiciens, des physiciens, des médecins et d'autres acteurs peuvent collaborer. L'innovation et la recherche dans ce domaine sont alimentées par la diversité des compétences et des connaissances qui peuvent être assemblées au sein de ces équipes multidisciplinaires. Cela permet de repousser les limites de ce qui est actuellement possible en biologie et d'ouvrir de nouvelles perspectives.

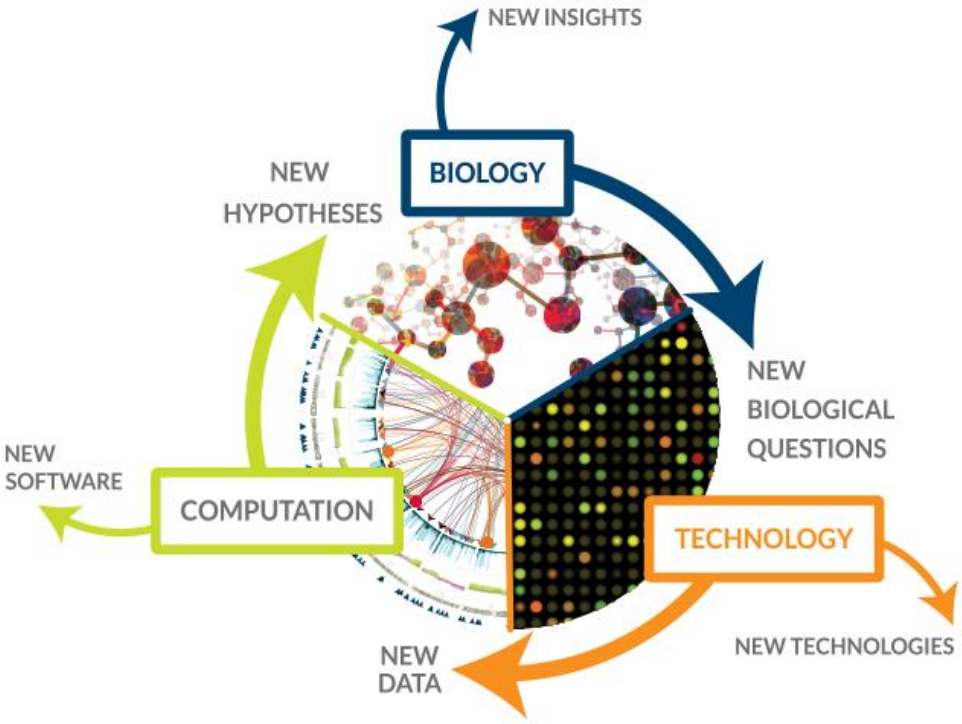


Figure IV-2. Cercle vertueux de la Biologie des systèmes *vs* biologie expérimentale.

[200].

3.2. Technologies analytiques

Le terme "OMIQUE" définit une exploration permettant l'analyse d'une grande quantité de données représentant la structure et la fonction de l'ensemble d'un système biologique à un niveau particulier. Ce type d'approche a révolutionné de manière substantielle nos méthodologies d'investigation des systèmes biologiques [209]. L'exploration des maladies complexes comme les cancers a ainsi évolué d'une délimitation statique (ex : cancéreux vs sain) à une déconvolution spatiotemporelle de systèmes complexes impliquant des modifications multicouches aux niveaux génomique, transcriptomique, protéomique et métabolique de manière globale et non biaisée [210,211].

3.2.1. Supports de l'information biologique

Depuis l'établissement de la première technologie à haut débit (les puces à ADN), les technologies omiques ont connu un développement fulgurant. Chaque niveau d'analyse apporté par une technologie omique explore en quelque sorte un support de l'information biologique différent, dont les quatre principaux groupes sont : les gènes (ADN), les transcrits (ARN), les protéines et les métabolites. D'autres supports incluent les modifications épigénétiques, les interactions moléculaires, le microbiote ou bien les expositions environnementales.

La génomique est l'étude du génome, c'est-à-dire l'ensemble de l'ADN d'un organisme. Dans le contexte de la recherche médicale, la génomique se concentre sur l'identification de variants génétiques associés à des maladies, à la réponse au traitement et au pronostic des patients. Les études d'association génomique (GWAS) ont été un moyen efficace d'identifier des milliers de variants génétiques associés à des maladies complexes.

L'épigénomique se penche sur les modifications réversibles de l'ADN ou des protéines associées à l'ADN, telles que la méthylation de l'ADN ou l'acétylation des histones. Ces modifications jouent un rôle clé dans la régulation de la transcription génique et, par conséquent, dans le destin cellulaire. Les modifications épigénétiques peuvent être influencées à la fois par des facteurs génétiques et environnementaux.

La transcriptomique examine les niveaux d'ARN à l'échelle du génome, à la fois qualitativement (quels transcrits sont présents, identification de nouveaux sites de coupure

d'ARN, sites d'édition d'ARN) et quantitativement (combien de chaque transcrit est exprimé). Cela permet de comprendre les processus de transcription et d'expression génique.

La protéomique est utilisée pour quantifier l'abondance des peptides ou des protéines, les modifications et les interactions des protéines. Les méthodes basées sur la spectrométrie de masse ont révolutionné l'analyse des protéines, permettant des études à haut débit de milliers de protéines dans des cellules ou des fluides corporels. La protéomique peut également révéler des informations sur les modifications post-traductionnelles des protéines.

La métabolomique quantifie simultanément de multiples types de petites molécules, telles que les acides aminés, les acides gras, les glucides, qui sont des produits des fonctions métaboliques cellulaires. Les niveaux de métabolites et les ratios relatifs reflètent la fonction métabolique et les perturbations en dehors des plages normales sont souvent indicatives de maladies.

La microbiomique est une discipline en plein essor qui explore l'ensemble des micro-organismes d'une communauté donnée. Cela inclut les bactéries, les virus et les champignons qui colonisent diverses parties du corps humain, comme la peau, les muqueuses et l'intestin. Le microbiome humain est extrêmement complexe et des perturbations dans la composition du microbiome ont été liées à diverses maladies.

3.2.2. Technologies digitales

Les pipelines bio-informatiques jouent un rôle essentiel dans l'environnement digital de la biologie des systèmes pour analyser des données omiques complexes. Un pipeline bio-informatique est une série séquentielle de processus d'analyse de données informatiquement complexes, allant de la récupération des données brutes à la production des résultats finaux. Cette série de processus comprend le traitement des données, l'analyse des données et l'interrogation des bases de données de référence. Ces analyses complexes sont effectuées à l'aide des logiciels spécialisés ainsi que des langages de programmation comme R ou Python. Les technologies à haut débit utilisées dans les sciences omiques génèrent un volume important de données (l Go à plus de 150 Go). Le stockage et l'analyse de ses données peut constituer un problème. En effet, les outils précédemment cités ont

parfois des complexités qui augmentent exponentiellement avec la taille des données, ce qui peut nécessiter d'importantes capacités de calculs. Afin de faciliter le pipeline, des compétences en « big data », l'utilisation d'infrastructure et de logiciels adaptés aux « data-mining » sont de plus en plus nécessaires.

3.3. Analyse des données

Lors d'une étude clinique classique, la base de données regroupant les résultats obtenus possède peu de dimensions, c'est-à-dire que les variables étudiées dans chaque échantillon/patient sont peu nombreuses et bien inférieures au nombre d'échantillons étudiés qui lui est important. La situation est inversée lors d'une étude omique où le nombre de variables analysées dépasse largement le nombre d'échantillons utilisés. Les outils statistiques conventionnels des études cliniques classiques sont souvent insuffisants pour appréhender la complexité des jeux de données omiques. Ceci exige l'utilisation d'outils de statistiques et de modélisations adaptés à l'analyse des données à haute dimension.

Pour analyser des données omiques, il est essentiel de maîtriser un ensemble d'outils statistiques et informatiques spécifiques. Ces outils s'organisent en deux approches complémentaires, supervisées et non supervisées.

Les approches non supervisées sont essentielles pour l'exploration initiale des données omiques et permettre une première vue d'ensemble. Un des outils le plus couramment utilisé est l'Analyse en Composantes Principales (PCA). Cette technique concentre la variance des données en un nombre limité de composantes principales, ce qui permet de réduire la dimensionnalité du jeu de données. Cette approche permet une visualisation simple en minimisant la perte d'information, ce qui facilite la détection d'échantillons aberrants, de tendances ou de séparations en groupes. Une autre méthode utile est le Regroupement Hiérarchique avec Dendrogramme, qui organise visuellement les données en regroupant les échantillons similaires entre eux.

Les approches supervisées, en revanche, sont orientées vers la création de modèles prédictifs. Elles visent à prédire le mieux possible l'appartenance de chaque échantillon à un groupe prédéfini. L'une des méthodes fréquemment utilisées est la Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA). L'évaluation de la performance du modèle permet d'estimer si le jeu de données contient des éléments permettant la séparation attendue. Si le

modèle est suffisamment bon, il est alors possible d'en extraire les variables qui sont les plus contributives à la séparation. Il existe de nombreux modèles utilisables, chacun ayant ses avantages et inconvénients. Une bonne connaissance préalable de ces modèles permet de choisir le plus adapté au problème posé. Le principal inconvénient à utiliser des approches supervisées est le risque de « overfitting » (surapprentissage), un phénomène où le modèle s'adapte trop précisément aux données d'apprentissage. Les constatations apportées par ces deux approches doivent ensuite être confirmés par une analyse statistique approfondie en tenant compte des potentiels facteurs confondants. A cette fin, des modèles statistiques comme la régression linéaire ou les analyses de la variance (ANOVA) sont souvent utilisés. Les statistiques bayésiennes sont également utilisables pour donner une appréciation statistique de la crédibilité des résultats.

3.4. Analyse des réseaux et théorie des graphes

La notion de réseau est importante pour bien comprendre la biologie des systèmes. Dans sa définition la plus minimaliste, un réseau est un ensemble de nœuds et de liens entre ces nœuds. Un nœud peut représenter n'importe quels éléments d'un système et un lien n'importe quelles relations entre les nœuds. La formulation mathématique des réseaux est la théorie des graphes [212] qui a permis la conceptualisation d'une série de propriétés et de descripteurs propres aux réseaux. Ces propriétés permettent d'analyser et de caractériser la topologie d'un réseau, qu'il s'agisse d'un réseau social, biologique, ou autre. Elles sont essentielles pour comprendre les motifs et les propriétés qui émergent au sein du réseau.

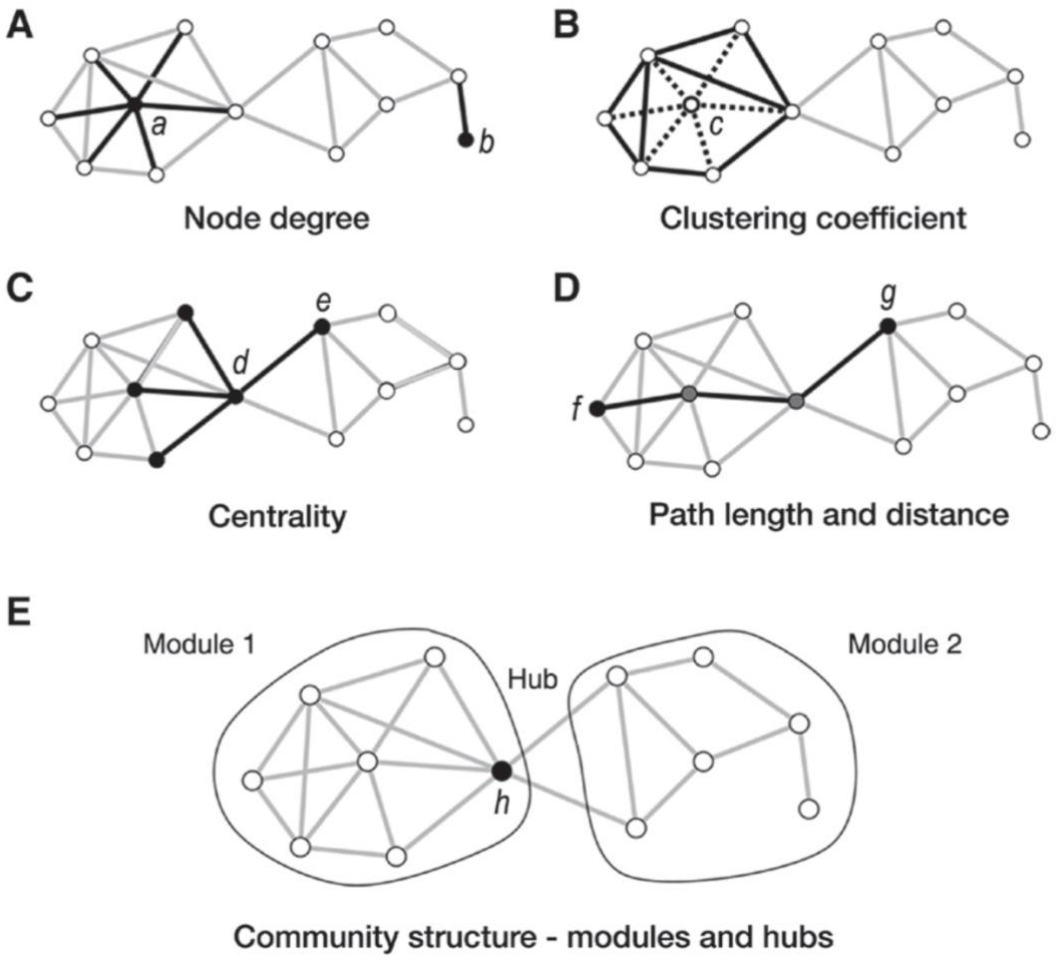


Figure IV-2. Les propriétés de base d'un réseau.

Ces propriétés sont essentielles pour comprendre sa structure et son fonctionnement. Cette figure illustre différentes propriétés basiques à l'aide d'un graphe non orienté simple composé de 12 nœuds et 23 arêtes. (A) Le degré d'un nœud est le nombre d'arêtes qui y sont attachées. Par exemple, le nœud a a un degré de 6 car il est relié à 6 autres nœuds, tandis que le nœud périphérique b a un degré de 1 car il n'est connecté qu'à un seul autre nœud. (B) Le coefficient de clustering mesure dans quelle mesure les nœuds ont tendance à former des groupes ou des clusters. Cela permet de quantifier la ségrégation dans un réseau. Dans l'exemple donné, le nœud central c a 6 voisins et il y a 15 connexions possibles entre ces 6 voisins. Sur ces 15 connexions possibles, 8 sont effectivement présentes. Ainsi, le coefficient de clustering est de 0,53, indiquant une forte tendance des voisins de c à être connectés. (C) La centralité est utilisée pour identifier les nœuds les plus influents au sein d'un réseau. Dans un réseau social, cela pourrait représenter la personne la plus influente. Dans l'exemple, le nœud d contribue le plus à la centralité car tous les nœuds du côté droit passent par le nœud d pour atteindre les autres nœuds du côté gauche. (D) La longueur du chemin est la moyenne des distances les plus courtes entre toutes les paires de nœuds dans un réseau. Par exemple, la longueur du chemin le plus court entre les nœuds f et g est de trois étapes, passant par deux nœuds intermédiaires. (E) La modularité est une mesure de la structure d'un réseau qui reflète la force de division du réseau en modules, également appelés groupes, clusters ou communautés. Dans l'exemple donné, le réseau se divise en deux modules interconnectés par le nœud central h.

La formulation abstraite des systèmes en réseaux possède plusieurs atouts majeurs :

- La structure du réseau peut suffire à elle seule pour modéliser une fonction (Figure ////)

- Un réseau n'a pas de dimension. En effet, seule compte la nature des nœuds et des liens. Cette absence de dimension permet l'intégration de données de natures radicalement différentes.

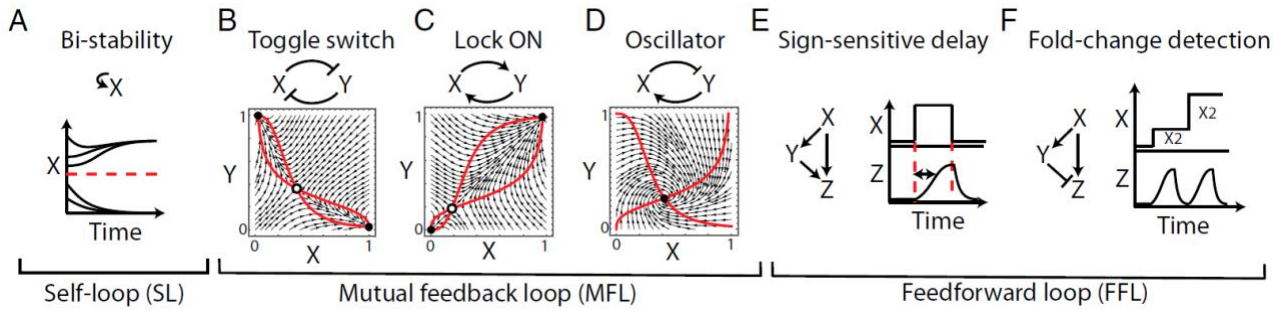


Figure IV-3. Les propriétés dynamiques émergentes des combinaisons de motifs de réseau.

Ces propriétés sont essentielles pour comprendre comment les réseaux complexes fonctionnent. Trois classes de circuits considérées comme des blocs de construction minimaux sont représentés. (A) Boucle Autonome (Self-Loop) est une configuration dans un réseau où un nœud est relié à lui-même par une arête. En d'autres termes, il y a une connexion qui part du nœud et revient au même nœud. Cette boucle signifie que le nœud peut s'auto-moduler. Dans de nombreux cas, une boucle autonome peut conduire à des comportements spécifiques, tels que l'auto-renforcement ou l'auto-inhibition du nœud, en fonction de la nature de la relation entre le nœud et sa propre boucle. (B-D) Boucle de Rétroaction Mutuelle (Mutual Feedback Loop) est une structure dans laquelle deux nœuds ou plus sont interconnectés de telle manière qu'ils s'influencent mutuellement. Les boucles de rétroaction mutuelle peuvent donner lieu à des comportements dynamiques, y compris des oscillations. (E-F) Boucle Avant (Feedforward Loop) est une configuration où l'information circule d'un nœud source vers un nœud cible via un nœud intermédiaire. Ces structures sont couramment utilisées pour décrire des processus de régulation, de détection. Elles permettent de moduler et de contrôler la transmission de l'information dans le réseau. Dans les diagrammes les cercles noirs représentent des points fixes stables et les cercles blancs des points instables. [213]

4. Propriétés des réseaux biologiques

Les réseaux biologiques possèdent des propriétés émergentes, c'est-à-dire des caractéristiques qui ne peuvent être prédites à partir de la connaissance des composants individuels du système. Par exemple, la vie elle-même est une propriété émergente qui résulte des actions et interactions complexes de l'ADN, de l'ARN, des protéines, des glucides et des lipides. Pour comprendre ces propriétés émergentes, il est nécessaire d'adopter une perspective systémique, car les approches réductionnistes simples ne suffisent pas. Une autre caractéristique importante des réseaux biologiques est leur robustesse. Les systèmes biologiques maintiennent une stabilité phénotypique face à diverses perturbations, que ce soient des changements de l'environnement, des événements aléatoires ou des variations génétiques. Cette robustesse découle de mécanismes tels que les boucles de rétroaction

(feed-back) positives et négatives qui limitent les fluctuations géniques et isolent le système des perturbations extérieures. La rétroaction positive peut rendre le système plus sensible, tandis que la rétroaction négative atténue le bruit et repousse les perturbations. La robustesse est une caractéristique inhérente à l'évolution des systèmes biologiques. En outre, les réseaux biologiques sont organisés de manière modulaire. Les modules sont des ensembles de composants qui interagissent pour accomplir une fonction spécifique, que ce soit du point de vue de l'ingénierie ou de la biologie. Cette modularité contribue à la robustesse du système en limitant les dommages aux parties séparables et facilite l'évolution en permettant la réorganisation des modules. De plus, la modularité empêche la propagation des défaillances d'une partie du réseau à l'ensemble du système, réduisant ainsi le risque de perte de fonctionnalité.

En résumé, les réseaux biologiques présentent des propriétés émergentes, une robustesse face aux perturbations et une organisation modulaire. Ces caractéristiques sont essentielles pour comprendre le fonctionnement des systèmes biologiques, ainsi que d'autres systèmes complexes. Elles ont des implications importantes dans des domaines tels que la biologie, l'ingénierie des réseaux et la gestion des systèmes.

5. Médecine des systèmes et médecine de précision

Le concept de médecine de précision vise à personnaliser la prise en charge médicale en fonction des caractéristiques de chaque patient, aussi bien sur le plan clinico-biologique, psychologique et environnemental. Ceci permet aussi de stratifier les individus en sous-populations présentant des différences de susceptibilité à une maladie particulière ou de réponse à un traitement spécifique. L'objectif est d'orienter les interventions préventives ou thérapeutiques vers ceux qui en bénéficieront, tout en épargnant des dépenses et des effets secondaires inutiles à ceux pour qui ces interventions ne seront pas efficaces.

CHAPITRE V : OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif de projet de cette thèse en sciences repose sur la caractérisation omique et phénomique de deux maladies lysosomales, la maladie de Fabry et la maladie de Gaucher. L'approche principale de cette recherche est basée sur l'utilisation de techniques de protéomique et de métabolomique plasmatiques. Cette démarche permet de mettre en lumière les altérations moléculaires sous-jacentes, offrant ainsi une meilleure compréhension des mécanismes métaboliques sous-tendant ces deux maladies.

Ainsi, ce travail permettra de mettre en place des signatures protéomiques et métabolomiques spécifiques à chaque maladie et de déterminer ainsi des éventuels marqueurs moléculaires qui pourraient servir à des fins de diagnostic ou de suivi de l'évolution de la pathologie et d'explorer les voies métaboliques perturbées.

Par ailleurs, au cours de cette thèse des développements analytiques ont été réalisés pour évaluer le dosage des activités des enzymes lysosomales sang séché sur buvard et le dosage des lysosphingolipides (biomarqueurs de sphingolipidoses) sur sang séché sur buvard et plasma. L'objectif est de mettre en place des méthodes robustes et reproductibles pour garantir la qualité des résultats obtenus et pour faciliter l'application future de ces techniques dans un contexte clinique.

La partie expérimentale est présentée en trois chapitres :

Chapitre 1 : Maladie de Fabry

Chapiter 2 : Maladies de Gaucher

Chapitre 3 : Développements analytiques

Partie II : Travail expérimental

CHAPITRE I : MALADIE DE FABRY (ARTICLES I ET II)

La première partie du travail expérimental a concerné l'exploration omique de la maladie de Fabry. La maladie de Fabry est une maladie lysosomale liée à l'X due à un déficit de l'activité de la galactosidase A lysosomale (GalA), une enzyme clé dans la voie de dégradation des glycosphingolipides. Cette maladie complexe peut entraîner des atteintes rénales, cardiaques ou du système nerveux central, réduisant significativement l'espérance de vie. L'avènement des technologies omiques offre la possibilité d'explorer de façon globale, intégrée et systémique mécanismes qui sous-tendent la MF.

Un premier projet a consisté à appliquer une approche métabolomique ciblée. Soixante-six plasmas de patients atteints de MF de la cohorte française de Fabry (FFABRY) et 60 plasmas témoins ont été analysés à l'aide de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse ciblée (188 métabolites), ainsi que de la détermination de la concentration en LysoGb3 et de l'activité enzymatique de la GalA. Des analyses univariées conventionnelles ainsi que des méthodes de biologie des systèmes et d'apprentissage automatique ont été utilisées.

Ce travail a permis d'identifier des profils métaboliques discriminants permettant la séparation des patients atteints de la MF des sujets témoins. L'analyse a identifié 86 métabolites différentiellement exprimés, comprenant 62 glycérophospholipides, 8 acylcarnitines, 6 sphingomyélines, 5 acides aminés et 5 amines biogènes. Treize métabolites de prédictifs ont été identifiés : 1 amine biogène, 2 lysophosphatidylcholines et 10 glycérophospholipides. Un modèle prédictif utilisant ces métabolites a montré une AUC-ROC de 0,992 (IC : 0,965-1,000).

L'identification de biosignatures pathologiques spécifiques permet de mieux comprendre la maladie et en particulier le rôle important des glycérophospholipides et du stress oxydant dans sa physiopathologie. Il convient d'envisager de combiner des traitements spécifiques avec un traitement anti-oxydant et d'utiliser le méthione sulfoxide comme biomarqueur pour le suivi du traitement. Ces résultats mettent en lumière un remodelage métabolique

profond dans la MF et confirment le potentiel des approches omiques dans les maladies lysosomales pour révéler des associations cliniques et biologiques afin de générer des hypothèses physiopathologiques.

Mon rôle dans ce projet a porté sur la génération des données métabolomiques, le contrôle qualité, l'analyse, l'intégration, la visualisation et l'interprétation des données clinico-biologiques. J'ai participé à la rédaction du manuscrit.

Ce travail a été valorisé par une publication dans Journal of Personalized Medicine en 2021.

> ***Ducatez F**, Mauhin W, Boullier A, Pilon C, Pereira T, Aubert R, Benveniste O, Marret S, Lidove O, Bekri S, Tebani A. Parsing Fabry Disease Metabolic Plasticity Using Metabolomics. J Pers Med. 2021 Sep 8;11(9):898.*

Le deuxième projet repose sur l'analyse protéomique ciblée utilisant des technologies de protéomique de nouvelle génération incluant 1463 protéines. Nous avons examiné les profils protéiques plasmatiques de patients atteints de la maladie de Fabry (n = 55) par rapport à des témoins (n = 30). Des approches de biologie des systèmes et d'apprentissage automatique ont été appliquées. L'analyse a révélé des profils protéomiques distinguant clairement les patients atteints de la MF des témoins (615 protéines différentiellement exprimées, 476 surexprimées et 139 sous-exprimées), dont 365 protéines nouvellement identifiées. Nous avons observé un remaniement fonctionnel de plusieurs processus, tels que les voies médiées par les cytokines, la matrice extracellulaire et le protéome vacuolaire/lysosomal. Nous avons exploré le remodelage métabolique spécifique au tissu et identifié une signature protéique consensuelle robuste comprenant 17 protéines : CD200, SPINT1, CD34, FGFR2, GRN, ERBB4, AXL, ADAM15, PTPRM, IL13RA1, NBL1, NOTCH1, VASN, ROR1, AMBP, CCN3 et HAVCR2.

Dans le cadre de ce projet, j'ai participé à l'analyse, l'intégration, la visualisation et l'interprétation des données clinico-biologiques.

Ces résultats ont été valorisés par une publication dans Translational Research en 2023.

> *Tebani A, Barbey F, Dormond O**, Ducatez F**, Marret S, Nowak A, Bekri S. Deep next-generation proteomics and network analysis reveal systemic and tissue-specific patterns in Fabry disease. Transl Res. 2023 Aug;258:47-59.*

Translational Research 000 (2023) 1–13

Contents lists available at ScienceDirect

Translational Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jagp

Deep next-generation proteomics and network analysis reveal systemic and tissue-specific patterns in Fabry disease

Abdellah Tebani [1], Frédéric Barbey [2], Olivier Dormond [3], Franklin Ducatez [1,4], Stéphane Marret [4], Albina Nowak [5], Soumeya Bekri [1,*]

[1] Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245, CHU Rouen, Department of Metabolic Biochemistry, Rouen, France
[2] University of Lausanne and University Hospital of Lausanne, Department of Immunology, Switzerland
[3] Lausanne University Hospital and University of Lausanne, Department of Visceral Surgery, Lausanne, Switzerland
[4] Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245, CHU Rouen, Department of Neonatal Pediatrics, Intensive Care, and Neuropediatrics, Rouen, France
[5] University Hospital and University of Zurich, Department of Endocrinology and Clinical Nutrition, Zurich, Switzerland

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Fabry disease (FD) is an X-linked lysosomal rare disease due to a deficiency of α-galactosidase A activity. The accumulation of glycosphingolipids mainly affects the kidney, heart, and central nervous system, considerably reducing life expectancy. Although the accumulation of undegraded substrate is considered the primary cause of FD, it is established that secondary dysfunctions at the cellular, tissue, and organ levels ultimately give rise to the clinical phenotype. To parse this biological complexity, a large-scale deep plasma targeted proteomic profiling has been performed. We analyzed the plasma protein profiles of FD deeply phenotyped patients (n = 55) compared to controls (n = 30) using next-generation plasma proteomics including 1463 proteins. Systems biology and machine learning approaches have been used. The analysis enabled the identification of proteomic profiles that unambiguously separated FD patients from controls (615 differentially expressed proteins, 476 upregulated, and 139 downregulated) and 365 proteins are newly reported. We observed functional remodeling of several processes, such as cytokine-mediated pathways, extracellular matrix, and vacuolar/lysosomal proteome. Using network strategies, we probed patient-specific tissue metabolic remodeling and described a robust predictive consensus protein signature including 17 proteins CD200, SPINT1, CD34, FGFR2, GRN, ERBB4, AXL, ADAM15, PTPRM, IL13RA1, NBL1, NOTCH1, VASN, ROR1, AMBP, CCN3, and HAVCR2. Our findings highlight the pro-inflammatory cytokines' involvement in FD pathogenesis along with extracellular matrix remodeling. The study shows a tissue-wide metabolic remodeling connection to plasma proteomics in FD. These results will facilitate further studies to understand the molecular mechanisms in FD to pave the way for better diagnostics and therapeutics.

Introduction

Fabry disease (FD; OMIM #301500) is a rare X-linked lysosomal disease (LD) due to a deficiency in the α-galactosidase A (GalA) activity.[1,2] This leads to the progressive storage of glycosphingolipids such as globotriaosylceramide (Gb3) and globotriaosylsphingosine (Lyso-Gb3)[2] in multiple cell types, including endothelial, vascular, renal, cardiac, and nervous cells.[3] There are 2 major phenotypes, classic and late-onset. In the classic phenotype, the GalA activity is absent or minimal (<3% of mean normal), leading to early onset of acroparesthesia, angiokeratoma, cornea verticillate, and hypohidrosis. In adulthood, the severity of the glycosphingolipid-load causes direct cellular toxic effects and promotes cell proliferation, inflammatory response, and fibrotic process. These pathogenic mechanisms result in hypertrophic cardiomyopathy, chronic proteinuric nephropathy, recurrent strokes, and premature death.[4–6] The later-onset phenotype is the most prevalent.[7] In this form, patients have a residual GalA activity (up to 25% of mean normal)[8] and develop no accumulation of Gb3 in endothelial cells. Males are generally asymptomatic during childhood but, as adults, may develop hypertrophic cardiomyopathy similar to that of the classic form, which is rarely associated with a nephropathy.[9,10] In heterozygous females, GalA activity can range from low to normal, mostly leading to milder symptoms

Abbreviations: AUC, Area Under the Curve; FD, Fabry Disease; ECM, Extracellular matrix; LD, Lysosomal Disease; GO, Gene Ontology; NPX, Normalized Protein Expression; NGS, Next-Generation Sequencing; PCA, Principal Component Analysis; PEA, Proximity Extension Assay; OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man; QC, Quality Control; UMAP, Uniform Manifold Approximation and Projection

* Reprint requests: Soumeya Bekri, Department of Metabolic Biochemistry, Rouen University Hospital, 1 rue de Germont, 76000 ROUEN Cedex, France.
E-mail address: soumeya.bekri@chu-rouen.fr (S. Bekri).

AVAILABILITY OF DATA: All the data that support the findings are presented in the manuscript and the supplementary material.

https://doi.org/10.1016/j.trsl.2023.02.006
Received 28 September 2022; Revised 18 January 2023; Accepted 21 February 2023

1931-5244/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

Please cite this article as: A. Tebani et al., Deep next-generation proteomics and network analysis reveal systemic and tissue-specific patterns in Fabry disease, Translational Research (2023), https://doi.org/10.1016/j.trsl.2023.02.006

At A Glance Commentary

Abdellah T, et al.

Background

Fabry disease is a rare X-linked lysosomal disease (LD) due to a deficiency in the α-galactosidase A (GalA) activity. In adulthood, this leads to hypertrophic cardiomyopathy, proteinuric nephropathy, recurrent strokes, and premature death. This work aims to use omics profiling coupled with systems biology to disentangle the disease complexity and help its diagnosis.

Translational Significance

To our knowledge, this is the most extensive targeted plasma proteomics study of Fabry disease. This work shows deep systemic and tissue-specific metabolic remodeling and describes a predictive proteomic signature to identify Fabry disease.

than in males. Still, it can present very heterogeneous phenotypes due to random X-chromosomal inactivation.[11,12] A better understanding of the role of the lysosome and metabolic pathways involved in FD may allow the identification of reliable diagnostic biomarkers, which is essential for an early and efficient therapeutic intervention. Our understanding of the mechanisms underlying FD and LD, in general, has significantly evolved since the multifaceted roles of the lysosome were characterized. The primary function classically attributed to lysosomes is the degradation of macromolecules. Still, it has been recently demonstrated that lysosomes participate in many other cellular processes, including antigen presentation, plasma membrane repair, cell adhesion, migration, apoptotic cell death, metabolic signaling, interorganelle communication, and gene regulation.[13,14] Lysosomes move rapidly through the cell and are distributed in several pools with different functions depending on their spatiotemporal characteristics.[15] Significantly, this ability to move and interact with other cellular compartments underlies the sprawling involvement of the lysosome in many processes and gives it a central role in cellular homeostasis. This expansion of functions and their close interaction adds layers to the biological complexity of the lysosome in health and disease. This could explain the dysfunction in LDs and common conditions such as cancers, neurodegenerative diseases, and autoimmune diseases. To parse this complexity, we need to interrogate cell biology in a broader scope and breath using multiscale molecular investigations. This holistic perspective aims to be unbiased, data-driven and hypothesis-free.[16] This work tests the hypothesis that a distinct systemic proteomic signature exists in FD. Different studies have been previously reported in FD using proteomic-based strategies.[17–28] Our work presents the deepest targeted plasma proteomics profiling in inherited metabolic diseases and FD to date. It also offers widespread tissue and cell type perspectives on biological plasticity at a Fabry patient level.

Methods

Patients and blood samples

Blood samples were retrieved from the Swiss Fabry cohort with FD's enzymatic and/or genetic diagnosis. Human control plasma samples with no significant medical conditions were purchased from Biovit (West Sussex, UK). A total of 55 patients were included: 40 with classic phenotype, including 27 females and 13 males, and 15 with late-onset phenotype, including 10 females and 5 males. Molecular variants have been characterized in 54 patients (39 classical and 15 late onset). All these characteristics are presented in Supplementary Tables I and II. Human control plasmas with no significant medical conditions were purchased from Biovit (West Sussex, UK). Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Proteomic profiling

Plasma proteins were analyzed using a multiplex proximity extension assay (PEA) technology with high throughput sequencing readout (Olink Explore). The entire library consists of specific antibodies targeting 1472 proteins, including 1463 unique proteins and 48 controls. Each antibody is labeled with unique PEA oligonucleotide probes, 2 separate and complementary sequences. The conjugated antibodies are mixed into 4 different 384-plex panels (372 proteins and 12 internal controls used for QC and normalization) focused on inflammation, oncology, cardiometabolic and neurology proteins (http://www.olink.com). Briefly, samples were randomized, and 2.8 μL of plasma were incubated overnight with antibodies conjugated to PEA probes at +4°C. A combined extension and preamplification mix were added to the incubated samples at room temperature for PCR amplification following the immune reaction. The PCR amplicons were pooled after that before a second PCR amplification step was performed with individual sample index sequences additions. After pooling samples, bead purification and QC of the generated libraries were followed on a Bioanalyzer. Finally, the sequencing was carried out using Illumina's NovaSeq 6000 instrument using 2 S1 flow cells with 2×50 bases read lengths. Counts of known barcode sequences were then translated into normalized protein expression (NPX) units through a QC and normalization process. NPX is a relative protein quantification unit on a log2 scale, and values are calculated from the number of matched counts on the NovaSeq run. Data generation of NPX consists of 3 main steps: normalization to the extension control (known standard), log2-transformation, and level adjustment using the plate control (plasma sample). After quality control, 1463 proteins were included in the analysis.

Data analysis

Data analysis and visualization were performed using R (v4.0.0) with the tidyverse suite R packages[29] and the ggplot2 R package.[30] Missing values were imputed using the nearest neighbor averaging algorithm in the impute.knn function of the imputeR package. Euclidean distance was used as a similarity measure in the clustering analysis. Principal Component Analysis was used as a dimension reduction technique using scaled NPX values using the R package pcaMethods. Mixed-effect modeling was performed using the lme4 package[31] and Kenward-Roger approximation[32] to calculate p-values. False discovery rates were corrected using the Benjamini–Hochberg–Yekutieli method[33] and $P < 0.05$ was considered statistically significant. For network analysis, the first step was to compute a Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) with 20 components and 1000 iterations to obtain a robust dimension reduction of the dataset. In this new embedding space, the Euclidean distances between each 2 proteins were calculated and the top shortest 5% were selected to construct a similarity network (SN). This step was done using the UMAP analysis was performed using the UMAP package.[34] Three types of SNs were calculated: control + disease samples, control samples only, and all networks: control + "disease-minus-one-patient." Networks were then pruned with each other to get specific networks. This pruning step removes edges present simultaneously in both networks. Pruning the "disease + control" network with the "control" network keeps only disease-specific edges, resulting in a "disease-specific" network. This step has been accomplished using the CTD R package.[35] Using the same strategy, networks of controls + "disease-minus-one" samples were pruned with the control samples network to obtain a "disease-specific-minus-one-patient" network, which was then pruned with the "disease-specific" network computed above to extract "patient-specific" proteomic signatures. The proteins present in at least 60 % of

all these "patient-specific" networks were selected to build a Consensus Network and enable the visualization of critical proteomic signatures for the disease. To test the discriminatory power of this consensus signature, Random Forest models were built and tuned for every possible combination of proteins from the Consensus Network and using the ranger package.[36] Performances of the models were assessed with the MLeval package in R. The primary metric for predictive performance assessment was the area under the curve (AUC) for the resulting receiver operating characteristic curve.[37]

Results

Cohort characteristics

We analyzed 85 unique subjects, including 30 controls (15 males and 15 females) and 55 Fabry patients (18 males and 37 females). For the controls age, 15 males (mean age: 40 years, age range: 19−59) and 15 females (mean age: 39 years, age range: 21−56). We classified patients by phenotype groups: classic (n = 40) and late-onset (n = 15) (Fig 1A and B). For classic phenotype males (n = 13, mean age: 38 years, age range: 12−66) and females (n = 27, mean age: 40 years, age range: 20 −77). For late-onset phenotype males (n = 5, mean age: 40 years, age range: 21−56) and females (n = 10, mean age: 34 years, age range: 20 −46 years). The age distribution is presented in Fig 1C. No significant differences in age, sex, or phenotype groups were observed. Regarding molecular analysis, in classic patients, the observed variants include 22 missense, 7 nonsense, 6 insertions, 6 deletions, 1 splicing, whereas only missense variants are observed in late-onset patients (15 variants). For classic phenotype group, the clinical features that were observed were: cornea verticillata 34 (85%), neuropathic pain 21 (52%), angiokeratoma 20 (5%), hypertrophic cardiomyopathy 15 (38%), sudation disorder 13 (32%), deafness 8 (20%), ischemic stroke 6 (15%), arrhythmia 4 (10%), kidney transplantation 2 (5%), pacemaker 2 (5%), aorta dilation 1 (2.5%), defibrillator 1 (2.5%), and venous thrombosis 1 (2.5%). For non-classic patients (n = 15): hypertrophic cardiomyopathy 3 (20%), arrhythmia 3 (20%), cornea verticillata 2 (13%), deafness 2 (13%), angiokeratoma 1 (6.7%), sudation disorder 1 (6.7%), ischemic stroke 1 (6.7%), aorta dilation 1 (6.7%), defibrillator 1 (6.7%). Clinical features are presented in Fig 1D and summarized in Table I. The overall summary of the cohort is presented in Fig 1B. All patients' characteristics are presented in Supplementary Tables I and II.

Unsupervised exploratory analysis

We analyzed 1463 unique plasma proteins using PEA on the Olink platform (Olink Explore 1536) in all samples (Supplementary Tables III and IV). Unsupervised analysis of the samples using protein levels shows apparent clustering by sample group (Fabry vs Control) as presented by the principal component analysis (Fig 2A). This separation is mainly observed on the PC1 dimension, which explains alone 35.3% of the variance of the dataset. The PCA scores matrices are presented in Supplementary Table V. However, no separation was observed regarding sex or phenotype (Fig 2B and C). Furthermore, the hierarchical clustering of samples colored by sample group indicates a clustering in each group (Fig 2D). The heatmap clearly shows 2 main clusters belonging to Fabry and Control samples. The respective proteomic profile drives this clustering in each sample. The total data matrix is presented in Supplementary Table III.

Distinct plasma protein profiles between Fabry and control individuals

We performed a linear mixed effect modeling between the 2 groups, Fabry vs Control samples, with adjustment for age and sex. The analysis allowed for identifying proteomic profiles that unambiguously separate FD patients from controls. All proteins with adjusted p-value < 0.05 and fold change > 2 are considered significant. We identified 615 differentially expressed proteins (476 upregulated and 139 downregulated). The complete list of proteins and their related statistics are presented in Supplementary Table VI. The top 20 proteins are presented in (Fig 3). The top upregulated proteins include: NSFL1C (adjusted $P = 6.4 \times 10\text{-}43$, fold change = 5.09), STIP1 (adjusted $P = 1.6 \times 10^{-38}$, fold change = 4.96), GLO1 (adjusted $P = 6.2 \times 10^{-36}$, fold change = 5.73), BLVRB (adjusted $P = 1.1 \times 10^{-32}$, fold change = 5.13), CA2 (adjusted $P = 2.7 \times 10^{-29}$, fold change = 5.99), SF3B4 (adjusted $P = 1.6 \times 10^{-27}$, fold change = 4.9), LXN (adjusted $P = 6.1 \times 10^{-27}$, fold change = 5.37), PPME1 (adjusted $P = 7.4 \times 10\text{-}25$, fold change = 4.97), STAT5B (adjusted $P = 6.6 \times 10^{-24}$, fold change = 5.5), CALCOCO1 (adjusted $P = 2.6 \times 10\text{-}22$, fold change = 4.97). The top downregulated proteins include: BGN (adjusted $P = 2 \times 10\text{-}39$, fold change = -4.43), HS6ST1 (adjusted $P = 6.2\ 10^{-34}$, fold change = -2.73), TFRC (adjusted $P = 9.1 \times 10^{-30}$, fold change = -2.42), CKMT1A_CKMT1B (adjusted $P = 1.1 \times 10^{-19}$, fold change = -3.28), BMP4 (adjusted $P = 4.5 \times 10^{-19}$, fold change = -2.28), CCN1 (adjusted $P = 4 \times 10^{-17}$, fold change = -2.31), DRAXIN (adjusted $P = 8.1 \times 10^{-17}$, fold change = -2.05), GAL (adjusted $P = 1.7 \times 10^{-14}$, fold change = -2.38), FABP1 (adjusted $P = 2.4\ 10^{-08}$, fold change = -2.1), GCG (adjusted $P = 10^{-07}$, fold change = -2.02). To confirm the expression trends, some differentially expressed proteins were also measured using an ELISA method that confirmed the observed trends for the selected proteins (STIP1, FGF2, and IL7). Results are shown in Supplementary Fig 1. Furthermore, to explore the association between protein expression and residual activity, we have computed the correlation of the abovementioned top proteins with residual enzyme activity. Six proteins have shown a significant correlation. These include AMBP (R2 = -0.52, adjusted P-value = 0.0078), CCN3 (R2 = -0.47, adjusted P-value = 0.0246), FGFR2 (R2 = -0.41, adjusted P-value = 0.0383), HAVCR2 (R2 = -0.42, adjusted P-value = 0.0351), NBL1 (R2 = -0.55, adjusted P-value = 0.0052), VASN (R2 = -0.41, adjusted P-value = 0.0377). The correlation scatter plots are shown in Supplementary Fig 2.

Functional analysis

For a systematic evaluation of biological functions related to the differentially expressed proteins, we quantified the statistical significance of enrichment of proteins with the association in proteome tissue specificity and gene ontology terms.[38] The overall results are presented in Fig 4. The top enriched tissues are presented in Fig 4A and include: lymphoid tissue (proteins: n = 77), bone marrow (proteins: n = 71), brain (proteins: n = 42), liver (proteins: n = 41), intestine (proteins: n = 30), skeletal muscle (proteins: n = 28), urinary bladder (proteins: n = 17), esophagus (proteins: n = 15), kidney (proteins: n = 15), lung (proteins: n = 12), salivary gland (proteins: n = 12), testis (proteins: n = 12), tongue (proteins: n = 12), retina (proteins: n = 11), adipose tissue (proteins: n = 10), placenta (proteins: n = 10), stomach (proteins: n = 10), gallbladder (proteins: n = 9), heart muscle (proteins: n = 8), pancreas (proteins: n = 8), cervix (proteins: n = 7), choroid plexus (proteins: n = 7), thyroid gland (proteins: n = 7), skin (proteins: n = 6), endometrium (proteins: n = 5), parathyroid gland (proteins: n = 5), adrenal gland (proteins: n = 5), ovary (proteins: n = 5), pituitary gland (proteins: n = 4), seminal vesicle (proteins: n = 4), smooth muscle (proteins: n = 3), vagina (proteins: n = 3), fallopian tube (proteins: n = 2), breast (proteins: n = 2), prostate (proteins: n = 1). To define the functional relevance of the differentially expressed proteins, we also performed enrichment analyses that measure the importance of a group of proteins' overlap with an annotated group of proteins known for their specific biological role. We performed gene ontology analysis, including GO biological process, GO cellular component, GO molecular function, and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). All results are presented in Supplementary Tables VII. We plotted the most important pathways based on the adjusted P-value in Fig 4B. For biological processes, the main items were: cytokine-mediated signaling pathway (adjusted $P = 3.3 \times 10^{-48}$), cellular response to cytokine stimulus (adjusted

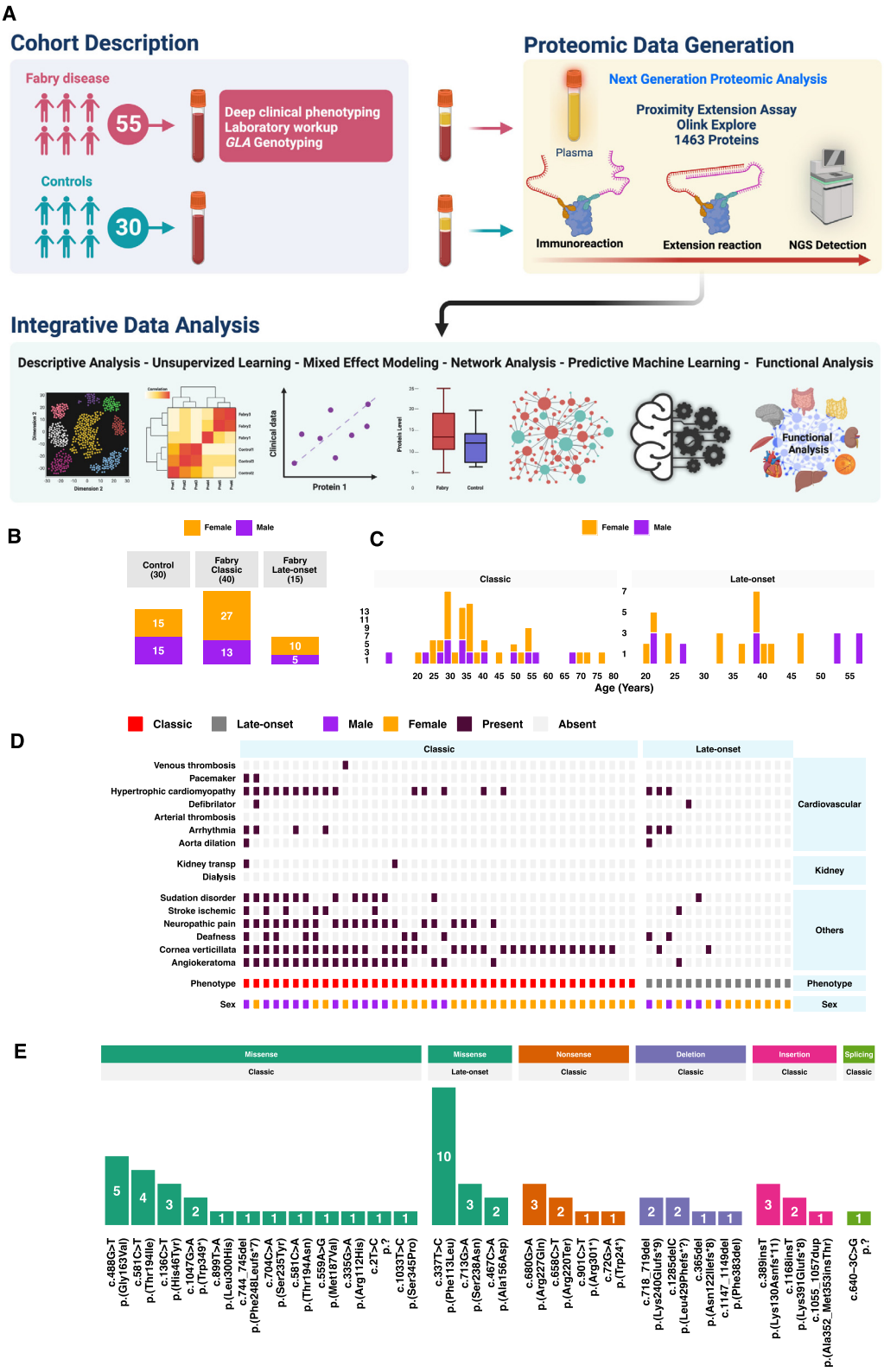


Fig. 1. Overview of the study design and cohort. **A**, Cohort description and overview of the data generation and analysis including 55 Fabry patients and 30 controls. **B**, Phenotype and sex description. **C**, Age distribution in classic and late-onset phenotype. **D**, Clinical presentation overview of the cohort. **E**, Molecular analysis and variant distribution regarding phenotype classes.

$P = 1.7 \times 10^{-41}$), regulation of cell population proliferation (adjusted $P = 7.1 \times 10^{-34}$), positive regulation of cell population proliferation (adjusted $P = 5.1 \times 10^{-30}$), positive regulation of protein phosphorylation (adjusted $P = 5.1 \times 10^{-30}$), positive regulation of cellular process (adjusted $P = 6.3 \times 10^{-30}$), positive regulation of intracellular signal transduction (adjusted $P = 2.4 \times 10^{-27}$), positive regulation of phosphorylation (adjusted $P = 4.2 \times 10^{-27}$), positive regulation of MAPK cascade (adjusted $P = 8.4 \times 10^{-25}$), negative regulation of apoptotic process (adjusted

$P = 1.3 \times 10^{-23}$). For cellular component: collagen-containing extracellular matrix (ECM, adjusted $P = 2.3 \times$ 10-33), vacuolar lumen (adjusted $P = 1.8 \times 10^{-20}$), lysosomal lumen (adjusted $P = 3.3 \times 10^{-18}$), integral component of plasma membrane (adjusted $P = 9.5 \times 10^{-18}$), secretory granule lumen (adjusted $P = 1.6 \times 10^{-14}$), intracellular organelle lumen (adjusted $P = 8.8 \times 10^{-13}$), membrane raft (adjusted $P = 2.3 \times 10^{-11}$), tertiary granule (adjusted $P = 2.5 \times 10^{-11}$), golgi lumen (adjusted $P = 5.3 \times 10^{-11}$), cell-substrate junction (adjusted $P = 6.3 \times 10^{-11}$). For molecular function: receptor ligand activity (adjusted $P = 1.4 \times 10^{-30}$), cytokine activity (adjusted $P = 1.2 \times 10^{-25}$), chemokine activity (adjusted $P = 2.2 \times 10^{-18}$), chemokine receptor binding (adjusted $P = 2.9 \times 10^{-17}$), transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity (adjusted $P = 4.0 \times 10^{-17}$), growth factor activity (adjusted $P = 5.7 \times 10^{-17}$), cytokine receptor activity (adjusted $P = 6.8 \times 10^{-15}$), transmembrane receptor protein kinase activity (adjusted $P = 5.8 \times 10^{-14}$), cytokine receptor binding (adjusted $P = 1.5 \times 10^{-12}$), protein homodimerization activity (Adjusted $P = 4.0 \times 10^{-12}$). For KEGG enrichment: lipid and atherosclerosis (adjusted $P = 4.99 \times 10^{-16}$), cytokine-cytokine receptor interaction (adjusted $P = 7.84 \times 10^{-14}$), TNF signaling pathway (adjusted $P = 4.20 \times 10^{-12}$), IL17 signaling pathway (adjusted $P = 4.13 \times 10^{-11}$), Nf-kappa b signaling pathway (adjusted $P = 2.77 \times 10^{-10}$), apoptosis (adjusted $P = 2.38 \times 10^{-09}$), MAPK signaling pathway (adjusted $P = 1.96 \times 10^{-08}$), chemokine signaling pathway (adjusted $P = 3.40 \times 10^{-08}$), pathways in cancer (adjusted $P = 5.94 \times 10^{-08}$), C-type lectin receptor signaling pathway (adjusted $P = 3.39 \times 10^{-07}$).

Machine learning and patient-specific network analysis

A network-based strategy was used for a more personalized assessment of the results at the patient's level. This was based on generating different protein networks using control, disease, or both samples. Using these networks, 55 Fabry-specific proteomic signatures were extracted, presented in Supplementary Figs 1–55. Networks and the full list for each sample are presented in Supplementary Tables VIII–XII. Then, we identified the most redundant proteins found in all patients' specific signatures to build a consensus network. The consensus network included 17 proteins including: CD200 (adjusted $P = 4.1 \times 10^{-13}$, fold change = -0.69), SPINT1 (adjusted $P = 6.2 \times 10^{-13}$), CD34 (adjusted $P = 3.3 \times 10^{-11}$), FGFR2 (adjusted $P = 3.3 \times 10^{-11}$), GRN (adjusted $P = 1.9 \times 10^{-10}$), ERBB4 (adjusted $P = 2.3 \times 10^{-10}$), AXL (adjusted $P = 4.3 \times 10^{-10}$), ADAM15 (adjusted $P = 1.6 \times 10^{-09}$), PTPRM (adjusted $P = 2.0 \times 10^{-09}$), IL13RA1 (adjusted $P = 2.4 \times 10^{-09}$), NBL1 (adjusted $P = 5.9 \times 10^{-07}$), NOTCH1 (adjusted $P = 3.6 \times 10^{-06}$), VASN (adjusted $P = 4.4 \times 10^{-06}$), ROR1 (adjusted $P = 1.2 \times 10^{-04}$), AMBP (adjusted $P = 3.8 \times 10^{-04}$), CCN3 (adjusted $P = 7.6 \times 10^{-04}$), HAVCR2 (adjusted $P = 9.4 \times 10^{-04}$). Expression patterns of these proteins are

Table 1
Clinical and biochemical characteristics of the cohort

Characteristic	Overall N = 85*	Control N = 30*	Classic N = 40*	Late-onset N = 15*	*P*-value†	q-value‡
Control	30/85 (35%)	30/30 (100%)	0/40 (0%)	0/15 (0%)		
Fabry	55/85 (65%)	0/30 (0%)	40/40 (100%)	15/15 (100%)		
Sex					0.3	0.7
Female	52/85 (61%)	15/30 (50%)	27/40 (68%)	10/15 (67%)		
Male	33/85 (39%)	15/30 (50%)	13/40 (32%)	5/15 (33%)		
Age (Y)	39 (14)	39 (13)	39 (15)	36 (11)	0.7	0.9
BMI (Kg/m²)	24.4 (4.3)		24.9 (4.8)	23.0 (1.8)	0.5	0.7
Variant type					**0.016**	0.061
Deletion	5/54 (9.3%)		5/39 (13%)	0/15 (0%)		
Insertion	6/54 (11%)		6/39 (15%)	0/15 (0%)		
Missense	35/54 (65%)		20/39 (51%)	15/15 (100%)		
Nonsense	7/54 (13%)		7/39 (18%)	0/15 (0%)		
Splicing	1/54 (1.9%)		1/39 (2.6%)	0/15 (0%)		
LysoGb3 (ng/mL)	16 (25)		21 (28)	5 (4)	**<0.001**	0.003
Residual enzyme activity (%)	55 (52)		53 (53)	60 (51)	0.5	0.7
eGFR (MDRD)	84 (31)		85 (34)	81 (15)	0.8	0.9
Proteins urine (g/mol creatinine)	51 (125)		64 (145)	17 (37)	0.2	0.4
CKD Epi	98 (27)		97 (30)	102 (18)	0.9	>0.9
CKD Stage					0.4	0.7
1	16/33 (48%)		12/25 (48%)	4/8 (50%)		
2	12/33 (36%)		8/25 (32%)	4/8 (50%)		
3	5/33 (15%)		5/25 (20%)	0/8 (0%)		
Kideny transplantation	2/55 (3.6%)		2/40 (5.0%)	0/15 (0%)	>0.9	>0.9
Cornea verticillata	36/55 (65%)		34/40 (85%)	2/15 (13%)	**<0.001**	<0.001
Hypertrophic cardiomyopathy	18/55 (33%)		15/40 (38%)	3/15 (20%)	0.3	0.7
Angiokeratoma	21/55 (38%)		20/40 (50%)	1/15 (6.7%)	**0.004**	0.018
Venous thrombosis	1/55 (1.8%)		1/40 (2.5%)	0/15 (0%)	>0.9	>0.9
Arrhythmia	7/55 (13%)		4/40 (10%)	3/15 (20%)	0.4	0.7
Stroke_ischemic	7/55 (13%)		6/40 (15%)	1/15 (6.7%)	0.7	0.8
Neuropathic pain	21/55 (38%)		21/40 (52%)	0/15 (0%)	**<0.001**	0.002
Pacemaker	2/55 (3.6%)		2/40 (5.0%)	0/15 (0%)	>0.9	>0.9
Defibrilator	2/55 (3.6%)		1/40 (2.5%)	1/15 (6.7%)	0.5	0.7
Sudation disorder	14/55 (25%)		13/40 (32%)	1/15 (6.7%)	0.081	0.3
Deafness	10/55 (18%)		8/40 (20%)	2/15 (13%)	0.7	0.9
Aorta dilatation	2/55 (3.6%)		1/40 (2.5%)	1/15 (6.7%)	0.5	0.7

Abbreviations: BMI, body mass index; *MDRD*, modification of diet in renal disease study; *eGFR*, estimated glomerular filtration rate; *CKI Epi*, chronic kidney disease epidemiology collaboration.
The bold denotes significant values.
* n/N (%); mean (SD).
† Pearson's chi-squared test; Fisher's exact test; Kruskal-Wallis rank sum test.
‡ False discovery rate correction for multiple testing.

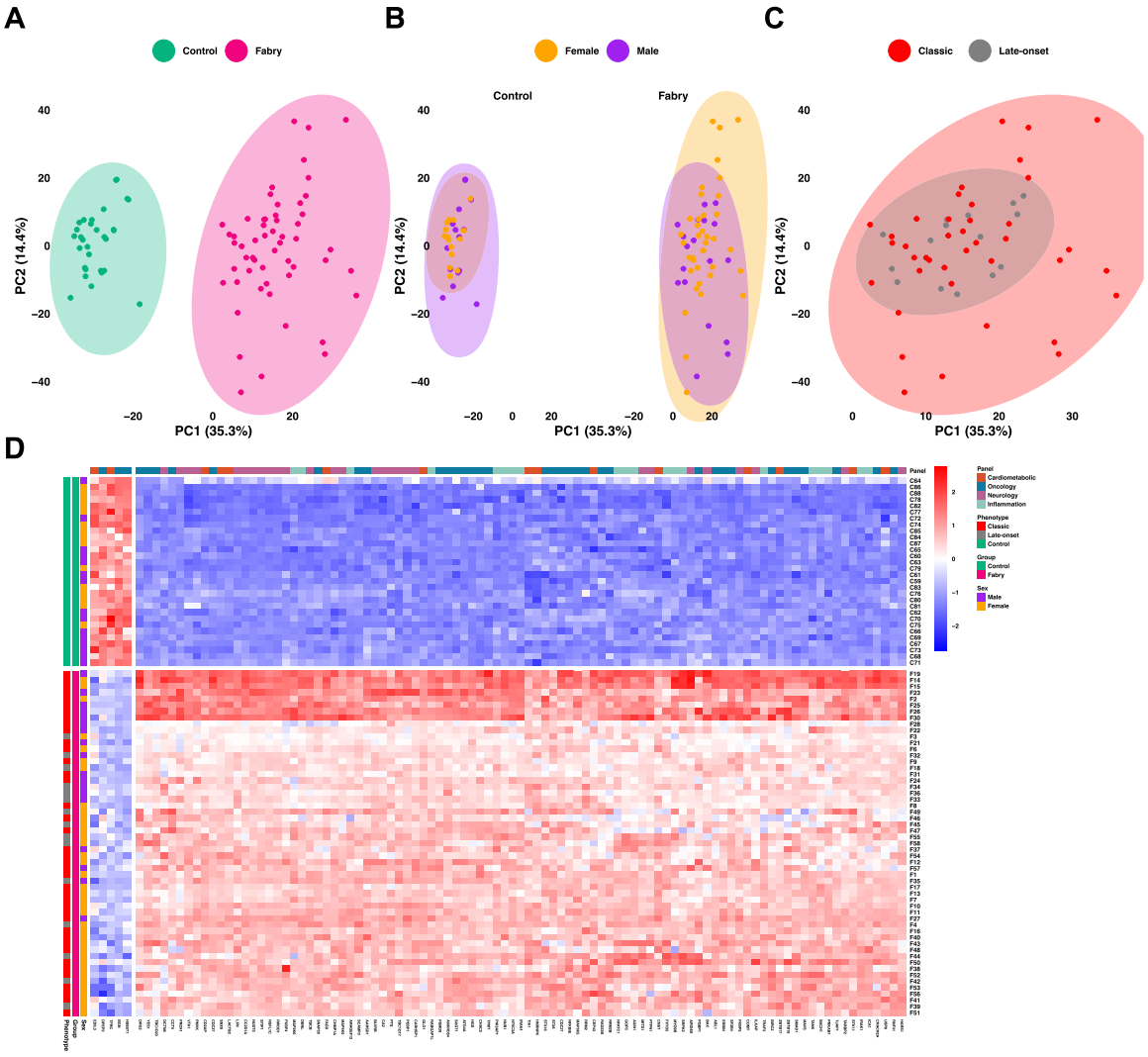


Fig. 2. Unsupervised exploration of the proteomics data. **A**, Principal component analysis based on 85 samples and 1463 proteins visualized in scores plot colored according to disease status. **B**, Principal component analysis scores plot colored according to sex. **C**, Principal component analysis scores plot colored according to treatment status. **D**, Heatmap showing sample clustering analysis based on the top 100 differentially expressed proteins (samples are presented in rows and proteins in columns).

presented in Fig 5A, and intercorrelations between the proteins mentioned above are presented in Figs 5B, 6A, and 6B. To have an overview of the expression levels of these proteins, boxplots are shown in Fig 6C. Based on this consensus signature; we explored the predictive performance of each of the 17 proteins and all their possible combinations using predictive Random Forest models. The area under curve and receiver operating characteristic curves were used as performance metrics. All model-related results are presented in Supplementary Table XIII. The 17 univariate models and their combinations are shown in Fig 6C and D. These models showed the following predictive performances: SPINT1: AUC = 0.911 (CI: 0.851−0.971), NOTCH1: AUC = 0.847 (CI: 0.767−0.927), IL13RA1: AUC = 0.824 (CI: 0.737−0.91), PTPRM: AUC = 0.813 (CI: 0.724−0.902), NBL1: AUC = 0.809 (CI: 0.719−0.9), ERBB4: AUC = 0.793 (CI: 0.699−0.887), FGFR2: AUC = 0.791 (CI: 0.696−0.885), GRN: AUC = 0.789 (CI: 0.694−0.884), CD200: AUC = 0.767 (CI: 0.668−0.867), CD34: AUC = 0.758 (CI: 0.657 −0.859), AXL: AUC = 0.701 (CI: 0.589−0.812), ADAM15: AUC = 0.675 (CI: 0.56−0.791), VASN: AUC = 0.65 (CI: 0.532−0.769), ROR1: AUC = 0.618 (CI: 0.496−0.74), HAVCR2: AUC = 0.596 (CI: 0.472−0.72), CCN3: AUC = 0.481 (CI: 0.352−0.611), AMBP: AUC = 0.352 (CI: 0.226−0.477). Overall, most of the models showed an AUC higher than 0.90. It is worth mentioning that one of the most predictive models includes; PTPRM, HAVCR2, CD200, IL13RA1, SPINT1, CD34, and CCN3 and showed an AUC = 0.966 (CI: 0.929 −1.000).

Tissue-specific pattern hunting

We defined patient-level signature based on the network analysis strategy (Fig 7A and B). Using this signature, we performed a tissue-enrichment and cell type-enrichment analysis using the enrichR package.[39] Then, we computed the number of patients that enriched a tissue or cell type. Thus, we could define each patient's tissue- and cell-type enrichment rankings. The full results are presented in Supplementary Table XV. The results show that the top enriched tissues include the lung, breast, thyroid, skin, esophagus, and liver. Regarding cell type enrichment, the top results include omentum, podocyte, renal cortex, fibroblast, gastric epithelial cell, atrium, ventricle, and Kubpfer cell. Overall, our cohort observed the same top tissues in both classic and late-onset phenotypes, even though some differences have been

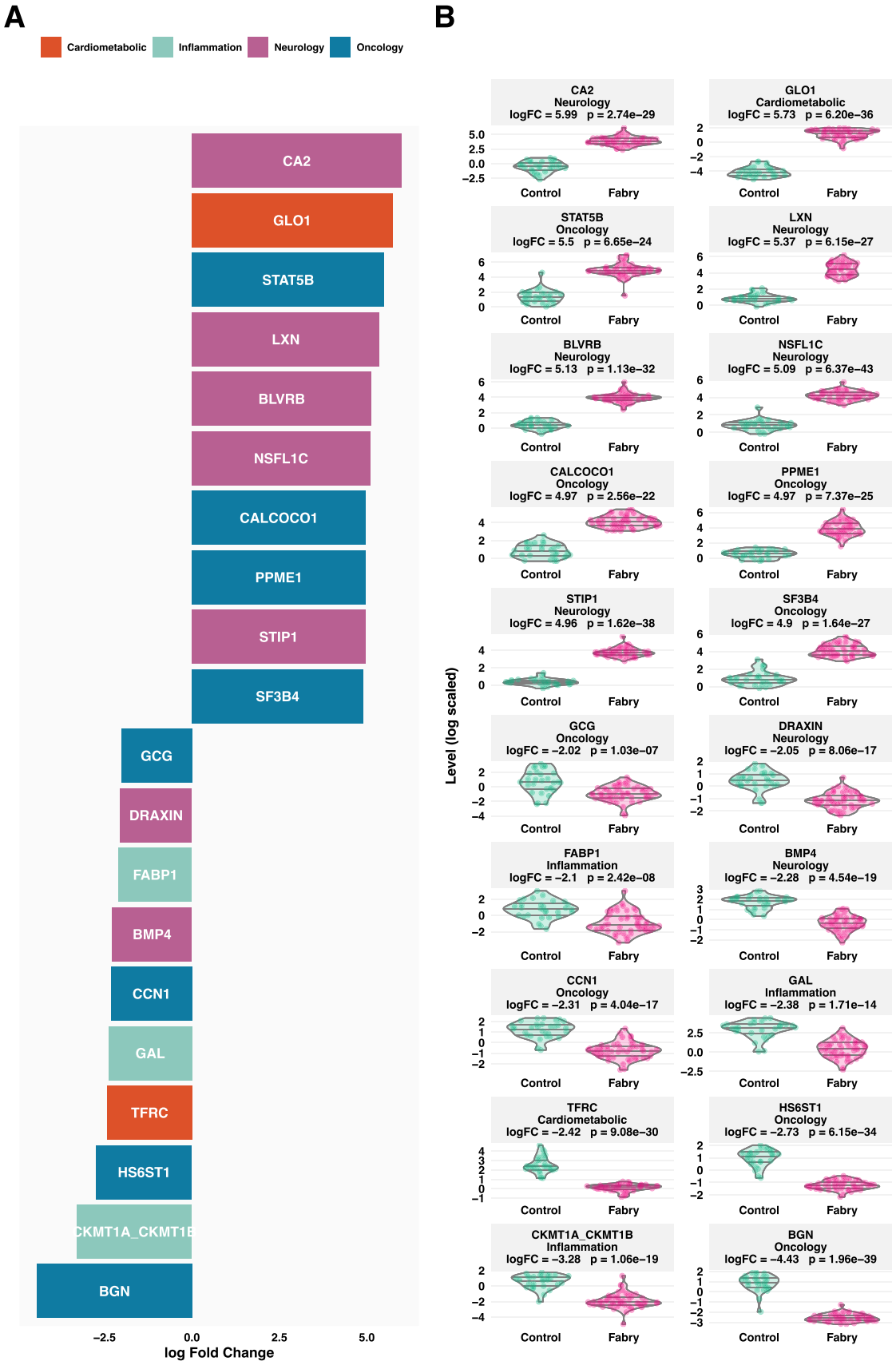


Fig. 3. Visualization of the top 20 differentially expressed proteins between Fabry and control samples. **A**, Barplot of Top 20 differentially expressed proteins displaying log fold change. **B**, Violin plots of the top expressed proteins. Violin plots show medians and the 25th and 75th percentiles, whiskers show the largest and smallest values (n = 85 samples).

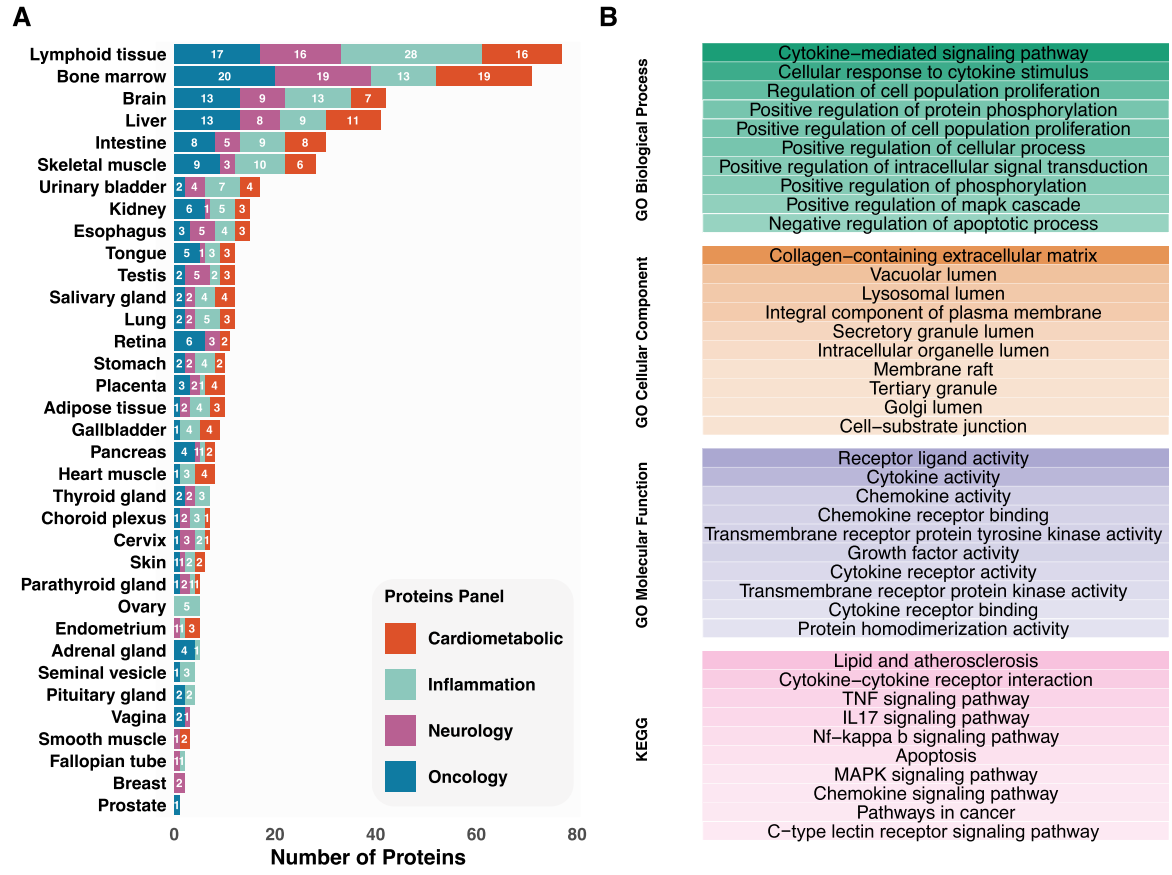


Fig. 4. Enrichment analysis of the differentially expressed proteome between Fabry and control samples. **A**, Bar plot showing the distribution of tissue enriched proteins and the related number of tissue-enriched proteins for each tissue type colored according to Olink panel categories (Total proteins: n = 615). **B**, Top enrichment terms of the genome ontology enrichment analysis in Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), biological, component, and function terms. The box transparency is correlated with the significance of the term. The darker the box, the more significant is the term. Multiple test corrections have been applied for *P* values using Benjamini and Hochberg method.

observed. For tissues, endometrium (5 patients) and ovary (1 patient) were only enriched in the classic phenotype. For cell types, pericardium (7 patients), lung epithelial cell (4 patients), cardiac muscle fiber (3 patients), pancreatic islet (2 patients), mammary gland (2 patients), Wharton's jelly (1 patient), and melanocyte (1 patient) are enriched only in classical phenotype. Whereas oligodendrocyte (1 patient), hepatocyte (1 patient), and alveolar macrophage (1 patient) are enriched in the nonclassical phenotype. The detailed results are presented in Fig 7B and C**,** which show the contributing signature for each patient and display each patient's enriched tissues or cell types along with their related phenotype and sex. In Fig 7E presents higher granularity data by showing which protein is enriched in which tissue or cell type. The overall results are presented in Fig 7E**,** highlighting the number of patients that enriched each tissue or cell type. We have also explored the overall expression of the top proteins in GTEx database.[40] The results show that most of these proteins are expressed in different tissues with uneven expression patterns. AMBP seems to be enriched in the liver and pancreas. The overall expression is presented in the Supplementary Fig 58.

Discussion

This project aims to probe the biological remodeling in FD using deep targeted plasma proteomics. To the best of our knowledge, this study presents the deepest targeted plasma proteomics study in FD using a sensitive multiplex blood protein analysis based on PEA combined with next-generation sequencing read-out. This large-scale plasma proteomics profiling enabled us to explore the broad metabolic rewiring underlying FD. Across our cohort (55 Fabry patients and 30 control individuals), 615 proteins were differentially expressed (476 upregulated and 139 downregulated). Various impaired biological processes have been shown through the functional assessment. Indeed, the enrichment analysis highlighted functional changes in different processes, including (1) immune response and inflammation, (2) cell proliferation, (3) lipid metabolism, and (4) ECM homeostasis. Furthermore, the differentially expressed proteome was associated with tissue-specific remodeling. Lung, esophagus, skin, thyroid, breast, and liver as the most contributing tissues to this proteomics signature. This study also shows a cellular rewiring perspective using plasma proteomics as a proxy and highlights the importance of a such granular investigation. This work showed the most contributing cell types of omentum, podocyte, renal cortex, and fibroblasts. This result is aligned with the previously reported kidney-related cellular dysregulation. The top upregulated proteins are CA2 (pH regulation), GLO1 (glutathione metabolism), STAT5B (inflammation), LXN, BLVRB (heme metabolism), NSFL1C (inflammation), CALCOCO1 (autophagy), PPME1 (cell proliferation), STIP1 (protein folding), SF3B4 (RNA metabolism). The most significant downregulated proteins include BGN, HS6ST1, BMP4, and CCN1 involved in collagen and ECM homeostasis, Mitochondrial creatine kinase CKMT1A and 1B

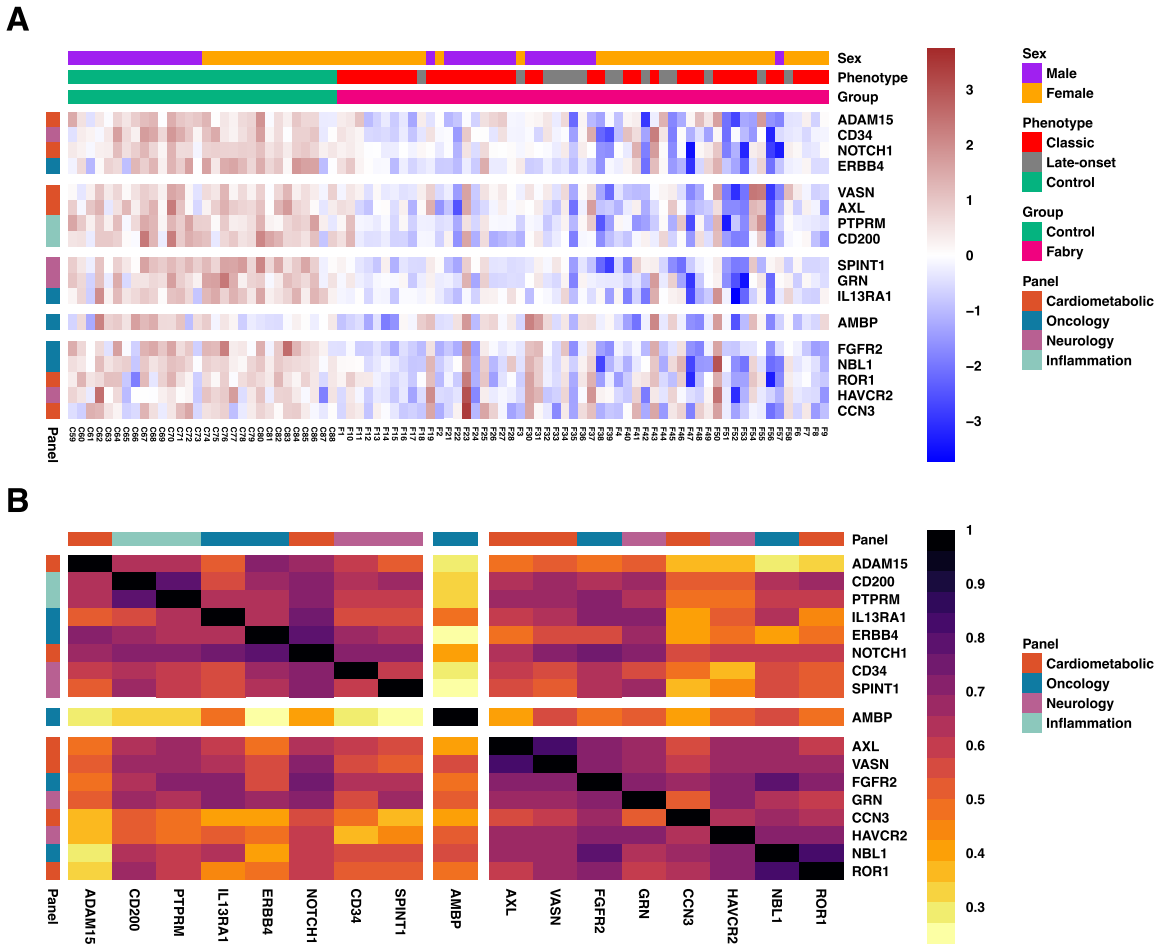


Fig. 5. Expression and correlation profiles of the consensus proteomic signature. **A**, Heatmap of levels of the proteome signature (NBL1, PTPRM, FGFR2, GRN, NOTCH1, VASN, HAVCR2, CD200, AXL, IL13RA1, SPINT1, ERBB4, CD34, ADAM15, AMBP, CCN3, ROR1) across samples. The color refers to the scaled expression of each protein in each sample (85 samples and 17 proteins) **B**, Heatmap of correlation analysis between the consensus proteins. The color refers to Spearman correlation coefficients (rho). Detailed results are presented in Supplementary Table XIV.

reflecting the energy turnover disturbances, TFRC (transferrin receptor—endosomal trafficking), GAL (innate immune system), FAB1 (fatty acid metabolism) DRAXIN (axone guidance) and GCG (glucagon).

Interestingly, we have previously reported a high prevalence of ascending aorta dilation/aneurysms in Fabry normotensive males compared with the general population, suggesting weakness of the aortic wall. Moreover, in a cohort of 27 Fabry patients, 88.8% exhibited full 2017 New-York criteria of hypermobile Ehlers-Danlos syndrome.[41,42] These 2 observations underline the hypothesis of connective tissue abnormalities in FD.

To further investigate to what extent the observed proteome changes may be related to the decrease in GalA activity, we compared the retrieved proteins with previously reported FD proteomics studies in plasma and urine.[19,43,44] Interestingly, of the 615 proteins identified in this study, 250 have been reported previously (Fig 8A, Supplementary Table XVI). Regarding the abovementioned differential proteins, some were previously reported: TFRC, STIP1, PPME1, NSFL1C, GLO1 SPINT1, GRN, CA2, BLVRB, AXL by Slaats et al[44] and SPINT1 et GRN Matafora et al.[19] The following are newly described; BGN, HS6ST1, LXN, NTF3, STAT5B, CALCOCO1, BMP4, CCN1, DRAXIN, GAL, CXCL11, FABP1. Slaat et al[44] reported a significant impairment of several lysosomal/endosomal proteins. Our study yielded 35 impaired lysosomal-related proteins, of which 14 have been previously reported by Slaat et al,[44] namely CLTA, SRC, HGS, SDC4, ARSB, TXNDC5, GOPC, DAB2, SNAP23, CD63, ATP6V1D, ANXA11, FUCA1, and SMPD1. Here we report 21 new altered lysosomal proteins, including EGF, GNLY, NAAA, GZMB, GUSB, ADAM8, CD164, NCF2, MPO, AZU1, ADA, RILP, OMD, PCSK9, BGN, OGN, NCAN, TCN2, BCAN, CTSV, and CTSH (Supplementary Table XVI). This work confirms a broad impairment of the lysosomal integrity at structural and functional levels beyond the disease-related enzymatic defect. This highlights the complex molecular networks that underpin the regulation of the versatile function of the lysosome that a reductionist approach might overlook.

As expected, several inflammation-related proteins are dysregulated. Indeed, 160 proteins included in the inflammation panel have been found differentially expressed (39 downregulated and 122 upregulated); among them, 52 have been previously described,[27,43,44] and 108 are newly reported here. Regarding the cytokine—cytokine receptor interaction network, several proteins belong to different cytokine families, such as TNF, TGF beta, interleukin/prolactin, and chemokine families, as shown in (Fig 8B). Stimulating immune cell receptors by substrates accumulated in FD such as Lyso-Gb3 may trigger proinflammatory cytokine production underlying the chronic inflammatory response. Indeed, it has been reported that the binding of Lyso-Gb3 or Gb3 to TOL-like Receptor 4—TLR4 in FD may activate NOTCH1 signaling. Subsequently, the NFKB pathway leads to pro-inflammatory cytokine surge.[4,45,46] Accordingly, this work also shows that the NFKB pathway is highly impaired, with 21 altered proteins out of the 104 included in the KEGG database (Supplementary Table VII).

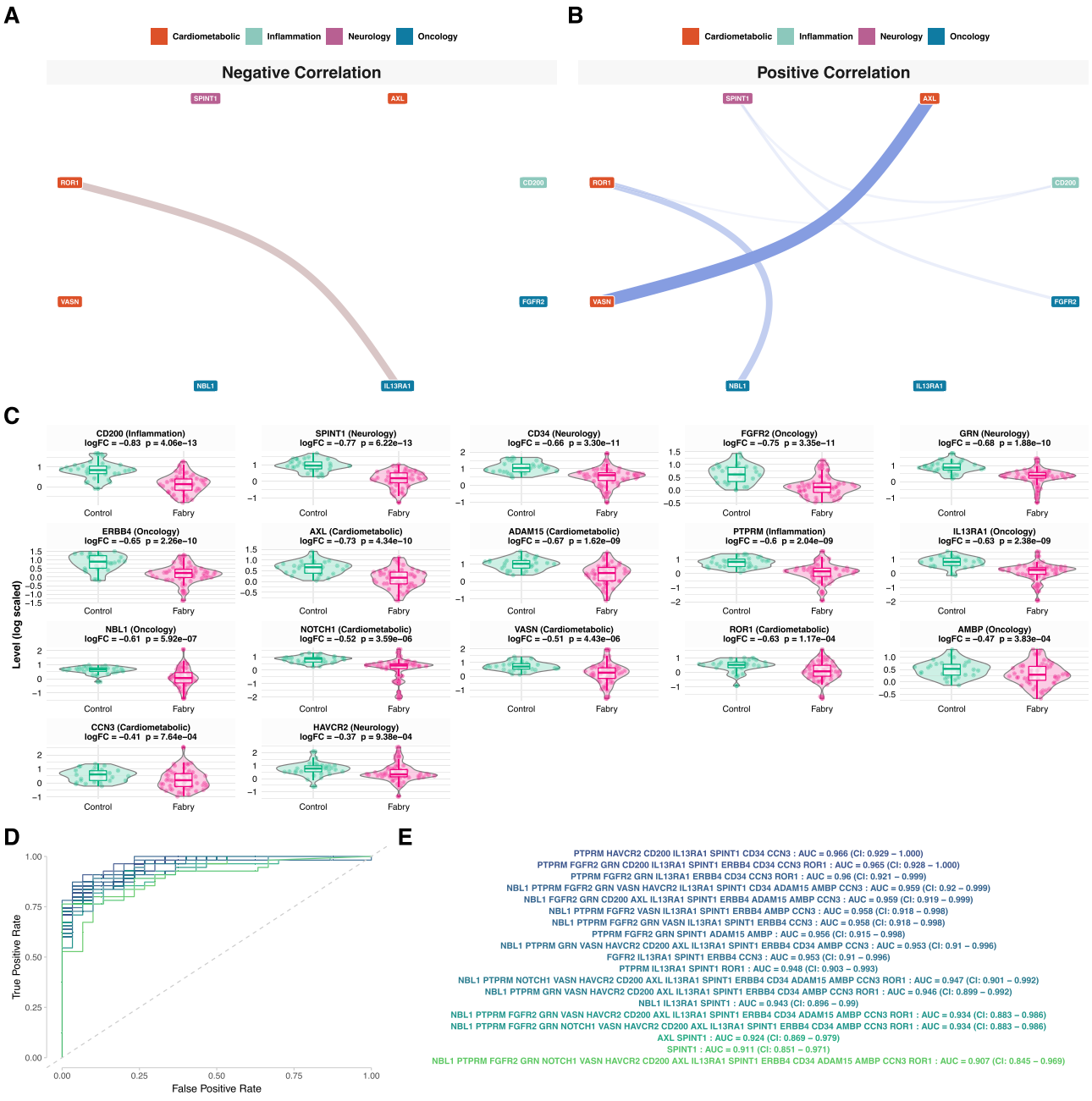


Fig. 6. Network-based predictive machine learning modeling. **A**, Negative partial correlation network visualization of the Fabry consensus plasma proteomic signature. IL13RA1-ROR1 (adjusted $P = 5.1 \times 10^{-03}$, rho = -0.41). The size of the ribbon is proportional to the correlation. **B**, Positive partial correlation network visualization of the Fabry consensus plasma proteomic signature. AXL-VASN (adjusted $P = 4.7 \times 10^{-05}$, rho = 0.52), CD200-ROR1 (adjusted $P = 3.0 \times 10^{-02}$, rho = 0.34), CD200-SPINT1 (adjusted $P = 2.9 \times 10^{-02}$, rho = 0.35), FGFR2-SPINT1 (adjusted $P = 2.6 \times 10^{-02}$, rho = 0.36), NBL1-ROR1 (adjusted $P = 3.9 \times 10^{-03}$, rho = 0.42). The size of the ribbon is proportional to the correlation. Multiple test corrections have been applied for P values using Benjamini and Hochberg method. **C**, Boxplots of the consensus plasma proteome signature. **D**, ROC curves of the Random Forest predictive models, including NBL1, PTPRM, FGFR2, GRN, NOTCH1, VASN, HAVCR2, CD200, AXL, IL13RA1, SPINT1, ERBB4, CD34, ADAM15, AMBP, CCN3, ROR1. **E**, Proteins included in each top model along with area under curve and confidence intervals.

Fibrosis has been characterized in several target organs in FD. In the kidney, glomerular and interstitial fibrosis may appear as early as childhood or in female patients with normal renal function.[47] At the cardiac level, left ventricular hypertrophy is mainly related to the replacement fibrosis.[4] This feature is related to an overproduction of the ECM, a dynamic network that supports cells and tissues and regulates their functions. The extracellular vesicles underpin the interaction of the ECM with the surrounding cells. Thus, this constant crosstalk between the intracellular lumen and the ECM is at the root of developmental adaptations and pathological state-related changes. The lysosome and lysosomal exocytosis play a vital role in this ECM remodeling.[48] This complex interplay between ECM and lysosomes may be disrupted in FD, and ECM alteration may underlie tissue and organ damage.[49] According to the genome ontology analysis, 60 ECM-related proteins are modulated in Fabry patients in the present study.

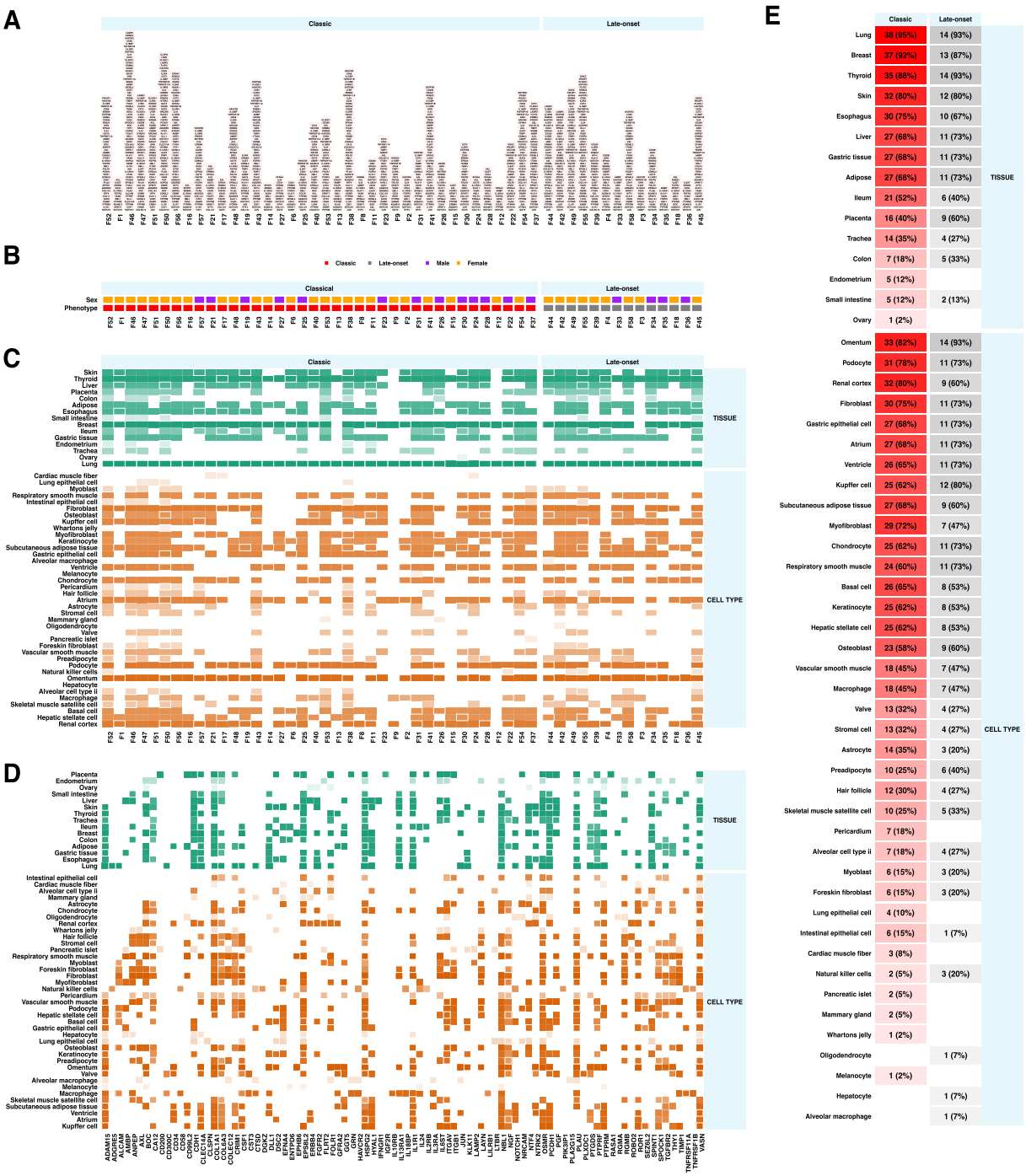


Fig. 7. Patient-specific tissue and cell type enrichment analyses. **A**, Patient-specific signature retrieved from the network analysis. **B**, Phenotype and sex of each patient. **C**, detailed tissue- and cell type enrichment for each patient. **D**, Visualization of all patient-specific proteins and their respective tissue- or cell type enrichment. **E**, Overall results of the enrichment analyses were stratified by Fabry phenotype showing the fraction of patients that enriched each tissue or cell type.

Forty-two proteins were found in the matrisome database,[50] which maps the ECM genes (Supplementary Table XVII). This impairment encompasses different ECM proteins with various properties and functions; structural proteins, collagen degradation, and secreted proteins (Fig 8C). Using a personalized network-based strategy coupled with a machine learning approach, we uncovered a consensual predictive biosignature including 17 proteins. However, although informative, these results need to be validated and replicated in a larger cohort. The limitations of this study are related to the small number of patients, which is quite common in the context of a rare condition. A validation cohort study, including other panomic studies[16,51] may confirm these results and further characterize the altered biological pathways and their clinical consequences, capitalizing on the breath and the scope of omics.

In summary, we described a comprehensive and deep protein profiling coupled with systems-based strategies to parse the biological

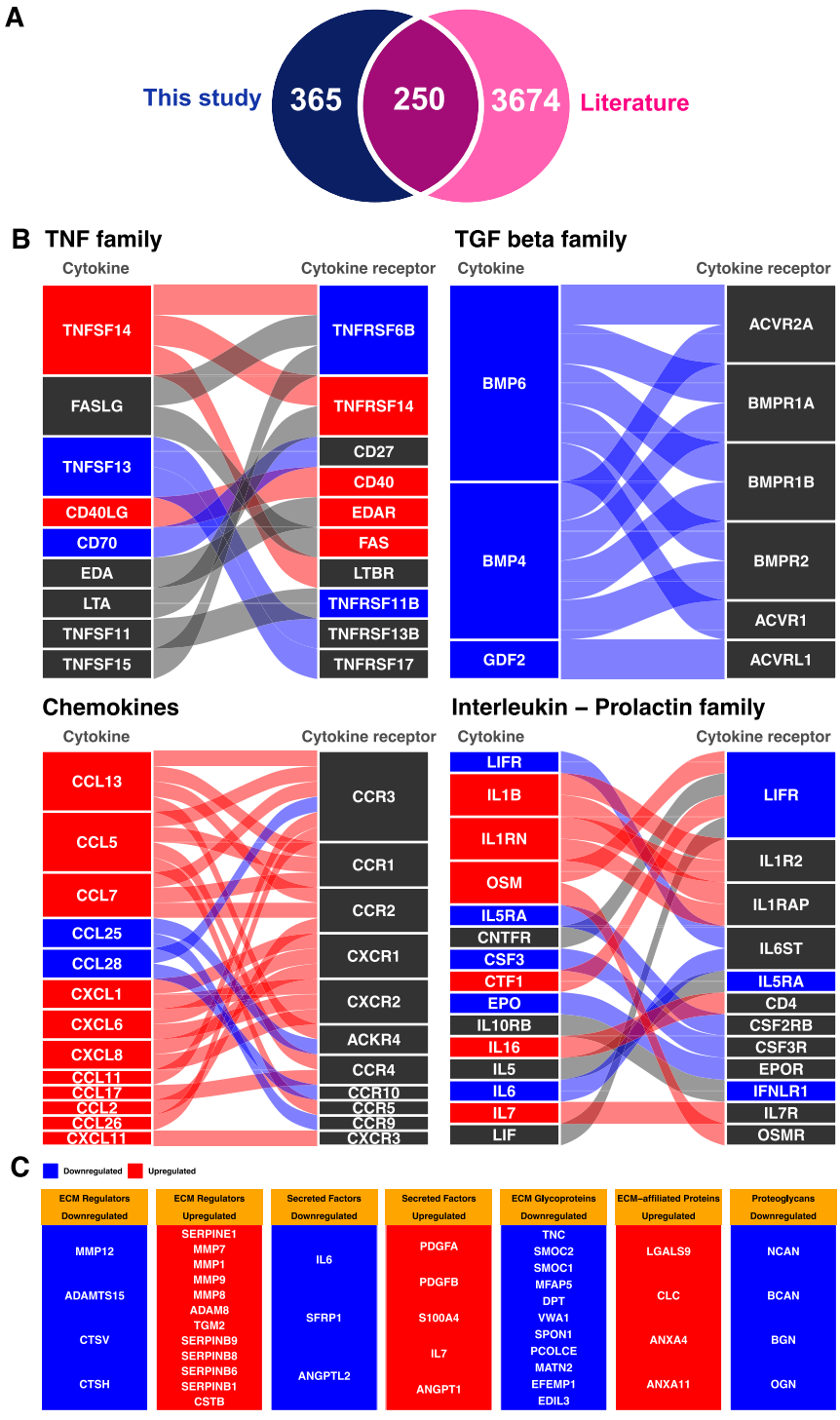


Fig. 8. Literature context-analysis of the results. **A**, Venn diagram showing overlap between this study with reported literature (details are presented in Supplementary Table XVI). **B**, Proteins mapped on the cytokine-cytokine receptor network retrieved from the KEGG database. Downregulated: blue, upregulated: red. C, Matrix-related proteome remodelling in the differentially expressed proteins in Fabry disease. Downregulated: blue, upregulated: red.

plasticity in FD to inform clinical heterogeneity and biological individuality and, ultimately, pave the way to precision medicine.

Acknowledgments

Conflicts of Interest: A.N. and S.B. received speaker honoraria and research support from Sanofi Genzyme, Amicus, and Takeda. The authors would like to thank Céline Lesueur for her technical assistance. All the other authors declare no competing interests. All authors have read the journal's authorship agreement and that the manuscript has been reviewed by and approved by all named authors.

Author contributions are as follows: A.T. and S.B. designed the study. F.B., O.D., A.N., S.M., and S.B. collected and contributed data to the study. A.T. and F.D. performed data analysis and data visualization. A.T. and S.B. wrote the manuscript. All authors read, edited, and approved the final version of the manuscript.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.trsl.2023.02.006.

References

1. Desnick RJ, Brady R, Barranger J, et al. Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: expert recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy. Ann Intern Med 2003;138:338–46.
2. Kok K, Zwiers KC, Boot RG, Overkleeft HS, Aerts J, Artola M. Fabry disease: molecular basis, pathophysiology, diagnostics and potential therapeutic directions. Biomolecules 2021;11:271.
3. Tuttolomondo A, Pecoraro R, Simonetta I, Miceli S, Pinto A, Licata G. Anderson-Fabry disease: a multiorgan disease. Curr Pharm Des 2013;19:5974–96.
4. Sanchez-Niño MD, Carpio D, Sanz AB, Ruiz-Ortega M, Mezzano S, Ortiz A. Lyso-Gb3 activates Notch1 in human podocytes. Hum Mol Genet 2015;24:5720–32.
5. Schiffmann R, Warnock DG, Banikazemi M, et al. Fabry disease: progression of nephropathy, and prevalence of cardiac and cerebrovascular events before enzyme replacement therapy. Nephrol Dial Transplant 2009;24:2102–11.
6. Weidemann F, Sanchez-Niño MD, Politei J, et al. Fibrosis: a key feature of Fabry disease with potential therapeutic implications. Orphanet J Rare Dis 2013;8:1–12.
7. Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, et al. High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening. Am J Hum Genet 2006;79:31–40.
8. Nowak A, Huynh-Do U, Krayenbuehl PA, Beuschlein F, Schiffmann R, Barbey F. Fabry disease genotype, phenotype, and migalastat amenability: Insights from a national cohort. J Inherit Metab Dis 2020;43:326–33.
9. Nakao S, Takenaka T, Maeda M, et al. An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. N Engl J Mede 1995;333:288–93.
10. Silva CAB, Moura-Neto JA, Dos Reis MA, Vieira Neto OM, Barreto FC. Renal manifestations of Fabry disease: a narrative review. Can J Kidney Health Dis 2021;8:2054358120985627.
11. Echevarria L, Benistan K, Toussaint A, et al. X-chromosome inactivation in female patients with Fabry disease. Clin Genet 2016;89:44–54.
12. MacDermot K, Holmes A, Miners A. Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 98 hemizygous males. J Med Genet 2001;38:750–60.
13. Cabukusta B, Neefjes J. Mechanisms of lysosomal positioning and movement. Traffic (Copenhagen, Denmark) 2018;19:761–9.
14. Pu J, Guardia CM, Keren-Kaplan T, Bonifacino JS. Mechanisms and functions of lysosome positioning. J Cell Sci 2016;129:4329–39.
15. Oyarzún JE, Lagos J, Vázquez MC, et al. Lysosome motility and distribution: relevance in health and disease. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 2019;1865:1076–87.
16. Tebani A, Afonso C, Marret S, Bekri S. Omics-based strategies in precision medicine: toward a paradigm shift in inborn errors of metabolism investigations. Int J Mol Sci 2016;17:1555.
17. Cigna D, D'Anna C, Zizzo C, et al. Alteration of proteomic profiles in PBMC isolated from patients with Fabry disease: preliminary findings. Molecular BioSystems 2013;9:1162–8.
18. Yogasundaram H, Nikhanj A, Putko BN, et al. Elevated inflammatory plasma biomarkers in patients with Fabry disease: a critical link to heart failure with preserved ejection fraction. J Am Heart Assoc 2018;7:e009098.
19. Matafora V, Cuccurullo M, Beneduci A, et al. Early markers of Fabry disease revealed by proteomics. Mol BioSyst 2015;11:1543–51.
20. Manwaring V, Heywood WE, Clayton R, et al. The identification of new biomarkers for identifying and monitoring kidney disease and their translation into a rapid mass spectrometry-based test: evidence of presymptomatic kidney disease in pediatric Fabry and type-I diabetic patients. J Proteome Res 2013;12:2013–21.
21. Heo SH, Kang E, Kim YM, et al. Fabry disease: characterisation of the plasma proteome pre- and post-enzyme replacement therapy. J Med Genet 2017;54:771–80.
22. Moore DF, Krokhin OV, Beavis RC, et al. Proteomics of specific treatment-related alterations in Fabry disease: a strategy to identify biological abnormalities. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:2873–8.
23. Birket MJ, Raibaud S, Lettieri M, et al. A human stem cell model of Fabry disease implicates LIMP-2 accumulation in cardiomyocyte pathology. Stem Cell Rep 2019;13:380–93.
24. Song H-Y, Chien C-S, Yarmishyn AA, et al. Generation of GLA-knockout human embryonic stem cell lines to model autophagic dysfunction and exosome secretion in fabry disease-associated hypertrophic cardiomyopathy. Cells 2019;8:327.
25. Weidemann F, Beer M, Kralewski M, Siwy J, Kampmann C. Early detection of organ involvement in Fabry disease by biomarker assessment in conjunction with LGE cardiac MRI: results from the SOPHIA study. Mol Genet Metab 2019;126:169–82.
26. Doykov ID, Heywood WE, Nikolaenko V, et al. Rapid, proteomic urine assay for monitoring progressive organ disease in Fabry disease. J Med Genet 2020;57:38–47.
27. Tebani A, Mauhin W, Abily-Donval L, et al. A proteomics-based analysis reveals predictive biological patterns in Fabry disease. J Clin Med 2020;9:1325.
28. Rossi F, L'Imperio V, Marti H-P, et al. Proteomics for the study of new biomarkers in Fabry disease: state of the art. Mol Genet Metab 2021;132:86–93.
29. Wickham H. The tidyverse. R Package Ver 2017;1:1.
30. Wickham H, Chang W, Wickham MH. Package 'ggplot2'. Create elegant data visualisations using the grammar of graphics version. 2016;2:1−189.
31. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. Fitting linear mixed-effects models using lme4. arXiv preprint arXiv:14065823. 2014.
32. Halekoh U, Højsgaard S. A kenward-roger approximation and parametric bootstrap methods for tests in linear mixed models−the R package pbkrtest. J Stat Softw 2014;59:1–32.
33. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J R Stat Soc Series B Methodol 1995;57:289–300.
34. McInnes L, Healy J, Melville J. Umap: uniform manifold approximation and projection for dimension reduction. arXiv preprint arXiv:180203426. 2018.
35. Thistlethwaite LR, Petrosyan V, Li X, Miller MJ, Elsea SH, Milosavljevic A. CTD: an information-theoretic algorithm to interpret sets of metabolomic and transcriptomic perturbations in the context of graphical models. PLoS Comput Biol 2021;17:e1008550.
36. Wright MN, Ziegler A. ranger: a fast implementation of random forests for high dimensional data in C++ and R. J Stat Softw 2017;77:1–17.
37. Bradley AP. The use of the area under the ROC curve in the evaluation of machine learning algorithms. Pattern Recognit 1997;30:1145–59.
38. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. Science 2015;347:1260419.
39. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. Nucleic Acids Res 2016;44:W90–W7.
40. Consortium G, Ardlie KG, Deluca DS. The genotype-tissue expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. Science 2015;348:648–60.
41. Barbey F, Lidove O, Dormond O. Hypermobile Ehlers-Danlos-like syndrome in Fabry disease. Clin Genet 2019;95:627–8.
42. Barbey F, Qanadli SD, Juli C, et al. Aortic remodelling in Fabry disease. Eur Heart J 2010;31:347–53.
43. Parolo S, Tomasoni D, Bora P, et al. Reconstruction of the cytokine signaling in lysosomal storage diseases by literature mining and network analysis. Front Cell Dev Biol 2021;9:703489.
44. Slaats GG, Braun F, Hoehne M, et al. Urine-derived cells: a promising diagnostic tool in Fabry disease patients. Sci Rep 2018;8:11042.
45. Anders H-J, Banas B, Schlöndorff D. Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease. J Am Soc Nephrol 2004;15:854–67.
46. 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 2013;109:93–9.
47. Weidemann F, Sanchez-Niño MD, Politei J, et al. Fibrosis: a key feature of Fabry disease with potential therapeutic implications. Orphanet J Rare Dis 2013;8:116.
48. Karamanos NK, Theocharis AD, Piperigkou Z. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. FEBS J 2021;288:6850–912.
49. Tancini B, Buratta S, Delo F, et al. Lysosomal exocytosis: the extracellular role of an intracellular organelle. Membranes 2020;10:406.
50. Shao X, Taha IN, Clauser KR, Gao YT, Naba A. MatrisomeDB: the ECM-protein knowledge database. Nucleic Acids Res 2020;48:D1136–d44.
51. Tebani A, Gummesson A, Zhong W, et al. Integration of molecular profiles in a longitudinal wellness profiling cohort. Nat Commun 2020;11:4487.

Journal of *Personalized Medicine*

MDPI

Article

Parsing Fabry Disease Metabolic Plasticity Using Metabolomics

Franklin Ducatez [1,2], Wladimir Mauhin [3], Agnès Boullier [4,5], Carine Pilon [1], Tony Pereira [6], Raphaël Aubert [1], Olivier Benveniste [7], Stéphane Marret [2], Olivier Lidove [3], Soumeya Bekri [1] and Abdellah Tebani [1,*]

1 Department of Metabolic Biochemistry, Normandie University, UNIROUEN, INSERM U1245, CHU Rouen, 76000 Rouen, France; franklin.ducatez@gmail.com (F.D.); carine.pilon@chu-rouen.fr (C.P.); raphael.aubert@univ-rouen.fr (R.A.); soumeya.bekri@chu-rouen.fr (S.B.)
2 Department of Neonatal Pediatrics, Intensive Care, and Neuropediatrics, Normandie University, UNIROUEN, INSERM U1245, CHU Rouen, 76000 Rouen, France; stephane.marret@chu-rouen.fr
3 Department of Internal Medicine, Groupe Hospitalier Diaconesses Croix Saint Simon, Site Avron & UMRS 974, 75013 Paris, France; wmauhin@hopital-dcss.org (W.M.); olidove@hopital-dcss.org (O.L.)
4 MP3CV-UR7517, CURS-Université de Picardie Jules Verne, Avenue de la Croix Jourdain, 80054 Amiens, France; Boullier.Agnes@chu-amiens.fr
5 Laboratoire de Biochimie CHU Amiens-Picardie, Avenue de la Croix Jourdain, 80054 Amiens, France
6 CHU Rouen, Institut de Biologie Clinique, 76000 Rouen, France; tony.pereira@chu-rouen.fr
7 Department of Internal Medicine, Hôpital Pitié-Salpêtrière & INSERM U 974, 75013 Paris, France; olivier.benveniste@aphp.fr
* Correspondence: abdellah.tebani@chu-rouen.fr

Abstract: Background: Fabry disease (FD) is an X-linked lysosomal disease due to a deficiency in the activity of the lysosomal α-galactosidase A (GalA), a key enzyme in the glycosphingolipid degradation pathway. FD is a complex disease with a poor genotype–phenotype correlation. FD could involve kidney, heart or central nervous system impairment that significantly decreases life expectancy. The advent of omics technologies offers the possibility of a global, integrated and systemic approach well-suited for the exploration of this complex disease. Materials and Methods: Sixty-six plasmas of FD patients from the French Fabry cohort (FFABRY) and 60 control plasmas were analyzed using liquid chromatography and mass spectrometry-based targeted metabolomics (188 metabolites) along with the determination of LysoGb3 concentration and GalA enzymatic activity. Conventional univariate analyses as well as systems biology and machine learning methods were used. Results: The analysis allowed for the identification of discriminating metabolic profiles that unambiguously separate FD patients from control subjects. The analysis identified 86 metabolites that are differentially expressed, including 62 Glycerophospholipids, 8 Acylcarnitines, 6 Sphingomyelins, 5 Aminoacids and 5 Biogenic Amines. Thirteen consensus metabolites were identified through network-based analysis, including 1 biogenic amine, 2 lysophosphatidylcholines and 10 glycerophospholipids. A predictive model using these metabolites showed an AUC-ROC of 0.992 (CI: 0.965–1.000). Conclusion: These results highlight deep metabolic remodeling in FD and confirm the potential of omics-based approaches in lysosomal diseases to reveal clinical and biological associations to generate pathophysiological hypotheses.

Keywords: inborn errors of metabolism; Fabry disease; lysosomal storage diseases; metabolomics; systems biology; machine learning

check for updates

Citation: Ducatez, F.; Mauhin, W.; Boullier, A.; Pilon, C.; Pereira, T.; Aubert, R.; Benveniste, O.; Marret, S.; Lidove, O.; Bekri, S.; et al. Parsing Fabry Disease Metabolic Plasticity Using Metabolomics. *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, 898. https://doi.org/10.3390/jpm11090898

Academic Editor: Richard E. Frye

Received: 7 August 2021
Accepted: 5 September 2021
Published: 8 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Fabry disease (FD, OMIM #301500) is an X-linked inherited metabolic disease (IMD) due to lysosomal α-galactosidase A activity deficiency (GalA-EC 3.2.1.22), which has a key role in the glycosphingolipid degradation pathway, leading to cellular dysfunction and microvascular pathology [1]. The incidence ranges from 1 in 40,000 to 1 in 117,000 births in the general population [2]. However, this might be underestimated as some screening studies (Japan [3], Austria [4], northwestern Italy [5], United States (Missouri) [6] and Taiwan [7]) reported a higher incidence rate (1/1500–1/7000). The impairment of GalA generates a

progressive accumulation of glycosphingolipid derivatives such as globotriaosylceramide (Gb3) and galabiosylceramide in the lysosome. This may occur in various cell types such as vascular, endothelial, renal, cardiac and nerve cells (neurons, Schwann cells) where the continuous deposition leads to serious cellular damage and organ failure [8]. Thus, damage to the kidney, heart and central nervous system will significantly decrease life expectancy [9]. Most Fabry patients show no symptoms in early life; however, symptoms may arise in childhood or adolescence. The classical phenotype in FD presents cornea verticillata, neuropathic pain, gastrointestinal dysfunction and angiokeratoma [10,11]. Serious complications are usually observed in adulthood and may include progressive renal insufficiency, cardiac complications (arrhythmia, hypertrophic cardiomyopathy) and/or cerebrovascular complications. Vascular ectasia and tortuosity could also be observed [10]. Pathogenic variants might present with low to absent residual GalA activity in males spanning the full disease clinical spectrum. In heterozygous females, the presentation is miscellaneous. This clinical variability might be due to the X-inactivation in female patients. Putative modifier genes could also explain part of the lack of *GLA* genotype–phenotype correlation. FD diagnosis is usually made by the deficiency in GalA activity in white blood cells from a blood sample [12], plasma/serum [13] or a dried blood spot [14]. Other samples could be used to identify a GalA activity deficiency such as lymphoblasts, cultured fibroblasts, tears or urine [15]. The diagnosis confirmation is done using molecular analysis of the *GLA* gene. While reliable for male patients, the enzymatic assessment is dubious for female carriers given the abovementioned random inactivation of the X-chromosome. In this case, molecular analysis is a very precious tool to detect heterozygous individuals. The storage product Gb3 concentrations are inconsistently increased in either plasma [16,17] or urine [18] in late onset forms and in female patients. For a greater discrimination, globotriaosylsphingosine (LysoGb3), a deacylated derivative of Gb3, is suggested. However false negatives in some female patients and in very late onset forms have been described [19,20]. Moreover, LysoGb3 does not correlate well with clinical events in patients under treatment, as recently illustrated in patients on migalastat-chaperone therapy [21]. Regarding treatment, Enzyme Replacement Therapy (ERT) using intravenous exogeneous human α-Galactosidase A has enhanced FD management. Currently, two ERTs are available: recombinant (Agalsidase β) [22] or gene-activated human α-Galactosidase A enzyme [23]. Substrate reduction therapy (SRT) is another approach aiming to reduce the synthesis of glucosylceramide via inhibition of the glucosylceramide synthase. Two molecules are currently under clinical trials: Venglustat and Lucerastat [24]. Recently, a new therapeutic strategy was also reported using a pharmacological chaperone that can help proper protein folding of the mutated protein to increase the enzymatic activity [25]. All of these therapeutic avenues aim to improve the quality of life of the patients and to slow the course of the disease [26]. An effective management of FD requires early diagnosis. This highlights the lack of robust surrogate markers and molecular understanding of FD pathogeny for effective diagnosis, patient stratification and personalized management [27,28]. Thus, a better understanding of FD biological plasticity might enhance our screening and diagnosis tools.

The ongoing omics revolution has opened new avenues to interrogate biological systems through data-rich strategies at an unprecedented breadth, depth and scope in different fields, including IMD [29–32]. This omics surge is mainly driven by high throughput technologies, bioinformatics, data sciences and systems biology approaches. Such systems-based strategies promote unbiased, data-driven and hypothesis-free studies to explore health and disease states and get rid of hypothesis-driven aspects of conventional reductionist approaches [31]. In FD, several omics-based studies have been previously reported in FD [33–44]. We describe here a network-based targeted metabolomics study aiming to determine metabolic-based biological signatures that could discriminate Fabry patients from healthy subjects. In addition, we aimed to compare the unveiled metabolomic profile with routinely FD biomarkers.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Blood Samples

Blood samples were retrieved from the French Fabry cohort (FFABRY), a French multicenter cohort of patients with an enzymatic and/or genetic diagnosis of FD [45]. A total of 66 patients were included: 33 with classical phenotype, including 20 females (age range: 25 to 75 years; mean age: 47 years) and 13 males (age range: 20 to 59 years; mean age: 38 years), and 33 with non-classic phenotype, including 14 females (age range: 17 to 66 years; mean age: 46 years) and 19 males (age range: 17 to 74 years; mean age: 49 years). A total of 45 were treated, 11 with Agalsidase α (8 classical and 3 non-classical), 21 with Agalsidase β (11 classical and 10 non-classical), 1 with Migalastat (non-classical), 10 with Agalsidase α and Agalsidase β (4 classical and 6 non-classical), 1 with Agalsidase α and Miglastat (non-classical), and 1 with all three, Agalsidase β, Agalsidase α and Migalastat (non-classical). No significant differences in age, sex or treatment between phenotype groups were observed. The mean cumulative treatment duration time was 6.4 years. Genotyping had been performed in 61 patients. For missense variants, 13 and 24 were found in classical and non-classical Fabry patients, respectively. There were 16 and 8 variants leading to a truncated protein (deletion, frameshift or non-sense mutations) in classical and non-classical Fabry patients, respectively. All these characteristics are presented in Supplementary Tables S1 and S2. Human control plasmas with no significant medical conditions were purchased from Biovit (West Sussex, UK). We analyzed plasma samples from 60 healthy donors, 30 males (age range: 20 to 55 years; mean age: 34 years) and 30 females (age range: 18 to 56 years; mean age: 37 years). The overall summary of the cohort is presented in Figure 1.



Figure 1. Cohort description.

The study was approved by the Institutional Ethics Committee Research (Ethics Board of Rouen University Hospital-CERNI E2016-21).

2.2. Targeted Metabolomics Analysis

All reagents required for the AbsoluteIDQ® p180 analysis are included in the kit or provided by Biocrates Life Science AG (Innsbruck, Austria). Sample preparation was carried out according to the manufacturer's protocol [46,47]. Briefly, 10 µL of plasma was transferred to the upper 96-well plate and dried under a nitrogen stream. Thereafter, 50 µL of a 5% PITC solution was added to derivatize amino acids and biogenic amines. After incubation, the spots were dried again before the metabolites were extracted using

5 mM ammonium acetate in methanol (300 µL) into the lower 96-well plate for analysis after further dilution using the MS running solvent A. Quantification was carried out using isotopically labeled internal standards and a calibration curve [46,47]. The full list of 188 measured metabolites is presented Supplementary Table S3. The AbsoluteIDQ® p180 kit is a fully automated assay based on phenylisothiocyanate (PITC) derivatization of the target analytes in bodily fluids using internal standards for quantitation. Amino acids and biogenic amines are determined in LC-MS mode, acylcarnitines, phospholipids, sphingomyelins, and the sum of hexoses are analyzed in flow injection analysis (FIA). The analyses were performed following the instructions of the kit manufacturer: autosampler temperature at 10 °C, injection volume at 10 µL, reversed-phase HPLC gradient using HPLC grade water and acetonitrile, both with 0.2% formic acid (FA), flow rate at 0.5 mL/min. For the FIA, only acetonitrile with 0.2% FA was used with a max flow rate of 0.2 mL/min. Liquid chromatography instrument prominence Shimadzu UFLC System (Shimadzu, Prominence, Kyoto, Japan) was used coupled to the 4000 Qtrap mass spectrometer (Sciex, Framingham, MA, USA) with an electrospray ion source. Data acquisition and processing were performed using the Analyst 1.5 software (Sciex, Framingham, MA, USA).

2.3. Plasma LysoGb3 Analysis

The LysoGb3 concentration was measured as previously described [45]. Using plasma samples and ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). In glass 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 for 30 s in a bath sonifier and vortexed. After centrifugation, 8 min at 16,000× g, 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.

2.4. Alpha-D-Galactopyranosidase Activity Analysis

Alpha-D-galactopyranosidase enzymatic activity was assessed in isolated blood leukocytes using a fluorometric assay [13]. Hexosaminidase activity was also determined as an enzyme control to confirm leukocyte integrity. The residual enzymatic activity (REA) is defined as the ratio of enzyme activity measured in a sample to the activity measured with a control.

2.5. Data Analysis

Data matrix was log-transformed and pareto-scaled [48]. Missing values were imputed using nearest neighbor averaging algorithm using the impute.knn function in the impute R package. Univariate analyses were performed using t-tests to identify discriminatory features between the assessed groups. Limma package [49] was used for differential analysis with sex and age taken into account by adding it as covariate. Spearman correlation analysis was performed using R software. Euclidean distance was used as a similarity measure in the clustering analysis. Principal Component Analysis was used as dimension reduction technique using log-transformed and pareto-scaled dataset. False discovery rates were corrected using the Benjamini–Hochberg–Yekutieli method [50], and $p < 0.05$ was considered statistically significant. For network analysis, the first step was to compute several partial correlation matrices (PCM) [51]. Three kinds of PCMs were calculated: control + disease samples, control samples only, and all the combinations of samples including control + "disease-minus-one-patient" to get patient specific networks. Networks were then constructed from each PCMs data matrix and pruned with each other to get

specific networks. The idea of network pruning is to remove edges in a general network that are also found in a more specific network. So, we pruned the "disease + control" network with the "control" network in order to keep only edges that are disease specific. Thus, this step results in a "disease-specific" network. This step has been done using the CTD R package [52]. Using the same strategy, networks of controls + "disease-minus-one" samples were pruned with the control-samples network to obtain a "disease-specific-minus-one-patient" network. This network was then pruned with the "disease-specific" network calculated above in order to extract "patient-specific" metabolic signatures. A summary overview of the network strategy is presented in Supplementary Figure S1. The metabolites present in all of these "patient-specific" networks were selected to build a Consensus Network and enable the visualization of key metabolic signatures for the disease. To test the discriminatory power of this signature, Random Forest models were tuned for every possible combination of metabolites from the Consensus Network. Random Forest models were built using the ranger package [53] and the caret package in R [54]. The models were tuned over ~50 repeats to obtain robust classification probabilities. Performances of the models were assessed with the MLeval package in R. The main metric for predictive performance assessment was the area under the curve (AUC) for the resulting receiver operating characteristic (ROC) curve. All data analyses and visualizations were performed using R software [55].

3. Results

The aim of this work is to explore metabolic profile differences between Fabry and control samples using plasma-targeted metabolomics. The full data matrix with samples characteristics is presented in Supplementary Table S2. To analyze the data, the first approach was to use an unsupervised analysis to track samples' clustering trends based on the underlying metabolic profiles. The principal component analysis score plot revealed a clear separation between Fabry and control samples (Figure 2A). This separation was mainly observed on the PC1 dimension which explains alone 69.3% of the variance of the dataset. No sex, treatment or disease phenotype separation were observed on the PCA (Figure 2B–D). The PCA scores' matrices are presented in Supplementary Table S4. To go further, we performed a differential analysis between the two groups Fabry versus control samples. The analysis identified 86 metabolites that are differentially expressed. The full list of metabolites and their related statistics are presented in Supplementary Table S5. The metabolites include 62 Glycerophospholipids, 8 Acylcarnitines, 6 Sphingomyelins, 5 Aminoacids and 5 Biogenic Amines. To visualize the discriminant effect of these metabolites on the samples, we present in Figure 3A a heatmap of the correlation between metabolites (rows) and samples (columns). The full correlation matrix is presented in Supplementary Table S6. The heatmap clearly shows two main clusters belonging to Fabry and Control samples. This clustering is driven by the respective metabolic profile in each sample. Thus, we have performed correlation analysis between the differentially expressed metabolites. The results are presented in a heatmap (Figure 3B). The figure shows four main clusters with high intraclass correlation, especially between glycerophospholipids and sphingomyelins, Acylcarnitines and aminoacids. The top 12 differentially expressed metabolites are presented in boxplots (Figure 4). These include 3 amino acids: Glutamine (logFC = 1.78, p-value = 6.79×10^{-23}), Methionine (logFC = 1.83, p-value = 2.99×10^{-22}), Methionine sulfoxide (logFC = −1.86, p-value = 1.72×10^{-23}), and 9 phosphatidylcholins: PC ae C38:1 (logFC = −1.94, p-value = 1.72×10^{-23}), PC ae C38:2 (logFC = −1.89, p-value = 8.51×10^{-23}), PC aa C40:2 (logFC = −1.88, p-value = 2.99×10^{-22}), PC ae C36:1 (logFC = −1.89, p-value = 3.96×10^{-22}), PC aa C40:3 (logFC = −1.88, p-value = 6.8×10^{-22}), PC ae C40:3 (logFC = −1.78, p-value = 1.39×10^{-19}), PC aa C42:4 (logFC = −1.78, p-value = 3.31×10^{-19}), PC ae C40:2 (logFC = −1.78, p-value = 1.05×10^{-18}), PC ae C38:3 (logFC = −1.78, p-value = 5.84×10^{-18}).

To investigate the correlation between the associations between the retrieved metabolic profile and residual enzyme activity and LysoGb3, we used Spearman correlations. For

LysoGb3, the analysis yielded nine negative correlations (PC aa C24:0 vs. LysoGb3: rho = −0.3 adjusted p-value = 3.10×10^{-2}, PC aa C40:2 vs LysoGb3: rho = −0.3 adjusted p-value = 3.41×10^{-2}, PC ae C40:1 vs. LysoGb3: rho = −0.29 adjusted p-value = 3.60×10^{-2}, PC ae C42:1 vs. LysoGb3: rho = −0.29 adjusted p-value = 3.76×10^{-2}, PC aa C40:1 vs. LysoGb3: rho = −0.29 adjusted p-value = 3.92×10^{-2}, PC ae C42:2 vs. LysoGb3: rho = −0.28 adjusted p-value = 4.50×10^{-2}, lysoPC a C26:1 vs LysoGb3: rho = −0.28 adjusted p-value = $4.60 \times 10-2$), and two positive correlations (Acetylcarnitine vs. LysoGb3: rho = 0.33 adjusted p-value = 1.83×10^{-2}, Putrescine vs. LysoGb3: rho = 0.35 adjusted p-value = 1.05×10^{-2}). For residual enzyme activity, two negative correlations were observed (Hexadecenoylcarnitine vs. Residual Enzyme Activity: rho = −0.48 adjusted p-value = 4.87×10^{-4}, Serotonin vs. Residual Enzyme Activity: rho = −0.34 adjusted p-value = 1.85×10^{-2}). A network visualization is presented in Figure 5, and full results are presented in Supplementary Table S7.

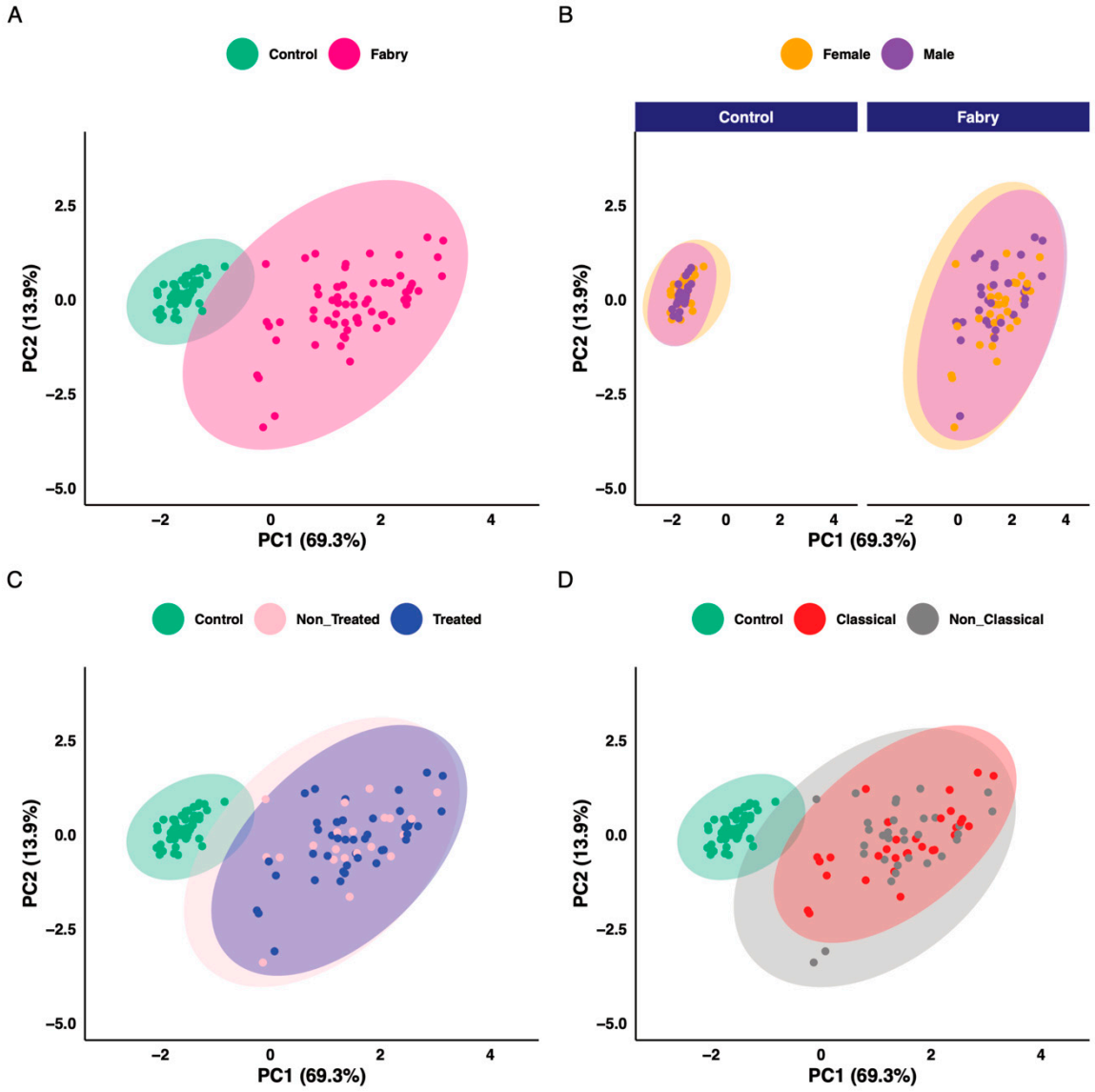


Figure 2. Principal component analysis scores plot. (**A**) Colored according to disease status. (**B**) Colored according to sex. (**C**) Colored according to treatment status. (**D**) Colored according to phenotype status.

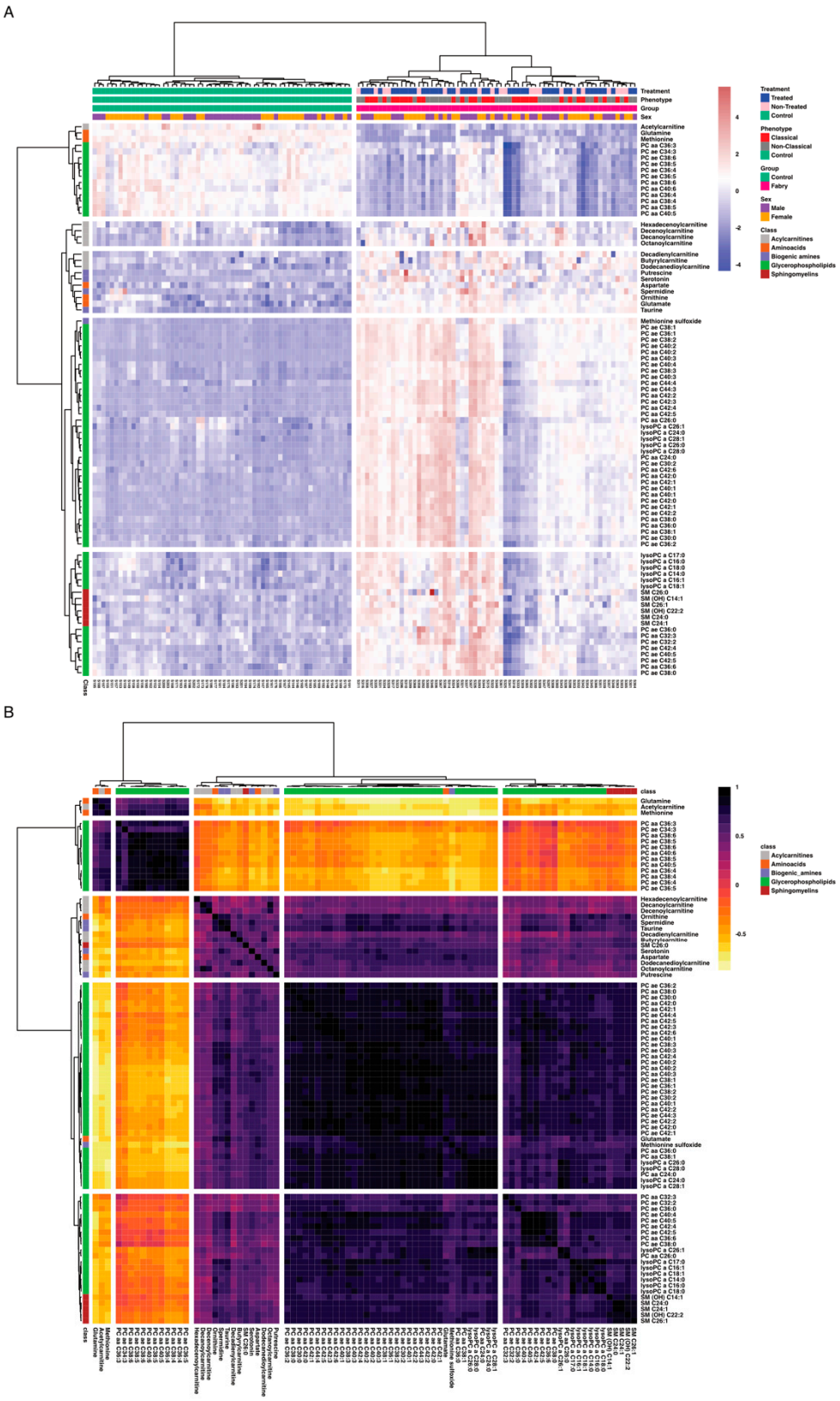


Figure 3. (**A**) Sample similarity heatmap. The colors refer to concentration z-scores. (**B**) Metabolites correlation heatmap. The color refers to Spearman correlation coefficients.

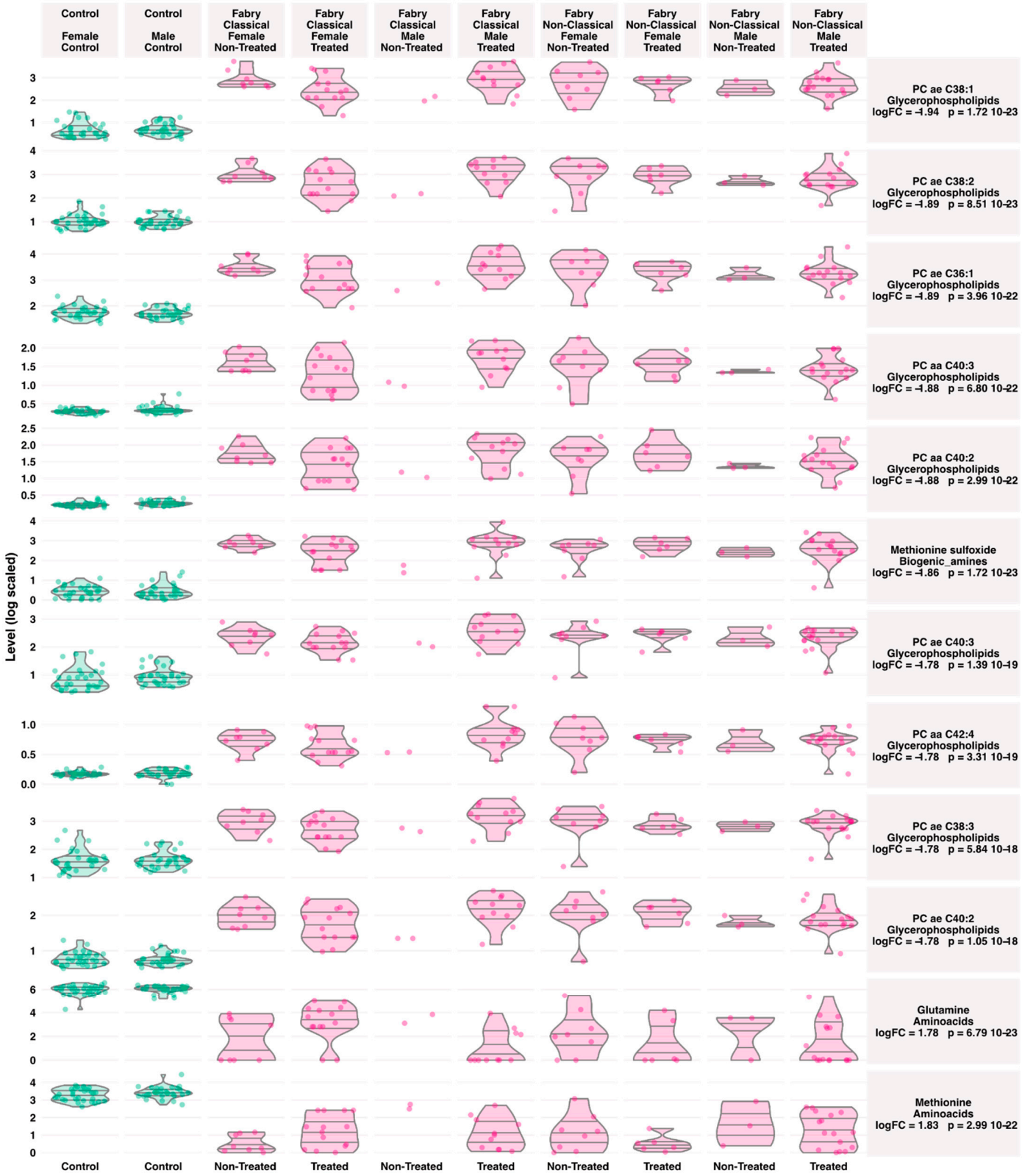


Figure 4. Boxplots of the top varying metabolites between Fabry and control samples. Lines in the violin plots refer to quantiles (0.25, 050 and 0.75).

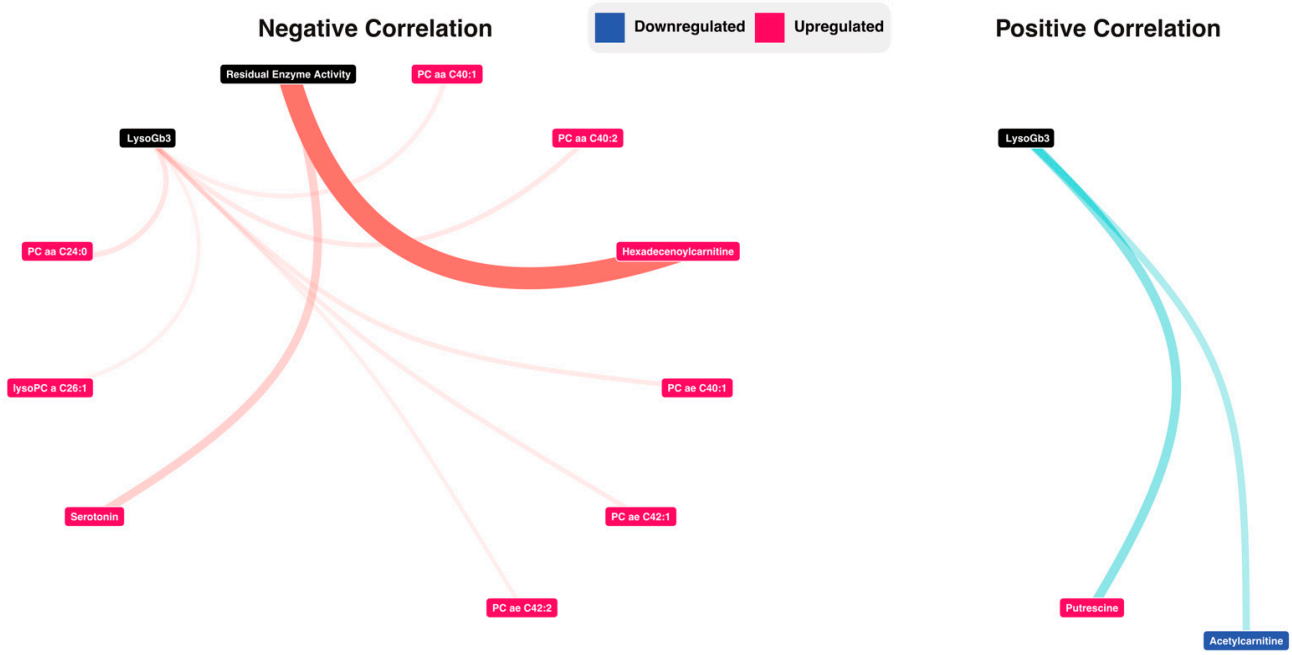


Figure 5. Correlation analysis between LysoGb3, Residual enzyme activity and the metabolomic data. Detailed results are presented in supplementary Table S7.

For a more personalized assessment of the results at the patient's level, a network-based strategy was used. This was based on generating different networks using control, disease or both samples. Using these networks, 21 Fabry-specific metabolic signatures were extracted that are presented in Supplementary Figures S1–S21. Networks and the full list for each sample are presented in Supplementary Tables S8–S11. Then, to build a consensus network, we identified the most redundant metabolites found in all of the patients' signatures. The consensus network included 13 metabolites: 1 biogenic amine (Methionine sulfoxide), 2 lysophosphatidylcholines (lysoPC a C18:0, lysoPC a C28:0) and 10 glycerophospholipids (PC ae C38:1, PC aa C38:1, PC ae C36:1, PC aa C42:1, PC ae C40:3, PC aa C42:5, PC ae C38:3, PC ae C40:1, PC ae C40:5, PC aa C26:0). Correlation network visualizations are presented in Figure 6A,B. The full results are presented in Supplementary Table S12. To have an overview of the expression levels of these metabolites, boxplots are shown in Figure 6C. Based on this consensus signature, we explored the predictive performance of each of the 13 metabolites and all their possible combinations using predictive Random Forest models. Area under curve and ROC curves were used as performance metrics. All model-related results are presented in Supplementary Table S13. The 13 univariate models and their combination are shown in Figure 6 These models showed the following predictive performances: PC ae C38:1-AUC = 0.975 (CI: 0.928–1.000), PC aa C38:1-AUC = 0.973 (CI: 0.923–1.000), Methionine sulfoxide-AUC = 0.972 (CI: 0.921–1.000), PC ae C36:1-AUC = 0.971 (CI: 0.919–1.000), PC aa C42:1-AUC = 0.962 (CI: 0.904–1.000), PC ae C40:3-AUC = 0.946 (CI: 0.877–1.000), PC aa C42:5-AUC = 0.945 (CI: 0.876–1.000), lysoPC a C28:0-AUC = 0.943 (CI: 0.873–1.000), PC ae C38:3-AUC = 0.94 (CI: 0.867–1.000), PC ae C40:1-AUC = 0.926 (CI: 0.846–1.000), PC ae C40:5-AUC = 0.913 (CI: 0.827–1.000), lysoPC a C18:0-AUC = 0.738 (CI: 0.605–0.872), PC aa C26:0-AUC = 0.673 (CI: 0.531–0.814). Overall, most of the models showed an AUC higher than 0.90. It is worth mentioning that one of the most predictive model includes all the metabolites and showed an AUC = 0.992 (CI: 0.965–1.000).

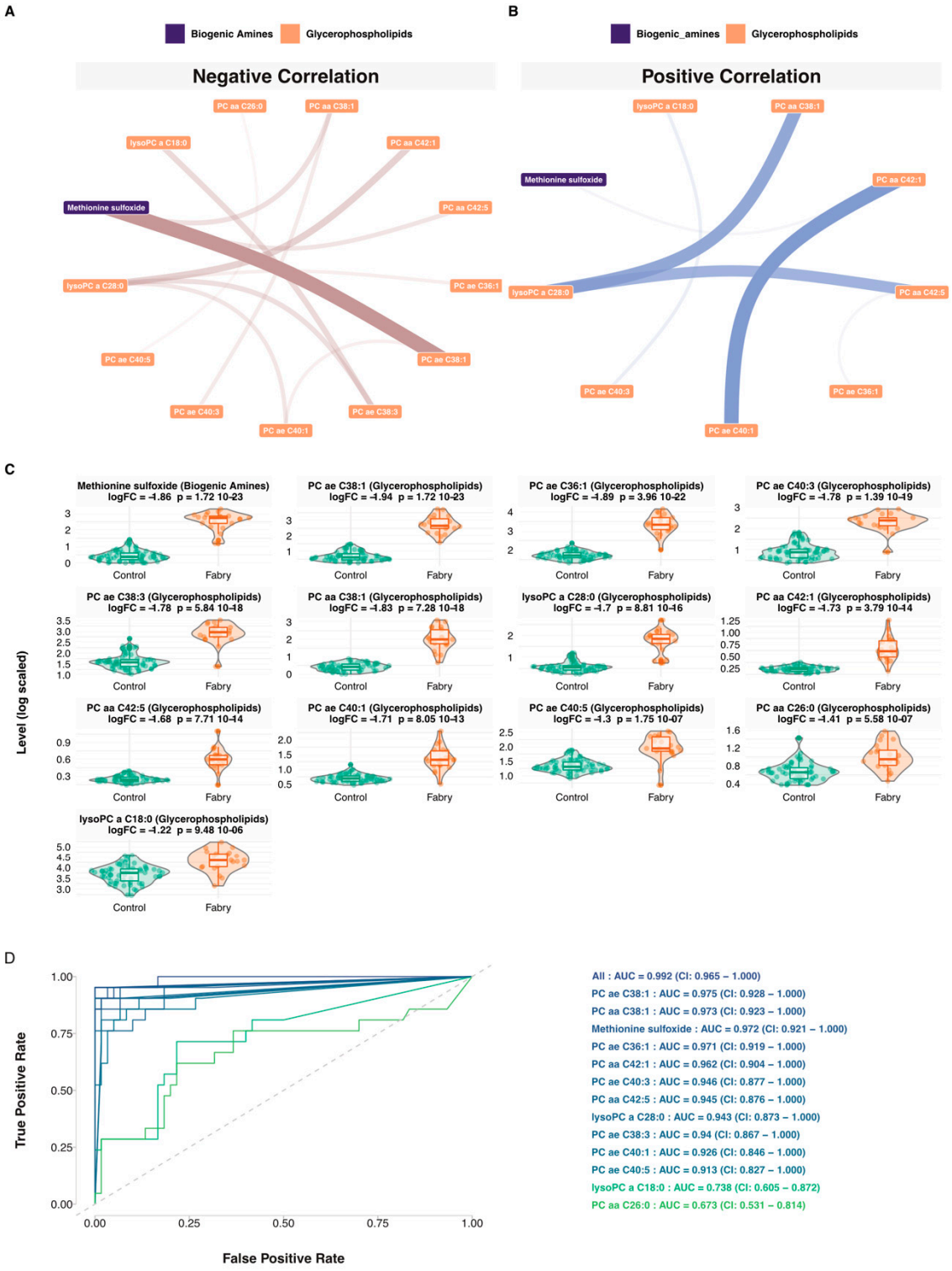


Figure 6. Network and machine learning analysis. (**A**) Negative partial correlation network visualization of the Fabry consensus plasma metabolic signature. The size of the ribbon is proportional to the correlation. (**B**) Positive partial correlation network visualization of the Fabry consensus plasma metabolic signature. The size of the ribbon is proportional to the correlation. (**C**) Boxplots of the consensus plasma metabolic signature. (**D**) ROC curves of the Random Forest predictive models, including 1 biogenic amine (Methionine sulfoxide), 2 lysophosphatidylcholines (lysoPC a C18:0, lysoPC a C28:0) and 10 glycerophospholipids (PC ae C38:1, PC aa C38:1, PC ae C36:1, PC aa C42:1, PC ae C40:3, PC aa C42:5, PC ae C38:3, PC ae C40:1, PC ae C40:5, PC aa C26:0).

4. Discussion

Fabry disease is an IMD that displays a clinical heterogeneity. Currently, LysoGb3 is the most reliable diagnostic biomarker for Fabry disease. However, it fails in diagnosing some non-classical phenotypes or female patients. Since an early diagnosis of this rare disease allows the optimization of patient management, it is essential to uncover disease-specific biomarkers that could allow the stratification of patients and provide tools for treatment follow-up. To achieve this goal, we conducted a targeted metabolomic study in a series of Fabry patients and control individuals. A total of 188 metabolites, including acylcarnitines, biogenic amines, amino acids, glycerophospholipids and sphingomyelins, were quantified in plasma samples. Unsupervised multivariate analysis of the concentrations of these metabolites showed a very clear discrimination of metabolomic profiles between the control and Fabry groups. However, we found no specific metabolic patterns related to gender, disease phenotype (classical vs. non-classical) or disease treatment. Furthermore, this targeted metabolomic analysis shows that 86 metabolites have differential expression between Fabry and control samples. The main unveiled biochemical classes include glycerophospholipids, acylcarnitines, amino acids, biogenic amines and sphingomyelins. To parse the metabolic complexity of these patterns, we used an integrative network-based strategy coupled to a machine learning approach that uncovered a consensual biosignature that is specifically increased in Fabry samples compared to controls. It includes 1 biogenic amine (Methionine sulfoxide), 2 lysophosphatidylcholines (lysoPC a C18:0, lysoPC a C28:0) and 10 glycerophospholipids (PC ae C38:1, PC aa C38:1, PC ae C36:1, PC aa C42:1, PC ae C40:3, PC aa C42:5, PC ae C38:3, PC ae C40:1, PC ae C40:5, PC aa C26:0).

These results show alterations in the metabolism of sphingomyelins and glycerophospholipids. Among the 15 metabolites most significantly altered between controls and Fabry patients, the majority belong to the class of glycerophospholipids (GPL), the components of which are important parts of cell membrane and are also involved in many biological processes such as inflammation and cell differentiation [56]. For example, the length of the fatty acid chain of which they are composed and their degree of saturation have an impact on membrane fluidity and permeability. GPL also serve as reservoirs for second messengers that will be released under the action of phospholipases. Zhang et al. showed that lipid metabolism can contribute to the pro- or anti-inflammatory activities of macrophages by modulating, for example, the fluidity of the membrane and are thus biomarkers of the activation state of macrophages [57]. Depending on the activation stimulus, activated macrophages are divided into 2 main groups: M1 macrophages (pro-inflammatory phenotype) and M2 macrophages (anti-inflammatory phenotype). This activation leads to a modification of the GPL from saturated to polyunsaturated GPLs. In addition, M1 has more GPLs than lysophospholipids, unlike M2. Since Fabry disease is an inflammatory disease, it is therefore interesting to note that most of the GPLs significantly modified in our metabolomic study are GPLs containing polyunsaturated fatty acids. GPLs are also found largely in neural cell membranes, and studies have shown that abnormal metabolism of GPL is associated with neuroinflammation and neurodegeneration [56]. For example, alterations in the GPL composition of the neural membrane have been shown to occur in neurological pathologies such as Alzheimer's disease [58] and Parkinson's disease [59]. Of note, GPL are also components of lipoproteins, particularly low-density lipoproteins (LDL), and it is now accepted that polyunsaturated fatty acids are more oxidation-sensitive [60]. The oxidation of LDL is a key step in the development of atherosclerosis [61]. Thus, the increase in polyunsaturated GPL in Fabry disease may therefore play a role in the occurrence of cardiovascular events in Fabry patients with increased oxidative stress.

Another metabolite of potential interest for Fabry disease is methionine, which is significantly decreased in Fabry patients compared to controls. Indeed, methionine is an essential amino acid that not only plays a proteinogenic role, but also intervenes in several important metabolic pathways such as the cycle of re-methylation of homocysteine to methionine in the presence of folates. This result is suggestive of an alteration in the homocysteine re-methylation cycle. Studies seem to indicate that Fabry patients have

increased homocysteine concentrations even in the absence of chronic renal failure or vitamin deficiency [62–64]. However, the exact mechanism of this increase is not yet clearly understood. Of note, renal insufficiency may be associated with increased plasmatic levels of S-adenosylmethionine (SAM) while folate and methionine levels remain normal [65]. Studies have also shown that methylated forms of Gb3 are present in the plasma and urine of Fabry patients [66]. This might involve the metabolism of SAM, which is derived from methionine. SAM is a methyl donor and a regulator of epigenetics. The role of epigenetics, including DNA methylation, has already been suggested in lysosomal storage diseases [67] and might be involved in the lack of genotype–phenotype correlation in Fabry disease. Patients with Fabry disease also present autophagy impairments [68]. Yanagisawa et al. showed that deregulation of DNA methylation on the *GLA* gene is associated with this dysfunction and that there is a correlation between symptom severity, autophagy dysfunction and methylation of the mutant allele [69].

Interestingly, our analysis clearly shows that not only methionine level is decreased, but its oxidized form, methionine sulfoxide (Met-SO), is increased in patients compared to controls. One of the peculiarities of methionine is that it is very susceptible to oxidation, due to its cysteine sulfide groups. The oxidation of methionine modifies the physicochemical properties of proteins and consequently modulates their function. Numerous studies have shown an increase in oxidative stress in Fabry disease [70–75]. In particular, it has been shown that the accumulation of Gb3 induces oxidative stress [71,73–75] and that there is a correlation between Gb3 and oxidative stress [76]. Biancini et al. also reported an increase in lipid and protein oxidation and inflammation in Fabry patients with decreased antioxidant defenses [71] such as heme oxygenase 1 (HO1) [74]. Fabry patients have endothelial dysfunction [63,77,78]. Namdar et al. showed that the endothelial dysfunction is due to Gb3 accumulation [79]. This is partly due to a decrease in nitric oxide (NO) production by the enzyme endothelial NO synthase (eNOS). Indeed, under physiological conditions, eNOS is associated with the cofactor BH4 to produce NO. In a context of increased oxidative stress, BH4 is oxidized to BH2, and the eNOS thus decoupled from its cofactor no longer produces NO, but superoxide anion, a radical oxygen species (ROS), thus increasing oxidative stress. Shen's team showed that BH4 was decreased in patients with Fabry disease [80]. Moreover, a decrease in superoxide dismutase 2, the mitochondrial enzyme responsible for the degradation of the superoxide anion, was observed in these patients [81]. The oxidation of methionine to methionine sulfoxide (Met-SO) is a mechanism by which proteins protect themselves from oxidative stress, and to protect the cell from radical oxygen species (ROS), the methionine SO reductase system intervenes to subsequently reduce Met-SO to methionine [82]. Therefore, Met-SO is considered a marker of the systemic oxidative state of the organism [83,84].

One of the limitations of our study is related to the small number of patients studied. Thus, our results will need to be confirmed in a larger cohort to verify the predictive nature of these metabolites in Fabry disease and to be able to use them as diagnostic and treatment monitoring tools, particularly in heterozygous women and moderate forms of the disease. It would also be promising to adjust these metabolites to clinical manifestations and assess their predictive performances of disease progression.

5. Conclusions

This metabolomic study allowed us to unveil specific metabolic patterns in Fabry disease. The identification of specific pathological biosignatures provides a better understanding of the disease and in particular the important role of glycerophospholipids and oxidative stress in its pathophysiology. Consideration should be given to combining ERT or SRT treatments with an oxidative stress inhibitor treatment and using Met-SO as a biomarker for treatment monitoring. Moreover, this highlights the potential of using integrative omics and systems-based techniques to parse the genotype–phenotype complexity of FD.

Supplementary Materials: The following are available online at https://www.mdpi.com/article/10.3390/jpm11090898/s1, Table S1: Cohorte Overview; Table S2: Metabolomics Data Matrix; Table S3: Variable metadata; Table S4: Principal Component Analysis Scores; Table S5: Differential Expression Analysis; Table S6: Metabolite Spearman Correlation Matrix; Table S7: Spearman Correlation with LysoGb3 and Residual Enzymatic Activity; Table S8: Partial Correlation Matrix including all samples; Table S9: Partial Correlation Matrix including only control samples; Table S10: Pruned network using all samples network; Table S11: Patient-specific pruned networks; Table S12: Consensus network; Table S13: All Random Forest Models.

Author Contributions: Conceptualization, A.T. and S.B.; methodology, A.T. and S.B.; software, F.D. and A.T.; formal analysis, F.D. and A.T.; investigation, C.P., T.P., R.A. and A.B.; resources, S.B., S.M., O.B. and O.L.; data curation, W.M., S.B., S.M. and O.L.; writing—original draft preparation. A.T. and S.B.; writing—review and editing, all authors; visualization, A.T. and F.D.; supervision, S.B., S.M. and A.T.; project administration, A.T. and S.B.; funding acquisition, A.T. and S.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Rouen University Hospital N° E2021-10.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consents were obtained from the parents when the patient was under 18 or from the adult patient in order to perform any investigation related to their pathology.

Data Availability Statement: All the data that support the findings are presented in the manuscript and the supplementary material.

Acknowledgments: The authors are grateful to all patients and their relatives, staff and clinicians for their contributions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Arends, M.; Wanner, C.; Hughes, D.; Mehta, A.; Oder, D.; Watkinson, O.T.; Elliott, P.M.; Linthorst, G.E.; Wijburg, F.A.; Biegstraaten, M.; et al. Characterization of classical and nonclassical fabry disease: A multicenter study. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2017**, *28*, 1631–1641. [CrossRef]
2. Meikle, P.J.; Hopwood, J.J.; Clague, A.E.; Carey, W.F. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* **1999**, *281*, 249–254. [CrossRef] [PubMed]
3. Inoue, T.; Hattori, K.; Ihara, K.; Ishii, A.; Nakamura, K.; Hirose, S. Newborn screening for fabry disease in Japan: Prevalence and genotypes of fabry disease in a pilot study. *J. Hum. Genet.* **2013**, *58*, 548. [CrossRef]
4. Mechtler, T.P.; Stary, S.; Metz, T.F.; De Jesús, V.R.; Greber-Platzer, S.; Pollak, A.; Herkner, K.R.; Streubel, B.; Kasper, D.C. Neonatal screening for lysosomal storage disorders: Feasibility and incidence from a nationwide study in Austria. *Lancet* **2012**, *379*, 335–341. [CrossRef]
5. Spada, M.; Pagliardini, S.; Yasuda, M.; Tukel, T.; Thiagarajan, G.; Sakuraba, H.; Ponzone, A.; Desnick, R.J. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *Am. J. Hum. Genet.* **2006**, *79*, 31–40. [CrossRef] [PubMed]
6. Hopkins, P.V.; Campbell, C.; Klug, T.; Rogers, S.; Raburn-Miller, J.; Kiesling, J. Lysosomal storage disorder screening implementation: Findings from the first six months of full population pilot testing in missouri. *J. Pediatr.* **2015**, *166*, 172–177. [CrossRef] [PubMed]
7. Lin, H.Y.; Chong, K.W.; Hsu, J.H.; Yu, H.C.; Shih, C.C.; Huang, C.H.; Lin, S.J.; Chen, C.H.; Chiang, C.C.; Ho, H.J.; et al. High incidence of the cardiac variant of fabry disease revealed by newborn screening in the taiwan chinese population. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **2009**, *2*, 450–456. [CrossRef]
8. Kramer, J.; Weidemann, F. Biomarkers for diagnosing and staging of fabry disease. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25*, 1530–1537. [CrossRef]
9. Waldek, S.; Patel, M.R.; 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.* **2009**, *11*, 790–796. [CrossRef] [PubMed]
10. Thomas, A.S.; Mehta, A.B. Difficulties and barriers in diagnosing fabry disease: What can be learnt from the literature? *Expert Opin. Med. Diagn.* **2013**, *7*, 589–599. [CrossRef]
11. Zar-Kessler, C.; Karaa, A.; Sims, K.B.; Clarke, V.; Kuo, B. Understanding the gastrointestinal manifestations of fabry disease: Promoting prompt diagnosis. *Ther. Adv. Gastroenterol.* **2016**, *9*, 626–634. [CrossRef] [PubMed]
12. Winchester, B.; Young, E. *Biochemical and Genetic Diagnosis of Fabry Disease*; Oxford PharmaGenesis: Oxford, UK, 2006.

13. Desnick, R.J.; Allen, K.Y.; Desnick, S.J.; Raman, M.K.; Bernlohr, R.W.; Krivit, W. Fabry's disease: Enzymatic diagnosis of hemizygotes and heterozygotes: A-galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes. *J. Lab. Clin. Med.* **1973**, *81*, 157–171. [PubMed]
14. Chamoles, N.; Blanco, M.; Gaggioli, D. Fabry disease: Enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin. Chim. Acta* **2001**, *1*, 195–196. [CrossRef]
15. Desnick, R.J. A-galactosidase a deficiency: Fabry disease. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed.; Scriver, C.R., Sly, D., Valle, D., Eds.; McGraw-Hill: New York, NY, USA, 2001; Volume 3, pp. 3733–3774.
16. Mills, K.; Johnson, A.; Winchester, B. Synthesis of novel internal standards for the quantitative determination of plasma ceramide trihexoside in fabry disease by tandem mass spectrometry. *FEBS Lett.* **2002**, *515*, 171–176. [CrossRef]
17. Nowak, A.; Mechtler, T.; Kasper, D.C.; Desnick, R.J. Correlation of lyso-gb3 levels in dried blood spots and sera from patients with classic and later-onset fabry disease. *Mol. Genet. Metab.* **2017**, *121*, 320–324. [CrossRef]
18. Boscaro, F.; Pieraccini, G.; Marca, G.l.; Bartolucci, G.; Luceri, C.; Luceri, F.; Moneti, G. Rapid quantitation of globotriaosylceramide in human plasma and urine: A potential application for monitoring enzyme replacement therapy in anderson-fabry disease. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 1507–1514. [CrossRef] [PubMed]
19. Aerts, J.M.; Groener, J.E.; Kuiper, S.; Donker-Koopman, W.E.; Strijland, A.; Ottenhoff, R.; van Roomen, C.; Mirzaian, M.; Wijburg, F.A.; Linthorst, G.E. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 2812–2817. [CrossRef] [PubMed]
20. Talbot, A.; Nicholls, K.; Fletcher, J.M.; Fuller, M. A simple method for quantification of plasma globotriaosylsphingosine: Utility for fabry disease. *Mol. Genet. Metab.* **2017**, *122*, 121–125. [CrossRef] [PubMed]
21. Bichet, D.G.; Aerts, J.M.; Auray-Blais, C.; Maruyama, H.; Mehta, A.B.; Skuban, N.; Krusinska, E.; Schiffmann, R. Assessment of plasma lyso-gb3 for clinical monitoring of treatment response in migalastat-treated patients with fabry disease. *Genet. Med.* **2021**, *23*, 192–201. [CrossRef]
22. Mehta, A. Fabry disease: A review of current enzyme replacement strategies. *Expert Opin. Orphan Drugs* **2015**, *3*, 1319–1330. [CrossRef]
23. Schiffmann, R.; Kopp, J.B.; Austin, H.A., 3rd; Sabnis, S.; Moore, D.F.; Weibel, T.; Balow, J.E.; Brady, R.O. Enzyme replacement therapy in fabry disease: A randomized controlled trial. *JAMA* **2001**, *285*, 2743–2749. [CrossRef]
24. Felis, A.; Whitlow, M.; Kraus, A.; Warnock, D.G.; Wallace, E. Current and investigational therapeutics for fabry disease. *Kidney Int. Rep.* **2020**, *5*, 407–413. [CrossRef] [PubMed]
25. McCafferty, E.H.; Scott, L.J. Migalastat: A review in fabry disease. *Drugs* **2019**, *79*, 543–554. [CrossRef] [PubMed]
26. Arends, M.; Hollak, C.E.M.; Biegstraaten, M. Quality of life in patients with fabry disease: A systematic review of the literature. *Orphanet J. Rare Dis.* **2015**, *10*, 77. [CrossRef]
27. Arends, M.; Biegstraaten, M.; Hughes, D.A.; Mehta, A.; Elliott, P.M.; Oder, D.; Watkinson, O.T.; Vaz, F.M.; van Kuilenburg, A.B.P.; Wanner, C.; et al. Retrospective study of long-term outcomes of enzyme replacement therapy in fabry disease: Analysis of prognostic factors. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0182379. [CrossRef]
28. Citro, V.; Cammisa, M.; Liguori, L.; Cimmaruta, C.; Lukas, J.; Cubellis, M.V.; Andreotti, G. The large phenotypic spectrum of fabry disease requires graduated diagnosis and personalized therapy: A meta-analysis can help to differentiate missense mutations. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 2010. [CrossRef]
29. Sudrie-Arnaud, B.; Marguet, F.; Patrier, S.; Martinovic, J.; Louillet, F.; Broux, F.; Charbonnier, F.; Dranguet, H.; Coutant, S.; Vezain, M.; et al. Metabolic causes of nonimmune hydrops fetalis: A next-generation sequencing panel as a first-line investigation. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **2018**, *481*, 1–8. [CrossRef]
30. Tebani, A.; Schmitz-Afonso, I.; Abily-Donval, L.; Heron, B.; Piraud, M.; Ausseil, J.; Brassier, A.; De Lonlay, P.; Zerimech, F.; Vaz, F.M.; et al. Urinary metabolic phenotyping of mucopolysaccharidosis type i combining untargeted and targeted strategies with data modeling. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **2017**, *475*, 7–14. [CrossRef]
31. Tebani, A.; Afonso, C.; Marret, S.; Bekri, S. Omics-based strategies in precision medicine: Toward a paradigm shift in inborn errors of metabolism investigations. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1555. [CrossRef]
32. Tebani, A.; Abily-Donval, L.; Afonso, C.; Marret, S.; Bekri, S. Clinical metabolomics: The new metabolic window for inborn errors of metabolism investigations in the post-genomic era. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1167. [CrossRef] [PubMed]
33. Cigna, D.; D'Anna, C.; Zizzo, C.; Francofonte, D.; Sorrentino, I.; Colomba, P.; Albeggiani, G.; Armini, A.; Bianchi, L.; Bini, L.; et al. Alteration of proteomic profiles in pbmc isolated from patients with fabry disease: Preliminary findings. *Mol. BioSyst.* **2013**, *9*, 1162–1168. [CrossRef]
34. Yogasundaram, H.; Nikhanj, A.; Putko, B.N.; Boutin, M.; Jain-Ghai, S.; Khan, A.; Auray-Blais, C.; West, M.L.; Oudit, G.Y. Elevated inflammatory plasma biomarkers in patients with fabry disease: A critical link to heart failure with preserved ejection fraction. *J. Am. Heart Assoc.* **2018**, *7*, e009098. [CrossRef]
35. Matafora, V.; Cuccurullo, M.; Beneduci, A.; Petrazzuolo, O.; Simeone, A.; Anastasio, P.; Mignani, R.; Feriozzi, S.; Pisani, A.; Comotti, C.; et al. Early markers of fabry disease revealed by proteomics. *Mol. BioSyst.* **2015**, *11*, 1543–1551. [CrossRef]
36. Manwaring, V.; Heywood, W.E.; Clayton, R.; Lachmann, R.H.; Keutzer, J.; Hindmarsh, P.; Winchester, B.; Heales, S.; Mills, K. The identification of new biomarkers for identifying and monitoring kidney disease and their translation into a rapid mass spectrometry-based test: Evidence of presymptomatic kidney disease in pediatric fabry and type-i diabetic patients. *J. Proteome Res.* **2013**, *12*, 2013–2021. [CrossRef]

37. Heo, S.H.; Kang, E.; Kim, Y.M.; Go, H.; Kim, K.Y.; Jung, J.Y.; Kang, M.; Kim, G.H.; Kim, J.M.; Choi, I.H.; et al. Fabry disease: Characterisation of the plasma proteome pre- and post-enzyme replacement therapy. *J. Med. Genet.* **2017**, *54*, 771–780. [CrossRef]
38. Moore, D.F.; Krokhin, O.V.; Beavis, R.C.; Ries, M.; Robinson, C.; Goldin, E.; Brady, R.O.; Wilkins, J.A.; Schiffmann, R. Proteomics of specific treatment-related alterations in fabry disease: A strategy to identify biological abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2873–2878. [CrossRef]
39. Birket, M.J.; Raibaud, S.; Lettieri, M.; Adamson, A.D.; Letang, V.; Cervello, P.; Redon, N.; Ret, G.; Viale, S.; Wang, B.; et al. A human stem cell model of fabry disease implicates limp-2 accumulation in cardiomyocyte pathology. *Stem Cell Rep.* **2019**, *13*, 380–393. [CrossRef] [PubMed]
40. Song, H.-Y.; Chien, C.-S.; Yarmishyn, A.A.; Chou, S.-J.; Yang, Y.-P.; Wang, M.-L.; Wang, C.-Y.; Leu, H.-B.; Yu, W.-C.; Chang, Y.-L.; et al. Generation of gla-knockout human embryonic stem cell lines to model autophagic dysfunction and exosome secretion in fabry disease-associated hypertrophic cardiomyopathy. *Cells* **2019**, *8*, 327. [CrossRef] [PubMed]
41. Weidemann, F.; Beer, M.; Kralewski, M.; Siwy, J.; Kampmann, C. Early detection of organ involvement in fabry disease by biomarker assessment in conjunction with lge cardiac mri: Results from the sophia study. *Mol. Genet. Metab.* **2019**, *126*, 169–182. [CrossRef] [PubMed]
42. Doykov, I.D.; Heywood, W.E.; Nikolaenko, V.; Śpiewak, J.; Hällqvist, J.; Clayton, P.T.; Mills, P.; Warnock, D.G.; Nowak, A.; Mills, K. Rapid, proteomic urine assay for monitoring progressive organ disease in fabry disease. *J. Med. Genet.* **2020**, *57*, 38–47. [CrossRef] [PubMed]
43. Tebani, A.; Mauhin, W.; Abily-Donval, L.; Lesueur, C.; Berger, M.G.; Nadjar, Y.; Berger, J.; Benveniste, O.; Lamari, F.; Laforêt, P.; et al. A proteomics-based analysis reveals predictive biological patterns in fabry disease. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 1325. [CrossRef] [PubMed]
44. Manwaring, V.; Boutin, M.; Auray-Blais, C. A metabolomic study to identify new globotriaosylceramide-related biomarkers in the plasma of fabry disease patients. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 9039–9048. [CrossRef]
45. Mauhin, W.; Lidove, O.; Amelin, D.; Lamari, F.; Caillaud, C.; Mingozzi, F.; Dzangue-Tchoupou, G.; Arouche-Delaperche, L.; Douillard, C.; Dussol, B.; 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.* **2018**, *13*, 127. [CrossRef]
46. Ramsay, S.L.; Guggenbichler, W.; Weinberger, K.M.; Graber, A.; Stoeggl, W.M. Device for Quantitative Analysis of a Drug or Metabolite Profile. Google Patents WO2007003344A2, 11 January 2007.
47. Ramsay, S.L.; Stoeggl, W.M.; Weinberger, K.M.; Graber, A.; Guggenbichler, W. Apparatus and Method for Analyzing a Metabolite Profile. Google Patents US8265877B2, 11 September 2012.
48. Van Den Berg, R.A.; Hoefsloot, H.C.; Westerhuis, J.A.; Smilde, A.K.; Van Der Werf, M.J. Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genom.* **2006**, *7*, 142. [CrossRef]
49. Ritchie, M.E.; Phipson, B.; Wu, D.; Hu, Y.; Law, C.W.; Shi, W.; Smyth, G.K. Limma powers differential expression analyses for rna-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, e47. [CrossRef]
50. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* **1995**, *57*, 289–300. [CrossRef]
51. Liang, F.; Song, Q.; Qiu, P. An equivalent measure of partial correlation coefficients for high-dimensional gaussian graphical models. *J. Am. Stat. Assoc.* **2015**, *110*, 1248–1265. [CrossRef]
52. Thistlethwaite, L.R.; Petrosyan, V.; Li, X.; Miller, M.J.; Elsea, S.H.; Milosavljevic, A. Ctd: An information-theoretic algorithm to interpret sets of metabolomic and transcriptomic perturbations in the context of graphical models. *PLoS Comput. Biol.* **2021**, *17*, e1008550. [CrossRef] [PubMed]
53. Wright, M.N.; Ziegler, A. Ranger: A fast implementation of random forests for high dimensional data in C++ and r. *J. Stat. Softw.* **2017**, *77*, 1–17. [CrossRef]
54. Kuhn, M. Caret: Classification and Regression Training; Astrophysics Source Code Library: 2020. Avaliable online: https://ascl.net/ (accessed on 1 May 2021).
55. Eriksson, L.; Trygg, J.; Wold, S. A chemometrics toolbox based on projections and latent variables. *J. Chemom.* **2014**, *28*, 332–346. [CrossRef]
56. Farooqui, A.A.; Horrocks, L.A.; Farooqui, T. Glycerophospholipids in brain: Their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *106*, 1–29. [CrossRef]
57. Zhang, C.; Wang, Y.; Wang, F.; Wang, Z.; Lu, Y.; Xu, Y.; Wang, K.; Shen, H.; Yang, P.; Li, S.; et al. Quantitative profiling of glycerophospholipids during mouse and human macrophage differentiation using targeted mass spectrometry. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 412. [CrossRef]
58. Kosicek, M.; Hecimovic, S. Phospholipids and Alzheimer's disease: Alterations, mechanisms and potential biomarkers. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 1310–1322. [CrossRef] [PubMed]
59. Miletic Vukajlovic, J.; Drakulic, D.; Pejic, S.; Ilic, T.V.; Stefanovic, A.; Petkovic, M.; Schiller, J. Increased plasma phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratios in patients with Parkinson's disease. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2019**, *34*, e8595. [CrossRef] [PubMed]
60. McIntyre, T.M.; Hazen, S.L. Lipid oxidation and cardiovascular disease: Introduction to a review series. *Circ. Res.* **2010**, *107*, 1167–1169. [CrossRef]

61. Witztum, J.L.; Steinberg, D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Investig.* **1991**, *88*, 1785–1792. [CrossRef] [PubMed]
62. Cheung, R.; Sillence, D.O.; Tchan, M.C. Homocysteine and erythrocyte sedimentation rate correlate with cerebrovascular disease in fabry disease. *JIMD Rep.* **2012**, *6*, 101–105. [PubMed]
63. Demuth, K.; Germain, D.P. Endothelial markers and homocysteine in patients with classic fabry disease. *Acta Paediatr. Suppl.* **2002**, *91*, 57–61. [CrossRef]
64. Fedi, S.; Gensini, F.; Gori, A.M.; Abbate, R.; Borsini, W. Homocysteine and tissue factor pathway inhibitor levels in patients with fabry's disease. *J. Thromb. Haemost.* **2005**, *3*, 2117–2119. [CrossRef]
65. Van Guldener, C. Why is homocysteine elevated in renal failure and what can be expected from homocysteine-lowering? *Nephrol. Dial. Transplant.* **2006**, *21*, 1161–1166. [CrossRef] [PubMed]
66. Abaoui, M.; Boutin, M.; Lavoie, P.; Auray-Blais, C. Tandem mass spectrometry multiplex analysis of methylated and non-methylated urinary gb3 isoforms in fabry disease patients. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **2016**, *452*, 191–198. [CrossRef] [PubMed]
67. Hassan, S.; Sidransky, E.; Tayebi, N. The role of epigenetics in lysosomal storage disorders: Uncharted territory. *Mol. Genet. Metab.* **2017**, *122*, 10–18. [CrossRef] [PubMed]
68. Chévrier, M.; Brakch, N.; Céline, L.; Genty, D.; Ramdani, Y.; Moll, S.; Djavaheri-Mergny, M.; Brasse-Lagnel, C.; Annie Laquerrière, A.L.; Barbey, F. Autophagosome maturation is impaired in fabry disease. *Autophagy* **2010**, *6*, 589–599. [CrossRef] [PubMed]
69. Yanagisawa, H.; Hossain, M.A.; Miyajima, T.; Nagao, K.; Miyashita, T.; Eto, Y. Dysregulated DNA methylation of gla gene was associated with dysfunction of autophagy. *Mol. Genet. Metab.* **2019**, *126*, 460–465. [CrossRef] [PubMed]
70. Biancini, G.B.; Jacques, C.E.; Hammerschmidt, T.; de Souza, H.M.; Donida, B.; Deon, M.; Vairo, F.P.; Lourenco, C.M.; Giugliani, R.; Vargas, C.R. Biomolecules damage and redox status abnormalities in fabry patients before and during enzyme replacement therapy. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **2016**, *461*, 41–46. [CrossRef] [PubMed]
71. Biancini, G.B.; Moras, A.M.; Reinhardt, L.S.; Busatto, F.F.; de Moura Sperotto, N.D.; Saffi, J.; Moura, D.J.; Giugliani, R.; Vargas, C.R. Globotriaosylsphingosine induces oxidative DNA damage in cultured kidney cells. *Nephrology* **2017**, *22*, 490–493. [CrossRef] [PubMed]
72. Muller, K.B.; Galdieri, L.C.; Pereira, V.G.; Martins, A.M.; D'Almeida, V. Evaluation of oxidative stress markers and cardiovascular risk factors in fabry disease patients. *Genet. Mol. Biol.* **2012**, *35*, 418–423. [CrossRef] [PubMed]
73. Ravarotto, V.; Carraro, G.; Pagnin, E.; Bertoldi, G.; Simioni, F.; Maiolino, G.; Martinato, M.; Landini, L.; Davis, P.A.; Calo, L.A. Oxidative stress and the altered reaction to it in fabry disease: A possible target for cardiovascular-renal remodeling? *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0204618.
74. Ravarotto, V.; Simioni, F.; Carraro, G.; Bertoldi, G.; Pagnin, E.; Calo, L.A. Oxidative stress and cardiovascular-renal damage in fabry disease: Is there room for a pathophysiological involvement? *J. Clin. Med.* **2018**, *7*, 409. [CrossRef]
75. Shen, J.S.; Meng, X.L.; Moore, D.F.; Quirk, J.M.; Shayman, J.A.; Schiffmann, R.; Kaneski, C.R. Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in fabry disease endothelial cells. *Mol. Genet. Metab.* **2008**, *95*, 163–168. [CrossRef]
76. Biancini, G.B.; Vanzin, C.S.; Rodrigues, D.B.; Deon, M.; Ribas, G.S.; Barschak, A.G.; Manfredini, V.; Netto, C.B.; Jardim, L.B.; Giugliani, R.; et al. Globotriaosylceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in fabry patients treated with enzyme replacement therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1822*, 226–232. [CrossRef]
77. Loso, J.; Lund, N.; Avanesov, M.; Muschol, N.; Lezius, S.; Cordts, K.; Schwedhelm, E.; Patten, M. Serum biomarkers of endothelial dysfunction in fabry associated cardiomyopathy. *Front. Cardiovasc. Med.* **2018**, *5*, 108. [CrossRef]
78. Satoh, K. Globotriaosylceramide induces endothelial dysfunction in fabry disease. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2014**, *34*, 2–4. [CrossRef]
79. Namdar, M.; Gebhard, C.; Studiger, R.; Shi, Y.; Mocharla, P.; Schmied, C.; Brugada, P.; Luscher, T.F.; Camici, G.G. Globotriaosylsphingosine accumulation and not alpha-galactosidase—A deficiency causes endothelial dysfunction in fabry disease. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36373. [CrossRef]
80. Shen, J.S.; Arning, E.; West, M.L.; Day, T.S.; Chen, S.; Meng, X.L.; Forni, S.; McNeill, N.; Goker-Alpan, O.; Wang, X.; et al. Tetrahydrobiopterin deficiency in the pathogenesis of fabry disease. *Hum. Mol. Genet.* **2017**, *26*, 1182–1192. [CrossRef]
81. Tseng, W.L.; Chou, S.J.; Chiang, H.C.; Wang, M.L.; Chien, C.S.; Chen, K.H.; Leu, H.B.; Wang, C.Y.; Chang, Y.L.; Liu, Y.Y.; et al. Imbalanced production of reactive oxygen species and mitochondrial antioxidant sod2 in fabry disease-specific human induced pluripotent stem cell-differentiated vascular endothelial cells. *Cell Transpl.* **2017**, *26*, 513–527. [CrossRef] [PubMed]
82. Oien, D.B.; Moskovitz, J. Substrates of the methionine sulfoxide reductase system and their physiological relevance. *Curr. Top. Dev. Biol.* **2008**, *80*, 93–133.
83. Stadtman, E.R.; Van Remmen, H.; Richardson, A.; Wehr, N.B.; Levine, R.L. Methionine oxidation and aging. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1703*, 135–140. [CrossRef] [PubMed]
84. Suzuki, S.; Kodera, Y.; Saito, T.; Fujimoto, K.; Momozono, A.; Hayashi, A.; Kamata, Y.; Shichiri, M. Methionine sulfoxides in serum proteins as potential clinical biomarkers of oxidative stress. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 38299. [CrossRef] [PubMed]

CHAPITRE II : MALADIE DE GAUCHER (ARTICLE III)

La maladie de Gaucher (MG), une maladie lysosomale de transmission autosomique récessive, affecte l'enzyme lysosomale β-glucocérébrosidase (GCase), entraînant l'accumulation de glucosylcéramide (Gb1) dans les lysosomes. La MG présente un éventail de manifestations cliniques. Ce projet déploie des approches de protéomique et de métabolomique ciblées pour investiguer les changements métaboliques chez 43 patients atteints de la MG de type 1 par rapport à 59 contrôles. Les résultats révèlent des empreintes biologiques prometteuses. En effet, la numération plaquettaire, la splénectomie, le traitement et les caractéristiques cliniques étaient associés à des caractéristiques omiques spécifiques, offrant des perspectives sur l'hétérogénéité clinique de la GD et des marqueurs diagnostiques potentiels. De plus, l'augmentation des phosphatidylcholines chez les patients atteints de MG suggère un métabolisme lipidique altéré, potentiellement en raison de leur synthèse accrue. Cela met en lumière le stress du réticulum endoplasmique et le trafic lipidique altéré, communément observés dans les maladies lysosomales. Les patients atteints de MG présentent un profil inflammatoire avec des cytokines élevées et une inflammation de type auto-immune, même chez les patients traités, soulignant la complexité des déséquilibres immunitaires liés à la MG. Des indices de dysfonctionnement mitochondrial sont identifiés à travers l'augmentation des marqueurs de stress oxydatif et des profils modifiés d'acylcarnitines chez les patients atteints de GD, indiquant un dysfonctionnement de la membrane mitochondriale qui affecterait la capacité de transport des acides gras. L'inhibition de l'autophagie semble être cruciale dans la MG, entraînant la synthèse lipidique, un dysfonctionnement mitochondrial et une inflammation via l'activation chronique de mTORC1. Malgré des limites telles que la focalisation sur la MG de type 1 et l'utilisation d'approches omiques ciblées, cette étude confirme la dysrégulation métabolique et immunitaire dans la MG. Elle pose les bases pour des investigations futures

exhaustives sur les manifestations de la GD avec une portée plus large et une couverture moléculaire plus étendue.

Mon rôle dans ce projet a porté sur la génération des données métabolomiques et protéomique, le contrôle qualité, l'analyse, l'intégration, la visualisation et l'interprétation des données clinico-biologiques. J'ai participé à la rédaction de l'article actuellement soumis.

***Ducatez F**, Berger MG, Pilon C, Plichet T, Lesueur C, Berger J, Belmatoug N, Marret S, Bekri S, Tebani A. Deciphering Metabolic Shifts in Gaucher Disease: A Multi-Omics Study. Submitted.*

Deciphering Metabolic Shifts in Gaucher Disease Type 1: A Multi-Omics Study

Franklin Ducatez[1,2], Marc G. Berger[3,4*], Carine Pilon[1], Thomas Plichet[1], Céline Lesueur[1], Juliette Berger[3,4*], Nadia Belmatoug[5*], Stéphane Marret[2], Soumeya Bekri[1*], Abdellah Tebani[1*]

[1] Normandie Univ, UNIROUEN, CHU Rouen, INSERM U1245, Department of Metabolic Biochemistry, 76000 Rouen
[2] Normandie Univ, UNIROUEN, CHU Rouen, INSERM U1245, Department of Neonatal Pediatrics, Intensive Care and Neuropediatrics, 76000 Rouen, France
[3] CHU Clermont-Ferrand, Hopital Estaing, CRB-Auvergne, 63003 Clermont-Ferrand, France
[4] Université Clermont Auvergne, EA 7453 CHELTER, 63000 Clermont-Ferrand, France
[5] Referral Center for Lysosomal Diseases, Paris Cité University, APHP-Nord, France.
[*]Groupe CETG - Commission d'Evaluation du Traitement de la maladie de Gaucher

***** Correspondence

Dr. Abdellah TEBANI
Department of Metabolic Biochemistry,
Rouen University Hospital
76000 ROUEN Cedex
France
+33 2 32 88 81 24
abdellah.tebani@chu-rouen.fr

Running head: Multi-omics profiling in Gaucher disease

Abstract

Gaucher disease (GD), an autosomal recessive lysosomal disorder, primarily affects the lysosomal enzyme β-glucocerebrosidase (GCase), leading to glucosylceramide (Gb1) accumulation in lysosomes. GD presents a spectrum of clinical manifestations. This study deploys proteomics and metabolomics to comprehensively investigate the biochemical landscape in 43 deeply phenotyped type 1 GD patients compared to 59 controls. Conventional and systems biology with machine learning approaches have been used to analyze the data. The results show promising biological imprints. Indeed, platelet count, splenectomy, treatment, and clinical traits were associated with specific omics features, providing insights into GD's clinical heterogeneity and potential diagnostic markers. Furthermore, elevated phosphatidylcholines in GD patients suggest altered lipid metabolism, potentially due to their increased synthesis. This points to endoplasmic reticulum stress and impaired lipid trafficking, commonly seen in lysosomal diseases. GD patients exhibit an inflammatory profile with elevated cytokines and autoimmune-like inflammation, even in treated patients, highlighting the complexity of GD-related immune imbalances. Mitochondrial dysfunction clues are found through increased oxidative stress markers and altered acylcarnitine profiles in GD patients, suggesting mitochondrial membrane dysfunction affecting carnitine-carrying capacity. Autophagy inhibition appears pivotal in GD, driving lipid synthesis, impaired mitochondrial function, and inflammation through mTORC1 chronic activation. Despite limitations like focusing on type 1 GD and using targeted omics approaches, this study provides valuable insights into GD metabolic and immune dysregulation. It lays the basis for future comprehensive investigations into GD manifestations with broader scope and molecular coverage.

Keywords: Lysosomal diseases; Gaucher disease; Inherited Metabolic Diseases; Omics; Proteomics; Metabolomics; Systems biology; Network analysis

1. Introduction

Gaucher disease (GD) (OMIM #250100) is a rare lysosomal disorder with an overall incidence of 1/40,000. GD is due to a deficiency of acid beta-glucosidase or glucocerebrosidase (GCase) or in rare cases of its activator, saposin C [214]. GCase belongs to the glycosphingolipid (GSLs) pathway and its deficiency leads to the accumulation of two main substrates, glucosylceramide (Gb1) and glucosylsphingosine (LysoGb1) within the lysosomes [214]. Lyso-Gb1 is considered as a selective and sensitive biomarker of GD for diagnosis, prognosis, and treatment monitoring [215]. To date, 690 variants have been described in *GBA* gene encoding for GCase (https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=GBA). Like many inborn errors of metabolism (IEMs), the clinical presentations of GD represent a continuum from an acute lethal neuronopathic (type 2) to a progressive (type 1) form. GD type 1 represents 90% of all cases and is characterized by a splenomegaly and/or hepatomegaly, cytopenia (thrombocytopenia, anemia and more rarely leukopenia), and/or bone involvement (Erlenmeyer flask deformity, bone marrow infiltration, osteoporosis, fractures, lytic lesions, pathological and vertebral fractures, bone infarcts and avascular necrosis) [216]. This condition was called non-neuronopathic form, but lately it has been noted that GD patients are prone to develop neurodegenerative diseases such as Parkinson disease (PD) or Lewy Bodies dementia (LBD) [217-219]. In addition, patients with GD have a higher risk of developing hematologic diseases, such as monoclonal gammopathies (monoclonal gammopathy of undetermined significance – MGUS and multiple myeloma – MM). These gammopathies are characterized by abnormal and uncontrolled clonal expansion of plasma cells. Clonal immunoglobulins reactive against LysoGb1 have been reported in Gaucher patients with MM or MGUS. Chronic stimulation of B cells by these lipid antigens may drive the development MGUS and MM [163,183,220].

Several specific treatments are available such as enzyme replacement therapy (ERT) and substrate reduction (SRT); thus, an early diagnosis is necessary for an efficient disease management. However, due to the diversity of clinical signs, the low prevalence of this disease and the complexity of the mechanisms involved, the diagnosis can be difficult and delayed. The development of "omics" investigations and the advances in large-scale data analysis may enable the emergence of new tools for the diagnosis, monitoring, and treatment of GD.

In addition to the major role of the lysosome in macromolecule degradation, multiple functions of the lysosome have been characterized recently such as antigen presentation, plasma membrane repair, cell adhesion and migration, apoptotic cell death, metabolic signaling, communication between organelles, and gene regulation [184,221]. This places the lysosome in many processes and gives it a central role in cellular homeostasis. Knowing this helps explain the link between rare lysosomal diseases and common pathologies such as cancers, neurodegenerative diseases and autoimmune diseases. To analyze this complexity, we need to interrogate cell biology in greater depth using innovative multi-scale molecular investigations. The omics approach allows interrogating complex data extracted from biological systems in an integrative way using bioinformatics, data modeling, and systems biology strategies.

Given the limited number of omics studies in Gaucher disease, we present a targeted proteomics and metabolomics study to determine the underlying biological signatures that may distinguish Gaucher disease patients from healthy subjects. In addition, a study of

altered metabolic pathways was conducted to reveal underlying mechanisms and potential therapeutic targets.

2. Methods

2.1. Patients and Blood Samples

Plasma samples from 43 Gaucher patients were issued from the French national biological collection (ELODIE-MG) housed at the CRB-Auvergne in Clermont-Ferrand (France) under the scientific responsibility of the French Gaucher disease expert group (*Comité d'Evaluation du Traitement de la maladie de Gaucher*, CETG).
Clinico-biological follow-up were retrieved from the French Gaucher disease registry (INSERM accredited) organized by the Center for Lysosomal Diseases (CRML) with the CETG as scientific committee. All Gaucher samples were from GD type 1. Human control plasma samples with no significant medical conditions were purchased from BioIVT (West Sussex, UK). Detailed clinical and molecular characteristics of the are presented in **Supplementary Tables S1 and S2**. Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

2.2. Metabolomics profiling

Plasma metabolites were measured using the AbsoluteIDQ®p180 kit (Biocrates Life Science - Innsbruck, Austria), a fully automated assay based on phenylisothiocyanate (PITC) derivatization of the target analytes in bodily fluids. Amino acids and biogenic amines are determined in LC-MS mode, whereas acylcarnitines (C), phosphatidylcholines acyl-acyl/acyl-alkyl (PC aa, PC ae), lyso-phosphatidylcholines (lyso-PC) and sphingomyelins (SM) are analyzed in flow injection analysis (FIA). The list of the 188 analytes is available in **Supplementary Table S3**. Sample preparation was carried out according to the manufacturer's protocol. Analysis was carried out on the Prominence Shimadzu UFLC System (Shimadzu, Prominence, Kyoto, Japan) coupled to a 4000 Qtrap mass spectrometer (Sciex, Framingham, MA, USA) with an electrospray ion source. Data acquisition and processing were performed using the Analyst 1.5 software (Sciex, Framingham, MA, USA).

2.3. Proteomics

Plasma proteins were measured using the V-PLEX Human Biomarker 40-Plex Kit (Meso Scale Discovery, Rockville, MD, USA), based on electrochemiluminescence assays. The list of the 40 proteins is available in **Supplementary Table S3**. Data were acquired using a SECTOR S 6000 plate reader (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD, USA).

2.4. Data analysis

All measurements were combined into one concatenated dataset. The analysis was conducted using the R programming language. Missing values have been imputed with the nearest-neighbor averaging algorithm in the impute package [222]. Results have been log-transformed and pareto-scaled. Exploratory analysis was performed using principal components analysis (PCA) with the pcaMethods package [223]. All the differential analyses

were performed using linear mixed effect modeling with the limma package [224]. Age and sex were taken into account as cofounders. Correlations analysis was done using Spearman correlation. Clustering analysis used the Euclidean distances. Correction for multi-testing was done with the Benjamini–Hochberg–Yekutieli method. The results with an adjusted *p*-value <0.05 were considered statistically significant. The main characteristics of all measured biomolecules is available in **Supplementary Table S4**.

3. Results

3.1. Cohort characteristics

In total, 43 Gaucher patients of type 1 were included and compared to 59 controls. The sex ratio was similar between the two groups. However, Gaucher patients were, on average older than controls, with a mean age of 46 vs. 36 years old, respectively (adjusted *p*-value = 0.026, **Table 1**). In our GD population, two patients had arthritis, 33 had bone involvement, 22 were male, and 21 were female (**Fig. 1**). Regarding the genotype, three were homozygous p.(Asn370Ser)/p.(Asn370Ser), 30 were compound heterozygous with 25 of them containing the p.(Asn370Ser) variant, and 10 were unknown. Additionally, 29 individuals had hepatomegaly, two had lung involvement, four had MGUS or MM, and four had neurological involvement. Of note, eight patients had undergone splenectomy. In terms of age at diagnosis, the mean age was 25 years (range: 0 – 85). The mean age at sampling was 46 years (range: 8 – 86). The CCL18 levels had a mean of 554.60 ng/mL (range: 63 - 3,748), and chitotriosidase activity levels had a mean of 3432.35 nmol/ml plasma per hour (range: 15 - 19,211). The mean platelet count was 153.31 G/L (range: 30 – 343).

3.2. Exploratory unsupervised analysis

The unsupervised exploration of the results with PCA showed a complete separation between the Gaucher samples and the controls (**Fig. 2A**). This separation predominantly occurred through biomolecules from the first principal component of the PCA (**Fig. 2B**), with six Glycerophospholipids, the acylcarnitine C18:1 and the fibroblast growth factor 2 (FGF2). However, no clear separation was found within the Gaucher group.

3.3. Distinct biological imprint in Gaucher patients

The differential analysis showed that 146 omics features were differentially expressed within Gaucher patients vs. controls, including: 21 Acylcarnitines, 16 Aminoacids, four Angiogenesis proteins, 13 Biogenic amines, five Chemokines, seven Cytokines, 61 Glycerophospholipids, six proinflammatory proteins, nine Sphingomyelins and four vascular injury proteins (**Fig. 2C**). Among them, 19 biomolecules showed important levels change. Nine were upregulated with levels at least two folds compared to controls (**Fig. 2C-D**): lysoPC a C14:0 (logFC = 1.1, adjusted p-value = 1.40×10^{-25}), C18:1 (logFC = 1.19, adjusted p-value = 3.30×10^{-23}), Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2 – logFC = 2.26, adjusted p-value = 2.34×10^{-19}), Vascular Endothelial Growth Factor alpha (VEGFA – logFC = 2.6, adjusted p-value = 5.16×10^{-17}), PC aa C40:2 (logFC = 1.03, adjusted p-value = 1.68×10^{-16}), Putrescine (logFC = 1.27, adjusted p-value = 3.54×10^{-15}), Serotonin (logFC = 1.28, adjusted p-value = 1.05×10^{-08}), N-

acetylornithine (Ac-Orn – logFC = 1.11, adjusted p-value = 1.41 x 10^{-04}) and Levodopa (DOPA – logFC = 1.08, adjusted p-value = 2.33 x 10^{-04}). Furthermore, there were ten biomolecules in Gaucher patients with downregulated levels, which were decreased by at least a half (**Fig. 2D**). These include Arginine (logFC = -1.52, adjusted p-value = 3.81 x 10^{-19}), Interleukin-12p70 (IL12B – logFC = -2.08, adjusted p-value = 2.00 x 10^{-14}), IL5 (logFC = -2.7, adjusted p-value = 6.78 x 10^{-14}), IL2 (logFC = -2.35, adjusted p-value = 4.04 x 10^{-12}), C5:1-DC (logFC = -1.01, adjusted p-value = 5.31 x 10^{-09}), Interferon γ (IFNG – logFC = -1.1, adjusted p-value = 9.35 x 10^{-09}), PC ae C30:1 (logFC = -1.04, adjusted p-value = 5.69 x 10^{-06}), Serum Amyloid A1 (SAA1 – logFC = -1.14, adjusted p-value = 3.21 x 10^{-05}), Symetric Dimethylarginine (SDMA – logFC = -1.01, adjusted p-value = 6.37 x 10^{-03}) and CC motif chemokine ligand 13 (CCL13 – logFC = -1.19, adjusted p-value = 1.20 x 10^{-02}). In the Glycerophospholipids group, 24 were upregulated including: PC ae C42:0 (logFC = 0.74, adjusted p-value = 2.42 x 10^{-23}), PC aa C40:3 (logFC = 0.92, adjusted p-value = 3.01 x 10^{-17}), PC aa C42:5 (logFC = 0.65, adjusted p-value = 9.51 x 10^{-16}), PC ae C40:5 (logFC = 0.7, adjusted p-value = 1.93 x 10^{-14}), PC ae C36:1 (logFC = 0.64, adjusted p-value = 6.06 x 10^{-14}), PC ae C38:2 (logFC = 0.74, adjusted p-value = 2.95 x 10^{-11}), PC ae C40:3 (logFC = 0.91, adjusted p-value = 3.19 x 10^{-11}), PC ae C38:1 (logFC = 0.99, adjusted p-value = 5.13 x 10^{-11}), PC aa C42:4 (logFC = 0.89, adjusted p-value = 2.28 x 10^{-10}), PC ae C44:3 (logFC = 0.7, adjusted p-value = 2.46 x 10^{-07}). Whereas, four were downregulated: PC aa C32:2 (logFC = -0.98, adjusted p-value = 3.40 x 10^{-11}), PC aa C30:0 (logFC = -0.59, adjusted p-value = 2.67 x 10^{-10}), PC ae C34:3 (logFC = -0.56, adjusted p-value = 4.62 x 10^{-10}) and PC aa C32:3 (logFC = -0.76, adjusted p-value = 2.51 x 10^{-06}). Regarding the Acylcarnitines' group, 9 were upregulated: C12-DC (logFC = 0.43, adjusted p-value = 3.09 x 10^{-13}), C8 (logFC = 0.53, adjusted p-value = 1.03 x 10-10), C16 (logFC = 0.67, adjusted p-value = 1.13 x 10^{-10}), C3-OH (logFC = 0.7, adjusted p-value = 3.15 x 10^{-07}), C18:2 (logFC = 0.81, adjusted p-value = 4.50 x 10^{-07}), C10 (logFC = 0.51, adjusted p-value = 6.92 x 10^{-06}), C14:1 (logFC = 0.47, adjusted p-value = 2.29 x 10^{-05}), C18 (logFC = 0.57, adjusted p-value = 4.53 x 10-05), C12 (logFC = 0.45, adjusted p-value = 1.03 x 10^{-03}). 2 were downregulated: C5-M-DC (logFC = -0.42, adjusted p-value = 2.24 x 10^{-02}) and C9 (logFC = -0.4, adjusted p-value = 3.01 x 10^{-02}). For aminoacids, Ornithine was upregulated (logFC = 0.47, adjusted p-value = 4.33 x 10^{-06}) along with Methionine sulfoxide (Met-SO – logFC = 0.94, adjusted p-value = 1.56 x 10^{-04}), Taurine (logFC = 0.41, adjusted p-value = 9.69 x 10-04), Cis-4-Hydroxyproline (c4-OH-Pro – logFC = 0.62, adjusted p-value = 4.78 x 10^{-02}). Three aminoacids were downregulated including Methionine (logFC = -0.69, adjusted p-value = 5.03 x 10^{-16}), Isoleucine (logFC = -0.41, adjusted p-value = 1.29 x 10^{-06}) and Trans-4-Hydroxyproline (t4-OH-Pro – logFC = -0.42, adjusted p-value = 3.64 x 10^{-04}). Spermidine (logFC = 0.63, adjusted p-value = 3.83 x 10-09) was upregulated in the Biogenic amines group. No Sphingomyelins were found upregulated. Five were downregulated including: SM C16:1 (logFC = -0.59, adjusted p-value = 1.41 x 10^{-14}), SM C16:0 (logFC = -0.48, adjusted p-value = 1.22 x 10^{-12}), SM C20:2 (logFC = -0.68, adjusted p-value = 1.61 x 10^{-12}), SM C18:1 (logFC = -0.44, adjusted p-value = 2.50 x 10^{-08}), SM C22:3 (logFC = -0.81, adjusted p-value = 4.67 x 10^{-05}). On the proteomic side, several proteins exhibited changes in plasma levels. Vascular Endothelial Growth Factor C (VEGFC), an angiogenic protein, increased in GD (logFC = 0.57, adjusted p-value = 4.97 x 10^{-05}). The Proinflammatory group showed downregulated levels in Tumor Necrosis Factor α (TNF – logFC = 0.71, adjusted p-value = 7.10 x 10^{-11}) and CXC motif chemokine ligand 8 (CXCL8.1 – logFC = 0.64, adjusted p-value = 9.93 x 10^{-03}). IL6, on the other hand, showed decrease levels in GD (logFC = -0.81, adjusted p-value = 1.40 x 10^{-04}).

For vascular injury proteins, Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM1) showed an increase (logFC = 0.71, adjusted p-value = 4.24 x 10-14) while C-Reactive Protein (CRP) displayed decreased levels in GD (logFC = -0.73, adjusted p-value = 9.70 x 10-03). Four cytokines were upregulated: Interleukin 7 (IL7 – logFC = 0.78, adjusted p-value = 4.92 x 10^{-06}), IL12A (logFC = 0.58, adjusted p-value = 5.44 x 10^{-06}), IL16 (logFC = 0.76, adjusted p-value = 3.78 x 10^{-05}), and IL1A (logFC = 0.62, adjusted p-value = 3.14 x 10^{-02}). Meanwhile, two cytokines showed decreased levels: IL17A (logFC = -0.83, adjusted p-value = 5.42 x 10^{-06}) and lymphotoxin α (LTA – logFC = -0.66, adjusted p-value = 9.50 x 10^{-04}). In the chemokine group, four were increased: CC motif chemokine ligand 4 (CCL4 – logFC = 0.95, adjusted p-value = 9.85 x 10^{-10}), CCL26 (logFC = 0.82, adjusted p-value = 3.76 x 10^{-06}), CCL11 (logFC = 0.48, adjusted p-value = 1.56 x 10^{-04}), and CCL3 (logFC = 0.61, adjusted p-value = 4.15 x 10^{-02}). Results are shown in **Fig. 2** and detailed data can be found in **Supplementary Table S5**.

3.4. Biological imprinting displays subgroup patterns

Correlation analysis showed clear patterns in the differently expressed omics features (**Fig. 3**). Several groups containing strong correlations emerged. The first cluster contains phosphatidylcholines with long carbon chains: PC aa C40:2, PC aa C42:4, PC aa C42:5, PC ae C40:5, PC ae C42:5, PC ae C38:1, PC ae C38:2, PC ae C44:3, PC aa C40:3, PC ae C40:3, PC aa C42:6, PC ae C42:2, PC ae C36:1, PC ae C38:3, PC ae C40:2, PC ae C42:3, PC ae C42:0, PC aa C38:0, PC ae C40:6, PC aa C38:1, PC aa C32:3, PC ae C34:3. Interestingly, cluster 1 is negatively correlated with a second cluster that includes already knowns GD biomarkers, cytokines and proinflammatory proteins: CCL18, chitotriosidase activity level, Chemokine C-C motif ligand 3 (CCL3), CCL4, VCAM1 and TNF. A third cluster (group 3) is built with long chains acylcarnitines, including C16, C18, C18:1, C18:2, interleukin 16 (IL16), serotonin, spermidine. Cluster 3 tends to be positively correlated with cluster 1 and negatively correlated with cluster 2. Furthermore, platelet count in Gaucher patients appeared to be positively correlated with cluster 1 and negatively correlated with cluster 2. Detailed correlation analysis results can be found in **Supplementary Table S6**.

3.5. Omics connections to Gaucher disease clinical phenotypes

We performed a comprehensive differential analysis for each clinical trait within our Gaucher population. In total, we identified up to 60 biomolecules associated with at least one clinical characteristic connection (**Fig. 4**). Interestingly, as shown in **Fig. 4A**, IL10 was not only associated with CCL18 (adjusted p-value = 8.35 x 10^{-03}) and chitotriosidase activity level (adjusted p-value = 2.62 x 10^{-04}), but also with platelet count (adjusted p-value = 3.05 x 10^{-02}), and treatment with ERT/SRT (adjusted p-value = 3.19 x 10^{-04}) (**Fig. 4B**). Likewise, other omics molecules were shared between several clinical traits, implying a probable common driving factor (**Fig. 4A**). This study found that certain sphingomyelins, linked to treatment, were also associated with platelet count, including SM C24:0, SM (OH) C22:1, SM C24:1, SM C16:1, SM (OH) C22:2, and SM (OH) C24:1. Additionally, Chemokine C-C motif ligand 17 (CCL17), VEGFC, and IL7 showed a clear connection to both platelet count and splenectomy. Overall, 48 other metabolites and proteins were associated with platelets count: including five proteins: CCL17 (adjusted p-value = 1.75 x 10^{-05}), VCAM1 (adjusted p-value = 2.49 x 10^{-03}), VEGFC (adjusted p-value = 8.61 x 10^{-03}), IL16 (adjusted p-value = 3.86 x 10^{-02}) and

Placental Growth Factor (PGF – adjusted p-value = 4.74 x 10^{-02}). Thirteen molecular features were found to be linked to splenectomy: CCL17, VEGFC, IL7, lysoPC a C20:3, Taurine, Glutamate, PC aa C38:4, VCAM1, IL16, PC aa C38:3, PC aa C32:1, PC aa C36:4, and Putrescine. In addition to IL10, 19 other biomolecules showed a connection to treatment with ERT/SRT. These included VCAM1, CCL4, SM C24:0, PC aa C28:1, SM (OH) C22:1, PC ae C40:1, PC aa C36:4, SM C24:1, SM C16:1, Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1), SM (OH) C22:2, TNF, lysoPC a C28:1, CCL3, SM (OH) C24:1, PC ae C44:4, PC aa C26:0, PC aa C24:0, and lysoPC a C26:1. No molecular features were associated with arthritis, bone involvement, neurological involvement, MGUS/MM, lung involvement, hepatomegaly, splenomegaly, or genotype. Detailed data can be found in **Supplementary Table S7**.

4. Discussion

Our study delves into GD using a combination of targeted plasma proteomics, metabolomics, and clinical phenotyping. By analyzing the multifaceted layers of GD, we aimed to uncover extensive metabolic alterations in this condition. We conducted a metabolomics and proteomics study on a group of 43 GD patients and 59 control individuals and identified 146 biomolecules with differential expression. We also established connections between some of these biomolecules and clinical traits, including the impact of treatments, splenectomy, platelet count, and two conventional GD biomarkers: chitotriosidase activity level and CCL18. Some of the identified molecular patterns appeared to be promising biomarkers for diagnosing and monitoring GD.

4.1. The lipid profile suggests an increase in lipid remodeling and synthesis.

In this study, we observed a global increase in PCs. However, this tendency appears stronger in PCs that contain long chains of polyunsaturated fatty acids (PUFA) and seems to be reversed for PCs with shorter, more saturated carbon chains (mono-unsaturated fatty acids or MUFA), with lower levels of these PCs in GD than controls. This observation aligns with existing scientific literature, which has also reported elevated levels of PCs in GD patients [225]. Phosphatidylcholines (PCs) and lysophosphatidylcholines (lysoPCs) are essential components of cell membranes, playing critical roles in maintaining membrane flexibility, cell communication, lung function, and regulating liver fat levels [226]. PCs are primarily produced through two pathways: the Cytidine 5-diphosphocholine (CDP-choline) pathway and the Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) pathway [227-229]. Over time, PCs undergo continuous changes through the Land cycle: the enzyme phospholipase A2 (PLA2) can break down PCs into lysoPCs, releasing fatty acids (FA) that can be modified by elongases or desaturases [228]. These modified FA can then be integrated into lysoPCs with the help of acyltransferases. Consequently, any disruption in this delicate balance leads to specific alterations in the PCs profile. Thus, the increase in PCs detected in Gaucher patients could be due to increased PCs synthesis. Of note, our findings are similar to those obtained in a knockout (KO) mice model for Phosphocholine Cytidylyltransferase α (CCTα), an important enzyme in the CDP-choline pathway, which leads to reduced PC turnover, increased PUFA-PC, and decreased MUFA-PC [230]. These observations are aligned with increased membrane phosphatidylcholine remodelling. This could be caused by endoplasmic reticulum (ER) stress and impaired lipid trafficking commonly described in LDs

[54,231]. It is important to note that the observed similarity with the CCTα-KO profile was specific to PC ae, not PC aa. This specificity could suggest the involvement of the macrophage Lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 (LPCAT3) which can add acyl groups to alkyl-lysoPCs. In the context of inflammation, PLA2 activity typically increases along with membrane remodeling and an increase in lysoPCs. Indeed, our Gaucher samples showed high levels of lysoPCs containing different acyl group including the MUFAs C14:0, C16:1, C18:0, and C18:1 or the PUFAs C20:3 and C20:4. Higher levels of PUFAs containing lysoPCs is aligned with the increased remodeling hypothesis. This may seem counterintuitive, but higher levels of MUFA with medium-length chains could be explained by an increase in fatty acid synthesis. This process is crucial for the proliferation of immune cells. In fact, similar increases in MUFAs lipogenesis have been observed in splenic B lymphocytes stimulated by LPS [232]. High levels of lysoPCs, however, contrast with studies showing a global decrease of lysoPCs in Gaucher patients [225,233]. Notably, we found a very significant increase in lysoPC a C14:0. This lipid has been associated with a high fructose regimen or correlated with increased body mass index (BMI) [234]. Strikingly, an increase in plasmatic lysoPC a C14:0 has been described in chronic obstructive pulmonary disease [235,236] and in acetaminophen overdose [237]. Of note, no significant association between LysoPC a C14:0 and treatment has been found. Interestingly, this lipid had a similar expression pattern to FGF2 and putrescine. Together, these insights might pinpoint lysoPC a C14:0 as a potential plasmatic biomarker of a certain type of inflammation with high vascular remodeling.

4.2. The immune system is more prone to chronic inflammation echoing autoimmunity patterns

This study revealed profound alterations in the inflammasome among GD patients showing elevated levels of several cytokines, consistent with previously reported studies.
We also noticed decreased arginine levels and increased downstream metabolites like ornithine and polyamines (putrescine, spermidine, and spermine). Arginase released by activated macrophages may decrease the arginine level and participate in the inflammatory process [238]. In addition, we observed higher levels of acetyl-ornithine (Ac-Orn) in patients with Gaucher disease. It is worth noting that elevated Ac-Orn has recently been associated with Alzheimer's disease [239]. Additionally, we found a global decrease in the other amino acids, which has been reported in inflammatory context [240]. High levels of IL23, TNF-α, and IL7 in Gaucher samples align with the activation of macrophages and APCs, fostering a high chemotactic environment. Indeed, our Gaucher patients showed increased levels of CCL4, CCL26 (Eotaxin 3), CCL11 (Eotaxin 1), IL16, VCAM1, and ICAM1. Interestingly, CCL26 and CCL11 have selective eosinophil chemotactic activity and are linked to neuroinflammation and neurodegenerative diseases like PD. These findings could be directly linked to Gb1 accumulation. Indeed, we found that treated Gaucher patients (ERT or SRT combined) had significantly decreased levels of some of these biomolecules compared to untreated patients. Moreover, these molecular patterns are strongly correlated to known biomarkers of GD, like chitotriosidase activity or CCL18 (**Fig. 2**). Additionally, we found higher levels of the pro-angiogenesis factors FGF2, VEGFa, VEGFc and PGF. Higher angiogenesis seems aligned within the above-described high chemotactic environment. Interestingly, these four proteins were upregulated in another sphingolipidosis, Fabry disease (FD) [241]. Furthermore, FGF2 seems to be part of the pathophysiology of numerous conditions,

including chronic inflammatory airway diseases [242], neoplasia, and chronic kidney disease [243]. VEGF and FGF2 levels have been also found positively correlated with CD4(+) T-cell counts in HIV patients [244].
Chronic inflammation has been a recurrent theme in GD literature. The accumulation of Gb1 in monocytes, antigen-presenting cells (APCs), and Gaucher cells has been linked to increased Th1 and Th17 immune responses [245]. Consequently, Gaucher patients usually exhibit elevated levels of various cytokines, including IL1β, IL1α, TNF-α, macrophage colony-stimulating factor (MCSF), IL6, IL10, macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1), transforming growth factor-beta1 (TGFβ1), chemokine ligand 2 (CCL2), and CCL18 [160,246-249].
Interestingly, we found a significant decrease in IL6 in our Gaucher population which is odd considering previous reports. While no significant difference was found in the level of IL10 in Gaucher samples vs controls, untreated Gaucher patients had higher IL10 levels than those receiving treatment. Conversely, we found reduced levels of IL2 and IL5 in Gaucher patients which could be aligned with compromised T regulatory lymphocytes (Treg) and autoimmunity defenses. Moreover, high levels of IL23, a strong Th17-type response enhancer has been shown to inhibit Treg. Additionally, our results showed markedly reduced levels of Th1 cytokines like IFN-γ or IL12 and acute phase response cytokines such as SAA1, CRP, IL6, and IFN-γ. This is intriguing because previous studies showed on the contrary, high level of some of these cytokines in GD [160,247,249,250]. Furthermore, we observed low levels of acylcarnitine C9 and C7-DC, which similarly to increased IL23, have been associated with auto-immune diseases like psoriasis [251,252]. Moreover, our results also showed an increase in CCL17, IL7, and IL16 in Gaucher patients who underwent a splenectomy. These proteins are potent proinflammatory cytokines and have been linked to auto-immune diseases. Overall, our findings suggest an imbalance in the immune system in GD which bears strong ressemblance with auto-immune diseases like psoriasis or asthma. These results contrast with previous studies showing predominent Th1 and acute phase response immunity in GD.These observations might be due to our Gaucher cohort, which consists primarily of type 1 GD with 56% of patient untreated.

4.3. Dysfunctions of the inner mitochondrial membrane

Our multi-omics workflow revealed indirect signs of mitochondrial dysfunctions. Indeed, molecular patterns linked to oxidative stress like methionine-sulfoxidase (Met-SO) [253] or hydroxypropionylcarnitine (C3-OH) [254] were increased in our Gaucher samples compared to controls. Mitochondrial dysfunction has been reported in LDs, leading to lower ATP production and increased oxidative stress potentially underlying neurodegeneration [32,54,187]. Moreover, in our cohort, the acylcarnitine profiles were significantly altered with enriched higher medium-to-long chain acylcarnitines (C8, C10, C12-DC, C14:1, C16, C16:1, C18, C18:1, C18:2) and lower levels of shorter odd-chain mainly dicarboxylic acylcarnitines (C3-DC, C5:1-DC, C5-M-DC, C7-DC, C9). This profile is very similar to a recently reported metabolome-wide association aging study [255]. This similarity could hardly be induced by the age difference between our group since age was taken into account as a cofounder in our analysis. The lower dicarboxylic acylcarnitines levels could also point toward reduced beta-oxidation in the mitochondria. Interestingly, increased levels of C12-DC, C16, C18, and C18:1 are also commonly associated with Carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2) deficiency

[256]. Indirect biomarkers of reduced oxidative phosphorylation (OXPHOS) like increases in VEGFα, TNFα or CXCL8 or decrease in arginine levels, were found. While some findings suggest a link between these molecular features and reduced OXPHOS, these associations are not specific [257,258]. Furthermore, alanine levels were reduced in Gaucher samples, while an increase in alanine and lactate concentrations is expected in reduced OXPHOS situations [257]. Overall, these results suggest that mitochondrial dysfunction in Gaucher disease may be caused by an altered inner mitochondrial membrane, reducing carnitine carrying capacity, rather than reduced OXPHOS.

4.4. Connecting the dots: bioactive lipids overstimulate mTORC1 in GD

Mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) hyperactivation has been previously reported in GD and other LDs [259-262]. mTORC1 stimulates lipid synthesis, enhances glycolysis, diminishes OXPHOS capacity, promotes mitochondrial biogenesis, and significantly impedes both autophagy and mitophagy processes [44,263]. These distinctive features have already been identified in GD [250,264].

Taken together, the variety and heterogeneity of the observed perturbations in our study steers towards an over-activation of mTORC1 that plays a pivotal role in the pathophysiology of GD. Lipogenesis was increased with higher levels of PCs and lysoPCs in Gaucher patients. Interestingly, mTORC1, via SREBP, has been found to stimulate various desaturases especially stearoyl-coA desaturase 1, leading to increased C18:1 FA [265,266]. Precisely, acylcarnitine C18:1 was one of the most significant increases in the acylcarnitine profile. We had indirect signs of mitochondrial dysfunction. More strikingly, while the intricacies of mTORC1 roles in immunity are complex [263,267], the inflammasome in Gaucher samples could be linked to mTORC1 activation. Indeed, IL10, TNFα and IL23 have been linked to mTORC1activation [268]. FGF2 have been reported to activate mTORC1 [269] and VEGFα secretion depends on mTORC1 activation [270,271]. Overall, activation of mTORC1 has been linked to chronic autoimmunity inflammation like asthma and psoriasis [272,273]. Importantly, this activation requires the docking of mTORC1 on the lysosomal membrane [274]. Besides, inflammation and impaired autophagy could explain the higher serotonin levels in our Gaucher samples. Indeed, a serotonin synthesis levels take place in the gastrointestinal tract and rely on a functional endosome system [275,276]. The DOPA increase that is found in our cohort could also be linked to impaired autophagy as well [32,185,277].

Recent research revealed that this mTORC1 activation in GD could be induced by bioactive lipids rather than 'lysosome storage' issues. Indeed, accumulation of Gb1 in the lysosome has been linked to increased levels of lyso-Gb1 which directly activates mTORC1 [278] and can also inhibits CCTα in the CDP-choline pathway [279]. Accumulation of Gb1 also leads to higher levels of sphingosine-1-phosphate (S1P) which is bioactive [181]. LysoPCs are bioactive lipids inducing increased secretion of pro-inflammatory cytokines, FGF, and adhesion molecules in endothelial cells [280]. Moreover, increased LPA2 activity usually release arachidonic acid (ARA, C20:4), which activates mTORC1 [281] and promote inflammation [282].

Although this study has shown evidence of metabolic plasticity, it is important to note certain limitations. This study relies exclusively on type 1 GD, even though this also could highlight cohort coherence. Therefore, our results may not apply to individuals with more severe GD or those with significant neurological symptoms. In addition, our omics analysis focuses on

specific omics profiles. It may have missed some important omics features that could significantly impact disease development but were not covered by the targeted approach. In conclusion, this study has provided valuable insights into the molecular signatures linked with type 1 Gaucher disease. These findings can be a foundation for future research into the wider range of Gaucher disease manifestations. They can also be a starting point for more comprehensive multi-omics approaches with broader molecular coverage to better understand the disease's underlying mechanisms.

AUTHOR'S CONTRIBUTIONS

AT and SB designed the study. NB, MGB, JB, SM, and SB collected and contributed data to the study. TP, CP, CL, and FD performed the omics data generation. FD and AT performed data analysis and data visualization. AT, FD, and SB wrote the manuscript. All authors read, edited, and approved the final version of the manuscript.

AVAILABILITY OF DATA

All the data that support the findings are presented in the manuscript and the supplementary material.

ACKNOWLEDGMENTS

The other authors declare no competing interests. All authors have read the journal's authorship agreement and that the manuscript has been reviewed by and approved by all named authors.

5. References

[1] Mistry PK, Lopez G, Schiffmann R, Barton NW, Weinreb NJ, Sidransky E. Gaucher disease: Progress and ongoing challenges. Molecular genetics and metabolism. 2017;120:8-21.
[2] Revel-Vilk S, Fuller M, Zimran A. Value of Glucosylsphingosine (Lyso-Gb1) as a Biomarker in Gaucher Disease: A Systematic Literature Review. Int J Mol Sci. 2020;21.
[3] Sidransky E. Gaucher disease: insights from a rare Mendelian disorder. Discov Med. 2012;14:273-81.
[4] Neudorfer O, Giladi N, Elstein D, Abrahamov A, Turezkite T, Aghai E, et al. Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. Qjm. 1996;89:691-4.
[5] Tayebi N, Callahan M, Madike V, Stubblefield BK, Orvisky E, Krasnewich D, et al. Gaucher disease and parkinsonism: a phenotypic and genotypic characterization. Molecular genetics and metabolism. 2001;73:313-21.
[6] Tayebi N, Walker J, Stubblefield B, Orvisky E, LaMarca ME, Wong K, et al. Gaucher disease with parkinsonian manifestations: does glucocerebrosidase deficiency contribute to a vulnerability to parkinsonism? Molecular genetics and metabolism. 2003;79:104-9.
[7] Nair S, Bar N, Xu ML, Dhodapkar M, Mistry PK. Glucosylsphingosine but not Saposin C, is the target antigen in Gaucher disease-associated gammopathy. Molecular genetics and metabolism. 2020;129:286-91.
[8] Nair S, Branagan AR, Liu J, Boddupalli CS, Mistry PK, Dhodapkar MV. Clonal Immunoglobulin against Lysolipids in the Origin of Myeloma. N Engl J Med. 2016;374:555-61.
[9] Nair S, Sng J, Boddupalli CS, Seckinger A, Chesi M, Fulciniti M, et al. Antigen-mediated regulation in monoclonal gammopathies and myeloma. JCI Insight. 2018;3.
[10] Cabukusta B, Neefjes J. Mechanisms of lysosomal positioning and movement. Traffic (Copenhagen, Denmark). 2018;19:761-9.

[11] Pu J, Guardia CM, Keren-Kaplan T, Bonifacino JS. Mechanisms and functions of lysosome positioning. J Cell Sci. 2016;129:4329-39.
[12] Trevor Hastie RT, Balasubramanian Narasimhan, Gilbert Chu. impute: impute: Imputation for microarray data 2022.
[13] Stacklies W, Redestig H, Scholz M, Walther D, Selbig J. pcaMethods--a bioconductor package providing PCA methods for incomplete data. Bioinformatics. 2007;23:1164-7.
[14] Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. Nucleic Acids Res. 2015;43:e47.
[15] Lopez de Frutos L, Almeida F, Murillo-Saich J, Conceicao VA, Guma M, Queheberger O, et al. Serum Phospholipid Profile Changes in Gaucher Disease and Parkinson's Disease. Int J Mol Sci. 2022;23.
[16] Wang B, Tontonoz P. Phospholipid remodeling in physiology and disease. Annual review of physiology. 2019;81:165-88.
[17] Cole LK, Vance JE, Vance DE. Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. Biochim Biophys Acta. 2012;1821:754-61.
[18] Moessinger C, Klizaite K, Steinhagen A, Philippou-Massier J, Shevchenko A, Hoch M, et al. Two different pathways of phosphatidylcholine synthesis, the Kennedy Pathway and the Lands Cycle, differentially regulate cellular triacylglycerol storage. BMC Cell Biol. 2014;15:43.
[19] Henneberry AL, Wright MM, McMaster CR. The major sites of cellular phospholipid synthesis and molecular determinants of Fatty Acid and lipid head group specificity. Mol Biol Cell. 2002;13:3148-61.
[20] Petkevicius K, Virtue S, Bidault G, Jenkins B, Cubuk C, Morgantini C, et al. Accelerated phosphatidylcholine turnover in macrophages promotes adipose tissue inflammation in obesity. Elife. 2019;8.
[21] Vitner EB, Platt FM, Futerman AH. Common and Uncommon Pathogenic Cascades in Lysosomal Storage Diseases. Journal of Biological Chemistry. 2010;285:20423-7.
[22] Parenti G, Medina DL, Ballabio A. The rapidly evolving view of lysosomal storage diseases. EMBO Molecular Medicine. 2021;13.
[23] Dufort FJ, Gumina MR, Ta NL, Tao Y, Heyse SA, Scott DA, et al. Glucose-dependent de novo lipogenesis in B lymphocytes: a requirement for atp-citrate lyase in lipopolysaccharide-induced differentiation. J Biol Chem. 2014;289:7011-24.
[24] Miletic Vukajlovic J, Drakulic D, Pejic S, Ilic TV, Stefanovic A, Petkovic M, et al. Increased plasma phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratios in patients with Parkinson's disease. Rapid Commun Mass Spectrom. 2020;34:e8595.
[25] Rangel-Huerta OD, Pastor-Villaescusa B, Gil A. Are we close to defining a metabolomic signature of human obesity? A systematic review of metabolomics studies. Metabolomics. 2019;15.
[26] Saito K, Gemma A, Tatsumi K, Hattori N, Ushiki A, Tsushima K, et al. Identification and characterization of lysophosphatidylcholine 14:0 as a biomarker for drug-induced lung disease. Scientific Reports. 2022;12.
[27] Gonzalez-Granda A, Damms-Machado A, Basrai M, Bischoff S. Changes in Plasma Acylcarnitine and Lysophosphatidylcholine Levels Following a High-Fructose Diet: A Targeted Metabolomics Study in Healthy Women. Nutrients. 2018;10:1254.
[28] Bhattacharyya S, Pence L, Yan K, Gill P, Luo C, Letzig LG, et al. Targeted metabolomic profiling indicates structure-based perturbations in serum phospholipids in children with acetaminophen overdose. Toxicol Rep. 2016;3:747-55.
[29] Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. J Immunol. 2000;164:6166-73.
[30] Weng WC, Huang WY, Tang HY, Cheng ML, Chen KH. The Differences of Serum Metabolites Between Patients With Early-Stage Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. Front Neurol. 2019;10:1223.
[31] Suliman ME, Qureshi AR, Stenvinkel P, Pecoits-Filho R, Barany P, Heimburger O, et al. Inflammation contributes to low plasma amino acid concentrations in patients with chronic kidney disease. Am J Clin Nutr. 2005;82:342-9.

[32] Tebani A, Mauhin W, Abily-Donval L, Lesueur C, Berger MG, Nadjar Y, et al. A Proteomics-Based Analysis Reveals Predictive Biological Patterns in Fabry Disease. J Clin Med. 2020;9.
[33] Tan Y, Qiao Y, Chen Z, Liu J, Guo Y, Tran T, et al. FGF2, an Immunomodulatory Factor in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). Front Cell Dev Biol. 2020;8:223.
[34] Xie Y, Su N, Yang J, Tan Q, Huang S, Jin M, et al. FGF/FGFR signaling in health and disease. Signal Transduction and Targeted Therapy. 2020;5.
[35] Keating SM, Golub ET, Nowicki M, Young M, Anastos K, Crystal H, et al. The effect of HIV infection and HAART on inflammatory biomarkers in a population-based cohort of women. AIDS. 2011;25:1823-32.
[36] Pandey MK, Rani R, Zhang W, Setchell K, Grabowski GA. Immunological cell type characterization and Th1–Th17 cytokine production in a mouse model of Gaucher disease. Molecular Genetics and Metabolism. 2012;106:310-22.
[37] Stirnemann J, Belmatoug N, Camou F, Serratrice C, Froissart R, Caillaud C, et al. A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. Int J Mol Sci. 2017;18.
[38] van Breemen MJ, de Fost M, Voerman JS, Laman JD, Boot RG, Maas M, et al. Increased plasma macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta levels in type 1 Gaucher disease. Biochim Biophys Acta. 2007;1772:788-96.
[39] Allen MJ, Myer BJ, Khokher AM, Rushton N, Cox TM. Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: increased release of interleukin-6 and interleukin-10. QJM. 1997;90:19-25.
[40] Mucci JM, Cuello MF, Kisinovsky I, Larroude M, Delpino MV, Rozenfeld PA. Proinflammatory and proosteoclastogenic potential of peripheral blood mononuclear cells from Gaucher patients: Implication for bone pathology. Blood Cells Mol Dis. 2015;55:134-43.
[41] 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. 2016;15:77-88.
[42] Aerts J, Kuo CL, Lelieveld LT, Boer DEC, van der Lienden MJC, Overkleeft HS, et al. Glycosphingolipids and lysosomal storage disorders as illustrated by gaucher disease. Curr Opin Chem Biol. 2019;53:204-15.
[43] Ottas A, Fishman D, Okas TL, Kingo K, Soomets U. The metabolic analysis of psoriasis identifies the associated metabolites while providing computational models for the monitoring of the disease. Arch Dermatol Res. 2017;309:519-28.
[44] Chan TC, Hawkes JE, Krueger JG. Interleukin 23 in the skin: role in psoriasis pathogenesis and selective interleukin 23 blockade as treatment. Ther Adv Chronic Dis. 2018;9:111-9.
[45] Suzuki S, Kodera Y, Saito T, Fujimoto K, Momozono A, Hayashi A, et al. Methionine sulfoxides in serum proteins as potential clinical biomarkers of oxidative stress. Scientific Reports. 2016;6:38299.
[46] Vanella A, Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Di Giacomo C, Sorrenti V, et al. l-Propionyl-carnitine as superoxide scavenger, antioxidant, and DNA cleavage protector. Cell Biology and Toxicology. 2000;16:99-104.
[47] Plotegher N, Duchen MR. Crosstalk between Lysosomes and Mitochondria in Parkinson's Disease. Front Cell Dev Biol. 2017;5:110.
[48] Stepien KM, Roncaroli F, Turton N, Hendriksz CJ, Roberts M, Heaton RA, et al. Mechanisms of Mitochondrial Dysfunction in Lysosomal Storage Disorders: A Review. Journal of Clinical Medicine. 2020;9:2596.
[49] Jarrell ZR, Smith MR, Hu X, Orr M, Liu KH, Quyyumi AA, et al. Plasma acylcarnitine levels increase with healthy aging. Aging. 2020;12:13555-70.
[50] Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A, Bastin J. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. Mol Aspects Med. 2004;25:495-520.
[51] Hubens WHG, Vallbona-Garcia A, de Coo IFM, van Tienen FHJ, Webers CAB, Smeets HJM, et al. Blood biomarkers for assessment of mitochondrial dysfunction: An expert review. Mitochondrion. 2022;62:187-204.

[52] Garrido-Pérez N, Vela-Sebastián A, López-Gallardo E, Emperador S, Iglesias E, Meade P, et al. Oxidative Phosphorylation Dysfunction Modifies the Cell Secretome. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21:3374.
[53] Davis OB, Shin HR, Lim CY, Wu EY, Kukurugya M, Maher CF, et al. NPC1-mTORC1 Signaling Couples Cholesterol Sensing to Organelle Homeostasis and Is a Targetable Pathway in Niemann-Pick Type C. Dev Cell. 2021;56:260-76 e7.
[54] Brown RA, Voit A, Srikanth MP, Thayer JA, Kingsbury TJ, Jacobson MA, et al. mTOR hyperactivity mediates lysosomal dysfunction in Gaucher's disease iPSC-neuronal cells. Disease Models & Mechanisms. 2019;12:dmm038596.
[55] Ivanova MM, Changsila E, Iaonou C, Goker-Alpan O. Impaired autophagic and mitochondrial functions are partially restored by ERT in Gaucher and Fabry diseases. PLOS ONE. 2019;14:e0210617.
[56] Kinghorn KJ, Grönke S, Castillo-Quan JI, Woodling NS, Li L, Sirka E, et al. ADrosophilaModel of Neuronopathic Gaucher Disease Demonstrates Lysosomal-Autophagic Defects and Altered mTOR Signalling and Is Functionally Rescued by Rapamycin. The Journal of Neuroscience. 2016;36:11654-70.
[57] Puertollano R. mTOR and lysosome regulation. F1000Prime Reports. 2014;6.
[58] Linke M, Fritsch SD, Sukhbaatar N, Hengstschläger M, Weichhart T. <scp>mTORC</scp>1 and <scp>mTORC</scp>2 as regulators of cell metabolism in immunity. FEBS Letters. 2017;591:3089-103.
[59] Kaluzna M, Trzeciak I, Ziemnicka K, Machaczka M, Ruchala M. Endocrine and metabolic disorders in patients with Gaucher disease type 1: a review. Orphanet J Rare Dis. 2019;14:275.
[60] Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leevers S, et al. SREBP Activity Is Regulated by mTORC1 and Contributes to Akt-Dependent Cell Growth. Cell Metabolism. 2008;8:224-36.
[61] Ecker J, Liebisch G, Englmaier M, Grandl M, Robenek H, Schmitz G. Induction of fatty acid synthesis is a key requirement for phagocytic differentiation of human monocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010;107:7817-22.
[62] Jones RG, Pearce EJ. MenTORing Immunity: mTOR Signaling in the Development and Function of Tissue-Resident Immune Cells. Immunity. 2017;46:730-42.
[63] Pastor-Fernández G, Mariblanca IR, Navarro MN. Decoding IL-23 Signaling Cascade for New Therapeutic Opportunities. Cells. 2020;9:2044.
[64] Lau M-T, So W-K, Leung PCK. Fibroblast Growth Factor 2 Induces E-Cadherin Down-Regulation via PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK Signaling in Ovarian Cancer Cells. PLoS ONE. 2013;8:e59083.
[65] Dodd KM, Yang J, Shen MH, Sampson JR, Tee AR. mTORC1 drives HIF-1alpha and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3. Oncogene. 2015;34:2239-50.
[66] Wang S, Lu J, You Q, Huang H, Chen Y, Liu K. The mTOR/AP-1/VEGF signaling pathway regulates vascular endothelial cell growth. Oncotarget. 2016;7:53269-76.
[67] Buerger C. Epidermal mTORC1 Signaling Contributes to the Pathogenesis of Psoriasis and Could Serve as a Therapeutic Target. Front Immunol. 2018;9:2786.
[68] Zhang Y, Jing Y, Qiao J, Luan B, Wang X, Wang L, et al. Activation of the mTOR signaling pathway is required for asthma onset. Scientific Reports. 2017;7.
[69] Yang H, Jiang X, Li B, Yang HJ, Miller M, Yang A, et al. Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40. Nature. 2017;552:368-73.
[70] Rahbek-Clemmensen T, Bay T, Eriksen J, Gether U, Jørgensen TN. The Serotonin Transporter Undergoes Constitutive Internalization and Is Primarily Sorted to Late Endosomes and Lysosomal Degradation. Journal of Biological Chemistry. 2014;289:23004-19.
[71] Liu N, Sun S, Wang P, Sun Y, Hu Q, Wang X. The Mechanism of Secretion and Metabolism of Gut-Derived 5-Hydroxytryptamine. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22:7931.
[72] Hou X, Watzlawik JO, Fiesel FC, Springer W. Autophagy in Parkinson's Disease. J Mol Biol. 2020;432:2651-72.

[73] Moors TE, Hoozemans JJM, Ingrassia A, Beccari T, Parnetti L, Chartier-Harlin M-C, et al. Therapeutic potential of autophagy-enhancing agents in Parkinson's disease. Molecular Neurodegeneration. 2017;12.
[74] Srikanth MP, Jones JW, Kane M, Awad O, Park TS, Zambidis ET, et al. Elevated Glucosylsphingosine in Gaucher Disease induced Pluripotent Stem Cell Neurons Deregulates Lysosomal Compartment through Mammalian Target of Rapamycin Complex 1. Stem Cells Translational Medicine. 2021;10:1081-94.
[75] Sohal PS, Cornell RB. Sphingosine inhibits the activity of rat liver CTP:phosphocholine cytidylyltransferase. Journal of Biological Chemistry. 1990;265:11746-50.
[76] Mistry PK, Liu J, Sun L, Chuang WL, Yuen T, Yang R, et al. Glucocerebrosidase 2 gene deletion rescues type 1 Gaucher disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111:4934-9.
[77] Law S-H, Chan M-L, Marathe GK, Parveen F, Chen C-H, Ke L-Y. An Updated Review of Lysophosphatidylcholine Metabolism in Human Diseases. International Journal of Molecular Sciences. 2019;20:1149.
[78] Wen Z-H, Su Y-C, Lai P-L, Zhang Y, Xu Y-F, Zhao A, et al. Critical role of arachidonic acid-activated mTOR signaling in breast carcinogenesis and angiogenesis. Oncogene. 2013;32:160-70.
[79] Wang B, Wu L, Chen J, Dong L, Chen C, Wen Z, et al. Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. Signal Transduction and Targeted Therapy. 2021;6.

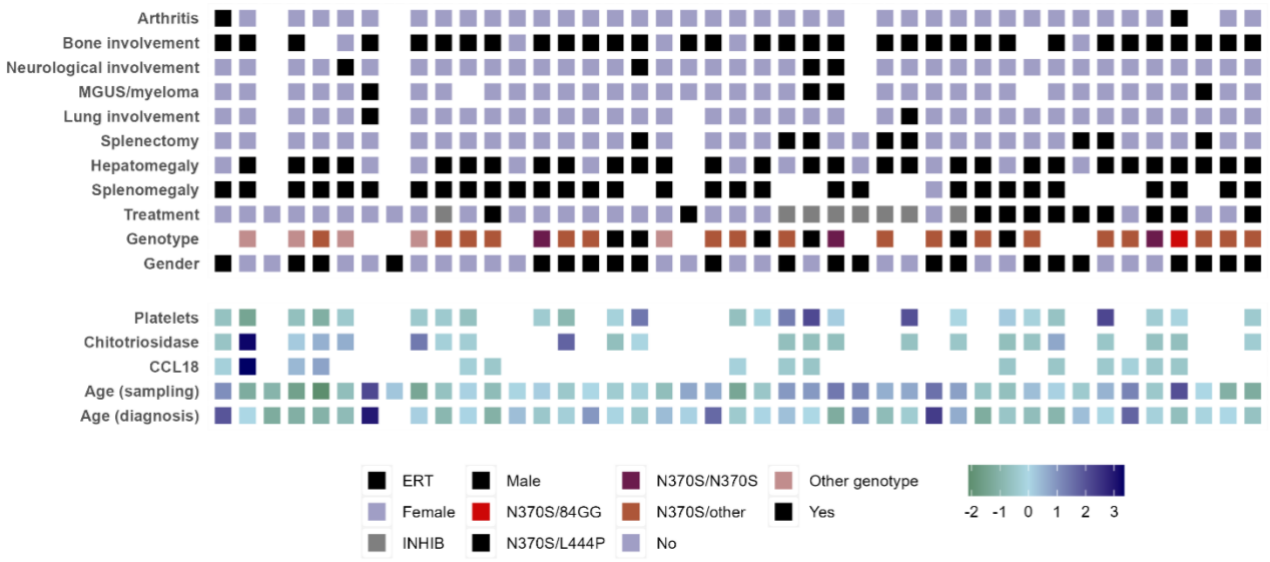


Figure 1. Overview of the clinical landscape of the cohort. Continuous variables (Age, Chitotriosidase, CCL18, and Platelets) are scaled.

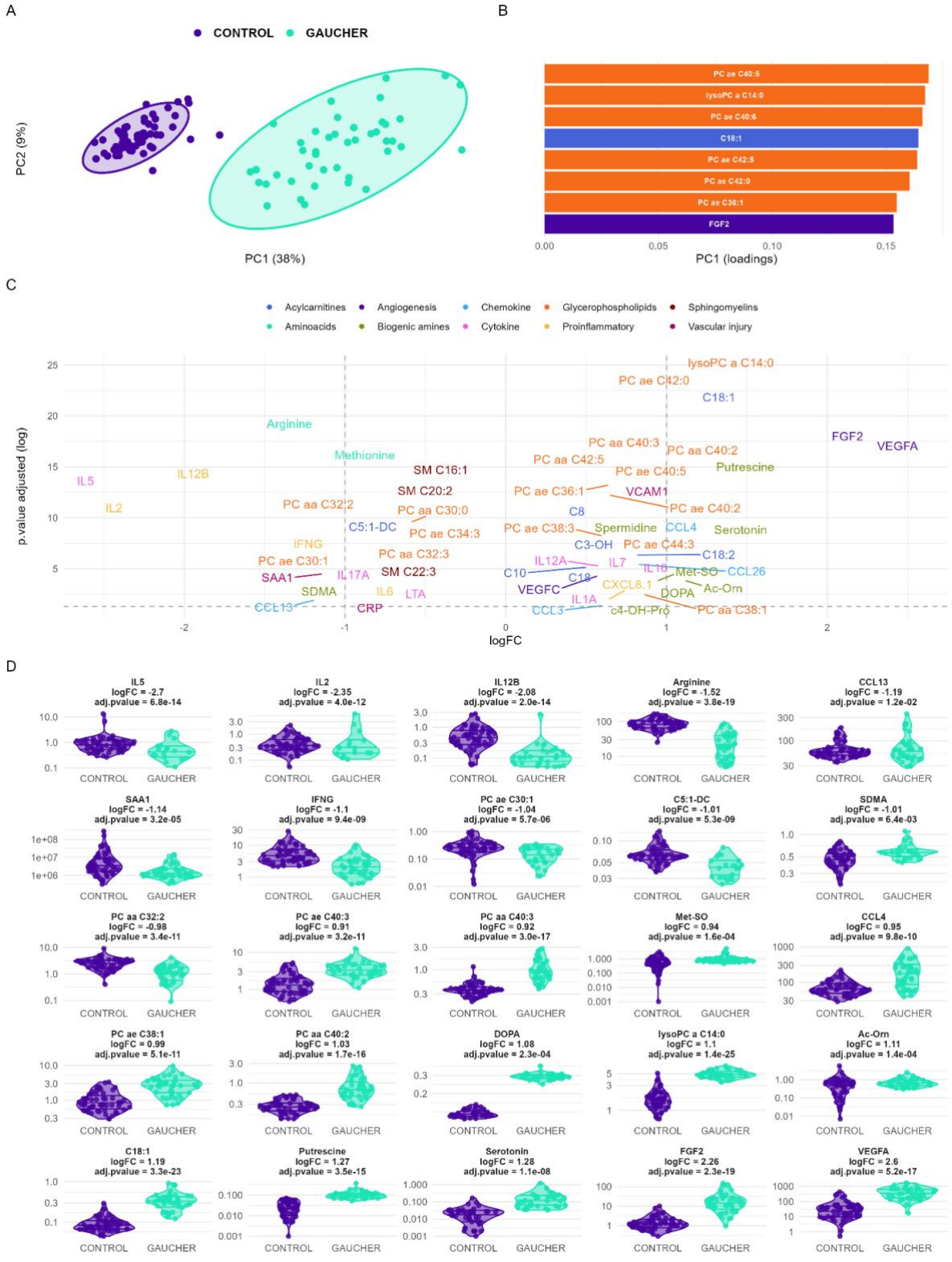


Figure 2. A. Principal component analysis scores plot shows a clear separation between Gaucher patients and controls. B. Principal component analysis loadings plot showing the top variables driving the group separation. C. Volcano plot showing the differentially expressed omics features. D. Violin plots of the differentially expressed omics features between Gaucher and controls.

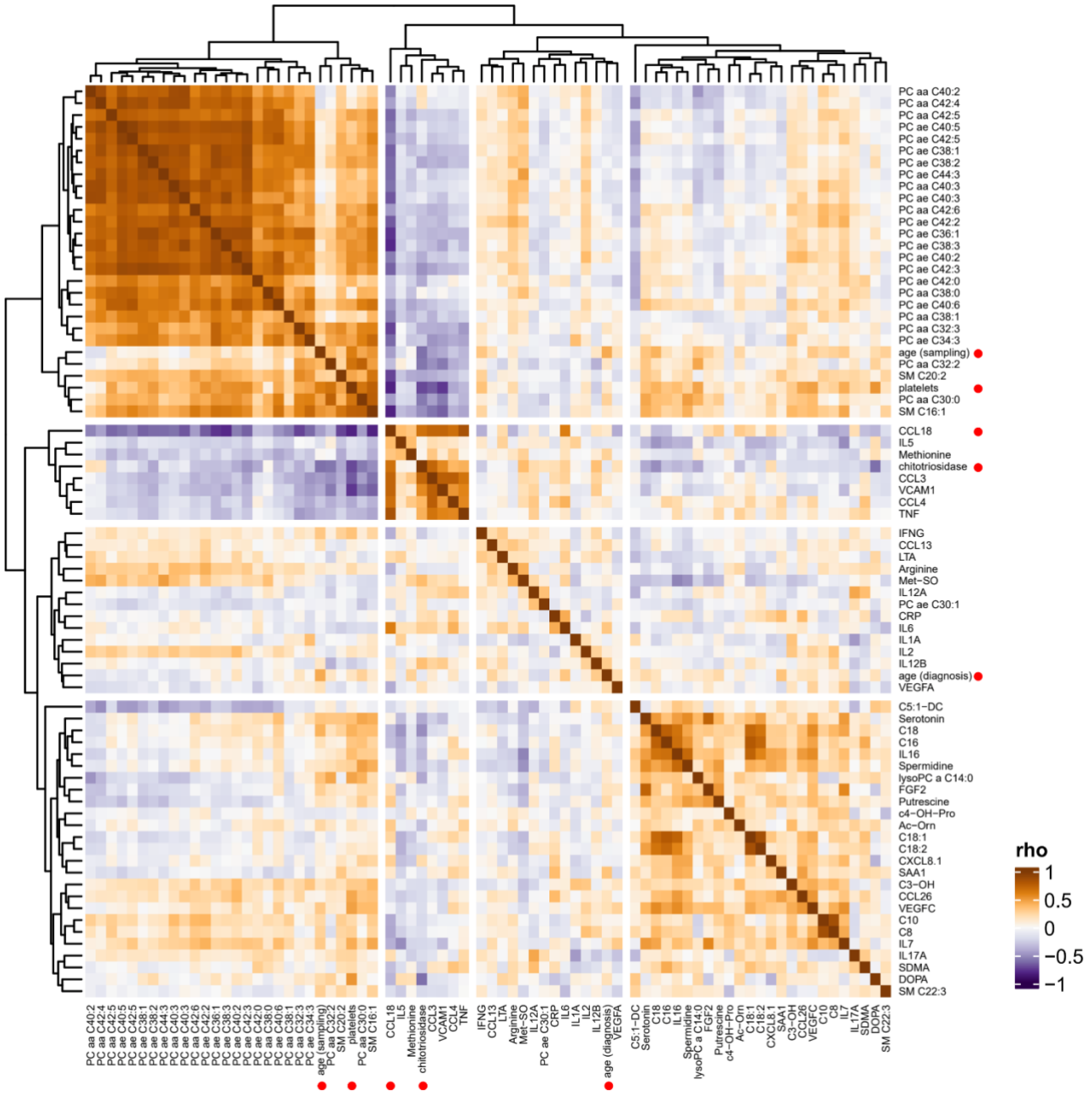


Figure 3. Heatmap showing the Spearman correlations (rho) of the differentially expressed omics features in Gaucher patients. Red dots indicate a clinical trait.

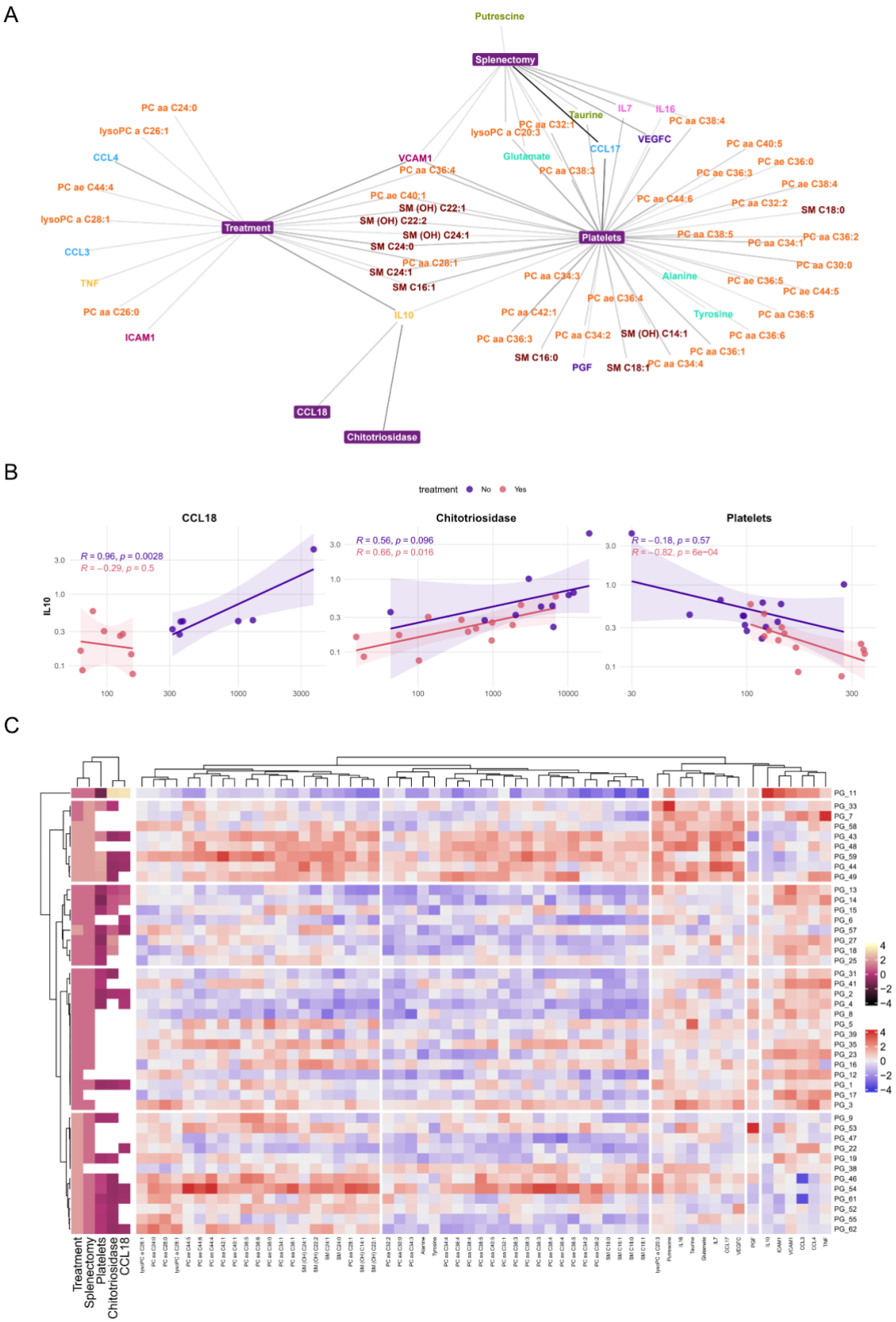


Figure 4. A. Heatmap showing expression patterns of omics features across Gaucher samples. B. Correlation scatter plot between IL10 and CCL18, Chitotriosidase, and platelets highlighted according to the treatment status. Network representation of the connection between omics features and clinical traits or conventional biological markers. The darkness of the network edges is mapped to the adjusted *p*-value (it ranges from 4.74 x 10^{-02} to 5.93 x 10^{-08})

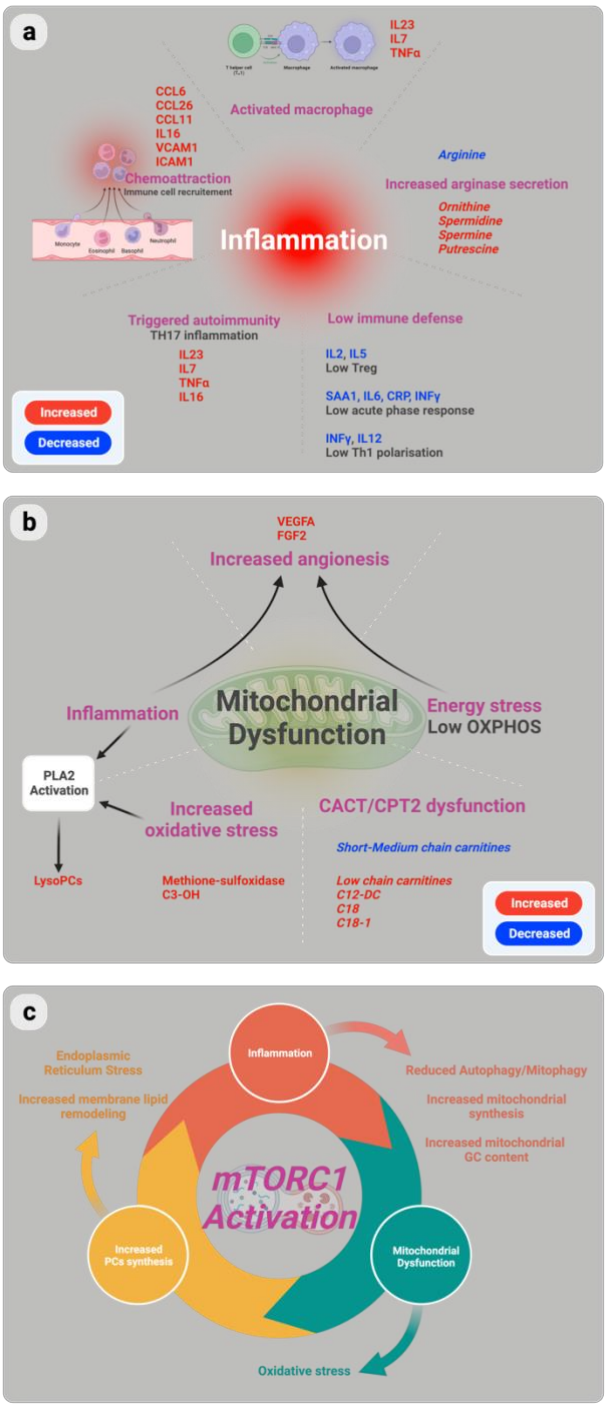


Figure 5. Summary of the biological remodeling pathways in Gaucher disease. A. Inflammation. B. Mitochondrial dysfunctions. C. Autophagy activation.

Table 1. Clinical and biochemical characteristics of the cohort.

Characteristic	**Overall**, N = 102[1]	**Control**, N = 59[1]	**Gaucher**, N = 43[1]	p-value[2]	q-value[3]
Age (diagnosis)	25 (0 - 85)		25 (0 - 85)		
Age (sampling)	40 (8 - 86)	36 (18 - 56)	46 (8 - 86)	**0.002**	**0.026**
Gender				>0.9	>0.9
Female	50 / 102 (49%)	29 / 59 (49%)	21 / 43 (49%)		
Male	52 / 102 (51%)	30 / 59 (51%)	22 / 43 (51%)		
CCL18	555 (63 - 3,748)		555 (63 - 3,748)		
Chitotriosidase	3,432 (15 - 19,211)		3,432 (15 - 19,211)		
Platelets	153 (30 - 343)		153 (30 - 343)		
Arthritis	2 / 39 (5.1%)		2 / 39 (5.1%)	>0.9	>0.9
Bone involvement	33 / 38 (87%)		33 / 38 (87%)	>0.9	>0.9
Genotype				>0.9	>0.9
p.(Ans370Ser)/84GG	1 / 33 (3.0%)		1 / 33 (3.0%)		
p.(Ans370Ser)/p.(Leu444Pro)	6 / 33 (18%)		6 / 33 (18%)		
p.(Ans370Ser)/p.(Ans370Ser)	3 / 33 (9.1%)		3 / 33 (9.1%)		
p.(Ans370Ser)/other	18 / 33 (55%)		18 / 33 (55%)		
Other genotype	5 / 33 (15%)		5 / 33 (15%)		
Hepatomegaly	29 / 40 (72%)		29 / 40 (72%)	>0.9	>0.9
Lung involvement	2 / 39 (5.1%)		2 / 39 (5.1%)	>0.9	>0.9
MGUS/myeloma	4 / 38 (11%)		4 / 38 (11%)	>0.9	>0.9
Neurological Involvement	4 / 40 (10%)		4 / 40 (10%)	>0.9	>0.9
Splenectomy	8 / 40 (20%)		8 / 40 (20%)	>0.9	>0.9
Splenomegaly	30 / 31 (97%)		30 / 31 (97%)	>0.9	>0.9
Treatment				>0.9	>0.9
ERT	11 / 43 (26%)		11 / 43 (26%)		
INHIB	8 / 43 (19%)		8 / 43 (19%)		
No	24 / 43 (56%)		24 / 43 (56%)		

[1] n / N (%); Mean (Range)

[2] Fisher's exact test; Pearson's Chi-squared test; Wilcoxon rank sum test

[3] False discovery rate correction for multiple testing

CHAPITRE III : DEVELOPPEMENTS ANALYTIQUES (ARTICLE IV & V)

Dans le cadre de ma thèse, je me suis engagé dans des développements méthodologiques analytiques, au-delà de l'aspect exploratoire de ce travail de thèse présenté dans les chapitres précédents. Ces efforts visaient à établir des protocoles analytiques avancés basés sur la spectrométrie de masse et la chromatographie liquide à haute performance. Mon rôle a été de participer activement à la conception, optimisation et la validation analytique. Ces développements ont été cruciaux pour garantir la fiabilité et la précision des résultats, tout en contribuant de manière significative à l'élargissement du panel des explorations des maladies lysosomales. Ce chapitre méthodologique présente deux projets rapportant deux méthodes analytiques pour l'exploration des maladies lysosomales. Le premier projet évalue les performances analytiques d'un nouveau dispositif volumétrique de collecte de sang par micro-échantillonnage, le deuxième projet concerne le dosage des lysosphingolipides sur buvard et dans le plasma.

Projet 1

Les taches de sang séché sur buvard (DBS – Dried Blood Sample) permettent de recueillir un petit volume de sang sur un papier buvard. Le DBS est largement utilisé comme méthode d'échantillonnage non invasive pour le dépistage des nouveau-nés. Cette méthode d'échantillonnage permet de prélever de petits volumes de sang et facilite le transport. Les technologies analytiques innovantes ne nécessitent que de petits volumes d'échantillons pour mesurer un grand nombre d'analytes ; les méthodes de micro-échantillonnage telles que le DBS sont donc particulièrement adaptées.

Un disque d'un diamètre défini est prélevé sur le DBS pour être analysé ; ce disque est supposé contenir un volume de sang fixe. Toutefois, ce volume peut être modulé en fonction de l'hématocrite et de la viscosité sanguine qui en résulte, d'une part, et de la qualité du dépôt sanguin, d'autre part. Ainsi, la tache séchée pourrait ne pas être homogène et le

résultat pourrait différer selon la position du poinçon dans la tache de sang. Ces inconvénients pourraient être évités en utilisant des dispositifs de micro-échantillonnage absorbants volumétriques. Ces dispositifs permettent de distribuer un volume fixe de sang sur un papier filtre indépendamment du niveau d'hématocrite. Les dispositifs de collecte d'échantillons sanguins volumétriques par micro-échantillonnage sont conçus pour recueillir de petits volumes de sang, généralement de quelques microlitres. Plusieurs dispositifs de collecte sanguine volumétrique par micro-échantillonnage sont disponibles. Les tubes capillaires sont de petits tubes avec une ouverture étroite à une extrémité pour recueillir un petit volume de sang à partir d'une piqûre au doigt ou d'un autre site de ponction. Le sang est aspiré dans le tube par action capillaire.

HemaPEN® est un dispositif de prélèvement qui recueille le sang via des microcapillaires intégrés et dépose un volume de sang fixe sur des disques de papier préperforés. Le dispositif HemaPEN® permet de prélever une petite quantité de sang (20 µL) et de déposer un volume de sang fixe, précis et exact sur 4 disques de papier filtre PerkinElmer 226 préperforés. Une goutte de sang capillaire est aspirée et le dispositif HemaPEN® est placé sur la goutte pour permettre le transfert du sang dans le dispositif. Ensuite, le sang est transféré sur les disques préperforés (papier filtre PerkinElmer 226) déjà intégrés dans le dispositif. À des fins de stockage, un agent dessiccatif est également intégré dans le dispositif. Le récent développement de substrats synthétiques a permis la mise en place du dosage de l'activité des enzymes lysosomales en multiplex sur DBS par spectrométrie de masse en tandem [12-15]. Ainsi, ces avancées dans les méthodes de dépistage et les approches thérapeutiques ont conduit à envisager l'inclusion des ML dans les programmes nationaux et régionaux de dépistage néonatal. De nombreuses études pilotes utilisant l'évaluation de l'activité enzymatique sur les DBS ont été menées aux États-Unis et en Europe. Il est important d'évaluer la fiabilité des résultats des activités enzymatiques lysosomales obtenus à l'aide des DBS. Dans cette étude, nous avons comparé les performances techniques des disques préperforés dans les dispositifs HemaPEN® aux poinçons générés à partir des DBS PE 226, en utilisant un dosage enzymatique en tandem multiplex de masse spectrométrie (MS/MS) de 6 enzymes lysosomales diminuées dans les maladies de Pompe, Fabry, Gaucher, Niemann-Pick type A/B, Krabbe et la de Mucopolysaccharidose de type 1. Les résultats obtenus avec le DBS conventionnel et le

dispositif volumétrique HemaPEN® sont comparables. Ces résultats démontrent la fiabilité des DBS pour le dosage de l'activité des enzymes lysosomales.

Mon rôle dans ce projet a porté sur le design expérimental, la génération des données, l'analyse, l'intégration, la visualisation et l'interprétation des données. J'ai participé à la rédaction de l'article actuellement publié en 2023 dans Clinica Chimica Acta.

> ***Ducatez F**, Pilon C, Ferey J, Marret S, Bekri S, Tebani A (2023) Evaluation of dried-blood spots and a hematocrit-independent procedure in lysosomal diseases screening using multiplexed tandem mass spectrometry assays. Clin Chim Acta: 117278 Doi https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117278*

Projet 2

Les sphingolipidoses constituent un sous-groupe des maladies lysosomales caractérisées par une altération du métabolisme des sphingolipides. Ces pathologies présentent des phénotypes hétérogènes et chevauchants. De plus, la gravité et le début des symptômes peuvent varier considérablement, même au sein d'une même maladie. Les sphingolipidoses sont donc difficiles à diagnostiquer, d'où la recherche active de biomarqueurs visant à améliorer la précision diagnostique, la surveillance thérapeutique et la prédiction de l'évolution de la maladie. Les lysosphingolipides, dérivés des glycosphingolipides résultant de leur N-désacylation, sont des biomarqueurs potentiels de plusieurs sphingolipidoses, dont la maladie de Gaucher (MG), la maladie de Krabbe (MK), la maladie de Fabry (MF), les maladies de Niemann-Pick de type A/B (NPAB) et de type C (NPC), ainsi que les gangliosidoses GM1 et GM2. Ces molécules sont libérées dans la circulation sanguine, constituant ainsi des indicateurs potentiels de la présence et/ou de la progression de la maladie. Les avancées technologiques, telles que la spectrométrie de masse, permettent une mesure plus précise et efficace des lysosphingolipides, facilitant leur intégration dans la pratique clinique courante. De plus, la pertinence de l'évaluation des lysosphingolipides pour la surveillance de l'évolution de la maladie pourrait nécessiter des recherches approfondies afin d'améliorer sa précision et sa valeur prédictive. Dans cette étude, nous présentons une méthode multiplex UPLC-Orbitrap-Exploris-120, spectromètre à haute résolution, simple et fiable pour quantifier les lysosphingolipides simultanément, dans le

plasma et le DBS. La méthode développée inclut la Glucosylsphingosine ou lysoglucosylcéramide (LysoGb1 pour la MG) + la Galactosylsphingosine ou lysogalactosylcéramide (Psychosine pour la MK), le lysoglobotriaosylcéramide (Lyso-Gb3 pour la MF), la lysosphingomyéline (LysoSM pour NPAB et LysoSM509 pour NPAB et NPC), le lyso-monosialoganglioside GM1 et GM2 (LysoGM1 - GM1 gangliosidose, LysoGM2 - GM2 Gangliosidose).

Ce projet a montré que l'analyse réalisée sur DBS avec une méthode basée sur la spectrométrie de masse à haute résolution est une alternative efficace pour mesurer les lysosphingolipides sur DBS avec des résultats comparables à ceux obtenus à partir de plasma.

Mon rôle dans ce projet a porté sur le design expérimental, la génération des données, l'analyse, l'intégration, la visualisation et l'interprétation des données. J'ai participé à la rédaction de l'article actuellement soumis.

***Ducatez F**, Ottaviani J, Plichet T, Pilon C, Lidove O, Wladimir Mauhin W, Barbey F, Perrichot R, Vergnaud S, Berger MG, Berger J, Belmatoug N, Marret S, Bekri S, Tebani A. Dried-blood spots and plasma lysosphingolipids measurement for sphingolipidoses screening using high resolution spectrometry. Submitted.*

Clinica Chimica Acta 542 (2023) 117278

Contents lists available at ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cca

Evaluation of dried-blood spots and a hematocrit-independent procedure in lysosomal diseases screening using multiplexed tandem mass spectrometry assays

Franklin Ducatez [a,b], Carine Pilon [a], Justine Ferey [a], Stéphane Marret [b], Soumeya Bekri [a], Abdellah Tebani [a,*]

[a] Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245, CHU Rouen, Department of Metabolic Biochemistry, 76000 Rouen, France
[b] Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245, CHU Rouen, Department of Neonatal Pediatrics, Intensive Care, and Neuropediatrics, 76000 Rouen, France

ARTICLE INFO

Keywords:
DBS
Dried blood spot
hemaPEN
Lysosomal storage diseases
Screening
Hematocrit-independent sampling

ABSTRACT

Background: Dried blood spots (DBS) are widely used as a non-invasive sampling method, especially in newborn screening (NBS). Despite its numerous advantages, conventional DBS might be limited by the hematocrit effect when analyzing a punch, depending on its position in the blood spot. This effect could be avoided using hematocrit-independent sampling devices such as the hemaPEN®. This device collects blood through integrated microcapillaries, and a fixed blood volume is deposited on a pre-punched paper disc. NBS programs are increasingly poised to include lysosomal disorders, given the availability of treatments that improve clinical outcomes if detected early.

In this study, the effect of hematocrit and punch position in the DBS on the assay of 6 lysosomal enzymes was evaluated on 3 mm discs pre-punched in hemaPEN® devices compared to 3 mm punches from the PerkinElmer 226 DBS.

Methods: The enzyme activities were measured by multiplexed tandem mass spectrometry coupled to ultra-high performance liquid chromatography. Three hematocrit levels (23%, 35%, and 50%) and punching positions (center, intermediary, and border) were tested. Three replicates have been performed for each condition. A multivariate approach has been used along with a univariate method to assess the effect of the experimental design on each enzyme activity.

Results: Hematocrit, punch position, and whole blood sampling method do not affect the assessment of enzyme activity using the NeoLSD® assay.

Conclusion: The results obtained from conventional DBS and the volumetric device HemaPEN® are comparable. These results underline the reliability of DBS for this test.

1. Introduction

Dried blood spot (DBS) cards collect a small volume of blood by pressing a finger or other puncture site onto a special filter paper. The blood is absorbed by the paper and dried, creating a small blood spot that can be used for testing. DBS is widely used as a non-invasive sampling method for newborn screening. This sampling method allows the collection of small volumes of blood and facilitates transportation. Innovative analytical technologies require only small volumes of samples to measure a large number of analytes; therefore, microsampling methods such as DBS is particularly suitable [1,2]. A disk of a defined diameter is punched from the DBS for analysis; this punch is supposed to contain a fixed blood volume. However, this volume can be modulated according to the hematocrit and the resulting blood viscosity on the one hand and the quality of the blood deposit on the other hand. Thus, conventional DBS might suffer from the hematocrit effect when analyzing a punch depending on the punch position within the blood spot. These drawbacks could be avoided using volumetric absorptive microsampling devices [2]. These devices allow to distribution a fixed volume of blood on a filter paper independently of the hematocrit level.

Microsampling volumetric blood collection devices are designed to collect small volumes of blood, typically in the range of a few

* Corresponding author at: Department of Metabolic Biochemistry, Rouen University Hospital, 37 Boulevard Gambetta, 76000 Rouen, France.
E-mail address: abdellah.tebani@chu-rouen.fr (A. Tebani).

https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117278
Received 20 January 2023; Received in revised form 28 February 2023; Accepted 28 February 2023
Available online 4 March 2023
0009-8981/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

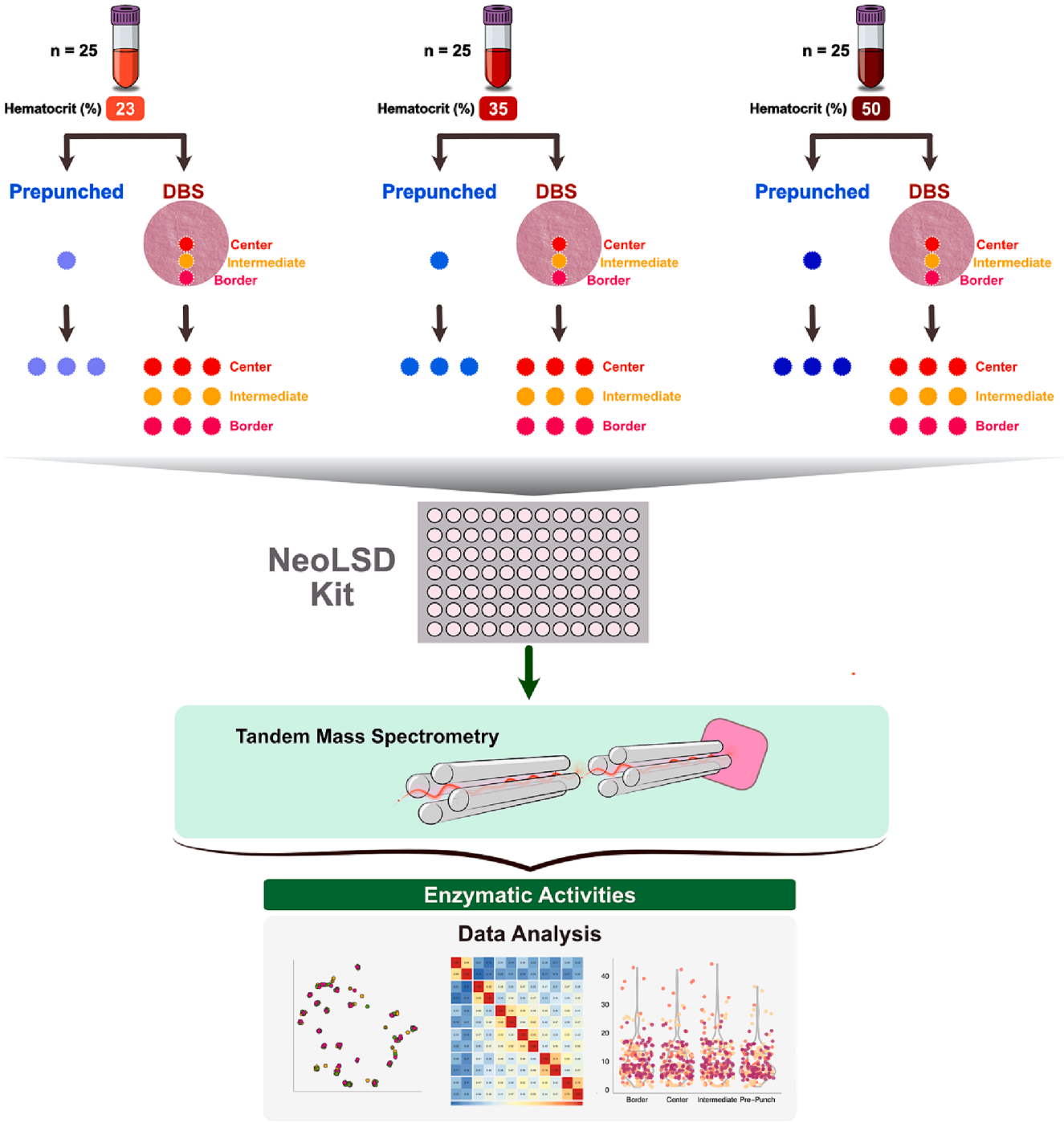


Fig. 1. Overview of the experimental design. Three hematocrit level blood samples have been selected (Low hematocrit = 23%, medium hematocrit = 35%, high hematocrit = 50%). These samples have been either sampled using HemaPEN® or put on a dried blood spot. For the DBS three punch positions have been tested; B: border punch, I: intermediary punch, C: center punch, PP: pre-punched. Once the samples are prepared, the enzyme activities are measured using NeoLSD™ MSMS Kit from PerkinEmer. All analyses have been performed in triplicate. After data acquisition, both multivariate and univariate data analysis have applied.

microliters. These devices are often used when a large volume of blood is unnecessary or when collecting more blood may be difficult or inconvenient, such as in pediatric or elderly populations or resource-limited settings.

Several microsampling volumetric blood collection devices are available [3,4]. Capillary tubes are small tubes with a narrow opening at one end for collecting a small volume of blood from a fingerstick or another puncture site. The blood is drawn up into the tube by capillary action. Microsampling needles collect a small volume of blood from a vein or artery. They have a minimal diameter and are often used with a syringe or other collection device.

HemaPEN® is a sampling device that collects blood via integrated microcapillaries and deposits a fixed blood volume on pre-punched paper discs [5]. The HemaPEN® device allows to draw a small amount of blood (20 μL) and deposit a fixed, exact and precise volume on 4 pre-punches of PerkinElmer 226 filter paper. A drop of capillary blood is drawn and the HemaPEN® device is placed on the drop to allow the blood to be transferred into the device. Then, the blood is transferred onto the pre-punched discs (PerkinElmer 226 filter paper) already integrated into the device. For storage purposes, a desiccant is also

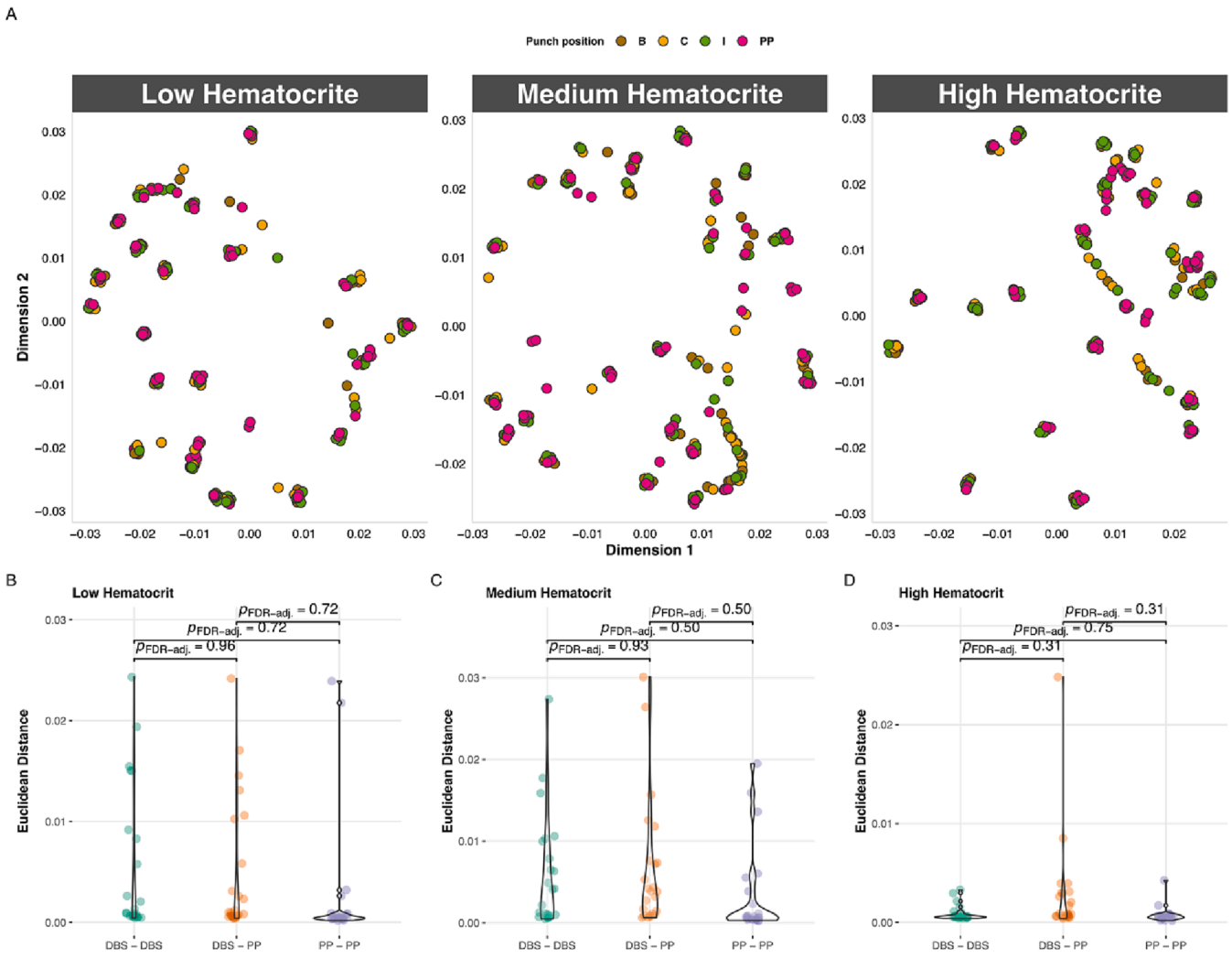


Fig. 2. A Two-dimensional PHATE projection of assessed samples colored by punch position and sampling type. B) Violin plot showing intrasample Euclidean distance based on the PHATE project embedding as a proxy for sample similarity. ANOVA-adjusted p-values are displayed. B: border punch, I: intermediary punch, C: center punch, PP: pre-punched. Low hematocrit = 23%, medium hematocrit = 35%, high hematocrit = 50%.

integrated in the device.

Lysosomal diseases (LDs) represent a group of about 70 hereditary diseases due to lysosomal protein deficiencies. These defects lead to the progressive accumulation of components in the lysosome [6]. LD clinical course is usually chronic and progressive and may present a large spectrum of severity and symptoms. LDs are usually multi-systemic, affecting various organs, including bones, muscles, liver, spleen, heart, lungs and central nervous system. Of note, LDs are the most frequent cause of pediatric neurodegenerative diseases [7].

Several specific treatments have been developed or are under development for LDs, such as hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), enzyme replacement therapy (ERT), substrate reduction (SR), pharmacological chaperones, and gene therapy [8-11]. One rule applies to all these approaches: the treatment efficacy depends on early initiation. If the treatment is delayed, cell and tissue damage is irreversible.

The recent development of synthetic substrates enabled the implementation of high throughput multiplex lysosomal enzyme mass spectrometry analysis on the DBS [12-15]. Thus, these advances in screening methods and therapeutic approaches led to consider the inclusion of LDs in national and regional neonatal screening programs. Numerous pilot studies using enzyme activity assessment on DBS have been conducted in the United States and Europe [16-19]. It is important to assess the reliability of the results of lysosomal enzyme activities obtained using DBS. In this study, we compared the technical performances of the pre-punched discs within HemaPEN® devices to punches generated from PE 226 DBS, using a multiplex-tandem mass spectrometry (MS/MS) enzymatic activity assay of 6 lysosomal enzymes that are decreased in Pompe, Mucopolysaccharidosis-I (MPS-I), Fabry, Gaucher, Niemann Pick-A/B, and Krabbe diseases.

2. Materials and methods

2.1. Blood sample preparation

Venous whole blood patient samples (EDTA-anticoagulated) were collected at Rouen University Hospital and were selected to cover three hematocrit levels. Seventy-five unique individuals have been included in this study. Three groups of 25 subjects with three different hematocrit levels were tested (23%, 35%, and 50%).

In this study, for each blood sample (i) 3.2 μL of whole blood is deposited onto pre-punched PerkinElmer 226 discs (used in HemaPEN® devices) using a positive displacement pipette to ensure accuracy, and then the pre-punches are dried for 2 h at room, (ii) in addition, regular DBS were prepared by pipetting 70 μL of whole blood onto a spot within PerkinElmer 226 sample collection card (PerkinElmer, USA). After drying for minimally two hours at ambient room temperature, 3 mm punches were taken at three punching positions: center, intermediary, and border. Each punch corresponds to a blood volume of theoretically

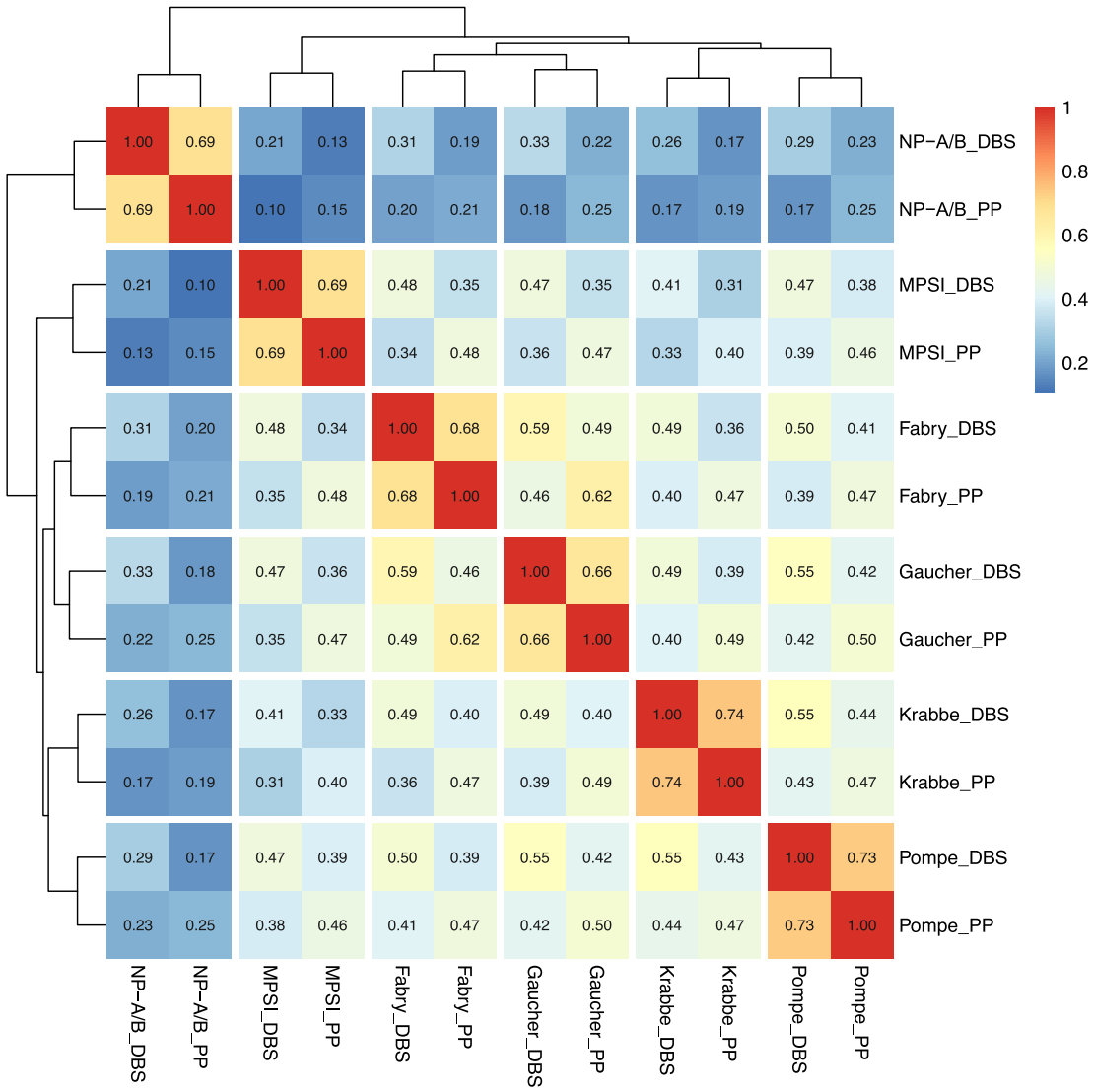


Fig. 3. Correlation matrix heatmap between samples based on enzymatic activities. B: border punch, I: intermediary punch, C: center punch, PP: pre-punched. The colors show spearman correlations. Blue: low correlation, red: high correlation. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.2 μL.

Three replicates have been assessed for each condition. Thus, 12 assessments were performed for each patient (Fig. 1).

2.2. Enzymatic activity assessment

Enzymatic activities of acid β-glucocerebrosidase (ABG; Gaucher), acid α-glucosidase (GAA; Pompe disease), acid α-galactosidase (GLA; Fabry), acid α-L-iduronidase (IDUA; MPS-I), sphingomyelinase (ASM; Niemann-Pick A/B, NPAB), and β-galactocerebrosidase (GALC; Krabbe disease) in DBS were determined by multiplexed tandem mass spectrometry (MS/MS) using the NeoLSD^{TM} assay kit (PerkinElmer). This kit contains all the reagents and buffers needed for the test (6 synthetic substrates, six internal standards, buffers, extraction solutions, solvent, control DBSs, microplates, and adhesive microplate covers). The enzymatic activity is evaluated by quantifying the reaction product generated in the presence of a specific synthetic substrate. The internal standards and the effects generated by the enzymes are measured after direct injection by the tandem mass spectrometer (FIA-MSMS – QSight, PerkinElmer) in MRM mode. Enzyme activities are calculated as a ratio between the product's peak intensity and its internal standard's. Results are expressed in micromoles (μmol) per liter (L) per hour (h).

2.3. Data analysis

Data analysis and visualization were performed using R (version 4.0.0) [20]. A multivariate exploratory analysis approach has been used to unveil trends and similarity analysis across samples and replicates. The PHATE algorithm (potential of heat-diffusion for affinity-based trajectory embedding) has been used as a dimensionality reduction tool using the R package phateR [21]. Clustering in heatmaps and dendrograms based on Spearman correlation was created by first calculating a correlation matrix of Spearman's ρ [22] between all samples. The correlation was converted to an Euclidean distance metric (1 – ρ) and was clustered using unsupervised top-down hierarchical clustering. Dendrograms showing gene expression in heatmaps have been clustered using the Ward2 algorithm implementation in the hclust function in the R package stats [23]. Univariate method to assess the effect of the sampling procedure and punch position using ANOVA with an adjusted significant p-value cut-off set at 0.05.

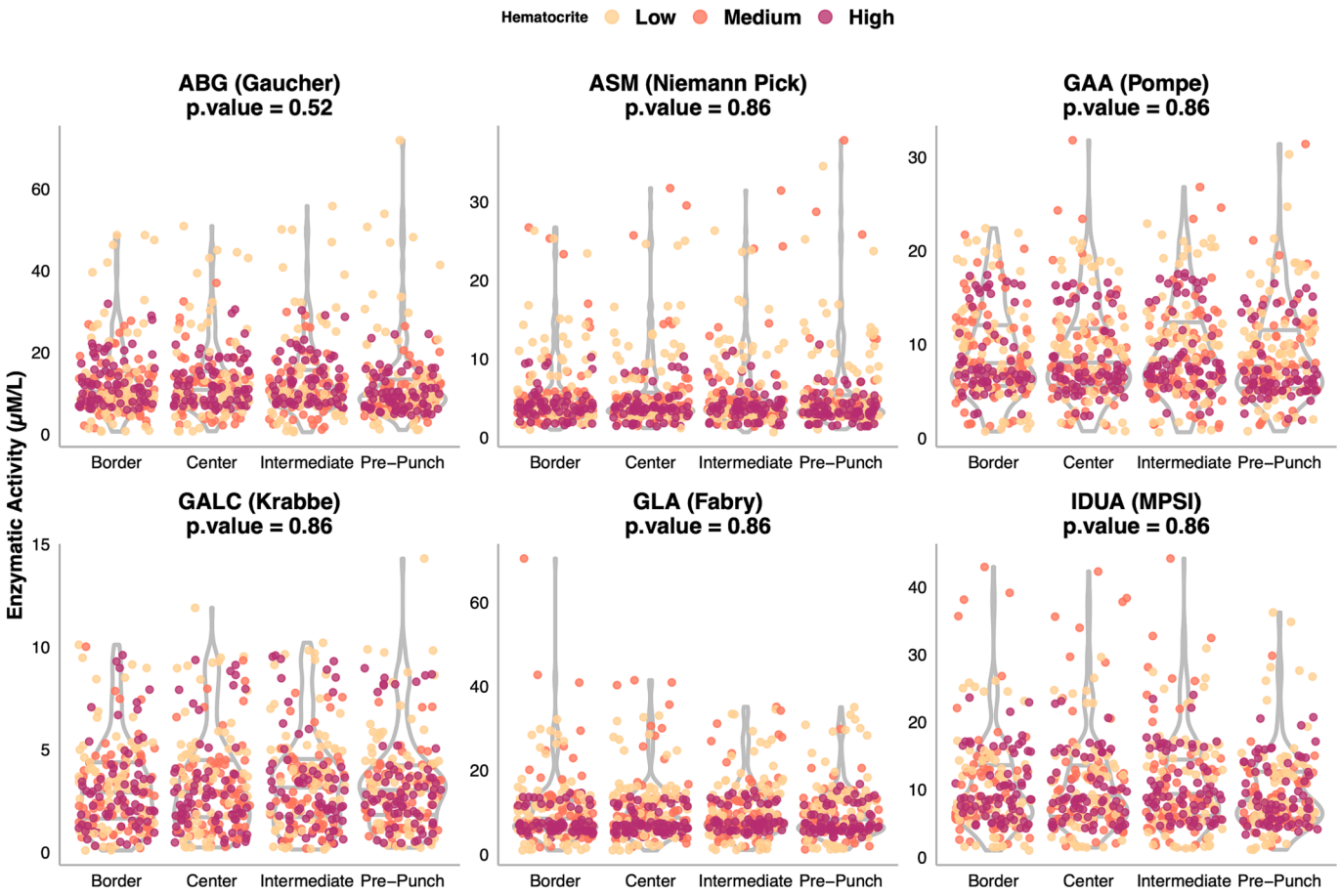


Fig. 4. Violin plot for the six assessed enzymatic activity in the different sampling methods colored according to their respective hematocrit. B: border, I: intermediary, C: center, PP: pre-punched.

3. Results

To assess the variation of the enzymatic activity between the different sampling methods and related hematocrit levels, we first applied an unsupervised multivariate method based on a dimension reduction. The results are shown in Fig. 2A which displays the clustering of the different samples according to their underlying enzymatic activities. Samples with similar enzymatic activity profiles tend to cluster with each other. Thus, Fig. 2A shows that samples don't cluster according to their sampling method or punch position but rather on their respective enzymatic profiles. Interestingly, this is also observed at different hematocrit levels. Using this unsupervised approach, we have also assessed the similarities between samples using Euclidean distance based on the embeddings of the 2D projection. The results did not reveal a significant difference between the sampling methods regardless of the hematocrit, as shown in Fig. 2B.

To go further in the analysis, we assessed the behavior of each enzymatic activity in each sample regarding their sampling method and

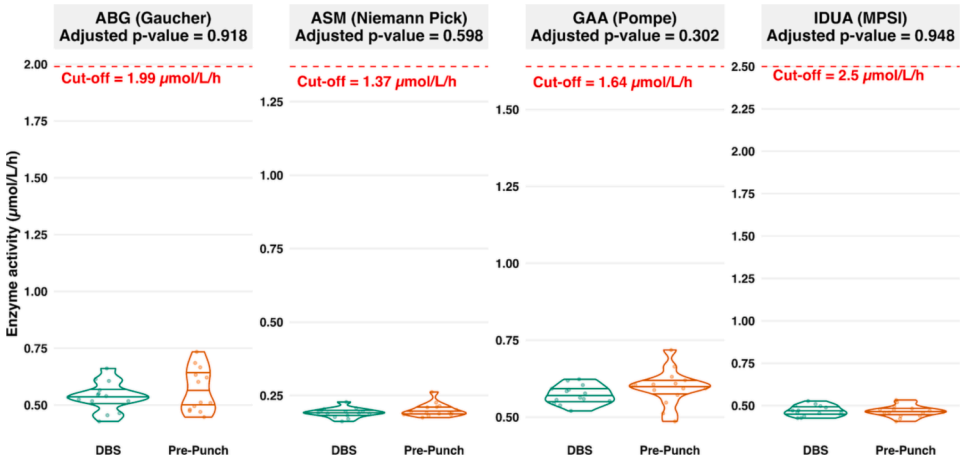


Fig. 5. Violin plots for the four patient-derived samples showed consistently low enzymatic activity in both sampling methods DBS and Pre-Punch for all patients. No significant difference has been observed.

hematocrit levels. To do so, we used a correlation analysis between all samples as a similarity metric. The results showed a high correlation between pre-punched and DBS samples across all assessed enzymes; Krabbe disease: GALC _DBS vs. GALC_PP (R = 0.74), Pompe disease: GAA _DBS vs. GAA_PP (R = 0.73), MPSI: IDUA _DBS vs. IDUA_PP (R = 0.69), NP-A/B: ASM_DBS vs. ASM_PP (R = 0.69), Fabry disease: GLA_DBS vs. GLA_PP (R = 0.68), Gaucher disease: ABG_DBS vs. ABG_PP (R = 0.66). However, there were low correlations between the different enzymes. The results are shown in Fig. 3.

Furthermore, we have also assessed, using ANOVA analysis, the differences between the enzymatic activities across the samples, sampling conditions, and hematocrit levels. The results showed no difference for the six assessed enzymes regardless of sampling method or hematocrit levels (Fig. 4).

To assess the consistency of these observations, we have acquired data for four patient-derived samples (Gaucher, Pompe, Niemman Pick and MPSI). The data didn't show any differences between the enzymatic activities across the sampling conditions. The lower enzyme activities were observed in both sampling conditions (Fig. 5).

4. Discussion

The HemaPEN® is a device that collects a small blood volume for diagnostic or follow-up testing. This device is designed to be easy to use, with a simple, one-step process for collecting blood. In contrast, DBS collection requires multiple steps, including the application of blood to the card, drying, and packaging for transport to the laboratory.

This is the first study that evaluates the volumetric blood collection devices for measuring the activity of lysosomal enzymes in whole blood and its comparison to conventional DBS with different punching positions and hematocrit levels.

Hematocrit levels vary significantly with age and disease. A hematocrit bias is a potential disadvantage of using DBS in routine analyses [5,24]. High-hematocrit blood spreads less on filter paper than low-hematocrit blood. As a result, there is a risk of overestimating the analyte concentration. The hematocrit effect can also affect extraction effectiveness, affecting the analyte recovery [24]. A high-hematocrit DBS could create an extraction barrier, lowering recovery and underestimating the analyte concentration. It is reported that hematocrit affects blood DBS characteristics such as drying time, homogeneity, and extraction recovery [25].

Thus, to explore this potential bias of hematocrit, blood samples with hematocrit levels were deposited on DBS and pre-punched discs. In addition to the effect of hematocrit, we assessed the impact of DBS punch position between samples and across hematocrit levels. Indeed, the location of the punch within a single DBS could also be a source of bias. The DBS samples were punched at 3 positions (center, intermediary and border). The activity of six lysosomal enzymes has been measured in all the punches. The present results showed no significant difference between the punches from DBS regardless of their position. Thus, the enzymes tested appear to be homogeneously distributed in the blood spot. These results indicate that when resampling from the same spot, such as in a replication or confirmation analysis, the location of the punch may not induce a result with an unacceptable bias compared to the original result. Thus, the error associated with the non-homogeneous distribution of enzymes would not be a critical factor for the assessed enzymes. Furthermore, no differences have been observed between conventional DBS and HemaPEN® for whole-blood lysosomal enzymes measurement using the NeoLSD® assay.

Of note, these results need to be extended to other enzymes regarding their associations with the blood-cell effect. Furthermore, while promising hematocrit-independent microsampling devices are developed, further large-scale testing is required, including real-life applications, to demonstrate the applicability and robustness of these technologies. Indeed, it is important to highlight limitations regarding factors related to blood collection and sample preparation are of paramount importance. For DBS, it is essential to dry blood spots completely before transportation (minimum of 3–4 h of drying recommended at room temperature). Enzyme activities assessed on DBS can be affected by high ambient temperatures, which is a concern in regions with hot climates. After collection, DBS samples need to be transported in a sealed plastic bags with desiccant and stored carefully to maintain enzyme stability [26]. Indeed, high temperature and humidity of the DBS environment may contribute to changes in enzyme concentrations. DBS samples stored at room temperature for more than 5 days may lead to a marked loss of enzyme activities.

5. Conclusions

New microsampling tools are being developed and reaching the market. Several factors, including ease of sampling, automatability of sample processing, cost, and technical performance, will determine whether these devices will be widely used for home sampling. Overall, the HemaPEN® and traditional DBS collection methods have comparable performance for assessing lysosomal enzymes. However, both exhibit advantages and may be helpful in various circumstances. The volumetric devices can be particularly useful (i) if the hematocrit level affects the evaluation of the analyte (ii) for drawing a small, precise volume of blood, (iv) for reliable and simple home sampling. However, the DBS collection may be preferred when performed by professionals or when larger volumes of blood are required.

Funding: The authors have nothing to declare.

Data Availability Statement: All the data that support the findings are presented in the manuscript and the supplementary material.

CRediT authorship contribution statement

Franklin Ducatez: Visualization, Formal analysis, Writing – original draft, Investigation. **Carine Pilon:** Investigation. **Justine Ferey:** Investigation. **Stéphane Marret:** . **Soumeya Bekri:** Conceptualization, Methodology, Writing – review & editing. **Abdellah Tebani:** Conceptualization, Methodology, Writing – review & editing, Visualization, Formal analysis, Writing – original draft.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

References

[1] J. Henion, R.V. Oliveira, D.H. Chace, Microsample analyses via DBS: challenges and opportunities, Bioanalysis 5 (20) (2013) 2547–2565.
[2] V. Londhe, M. Rajadhyaksha, Opportunities and obstacles for microsampling techniques in bioanalysis: Special focus on DBS and VAMS, J Pharm Biomed Anal 182 (2020), 113102.
[3] J.L. Roberts, L. Whiley, N. Gray, M. Gay, N.G. Lawler, Advanced microsamples: Current applications and considerations for mass spectrometry-based metabolic phenotyping pipelines, Separations 9 (7) (2022) 175.
[4] L. Delahaye, H. Veenhof, B.C. Koch, J.-W.-C. Alffenaar, R. Linden, C. Stove, Alternative sampling devices to collect dried blood microsamples: state-of-the-art, Ther. Drug Monit. 43 (3) (2021) 310–321.
[5] S. Deprez, L. Paniagua-González, S. Velghe, C.P. Stove, Evaluation of the Performance and Hematocrit Independence of the HemaPEN as a Volumetric Dried Blood Spot Collection Device, Anal Chem 91 (22) (2019) 14467–14475.
[6] F.M. Platt, A. d'Azzo, B.L. Davidson, E.F. Neufeld, C.J. Tifft, Lysosomal storage diseases, Nat. Rev. Dis. Primers 4 (1) (2018) 27.
[7] M.F. Coutinho, S. Alves, From rare to common and back again: 60years of lysosomal dysfunction, Mol. Genet. Metab. 117 (2) (2016) 53–65.
[8] E.I. Katsigianni, P. Petrou, A systematic review of economic evaluations of enzyme replacement therapy in Lysosomal storage diseases, Cost Eff Resour Alloc 20 (1) (2022) 51.

[9] M. Penon-Portmann, D.R. Blair, P. Harmatz, Current and new therapies for mucopolysaccharidoses, Pediatr Neonatol (2022).
[10] L. Rossini, C. Durante, A. Marzollo, A. Biffi, New Indications for Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy in Lysosomal Storage Disorders, Front Oncol 12 (2022), 885639.
[11] J. Sheth, A. Nair, Treatment for Lysosomal Storage Disorders, Curr Pharm Des 26 (40) (2020) 5110–5118.
[12] H.C. Joyce Liao, H.J. Chen, Multiplex Lysosomal Enzyme Activity Assay on Dried Blood Spots Using Tandem Mass Spectrometry, Methods in molecular biology 2546 (2022) 261–269.
[13] Z. Spacil, H. Tatipaka, M. Barcenas, C.R. Scott, F. Turecek, M.H. Gelb, High-throughput assay of 9 lysosomal enzymes for newborn screening, Clin Chem 59 (3) (2013) 502–511.
[14] X.K. Zhang, C.S. Elbin, F. Turecek, R. Scott, W.L. Chuang, J.M. Keutzer, M. Gelb, Multiplex lysosomal enzyme activity assay on dried blood spots using tandem mass spectrometry, Methods in molecular biology 603 (2010) 339–350.
[15] M.H. Gelb, Newborn Screening for Lysosomal Storage Diseases: Methodologies, Screen Positive Rates, Normalization of Datasets, Second-Tier Tests, and Post-Analysis Tools, Int J Neonatal Screen 4 (3) (2018).
[16] E.G. Ames, R. Fisher, M. Kleyn, A. Ahmad, Current Practices for U.S. Newborn Screening of Pompe Disease and MPSI, Int J Neonatal, Screen 6 (3) (2020).
[17] A.B. Burlina, G. Polo, L. Salviati, G. Duro, C. Zizzo, A. Dardis, B. Bembi, C. Cazzorla, L. Rubert, R. Zordan, R.J. Desnick, A.P. Burlina, Newborn screening for lysosomal storage disorders by tandem mass spectrometry in North East Italy, J. Inherit. Metab. Dis. 41 (2) (2018) 209–219.
[18] T.P. Mechtler, S. Stary, T.F. Metz, V.R. De Jesus, S. Greber-Platzer, A. Pollak, K. R. Herkner, B. Streubel, D.C. Kasper, Neonatal screening for lysosomal storage disorders: feasibility and incidence from a nationwide study in Austria, Lancet (London, England) 379 (9813) (2012) 335–341.
[19] J. Wittmann, E. Karg, S. Turi, E. Legnini, G. Wittmann, A.K. Giese, J. Lukas, U. Golnitz, M. Klingenhager, O. Bodamer, A. Muhl, A. Rolfs, Newborn screening for lysosomal storage disorders in hungary, JIMD Rep 6 (2012) 117–125.
[20] R.C. Team, R: a language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing website (2020).
[21] K.R. Moon, D. van Dijk, Z. Wang, S. Gigante, D.B. Burkhardt, W.S. Chen, K. Yim, A. v.d. Elzen, M.J. Hirn, R.R. Coifman, Visualizing structure and transitions in high-dimensional biological data, Nat. Biotechnol. 37(12) (2019) 1482-1492.
[22] C. Spearman, The proof and measurement of association between two things, Int J Epidemiol 39 (5) (2010) 1137–1150.
[23] F. Murtagh, P. Legendre, Ward's hierarchical agglomerative clustering method: which algorithms implement Ward's criterion? J. Classif. 31 (3) (2014) 274–295.
[24] S. Velghe, L. Delahaye, C.P. Stove, Is the hematocrit still an issue in quantitative dried blood spot analysis? J. Pharm. Biomed. Anal. 163 (2019) 188–196.
[25] M. O'Mara, B. Hudson-Curtis, K. Olson, Y. Yueh, J. Dunn, N. Spooner, The effect of hematocrit and punch location on assay bias during quantitative bioanalysis of dried blood spot samples, Bioanalysis 3 (20) (2011) 2335–2347.
[26] M. Supriya, T. De, R. Christopher, Effect of temperature on lysosomal enzyme activity during preparation and storage of dried blood spots, J. Clin. Lab. Anal. 32 (1) (2018).

Dried-blood spots and plasma lysosphingolipids measurement for sphingolipidoses screening

Franklin Ducatez[1,2], Jules Ottaviani[1], Thomas Plichet[1], Carine Pilon[1], Olivier Lidove[3], Wladimir Mauhin[3], Fréderic Barbey[4], Régine Perrichot[5], Sabrina Vergnaud[6], Marc G. Berger[7,8], Juliette Berger[7,8], Nadia Belmatoug[9], Nadia Belmatoug[10], Stéphane Marret[2], Soumeya Bekri[1], Abdellah Tebani[1*]

[1] Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245, CHU Rouen, Department of Metabolic Biochemistry, 76000 Rouen, France
[2] Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245, CHU Rouen, Department of Neonatal Pediatrics, Intensive Care, and Neuropediatrics, 76000 Rouen, France.
[3] Department of Internal Medicine-Rheumatology, Croix Saint Simon Hospital, Paris, France.
[4] University of Lausanne and University Hospital of Lausanne, Department of Immunology, Switzerland.
[5] Service de Néphrologie, Centre Hospitalier de Bretagne Atlantique, Vannes, France.
[6] UF Maladies Héréditaires Enzymatiques Rares-CGD, Institut de Biologie et de Pathologies, CHU de Grenoble Alpes, Grenoble, France.
[7] CHU Clermont-Ferrand, Hopital Estaing, CRB-Auvergne, 63003 Clermont-Ferrand, France
[8] Université Clermont Auvergne, EA 7453 CHELTER, 63000 Clermont-Ferrand, France
[9] Referral Center for Lysosomal Diseases, Paris Cité University, APHP-Nord, France.
[10] Neurology Department, Reference center for Lysosomal Diseases, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France.

* Correspondence:
Dr. Abdellah Tebani
Department of Metabolic Biochemistry
Rouen University Hospital
37 Boulevard Gambetta, 76000 Rouen, France.
Phone: + (33) 2 32 88 81 24
abdellah.tebani@chu-rouen.fr

Abstract

Background: Sphingolipidoses are rare inherited metabolic diseases from lysosomal diseases. Early and accurate diagnosis is crucial for effective management and treatment. Dried blood spots (DBS) are widely used as a non-invasive sampling method, especially in newborn screening (NBS). In this study, we aimed to develop a robust method to accelerate the diagnosis of these sphingolipidoses.

Method: We employed high-resolution mass spectrometry coupled with liquid chromatography (LC-MS/MS) to analyze 6 lysosphingolipids (lysoGb1, lysoGb3, lysoSM, lysoSM509, LysoGM1 and LysoGM2) on dried blood spots and plasma samples, including 30 control subjects and 110 sphingolipidosis patients (60 Fabry, 49 Gaucher and 1 GM2 Gangliodosis).

Results: The developed multiplex LC-MS/MS method demonstrated excellent linearity, precision, accuracy, and quantification when applied to samples from normal individuals and patients with sphingolipidoses. Each disease displayed a specific biomarker pattern consistent with previously reported performances.

Conclusion: Our study presents an LC-MS/MS method along with the established reference ranges, providing a valuable tool for targeted screening, accurate diagnosis, and ongoing monitoring of sphingolipidoses. This advancement in diagnostic technology holds great promise for improving the clinical management and quality of life for individuals affected by lysosomal diseases.

Keywords: DBS; Dried blood spot; Plasma; sphingolipids; Lysosomal diseases; screening; Fabry; Gaucher; Krabbe; GM1, GM2; Niemann-Pick

1. Introduction

Sphingolipidoses are a subgroup of lysosomal characterized due to an alteration of sphingolipid metabolism. Sphingolipids are a large class of complex lipids composed of a sphingosine molecule, which serves as the platform for various modifications, resulting in numerous sphingolipid species, a long-chain fatty acid, and eventually head group (**Fig. 1**) [283]. Sphingolipids are major components of cellular membranes and are particularly present in the plasma membrane and several organelles. Moreover, they intervene in various cellular processes, including signaling, adhesion, and intracellular transport. Sphingolipidoses are responsible for overlapping phenotypes with a large range of clinical presentations. Besides, the severity and onset of symptoms can vary widely, even within the same disorder. Sphingolipidoses are therefore difficult to diagnose, thus active research aims to characterize biomarkers able to improve diagnostic accuracy, treatment monitoring, and prediction of disease progression. [284]. Lysosphingolipids, derivatives of glycosphingolipids resulting from their N-deacylation, have emerged as potential biomarkers of several sphingolipidoses including Gaucher disease (GD), Krabbe disease (KD) Fabry disease (FD), Niemann-Pick type A/B (NPA/B) and type C (NPC) diseases, and GM1 and GM2 gangliosidoses (**Fig. 2**). These molecules are released into the circulation, and are therefore potential indicators of the presence and/or progression of the disease [285]. Advances in technology, such as mass spectrometry, enable more precise and efficient measurement of lysosphingolipids, facilitating their integration into routine clinical practice. In addition, the relevance of lysosphingolipid assessment to monitor disease progression may require further exploration to enhance its accuracy and predictive value.

Dried blood spot (DBS) cards enable to collect a small volume of blood on a filter paper. This sampling method meets the volume requirements of innovative analytical technologies that can measure many analytes in small sample volumes [286]. Therefore, microsampling methods such as DBS are particularly suitable for lysosphingolipid assessment. Moreover, this easily transportable sample makes diagnosing these rare diseases in remote areas possible. Different methods have been previously reported with different analyte scopes and used plasma [287-296], and DBS [289,294,297-302]. In this study, we report a simple and reliable UPLC-Orbitrap-Exploris-120 multiplex method

was established to quantify simultaneously, in plasma or DBS, Glucosylsphingosine or lysoglucosylceramide (LysoGb1 for GD) + lysogalactosylceramide or Galactosylsphingosine (Psychosine for KD), lysoglobotriaosylceramide (Lyso-Gb3 for FD), lysosphingomyeline (LysoSM for NPAB and LysoSM509 for NPAB and NPC), lyso-monosialoganglioside GM1 and GM2 (LysoGM1 - GM1 gangliosidosis, LysoGM2 - GM2 Gangliosidosis) (**Fig. 2**). Standardization of lysosphingolipid measurement techniques, reference intervals and interpretation criteria are needed for a large clinical adoption. To effectively evaluate analytical practices for lysoshingolipid assessment, we have thoroughly compiled the published methodologies and their respective characteristics with different analyte scopes in plasma [287-296], or DBS [289,294,297-302] as presented in **Fig. 3**.

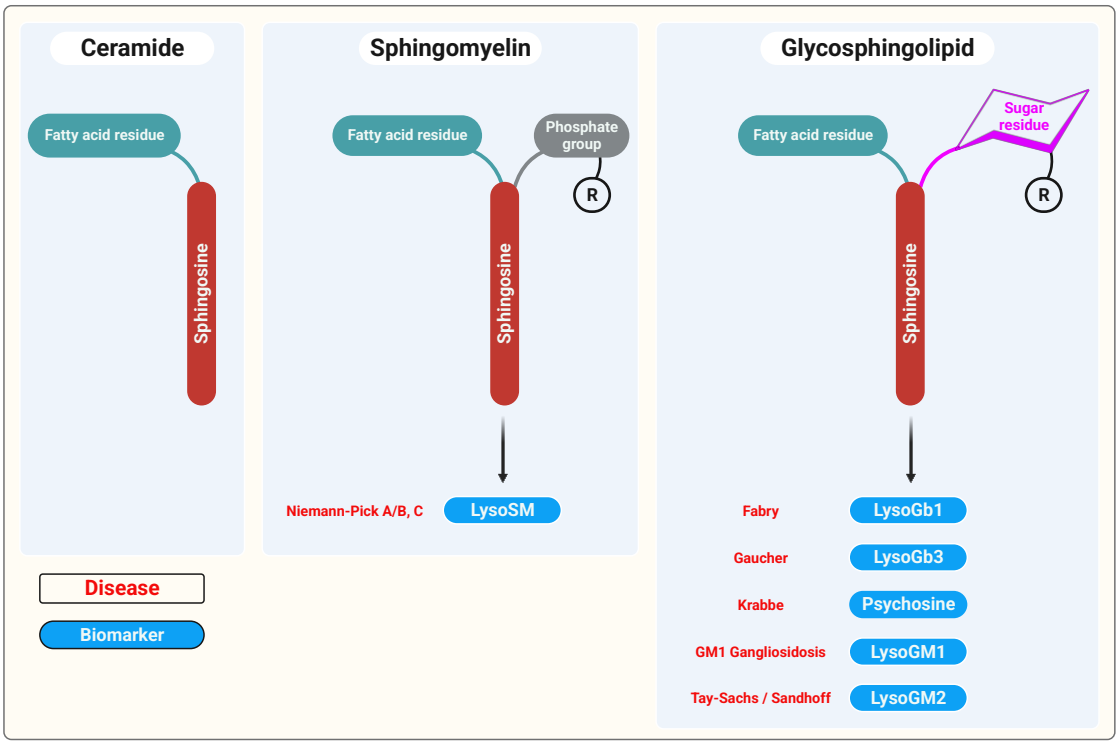


Figure 1. Overview of the biochemical components of lysosphingolipids biomarkers and their respective disease. lyso-Ceramide-trihexoside (LysoSM), D-erythro-Sphingosylphosphorylcholine (LysoGb3), lyso-Monosialoganglioside GM1 (LysoGM1), lyso-Monosialoganglioside GM2 (LysoGM2) were purchased from BioValley (Paris, France). Glucosyl-beta-sphingosine (d18:1) (LysoGb1).

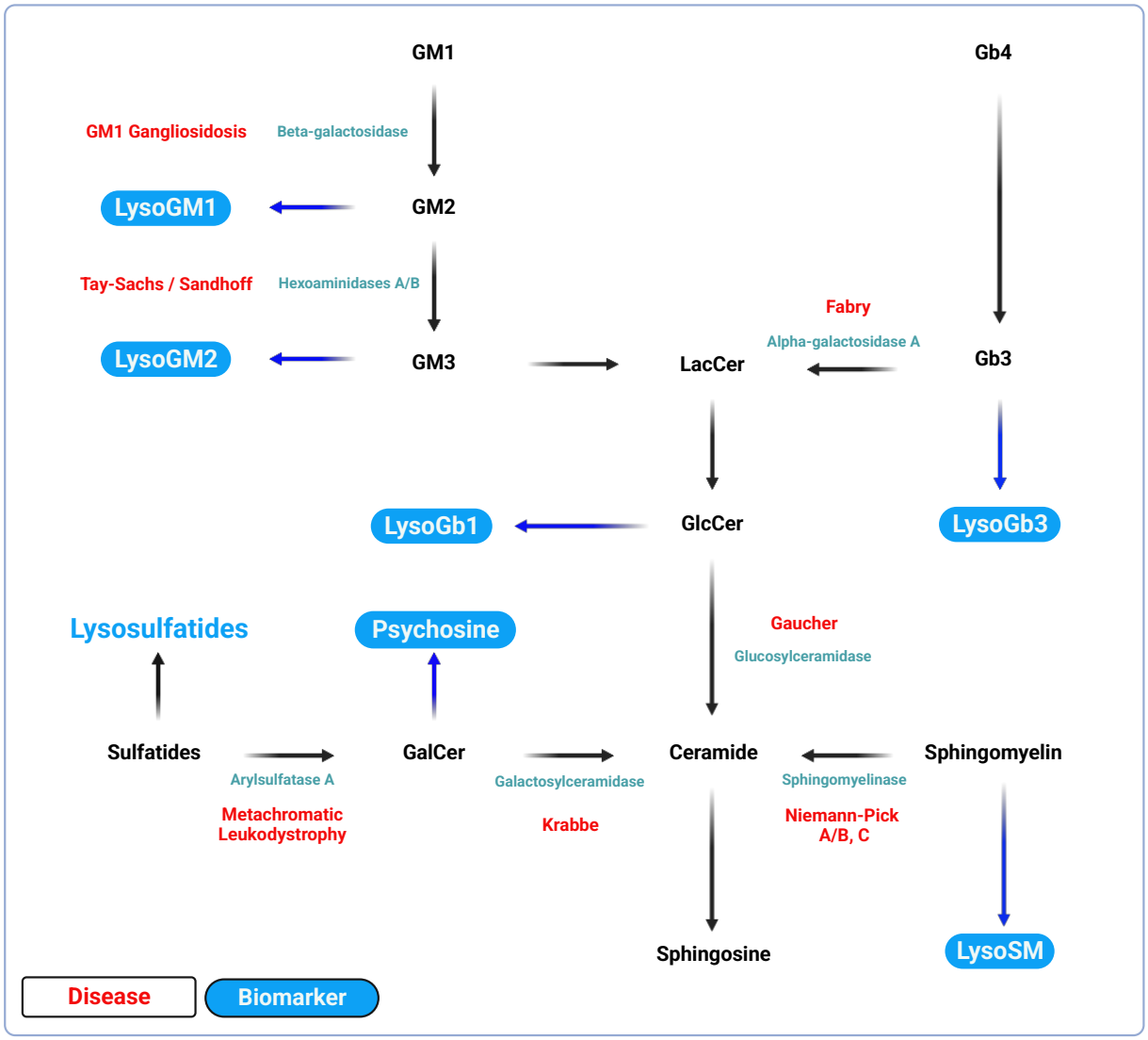


Figure 2. Metabolic mapping of the lysosphingolipids biomarkers and their respective diseases. lyso-Ceramide-trihexoside (LysoSM), D-erythro-Sphingosylphosphorylcholine (LysoGb3), lyso-Monosialoganglioside GM1 (LysoGM1), lyso-Monosialoganglioside GM2 (LysoGM2).

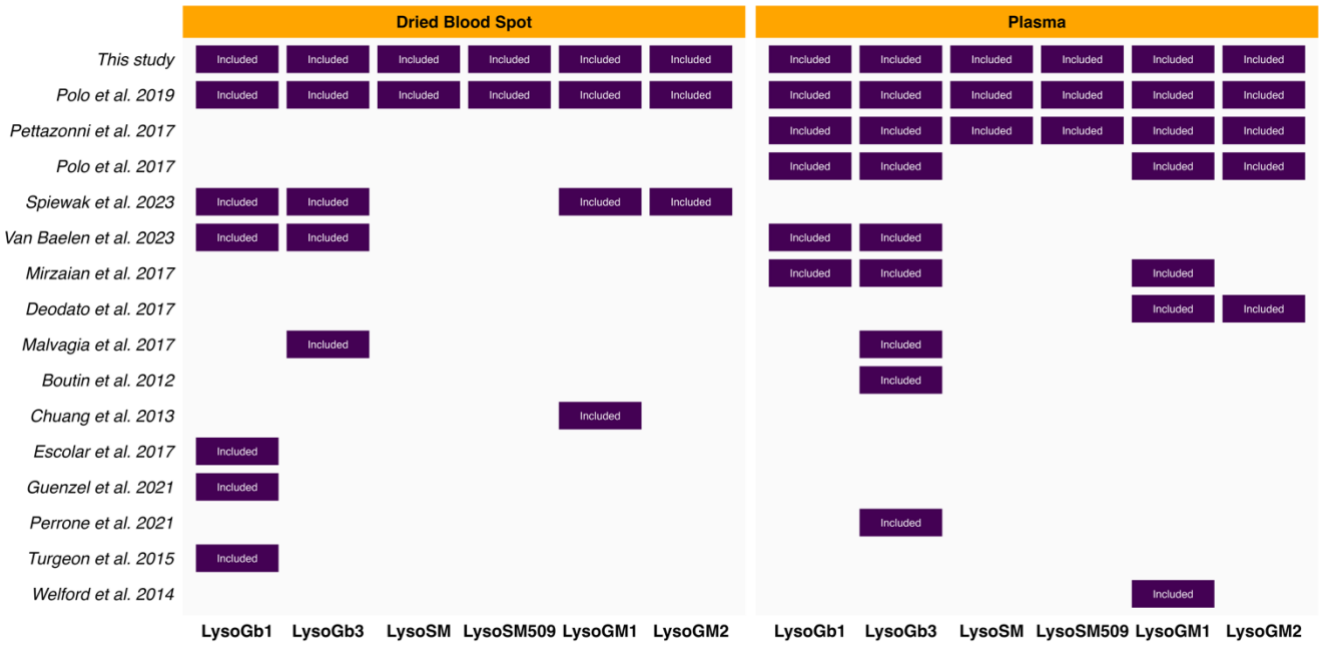


Figure 3. Overview of previously reported methods for lysosphingolipids measurements.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

LC-MS-grade acetonitrile and methanol and high-performance liquid chromatography (HPLC)-grade were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). The UPLC-MS-grade formic acid (purity >99%) was supplied by Biosolve-Chemicals (Dieuze, France). Ultrapure water was generated using the Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). lyso-Ceramide-trihexoside (LysoSM), D-erythro-Sphingosylphosphorylcholine (LysoGb3), lyso-Monosialoganglioside GM1 (LysoGM1), lyso-Monosialoganglioside GM2 (LysoGM2) were purchased from BioValley (Paris, France). Glucosyl-beta-sphingosine (d18:1) (LysoGb1) and Glucosyl-beta-sphingosine-d5 (Internal standard) were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA).

2.2. Preparation of the standard solutions

Internal standard solutions were prepared at 10 mg/L. Stock solutions were at 10 mg/L were prepared for lysoGb1, lysoGb3, lysoSM, lysoSM509, lysoGM1, and lysoGM2. The latter was used to prepare seven non-zero calibration points and two (low and high)

quality control (QC) samples. All dilutions were prepared in amber glass vials by adding acetonitrile to the standard solutions.

2.3. Sample preparation

Dried blood spots were punched into 3.2 mm discs. Subsequently, three of these discs were added to each well of the sample plate. For plasma EDTA, 9,6 µL was used. An incubation solution was prepared extemporaneously to facilitate the extraction and analysis of the target compounds. This solution contained the internal standard and was made at a concentration of 3 nmol/L. It was created by diluting the internal standard with a mixture of MeOH (Methanol), Acetone, and H_2O (water) in a 45:45:10 (v/v) ratio. The next step involved incubating the samples at a controlled temperature of 45°C for 20 minutes for DBS. During this incubation period, the samples were gently agitated by shaking at a speed of 650 rpm to ensure thorough mixing and extraction of analytes. Once the incubation was complete, centrifugation at 3500 rpm at 4°C for 10 min is performed. Then, 30 µL of HPLC-grade water was added to a vial. Following this, 60 µL of the contents from each well of the sample plate were carefully transferred to their respective vials and vortex. Then, we transfer it into a vial reducer before injection. Finally, a 15 µL aliquot from each vial was injected.

2.4. Liquid chromatography and mass spectrometry

A ThermoScientific Syncronis C18 1,7 µm 50x2.1mm (Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich, Germany) column was used and maintained at 30°C. Phase A was formic acid 0.2% in water, and phase B was formic acid 0.2% in Methanol. The following gradient was run at a 0.3 mL/min flow rate. The gradient was initiated at 50% of phase B: 0 to 1 min: 50 to 100% B, 1 to 1.5 min: 100% B, 1.5 to 4.5 min: 100 to 50% B, 4.5 to 5 min: 50% B, 5 to 6 min: 50% B.

The chromatographic system was connected to an Orbitrap Exploris 120 mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich, Germany) with an electrospray ionization (H-ESI) source. The source was operated in positive-negative switching mode at spray voltages of 3500 and -2500 V in the positive and negative modes, respectively. Sheath gas, auxiliary gas and sweep gas were set to 35, 10 and 1 (arbitrary units),

respectively. The capillary temperature and the vaporizer temperature were set to 325°C. The instrument was fully calibrated before the sequence started and recalibrated (one-point calibration) before every injection. Thus, a mass accuracy of better than 2 ppm could be expected. MS2 spectra were acquired in the data-dependent acquisition mode at a resolution of 30,000 by employing collision energy steps of 20 and 45 V. Data evaluation was conducted in a targeted approach using TraceFinder 5.1 (Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich, Germany). The following transition were monitored; LysoGb1 (m/z = 462.3425 --> 282.2792), LysoGb3 (m/z = 786.4424 --> 282.2792), LysoSM (m/z = 465.3447 --> 184.0733), LysoGM1 (m/z = 786.4424 --> 282.2792), LysoGM2 (m/z = 786.4424 --> 282.2792), LysoSM509 (m/z = 510.3430 --> 184.0733), Internal Standard (m/z = 467.3738 --> 237.6727). Data were exported in table format for further data analyses and visualization.

2.5. Methode validation

The linearity of the response was assessed by preparing a standard curve with 7 different concentrations depending on the analyte, LysoGb1 (0.8 – 500 nmol/L), LysoGb3 (4 – 100 nmol/L), LysoSM and LysoSM509 (2 – 500 nmol/L), LysoGM1 and LysoGM2 (2 – 250 nmol/L). Low and high Quality Controls were obtained by spiking pooled plasma or DBS with appropriate standard solutions. The detection limit (LOD) for each biomarker was determined using a signal-to-noise ratio of 3 Peaks with a signal-to-noise ratio greater than 10 were accepted and integrated (lower limit of quantification). QCs were used to evaluate intraday (n = 20) and interday (n = 9) for accuracy and precision. Stability has been assessed these pools of plasma were aliquoted and analyzed after 24 h, 48h, 72h in the autosampler (+4°C). For carryover analysis, low QC samples were evaluated in triplicate (L1, L2, L3) after high enrichment QC DBS samples (H1, H2, H3) to establish carryover. The final blanked carryover was calculated by taking the percent ratio of the peak areas, 100*(mean L1 – mean L3)/(mean H – mean L3). Accepted carryover values were <1%. Data analysis and visualization were performed using R (version 4.0.0) [303].

3. Results

3.1. Method validation

The calibration curves for lysoGb1, lysoGb3, lysoSM, lysoSM509, lysoGM1, and lysoGM2 were all found to be linear with high accuracy, as indicated by the mean regression coefficients (R2) ranging from 0.9940 to 0.9999 (**Fig. 4**). In addition, **Figure 5** presents the precision of low and high spiked QCs for both plasma and DBS samples, consistent across intra- and inter-day analyses.

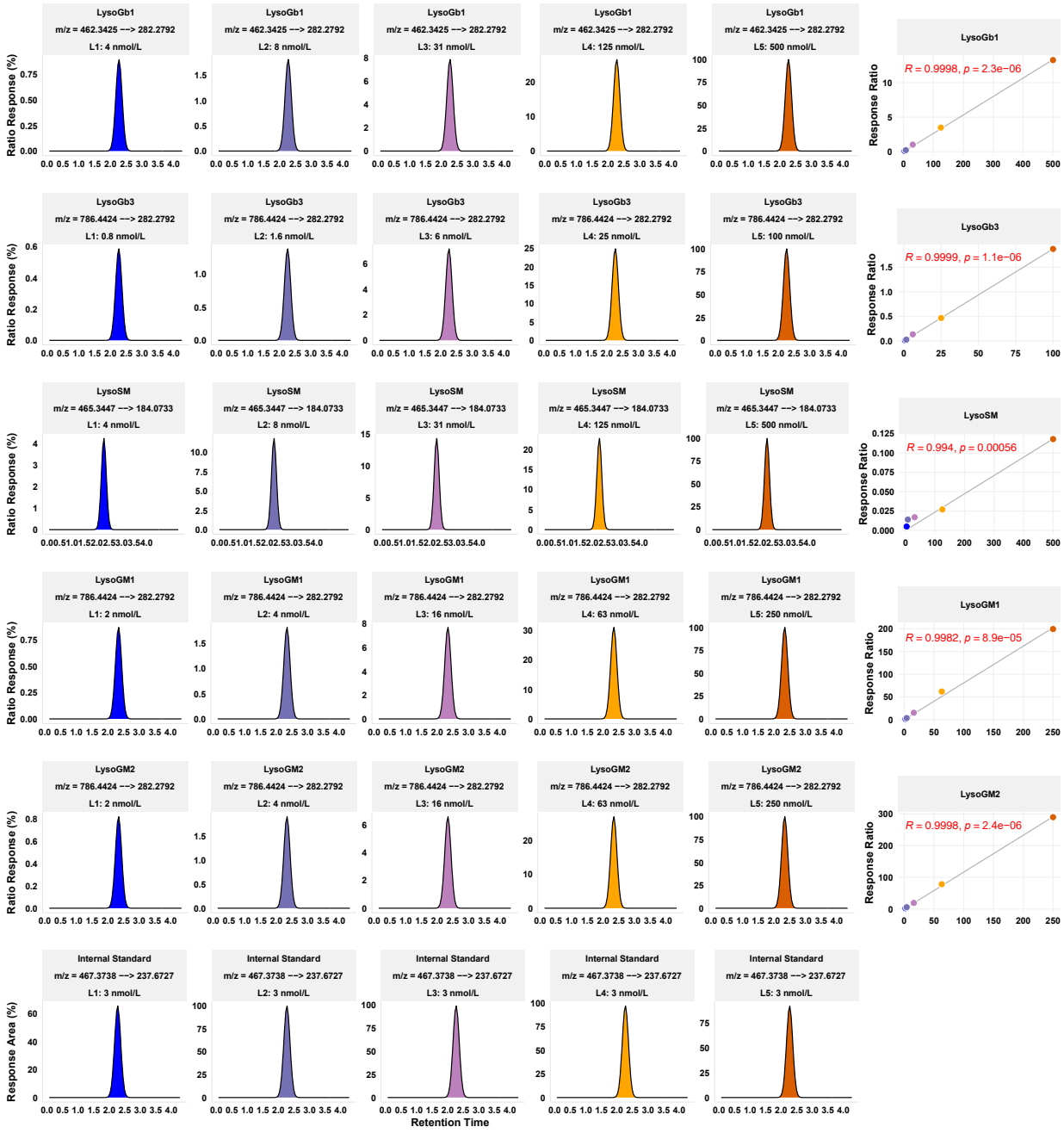


Figure 4. Calibration curves for each analyte.

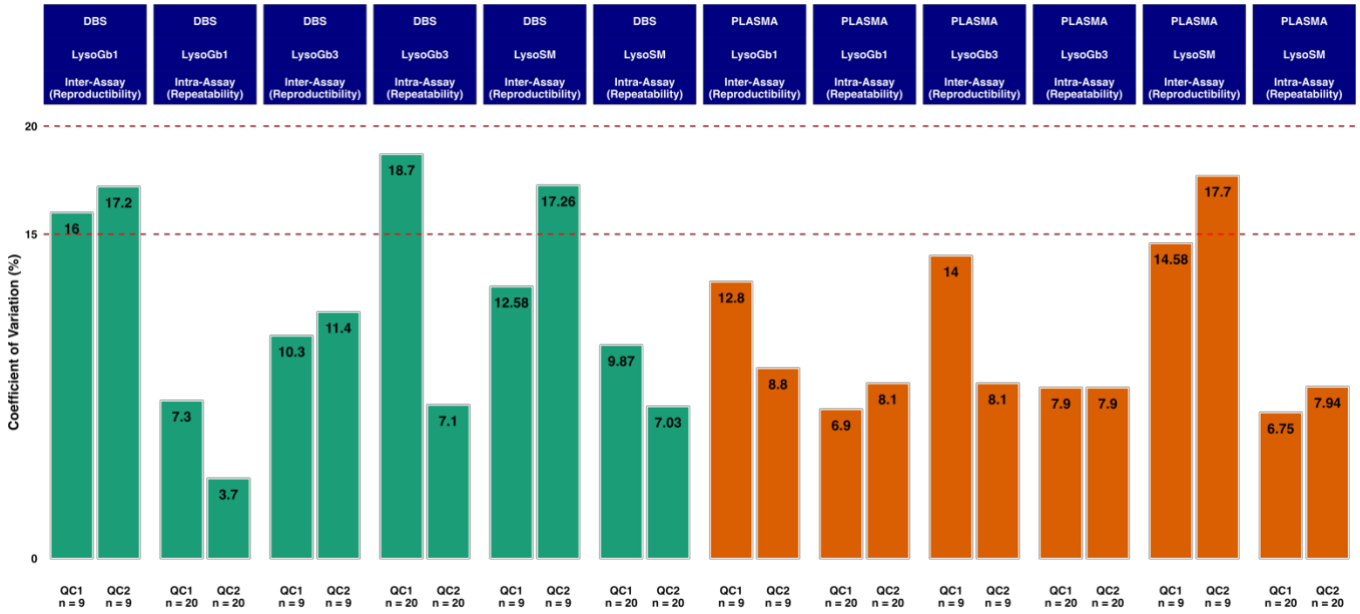


Figure 5. Inter-run and intra-run precision.

Regarding the stability, **Figure 6** summarizes the results of the stability of lysoGb1, lysoGb3, lysoSM, lysoSM509 at 4 °C. Samples were considered stable if their bias was below 15%. Samples were stable for 72h in the autosampler injector at +4 °C. No carry-over was detected between the injections.

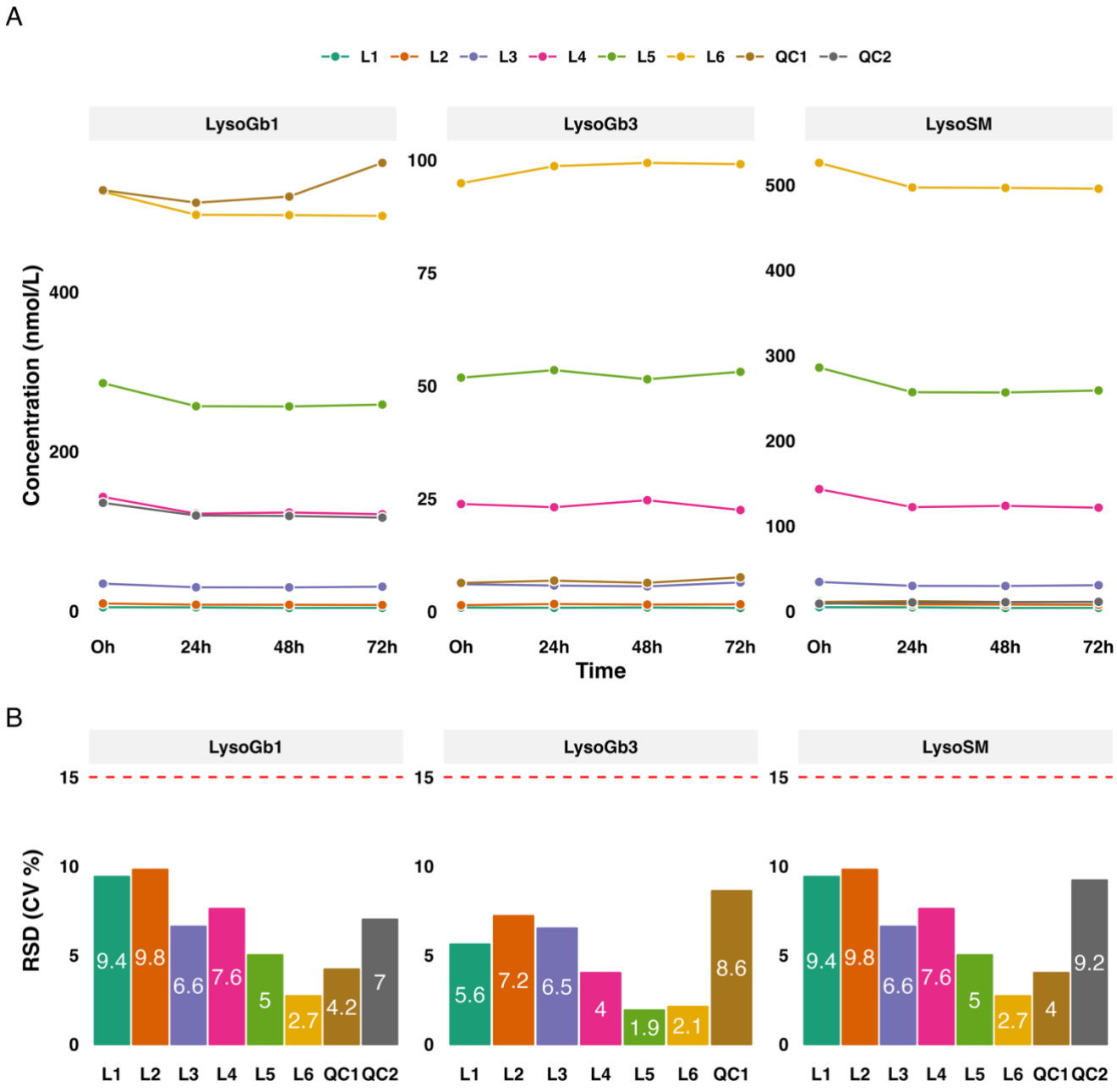


Figure 6. Stability results for up to 3 days at 24°C. A) Concentration variation over time. B) Relative standard deviation (Coefficient of variation) for each analyte and concentration level.

3.2. Reference cut-off

Gaussian distribution was achieved and verified. The exclusion of the outliers resulted in 100 remaining samples. The cut-off was defined as the 99th percentile. Thus the cut-off are defined as follows : LysoGb1 (DBS: 30 nmol/L, Plasma: 0.9 nmol/L), LysoGb3 (DBS: 3.1 nmol/L, Plasma: 0.4 nmol/L), LysoGM1 (DBS: 2.4 nmol/L, Plasma: 3.1 nmol/L), LysoGM2 (DBS: 1 nmol/L, Plasma: 1.9 nmol/L), LysoSM (DBS: 86.2 nmol/L, Plasma: 4.9

nmol/L), LysoSM509 (DBS: 100,1 nmol/L, Plasma: 11.2 nmol/L). DBS cut-offs are slightly higher in DBS compared to plasma.

3.3. Lysosphingolipids in healthy controls and patients with sphingolipidoses

The method was used to measure the levels of lysosphingolipids in a group of 30 control subjects and 110 patients with sphingolipidoses, including 49 with Gaucher disease, 60 with Fabry disease, and 1 with GM2. The results showed that each sphingolipidosis had a specific pattern of lysosphingolipids identified at different levels.

LysoGb3 was increased in all FD patients. The levels were higher in males and were at the intermediate in females (**Fig. 7**). LysoGb3 levels were measured in 28 DBS from Fabry patients, both treated and untreated males and females. A significant increase was found in males, while females showed a mild to moderate elevation. Treated patients showed lower LysoGb3 levels. LysoGb3 levels were also measured in 60 plasma samples from Fabry patients. Similar patterns were also observed compared to DBS data.

LysoGb1 levels were measured in 2 DBS from non-treated Gaucher patients. A significant increase was found. Plasma LysoGb1 levels were assessed in 49 plasma samples from Gaucher patients (20 treated and 29 non-treated). A clear elevation is observed in patients and lower levels in treated ones. We have also assessed the levels of lysosphingolipids in one GM2 gangliodisose that showed a clear elevation of lysoGM2.

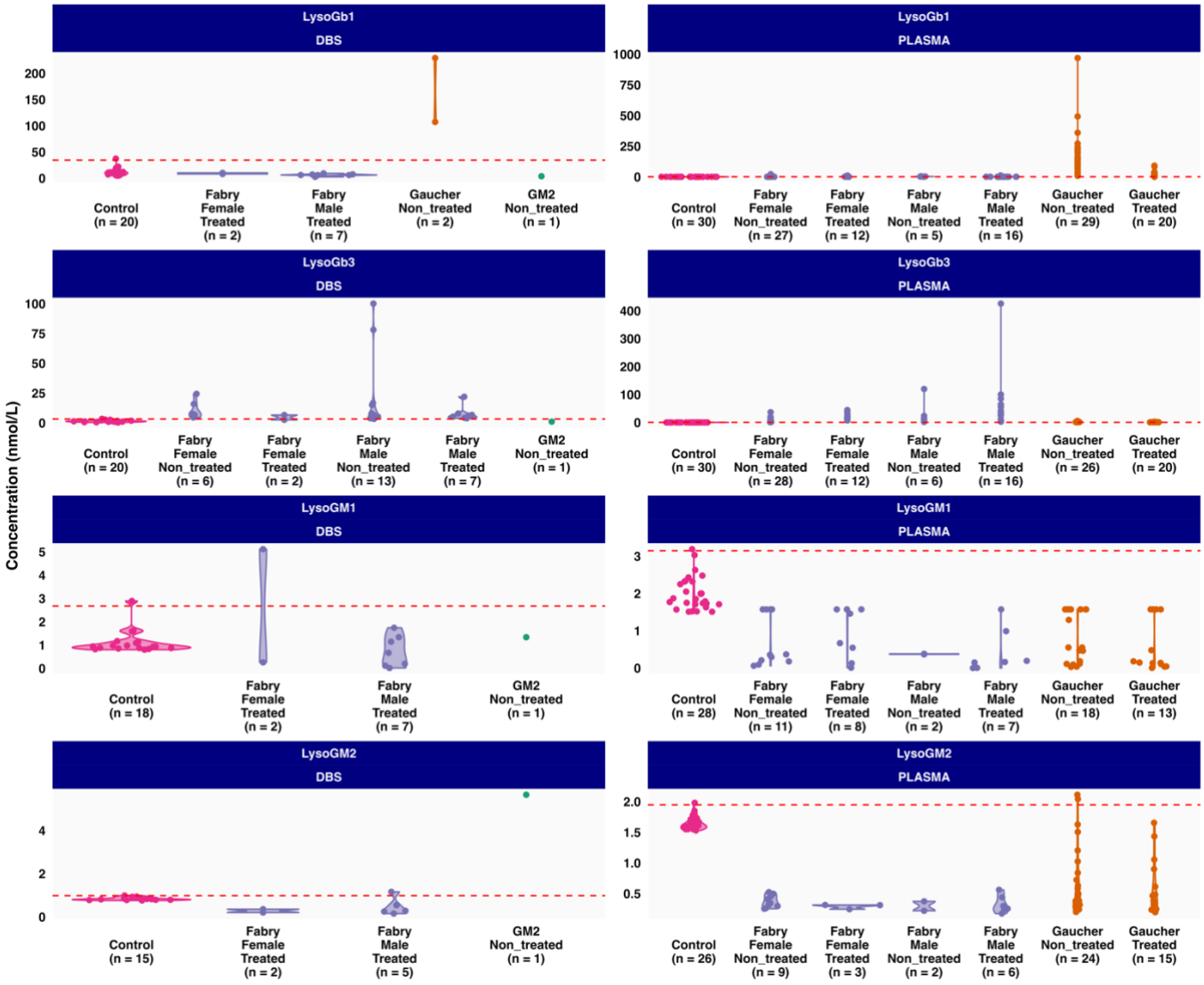


Figure 7. Overview of patient data in plasma and DBS samples.

4. Discussion

There are various markers that have been proposed to aid in the identification of multiple sphingolipidoses. We have developed a multiplex method to measure various lysosphingolipids in plasma to diagnose Fabry, Gaucher, Krabbe, GM1 and GM2 gangliodisosis, Niemann-Pick type A, B, and C diseases. Similar studies were performed by other groups in plasma [287-296], or DBS [289,294,297-302]. Despite differences in technical approaches, all studies suggest that quantifying lysosphingolipids is a valuable first-tier test for screening patients suspected of having sphingolipidoses. In this study, we present the simultaneous measurement of lysosphingolipids levels in two sample matrix types, DBS and plasma. The quantification of the lysosphingolipids levels was

performed by ultra-HPLC-MS/MS and capitalizes on the high-resolution mass spectrometry detection performances using a small volume of sample. Indeed, DBS is a sampling method that offers several advantages over conventional blood sampling. Firstly, it is relatively non-invasive, making it a more comfortable and convenient option for patients. Additionally, DBS requires minimal sample collection and processing, resulting in lower costs and reduced workload for healthcare providers. Moreover, the minimal pretreatment requirements for processing and shipment make it a valuable tool, especially in low-resource settings where access to laboratory facilities is limited The analytical performance both within and between assays was found to be satisfactory and consistently reliable for all the evaluated lysosphingolipids. In this study, we quantified the lysosphingolipids, including LysoGM1 and LysoGM2 in DBSs and plasma collected from controls (n = 30) and in patients affected by sphingolipidoses (n = 110 patients, 49 Gaucher, 60 Fabry, and 1 GM2). In general, the DBSs could clearly discriminate the controls from positive patients, similar with the plasma samples. These observations are consistent with previously reported studies [289,294,297-302]. The study measured the levels of LysoGb3 in a specific number of plates taken from both treated and untreated Fabry patients of both genders. The results showed a significant increase in LysoGb3 levels in males, while females showed a milder to moderate increase. However, treated patients had lower LysoGb3 levels. Additionally, 60 plasma samples from Fabry patients were also analyzed, and the patterns observed were similar to the DBS data.

Moreover, the study also measured the levels of LysoGb1 in a certain number of plates taken from non-treated Gaucher patients, and a significant increase was detected. Plasma LysoGb1 levels were also assessed in 49 plasma samples from Gaucher patients, where a clear elevation was observed in patients, with lower levels in treated ones. Furthermore, the study also assessed the levels of lysosphingolipids in one GM2 gangliodisose patient, where a clear elevation of lysoGM2 was detected. Enzyme replacement therapy (ERT) has been shown to be effective in treating Fabry Disease and Gaucher Disease, but it requires careful monitoring to ensure efficient therapy outcomes. One way to monitor ERT is by measuring the levels of LysoGb1 and LysoGb3, which are biomarkers that can indicate whether the therapy is having the desired effect. Traditionally, these measurements are taken from blood samples that are drawn in a clinical setting.

However, using DBS testing could allow patients to remotely monitor their condition, which would be more convenient and less invasive. DBS is currently used to test enzyme activity for lysosomal diseases in our laboratory and in various others worldwide. Adopting a tiered approach including enzymatic assay with the lysosphingolipids measurement could improve the diagnostic performance. To make DBS testing more useful for patients, it would be beneficial to align the DBS levels to currently used plasma equivalents for better clinical management. To conclude, the study has shown that using DBS analysis with a high-resolution mass spectrometry-based method is an effective way to measure lysosphingolipids. DBS is a useful matrix for screening sphingolipidoses and produces comparable results to plasma analysis.

Funding: The authors have nothing to declare.

Data Availability Statement: All the data that support the findings are presented in the manuscript and the supplementary material.

Conflicts of Interest: No conflict of interest to disclose.

5. References

[1] A.H. Merrill, Jr., Sphingolipid and Glycosphingolipid Metabolic Pathways in the Era of Sphingolipidomics, Chemical Reviews 111(10) (2011) 6387-6422.
[2] A. Laquerrière, S. Bekri, K. Suzuki, B.N. Harding, Sphingolipidoses and Related Disorders, Developmental Neuropathology (2018) 313-367.
[3] M. van Eijk, M.J. Ferraz, R.G. Boot, J. Aerts, Lyso-glycosphingolipids: presence and consequences, Essays Biochem 64(3) (2020) 565-578.
[4] J.L. Roberts, L. Whiley, N. Gray, M. Gay, N.G. Lawler, Advanced microsamples: Current applications and considerations for mass spectrometry-based metabolic phenotyping pipelines, Separations 9(7) (2022) 175.
[5] R.W. Welford, M. Garzotti, C. Marques Lourenco, E. Mengel, T. Marquardt, J. Reunert, Y. Amraoui, S.A. Kolb, O. Morand, P. Groenen, Plasma lysosphingomyelin demonstrates great potential as a diagnostic biomarker for Niemann-Pick disease type C in a retrospective study, PLoS One 9(12) (2014) e114669.
[6] M. Voorink-Moret, S.M.I. Goorden, A.B.P. van Kuilenburg, F.A. Wijburg, J.M.M. Ghauharali-van der Vlugt, F.S. Beers-Stet, A. Zoetekouw, W. Kulik, C.E.M. Hollak, F.M. Vaz, Rapid screening for lipid storage disorders using biochemical markers. Expert center data and review of the literature, Molecular genetics and metabolism 123(2) (2018) 76-84.
[7] G. Polo, A.P. Burlina, E. Ranieri, F. Colucci, L. Rubert, A. Pascarella, G. Duro, A. Tummolo, A. Padoan, M. Plebani, A.B. Burlina, Plasma and dried blood spot lysosphingolipids for the diagnosis of different sphingolipidoses: a comparative study, Clinical chemistry and laboratory medicine 57(12) (2019) 1863-1874.

[8] G. Polo, A.P. Burlina, T.B. Kolamunnage, M. Zampieri, C. Dionisi-Vici, P. Strisciuglio, M. Zaninotto, M. Plebani, A.B. Burlina, Diagnosis of sphingolipidoses: a new simultaneous measurement of lysosphingolipids by LC-MS/MS, Clinical chemistry and laboratory medicine 55(3) (2017) 403-414.
[9] M. Pettazzoni, R. Froissart, C. Pagan, M.T. Vanier, S. Ruet, P. Latour, N. Guffon, A. Fouilhoux, D.P. Germain, T. Levade, C. Vianey-Saban, M. Piraud, D. Cheillan, LC-MS/MS multiplex analysis of lysosphingolipids in plasma and amniotic fluid: A novel tool for the screening of sphingolipidoses and Niemann-Pick type C disease, PLoS One 12(7) (2017) e0181700.
[10] A. Perrone, S. Mohamed, V. Donadio, R. Liguori, M. Contin, A Rapid and Simple UHPLC-MS/MS Method for Quantification of Plasma Globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3), Molecules 26(23) (2021).
[11] M. Mirzaian, P. Wisse, M.J. Ferraz, A.R.A. Marques, P. Gaspar, S.V. Oussoren, K. Kytidou, J.D.C. Codee, G. van der Marel, H.S. Overkleeft, J.M. Aerts, Simultaneous quantitation of sphingoid bases by UPLC-ESI-MS/MS with identical (13)C-encoded internal standards, Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry 466 (2017) 178-184.
[12] S. Malvagia, L. Ferri, M. Della Bona, W. Borsini, C.L. Cirami, E. Dervishi, S. Feriozzi, S. Gasperini, S. Motta, R. Mignani, B. Trezzi, F. Pieruzzi, A. Morrone, M. Daniotti, M.A. Donati, G. la Marca, Multicenter evaluation of use of dried blood spot compared to conventional plasma in measurements of globotriaosylsphingosine (LysoGb3) concentration in 104 Fabry patients, Clinical chemistry and laboratory medicine 59(9) (2021) 1516-1526.
[13] F. Deodato, E. Procopio, A. Rampazzo, R. Taurisano, M.A. Donati, C. Dionisi-Vici, A. Caciotti, A. Morrone, M. Scarpa, The treatment of juvenile/adult GM1-gangliosidosis with Miglustat may reverse disease progression, Metab Brain Dis 32(5) (2017) 1529-1536.
[14] M. Boutin, R. Gagnon, P. Lavoie, C. Auray-Blais, LC-MS/MS analysis of plasma lyso-Gb3 in Fabry disease, Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry 414 (2012) 273-80.
[15] W.L. Chuang, J. Pacheco, S. Cooper, M.M. McGovern, G.F. Cox, J. Keutzer, X.K. Zhang, Lyso-sphingomyelin is elevated in dried blood spots of Niemann-Pick B patients, Molecular genetics and metabolism 111(2) (2014) 209-11.
[16] M.L. Escolar, B.T. Kiely, E. Shawgo, X. Hong, M.H. Gelb, J.J. Orsini, D. Matern, M.D. Poe, Psychosine, a marker of Krabbe phenotype and treatment effect, Molecular genetics and metabolism 121(3) (2017) 271-278.
[17] A.J. Guenzel, C.T. Turgeon, K.K. Nickander, A.L. White, D.S. Peck, G.B. Pino, A.L. Studinski, V.K. Prasad, J. Kurtzberg, M.L. Escolar, M.L.D. Lasio, J.E. Pellegrino, A. Sakonju, R.E. Hickey, N.M. Shallow, M.A. Ream, J.J. Orsini, M.H. Gelb, K. Raymond, D.K. Gavrilov, D. Oglesbee, P. Rinaldo, S. Tortorelli, D. Matern, The critical role of psychosine in screening, diagnosis, and monitoring of Krabbe disease, Genet Med 22(6) (2020) 1108-1118.
[18] J. Spiewak, I. Doykov, A. Papandreou, J. Hallqvist, P. Mills, P.T. Clayton, P. Gissen, K. Mills, W.E. Heywood, New Perspectives in Dried Blood Spot Biomarkers for Lysosomal Storage Diseases, Int J Mol Sci 24(12) (2023).
[19] C.T. Turgeon, J.J. Orsini, K.A. Sanders, M.J. Magera, T.J. Langan, M.L. Escolar, P. Duffner, D. Oglesbee, D. Gavrilov, S. Tortorelli, P. Rinaldo, K. Raymond, D. Matern, Measurement of psychosine in dried blood spots--a possible improvement to newborn screening programs for Krabbe disease, J Inherit Metab Dis 38(5) (2015) 923-9.
[20] A. Van Baelen, L. Roosens, S. Devos, S. Verhulst, F. Eyskens, A new multiplex analysis of glucosylsphingosine and globotriaosylsphingosine in dried blood spots by tandem mass spectrometry, Mol Genet Metab Rep 37 (2023) 100993.
[21] R.C. Team, R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing website, 2020.
1.

Conclusion et perspectives

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a permis d'explorer profondément des altérations métaboliques dans deux sphingolipidoses : la maladie de Gaucher et la maladie de Fabry. De nombreux questionnements découlent de ce travail et les perspectives de poursuite de ces recherches sont riches.

1. Perspectives directes

1.1. Exploration comparative Gaucher *vs* Fabry

Le premier axe serait de comparer via des analyses intégratives la maladie de Gaucher et la maladie de Fabry. De nombreuses similarités ont été observées dans ces deux pathologies telles que des altérations dans les concentrations de phosphatidylcholines avec un enrichissement en PUFA vs MUFA, un environnement inflammatoire particulier promouvant la néoangiogenèse ou des déséquilibres dans le métabolisme énergétique.
Les deux enzymes altérées dans ces maladies sont proches dans la voie métabolique de dégradation des sphingolipides, pourtant les présentations cliniques peuvent être très différentes.
La première étape serait d'utiliser les données générées au cours de ce travail pour effectuer une première comparaison. Les différences retrouvées pourraient nous orienter sur les particularités métaboliques propres à chacune. Cela permettrait également de mettre en évidence des physiopathologies communes. La deuxième étape serait d'utiliser les compétences acquises lors du développement de méthode analytique sur le spectromètre de masse à haute résolution (SMHR). Deux axes semblent possibles en utilisant la plateforme de chromatographie liquide couplée à la SMHR. Premièrement, il s'agirait de développer une méthode ciblée concernant des molécules qui n'ont pas été dosées pendant ce travail de thèse, mais qui pourraient fortement infirmer ou confirmer les hypothèses générées par l'analyse des résultats à la première étape. Deuxièmement, il serait envisageable d'exploiter la haute résolution de la plateforme pour réaliser une exploration non ciblée des échantillons restants (Gaucher, Fabry et Contrôles). Cependant, cet aspect

nécessitera au préalable de mettre au point une méthode non ciblée fiable. Il est possible que plusieurs méthodes soient nécessaires afin d'explorer au mieux les groupes de biomolécules d'intérêt ayant des propriétés physicochimiques différentes.

1.2. Consolidation par "bottom-up" approach

Pour le travail de cette thèse, il a été privilégié une approche « top-down ». Cette approche est efficace pour mettre en évidence des corrélations entre biomolécules d'intérêts et pour générer des hypothèses physiopathologiques. En revanche, la preuve causale de certaines altérations physiopathologiques dans le phénotype de la maladie est difficilement obtenue par ce genre d'étude. Cette preuve nécessite souvent des approches réductionnistes classiques ou « bottom-up ».

Dans un premier temps, il serait pertinent d'effectuer une approche ciblée pour doser les biomarqueurs spécifiques des mécanismes biologiques hypothétiquement altérés. Cette étape n'est possible que si de tels biomarqueurs existent et qu'ils soient dosables (idéalement dans le plasma).

Dans le cadre d'un autre travail de thèse, le laboratoire a obtenu et entretien des cellules de podocytes immortalisées dont le gène *GLA* a été inactivé par Crisp/Cas9 et servant de modèle pour la maladie de Fabry. Il serait donc possible de tester certaines des hypothèses générées sur la maladie de Fabry. Selon les résultats de ces premiers essais, il serait alors envisageable d'élargir à un modèle similaire pour la maladie de Gaucher.

Quelle que soit la question posée, le schéma expérimental suivrait alors le plan suivant :

- Explorations métabolomiques et protéomiques pour confirmer les profils obtenus précédemment en plasmatique et visualiser les différences propres au changement de milieu (plasma vs cellules en culture). Si possible, cette étape permettrait également de doser les marqueurs connus du mécanisme étudié.
- Incubation des cellules avec un agent perturbant le mécanisme biologique étudié. Cet agent peut être un inhibiteur ou un activateur.
- Explorations métabolomiques et protéomiques pour mettre en évidence l'effet de l'agent sur le métabolisme cellulaire

1.2.1. Suractivation de mTORC1

Les résultats de notre travail semblent pointer vers une l'implication de mTORC1 dans la physiopathologie des deux maladies étudiées et notamment sa suractivation. Le complexe mTORC1 est central dans la régulation de l'homéostasie énergétique cellulaire. Des travaux antérieurs ont montré qu'il pouvait être suractivé par l'action directe de certains lipides bioactifs dont le lyso-GB1. Une manière d'explorer cette hypothèse serait d'utiliser des inhibiteurs de la voie mTOR. Il existe deux complexes mTORC : mTORC1 et mTORC2. Il a été montré qu'un traitement aigu par la rapamycine pouvait inhiber sélectivement mTORC1 et dans un second temps mTORC2 en cas d'exposition prolongée [304].

Il semble donc possible de tenter une expérience où les cellules en culture soient exposées à la rapamycine pendant des durées croissantes afin de tenter de quantifier l'impact d'une inhibition d'abord sélective puis totale des complexes mTORC et d'observer les effets sur les cellules invalidées pour les gènes *GBA* ou *GLA* versus des cellules contrôles.

1.2.2. Stress oxydatif

Le stress oxydatif retrouvé chez les patients Fabry et Gaucher est très probablement multifactoriel. Afin de prouver la part de ce stress oxydatif dans le phénotype cellulaire, il serait tout d'abord intéressant d'incuber les cellules avec du glutathion ou un autre antioxydant [305]. Ensuite, il serait tentant de démontrer si la source principale de ce stress est les ROS générés par une dysfonction mitochondriale. Dans cette optique, l'usage de Metformine pourrait être testé. Même si les mécanismes d'action de cette molécule ne sont pas entièrement connus, il est démontré qu'elle agit sur la mitochondrie de manière dose dépendante. Une dose habituelle permet d'améliorer la fonction mitochondriale alors qu'une dose toxique entraine une diminution de la production d'ATP [306].

Il est à noter cependant que le glutathion, la metformine ou encore la N-acétyl-cystéine semblent entrainer également une inhibition sélective de mTORC1 [307]. Pour faire la distinction, il faudra probablement doser des marqueurs de stress oxydatifs comme la méthionine-sulfoxyde.

1.2.3. Dysfonction mitochondriale membranaire

Le stress induit par la supposée dysfonction membranaire mitochondriale est en partie dû à l'accumulation d'acylcarnitines qui sont toxiques pour la cellule. L'incubation de cellules

dans un environnement sans lipides peut déjà être un test intéressant pour apprécier si le profil des acylcarnitines reste perturbé. Dans un second temps, l'ajout d'acides gras à chaine moyenne (censés traverser spontanément les barrières mitochondriales) ou d'acides gras à longues chaines (dépendants de la navette carnitine) pourrait nous aider à vérifier si la dysfonction mitochondriale est en partie due à une dysfonction membranaire.

1.2.4. Déséquilibre immunitaire

Les perturbations du système immunitaire décrites lors de ce travail ne pourront probablement pas être approfondies par des approches réductionnistes. En effet, le système immunitaire est une entité complexe et dispersée au sein de l'organisme, avec des milliers d'états cellulaires existants en parallèle et interagissant au moyen de diverses voies de communication moléculaire. Il serait plus juste d'utiliser une approche systémique en se basant par exemple sur des modèles animaux [308].

1.3. Validation des biomarqueurs

1.3.1. LysoPC a C14:0

L'augmentation du lysoPC a C14 :0 dans notre population Gaucher est très significative. La première étape serait de confirmer son augmentation dans d'autres échantillons de patients atteints de la maladie de Gaucher qu'il soit d'un type 1 ou 2/3. Ensuite, il conviendrait d'évaluer la spécificité de ce potentiel biomarqueur et de comprendre le mécanisme physiopathologique sous-tendant son élévation. Pour cela, il serait pertinent de développer une méthode ciblée en spectrométrie de masse pour pouvoir le doser spécifiquement et à moindre cout dans des échantillons de patients atteints de maladie auto-immune chronique comme l'asthme, le psoriasis ou d'autres maladies associées à une inflammation chronique comme le syndrome métabolique ou la stéatose hépatique non alcoolique.

1.3.2. Ratio PUFA-PC / MUFA-PC

Ce travail de thèse permet de faire l'hypothèse que des altérations du ratio PUFA-PC/MUFA-PC puissent être un témoin du blocage de la synthèse des PC au sein du RE et donc indirectement du stress du RE. Une étude qui pourrait démontrer ce point devra probablement associer des méthodes de visualisation du RE ainsi que l'analyse du taux de

réponse du système UPR (Unfolded Protein Response). Toutefois, certaines pathologies ont été associées à un stress du RE. C'est le cas de certaines infections virales comme l'hépatite B, ou d'autres maladies comme le diabète ou la maladie d'Alzheimer. Certaines conditions pathologiques comme l'hypoxie peuvent également entrainer un stress du RE. Ainsi, une analyse préliminaire pourrait être d'évaluer le ratio PUFA-PC / MUFA-PC dans le plasma de patients ayant ces conditions.

1.3.3. FGF2

Le Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) a été retrouvé augmenté dans les plasmas de nos patients Fabry et dans une moindre mesure chez nos patients Gaucher. Le FGF2 est associé à l'angiogenèse médiée par l'inflammation. Il est également un facteur de mauvais pronostic dans certains cancers [309]. Il est tentant de proposer le FGF2 comme biomarqueurs du niveau d'activité de la maladie de Gaucher ou de Fabry. Pour répondre à cette question, il serait pertinent de doser le FGF2 ainsi que d'autres biomarqueurs d'évolutivité de la maladie dans plusieurs échantillons de patients à des temps différents de leur maladie (avant/après instauration d'un traitement, amélioration ou dégradation) dans une approche longitudinale. Etrangement, dans nos résultats les niveaux de FGF2 semblaient corrélés avec le lysoPC a C14 :0 pour la maladie de Gaucher.

1.4. Vers un "panel biochimique"

La démocratisation de l'accès à la spectrométrie de masse à haute résolution et à haut débit permet l'utilisation d'un minimum de volume d'échantillon. Il devient alors envisageable d'élaborer des panels biochimiques de la même manière que des panels génétiques ont été rendus possibles grâce au développement du NGS.

Dans le cadre élargi de ce travail de thèse, un tel panel est déjà en cours d'élaboration pour permettre une évaluation rapide et la plus exhaustive possible des biomarqueurs du métabolisme et des maladies héréditaires du métabolisme.

A moyen-long terme, la tendance pourrait se poursuivre à la généralisation de ce genre d'analyse dans d'autres domaines médicaux. La principale opposition à cette tendance vient du manque de reproductibilité des méthodes développées en dehors des conditions locales initiales [310]. Cette difficulté est encore plus accentuée pour les approches non ciblées. Un

effort important de standardisation des équipements de spectrométrie de masse, de chromatographie et de préparation est nécessaire pour endiguer cette limitation.

2. Perspectives générales

2.1. Poursuite du projet MetaLys

Le travail de cette thèse fait partie d'un projet global visant à explorer par des approches omiques les maladies lysosomales. Depuis son commencement, ce projet a permis de caractériser de manière extensive les altérations métaboliques des mucopolysaccharidoses de type I, III et VI ainsi que de certaines sphingolipidoses telles que la maladie de Gaucher et la maladie de Fabry.

Récemment, le laboratoire s'est doté d'un lecteur Olink Signature Q100 permettant de réaliser des explorations protéomiques à haut débit grâce à la technologie PEA (Proximity Extension Assay) d'Olink®. L'usage de cette technologie ainsi que la spectrométrie de masse Orbitrap devrait permettre d'explorer de manière plus approfondie les maladies lysosomales.

Dans un premier temps cependant, il serait pertinent d'utiliser ces nouvelles technologies pour explorer à nouveau les maladies déjà étudiées dans le cadre du projet MetaLys comme cela a été fait pour la maladie de Fabry où une première exploration standard en protéomique ciblée dont les résultats ont été publiés en 2020 a été suivie d'une exploration protéomique plus poussée grâce à la technologie Olink®.

En ce sens, le projet MetaLys nécessite un partenariat étroit avec les sociétés savantes (françaises ou non) afin de pouvoir accéder à des biobanques et des données phénotypiques de qualité. En effet, les maladies lysosomales étant des maladies parfois rarissimes, la principale difficulté rencontrée dans ce projet a été/est/sera de réunir suffisamment d'échantillons utilisables et de bonne qualité.

2.2. Généralisation

La métabolomique est encore une science omique jeune. Les nouvelles technologies de spectrométrie de masse haute résolution permettent à moindre cout de s'approcher de la masse exacte et ainsi de réduire drastiquement le travail d'annotations des pics d'intérêts. Malgré tout, le nombre de métabolites potentiels ayant une même masse exacte (m/z) peut

rester important et l'annotation peut encore être difficile. La chromatographie en phase liquide est facilement couplable à la spectrométrie de masse via une ESI (Electrospray Ionisation). Elle permet d'augmenter la résolution biochimique et la sensibilité (moins d'effet compétitif sur l'ESI) au prix d'un nouveau niveau de complexité.

Ces technologies évoluent à grande vitesse. Ainsi, en génétique, le séquençage ciblé en Sanger a été supplanté par les panels de gènes séquencer par NGS. Ces panels sont en train de disparaitre petit à petit au profit de l'exome qui est déjà en train de laisser la place au génome entier. Il n'est pas aberrant d'espérer une évolution similaire pour la métabolomique et la protéomique. Dans une de nos explorations de la maladie de Fabry nous avons ainsi utilisé une approche novatrice protéomique à haut débit basée sur la technologie Olink®.

La tendance sera probablement à la généralisation de ces technologiques permettant d'analyser un grand nombre de métabolites ou de protéines en même temps. Cette évolution peut s'associer d'une multiplication des entrepôts de données de santé, de cohortes « in silico » et de la constitution systématique de biobanques. Ainsi, de volumineuses banques de données phénotypiques et biologiques seraient en permanence alimentées par les examens multiomiques « de routine ». Ces bases de données peuvent ensuite être interrogées pour décider de la meilleure prise en charge pour un patient donné. Ainsi, il est tentant de penser qu'une approche big data puisse voir le jour prochainement. Un peu à la manière des GWAS (Genome Wide Association Studies) cette approche pourra capitaliser sur la quantité importante de descriptions phénotypiques et de données brutes de spectrométrie de masse haute résolution non ciblée pour identifier des altérations métabolomiques ou protéomiques spécifiques de certaines conditions pathologiques. Cette possibilité est centrale pour développer des approches plus personnalisées à chaque patient et permettre une meilleure prise en charge globale, telle que décrite dans la médecine de précision.

2.3. De la biologie des systèmes à la biologie prédictive

La haute complexité des systèmes biologiques pose un réel frein à l'élaboration de modèles déterministes. En l'état actuel des technologies d'analyse et des savoirs accumulés, les modèles constructibles ne sont que phénoménologiques. Ces modèles simulent les

comportements observés, mais pas les mécanismes causaux sous-jacents. L'exploration bibliographique des systèmes biologiques pour ce travail de thèse a permis de prendre conscience de ces limites actuelles. En effet, un modèle phénoménologique est très dépendant du contexte et ne permet pas toujours des prédictions fiables. Cependant, ces modèles constituent des outils très utiles pour pointer du doigt les probables mécanismes causaux sous-jacents. Ainsi, dans un second temps, les approches plus réductionnistes permettraient de mieux caractériser le mécanisme afin qu'il soit intégré au modèle. Il semble probable qu'avec la poursuite des gains technologiques et l'accumulation des données omiques, il devienne possible de construire des modèles mathématiques causaux qui possèderaient de bonnes capacités prédictives. Un tel modèle serait enrichi au fur et à mesure des explorations. Malheureusement, il est important de noter qu'en l'état actuel des standards, il est difficile de normaliser les données issues de recherche d'équipes différentes, or cette normalisation est essentielle pour enrichir un modèle commun.

3. Perspectives personnelles

3.1. Omiques et intélligence artificielle en médecine

3.1.1. Néonatologie

La néonatologie et la réanimation pédiatrique et néonatale constituent des environnements fortement générateurs de données. Les surveillances y sont intensives et les prises en charge en général bien protocolisées au niveau local (même si des différences significatives sont possibles entre chaque centre). L'installation du logiciel de dossier informatisé, surveillance et prescription ICCA de Philips dans le service à Rouen en 2017 représente clairement une avancée majeure par rapport aux dossiers et pancartes de surveillance papier.

Cette informatisation des données de manière organisée grâce à ICCA rend possible un travail de fouille de données « data mining » conséquent et automatisable. Les données issues de ce pipeline bio-informatif seraient de qualité suffisante pour répondre à de nombreux besoins. En effet, une analyse utilisant des modèles de langages performants permettrait d'extraire les informations contenues dans les textes médicaux et paramédicaux (qui soient structurés ou non) et qui seraient pertinentes pour répondre à la question posée. Ces appréciations textuelles peuvent être mises en relation avec les paramètres

physiologiques automatiquement relevés par le logiciel comme la fréquence cardiaque, la saturation. Cependant, le vrai potentiel réside dans la combinaison de ces données avec la création d'une biobanque permettant ainsi de relier les données phénotypiques à des profils métaboliques.

L'utilisation de l'intelligence artificielle (IA) dans la recherche biomédicale est déjà une réalité. Il est temps à présent de tenter d'exploiter les outils qui ont été développés pour améliorer la prise en charge des patients. Plusieurs projets d'IA en temps réel sont envisageables et possibles technologiquement avec pour but d'assister le médecin dans ses prises de décisions au lit du malade. En effet, l'environnement de réanimation néonatale est riche en situations à haut niveau d'incertitude où l'IA ajouterait un vrai plus.

Le CHU de Rouen et l'UFR Santé de Rouen soutiennent fortement un projet d'institut de médecine de précision. La généralisation des compétences acquises lors du travail de cette thèse pour la néonatologie est tout à fait en ligne avec les ambitions de ce futur institut.

3.1.2. Maladies héréditaires du métabolisme

Au-delà du projet MetaLys, les approches multi-omiques sont cruciales pour la recherche dans les maladies héréditaires du métabolisme. Ces prétendues maladies monogéniques présentent en fait des spectres d'expressions cliniques très variables en lien notamment avec le taux de l'activité résiduelle de l'enzyme atteinte. Les voies métaboliques atteintes étant bien souvent centrales dans le métabolisme à toutes les échelles de l'organisme, des déficits modérés peuvent participer dans la physiopathologie de maladies complexes chroniques. La généralisation du projet MetaLys à d'autres types de maladies héréditaires du métabolisme permettrait de mieux caractériser ses phénotypes complexes.

3.2. L'importance du retour au « touche à tout »

Le monde de la recherche (et même le monde en général) semble de plus en plus complexe. Les technologies évoluent et s'enchainent de plus en plus vite à tel point qu'il est difficile de suivre. La manière dont la communauté scientifique et la société en général tentent de s'adapter à cette fuite en avant marquera profondément la qualité de la recherche future. Pour le moment, la tendance générale semble à la surspécialisation. Cela semble logique, car la montée en complexité des sciences et des technologies impose nécessairement des

formations plus longues et un maintien des compétences plus complexe. A mon sens, ce phénomène traduit une possible limite des capacités humaines. Tout évolue trop vite pour l'évolution naturelle de notre cerveau à chaque génération. Cependant, si la surspécialisation permet la compétence, elle entraine nécessairement les mêmes travers que les approches réductionnistes en biologie expérimentale ; à savoir, un cloisonnement des compétences. Cette perte de communication efficace entre les différentes branches de la science ne peut qu'aboutir à des pertes conséquentes de temps et d'argent (temps et argent que nous n'avons bien souvent pas le luxe de gaspiller).

L'expérience de ce travail de thèse met en lumière ce travers. La biologie des systèmes impose une multidisciplinarité et expose donc les difficultés d'échange et de compréhension entre les différentes compétences. Pour aller jusqu'au bout du raisonnement, ce travail permet de formuler avec une certaine conviction que la science a besoin de personnes polyvalentes pour faciliter les échanges entre différentes disciplines scientifiques et biomédicales. Ces « hubs » comme on pourrait les appeler agissent comme des éléments à centralité haute (cf. théorie des graphes). Ils facilitent la transmission des informations, permettent la synchronisation des efforts et orientent le travail global de l'écosystème de recherche local. Cela permettrait au système de la recherche biomédicale d'être plus efficace tout en conservant la surspécialisation qui est indispensable.

Références bibliographiques

1. Krebs, H.A. The discovery of the ornithine cycle of urea synthesis. *Biochemical Education* **1973**, *1*, 19-23.
2. Krebs, H.A. The citric acid cycle: A reply to the criticisms of f. L. Breusch and of j. Thomas. *The Biochemical journal* **1940**, *34*, 460-463.
3. Judge, A.; Dodd, M.S. Metabolism. *Essays in biochemistry* **2020**, *64*, 607-647.
4. Chandel, N.S. Glycolysis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2021**, *13*.
5. Nunnari, J.; Suomalainen, A. Mitochondria: In sickness and in health. *Cell* **2012**, *148*, 1145-1159.
6. Schwarz, D.S.; Blower, M.D. The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 79-94.
7. Billman, G.E. Homeostasis: The underappreciated and far too often ignored central organizing principle of physiology. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 200.
8. Saudubray, J.M.; Garcia-Cazorla, A. Inborn errors of metabolism overview: Pathophysiology, manifestations, evaluation, and management. *Pediatr. Clin. North Am.* **2018**, *65*, 179-208.
9. Scriver, C.R. Garrod's croonian lectures (1908) and the charter 'inborn errors of metabolism': Albinism, alkaptonuria, cystinuria, and pentosuria at age 100 in 2008. *J Inherit Metab Dis* **2008**, *31*, 580-598.
10. Garrod, A. The incidence of alkaptonuria : A study in chemical individuality. *The Lancet* **1902**, *160*, 1616-1620.
11. Tada, K.; Buist, N.R.M.; Fernandes, J.; Saudubray, J.M.; van den Berghe, G. *Inborn metabolic diseases: Diagnosis and treatment*. Springer Berlin Heidelberg: Germany, 2013.
12. Aldenhoven, M.; Wynn, R.F.; Orchard, P.J.; O'Meara, A.; Veys, P.; Fischer, A.; Valayannopoulos, V.; Neven, B.; Rovelli, A.; Prasad, V.K. Long-term outcome of hurler syndrome patients after hematopoietic cell transplantation: An international multicenter study. *Blood* **2015**, *125*, 2164-2172.
13. Tomatsu, S.; Azario, I.; Sawamoto, K.; Pievani, A.S.; Biondi, A.; Serafini, M. Neonatal cellular and gene therapies for mucopolysaccharidoses: The earlier the better? *Journal of inherited metabolic disease* **2016**, *39*, 189-202.
14. Parenti, G.; Andria, G.; Ballabio, A. Lysosomal storage diseases: From pathophysiology to therapy. *Annual review of medicine* **2015**, *66*, 471-486.
15. Muenzer, J. Early initiation of enzyme replacement therapy for the mucopolysaccharidoses. *Mol. Genet. Metab.* **2014**, *111*, 63-72.
16. Beutler, E. Enzyme replacement in gaucher disease. *PLoS medicine* **2004**, *1*, e21.
17. Fan, J.Q.; Ishii, S.; Asano, N.; Suzuki, Y. Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase a in fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nature medicine* **1999**, *5*, 112-115.
18. Clancy, J.; BEBOK, Z.; Ruiz, F.; King, C.; Jones, J.; Walker, L.; Greer, H.; Hong, J.; Wing, L.; Macaluso, M. Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* **2001**, *163*, 1683-1692.
19. Kerem, E.; Hirawat, S.; Armoni, S.; Yaakov, Y.; Shoseyov, D.; Cohen, M.; Nissim-Rafinia, M.; Blau, H.; Rivlin, J.; Aviram, M. Effectiveness of ptc124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: A prospective phase ii trial. *The Lancet* **2008**, *372*, 719-727.
20. Muntau, A.C.; Leandro, J.; Staudigl, M.; Mayer, F.; Gersting, S.W. Innovative strategies to treat protein misfolding in inborn errors of metabolism: Pharmacological chaperones and proteostasis regulators. *Journal of inherited metabolic disease* **2014**, *37*, 505-523.
21. Morel, E.; Mehrpour, M.; Botti, J.; Dupont, N.; Hamaï, A.; Nascimbeni, A.C.; Codogno, P. Autophagy: A druggable process. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2017**, *57*, 375-398.
22. Haberle, J. Role of carglumic acid in the treatment of acute hyperammonemia due to n-acetylglutamate synthase deficiency. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2011**, *7*, 327-332.
23. Girard, M.; Douillard, C.; Debray, D.; Lacaille, F.; Schiff, M.; Vuillaumier-Barrot, S.; Dupre, T.; Fabre, M.; Damaj, L.; Kuster, A., *et al.* Long term outcome of mpi-cdg patients on d-mannose therapy. *J Inherit Metab Dis* **2020**, *43*, 1360-1369.

24. Harnett, M.M.; Pineda, M.A.; Latre de Late, P.; Eason, R.J.; Besteiro, S.; Harnett, W.; Langsley, G. From christian de duve to yoshinori ohsumi: More to autophagy than just dining at home. *Biomed J* **2017**, *40*, 9-22.
25. Fernandes, J. The history of the glycogen storage diseases. *Eur. J. Pediatr.* **1995**, *154*, 423-424.
26. Ballabio, A.; Bonifacino, J.S. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 101-118.
27. Xu, H.; Ren, D. Lysosomal physiology. *Annual review of physiology* **2015**, *77*, 57-80.
28. Barral, D.C.; Staiano, L.; Guimas Almeida, C.; Cutler, D.F.; Eden, E.R.; Futter, C.E.; Galione, A.; Marques, A.R.A.; Medina, D.L.; Napolitano, G., *et al.* Current methods to analyze lysosome morphology, positioning, motility and function. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **2022**, *23*, 238-269.
29. Coutinho, M.F.; Prata, M.J.; Alves, S. Mannose-6-phosphate pathway: A review on its role in lysosomal function and dysfunction. *Molecular genetics and metabolism* **2012**, *105*, 542-550.
30. Bajaj, L.; Lotfi, P.; Pal, R.; Ronza, A.D.; Sharma, J.; Sardiello, M. Lysosome biogenesis in health and disease. *J. Neurochem.* **2019**, *148*, 573-589.
31. Sardiello, M.; Palmieri, M.; di Ronza, A.; Medina, D.L.; Valenza, M.; Gennarino, V.A.; Di Malta, C.; Donaudy, F.; Embrione, V.; Polishchuk, R.S. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* **2009**, *325*, 473-477.
32. Plotegher, N.; Duchen, M.R. Crosstalk between lysosomes and mitochondria in parkinson's disease. *Front Cell Dev Biol* **2017**, *5*, 110.
33. Wong, Y.C.; Ysselstein, D.; Krainc, D. Mitochondria-lysosome contacts regulate mitochondrial fission via rab7 gtp hydrolysis. *Nature* **2018**, *554*, 382-386.
34. Saftig, P.; Puertollano, R. How lysosomes sense, integrate, and cope with stress. *Trends Biochem. Sci.* **2021**, *46*, 97-112.
35. Popovic, D.; Akutsu, M.; Novak, I.; Harper, J.W.; Behrends, C.; Dikic, I. Rab gtpase-activating proteins in autophagy: Regulation of endocytic and autophagy pathways by direct binding to human atg8 modifiers. *Mol Cell Biol* **2012**, *32*, 1733-1744.
36. Aderem, A.; Underhill, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **1999**, *17*, 593-623.
37. Baugh, M.; Black, D.; Westwood, P.; Kinghorn, E.; McGregor, K.; Bruin, J.; Hamilton, W.; Dempster, M.; Claxton, C.; Cai, J., *et al.* Therapeutic dosing of an orally active, selective cathepsin s inhibitor suppresses disease in models of autoimmunity. *J Autoimmun* **2011**, *36*, 201-209.
38. Rigante, D.; Cipolla, C.; Basile, U.; Gulli, F.; Savastano, M.C. Overview of immune abnormalities in lysosomal storage disorders. *Immunol. Lett.* **2017**, *188*, 79-85.
39. King, J.S. Autophagy across the eukaryotes: Is s. Cerevisiae the odd one out? *Autophagy* **2012**, *8*, 1159-1162.
40. Database, H.A. About autophagy. http://autophagy.lu/autophagy.html
41. Cox, T.M. Lysosomal diseases. In *Encyclopedia of cell biology*, 2023; pp 977-1028.
42. Mauvezin, C.; Neufeld, T.P. Bafilomycin a1 disrupts autophagic flux by inhibiting both v-atpase-dependent acidification and ca-p60a/serca-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* **2015**, *11*, 1437-1438.
43. Gropper, R.; Brandt, R.A.; Elias, S.; Bearer, C.F.; Mayer, A.; Schwartz, A.L.; Ciechanover, A. The ubiquitin-activating enzyme, e1, is required for stress-induced lysosomal degradation of cellular proteins. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266*, 3602-3610.
44. Puertollano, R. Mtor and lysosome regulation. *F1000Prime Reports* **2014**, *6*.
45. Coutinho, M.F.; Alves, S. From rare to common and back again: 60 years of lysosomal dysfunction. *Mol. Genet. Metab.* **2016**, *117*, 53-65.
46. Platt, F.M.; d'Azzo, A.; Davidson, B.L.; Neufeld, E.F.; Tifft, C.J. Lysosomal storage diseases. *Nat Rev Dis Primers* **2018**, *4*, 27.
47. Mechtler, T.P.; Stary, S.; Metz, T.F.; De Jesus, V.R.; Greber-Platzer, S.; Pollak, A.; Herkner, K.R.; Streubel, B.; Kasper, D.C. Neonatal screening for lysosomal storage disorders: Feasibility and incidence from a nationwide study in austria. *Lancet* **2012**, *379*, 335-341.
48. Poupetova, H.; Ledvinova, J.; Berna, L.; Dvorakova, L.; Kozich, V.; Elleder, M. The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the czech republic: Comparison with data in different populations. *J Inherit Metab Dis* **2010**, *33*, 387-396.

49. Walimbe, T.; Panitch, A. Proteoglycans in biomedicine: Resurgence of an underexploited class of ecm molecules. *Front Pharmacol* **2019**, *10*, 1661.
50. Cox, T.M.; Cachon-Gonzalez, M.B. The cellular pathology of lysosomal diseases. *J. Pathol.* **2012**, *226*, 241-254.
51. Manger, B.; Mengel, E.; Schaefer, R.M. Rheumatologic aspects of lysosomal storage diseases. *Clinical rheumatology* **2007**, *26*, 335-341.
52. Cimaz, R.; Coppa, G.V.; Koné-Paut, I.; Link, B.; Pastores, G.M.; Elorduy, M.R.; Spencer, C.; Thorne, C.; Wulffraat, N.; Manger, B. Joint contractures in the absence of inflammation may indicate mucopolysaccharidosis. *Pediatric Rheumatology* **2009**, *7*, 18.
53. Sévin, M.; Lesca, G.; Baumann, N.; Millat, G.; Lyon-Caen, O.; Vanier, M.T.; Sedel, F. The adult form of niemann–pick disease type c. *Brain* **2007**, *130*, 120-133.
54. Parenti, G.; Medina, D.L.; Ballabio, A. The rapidly evolving view of lysosomal storage diseases. *EMBO Molecular Medicine* **2021**, *13*.
55. Baldo, B.A. Enzymes approved for human therapy: Indications, mechanisms and adverse effects. *Biodrugs* **2015**, *29*, 31-55.
56. Coutinho, M.F.; Santos, J.I.; Alves, S. Less is more: Substrate reduction therapy for lysosomal storage disorders. *Int J Mol Sci* **2016**, *17*.
57. McCafferty, E.H.; Scott, L.J. Migalastat: A review in fabry disease. *Drugs* **2019**, *79*, 543-554.
58. Massaro, G.; Geard, A.F.; Liu, W.; Coombe-Tennant, O.; Waddington, S.N.; Baruteau, J.; Gissen, P.; Rahim, A.A. Gene therapy for lysosomal storage disorders: Ongoing studies and clinical development. *Biomolecules* **2021**, *11*.
59. Kuk, M.U.; Lee, Y.H.; Kim, J.W.; Hwang, S.Y.; Park, J.T.; Park, S.C. Potential treatment of lysosomal storage disease through modulation of the mitochondrial-lysosomal axis. *Cells* **2021**, *10*.
60. Fahy, E.; Sud, M.; Cotter, D.; Subramaniam, S. Lipid maps online tools for lipid research. *Nucleic acids research* **2007**, *35*, W606-612.
61. Chandel, N.S. Lipid metabolism. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2021**, *13*.
62. Harayama, T.; Riezman, H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 281-296.
63. Fahy, E.; Subramaniam, S.; Murphy, R.C.; Nishijima, M.; Raetz, C.R.; Shimizu, T.; Spener, F.; van Meer, G.; Wakelam, M.J.; Dennis, E.A. Update of the lipid maps comprehensive classification system for lipids. *Journal of lipid research* **2009**, *50 Suppl*, S9-14.
64. Raghu, P. Functional diversity in a lipidome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2020**, *117*, 11191-11193.
65. Yoon, H.; Shaw, J.L.; Haigis, M.C.; Greka, A. Lipid metabolism in sickness and in health: Emerging regulators of lipotoxicity. *Molecular cell* **2021**, *81*, 3708-3730.
66. Fagone, P.; Jackowski, S. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *Journal of lipid research* **2009**, *50 Suppl*, S311-316.
67. Eberle, D.; Hegarty, B.; Bossard, P.; Ferre, P.; Foufelle, F. Srebp transcription factors: Master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* **2004**, *86*, 839-848.
68. Mylonis, I.; Simos, G.; Paraskeva, E. Hypoxia-inducible factors and the regulation of lipid metabolism. *Cells* **2019**, *8*.
69. Beld, J.; Lee, D.J.; Burkart, M.D. Fatty acid biosynthesis revisited: Structure elucidation and metabolic engineering. *Mol Biosyst* **2015**, *11*, 38-59.
70. Jakobsson, A.; Westerberg, R.; Jacobsson, A. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Prog. Lipid Res.* **2006**, *45*, 237-249.
71. Cerqueira, N.M.; Oliveira, E.F.; Gesto, D.S.; Santos-Martins, D.; Moreira, C.; Moorthy, H.N.; Ramos, M.J.; Fernandes, P.A. Cholesterol biosynthesis: A mechanistic overview. *Biochemistry* **2016**, *55*, 5483-5506.
72. Houten, S.M.; Violante, S.; Ventura, F.V.; Wanders, R.J. The biochemistry and physiology of mitochondrial fatty acid beta-oxidation and its genetic disorders. *Annu. Rev. Physiol.* **2016**, *78*, 23-44.
73. Reddy, J.K.; Hashimoto, T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: An adaptive metabolic system. *Annu. Rev. Nutr.* **2001**, *21*, 193-230.
74. Cho, Y.K.; Lee, S.; Lee, J.; Doh, J.; Park, J.H.; Jung, Y.S.; Lee, Y.H. Lipid remodeling of adipose tissue in metabolic health and disease. *Experimental & molecular medicine* **2023**, *55*, 1955-1973.

75. O'Donnell, V.B. New appreciation for an old pathway: The lands cycle moves into new arenas in health and disease. *Biochem. Soc. Trans.* **2022**, *50*, 1-11.
76. Kazantzis, M.; Stahl, A. Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochimica et biophysica acta* **2012**, *1821*, 852-857.
77. Olzmann, J.A.; Carvalho, P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 137-155.
78. Fhu, C.W.; Ali, A. Protein lipidation by palmitoylation and myristoylation in cancer. *Front Cell Dev Biol* **2021**, *9*, 673647.
79. Leuti, A.; Fazio, D.; Fava, M.; Piccoli, A.; Oddi, S.; Maccarrone, M. Bioactive lipids, inflammation and chronic diseases. *Adv Drug Deliv Rev* **2020**, *159*, 133-169.
80. Hannun, Y.A.; Obeid, L.M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 175-191.
81. Chiurchiu, V.; Leuti, A.; Maccarrone, M. Bioactive lipids and chronic inflammation: Managing the fire within. *Frontiers in immunology* **2018**, *9*, 38.
82. Maceyka, M.; Spiegel, S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature* **2014**, *510*, 58-67.
83. Quinville, B.M.; Deschenes, N.M.; Ryckman, A.E.; Walia, J.S. A comprehensive review: Sphingolipid metabolism and implications of disruption in sphingolipid homeostasis. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*.
84. Al Sazzad, M.A.; Yasuda, T.; Murata, M.; Slotte, J.P. The long-chain sphingoid base of ceramides determines their propensity for lateral segregation. *Biophys. J.* **2017**, *112*, 976-983.
85. Hannun, Y.A.; Obeid, L.M. Many ceramides. *The Journal of biological chemistry* **2011**, *286*, 27855-27862.
86. Dutagaci, B.; Becker-Baldus, J.; Faraldo-Gomez, J.D.; Glaubitz, C. Ceramide-lipid interactions studied by md simulations and solid-state nmr. *Biochimica et biophysica acta* **2014**, *1838*, 2511-2519.
87. Mencarelli, C.; Martinez-Martinez, P. Ceramide function in the brain: When a slight tilt is enough. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2013**, *70*, 181-203.
88. Slotte, J.P. Biological functions of sphingomyelins. *Prog. Lipid Res.* **2013**, *52*, 424-437.
89. Pralhada Rao, R.; Vaidyanathan, N.; Rengasamy, M.; Mammen Oommen, A.; Somaiya, N.; Jagannath, M.R. Sphingolipid metabolic pathway: An overview of major roles played in human diseases. *J Lipids* **2013**, *2013*, 178910.
90. Barenholz, Y.; Thompson, T.E. Sphingomyelin: Biophysical aspects. *Chem Phys Lipids* **1999**, *102*, 29-34.
91. Lingwood, C.A. Glycosphingolipid functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*.
92. Schnaar, R.L.; Sandhoff, R.; Tiemeyer, M.; Kinoshita, T. Glycosphingolipids. In *Essentials of glycobiology*, 4th ed.; Varki, A.; Cummings, R.D.; Esko, J.D.; Stanley, P.; Hart, G.W.; Aebi, M.; Mohnen, D.; Kinoshita, T.; Packer, N.H.; Prestegard, J.H., *et al.*, Eds. Cold Spring Harbor (NY), 2022; pp 129-140.
93. Regina Todeschini, A.; Hakomori, S.I. Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains. *Biochimica et biophysica acta* **2008**, *1780*, 421-433.
94. Wigger, D.; Gulbins, E.; Kleuser, B.; Schumacher, F. Monitoring the sphingolipid de novo synthesis by stable-isotope labeling and liquid chromatography-mass spectrometry. *Front Cell Dev Biol* **2019**, *7*, 210.
95. Kitatani, K.; Idkowiak-Baldys, J.; Hannun, Y.A. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell. Signal.* **2008**, *20*, 1010-1018.
96. Hait, N.C.; Maiti, A. The role of sphingosine-1-phosphate and ceramide-1-phosphate in inflammation and cancer. *Mediators Inflamm.* **2017**, *2017*, 4806541.
97. Wang, J.; Chen, Y.L.; Li, Y.K.; Chen, D.K.; He, J.F.; Yao, N. Functions of sphingolipids in pathogenesis during host-pathogen interactions. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 701041.
98. Lee, M.; Lee, S.Y.; Bae, Y.S. Functional roles of sphingolipids in immunity and their implication in disease. *Experimental & molecular medicine* **2023**, *55*, 1110-1130.
99. Merrill, A.H., Jr. Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. *Chem Rev* **2011**, *111*, 6387-6422.
100. Ryckman, A.E.; Brockhausen, I.; Walia, J.S. Metabolism of glycosphingolipids and their role in the pathophysiology of lysosomal storage disorders. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*.
101. Sezgin, E.; Levental, I.; Mayor, S.; Eggeling, C. The mystery of membrane organization: Composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 361-374.
102. Pike, L.J. Lipid rafts: Heterogeneity on the high seas. *The Biochemical journal* **2004**, *378*, 281-292.
103. Schengrund, C.L. Gangliosides: Glycosphingolipids essential for normal neural development and function. *Trends Biochem. Sci.* **2015**, *40*, 397-406.

104. Yang, W.; Di Vizio, D.; Kirchner, M.; Steen, H.; Freeman, M.R. Proteome scale characterization of human s-acylated proteins in lipid raft-enriched and non-raft membranes. *Mol Cell Proteomics* **2010**, *9*, 54-70.
105. Waheed, A.A.; Freed, E.O. The role of lipids in retrovirus replication. *Viruses* **2010**, *2*, 1146-1180.
106. Yogi, A.; Callera, G.E.; Aranha, A.B.; Antunes, T.T.; Graham, D.; McBride, M.; Dominiczak, A.; Touyz, R.M. Sphingosine-1-phosphate-induced inflammation involves receptor tyrosine kinase transactivation in vascular cells: Upregulation in hypertension. *Hypertension* **2011**, *57*, 809-818.
107. Dragusin, M.; Wehner, S.; Kelly, S.; Wang, E.; Merrill, A.H., Jr.; Kalff, J.C.; van Echten-Deckert, G. Effects of sphingosine-1-phosphate and ceramide-1-phosphate on rat intestinal smooth muscle cells: Implications for postoperative ileus. *FASEB J.* **2006**, *20*, 1930-1932.
108. Hyde, C.A.; Missailidis, S. Inhibition of arachidonic acid metabolism and its implication on cell proliferation and tumour-angiogenesis. *Int. Immunopharmacol.* **2009**, *9*, 701-715.
109. Hla, T.; Venkataraman, K.; Michaud, J. The vascular s1p gradient-cellular sources and biological significance. *Biochimica et biophysica acta* **2008**, *1781*, 477-482.
110. Bryan, A.M.; Del Poeta, M. Sphingosine-1-phosphate receptors and innate immunity. *Cell. Microbiol.* **2018**, *20*, e12836.
111. Brinkmann, V.; Billich, A.; Baumruker, T.; Heining, P.; Schmouder, R.; Francis, G.; Aradhye, S.; Burtin, P. Fingolimod (fty720): Discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9*, 883-897.
112. Fettel, J.; Kuhn, B.; Guillen, N.A.; Surun, D.; Peters, M.; Bauer, R.; Angioni, C.; Geisslinger, G.; Schnutgen, F.; Meyer Zu Heringdorf, D., *et al.* Sphingosine-1-phosphate (s1p) induces potent anti-inflammatory effects in vitro and in vivo by s1p receptor 4-mediated suppression of 5-lipoxygenase activity. *FASEB J.* **2019**, *33*, 1711-1726.
113. Bodas, M.; Min, T.; Mazur, S.; Vij, N. Critical modifier role of membrane-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent ceramide signaling in lung injury and emphysema. *J Immunol* **2011**, *186*, 602-613.
114. Arsenault, E.J.; McGill, C.M.; Barth, B.M. Sphingolipids as regulators of neuro-inflammation and nadph oxidase 2. *Neuromolecular Med.* **2021**, *23*, 25-46.
115. Saddoughi, S.A.; Ogretmen, B. Diverse functions of ceramide in cancer cell death and proliferation. *Adv. Cancer Res.* **2013**, *117*, 37-58.
116. Czubowicz, K.; Jesko, H.; Wencel, P.; Lukiw, W.J.; Strosznajder, R.P. The role of ceramide and sphingosine-1-phosphate in alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 5436-5455.
117. Maceyka, M.; Sankala, H.; Hait, N.C.; Le Stunff, H.; Liu, H.; Toman, R.; Collier, C.; Zhang, M.; Satin, L.S.; Merrill, A.H., Jr., *et al.* Sphk1 and sphk2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *The Journal of biological chemistry* **2005**, *280*, 37118-37129.
118. Gangoiti, P.; Arana, L.; Ouro, A.; Granado, M.H.; Trueba, M.; Gomez-Munoz, A. Activation of mtor and rhoa is a major mechanism by which ceramide 1-phosphate stimulates macrophage proliferation. *Cell. Signal.* **2011**, *23*, 27-34.
119. Cavdarli, S.; Groux-Degroote, S.; Delannoy, P. Gangliosides: The double-edge sword of neuro-ectodermal derived tumors. *Biomolecules* **2019**, *9*.
120. Olsen, A.S.B.; Faergeman, N.J. Sphingolipids: Membrane microdomains in brain development, function and neurological diseases. *Open Biol* **2017**, *7*.
121. Sipione, S.; Monyror, J.; Galleguillos, D.; Steinberg, N.; Kadam, V. Gangliosides in the brain: Physiology, pathophysiology and therapeutic applications. *Front Neurosci* **2020**, *14*, 572965.
122. Dasgupta, S.; Ray, S.K. Diverse biological functions of sphingolipids in the cns: Ceramide and sphingosine regulate myelination in developing brain but stimulate demyelination during pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurol Psychol* **2017**, *5*.
123. Brown, G.R.; Hem, V.; Katz, K.S.; Ovetsky, M.; Wallin, C.; Ermolaeva, O.; Tolstoy, I.; Tatusova, T.; Pruitt, K.D.; Maglott, D.R., *et al.* Gene: A gene-centered information resource at ncbi. *Nucleic acids research* **2015**, *43*, D36-42.
124. Abed Rabbo, M.; Khodour, Y.; Kaguni, L.S.; Stiban, J. Sphingolipid lysosomal storage diseases: From bench to bedside. *Lipids in health and disease* **2021**, *20*, 44.
125. Schulze, H.; Sandhoff, K. Lysosomal lipid storage diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*.

126. Shaimardanova, A.A.; Solovyeva, V.V.; Issa, S.S.; Rizvanov, A.A. Gene therapy of sphingolipid metabolic disorders. *Int J Mol Sci* **2023**, *24*.
127. Miller, J.J.; Kanack, A.J.; Dahms, N.M. Progress in the understanding and treatment of fabry disease. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **2020**, *1864*, 129437.
128. Arends, M.; Wanner, C.; Hughes, D.; Mehta, A.; Oder, D.; Watkinson, O.T.; Elliott, P.M.; Linthorst, G.E.; Wijburg, F.A.; Biegstraaten, M., *et al.* Characterization of classical and nonclassical fabry disease: A multicenter study. *J Am Soc Nephrol* **2017**, *28*, 1631-1641.
129. Ortiz, A.; Germain, D.P.; Desnick, R.J.; Politei, J.; Mauer, M.; Burlina, A.; Eng, C.; Hopkin, R.J.; Laney, D.; Linhart, A., *et al.* Fabry disease revisited: Management and treatment recommendations for adult patients. *Molecular genetics and metabolism* **2018**, *123*, 416-427.
130. Germain, D.P. Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis* **2010**, *5*, 30.
131. Arends, M.; Hollak, C.E.M.; Biegstraaten, M. Quality of life in patients with fabry disease: A systematic review of the literature. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **2015**, *10*, 77.
132. Schiffmann, R.; Hughes, D.A.; Linthorst, G.E.; Ortiz, A.; Svarstad, E.; Warnock, D.G.; West, M.L.; Wanner, C.; Conference, P. Screening, diagnosis, and management of patients with fabry disease: Conclusions from a "kidney disease: Improving global outcomes" (kdigo) controversies conference. *Kidney Int.* **2017**, *91*, 284-293.
133. Lakoma, J.; Rimondini, R.; Ferrer Montiel, A.; Donadio, V.; Liguori, R.; Caprini, M. Increased expression of trpv1 in peripheral terminals mediates thermal nociception in fabry disease mouse model. *Mol. Pain* **2016**, *12*.
134. Miller, J.J.; Aoki, K.; Moehring, F.; Murphy, C.A.; O'Hara, C.L.; Tiemeyer, M.; Stucky, C.L.; Dahms, N.M. Neuropathic pain in a fabry disease rat model. *JCI Insight* **2018**, *3*.
135. Schumann, A.; Schaller, K.; Belche, V.; Cybulla, M.; Grunert, S.C.; Moers, N.; Sass, J.O.; Kaech, A.; Hannibal, L.; Spiekerkoetter, U. Defective lysosomal storage in fabry disease modifies mitochondrial structure, metabolism and turnover in renal epithelial cells. *J Inherit Metab Dis* **2021**, *44*, 1039-1050.
136. Consolato, F.; De Fusco, M.; Schaeffer, C.; Pieruzzi, F.; Scolari, F.; Gallieni, M.; Lanzani, C.; Feriozzi, S.; Rampoldi, L. Alpha-gal a missense variants associated with fabry disease can lead to er stress and induction of the unfolded protein response. *Mol Genet Metab Rep* **2022**, *33*, 100926.
137. Biancini, G.B.; Vanzin, C.S.; Rodrigues, D.B.; Deon, M.; Ribas, G.S.; Barschak, A.G.; Manfredini, V.; Netto, C.B.; Jardim, L.B.; Giugliani, R., *et al.* Globotriaosylceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in fabry patients treated with enzyme replacement therapy. *Biochimica et biophysica acta* **2012**, *1822*, 226-232.
138. Kang, J.J.; Kaissarian, N.M.; Desch, K.C.; Kelly, R.J.; Shu, L.; Bodary, P.F.; Shayman, J.A. Alpha-galactosidase a deficiency promotes von willebrand factor secretion in models of fabry disease. *Kidney Int.* **2019**, *95*, 149-159.
139. Squillaro, T.; Antonucci, I.; Alessio, N.; Esposito, A.; Cipollaro, M.; Melone, M.A.B.; Peluso, G.; Stuppia, L.; Galderisi, U. Impact of lysosomal storage disorders on biology of mesenchymal stem cells: Evidences from in vitro silencing of glucocerebrosidase (gba) and alpha-galactosidase a (gla) enzymes. *J. Cell. Physiol.* **2017**, *232*, 3454-3467.
140. Sanchez-Niño, M.D.; Carpio, D.; Sanz, A.B.; Ruiz-Ortega, M.; Mezzano, S.; Ortiz, A. Lyso-gb3 activates notch1 in human podocytes. *Human molecular genetics* **2015**, *24*, 5720-5732.
141. Choi, L.; Vernon, J.; Kopach, O.; Minett, M.S.; Mills, K.; Clayton, P.T.; Meert, T.; Wood, J.N. The fabry disease-associated lipid lyso-gb3 enhances voltage-gated calcium currents in sensory neurons and causes pain. *Neurosci. Lett.* **2015**, *594*, 163-168.
142. Cammarata, G.; Fatuzzo, P.; Rodolico, M.S.; Colomba, P.; Sicurella, L.; Iemolo, F.; Zizzo, C.; Alessandro, R.; Bartolotta, C.; Duro, G., *et al.* High variability of fabry disease manifestations in an extended italian family. *Biomed Res Int* **2015**, *2015*, 504784.
143. Mehta A, H.D., Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, . *Fabry disease*. 2023; Vol. GeneReviews® [Internet].
144. Germain, D.P.; Brand, E.; Burlina, A.; Cecchi, F.; Garman, S.C.; Kempf, J.; Laney, D.A.; Linhart, A.; Marodi, L.; Nicholls, K., *et al.* Phenotypic characteristics of the p.Asn215ser (p.N215s) gla mutation in male and female patients with fabry disease: A multicenter fabry registry study. *Mol Genet Genomic Med* **2018**, *6*, 492-503.
145. Bekri, S.; Enica, A.; Ghafari, T.; Plaza, G.; Champenois, I.; Choukroun, G.; Unwin, R.; Jaeger, P. Fabry disease in patients with end-stage renal failure: The potential benefits of screening. *Nephron Clinical Practice* **2005**, *101*, c33-c38.

146. Hwu, W.L.; Chien, Y.H.; Lee, N.C.; Chiang, S.C.; Dobrovolny, R.; Huang, A.C.; Yeh, H.Y.; Chao, M.C.; Lin, S.J.; Kitagawa, T., *et al.* Newborn screening for fabry disease in taiwan reveals a high incidence of the later-onset gla mutation c.936+919g>a (ivs4+919g>a). *Hum Mutat* **2009**, *30*, 1397-1405.
147. van der Tol, L.; Smid, B.E.; Poorthuis, B.J.; Biegstraaten, M.; Deprez, R.H.; Linthorst, G.E.; Hollak, C.E. A systematic review on screening for fabry disease: Prevalence of individuals with genetic variants of unknown significance. *Journal of medical genetics* **2014**, *51*, 1-9.
148. Felis, A.; Whitlow, M.; Kraus, A.; Warnock, D.G.; Wallace, E. Current and investigational therapeutics for fabry disease. *Kidney Int Rep* **2020**, *5*, 407-413.
149. van der Veen, S.J.; van Kuilenburg, A.B.P.; Hollak, C.E.M.; Kaijen, P.H.P.; Voorberg, J.; Langeveld, M. Antibodies against recombinant alpha-galactosidase a in fabry disease: Subclass analysis and impact on response to treatment. *Molecular genetics and metabolism* **2019**, *126*, 162-168.
150. Biegstraaten, M.; Arngrimsson, R.; Barbey, F.; Boks, L.; Cecchi, F.; Deegan, P.B.; Feldt-Rasmussen, U.; Geberhiwot, T.; Germain, D.P.; Hendriksz, C., *et al.* Recommendations for initiation and cessation of enzyme replacement therapy in patients with fabry disease: The european fabry working group consensus document. *Orphanet J Rare Dis* **2015**, *10*, 36.
151. Schiffmann, R.; Goker-Alpan, O.; Holida, M.; Giraldo, P.; Barisoni, L.; Colvin, R.B.; Jennette, C.J.; Maegawa, G.; Boyadjiev, S.A.; Gonzalez, D., *et al.* Pegunigalsidase alfa, a novel pegylated enzyme replacement therapy for fabry disease, provides sustained plasma concentrations and favorable pharmacodynamics: A 1-year phase 1/2 clinical trial. *J Inherit Metab Dis* **2019**, *42*, 534-544.
152. Germain, D.P.; Hughes, D.A.; Nicholls, K.; Bichet, D.G.; Giugliani, R.; Wilcox, W.R.; Feliciani, C.; Shankar, S.P.; Ezgu, F.; Amartino, H., *et al.* Treatment of fabry's disease with the pharmacologic chaperone migalastat. *The New England journal of medicine* **2016**, *375*, 545-555.
153. Feldt-Rasmussen, U.; Hughes, D.; Sunder-Plassmann, G.; Shankar, S.; Nedd, K.; Olivotto, I.; Ortiz, D.; Ohashi, T.; Hamazaki, T.; Skuban, N., *et al.* Long-term efficacy and safety of migalastat treatment in fabry disease: 30-month results from the open-label extension of the randomized, phase 3 attract study. *Molecular genetics and metabolism* **2020**, *131*, 219-228.
154. Guerard, N.; Oder, D.; Nordbeck, P.; Zwingelstein, C.; Morand, O.; Welford, R.W.D.; Dingemanse, J.; Wanner, C. Lucerastat, an iminosugar for substrate reduction therapy: Tolerability, pharmacodynamics, and pharmacokinetics in patients with fabry disease on enzyme replacement. *Clinical pharmacology and therapeutics* **2018**, *103*, 703-711.
155. Deegan, P.B.; Goker-Alpan, O.; Geberhiwot, T.; Hopkin, R.J.; Lukina, E.; Tylki-Szymanska, A.; Zaher, A.; Sensinger, C.; Gaemers, S.J.M.; Modur, V., *et al.* Venglustat, an orally administered glucosylceramide synthase inhibitor: Assessment over 3 years in adult males with classic fabry disease in an open-label phase 2 study and its extension study. *Molecular genetics and metabolism* **2023**, *138*, 106963.
156. Koprivica, V.; Stone, D.L.; Park, J.K.; Callahan, M.; Frisch, A.; Cohen, I.J.; Tayebi, N.; Sidransky, E. Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 gaucher disease. *Am J Hum Genet* **2000**, *66*, 1777-1786.
157. Vaccaro, A.M.; Motta, M.; Tatti, M.; Scarpa, S.; Masuelli, L.; Bhat, M.; Vanier, M.T.; Tylki-Szymanska, A.; Salvioli, R. Saposin c mutations in gaucher disease patients resulting in lysosomal lipid accumulation, saposin c deficiency, but normal prosaposin processing and sorting. *Human molecular genetics* **2010**, *19*, 2987-2997.
158. Meikle, P.J.; Hopwood, J.J.; Clague, A.E.; Carey, W.F. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* **1999**, *281*, 249-254.
159. Poorthuis, B.J.; Wevers, R.A.; Kleijer, W.J.; Groener, J.E.; de Jong, J.G.; van Weely, S.; Niezen-Koning, K.E.; van Diggelen, O.P. The frequency of lysosomal storage diseases in the netherlands. *Hum. Genet.* **1999**, *105*, 151-156.
160. Stirnemann, J.; Belmatoug, N.; Camou, F.; Serratrice, C.; Froissart, R.; Caillaud, C.; Levade, T.; Astudillo, L.; Serratrice, J.; Brassier, A., *et al.* A review of gaucher disease pathophysiology, clinical presentation and treatments. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*.
161. Hughes, D.; Mikosch, P.; Belmatoug, N.; Carubbi, F.; Cox, T.; Goker-Alpan, O.; Kindmark, A.; Mistry, P.; Poll, L.; Weinreb, N., *et al.* Gaucher disease in bone: From pathophysiology to practice. *J. Bone Miner. Res.* **2019**, *34*, 996-1013.
162. Nair, S.; Branagan, A.R.; Liu, J.; Boddupalli, C.S.; Mistry, P.K.; Dhodapkar, M.V. Clonal immunoglobulin against lysolipids in the origin of myeloma. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 555-561.

163. Nair, S.; Bar, N.; Xu, M.L.; Dhodapkar, M.; Mistry, P.K. Glucosylsphingosine but not saposin c, is the target antigen in gaucher disease-associated gammopathy. *Molecular genetics and metabolism* **2020**, *129*, 286-291.
164. Arends, M.; van Dussen, L.; Biegstraaten, M.; Hollak, C.E. Malignancies and monoclonal gammopathy in gaucher disease; a systematic review of the literature. *Br J Haematol* **2013**, *161*, 832-842.
165. Rosenbloom, B.; Balwani, M.; Bronstein, J.M.; Kolodny, E.; Sathe, S.; Gwosdow, A.R.; Taylor, J.S.; Cole, J.A.; Zimran, A.; Weinreb, N.J. The incidence of parkinsonism in patients with type 1 gaucher disease: Data from the icgg gaucher registry. *Blood Cells Mol. Dis.* **2011**, *46*, 95-102.
166. Ryan, E.; Seehra, G.K.; Sidransky, E. Mutations, modifiers and epigenetics in gaucher disease: Blurred boundaries between simple and complex disorders. *Molecular genetics and metabolism* **2019**, *128*, 10-13.
167. Fredriksen, K.; Aivazidis, S.; Sharma, K.; Burbidge, K.J.; Pitcairn, C.; Zunke, F.; Gelyana, E.; Mazzulli, J.R. Pathological alpha-syn aggregation is mediated by glycosphingolipid chain length and the physiological state of alpha-syn in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2021**, *118*.
168. Zunke, F.; Moise, A.C.; Belur, N.R.; Gelyana, E.; Stojkovska, I.; Dzaferbegovic, H.; Toker, N.J.; Jeon, S.; Fredriksen, K.; Mazzulli, J.R. Reversible conformational conversion of alpha-synuclein into toxic assemblies by glucosylceramide. *Neuron* **2018**, *97*, 92-107 e110.
169. Mazzulli, J.R.; Zunke, F.; Tsunemi, T.; Toker, N.J.; Jeon, S.; Burbulla, L.F.; Patnaik, S.; Sidransky, E.; Marugan, J.J.; Sue, C.M., *et al.* Activation of beta-glucocerebrosidase reduces pathological alpha-synuclein and restores lysosomal function in parkinson's patient midbrain neurons. *J. Neurosci.* **2016**, *36*, 7693-7706.
170. Rockenstein, E.; Clarke, J.; Viel, C.; Panarello, N.; Treleaven, C.M.; Kim, C.; Spencer, B.; Adame, A.; Park, H.; Dodge, J.C., *et al.* Glucocerebrosidase modulates cognitive and motor activities in murine models of parkinson's disease. *Human molecular genetics* **2016**, *25*, 2645-2660.
171. de Fost, M.; Vom Dahl, S.; Weverling, G.J.; Brill, N.; Brett, S.; Haussinger, D.; Hollak, C.E. Increased incidence of cancer in adult gaucher disease in western europe. *Blood Cells Mol. Dis.* **2006**, *36*, 53-58.
172. Demuth, K.; Germain, D.P. Endothelial markers and homocysteine in patients with classic fabry disease. *Acta Paediatr Suppl* **2002**, *91*, 57-61.
173. Pastores GM, H.D., Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA. *Gaucher disease*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2023.: GeneReviews® [Internet], 2018.
174. Hannibal, L.; Siebert, M.; Basgalupp, S.; Vario, F.; Spiekerkoetter, U.; Blom, H.J. Hampered vitamin b12 metabolism in gaucher disease? *Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening* **2017**, *5*, 232640981769235.
175. Hruska, K.S.; LaMarca, M.E.; Scott, C.R.; Sidransky, E. Gaucher disease: Mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (gba). *Hum Mutat* **2008**, *29*, 567-583.
176. Abrahamov, A.; Elstein, D.; Gross-Tsur, V.; Farber, B.; Glaser, Y.; Hadas-Halpern, I.; Ronen, S.; Tafakjdi, M.; Horowitz, M.; Zimran, A. Gaucher's disease variant characterised by progressive calcification of heart valves and unique genotype. *Lancet* **1995**, *346*, 1000-1003.
177. Tylki-Szymanska, A.; Czartoryska, B.; Vanier, M.T.; Poorthuis, B.J.; Groener, J.A.; Lugowska, A.; Millat, G.; Vaccaro, A.M.; Jurkiewicz, E. Non-neuronopathic gaucher disease due to saposin c deficiency. *Clin Genet* **2007**, *72*, 538-542.
178. Boven, L.A.; van Meurs, M.; Boot, R.G.; Mehta, A.; Boon, L.; Aerts, J.M.; Laman, J.D. Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. *Am. J. Clin. Pathol.* **2004**, *122*, 359-369.
179. Chavez-Galan, L.; Olleros, M.L.; Vesin, D.; Garcia, I. Much more than m1 and m2 macrophages, there are also cd169(+) and tcr(+) macrophages. *Frontiers in immunology* **2015**, *6*, 263.
180. Reza, S.; Ugorski, M.; Suchanski, J. Glucosylceramide and galactosylceramide, small glycosphingolipids with significant impact on health and disease. *Glycobiology* **2021**, *31*, 1416-1434.
181. Mistry, P.K.; Liu, J.; Sun, L.; Chuang, W.L.; Yuen, T.; Yang, R.; Lu, P.; Zhang, K.; Li, J.; Keutzer, J., *et al.* Glucocerebrosidase 2 gene deletion rescues type 1 gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111*, 4934-4939.
182. Revel-Vilk, S.; Fuller, M.; Zimran, A. Value of glucosylsphingosine (lyso-gb1) as a biomarker in gaucher disease: A systematic literature review. *International journal of molecular sciences* **2020**, *21*, 7159.
183. Nair, S.; Branagan, A.R.; Liu, J.; Boddupalli, C.S.; Mistry, P.K.; Dhodapkar, M.V. Clonal immunoglobulin against lysolipids in the origin of myeloma. *N Engl J Med* **2016**, *374*, 555-561.

184. Pu, J.; Guardia, C.M.; Keren-Kaplan, T.; Bonifacino, J.S. Mechanisms and functions of lysosome positioning. *J Cell Sci* **2016**, *129*, 4329-4339.
185. Hou, X.; Watzlawik, J.O.; Fiesel, F.C.; Springer, W. Autophagy in parkinson's disease. *J Mol Biol* **2020**, *432*, 2651-2672.
186. Roh, J.; Subramanian, S.; Weinreb, N.J.; Kartha, R.V. Gaucher disease - more than just a rare lipid storage disease. *J. Mol. Med. (Berl.)* **2022**, *100*, 499-518.
187. Stepien, K.M.; Roncaroli, F.; Turton, N.; Hendriksz, C.J.; Roberts, M.; Heaton, R.A.; Hargreaves, I. Mechanisms of mitochondrial dysfunction in lysosomal storage disorders: A review. *Journal of Clinical Medicine* **2020**, *9*, 2596.
188. El-Beshlawy, A.; Tylki-Szymanska, A.; Vellodi, A.; Belmatoug, N.; Grabowski, G.A.; Kolodny, E.H.; Batista, J.L.; Cox, G.F.; Mistry, P.K. Long-term hematological, visceral, and growth outcomes in children with gaucher disease type 3 treated with imiglucerase in the international collaborative gaucher group gaucher registry. *Molecular genetics and metabolism* **2017**, *120*, 47-56.
189. Ben Turkia, H.; Gonzalez, D.E.; Barton, N.W.; Zimran, A.; Kabra, M.; Lukina, E.A.; Giraldo, P.; Kisinovsky, I.; Bavdekar, A.; Ben Dridi, M.F., *et al.* Velaglucerase alfa enzyme replacement therapy compared with imiglucerase in patients with gaucher disease. *Am. J. Hematol.* **2013**, *88*, 179-184.
190. Starzyk, K.; Richards, S.; Yee, J.; Smith, S.E.; Kingma, W. The long-term international safety experience of imiglucerase therapy for gaucher disease. *Molecular genetics and metabolism* **2007**, *90*, 157-163.
191. Wenstrup, R.J.; Kacena, K.A.; Kaplan, P.; Pastores, G.M.; Prakash-Cheng, A.; Zimran, A.; Hangartner, T.N. Effect of enzyme replacement therapy with imiglucerase on bmd in type 1 gaucher disease. *J. Bone Miner. Res.* **2007**, *22*, 119-126.
192. Charrow, J.; Scott, C.R. Long-term treatment outcomes in gaucher disease. *Am. J. Hematol.* **2015**, *90 Suppl 1*, S19-24.
193. Ficicioglu, C. Review of miglustat for clinical management in gaucher disease type 1. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2008**, *4*, 425-431.
194. Cox, T.M.; Drelichman, G.; Cravo, R.; Balwani, M.; Burrow, T.A.; Martins, A.M.; Lukina, E.; Rosenbloom, B.; Goker-Alpan, O.; Watman, N., *et al.* Eliglustat maintains long-term clinical stability in patients with gaucher disease type 1 stabilized on enzyme therapy. *Blood* **2017**, *129*, 2375-2383.
195. Charrow, J.; Fraga, C.; Gu, X.; Ida, H.; Longo, N.; Lukina, E.; Nonino, A.; Gaemers, S.J.M.; Jouvin, M.H.; Li, J., *et al.* Once- versus twice-daily dosing of eliglustat in adults with gaucher disease type 1: The phase 3, randomized, double-blind edge trial. *Molecular genetics and metabolism* **2018**, *123*, 347-356.
196. Balwani, M.; Burrow, T.A.; Charrow, J.; Goker-Alpan, O.; Kaplan, P.; Kishnani, P.S.; Mistry, P.; Ruskin, J.; Weinreb, N. Recommendations for the use of eliglustat in the treatment of adults with gaucher disease type 1 in the united states. *Molecular genetics and metabolism* **2016**, *117*, 95-103.
197. Kojima, S.; Blair, D.F. The bacterial flagellar motor: Structure and function of a complex molecular machine. *Int. Rev. Cytol.* **2004**, *233*, 93-134.
198. Wanjek, C. Systems biology as defined by nih. *The NIH catalyst* **2022**, *19*.
199. Ahn, A.C.; Tewari, M.; Poon, C.S.; Phillips, R.S. The limits of reductionism in medicine: Could systems biology offer an alternative? *PLoS medicine* **2006**, *3*, e208.
200. Maggiora, G.M. The reductionist paradox: Are the laws of chemistry and physics sufficient for the discovery of new drugs? *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2011**, *25*, 699-708.
201. Lazebnik, Y. Can a biologist fix a radio?--or, what i learned while studying apoptosis. *Cancer Cell* **2002**, *2*, 179-182.
202. Brigandt, I.a.L., Alan. *Reductionism in biology*. Summer 2023 ed.; Metaphysics Research Lab, Stanford University: 2023.
203. Van Regenmortel, M.H. Reductionism and complexity in molecular biology. Scientists now have the tools to unravel biological and overcome the limitations of reductionism. *EMBO Rep* **2004**, *5*, 1016-1020.
204. Ferrell, J.E., Jr. Bistability, bifurcations, and waddington's epigenetic landscape. *Curr. Biol.* **2012**, *22*, R458-466.
205. Balazsi, G.; van Oudenaarden, A.; Collins, J.J. Cellular decision making and biological noise: From microbes to mammals. *Cell* **2011**, *144*, 910-925.
206. Ilan, Y. Making use of noise in biological systems. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2023**, *178*, 83-90.

207. Tebani, A.; Afonso, C.; Marret, S.; Bekri, S. Omics-based strategies in precision medicine: Toward a paradigm shift in inborn errors of metabolism investigations. *International journal of molecular sciences* **2016**, *17*, 1555.
208. Kurakin, A. The self-organizing fractal theory as a universal discovery method: The phenomenon of life. *Theor. Biol. Med. Model.* **2011**, *8*, 4.
209. Tebani, A.; Bekri, S. Les promesses des sciences omiques à l'ère de la médecine de précision. *La Revue de Médecine Interne* **2022**.
210. Wu, S.; Chen, D.; Snyder, M.P. Network biology bridges the gaps between quantitative genetics and multi-omics to map complex diseases. *Current Opinion in Chemical Biology* **2022**, *66*, 102101.
211. Marshall, J.L.; Peshkin, B.N.; Yoshino, T.; Vowinckel, J.; Danielsen, H.E.; Melino, G.; Tsamardinos, I.; Haudenschild, C.; Kerr, D.J.; Sampaio, C., *et al.* The essentials of multiomics. *The Oncologist* **2022**, *27*, 272-284.
212. Wilson, R.J. Introduction to graph theory. *Academic Press* **1979**.
213. Adler, M.; Medzhitov, R. Emergence of dynamic properties in network hypermotifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2022**, *119*, e2204967119.
214. Mistry, P.K.; Lopez, G.; Schiffmann, R.; Barton, N.W.; Weinreb, N.J.; Sidransky, E. Gaucher disease: Progress and ongoing challenges. *Molecular genetics and metabolism* **2017**, *120*, 8-21.
215. Revel-Vilk, S.; Fuller, M.; Zimran, A. Value of glucosylsphingosine (lyso-gb1) as a biomarker in gaucher disease: A systematic literature review. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*.
216. Sidransky, E. Gaucher disease: Insights from a rare mendelian disorder. *Discov Med* **2012**, *14*, 273-281.
217. Neudorfer, O.; Giladi, N.; Elstein, D.; Abrahamov, A.; Turezkite, T.; Aghai, E.; Reches, A.; Bembi, B.; Zimran, A. Occurrence of parkinson's syndrome in type i gaucher disease. *Qjm* **1996**, *89*, 691-694.
218. Tayebi, N.; Callahan, M.; Madike, V.; Stubblefield, B.K.; Orvisky, E.; Krasnewich, D.; Fillano, J.J.; Sidransky, E. Gaucher disease and parkinsonism: A phenotypic and genotypic characterization. *Molecular genetics and metabolism* **2001**, *73*, 313-321.
219. Tayebi, N.; Walker, J.; Stubblefield, B.; Orvisky, E.; LaMarca, M.E.; Wong, K.; Rosenbaum, H.; Schiffmann, R.; Bembi, B.; Sidransky, E. Gaucher disease with parkinsonian manifestations: Does glucocerebrosidase deficiency contribute to a vulnerability to parkinsonism? *Molecular genetics and metabolism* **2003**, *79*, 104-109.
220. Nair, S.; Sng, J.; Boddupalli, C.S.; Seckinger, A.; Chesi, M.; Fulciniti, M.; Zhang, L.; Rauniyar, N.; Lopez, M.; Neparidze, N., *et al.* Antigen-mediated regulation in monoclonal gammopathies and myeloma. *JCI Insight* **2018**, *3*.
221. Cabukusta, B.; Neefjes, J. Mechanisms of lysosomal positioning and movement. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **2018**, *19*, 761-769.
222. Trevor Hastie, R.T., Balasubramanian Narasimhan, Gilbert Chu. Impute: Impute: Imputation for microarray data 2022.
223. Stacklies, W.; Redestig, H.; Scholz, M.; Walther, D.; Selbig, J. Pcamethods--a bioconductor package providing pca methods for incomplete data. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 1164-1167.
224. Ritchie, M.E.; Phipson, B.; Wu, D.; Hu, Y.; Law, C.W.; Shi, W.; Smyth, G.K. Limma powers differential expression analyses for rna-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* **2015**, *43*, e47.
225. Lopez de Frutos, L.; Almeida, F.; Murillo-Saich, J.; Conceicao, V.A.; Guma, M.; Queheberger, O.; Giraldo, P.; Miltenberger-Miltenyi, G. Serum phospholipid profile changes in gaucher disease and parkinson's disease. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*.
226. Wang, B.; Tontonoz, P. Phospholipid remodeling in physiology and disease. *Annual review of physiology* **2019**, *81*, 165-188.
227. Cole, L.K.; Vance, J.E.; Vance, D.E. Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochim Biophys Acta* **2012**, *1821*, 754-761.
228. Moessinger, C.; Klizaite, K.; Steinhagen, A.; Philippou-Massier, J.; Shevchenko, A.; Hoch, M.; Ejsing, C.S.; Thiele, C. Two different pathways of phosphatidylcholine synthesis, the kennedy pathway and the lands cycle, differentially regulate cellular triacylglycerol storage. *BMC Cell Biol* **2014**, *15*, 43.
229. Henneberry, A.L.; Wright, M.M.; McMaster, C.R. The major sites of cellular phospholipid synthesis and molecular determinants of fatty acid and lipid head group specificity. *Mol Biol Cell* **2002**, *13*, 3148-3161.

230. Petkevicius, K.; Virtue, S.; Bidault, G.; Jenkins, B.; Cubuk, C.; Morgantini, C.; Aouadi, M.; Dopazo, J.; Serlie, M.J.; Koulman, A., *et al.* Accelerated phosphatidylcholine turnover in macrophages promotes adipose tissue inflammation in obesity. *Elife* **2019**, *8*.
231. Vitner, E.B.; Platt, F.M.; Futerman, A.H. Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 20423-20427.
232. Dufort, F.J.; Gumina, M.R.; Ta, N.L.; Tao, Y.; Heyse, S.A.; Scott, D.A.; Richardson, A.D.; Seyfried, T.N.; Chiles, T.C. Glucose-dependent de novo lipogenesis in b lymphocytes: A requirement for atp-citrate lyase in lipopolysaccharide-induced differentiation. *J Biol Chem* **2014**, *289*, 7011-7024.
233. Miletic Vukajlovic, J.; Drakulic, D.; Pejic, S.; Ilic, T.V.; Stefanovic, A.; Petkovic, M.; Schiller, J. Increased plasma phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratios in patients with parkinson's disease. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2020**, *34*, e8595.
234. Rangel-Huerta, O.D.; Pastor-Villaescusa, B.; Gil, A. Are we close to defining a metabolomic signature of human obesity? A systematic review of metabolomics studies. *Metabolomics* **2019**, *15*.
235. Saito, K.; Gemma, A.; Tatsumi, K.; Hattori, N.; Ushiki, A.; Tsushima, K.; Saito, Y.; Abe, M.; Horimasu, Y.; Kashiwada, T., *et al.* Identification and characterization of lysophosphatidylcholine 14:0 as a biomarker for drug-induced lung disease. *Scientific Reports* **2022**, *12*.
236. Gonzalez-Granda, A.; Damms-Machado, A.; Basrai, M.; Bischoff, S. Changes in plasma acylcarnitine and lysophosphatidylcholine levels following a high-fructose diet: A targeted metabolomics study in healthy women. *Nutrients* **2018**, *10*, 1254.
237. Bhattacharyya, S.; Pence, L.; Yan, K.; Gill, P.; Luo, C.; Letzig, L.G.; Simpson, P.M.; Kearns, G.L.; Beger, R.D.; James, L.P. Targeted metabolomic profiling indicates structure-based perturbations in serum phospholipids in children with acetaminophen overdose. *Toxicol Rep* **2016**, *3*, 747-755.
238. Mills, C.D.; Kincaid, K.; Alt, J.M.; Heilman, M.J.; Hill, A.M. M-1/m-2 macrophages and the th1/th2 paradigm. *J Immunol* **2000**, *164*, 6166-6173.
239. Weng, W.C.; Huang, W.Y.; Tang, H.Y.; Cheng, M.L.; Chen, K.H. The differences of serum metabolites between patients with early-stage alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Front Neurol* **2019**, *10*, 1223.
240. Suliman, M.E.; Qureshi, A.R.; Stenvinkel, P.; Pecoits-Filho, R.; Barany, P.; Heimburger, O.; Anderstam, B.; Rodriguez Ayala, E.; Divino Filho, J.C.; Alvestrand, A., *et al.* Inflammation contributes to low plasma amino acid concentrations in patients with chronic kidney disease. *Am J Clin Nutr* **2005**, *82*, 342-349.
241. Tebani, A.; Mauhin, W.; Abily-Donval, L.; Lesueur, C.; Berger, M.G.; Nadjar, Y.; Berger, J.; Benveniste, O.; Lamari, F.; Laforêt, P., *et al.* A proteomics-based analysis reveals predictive biological patterns in fabry disease. *J Clin Med* **2020**, *9*.
242. Tan, Y.; Qiao, Y.; Chen, Z.; Liu, J.; Guo, Y.; Tran, T.; Tan, K.S.; Wang, D.Y.; Yan, Y. Fgf2, an immunomodulatory factor in asthma and chronic obstructive pulmonary disease (copd). *Front Cell Dev Biol* **2020**, *8*, 223.
243. Xie, Y.; Su, N.; Yang, J.; Tan, Q.; Huang, S.; Jin, M.; Ni, Z.; Zhang, B.; Zhang, D.; Luo, F., *et al.* Fgf/fgfr signaling in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2020**, *5*.
244. Keating, S.M.; Golub, E.T.; Nowicki, M.; Young, M.; Anastos, K.; Crystal, H.; Cohen, M.H.; Zhang, J.; Greenblatt, R.M.; Desai, S., *et al.* The effect of hiv infection and haart on inflammatory biomarkers in a population-based cohort of women. *AIDS* **2011**, *25*, 1823-1832.
245. Pandey, M.K.; Rani, R.; Zhang, W.; Setchell, K.; Grabowski, G.A. Immunological cell type characterization and th1–th17 cytokine production in a mouse model of gaucher disease. *Molecular Genetics and Metabolism* **2012**, *106*, 310-322.
246. van Breemen, M.J.; de Fost, M.; Voerman, J.S.; Laman, J.D.; Boot, R.G.; Maas, M.; Hollak, C.E.; Aerts, J.M.; Rezaee, F. Increased plasma macrophage inflammatory protein (mip)-1alpha and mip-1beta levels in type 1 gaucher disease. *Biochim Biophys Acta* **2007**, *1772*, 788-796.
247. Allen, M.J.; Myer, B.J.; Khokher, A.M.; Rushton, N.; Cox, T.M. Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of gaucher's disease: Increased release of interleukin-6 and interleukin-10. *QJM* **1997**, *90*, 19-25.
248. Mucci, J.M.; Cuello, M.F.; Kisinovsky, I.; Larroude, M.; Delpino, M.V.; Rozenfeld, P.A. Proinflammatory and proosteoclastogenic potential of peripheral blood mononuclear cells from gaucher patients: Implication for bone pathology. *Blood Cells Mol Dis* **2015**, *55*, 134-143.

249. Aflaki, E.; Moaven, N.; Borger, D.K.; Lopez, G.; Westbroek, W.; Chae, J.J.; Marugan, J.; Patnaik, S.; Maniwang, E.; Gonzalez, A.N., *et al.* Lysosomal storage and impaired autophagy lead to inflammasome activation in gaucher macrophages. *Aging Cell* **2016**, *15*, 77-88.
250. Aerts, J.; Kuo, C.L.; Lelieveld, L.T.; Boer, D.E.C.; van der Lienden, M.J.C.; Overkleeft, H.S.; Artola, M. Glycosphingolipids and lysosomal storage disorders as illustrated by gaucher disease. *Curr Opin Chem Biol* **2019**, *53*, 204-215.
251. Ottas, A.; Fishman, D.; Okas, T.L.; Kingo, K.; Soomets, U. The metabolic analysis of psoriasis identifies the associated metabolites while providing computational models for the monitoring of the disease. *Arch Dermatol Res* **2017**, *309*, 519-528.
252. Chan, T.C.; Hawkes, J.E.; Krueger, J.G. Interleukin 23 in the skin: Role in psoriasis pathogenesis and selective interleukin 23 blockade as treatment. *Ther Adv Chronic Dis* **2018**, *9*, 111-119.
253. Suzuki, S.; Kodera, Y.; Saito, T.; Fujimoto, K.; Momozono, A.; Hayashi, A.; Kamata, Y.; Shichiri, M. Methionine sulfoxides in serum proteins as potential clinical biomarkers of oxidative stress. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 38299.
254. Vanella, A.; Russo, A.; Acquaviva, R.; Campisi, A.; Di Giacomo, C.; Sorrenti, V.; Barcellona, M.L. L-propionyl-carnitine as superoxide scavenger, antioxidant, and DNA cleavage protector. *Cell Biology and Toxicology* **2000**, *16*, 99-104.
255. Jarrell, Z.R.; Smith, M.R.; Hu, X.; Orr, M.; Liu, K.H.; Quyyumi, A.A.; Jones, D.P.; Go, Y.-M. Plasma acylcarnitine levels increase with healthy aging. *Aging* **2020**, *12*, 13555-13570.
256. Bonnefont, J.P.; Djouadi, F.; Prip-Buus, C.; Gobin, S.; Munnich, A.; Bastin, J. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: Biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med* **2004**, *25*, 495-520.
257. Hubens, W.H.G.; Vallbona-Garcia, A.; de Coo, I.F.M.; van Tienen, F.H.J.; Webers, C.A.B.; Smeets, H.J.M.; Gorgels, T. Blood biomarkers for assessment of mitochondrial dysfunction: An expert review. *Mitochondrion* **2022**, *62*, 187-204.
258. Garrido-Pérez, N.; Vela-Sebastián, A.; López-Gallardo, E.; Emperador, S.; Iglesias, E.; Meade, P.; Jiménez-Mallebrera, C.; Montoya, J.; Bayona-Bafaluy, M.P.; Ruiz-Pesini, E. Oxidative phosphorylation dysfunction modifies the cell secretome. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, 3374.
259. Davis, O.B.; Shin, H.R.; Lim, C.Y.; Wu, E.Y.; Kukurugya, M.; Maher, C.F.; Perera, R.M.; Ordonez, M.P.; Zoncu, R. Npc1-mtorc1 signaling couples cholesterol sensing to organelle homeostasis and is a targetable pathway in niemann-pick type c. *Dev Cell* **2021**, *56*, 260-276 e267.
260. Brown, R.A.; Voit, A.; Srikanth, M.P.; Thayer, J.A.; Kingsbury, T.J.; Jacobson, M.A.; Lipinski, M.M.; Feldman, R.A.; Awad, O. Mtor hyperactivity mediates lysosomal dysfunction in gaucher's disease ipsc-neuronal cells. *Disease Models & Mechanisms* **2019**, *12*, dmm038596.
261. Ivanova, M.M.; Changsila, E.; Iaonou, C.; Goker-Alpan, O. Impaired autophagic and mitochondrial functions are partially restored by ert in gaucher and fabry diseases. *PLOS ONE* **2019**, *14*, e0210617.
262. Kinghorn, K.J.; Grönke, S.; Castillo-Quan, J.I.; Woodling, N.S.; Li, L.; Sirka, E.; Gegg, M.; Mills, K.; Hardy, J.; Bjedov, I., *et al.* Adrosophilamodel of neuronopathic gaucher disease demonstrates lysosomal-autophagic defects and altered mtor signalling and is functionally rescued by rapamycin. *The Journal of Neuroscience* **2016**, *36*, 11654-11670.
263. Linke, M.; Fritsch, S.D.; Sukhbaatar, N.; Hengstschläger, M.; Weichhart, T. <scp>mtorc</scp>1 and <scp>mtorc</scp>2 as regulators of cell metabolism in immunity. *FEBS Letters* **2017**, *591*, 3089-3103.
264. Kaluzna, M.; Trzeciak, I.; Ziemnicka, K.; Machaczka, M.; Ruchala, M. Endocrine and metabolic disorders in patients with gaucher disease type 1: A review. *Orphanet J Rare Dis* **2019**, *14*, 275.
265. Porstmann, T.; Santos, C.R.; Griffiths, B.; Cully, M.; Wu, M.; Leevers, S.; Griffiths, J.R.; Chung, Y.-L.; Schulze, A. Srebp activity is regulated by mtorc1 and contributes to akt-dependent cell growth. *Cell Metabolism* **2008**, *8*, 224-236.
266. Ecker, J.; Liebisch, G.; Englmaier, M.; Grandl, M.; Robenek, H.; Schmitz, G. Induction of fatty acid synthesis is a key requirement for phagocytic differentiation of human monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 7817-7822.
267. Jones, R.G.; Pearce, E.J. Mentoring immunity: Mtor signaling in the development and function of tissue-resident immune cells. *Immunity* **2017**, *46*, 730-742.
268. Pastor-Fernández, G.; Mariblanca, I.R.; Navarro, M.N. Decoding il-23 signaling cascade for new therapeutic opportunities. *Cells* **2020**, *9*, 2044.

269. Lau, M.-T.; So, W.-K.; Leung, P.C.K. Fibroblast growth factor 2 induces e-cadherin down-regulation via pi3k/akt/mtor and mapk/erk signaling in ovarian cancer cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e59083.
270. Dodd, K.M.; Yang, J.; Shen, M.H.; Sampson, J.R.; Tee, A.R. Mtorc1 drives hif-1alpha and vegf-a signalling via multiple mechanisms involving 4e-bp1, s6k1 and stat3. *Oncogene* **2015**, *34*, 2239-2250.
271. Wang, S.; Lu, J.; You, Q.; Huang, H.; Chen, Y.; Liu, K. The mtor/ap-1/vegf signaling pathway regulates vascular endothelial cell growth. *Oncotarget* **2016**, *7*, 53269-53276.
272. Buerger, C. Epidermal mtorc1 signaling contributes to the pathogenesis of psoriasis and could serve as a therapeutic target. *Front Immunol* **2018**, *9*, 2786.
273. Zhang, Y.; Jing, Y.; Qiao, J.; Luan, B.; Wang, X.; Wang, L.; Song, Z. Activation of the mtor signaling pathway is required for asthma onset. *Scientific Reports* **2017**, *7*.
274. Yang, H.; Jiang, X.; Li, B.; Yang, H.J.; Miller, M.; Yang, A.; Dhar, A.; Pavletich, N.P. Mechanisms of mtorc1 activation by rheb and inhibition by pras40. *Nature* **2017**, *552*, 368-373.
275. Rahbek-Clemmensen, T.; Bay, T.; Eriksen, J.; Gether, U.; Jørgensen, T.N. The serotonin transporter undergoes constitutive internalization and is primarily sorted to late endosomes and lysosomal degradation. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289*, 23004-23019.
276. Liu, N.; Sun, S.; Wang, P.; Sun, Y.; Hu, Q.; Wang, X. The mechanism of secretion and metabolism of gut-derived 5-hydroxytryptamine. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 7931.
277. Moors, T.E.; Hoozemans, J.J.M.; Ingrassia, A.; Beccari, T.; Parnetti, L.; Chartier-Harlin, M.-C.; Van De Berg, W.D.J. Therapeutic potential of autophagy-enhancing agents in parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration* **2017**, *12*.
278. Srikanth, M.P.; Jones, J.W.; Kane, M.; Awad, O.; Park, T.S.; Zambidis, E.T.; Feldman, R.A. Elevated glucosylsphingosine in gaucher disease induced pluripotent stem cell neurons deregulates lysosomal compartment through mammalian target of rapamycin complex 1. *Stem Cells Translational Medicine* **2021**, *10*, 1081-1094.
279. Sohal, P.S.; Cornell, R.B. Sphingosine inhibits the activity of rat liver ctp:Phosphocholine cytidylyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **1990**, *265*, 11746-11750.
280. Law, S.-H.; Chan, M.-L.; Marathe, G.K.; Parveen, F.; Chen, C.-H.; Ke, L.-Y. An updated review of lysophosphatidylcholine metabolism in human diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 1149.
281. Wen, Z.-H.; Su, Y.-C.; Lai, P.-L.; Zhang, Y.; Xu, Y.-F.; Zhao, A.; Yao, G.-Y.; Jia, C.-H.; Lin, J.; Xu, S., *et al.* Critical role of arachidonic acid-activated mtor signaling in breast carcinogenesis and angiogenesis. *Oncogene* **2013**, *32*, 160-170.
282. Wang, B.; Wu, L.; Chen, J.; Dong, L.; Chen, C.; Wen, Z.; Hu, J.; Fleming, I.; Wang, D.W. Metabolism pathways of arachidonic acids: Mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2021**, *6*.
283. Merrill, A.H., Jr. Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. *Chemical Reviews* **2011**, *111*, 6387-6422.
284. Laquerrière, A.; Bekri, S.; Suzuki, K.; Harding, B.N. Sphingolipidoses and related disorders. *Developmental Neuropathology* **2018**, 313-367.
285. van Eijk, M.; Ferraz, M.J.; Boot, R.G.; Aerts, J. Lyso-glycosphingolipids: Presence and consequences. *Essays Biochem* **2020**, *64*, 565-578.
286. Roberts, J.L.; Whiley, L.; Gray, N.; Gay, M.; Lawler, N.G. Advanced microsamples: Current applications and considerations for mass spectrometry-based metabolic phenotyping pipelines. *Separations* **2022**, *9*, 175.
287. Welford, R.W.; Garzotti, M.; Marques Lourenco, C.; Mengel, E.; Marquardt, T.; Reunert, J.; Amraoui, Y.; Kolb, S.A.; Morand, O.; Groenen, P. Plasma lysosphingomyelin demonstrates great potential as a diagnostic biomarker for niemann-pick disease type c in a retrospective study. *PLoS One* **2014**, *9*, e114669.
288. Voorink-Moret, M.; Goorden, S.M.I.; van Kuilenburg, A.B.P.; Wijburg, F.A.; Ghauharali-van der Vlugt, J.M.M.; Beers-Stet, F.S.; Zoetekouw, A.; Kulik, W.; Hollak, C.E.M.; Vaz, F.M. Rapid screening for lipid storage disorders using biochemical markers. Expert center data and review of the literature. *Molecular genetics and metabolism* **2018**, *123*, 76-84.
289. Polo, G.; Burlina, A.P.; Ranieri, E.; Colucci, F.; Rubert, L.; Pascarella, A.; Duro, G.; Tummolo, A.; Padoan, A.; Plebani, M., *et al.* Plasma and dried blood spot lysosphingolipids for the diagnosis of

different sphingolipidoses: A comparative study. *Clinical chemistry and laboratory medicine* **2019**, *57*, 1863-1874.
290. Polo, G.; Burlina, A.P.; Kolamunnage, T.B.; Zampieri, M.; Dionisi-Vici, C.; Strisciuglio, P.; Zaninotto, M.; Plebani, M.; Burlina, A.B. Diagnosis of sphingolipidoses: A new simultaneous measurement of lysosphingolipids by lc-ms/ms. *Clinical chemistry and laboratory medicine* **2017**, *55*, 403-414.
291. Pettazzoni, M.; Froissart, R.; Pagan, C.; Vanier, M.T.; Ruet, S.; Latour, P.; Guffon, N.; Fouilhoux, A.; Germain, D.P.; Levade, T., *et al.* Lc-ms/ms multiplex analysis of lysosphingolipids in plasma and amniotic fluid: A novel tool for the screening of sphingolipidoses and niemann-pick type c disease. *PLoS One* **2017**, *12*, e0181700.
292. Perrone, A.; Mohamed, S.; Donadio, V.; Liguori, R.; Contin, M. A rapid and simple uhplc-ms/ms method for quantification of plasma globotriaosylsphingosine (lyso-gb3). *Molecules* **2021**, *26*.
293. Mirzaian, M.; Wisse, P.; Ferraz, M.J.; Marques, A.R.A.; Gaspar, P.; Oussoren, S.V.; Kytidou, K.; Codee, J.D.C.; van der Marel, G.; Overkleeft, H.S., *et al.* Simultaneous quantitation of sphingoid bases by uplc-esi-ms/ms with identical (13)c-encoded internal standards. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **2017**, *466*, 178-184.
294. Malvagia, S.; Ferri, L.; Della Bona, M.; Borsini, W.; Cirami, C.L.; Dervishi, E.; Feriozzi, S.; Gasperini, S.; Motta, S.; Mignani, R., *et al.* Multicenter evaluation of use of dried blood spot compared to conventional plasma in measurements of globotriaosylsphingosine (lysogb3) concentration in 104 fabry patients. *Clinical chemistry and laboratory medicine* **2021**, *59*, 1516-1526.
295. Deodato, F.; Procopio, E.; Rampazzo, A.; Taurisano, R.; Donati, M.A.; Dionisi-Vici, C.; Caciotti, A.; Morrone, A.; Scarpa, M. The treatment of juvenile/adult gm1-gangliosidosis with miglustat may reverse disease progression. *Metab Brain Dis* **2017**, *32*, 1529-1536.
296. Boutin, M.; Gagnon, R.; Lavoie, P.; Auray-Blais, C. Lc-ms/ms analysis of plasma lyso-gb3 in fabry disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **2012**, *414*, 273-280.
297. Chuang, W.L.; Pacheco, J.; Cooper, S.; McGovern, M.M.; Cox, G.F.; Keutzer, J.; Zhang, X.K. Lyso-sphingomyelin is elevated in dried blood spots of niemann-pick b patients. *Molecular genetics and metabolism* **2014**, *111*, 209-211.
298. Escolar, M.L.; Kiely, B.T.; Shawgo, E.; Hong, X.; Gelb, M.H.; Orsini, J.J.; Matern, D.; Poe, M.D. Psychosine, a marker of krabbe phenotype and treatment effect. *Molecular genetics and metabolism* **2017**, *121*, 271-278.
299. Guenzel, A.J.; Turgeon, C.T.; Nickander, K.K.; White, A.L.; Peck, D.S.; Pino, G.B.; Studinski, A.L.; Prasad, V.K.; Kurtzberg, J.; Escolar, M.L., *et al.* The critical role of psychosine in screening, diagnosis, and monitoring of krabbe disease. *Genet Med* **2020**, *22*, 1108-1118.
300. Spiewak, J.; Doykov, I.; Papandreou, A.; Hallqvist, J.; Mills, P.; Clayton, P.T.; Gissen, P.; Mills, K.; Heywood, W.E. New perspectives in dried blood spot biomarkers for lysosomal storage diseases. *Int J Mol Sci* **2023**, *24*.
301. Turgeon, C.T.; Orsini, J.J.; Sanders, K.A.; Magera, M.J.; Langan, T.J.; Escolar, M.L.; Duffner, P.; Oglesbee, D.; Gavrilov, D.; Tortorelli, S., *et al.* Measurement of psychosine in dried blood spots--a possible improvement to newborn screening programs for krabbe disease. *J Inherit Metab Dis* **2015**, *38*, 923-929.
302. Van Baelen, A.; Roosens, L.; Devos, S.; Verhulst, S.; Eyskens, F. A new multiplex analysis of glucosylsphingosine and globotriaosylsphingosine in dried blood spots by tandem mass spectrometry. *Mol Genet Metab Rep* **2023**, *37*, 100993.
303. Team, R.C. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing website. 2020.
304. Dowling, R.J.; Topisirovic, I.; Fonseca, B.D.; Sonenberg, N. Dissecting the role of mtor: Lessons from mtor inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **2010**, *1804*, 433-439.
305. Poljsak, B. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2011**, *2011*, 1-15.
306. Wang, Y.; An, H.; Liu, T.; Qin, C.; Sesaki, H.; Guo, S.; Radovick, S.; Hussain, M.; Maheshwari, A.; Wondisford, F.E., *et al.* Metformin improves mitochondrial respiratory activity through activation of ampk. *Cell Rep* **2019**, *29*, 1511-1523 e1515.
307. Perl, A. Mtor activation is a biomarker and a central pathway to autoimmune disorders, cancer, obesity, and aging. *Ann N Y Acad Sci* **2015**, *1346*, 33-44.

308. Bonaguro, L.; Schulte-Schrepping, J.; Ulas, T.; Aschenbrenner, A.C.; Beyer, M.; Schultze, J.L. A guide to systems-level immunomics. *Nature Immunology* **2022**, *23*, 1412-1423.
309. Akl, M.R.; Nagpal, P.; Ayoub, N.M.; Tai, B.; Prabhu, S.A.; Capac, C.M.; Gliksman, M.; Goy, A.; Suh, K.S. Molecular and clinical significance of fibroblast growth factor 2 (fgf2 /bfgf) in malignancies of solid and hematological cancers for personalized therapies. *Oncotarget* **2016**, *7*, 44735-44762.
310. Baker, M. 1,500 scientists lift the lid on reproducibility. *Nature* **2016**, *533*, 452-454.

“An example of perfection in nature is the cockroach. It was living six million years before us, and it may outlast us by that long. The brain of a cockroach is a splendid little engine. It doesn't evolve and it doesn't need to. The human brain is a disaster from the point of view of perfection--great intellectual power combined with primitive emotional reactions. Human beings today are living with terrible risks of their own creation--nuclear weapons, the exploitation of natural resources, the great disparity between the wealthy and the poor. Our brains will probably bring us to destruction, but we also have the possibility of growth, evolution. I prefer being a human. We shouldn't always look for perfection, in nature or our lives.”

— Rita Levi-Montalcini

Exploration intégrative multi-omique et phénomique dans les maladies lysosomales

Résumé : Les maladies héréditaires du métabolisme (MHM) sont des affections génétiques résultant d'anomalies au sein de voies biochimiques spécifiques. Elles sont dues à un déficit d'une enzyme, de son cofacteur ou d'un transporteur. La médecine des systèmes (MS) est un moteur moderne pour la recherche biomédicale en intégrant des données multimodales pour mieux comprendre les réseaux biologiques et améliorer la stratification des patients. Grâce à des stratégies basées sur la valorisation des données biomédicales et l'expertise clinique, la MS promet d'améliorer la prévention, diagnostic et le traitement des MHM. Dans cette thèse, nous avons adopté des approches multiomique et phénomique combinées à des stratégies d'apprentissage automatique et d'analyse des réseaux pour caractériser deux maladies lysosomales, maladie de Fabry (MF) et maladie de Gaucher (MD). Le premier projet a porté sur la MF et a permis d'identifier des profils omiques plasmatiques (métabolites et protéines) discriminant des patients Fabry. De plus, nous avons observé un remodelage métabolique de plusieurs processus biologiques, tels que les voies médiées par les cytokines, la matrice extracellulaire et le protéome vacuolaire/lysosomal. Nos découvertes mettent en évidence l'implication des cytokines pro-inflammatoires dans la pathogenèse de la MF, ainsi que la réorganisation de la matrice extracellulaire. Le deuxième projet a porté sur la MG de type 1. Les résultats ont révélé des empreintes biologiques plasmatiques. L'étude a révélé une perturbation significative du métabolisme des lipides, de l'inflammation et de la fonction mitochondriale, potentiellement attribuable au stress du réticulum endoplasmique, à un trafic lipidique altéré et à l'inhibition de l'autophagie. Dans le cadre de la thèse, nous avons évalué les performances analytiques d'un nouveau dispositif volumétrique de collecte de sang par micro-échantillonnage comparativement au sang séché sur buvard pour le dosage de l'activité des enzymes lysosomales. Par ailleurs, une méthode à haut débit a été développée pour évaluer les lysosphingolipides (biomarqueurs pour les sphingolipidoses). En résumé, une approche intégrative multiomique et phénomique a été utilisée pour étudier deux sphingolipidoses, révélant des empreintes plasmatiques biologiques spécifiques.

Mots clés : Maladies héréditaires du métabolisme, maladies lysosomales, sphingolipidoses, omiques, métabolomique, protéomique, spectrométrie de masse, chromatographie liquide, médecine des systèmes, intelligence artificielle.

Exploration intégrative multi-omique et phénomique dans les maladies lysosomales

Abstract: Inherited metabolic diseases (IMDs) are genetic disorders arising from abnormalities within specific biochemical pathways. These disorders result from the deficiency of an enzyme, its cofactor, or a transporter. Systems medicine (SM) is advancing biomedical research and healthcare by integrating multimodal data to better understand biological networks and improve patient stratification. Through data-driven strategies, SM is promising to enhance disease diagnosis, treatment, and prevention of IMDs. In this thesis, we employed a deep multiomics and phenomics approach combined with machine learning and network-based strategies to characterize tow lysosomal diseases, a sub-group of IMDs. The first project studied Fabry disease (FD) and enabled the identification of plasma omics-based profiles (metabolites and proteins) that unambiguously separated FD patients from controls. Furthermore, we observed a tissue-wide functional remodeling of several processes, such as cytokine-mediated pathways, extracellular matrix, and vacuolar/lysosomal proteome. Our findings highlight the pro-inflammatory cytokines' involvement in FD pathogenesis along with extracellular matrix remodeling. The second project studied type 1 Gaucher disease (GD). The results showed promising plasma biological imprints in type 1 GD. The study revealed a significant disruption in lipid metabolism, inflammation, and mitochondrial function, potentially, attributed to endoplasmic reticulum stress, impaired lipid trafficking, and inhibition of autophagy. As part of this thesis, we evaluated the analytical performance of a new volumetric micro-sampling blood collection device compared with dried blood spot for the assessment of lysosomal enzyme activity. In addition, a high-throughput method was developed to assess lysosphingolipids (biomarkers for sphingolipidosis). In summary, an integrative multiomics and phenomics approach was used to investigate two sphingolipidoses, revealing distinct biological imprints.

Keywords**:** Inborn errors of metabolism, lysosomal diseases, sphingolipidoses, omics, metabolomics, proteomics, mass spectrometry, liquid chromatography, systems medicine, artificial intelligence